



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**(21)(22) Заявка: **2012128312/15, 02.07.2012**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
**02.07.2012**

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: **02.07.2012**(45) Опубликовано: **27.12.2013** Бюл. № 36

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **RUBBO P.A. et al. Multicytokine detection improves latent tuberculosis diagnosis in health care workers. // J Clin Microbiol. - 2012, May, 50(5), p.1711-7. DRUSZCZYNSKA M. et al. Latent M. tuberculosis infection-pathogenesis, diagnosis, treatment and prevention strategies. // Polish Journal of Microbiology. - 2012, V.61, №1, p.3-10. EP 1674868 A1, 28.06.2006.**

Адрес для переписки:

**197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,  
ФБУН НИИ эпидемиологии и  
микробиологии имени Пастера, ОНМИ, Г.Л.  
Никифоров**

(72) Автор(ы):

**Васильева Елена Викторовна (RU),  
Вербов Вячеслав Николаевич (RU),  
Тотолян Арег Артемович (RU),  
Лядова Ирина Владимировна (RU),  
Никитина Ирина Юрьевна (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**Федеральное бюджетное учреждение науки  
"Санкт-Петербургский научно-  
исследовательский институт эпидемиологии  
и микробиологии им. Пастера" (ФБУН НИИ  
эпидемиологии и микробиологии имени  
Пастера) (RU)**

**(54) СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО ИНФИЦИРОВАНИЯ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к клинической медицине, а именно к способу диагностики туберкулезного инфицирования. Сущность способа состоит в том, что осуществляют взятие периферической крови пациента, проводят инкубацию цельной крови с микобактериальными антигенами, представляющими собой смесь белков ESAT-6, CFP-10, TB 7.7, и без них, центрифугирование проб с отделением плазмы, определение в супернатантах содержание IL-2 и диагностирование наличия заболевания по разнице его концентраций в пробах по

сравнению с выбранной пороговой величиной. В качестве пороговой величины устанавливают разницу в концентрации IL-2 между антигениндуцированной и спонтанной его продукцией 36 пг/мл и при разнице в концентрации 36 пг/мл и более делают вывод о туберкулезном инфицировании, а при значении ниже порогового - об отсутствии инфицирования. Использование заявленного способа позволяет сократить число сомнительных результатов и повысить надежность диагностики туберкулезного инфицирования. 2 табл., 3 ил., 5 пр.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2012128312/15, 02.07.2012**(24) Effective date for property rights:  
**02.07.2012**

Priority:

(22) Date of filing: **02.07.2012**(45) Date of publication: **27.12.2013 Bull. 36**

Mail address:

**197101, Sankt-Peterburg, ul. Mira, 14, FBUN NII  
ehpidemiologii i mikrobiologii imeni Pastera,  
ONMI, G.L. Nikiforj**

(72) Inventor(s):

**Vasil'eva Elena Viktorovna (RU),  
Verbov Vjacheslav Nikolaevich (RU),  
Totoljan Areg Artemovich (RU),  
Ljadova Irina Vladimirovna (RU),  
Nikitina Irina Jur'evna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe bjudzhetnoe uchrezhdenie nauki  
"Sankt-Peterburgskij nauchno-issledovatel'skij  
institut ehpidemiologii i mikrobiologii im.  
Pastera" (FBUN NII ehpidemiologii i  
mikrobiologii imeni Pastera) (RU)**

**(54) DIAGNOSTIC TECHNIQUE FOR TUBERCULOSIS INFECTION**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: patient's peripheral blood is sampled; whole blood is incubated with and without mycobacterial antigens representing a mixture of the proteins ESAT-6, CFP-10, TB 7.7; the samples are centrifuged to recover plasma; the supernatant is examined for the IL-2 content, and the presence of the disease is diagnosed by a concentration difference in the samples as compared to the specified threshold value. The threshold value is the

IL-2 concentration difference 36 pg/ml of the antigen-induced and spontaneous production, and if the concentration difference is 36 pg/ml and more, the tuberculosis infection is stated, while the values below the threshold show the absence of infection.

