

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ЛАБОРАТОРНОГО МЕТОДА ELISPOT В ВЫЯВЛЕНИИ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ЖИДКОСТИ БРОНХОАЛЬВЕОЛЯРНОГО ЛАВАЖА

Т.В. Ванеева¹, С.В. Быков¹, М.А. Свириденко¹, С.Г. Сафонова¹, М.В. Синицын^{1,2,3}

¹ ГБУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», г. Москва

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России, г. Москва

³ ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, г. Москва

Цель исследования. Определение диагностических возможностей тест-системы IGRA на основе платформы ELISPOT в выявлении специфически сенсibilизированных клеток при исследовании жБАЛ у больных туберкулезом легких, включая пациентов с ВИЧ-инфекцией.

Материалы и методы. Проанализирована чувствительность лабораторной тест-системы ELISPOT при исследовании жидкости бронхоальвеолярного лаважа и периферической крови от 70 больных впервые выявленным туберкулезом органов дыхания и 31 больного коинфекцией ВИЧ/туберкулез. Образцы материала от каждого пациента исследовали иммунологическим методом с использованием тест-системы T-SPOT®.TB (Oxford Immunotec Limited, UK).

Результаты. У ВИЧ-негативных пациентов анализ жидкости бронхоальвеолярного лаважа позволяет повысить клиническую чувствительность лабораторной тест-системы до 81,4% (95%ДИ 70,8–88,8%) по сравнению с анализом периферической крови (74,3%; 95%ДИ 63,0–83,1%). У ВИЧ-инфицированных пациентов исследование жидкости бронхоальвеолярного лаважа привело к снижению клинической чувствительности тест-системы до 61,3% (95% ДИ 43,8–76,3%) по сравнению с анализом периферической крови (77,4%, 95% ДИ 60,2–88,6%; $p < 0,05$).

Заключение. Исследование жидкости бронхоальвеолярного лаважа с помощью тест-системы T-SPOT®.TB позволяет повысить выявляемость туберкулезной инфекции преимущественно у пациентов, не инфицированных ВИЧ.

Ключевые слова: туберкулез, ВИЧ, ELISPOT, жидкость бронхоальвеолярного лаважа

Для цитирования: Ванеева Т.В., Быков С.В., Свириденко М.А., Сафонова С.Г., Синицын М.В. Диагностические возможности лабораторного метода ELISPOT в выявлении туберкулезной инфекции при исследовании жидкости бронхоальвеолярного лаважа // Туберкулез и социально значимые заболевания. – 2025. – Т. 13, №2. – С. 25-33.
<https://doi.org/10.54921/2413-0346-2025-13-2-25-33>

DIAGNOSTIC CAPACITIES OF THE ELISPOT LABORATORY METHOD IN THE DETECTION OF TUBERCULOSIS INFECTION IN THE STUDY OF BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FLUID

T.V. Vaneeva¹, S.V. Bykov¹, M.A. Sviridenko¹, S.G. Safonova¹, M.V. Sinitsyn^{1,2,3}

¹ Moscow Research and Clinical Center for Tuberculosis Control of the Moscow Government Department of Health, Moscow

² National Medical Research Center of Phthisiopulmonology and Infectious Diseases, Russian Ministry of Health, Moscow

³ Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

Aim. Determine the diagnostic capabilities of the IGRA test system based on the ELISPOT platform in detecting specifically sensitized cells in bronchoalveolar lavage fluid of patients with pulmonary tuberculosis, including patients with HIV infection.

Materials and methods. The sensitivity of the ELISPOT laboratory test system was analyzed in the study of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood from 70 patients with newly diagnosed pulmonary tuberculosis and 31 patients with HIV-tuberculosis coinfection. Samples from each patient were examined by the immunological method using the T-SPOT®.TB test system (Oxford Immunotec Limited, UK).

Results. In HIV-negative patients, bronchoalveolar lavage fluid analysis can increase the clinical sensitivity of the laboratory test system to 81.4% (95%CI 70.8–88.8%) compared with peripheral blood analysis (74.3%; 95%CI 63.0–83.1%). In HIV-infected patients, examination of bronchoalveolar lavage fluid resulted in a decrease in the clinical sensitivity of the test system to 61.3% (95% CI 43.8–76.3%) compared with peripheral blood analysis (77.4%, 95%CI 60.2–88.6%; $p < 0.05$).

