

Автореферат диссертации **Камаевой Натальи Геннадьевны** на соискание учёной степени кандидата медицинских наук

Камаева Наталья Геннадьевна

Дифференциальная диагностика оститов туберкулёзной и БЦЖ-этиологии у детей

14.01.16

Медицинские науки

Д 001.052.01

Учреждение Российской академии медицинских наук «Центральный научно-исследовательский институт туберкулёза РАМН» (107564, Москва, Яузская аллея, д.2)

Тел. 8(495)785-90-05

E-mail: citramn@online.ru

Предполагаемая дата защиты диссертации – 22.06.2010

*На правах рукописи*

КАМАЕВА

Наталья Геннадьевна

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ОСТИТОВ  
ТУБЕРКУЛЁЗНОЙ И БЦЖ-ЭТИОЛОГИИ У ДЕТЕЙ

14.01.16 – Фтизиатрия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2010

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИИ

### Актуальность темы

В Свердловской области последние 10 лет наблюдается увеличение количества туберкулёзных оститов у детей, при этом количество случаев туберкулёза крупных суставов и позвоночника остаётся минимальным. Подобная тенденция отмечается и в других регионах. Кроме того, среди оститов возросла доля поражений мелких и плоских костей – грудины, рёбер, костей стопы – 18% (Аксёнова В.А., Мушкин А.Ю., Коваленко К.Н., Казьмина Е.А., Бакин М.Н., Исаева Н.Ю., Фолина Е.В., 2007; Мушкин А.Ю., Коваленко К.Н., Малярова Е.Ю., Ватутина В.В., Евсеев В.А., Бакин М.Н., Першин А.А., Маламашин Д.Б., Вересова Л.А., 2009; Кривошеева Ж.И., Морозкина Н.С., Кривонос П.С., Емельянова Н.А., Бабченко И.В., Марутко С.В., 2009; Мушкин А.Ю., 2007).

Единая точка зрения на данную проблему отсутствует. По мнению одних авторов современная высокая заболеваемость костным туберкулёзом детей Свердловской области является показателем эпидемиологического неблагополучия (Нечаева О.Б., Попкова Г.Г., Скачкова Е.И., Подымова А.С., 2004). По другим данным, участвовавшие случаи туберкулёзных костных поражений у детей являются осложнениями противотуберкулёзной вакцинации II категории – БЦЖ-оститами, которые могут составлять до 75% среди всех случаев локальных туберкулёзных поражений костей у детей. (Аксёнова В.А., Сенькина Т.И., 2001; Аксёнова В.А., Мушкин А.Ю., Коваленко К.Н., Казьмина Е.А., Бакин М.Н., Исаева Н.Ю., Фолина Е.В., 2007; Гринберг Л.М., 2008; Коваленко К.Н., Мушкин А.Ю., Ватутина В.В., Оттен Т.Ф., 2004; Мушкин А.Ю., Коваленко К.Н., 2004; Мушкин А.Ю., Казьмина Е.А., Коваленко К.Н., 2006; Мушкин А.Ю., 2007).

Вопрос верификации клинического диагноза БЦЖ-остита у детей особо важен с учётом последующих юридических и социальных мероприятий. *M. bovis* достаточно трудно дифференцировать с другими штаммами *M. tuberculosis complex* рутинными методами, в частности культуральным, с

последующим проведением комплекса биохимических тестов. Кроме того, культуральный метод не позволяет дифференцировать вакцинные штаммы *M. bovis* BCG от вирулентных штаммов *M. bovis* (Альварес Фигероа М.В., Долгова Е.А., Шипулин Г.А., 2007; Оттен Т.Ф., Потапова Ю.С., Малярова Е.Ю., Мушкин А.Ю., 2009). Роль молекулярно-генетических методов верификации БЦЖ-оститов (выявление вакцинного штамма методом ПЦР) в условиях тотальной противотуберкулёзной вакцинации признается не всеми отечественными авторами, однако в зарубежных публикациях и единичных отечественных метод ПЦР назван абсолютно достоверным (Bedwell J, Kairo SK, Behr MA, Bygraves JA, 2001; Scorpio A, Collins D, Whipple D, Cave D, Bates J, Zhang Y, 1997; Talbot E.A., 1997; Yeboah-Manu D, Yates MD, Wilson SM., 2001), позволяющим в короткие сроки дифференцировать виды микобактерий туберкулёзного комплекса с высокой специфичностью (Альварес Фигероа М.В., Долгова Е.А., Шипулин Г.А., 2007).

Проблема диагностики БЦЖ-оститов до настоящего времени остаётся до конца нерешённой, прежде всего из-за особенностей течения заболевания и трудности лабораторного выявления возбудителя, вследствие чего в отечественной литературе отсутствуют чёткие статистические данные о динамике заболеваемости поствакцинальными оститами. Всё это определяет актуальность обсуждаемой проблемы, цель и задачи данной работы.

**Цель работы:** совершенствование дифференциальной диагностики туберкулёзных и БЦЖ-оститов у детей на основании комплексной оценки медико-социальных, эпидемиологических, клинических и молекулярно-генетических характеристик.

#### **Задачи исследования**

1. Определить динамику заболеваемости оститами БЦЖ-этиологии детей Свердловской области за 10 лет.

2. Изучить медико-социальные, эпидемиологические и клинико-лабораторные особенности туберкулёзных и поствакцинальных оститов у детей.

3. Оценить значение молекулярно-генетических методов исследования в дифференциальной диагностике туберкулёзных и БЦЖ-оститов у детей.

4. Разработать алгоритмы дифференциальной диагностики поствакцинальных и туберкулёзных оститов.

### **Научная новизна**

Впервые дана сравнительная характеристика поствакцинальных и туберкулёзных оститов у детей на основании комплексной оценки медико-социальных, эпидемиологических, клинико-лабораторных, морфологических, бактериологических особенностей и молекулярно-генетических данных.

Впервые показана возможность выделения генома *M. bovis* BCG из архивного гистологического материала в виде парафиновых блоков.

Определено значение молекулярно-генетических методов исследования в дифференциальной диагностике туберкулёзных и БЦЖ-оститов.

Разработаны алгоритмы обследования детей с костными очагово-деструктивными поражениями с морфологической картиной продуктивно-некротического туберкулёза, способствующие повышению эффективности дифференциальной диагностики поствакцинальных и туберкулёзных оститов.

### **Практическая значимость**

Комплексный анализ полученных данных о течении туберкулёзных и БЦЖ-оститов выявил их эпидемиологические, медико-социальные, клинические особенности и позволил сформировать объективное представление о заболеваемости детей БЦЖ-оститами.