EFFECT: using the declared method enables the number of controversial results and improves the diagnostic reliability of the tuberculosis infection.

2 tbl, 3 dwg, 4 ex

Изобретение относится к клинической медицине, точнее к фтизиатрии и иммунологии, а именно к ускоренным способам диагностики инфицирования больных туберкулезом легких (ТБ).

5 В последние годы во многих странах, независимо от уровня их экономического развития, отмечается увеличение заболеваемости и распространения туберкулеза, который все чаще упоминается среди так называемых "возрождающихся" инфекций. Для предотвращения распространения туберкулеза актуальное значение приобретает возможность диагностики этого заболевания, в частности, выявления контингента, 10 больного туберкулезом в активной форме, и представляющего опасность для окружающих. Это особенно актуально в условиях широкого распространения латентной формы туберкулеза, не представляющей серьезной опасности для окружающих и ограниченных возможностях лечебных учреждений.

15 В настоящее время наиболее широко распространена диагностика заболеваний с использованием пробы Манту и, при наличии положительной реакции, бактериологических методов анализа. Однако, результат постановки внутрикожной аллергической пробы Манту учитывают через 72 часа, причем в связи с высоким процентом инфицированности населения ТБ частота подтверждения диагноза 20 заболевания в разных возрастных группах составляет от 25 до 50% (Бородулина Е.А., Бородулин Б.Е. Дифференциальная диагностика поствакцинальной и инфекционной туберкулиновой аллергии у детей с atopическими заболеваниями. // Проблемы туберкулеза и болезней легких, - №1, 2006, - с.9-12). На результаты пробы Манту оказывают влияние предыдущая вакцинация, неконтролируемый прием антибиотиков 25 широкого спектра действия и наличие сопутствующей патологии, в том числе аллергопатологии (Аксенова В.А., Овсянкина Е.С., Александрова Т.М. Методы контроля качества работы при массовой туберкулинодиагностике. // Проблемы туберкулеза. - 2002, №2. - С.3-5). Недостатками бактериологических методов являются 30 низкая частота выявления *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) и длительный рост МБТ на питательных средах (до 30 дней). Все перечисленное определяет сложность клинико-лабораторной диагностики туберкулеза и обуславливает необходимость разработки более быстрых и надежных способов лабораторной диагностики туберкулезной инфекции.

35 Известен ускоренный способ бактериологической диагностики туберкулеза по методу Прайса, позволяющий выделить и идентифицировать МБТ через 7-14 дней (Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. / Под ред. А.А.Воробьева. М.: Медицинское информационное агенство, 2004. - 671 с.), однако и эти сроки также 40 достаточно велики, а надежность метода достаточно низка.

Широко используется для диагностики туберкулеза метод иммуноферментного анализа (ИФА), позволяющий определять наличие туберкулезной инфекции по концентрации (титру) специфических иммуноглобулинов классов А, М, G, Е (Авдеенко 45 В.Г. с соавт. Повышение эффективности иммунодиагностики туберкулеза путем применения моноклональных антител против иммуноглобулина G человека. / Клиническая лабораторная диагностика. - 1999, №6. - С.22-35; Авдеенко В.Г. с соавт. Противотуберкулезные IgE-антитела. Иммунодоминантные антигены. // Проблемы туберкулеза. - 2002, ч.1, №2. - С.30-33). Недостатком данного способа является 50 необходимость повторного исследования сывороток крови через 10-14 дней для выявления нарастания титра антител к МБТ, свидетельствующего об активном инфекционном процессе в организме.

Общим недостатком вышеперечисленных методов является длительность анализа,

их недостаточная селективность, невозможность подразделить контингент больных на пациентов с латентной и активной формами туберкулеза, что не позволяет своевременно проводить активные мероприятия с больными второй из вышеперечисленных групп.