Conclusion. Examination of bronchoalveolar lavage fluid using the T-SPOT® test system.TB helps to increase the detection of tuberculosis infection predominantly in uninfected HIV patients.

Key words: tuberculosis, HIV, ELISPOT, bronchoalveolar lavage fluid

For citations: Vaneeva T.V., Bykov S.V., Sviridenko M.A., Safonova S.G., Sinitsyn M.V. Diagnostic capacities of the ELISPOT laboratory method in the detection of tuberculosis infection in the study of bronchoalveolar lavage fluid. *Tuberculosis and socially significant diseases*. Vol. 13, № 2, pp. 25-33. (In Russ.) <https://doi.org/10.54921/2413-0346-2025-13-2-25-33>

Введение

Согласно данным сайта www.rosstat.gov.ru, эпидемиологическая ситуация по туберкулезу в Российской Федерации остается стабильной последние 5 лет; показатели заболеваемости, смертности и распространенности туберкулеза в 2023 году достигли исторического минимума за несколько десятилетий [3]. В основе этих достижений лежат эффективные противотуберкулезные мероприятия, направленные на раннее выявление заболевания и внедрение инновационных препаратов и методов лечения туберкулеза. Значительный вклад в выявление и диагностику туберкулезной инфекции вносят лабораторные методы. В то же время происходит увеличение доли больных с туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией [4], что требует поиска наиболее чувствительных методов выявления туберкулезной инфекции, включая лабораторные, в этой группе пациентов.

Основными методами лабораторной диагностики легочно-го туберкулеза являются микробиологические (микроскопия и культивирование *M. tuberculosis* (МБТ) и молекулярно-биологические, направленные на выявление ДНК возбудителя болезни в биологическом материале. Обладая высокой специфичностью, эти методы не позволяют выявить этиологический агент по разным данным в 25–75% случаев установленного активного туберкулеза, и даже в странах с высоким бременем туберкулеза их диагностическая чувствительность не превышает 70% [9].

Значительный вклад в раннее выявление туберкулезной инфекции вносят иммунологические методы, из которых ведущим в последние два десятилетия является анализ МБТ-специфического высвобождения интерферона-γ (IFN-γ) клетками периферической крови (interferon gamma release assay, IGRA) [27], проводимый на основе платформы ELISPOT (Enzyme linked immuno spot). Многочисленные исследования показывают высокую чувствительность этого метода в диагностике активного туберкулеза [7, 19, 23]. В настоящее время оценить диагностическую ценность любого лабораторного теста для раннего выявления туберкулезной инфекции позволяет только анализ результатов комплексной диагностики впервые выявленного активного туберкулеза в качестве «суррогата» латентной туберкулезной инфекции.

В поисках путей повышения эффективности лабораторной диагностики туберкулеза в последние годы появился интерес к возможности использования при исследовании мето-

дами IGRA разного биологического материала, содержащего моноклеарные клетки периферической крови. Этот подход повышает вероятность обнаружения специфически сенсibilизированных лимфоцитов в материале, взятом непосредственно из очага туберкулезной инфекции. Так, показано, что исследование плевральной жидкости методом ELISPOT, выполненное на моноклеарных клетках плевральной жидкости, позволяет в высоком проценте случаев выявить специфически сенсibilизированные лимфоциты у больных плевритом туберкулезной этиологии [1, 16].

На стадии установления клинического диагноза пациентов с различной легочной патологией часто направляют на бронхоскопию. Среди дополнительных диагностических эндобронхиальных манипуляций особое место занимает диагностический бронхоальвеолярный лаваж, являющийся, по сути, жидкостной биопсией слизистой трахеобронхиального дерева. Получаемый в процессе лаважа смыв (жидкость бронхоальвеолярного лаважа, жБАЛ) является традиционным биологическим материалом для проведения целого комплекса патоморфологических, микробиологических и общелабораторных исследований. Имеются свидетельства высокой диагностической чувствительности тест-систем на основе IGRA при использовании жБАЛ в качестве исследуемого материала [10, 15], однако нет достаточного количества наблюдений, доказывающих преимущество этих исследований у пациентов с ВИЧ-инфекцией. Именно эти пациенты в последние годы составляют основную группу риска по туберкулезу, особенно на стадии выраженного снижения иммунореактивности.