Показана информативность ПЦР-исследования операционного, архивного гистологического материала, полученных из операционного

материала культур, проводимого для верификации этиологии туберкулёзных и БЦЖ-оститов у детей.

Выявлением отсутствия достоверных различий между верифицированными и не верифицированными поствакцинальными оститами доказана правомочность диагностики БЦЖ-оститов, основанной на комплексе клинико-эпидемиологических критериев.

Предложенные алгоритмы способствуют повышению эффективности дифференциальной диагностики туберкулёзных оститов и костных осложнений противотуберкулёзной вакцинации.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. За последние 10 лет отмечен рост количества оститов у детей с морфологическим субстратом туберкулёзного воспаления. Большинство случаев оститов являются поствакцинальными осложнениями, и, лишь минимальное количество – костным туберкулёзом.

2. Между оститами БЦЖ-этиологии по клинико-эпидемиологическим критериям и оститами у детей, БЦЖ-этиология которых доказана выявлением методом ПЦР специфических фрагментов генома ДНК *M. bovis* BCG в материале костно-деструктивных очагов, нет достоверных различий по медико-социальным, эпидемиологическим и клиническим характеристикам.

3. БЦЖ-оститы по медико-социальным, эпидемиологическим, клиническим (интоксикационный синдром), лабораторным характеристикам существенно отличаются от классического туберкулёза.

4. При проведении молекулярно-генетического исследования (ПЦР) материала костно-деструктивных очагов возможно выявление специфических фрагментов генома ДНК патогенных микобактерий или микобактерий вакцинного штамма, что позволяет верифицировать туберкулёзную или поствакцинальную этиологию оститов у детей.

5. Выявление ДНК *M. bovis* BCG в архивном гистологическом материале залитым в парафин даёт возможность проводить отсроченную уточняющую диагностику БЦЖ-оститов у детей.

### **Реализация результатов работы**

Основные положения диссертации используются в практической работе государственного учреждения здравоохранения «Свердловский областной противотуберкулёзный диспансер», детского диспансерно-консультативного отделения ФГУ «Уральский НИИ фтизиопульмонологии Росмедтехнологий», включены в учебную программу педиатрического факультета и послевузовского дополнительного образования врачей-фтизиатров кафедры фтизиатрии и пульмонологии ГОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия Росздрава».

### **Апробация диссертации**

Материалы диссертации представлены и обсуждены на VIII Российском съезде фтизиатров (Москва, 2007); на конференции для врачей-фтизиатров Свердловской области «Осложнения противотуберкулёзной вакцинации» (Екатеринбург, 2007); на XVIII Национальном Конгрессе по болезням органов дыхания (Екатеринбург, 2008); на научно-практической конференции и школе по инфекционной патологии с международным участием (Москва, 2007), 64 всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием (Екатеринбург, 2009), конференции врачей Областной детской клинической больницы №1.

Основные результаты диссертации опубликованы в 8 работах, в том числе 2 – в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства Образования и науки РФ, 1 – в международной печати.

### **Структура и объём работы**

Диссертация изложена на 179 страницах, проиллюстрирована 38 таблицами, 15 рисунками и 2 схемами; состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием клинического материала и методов

исследования, трёх глав собственных исследований, заключения, выводов, указателя литературы, включающего 247 источников, в том числе 127 отечественных и 120 зарубежных.

## **СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **Материалы и методы**

В соответствии с поставленной целью и задачами проведено обследование 91 пациента с костно-деструктивными туберкулёзными процессами, выявленных в период с 1998 по 2007гг., ретро- и проспективный анализ медицинской документации (карты стационарного лечения, амбулаторные карты, индивидуальные амбулаторные карты развития, карты диспансерного учёта детей) с целью комплексной оценки условий жизни, преморбидного состояния ребёнка, эпидемиологических, медико-социальных аспектов.

Пациенты были разделены на 3 группы: в первую группу вошли случаи БЦЖ-оститов, этиология которых была подтверждена обнаружением ДНК вакцинного штамма (*M. bovis* BCG) в образцах ткани костно-деструктивных очагов залитых в парафин, в операционных биоптатах костной ткани, а также типированием методом ПЦР культур полученных при посеве ткани из операционного материала – 21; во вторую группу исследования вошли случаи оститов БЦЖ-этиологии по клинико-эпидемиологическим критериям – 63; в третью группу отнесены 7 случаев оститов туберкулёзной этиологии по клинико-эпидемиологическим критериям. Среди детей этой группы у 3 выявлен контакт с больным туберкулёзом лёгких, у 4 – туберкулёз внутригрудных лимфатических узлов, один из них не вакцинирован против туберкулёза, у 1 ребёнка выявлен первичный туберкулёзный комплекс, ещё в одном случае наблюдался туберкулёзный спондилит.

Для выявления социально-эпидемиологических и клинических (синдрома общей воспалительной реакции) различий между БЦЖ-оститами и классическим туберкулёзом сформирована группа детей с внутригрудным

туберкулёзом методом сплошной выборки, находившихся на стационарном лечении в ДСО ПТД№2 г. Екатеринбурга в 2007г. – 31 случай – 4 группа исследования: 22 больных туберкулёзом ВГЛУ, 9 пациентов с ПТК.

Морфологическое исследование биопсийного и/или операционного материала выявило картину продуктивно-некротического туберкулёзного воспаления во всех препаратах костно-деструктивных очагов (ЦПАО ПТД г. Екатеринбурга, зав. – д.м.н., проф. Л.М. Гринберг; Н.А. Анисимова).

При бактериологическом исследовании посев материала из очагов костной деструкции производился на плотные яичные среды Левенштейна-Йенсена и «Новая».

Выявление ПЦР-методом ДНК вакцинного штамма *M.bovis BCG* непосредственно из клинического материала и из гистологического материала костно-деструктивных очагов залитого в парафин производилось методом ПЦР в режиме реального времени в лаборатории микробиологии и ПЦР-диагностики ФГУ «УНИИФ Росмедтехнологий», н.с. Е.Ю. Камаев.

Выделение ДНК проводилось с использованием комплекта реагентов QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Germany) согласно инструкции. Дальнейшее исследование включало 2 этапа:

**1 этап.** Для выявления ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex* была использована тест-система «АмплиСенс *Mycobacterium tuberculosis complex*–FL» на основе ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией результатов в режиме реального времени с использованием амплификатора iQ5 (Bio-Rad, USA).

**2 этап.** Дифференцирование микобактерий вида *M.bovis BCG* от *M. tuberculosis* и других вирулентных видов МТС было проведено по регионам дифференцирования (RD1 и RD9) с использованием тест-системы «АмплиСенс МТС diff» (ФГУН ЦНИИ Роспотребнадзора) согласно инструкции производителя. Аналитическая чувствительность данной тест-системы составляет 5 ГЭ/мл, аналитическая специфичность – 100%.