5 Одним из наиболее перспективных направлений диагностики туберкулеза (ТБ) является проведение анализа *in vitro* с использованием антигенов, специфических для *Mycobacterium tuberculosis*. Как показывают обобщенные аналитические данные, клеточные тесты *in vitro* обладают высокой специфичностью: у 99% вакцинированных  
10 лиц наблюдаются отрицательные реакции, а у 78% больных туберкулезом - положительные реакции (Menzies T. Meta-analysis: New tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research march / T. Menzies, M. Pai, G. Comstock // *Annals. Intern. Med.* - 2007. - Vol.146 - P.340-354; Pai M. T-cell based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update / M.Pain,  
15 A.Zwerling, D.Menzies // *Arm. Intern. Med.* - 2008. - Vol.149. - P.177-184).

В настоящее время прошел сертификацию тест Т-SPOT, являющейся экспресс-аналогом стандартной диагностики туберкулеза на основе кожных реакций замедленного типа (Кожная проба с препаратом "ДИАСКИНТЕСТ"-новые  
20 возможности идентификации туберкулезной инфекции / Под ред. Академика РАН и РАМН М.А.Пальцева. Второе издание, переработанное и дополненное. - М.: Издательство "Шико", 2011. 256 с). Способ иммунологической диагностики и мониторинга туберкулезной инфекции Т-SPOT (Oxford Immunotec, USPTO Applicaton №20070196878), основан на определении количества клеток, продуцирующих  
25 интерферон-гамма (IFN $\gamma$ ) в присутствии таких специфических индукторов, как белки ESAT-6 (ранний секретируемый антиген) и CFP-10 (белок культурального фильтра), которые отсутствуют у микобактерий вакцинного штамма *M. bovis* (BCG) и большинства нетуберкулезных микобактерий окружающей среды, за  
30 исключением *Mycobacterium marinum* и *Mycobacterim kansasii*. При этом предварительная БЦЖ-вакцинация не оказывает значительного влияния на результаты индукции IFN $\gamma$  *in vitro*, а повышение его количества свидетельствует о наличии туберкулезной инфекции (Мордовская Л.И Индукция IFN $\gamma$  в образцах  
35 цельной венозной крови *in vitro* - тест для определения туберкулезного инфицирования детей и подростков / Л.И. Мордовская, М.А. Владимирский, В.А. Аксенова, Е.Е. Ефремов, Г.И. Игнашенкова, Т.Н. Власик // *Проблемы туберкулеза и болезней легких* - 2009. - №6. - С.19-24).

Основными недостатками этого теста является его сложность и трудоемкость,  
40 необходимость культивирования клеток в стерильных условиях, а также невозможность на его основе диагностировать носит ли заболевание латентный или активный характер.

Наиболее близким по своей сущности к методу, предлагаемому в данном изобретении, является способ, основанный на измерении уровня продукции IFN $\gamma$   
45 клетками периферической крови при стимуляции образцов крови антигенами микобактерий (RUBBO P.F. et al Multicytokine detection improves latent tuberculosis diagnosis in health care workers. *J. Clin Microbiol.* 2012, may, 50(5), p.1711-7). Способ диагностики включает в себя взятие крови у пациента, последующее культивирование  
50 образцов цельной крови, стабилизированной гепарином с микобактериальными антигенами, которые представляют собой смесь белков ESAT-6, CFP-10 и ТВ 7.7 и без них методом иммуноферментного анализа (ИФА). После окончания культивирования пробирки центрифугируют, отбирают плазму и определяют в них

содержание цитокина (IL-2, IFN $\gamma$ ) методом ИФА и диагностируют наличие заболевания по разнице его концентраций в пробах по сравнению с выбранной пороговой величиной. При этом определение IFN $\gamma$  проводят с использованием тест-системы "QuantiFERON-TB Gold In-Tube" ("Cellestis", Австралия). Результаты

5 оцениваются с помощью программного обеспечения QFT 2.62. Результаты теста считаются положительными, если разность между антигениндуцированной и спонтанной продукцией IFN $\gamma$  более 0,35 МЕ/мл.