Цель исследования

Определение диагностических возможностей тест-системы IGRA на основе платформы ELISPOT в выявлении специфически сенсibilизированных клеток при исследовании жБАЛ у больных туберкулезом легких, включая пациентов с ВИЧ-инфекцией.

Материалы и методы

Проспективное когортное исследование проведено на базе Государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы». Отбор участников проводили среди пациентов, которым выполняли бронхоальвеолярный лаваж на этапе

Таблица 1. Основные демографические характеристики, клинические и лабораторные параметры больных, включенных в исследование

Table 1. Main demographic characteristics, clinical and laboratory parameters of patients included in the study

Характеристика / Параметр • Characteristic / Parameter	Группа ТБ • TB group (n=70)	Группа ВИЧ/ТБ HIV/TB group (n=31)	p
Мужской пол • Male gender	43 (61,4%)	20 (64,5%)	> 0,05
Возраст (Me, ИКР) • Age (IU, IQR)	38, ИКР (IQR) 37–43	41, ИКР (IQR) 37–43	> 0,05
Туберкулез органов дыхания • Tuberculosis of the respiratory system	3 (4,3%)	2 (6,6%)	> 0,05
Туберкулез множественных локализаций/генерализованный Tuberculosis of multiple localizations/generalized	1 (1,4%)	6 (19,4%)	< 0,05
Форма туберкулеза • A form of tuberculosis			
Инфильтративный • Infiltrative	57 (81,4%)	11 (35,5%)	< 0,001
Диссеминированный • Disseminated	6 (8,6%)	9 (29,0%)	< 0,05
Туберкулома • Tuberculoma	3 (4,3%)	3 (9,7%)	> 0,05
Длительность противотуберкулезной терапии Duration of anti-tuberculosis therapy			
менее 2 недель • less than 2 weeks	26 (37,1%)	20 (64,5%)	< 0,05
от 2 недель до 1 месяца • from 2 weeks to 1 month	18 (25,7%)	2 (6,5%)	< 0,05
1-2 месяца • 1-2 months	11 (15,7%)	3 (9,7%)	> 0,05
более 2 месяцев • more than 2 months	15 (21,4%)	6 (19,4%)	> 0,05
Туберкулез подтвержден культуральным методом (рост МБТ при посеве диагностического материала) Tuberculosis was confirmed by the culture method (MBT growth during sowing of diagnostic material)	43 (61,4%)	19 (61,3%)	> 0,05
Доля лимфоцитов в рабочей суспензии жБАЛ (Me, ИКР) Proportion of lymphocytes in the working suspension of fBAL (IU, IQR)	49,1%, ИКР (IQR) 34,3–66,7	53,4%, ИКР (IQR) 38,3–66,5	> 0,05
Наличие МБТ в образце жБАЛ • Presence of MBT in the fBAL sample	23 (32,9%)	10 (32,3%)	> 0,05

жБАЛ – жидкость бронхоальвеолярного лаважа, ИКР – интерквартильный размах, МБТ – микобактерия туберкулеза, ТБ – туберкулез
fBAL – bronchoalveolar lavage fluid, IQR – interquartile range, MBT – mycobacterium tuberculosis, TB – tuberculosis

диагностики туберкулеза или в процессе проводимого противотуберкулезного лечения. Критериями включения служили впервые выявленный туберкулез легких и органов дыхания, возраст 18 лет и старше; критериями не включения – наличие злокачественных новообразований, беременность, прием противотуберкулезных препаратов более 6 месяцев.

От каждого пациента были получены образцы периферической крови (ПК) и жидкости бронхоальвеолярного лаважа (жБАЛ) для исследования иммунологическим методом с использованием тест-системы T-SPOT®.TB (Oxford Immunotec Limited, UK).

Периферическую кровь собирали в пробирки с гепарином лития в объеме 9 мл. Образец, поступивший в лабораторию, обрабатывали согласно инструкции производителя тест-системы.

Образец жБАЛ был разделен на три части, одну из которых исследовали иммунологическим методом с использованием тест-системы T-SPOT®.TB, две другие использовали для бактериологического и цитологического исследований. Результаты культурального исследования образца учитывали при анализе полученных результатов. Для получения рабочей суспензии, обогащенной мононуклеарными клетками (лимфоцитами), жБАЛ фильтровали через стерильный фильтр, осаждали клетки центрифугированием в течение 7 минут при 600g, сливали надосадочную жидкость, клетки ресуспендировали в

питательной среде. Исходя из опыта работы с плевральной жидкостью [2] и принимая во внимание опыт работы с жБАЛ других исследователей [14, 20], экспериментальным путем была установлена оптимальная концентрация клеток в рабочей суспензии жБАЛ, составившая $1,25 \times 10^6$ клеток/мл.