Суммарно ПЦР-исследованию подвергнут материал от 50 детей (из общего количества – 91) с оститами с морфологической картиной туберкулёза. У ребёнка исследовалась одна проба каждого клинического материала, который был в наличии (операционный, в виде парафиновых блоков, культура) однократно. Повторное исследование той же пробы проводилось, если ПЦР-реакция была ингибирована. В 41 случае ввиду отсутствия материала проведение ПЦР-исследования не представлялось возможным. Образцы гистологического материала в виде парафиновых блоков были исследованы от 37 детей, от 19 детей – операционный материал, кроме того проведено ПЦР-исследование 6 полученных из операционного материала культур возбудителя (из 17 образцов патологического материала костных очагов, направленных на посев). При этом в 6 случаях одновременно проводилось исследование парафиновых блоков и операционного материала, в 3 – операционного материала и культур и в 3 случаях было выполнено одновременно исследование парафиновых блоков, операционного материала и культур.

Специфические для *M.bovis* BCG фрагменты ДНК в исследуемом материале были выявлены в 21 из 47 наблюдений БЦЖ-оститов – 44,7%.

У 3 из 7 детей с туберкулёзными оститами был исследован имеющийся архивный гистологический материал в виде парафиновых блоков. При этом в образцах от 2 детей обнаружена ДНК *M.tuberculosis* complex, в одном из которых выявлена принадлежность данной ДНК микобактериям человеческого вида, в другом образце ввиду недостаточного количества ДНК видовая идентификация возбудителя не представлялась возможной.

С целью подтверждения принадлежности образцов ДНК вакцинному штамму BCG проведено секвенирование 10 удовлетворительных по количеству и качеству образцов ДНК, выделенных из культур *M.tuberculosis* complex, операционного материала, гистологического материала из очагов костных деструкций в виде парафиновых блоков, а также образца ДНК вакцинного штамма *M. bovis* BCG. Стратегия исследования строилась на

основе различий в геноме *M.tuberculosis* и *M. bovis* BCG, в частности на отсутствии в геноме *M. bovis* BCG прямого повтора RD1, который имеется у *M.tuberculosis* (Mahairas et al., 1996). Данное исследование проводилось в лаборатории молекулярной генетики Уральского госуниверситета (к.м.н., доцент С.Ю. Ковалёв).

В результате проведенного исследования у 10 образцов ДНК и вакцинного штамма *M. bovis* BCG была определена нуклеотидная последовательность фрагмента генома в месте локализации прямого повтора RD1, т.е. было установлено, что полученный PCR-продукт принадлежит участку генома *M. bovis* BCG. Сравнительный анализ показал абсолютную идентичность нуклеотидных последовательностей исследованных 10 образцов ДНК между собой и с образцом ДНК *M. bovis* BCG (вакцинный препарат), а также с нуклеотидными последовательностями участка генома *M. bovis* BCG, представленными в GenBank (Accession numbers: AP010918.1, AM408590.1, U35019.1).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы BioStat 2008 Professional 5.2.5. Для оценки статистической значимости рассчитывали показатели непараметрической статистики: критерий «хи-квадрат» для значений более либо равных 5, точный критерий Фишера для значений менее 5. Выборочная средняя (средняя арифметическая) и стандартное отклонение (SD) представлены как  $M \pm m$ , различия считали значимыми при  $p < 0,05$ . Различающие возможности методов оценивали также по критерию отношения шансов и их доверительным интервалам.

### **Результаты собственных исследований**

Общая характеристика. При изучении половой структуры пациентов, установлено, что в 1 и 2 группах доля мальчиков несколько меньше и составляет: 42,9% (n=9) и 49,2% (n=31) соответственно. При этом в 3 и 4 группах наблюдалось преобладание количества девочек – 71,4% (n=5) и 61,3% (n=19) соответственно. Средний возраст детей первой группы составил

18,7±14,5 месяца (7 месяцев – 5 лет 10 месяцев), второй – 16,3±8,1 месяцев (4 месяца – 4 года 7 месяцев), третьей – 13,0±4,0 месяцев (7 месяцев – 1 год 5 месяцев), четвертой – 26,7±14,4 месяцев (7 месяцев – 4 года 6 месяцев).

Анализ социально-экономического положения детей выявил достоверно более высокий уровень качества жизни и дохода семей детей с БЦЖ-оститами, чем семей детей с туберкулёзными оститами и с внутригрудным туберкулёзом.

Таблица 1

## Характеристика материального дохода семей

Материальный доход семьи	1 группа		2 группа		3 группа		4 группа		Достоверные различия
	n	%	n	%	n	n	%		
	p								
Ниже прожиточного минимума	1	4,8	3	4,8	3	14	45,2	$p_{1-3}<0,05$ $p_{1-4}<0,001$ $p_{2-3}<0,05$ $p_{2-4}<0,001$	
Соответствует прожиточному минимуму	7	33,3	27	42,9	3	11	35,5		
Выше прожиточного минимума	13	61,9	30	47,6	0	3	9,7	$p_{1-3}<0,01$ $p_{1-4}<0,001$ $p_{2-3}<0,05$ $p_{2-4}<0,01$	
Нет сведений	0	0	3	4,8	1	3	9,7		
Всего	21	100	63	100	7	31	100		

В 1 группе 61,9% (n=13) детей проживали в семьях с доходом выше прожиточного минимума (таблица 1), в 3 группе не было детей, проживающих в семьях с подобным уровнем дохода, различие является статистически высоко значимым,  $p<0,01$ .

Обнаружено высоко достоверное преобладание доли семей с доходом выше прожиточного минимума 1 группы в сравнении с показателем 4 группы – 61,9% (n=13) и 9,7% (n=3), точный критерий Фишера –  $p=0,0001$ , кроме

того выявлено статистически значимое преобладание доли детей 2 группы из семей с доходом выше прожиточного минимума – 47,6% (n=30) в сравнении с 3 группой, точный критерий Фишера –  $p=0,045$ , в сравнении с показателем 4 группы – 9,7% (n=3), точный критерий Фишера –  $p=0,002$ .