Основным недостатком этого метода является то, что диапазон измеряемых

10 концентраций IFN $\gamma$  очень низкий (пороговое значение 0,35 МЕ/мл или 17,5 пг/мл) и для его количественного обнаружения требуются очень чувствительные и дорогостоящие тест-системы. Кроме того, очень низкое пороговое значение увеличивает количество неопределенных результатов. Так, в недавней публикации [Pai.M Serial testing of Health Care Workers for Tuberculosis using Interferon-

15 Gamma. Assay / M. Pai, R. Joshi, S. Dogra, D.K. Mendiratta, P. Narang, S. Kalantri, A.L. Reingold, J.M. Colford Jr, L.W. Riley, and Menzies // Am. J. Respir. Crit Care Med. - 2006. - Vol.174(3). - P.349-355.], основанной на применении теста "QuantiFERON-TB Gold In-Tube"(QFN-GIT) было показано, что существует значительный риск

20 ложноположительных и ложноотрицательных результатов теста. В свою очередь при использовании IL-2 авторами было выбрано пороговое значение на малой выборке обследуемых.

Задачей изобретения являлась разработка способа диагностики туберкулезного инфицирования, позволяющего повысить его надежность.

25 Техническая задача решалась в результате нахождения биомаркера ТБ с высоким пороговым значением и его использованием для обеспечения надежности результатов.

Технический результат достигался тем, что цельную кровь инкубировали в пробирках с микобактериальными антигенами - смесью белков ESAT-6, CFP-10 и

30 TB 7.7 и без антигенов, определяли содержание интерлейкина-2 (IL-2) в обеих пробах и разность между антигениндуцированной и спонтанной продукцией сопоставляли с пороговым значением и при его достижении или превышении диагностировали наличие туберкулезного инфицирования, а при значении ниже порогового - его отсутствие. В качестве порогового значения, при котором достигается

35 чувствительность выявления инфицированных лиц 86% и 95%, была определена величина 36 пг/мл.

Как показали проведенные эксперименты, использование IL-2 в качестве биомаркера позволяет работать в существенно более широком диапазоне

40 определяемых концентраций IL-2, что позволяет избежать получения сомнительных результатов и повысить надежность диагностики.

Предлагаемый способ осуществляют следующим образом. Образцы цельной крови (1000мкл), стабилизированной гепарином (50ед/мл), культивируют при 37 $^{\circ}$ C в течение 18-24 часов в нулевой контрольной пробирке и в присутствии смеси антигенов

45 микобактерий ESAT-6, CFP-10, TB 7.7. (Как правило, используют смесь антигенов из тест-системы "QuantiFERON-TB Gold In-Tube" или других аналогичных тест-систем). После окончания культивирования пробы центрифугируют, отделяют плазму и определяют в ней количество IL-2 с помощью общепринятых методик

50 мультиплексного или иммуноферментного (ИФА) анализа. В частности, определение проводится с помощью технологии xMap при использовании магнитных частиц "Milliplex Mag"n анализатора "MagPix" ("Millipore", США). После чего, вычисляют разность между антигениндуцированной и спонтанной продукцией IL-2 и

при значении 36 пг/мл и выше делают вывод о туберкулезном инфицировании. При значении ниже порогового констатируют отсутствие инфицирования микобактериями.

Для оценки надежности заявляемого способа были проведены клинические исследования 54 больных с преимущественно инфильтративным, туберкулезом легких до начала специфической противотуберкулезной терапии (n=54) и 47 лиц с латентной формой туберкулезной инфекции (ЛТБИ), для которых тест с гамма-интерфероном дает, как правило, значения, близкие к пороговой величине. (Последняя группа была представлена в основном сотрудниками стационаров противотуберкулезных учреждений).