Культивирование клеточных суспензий крови и жБАЛ, отмывка, окрашивание, визуализация и интерпретация результата были выполнены согласно инструкции производителя тест-системы. Подсчет пятен осуществляли с помощью USB-лупы с увеличением 500x.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ IBM SPSS Statistics, version 25.0. Количественные данные рассчитывали в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (ИКР). Для оценки статистической значимости межгрупповых различий использовали критерий χ^2 , внутригрупповых различий – критерий Мак-Нимара. Для оценки согласованности результатов тестов рассчитывали коэффициент каппа Коэна (к). Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты

С учетом критериев отбора в исследование включен 101 впервые выявленный больной туберкулезом легких и органов дыхания, включая 63 мужчины и 38 женщин в возрасте от 18 до 71 года (Me 39 лет, ИКР 31–44,5 года).

Таблица 2. Частота положительных результатов теста T-SPOT®.TB при исследовании периферической крови и жидкости бронхоальвеолярного лаважа у больных туберкулезом с различным ВИЧ-статусом (n=101)

Table 2. Frequency of positive T-SPOT® test results.TB in the study of peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid in tuberculosis patients with different HIV status (n=101)

	Периферическая кровь Peripheral blood			Жидкость бронхоальвеолярного лаважа Bronchoalveolar lavage fluid			p (МакНимар) (McNemar)
	абс. • abs.	%	95% ДИ • CI	абс. • abs.	%	95% ДИ • CI	
ТБ • TB (n=70)	52	74,3	63,0–83,1	57	81,4	70,8–88,8	p > 0,05
ВИЧ/ТБ • HIV/TB (n=31)	25	77,4	60,2–88,6	19	61,3	43,8–76,3	p < 0,05
Значимость межгрупповых различий (χ²) Significance of intergroup differences (χ²)	p > 0,05			p < 0,05			
Сила связи (коэффициент сопряженности) Bond strength (conjugacy coefficient)	Связь отсутствует Bond is no strength p = 0,08			Связь умеренная Bond is moderate p = 0,32			

Все пациенты были разделены на две группы. Первую группу (ТБ) составили 70 больных туберкулезом с отрицательным ВИЧ-статусом, вторую (ВИЧ/ТБ) — 31 больной сочетанной инфекцией ВИЧ/туберкулез. Демографические, клинические и лабораторные данные пациентов представлены в таблице 1.

Группы были сопоставимы по полу и возрасту. В обеих группах преобладали пациенты с инфильтративной формой туберкулеза, однако среди больных ВИЧ/ТБ доля таких пациентов была значительно ниже (35,5% против 81,4%; p < 0,001), а доля больных диссеминированным туберкулезом легких (29,0%) и генерализованным туберкулезом (19,4%) значительно превышала таковую в группе больных ТБ с ВИЧ-негативным статусом (8,6% и 1,4% соответственно; p < 0,05). В обеих группах отмечено преобладание пациентов, которые на момент проведения бронхоальвеолярного лаважа не принимали противотуберкулезные препараты или длительность их приема не превышала двух недель; среди больных ВИЧ/ТБ доля таких больных была достоверно выше (64,5% против 37,1%; p < 0,05). Также группы различались по числу пациентов, принимающих ПТП от 2 недель до месяца: в первой группе доля таких больных составила 25,7%, во второй — 6,5% (p < 0,05). Различия между

группами были учтены при статистическом анализе, для этого проведена оценка влияния этих факторов на результаты лабораторного теста.

Содержание CD4⁺ Т-клеток в периферической крови у пациентов с сочетанной инфекцией ВИЧ/туберкулез варьировало от 8 до 1361 кл/мкл (Ме 200 кл/мкл, ИКР 77–485 кл/мкл).