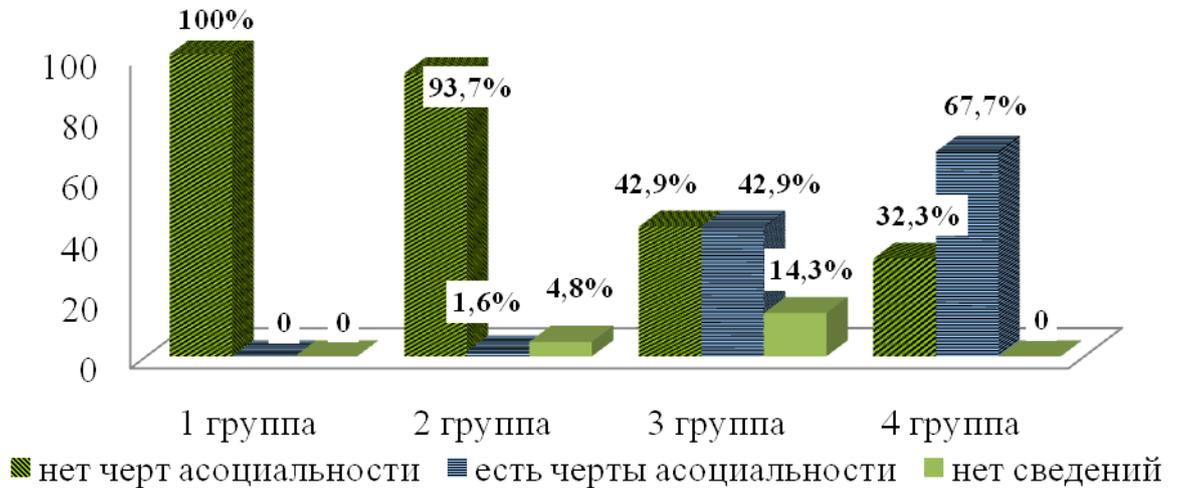


Рис. 1. Частота выявления черт асоциального поведения родителей

При выявлении признаков социальной дезадаптации установлено, что в 1 группе детей (с оститами, БЦЖ-этиология которых доказана) родители всех детей – 100% (n=21) – не имели черт асоциального поведения (рис. 1), во 2 группе детей (с оститами БЦЖ-этиологии по клинико-эпидемиологическим критериям) лишь в 1 случае выявлены черты социальной дезадаптации семьи – 1,6%. При сравнении этих групп детей по данному показателю не выявлено статистически значимых различий ( $p>0,05$ ). При анализе случаев оститов туберкулёзной этиологии в 3 случаях из 7 были выявлены черты социальной дезадаптации родителей, при сравнении данного показателя с показателем 2 группы – 1,6% (n=1) выявлены статистически значимые различия, точный критерий Фишера –  $p=0,0024$ . В группе сравнения, группе детей заболевших туберкулёзом органов дыхания, большинство детей проживали в социально-неблагополучных семьях – 67,7% (n=21), при сравнении этого показателя с показателем 2 группы – 1,6% (n=1), также получены статистически значимые различия, точный критерий Фишера –  $p=0,0001$ .

Контакт с больным туберкулёзом является основным фактором риска развития туберкулёза у детей. Среди пациентов 3 группы – группы детей с оститами туберкулёзной этиологии у 3 из 7 выявлен контакт с больным туберкулёзом, у пациентов 4 группы – в 83,9% (n=26) случаев, точный критерий Фишера –  $p=0,0407$ . Группы детей с БЦЖ-оститами были сформированы в соответствии с клинико-эпидемиологическими критериями поствакцинальных оститов, вследствие чего, у детей этих групп не было контакта с больными туберкулёзом.

При анализе охвата противотуберкулёзной вакцинацией обследованных детей установлено, среди пациентов с туберкулёзными оститами (3 группа) 1 ребёнок из 7 не был привит против туберкулёза, у 41,9% (n=13) больных туберкулёзом органов дыхания (4 группа) наблюдался фактор риска развития туберкулёза – отсутствие противотуберкулёзной вакцинации. При сравнении этих данных не выявлено достоверных различий.

Количество детей, привитых разными препаратами противотуберкулёзной вакцины, представлено в таблице 2.

Таблица 2

Количество детей, привитых разными препаратами вакцины

Препарат противотуберкулёзной вакцины		1 группа		2 группа		3 группа		4 группа		Достоверные различия
		n	%	n	%	n	n	%		
Вакцины	БЦЖ	15	71,4	49	77,8	6	8	44,4	$p_{2-4}<0,01$ $p_{3-4}<0,05$	
	БЦЖ-М	5	23,8	14	22,8	0	10	55,6		
Нет сведений о вакцине		1	4,8	0	0	0	0	0		
Всего		21	100	63	100	6	18	100		

При анализе сведений о противотуберкулёзной вакцинации детей было установлено, что препаратами БЦЖ и БЦЖ-М привиты примерно равные

доли детей 1 и 2 групп: вакцинным препаратом БЦЖ привито 71,4% (n=15) и 77,8% (n=49) соответственно, БЦЖ-М – 23,8% (n=5) и 22,8% (n=14) соответственно, статистически значимых различий не обнаружено. Препаратом вакцины БЦЖ привиты 71,4% (n=15) детей 1 группы, 77,8% (n=49) – 2-ой и все пациенты 3 группы – достоверных различий не обнаружено.

При сравнении количества детей 2 и 4 групп привитых препаратом БЦЖ обнаружено достоверное преобладание доли детей 2 группы – 77,8% (n=49) и 44,4% (n=8) соответственно, критерий «хи-квадрат» равен 7,46 при уровне значимости  $p < 0,01$ ; при сравнении 3 и 4 групп – достоверно большая доля детей 3 группы (оститы туберкулёзной этиологии) привита препаратом вакцины БЦЖ – 6 (все дети из получивших противотуберкулёзную вакцинацию) и 44,4% (n=8) соответственно, критерий «хи-квадрат» равен 5,71 при уровне значимости  $p < 0,05$ . Показано, что среди детей, заболевших туберкулёзом органов дыхания, достоверно меньшее количество детей привито препаратом вакцины БЦЖ, чем среди детей с оститами как БЦЖ-этиологии, так и туберкулёзных.

При регистрации размеров кожных знаков у детей как маркёров качественно проведённой противотуберкулёзной вакцинации установлено, что в 1 группе не было пациентов с поствакцинальным кожным знаком менее 3мм и в сравнении с показателем 3 группы – n=2 из 6 – это различие является статистически значимым,  $p < 0,05$ . Также достоверное различие обнаружено при сравнении количества детей с неотчётливым поствакцинальным кожным знаком 2 и 3 групп: 4,1% (n=2) и n=2 соответственно, точный критерий Фишера –  $p = 0,047$ . Достоверных различий по данному показателю между 3 и 4 группами не выявлено.