У всех лиц, включенных в исследование (n=101) был проведен тест по методике ближайшего аналога (с использованием тест-системы QuantiFERON-TB Gold In-Tube) и оценка инфицирования по концентрации гамма-интерферона. Положительный результат (QFN+) был получен у 36 больных с активной формой ТБ и 26 лиц с ЛТБИ, отрицательный результат (QFN-) был получен у 18 больных и 21 лица с ЛТБИ. На данном этапе больные с активной формой ТБ и лица с ЛТБИ были разбиты на 2 группы в зависимости от результата теста: QFN+ и QFN-.

В плазме крови изучалась спонтанная (NIL) и антигениндуцированная (AG) продукция интерлейкина-2. Для статистических расчетов использовали значения спонтанной (NIL) продукции исследуемых биомаркеров, антигениндуцированной (AG) продукции и разности между ними (AG-NIL). Статистическую обработку проводили с помощью программы SPSS (версия 13.0). Для сравнения групп использовали критерий Манна - Уитни. Для сравнения диагностической значимости были построены характеристические ROC - кривые). Для оценки взаимосвязи между продукцией IL-2<sub>AG-NIL</sub> и IFN $\gamma$ <sub>AG-NIL</sub> использовали коэффициент корреляции Спирмена (r=0,86, p<0,005).

На фиг.1 приведены характеристические кривые операционной характеристики при сравнении группы QFN+и QFN-.

На фиг.2 приведена корреляционная зависимость между IL-2 и IFN-у при совместном анализе больных и контактных лиц. (n=101).

На фиг.3 приведены диаграммы значений IFN- $\gamma$ <sub>AG-NIL</sub> и IL-2<sub>AG-NIL</sub> в группе QFN+ и QFN-, демонстрирующие разброс количественных значений при использовании обсуждаемых биомаркеров.

Для сравнения тестов с использованием IL-2 и IFN $\gamma$  по диапазону измеряемых концентраций были рассчитаны медианы с указанием межквартильного расстояния для группы QFN+, QFN-. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1			
Количественные значения медиан в обследуемы группах			
Показатель	Все (n=101)	QFN+(n=62)	QFN-(n=39)
1. IFN- $\gamma$ <sub>AG-NIL</sub> (QFN-IT), МЕ/мл			
Me [Q1;Q3]	0,74 [0,11;3,70]	2,6 [0,94;8,65]	0,040 [-0,010;-0,170]
Минимальное значение	-0,3	0,4	-0,3
Максимальное значение	97,39	97,39	0,34
2. IL-2 <sub>AG-NIL</sub> , пг/мл			
Me[Q1;Q3]	48,49 [5,29;156,60]	130,70 [57,73;252,46]	1,4 [0;7,21]
Минимальное значение	-3	0	-3
Максимальное значение	2255,78	2255,78	107,28

В связи с тем, что специфичность и чувствительность метода связаны между собой обратной связью, то, используя кривую операционной характеристики, в качестве

порогового значения была выбрана оптимальная величина, равная 36 пг/мл (таблица 2). При этом значении пороговой величины достигается чувствительность выявления инфицированных лиц 86% (ДИ 74,22-93,14) и специфичность выявления лиц неинфицированных лиц 95% (ДИ 82,68-99,37).

5

Специфичность, %	Чувствительность, %	Пороговое значение, пг/л
	97	
90	89	28,0
95	86	36
98	66	72

10

Полученные результаты показали преимущество заявляемого способа по сравнению с аналогами, особенно в случаях, когда разность между антигениндуцированной и спонтанной продукцией (AG-NIL) для IFN $\gamma$  была близка к пороговому значению. Это обусловлено тем, что для биомаркера IL-2 диапазон измеряемых концентраций существенно выше, чем для IFN $\gamma$ : от 0,3 до 97,39 МЕ/мл для IFN $\gamma$ <sub>AG-NIL</sub> и от 48,49 до 2255,78 пг/мл для IL-2<sub>AG-NIL</sub> (фиг.3).

20 Сущность и преимущества способа иллюстрируются следующими примерами.