При изучении туберкулиновой чувствительности установлено (таблица 3), что среди детей с БЦЖ-оститами достоверно меньше туберкулиноотрицательных лиц и лиц с гиперергической реакцией на

туберкулин в стандартном разведении (2ТЕ ППД-Л), чем среди детей с туберкулёзом органов дыхания.

Таблица 3

## Характер туберкулиновой чувствительности детей (с 2 ТЕ)

Туберкулиновая чувствительность детей (с 2 ТЕ)	1 группа		2 группа		3 группа	4 группа		Достоверные различия р
	п	%	п	%	п	п	%	
Отрицательная	0	0	0	0	0	3	9,7	$p_{2-4} < 0,05$
Сомнительная	0	0	0	0	0	1	3,2	
Нормергическая (папула 5-16 мм)	18	85,7	59	93,7	7	11	35,5	$p_{1-4} < 0,0001$ $p_{2-4} < 0,0001$
Гиперергическая	1	4,8	2	3,2	0	16	51,6	$p_{1-4} < 0,001$ $p_{2-4} < 0,0001$
Не проводилась	2	9,5	2	3,2	0	0	0	
Всего	21	100	63	100	7	31	100	

Отрицательная и сомнительная туберкулиновая чувствительность наблюдалась только у детей с внутригрудным туберкулёзом – 9,7% (n=3) и 3,2% (n=1) соответственно. Все дети с отрицательной и сомнительной реакцией на туберкулин (4 группа) – ВИЧ-инфицированы.

Гиперергическая туберкулиновая чувствительность у пациентов с оститами БЦЖ-этиологии 1 группы наблюдалась в 4,8% случаев (n=1), в 3,2% (n=2) – у детей с БЦЖ-оститами 2 группы, у пациентов с туберкулёзными оститами ни в одном случае не выявлена гиперергическая чувствительность к туберкулину, тогда как среди больных туберкулёзом органов дыхания гиперергическая туберкулиновая чувствительность наблюдалась в 51,6% случаев (n=16), что достоверно больше показателей 1 группы: точный критерий Фишера –  $p=0,001$  и 2 группы: точный критерий Фишера –  $p=0,0001$ .

При изучении преморбидного фона выявлено, что в структуре неспецифической заболеваемости во время беременности матерей детей 1 группы преобладали обострения хронических соматических заболеваний – 57,1% (n=4), 2 группы – инфекции передаваемые половым путём (уреаплазмоз, микоплазмоз, ЦМВ-инфекция, генитальный герпес и т.п.) – 36,7% (n=11). В группе детей, заболевших туберкулёзом органов дыхания 66,8% (n=14) матерей во время беременности были инфицированы ВИЧ, из них у 1 матери (4,8%) были выявлены ИППП, у другой (4,8%) – вирусные гепатиты В и С, ещё у одной (4,8%) – сифилис. У матери 1 ребёнка с туберкулёзным оститом во время беременности также был выявлен сифилис. В структуре заболеваемости во время беременности матерей детей 1 и 2 групп данная патология отсутствовала, при сравнении по показателю инфицированности матерей ВИЧ во время беременности обнаружены статистически высоко значимые различия между 1 и 4 группами – точный критерий Фишера –  $p=0,001$ , 2 и 4 группами – точный критерий Фишера –  $p=0,001$ . При сравнении 2 и 4 групп по показателю заболеваемости матерей во время беременности сифилисом (среди детей 4 группы 14,3% (n=3) матерей во время беременности переносили сифилис), также обнаружены статистически значимые различия, точный критерий Фишера –  $p=0,034$ .

Достоверно большее количество детей с впоследствии развившимся туберкулёзом органов дыхания, родились недоношенными – 29,0% (n=9), в сравнении с таковыми детьми с БЦЖ-оститами – 2,4% (n=2). Среди детей с БЦЖ-оститами достоверно большее количество рождалось с нормальной массой тела, чем среди детей с туберкулёзными оститами и с внутригрудным туберкулёзом. С массой в пределах нормы (от 3000 до 4000г) родились 57,1% (n=12) детей 1 группы и 77,8% (n=49) – 2 группы, n=3 – 3 группы и 38,7% (n=12) детей с развившимся в последствии туберкулёзом органов дыхания, среди которых 16,1% (n=5) родились с массой тела от 2000 до 2500г и 6,5% (n=2) с массой менее 2000г, что явилось препятствием для противотуберкулёзной вакцинации. Дети с БЦЖ-оститами достоверно чаще

при рождении были здоровы (либо с минимальной перинатальной патологией, легко поддающейся коррекции), чем дети, которые впоследствии заболели внутригрудным туберкулёзом: при рождении у них выявлялись поражения центральной нервной системы средней, тяжёлой степени, синдром задержки развития плода II, III, IV степени, риск внутриутробного инфицирования такими опасными для новорождённого инфекциями как ВИЧ, сифилис, вирусный гепатит В, С.

Среди детей с БЦЖ-оститами и больных туберкулёзными оститами не было ВИЧ-инфицированных, 25,8% (n=8 из 31) больных туберкулёзом органов дыхания детей были инфицированы ВИЧ.

При анализе неспецифической заболеваемости выявлено, что дети с туберкулёзом органов дыхания достоверно чаще страдали бронхо-лёгочной патологией – в 32,0% (n=8) случаев, чем дети 2 группы (с БЦЖ-оститами) – в 3,8% (n=2) случаев, точный критерий Фишера –  $p=0,0018$ .

При анализе выраженности симптомов общей воспалительной реакции выявлено, что наибольшая доля детей с выраженными симптомами интоксикации была в 4 группе исследования – 41,9% (n=13) и в 3 группе – n=2 из 7. У детей с БЦЖ-оститами выраженные симптомы интоксикации отмечались значительно реже: в 9,5% (n=2) и 6,3% (n=4) случаев. При сравнении данных показателей обнаружено, что между 1 и 4, 2 и 4 группами различия статистически значимы: 1 и 4 группы – 9,5% (n=2) и 41,9% (n=13) соответственно, точный критерий Фишера –  $p=0,011$ , 2 и 4 группы – 6,3% (n=4) и 41,9% (n=13) соответственно, точный критерий Фишера –  $p=0,0001$ .

Анализ частоты выявления симптомов общей воспалительной реакции показал, что у детей с БЦЖ-оститами реже развивается гипотрофия (7,9% (n=5) – 2 группа), чем у детей с туберкулёзными оститами и внутригрудным туберкулёзом: n=4 из 7 и 45,2% (n=14) соответственно. При сравнительном анализе этих показателей статистически значимые различия обнаружены между 1 и 3, точный критерий Фишера –  $p=0,002$ , 2 и 3, точный критерий Фишера –  $p=0,004$ , 1 и 4, точный критерий Фишера –  $p=0,000$ , 2 и 4 группами,

критерий «хи-квадрат» равен 17,85 при уровне значимости  $p < 0,001$ , точный критерий Фишера –  $p = 0,0001$ . Гепато(сплено)мегалия как проявление общей воспалительной реакции отмечена только у детей с туберкулёзными оститами и туберкулёзом органов дыхания:  $n=1$  из 7 и 25,8% ( $n=8$ ) соответственно, при сравнении данных показателей обнаружены статистически значимые различия между 1 и 4 группами, точный критерий Фишера –  $p = 0,016$ , 2 и 4, точный критерий Фишера –  $p = 0,000$ .

Изучая непосредственно костно-деструктивный процесс у детей, определена структура туберкулёзных и БЦЖ-оститов по локализациям, представленная в таблице 4.

Таблица 4

Структура локализаций костно-деструктивных процессов у детей с БЦЖ-оститами и оститами туберкулёзной этиологии

Локализации поражений			1 группа		2 группа		3 группа
			n	%	n	%	n
Нижняя конечность	Бедро	ПОБ	1	4,5	5	7,7	0
		ДОБ	3	13,6	9	13,8	3
	Большеберцовая	ПОББ	3	13,6	13	20,0	0
		ДОББ	0	0	3	4,6	0
	Кости стопы		3	13,6	13	20,0	1
Верхняя конечность	ПОП		1	4,5	4	6,2	2
	Предплечье (лучевая кость)		0	0	3	4,6	0
	Кисть		0	0	0	0	0
Грудина			5	22,7	8	12,3	1
Ребро			6	27,3	7	10,8	0
Позвоночник			0	0	0	0	1
Всего			22	100	65	100	8

При сравнении данных по локализациям костных деструкций значимых различий между группами детей с туберкулёзными и БЦЖ-оститами выявлено не было. При этом у 48,3% (n=42 из 87 локализаций) от общего числа детей с БЦЖ-оститами наблюдалось поражение мелких и плоских костей – грудины, рёбер, костей стопы.

Верификация БЦЖ-оститов проводилась методом ПЦР.

От 34 детей с БЦЖ-оститами были исследованы образцы гистологического материала в виде парафиновых блоков, в 10 из них выявлена ДНК *M. bovis* BCG – в 29,4%, от 19 детей – операционные биоптаты, из которых в 9 также выявлена ДНК *M. bovis* BCG – в 47,4%. Из 17 образцов патологического операционного материала костных очагов, направленных на посев, получено 6 культур микобактерий туберкулёзного комплекса – в 35,3%, при генотипировании которых все явились *M. bovis* BCG.

При проведении ПЦР-исследования операционных биоптатов и гистологического материала залитого в парафин, БЦЖ-оститы верифицированы у 40,4% детей (у 19 из 47). Культуральным методом выделить МБТ удалось у 35,3% детей (у 6 из 17). Расчёт показателя отношения шансов (ОШ=1,4 (ДИ 95%, 0,41-4,93) указывает на примерно равные возможности выявления возбудителя из патологического материала у детей с БЦЖ-оститами как при проведении ПЦР-исследования так и при посеве на селективные питательные среды.

Суммарно специфические для *M.bovis* BCG фрагменты ДНК в исследуемом материале были выявлены в 21 из 47 наблюдений – 44,7%.

Заболеваемость детей поствакцинальными оститами представлена на рисунке 2.



Рис. 2. Динамика заболеваемости БЦЖ-оститами (на 100 тыс. вакцинированных новорождённых)

При комплексной оценке условий жизни, преморбидного состояния детей, характера течения основного процесса не выявлено достоверных различий между верифицированными БЦЖ-оститами и оститами БЦЖ-этиологии по клинико-эпидемиологическим критериям, что позволило определить заболеваемость детей поствакцинальными оститами: в период 1996-1998гг. заболеваемость БЦЖ-оститами составляла 2,6 на 100 тыс. вакцинированных новорождённых (рис. 2). С 2000 года отмечается значительный рост – 10,6 на 100 тыс. вакцинированных новорождённых с максимальным уровнем заболеваемости БЦЖ-оститами в 2004г. – 34,2. Некоторое снижение в 2005г. – 30,8, 2006г. – 23,6 связано с тем, что заболевание развивается в отсроченном периоде, в течение трёх лет после вакцинации БЦЖ, а в некоторых случаях, у детей старше трёхлетнего возраста. Заболеваемость БЦЖ-оститами в среднем за 10 лет (1997-2006гг.) составил 16,7 на 100 тыс. вакцинированных новорождённых.