Пример 1. Больная Ф. Диагноз: инфильтративный туберкулез верхней доли правого легкого. Результат посева мокроты отрицательный. Результат теста на инфицирование M. tuberculosis (QuantiFERON-TB Gold in-tube): положительный (IFN- $\gamma$ <sub>AG-NIL</sub>=0,94 МЕ/мл при пороговом значении 0,35 МЕ/мл). Содержание IL-2<sub>AG-NIL</sub> в полученном супернатанте 55 пг/мл (>36 пг/мл). Результат положительный.

25 Заключение: больной инфицирован M. tuberculosis.

Пример 2. Сотрудник противотуберкулезного диспансера Х. Результат теста на инфицирование M. tuberculosis (QuantiFERON-TB Gold in-tube): положительный (IFN- $\gamma$ <sub>AG-NIL</sub>=0,37 МЕ/мл при пороговом значении 0,35 МЕ/мл). Полученное значение очень близко к пороговому.

30 Содержание IL-2<sub>AG-NIL</sub> в полученном супернатанте 28 пг/мл при пороговом значении 36 пг/мл. Результат отрицательный.

35 Результаты рентгенологического обследования: изменений в легочной ткани не выявлено. Жалоб нет. Клинические признаки туберкулеза отсутствуют. Заключение: отсутствие инфицирования M. tuberculosis

Пример 3. Сотрудник противотуберкулезного диспансера Х. Результат теста на инфицирование M. tuberculosis (QuantiFERON-TB Gold in-tube): положительный (IFN- $\gamma$ <sub>ag-nil</sub>=0,56 МЕ/мл при пороговом значении 0,35 МЕ/мл. Содержание IL-2<sub>Ag-nil</sub> в полученном супернатанте 175 пг/мл (>36 пг/мл). Результат положительный.

40 Заключение: вероятность инфицирования M.tuberculosis.

Пример 4. Сотрудник противотуберкулезного диспансера Х. Результат теста на инфицирование M. tuberculosis (QuantiFERON-TB Gold in-tube): отрицательный (IFN- $\gamma$ <sub>ag-nil</sub>=0,34 МЕ/мл). Пороговое значение 0,35 МЕ/мл. Полученное значение очень близко к пороговому. Содержание IL-2<sub>Ag-nil</sub> в полученном супернатанте 72 пг/мл (превышение порогового значения 36 пг/мл в 2 раза). Результат положительный.

45 Заключение: вероятность инфицирования M. tuberculosis.

50 Пример 5. Больной 3. Диагноз: диссеминированный ТБ в фазе инфильтрации и распада. Результат посева мокроты положительный. Результат теста на инфицирование M. tuberculosis (QuantiFERON-TB Gold in-tube): отрицательный (IFN-

$\gamma_{ag-nil}=0,21$  МЕ/мл при пороговом значении 0,35 МЕ/мл). Содержание IL-2<sub>AG-nil</sub> в полученном супернатанте 36 пг/мл (равно пороговому значению 36 пг/мл). Результат положительный.

5 Таким образом, использование IL-2 в качестве биомаркера позволяет работать в расширенном диапазоне определяемых концентраций, что позволяет избежать получения сомнительных результатов. При анализе небольшого количества периферической крови способ обладает высокой диагностической значимостью в диагностике туберкулезной инфекции. Несомненным преимуществом является  
10 удобство для пациента, так как для оценки результатов не требуется повторного посещения врача. Заявляемый способ может использоваться как самостоятельно, так и вместе со способом, основанным на диагностировании гамма-интерферона для уточнения диагноза, особенно при его концентрации в пробе близкой к пороговой.