## АЛГОРИТМЫ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЁЗНЫХ И БЦЖ-ОСТИТОВ У ДЕТЕЙ

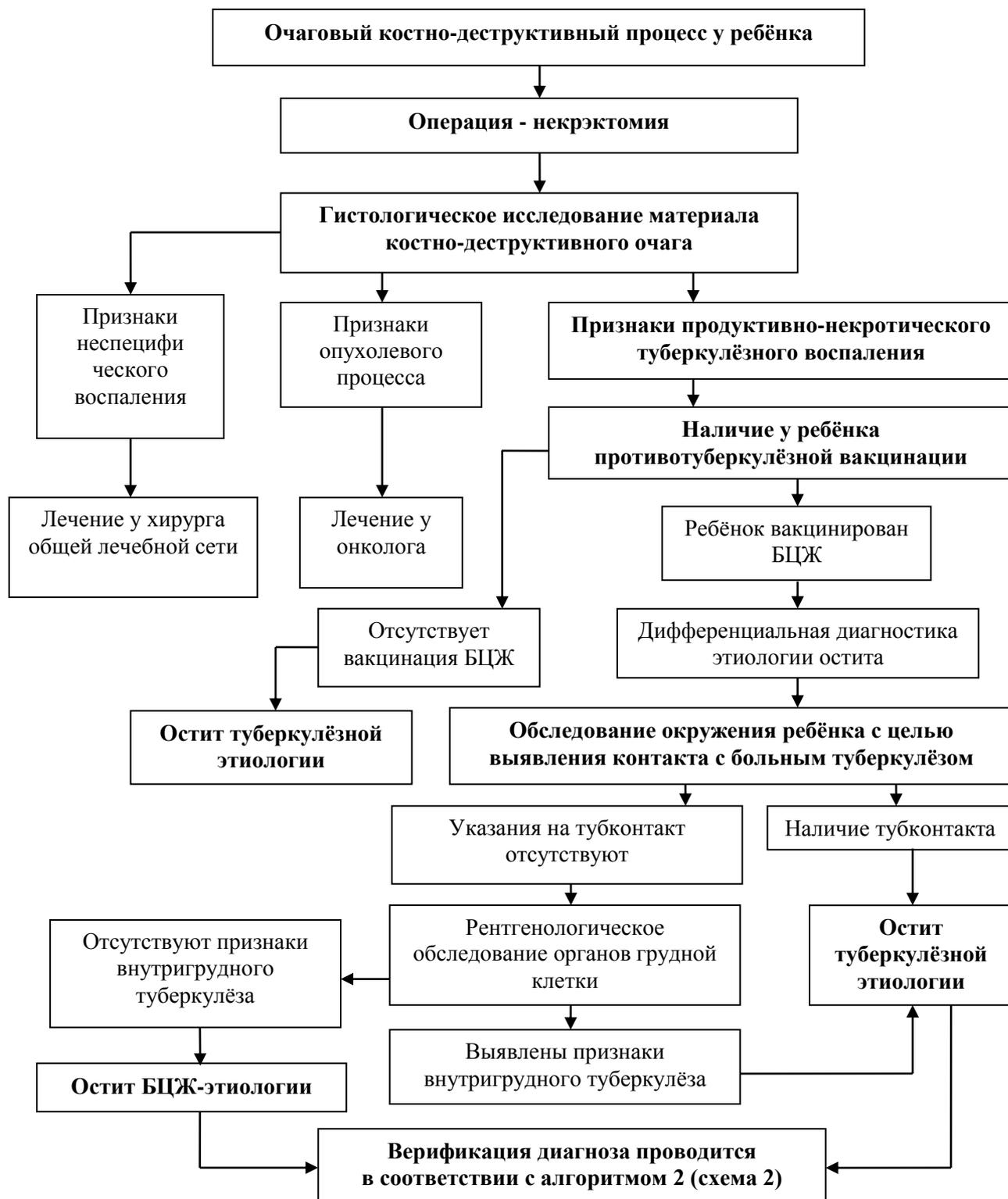


Рис. 3. Алгоритм дифференциальной диагностики оститов с морфологическими признаками продуктивно-некротического туберкулёза у детей

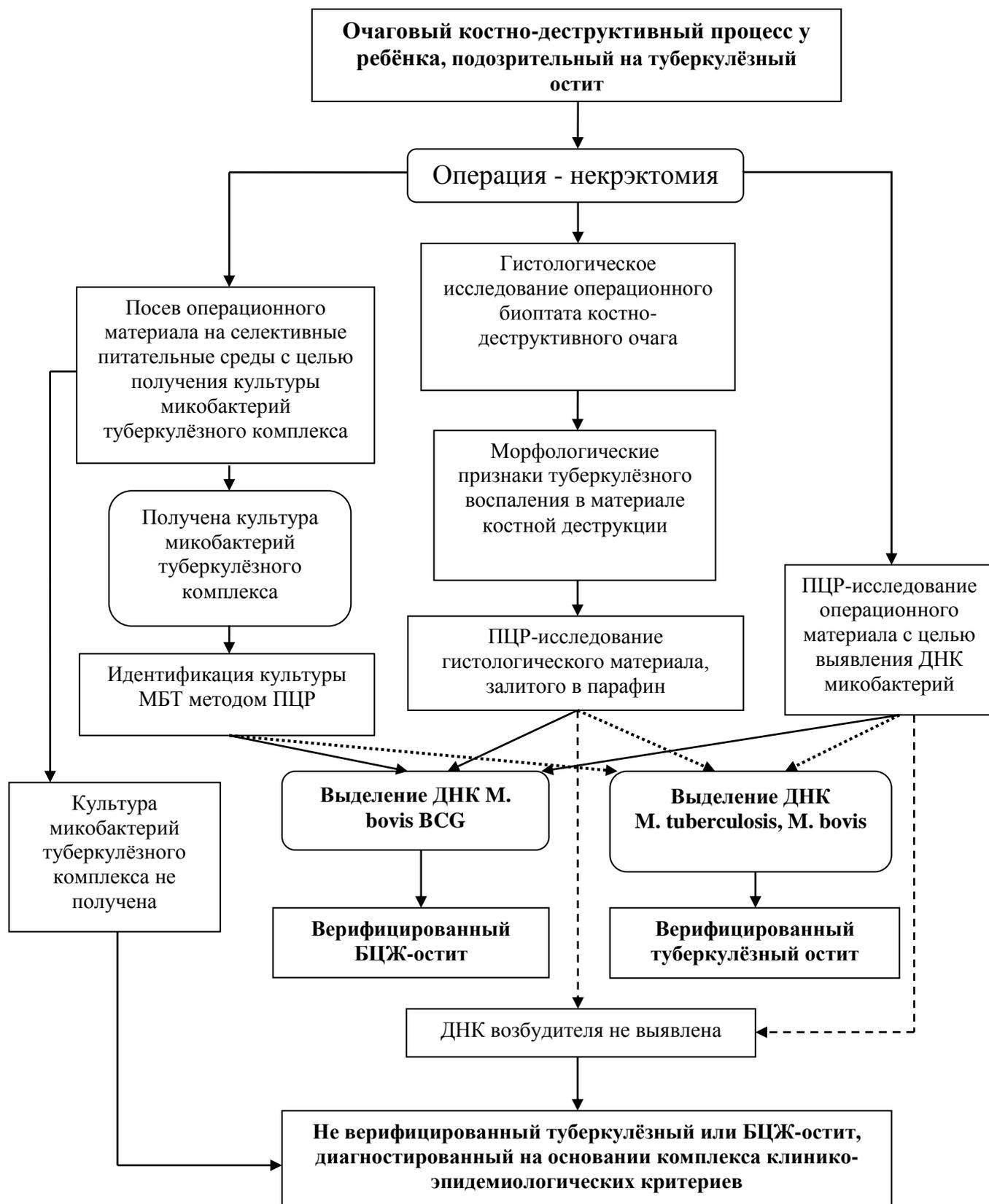


Рис. 4. Алгоритм верификации этиологии оститов с морфологической картиной туберкулёза у детей

## ВЫВОДЫ

1. В течение последнего десятилетия количество случаев оститов с морфологическим субстратом туберкулёза у детей Свердловской области увеличилось в 13 раз, 92,3% которых являются осложнениями противотуберкулёзной вакцинации II категории. Заболеваемость БЦЖ-оститами в среднем за 5 лет составила 26,7 на 100 тысяч вакцинированных новорождённых. В половине случаев БЦЖ-оститов (в 48,3%) очаги деструкции локализуются в мелких и плоских костях – грудина, рёбра, кости стопы.

2. Между БЦЖ-оститами, этиология которых доказана обнаружением ДНК вакцинного штамма в материале костно-деструктивных очагов и БЦЖ-оститами, диагностика которых основывалась на клинико-эпидемиологических критериях, не выявлено достоверных различий по эпидемиологическим, медико-социальным и клиническим данным. В семьях детей с поствакцинальными оститами отмечено социально-эпидемиологическое благополучие: подавляющее большинство детей проживают в благоприятных материальных условиях – 96%, родители социально адаптированы, у них отсутствует социально-значимая патология, такая как алкоголизм, наркомания, туберкулёз, ВИЧ-инфекция, сифилис. 98% детей с БЦЖ-оститами качественно вакцинированы против туберкулёза. Течение БЦЖ-оститов характеризуется умеренно выраженной общей воспалительной реакцией в 92% случаев.

3. Более трети детей с оститами туберкулезной этиологии и 45% детей больных туберкулезом органов дыхания проживают в неблагоприятных материально-бытовых условиях, в семьях, где выявляются признаки социальной дезадаптации (у 68% родителей детей больных внутригрудным туберкулезом) и высокая частота семейных туберкулёзных контактов – у трети детей с костным туберкулезом и 84% детей с туберкулезом органов дыхания, и родителями, инфицированными ВИЧ в 66,8% случаев внутригрудного туберкулёза; у трети детей с туберкулёзными оститами

наблюдается низкая эффективность противотуберкулёзной вакцинации и отсутствие её у 42% больных внутригрудным туберкулезом. Клиника заболевания характеризуется выраженным интоксикационным синдромом в трети случаев костного туберкулёза и 42% случаев туберкулёза органов дыхания с развитием гипотрофии у половины детей.

4. Посев материала костно-деструктивных очагов на селективные питательные среды позволил выделить культуру микобактерий туберкулёзного комплекса в 35% случаев, однако, при молекулярно-генетическом типировании (ПЦР) во всех случаях выявлена принадлежность МБТ вакцинному штамму.

5. Выявление методом ПЦР мутации, характерной для генома вакцинного штамма микобактерий, выделенных из материала костно-деструктивных очагов, архивного гистологического материала, а также полученных при посеве, позволяет верифицировать БЦЖ-этиологию оститов у 45% пациентов.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. При выявлении у ребёнка остита необходимо исследовать материал костного биоптата, полученного при радикальном оперативном вмешательстве методом ПЦР с целью обнаружения ДНК патогенных микобактерий или микобактерий вакцинного штамма для верификации туберкулёзной или БЦЖ-этиологии процесса.

2. Операционный материал костно-деструктивных очагов, подозрительный на туберкулез, должен в обязательном порядке подвергаться бактериологическому исследованию с целью получения культуры МБТ.

3. Для достоверной идентификации культур МБТ, полученных из материала костно-деструктивных очагов, необходимо проводить молекулярно-генетическое типирование микобактерий методом ПЦР.

4. Идентификацию ДНК возбудителя в архивном гистологическом материале в виде парафиновых блоков необходимо проводить для отсроченной уточняющей диагностики оститов у детей.

5. При отсутствии верификации дифференциальная диагностика оститов с морфологическим субстратом туберкулёза проводится в соответствии с комплексом социально-эпидемиологических и клинических критериев, согласно предложенному алгоритму.

#### **Список работ, опубликованных по теме диссертации:**

1. **Камаева Н.Г.** К вопросу об этиологии оститов у детей, вакцинированных БЦЖ / Н.Г. Камаева, Ю.П. Чугаев, Л.М. Гринберг, Н.А. Анисимова, Т.В. Голубева, Е.Ю. Камаев // Туберкулёз в России год 2007: материалы VIII Российского съезда фтизиатров. М.: ООО «Идея», 2007. – С. 250-251.

2. Чарыкова Г.П. Внелёгочные формы туберкулёза у детей по данным противотуберкулёзного стационара / Г.П. Чарыкова, Ю.П. Чугаев, **Н.Г. Камаева**, Н.А. Серебрякова, И.А. Долматова // Туберкулёз в России год 2007: материалы VIII Российского съезда фтизиатров. – М.: ООО «Идея», 2007. – С. 266-267.

3. Анисимова Н.А. Патоморфология туберкулёзного остеомиелита у детей / Н.А. Анисимова, Л.М. Гринберг, **Н.Г. Камаева** // Сборник научных трудов научно-практической конференция по инфекционной патологии. Москва, 2007. – С. 6.

4. Grinberg L. Pathology of TB ostitis in children: possible role of BCG infection / L. Grinberg, N. Anisimova, M. Syrochkina, Y. Chugaev, **N. Камаева**, E. Kamaev // The XXVII<sup>th</sup> International Congress of the International Academy of Pathology. – Athens, Greece, 2008. – P. 330.

5. **Камаева Н.Г.** Клинико-эпидемиологические особенности туберкулёзных оститов у детей, вакцинированных БЦЖ / Н.Г. Камаева, Ю.П.

Чугаев, Л.М. Гринберг, Н.А. Анисимова, Т.В. Голубева, Е.Ю. Камаев // Проблемы туберкулёза и болезней лёгких. – 2009. – №1. – С. 16-20.

6. Анисимова Н.А. Патоморфология различных фаз активности при туберкулёзе костей у детей / Н.А. Анисимова, **Н.Г. Камаева** // Материалы 64 Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием. Екатеринбург, 2009. – С. 242-244.

7. Анисимова Н.А. Патоморфология туберкулёзных оститов у детей / Н.А. Анисимова, Л.М. Гринберг, **Н.Г. Камаева**, Е.Ю. Камаев, Ю.П. Чугаев // Уральский медицинский журнал. – 2009. – №4(58). – С. 71-76.

8. **Камаева Н.Г.** Социально-эпидемиологическая характеристика детей Свердловской области, заболевших БЦЖ-оститами / Н.Г. Камаева, Ю.П. Чугаев, Л.М. Гринберг, С.Ю. Ковалёв, Е.Ю. Камаев // Туберкулёз у детей и подростков. Год 2009: сборник материалов научно-практической конференции / Российская академия медицинских наук, Центральный научно-исследовательский институт. Москва, 2009. – С. 56-58.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БЦЖ (BCG) – бациллы Кальметта-Жерена

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ВУИ – внутриутробное инфицирование

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КУМ – кислотоустойчивые микобактерии

МБТ – микобактерии туберкулёза

RD – регион дифференцирования (region differentiation)

ППЦНС – перинатальное поражение центральной нервной системы

ПТК – первичный туберкулёзный комплекс

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СЗРП – синдром задержки развития плода

СОЭ – скорость оседания эритроцитов

ТВГЛУ – туберкулёз внутригрудных лимфатических узлов