15

#### Формула изобретения

Способ диагностики туберкулезного инфицирования, включающий в себя взятие периферической крови пациента, инкубацию цельной крови с микобактериальными антигенами, представляющими собой смесь белков ESAT-6, CFP-10, TB 7.7, и без них,  
20 центрифугирование проб с отделением плазмы, определение в супернатантах содержания IL-2 и диагностирование наличия заболевания по разнице его концентраций в пробах по сравнению с выбранной пороговой величиной, отличающийся тем, что в качестве пороговой величины устанавливают разницу в  
25 концентрации IL-2 между антигениндуцированной и спонтанной его продукцией 36 пг/мл и при разнице в концентрации 36 пг/мл и более делают вывод о туберкулезном инфицировании, а при значении ниже порогового - об отсутствии инфицирования.

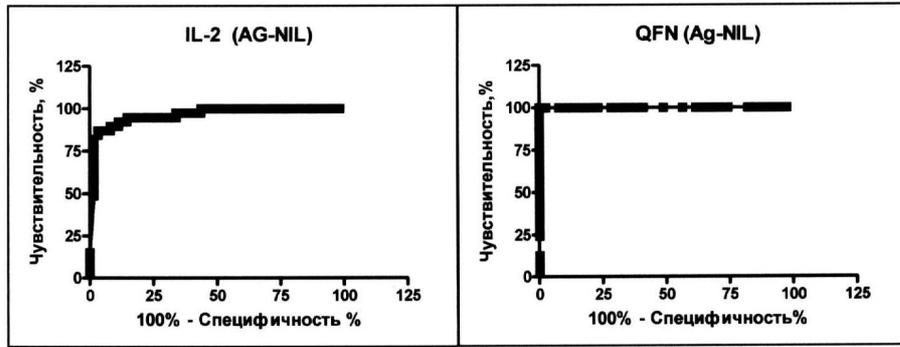
30

35

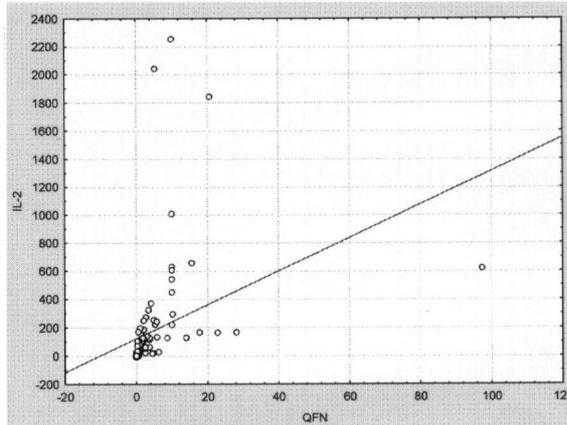
40

45

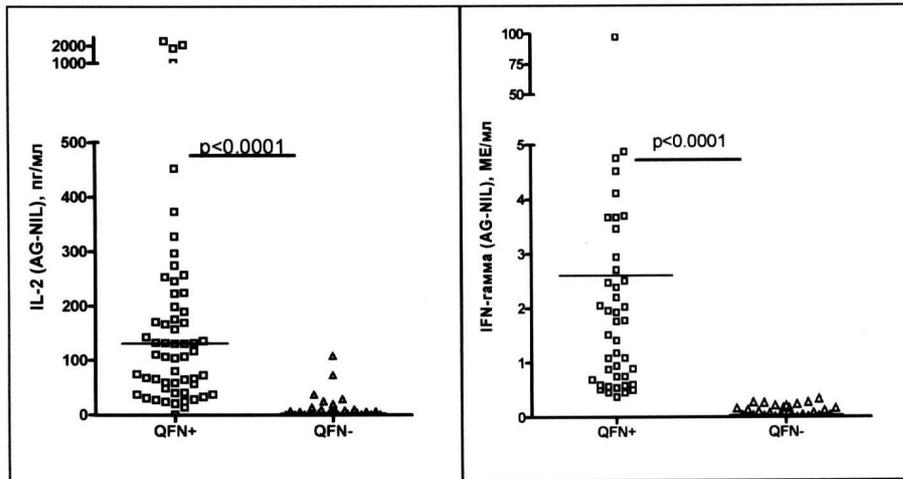
50



Фиг.1



Фиг.2



Фиг.3