Частота положительного результата лабораторного теста (ЧПРТ), проведенного в двух диагностических материалах у больных туберкулезом с различным ВИЧ-статусом, представлена в таблице 2. При исследовании периферической крови не отмечено различий ЧПРТ между пациентами двух групп. У больных ТБ тест показал заметно лучшие результаты при исследовании жБАЛ по сравнению с периферической кровью (81,4% и 74,3% соответственно). Напротив, у пациентов ВИЧ/ТБ ЧПРТ была ниже при исследовании образцов жБАЛ по сравнению с ПК (61,3% и 77,4% соответственно; p < 0,05) и с образцами жБАЛ от больных ТБ (61,3% и 81,4% соответственно; p < 0,05). Взаимосвязь между наличием ВИЧ-инфекции и снижением ЧПРТ в образцах жБАЛ подтверждается коэффициентом сопряженности, демонстрирующим умеренную связь между этими признаками (p = 0,32).

Таблица 3. Согласованность результатов теста T-SPOT®.TB при исследовании периферической крови и жидкости бронхоальвеолярного лаважа у больных туберкулезом

Table 3. Consistency of the T-SPOT® test results.TB in the study of peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid in tuberculosis patients

Результат теста Test result		Жидкость бронхоальвеолярного лаважа Bronchoalveolar lavage fluid			
		Больные туберкулезом Patients with tuberculosis		Больные с коинфекцией ВИЧ/туберкулез Patients with HIV/tuberculosis co-infection	
		положительный positive	отрицательный negative	положительный positive	отрицательный negative
Периферическая кровь Peripheral blood	положительный positive	47	5	19	6
	отрицательный negative	10	8	0	6
Степень согласия Degree of agreement		справедливая • fair (78,6%; κ=0,38; 95%ДИ (95%CI) 0,13–0,65)		умеренная • moderate (80,7%; κ=0,55; 95%ДИ (95%CI) 0,26–0,84)	

Таблица 4. Частота положительных результатов теста T-SPOT®.TB при исследовании жидкости бронхоальвеолярного лаважа у больных различными формами туберкулеза

Table 4. Frequency of positive T-SPOT® test results.TB in the study of bronchoalveolar lavage fluid in patients with various forms of tuberculosis

Форма туберкулезного процесса Form of the tuberculosis process	Туберкулез • Tuberculosis			Коинфекция ВИЧ/ТБ • HIV/TB co-infection			p (χ²)
	абс. • abs.	%	95% ДИ • 95%CI	абс. • abs.	%	95% ДИ • 95%CI	
Инфильтративный • Infiltrative	47/57	82,5	70,6–90,2	8/11	72,7	43,4–90,3	> 0,05
Диссеминированный Disseminated	5/6	83,3	43,7–97,0	5/9	55,6	26,7–81,1	> 0,05
Туберкулема • Tuberculoma	4/6	66,7	30,0–90,0	2/5	40,0	11,8–76,9	> 0,05
Генерализованный туберкулез Generalized tuberculosis	1/1	–	–	4/6	66,7	30,0–90,3	
p (χ²)	> 0,05			> 0,05			

Таблица 5. Частота положительных результатов теста T-SPOT®.TB при исследовании жидкости бронхоальвеолярного лаважа у больных ВИЧ-ТБ с различной длительностью противотуберкулезной терапии

Table 5. Frequency of positive T-SPOT® test results.TB in the study of bronchoalveolar lavage fluid in HIV-TB patients with different duration of anti-tuberculosis therapy

Длительность ПТТ Duration of ATT	Туберкулез • Tuberculosis			Коинфекция ВИЧ/ТБ • HIV/TB co-infection			p (χ²)
	абс. • abs.	%	95% ДИ • 95%CI	абс. • abs.	%	95% ДИ • 95%CI	
менее 2 недель less than 2 weeks	22/26	84,6	66,5–93,9	13/20	65,0	43,3–81,9	> 0,05
от 2 недель до 1 месяца from 2 weeks to 1 month	15/18	83,3	60,8–94,2	2/2	100,0	34,2–100,0	> 0,05
1-2 месяца • 1-2 months	8/11	72,7	43,4–90,3	2/3	66,7	20,8–93,9	> 0,05
более 2 месяцев more than 2 months	12/15	80,0	54,8–93,0	2/6	33,3	9,7–70,0	> 0,05
p (χ²)	> 0,05			> 0,05			

Следует отметить, что в обеих группах результаты лабораторного теста из двух типов биологического материала были согласованы в равной мере (таблица 3), но в отличие от больных ВИЧ/ТБ у больных ТБ исследование жБАЛ дало дополнительную информацию о наличии специфически сенсibilизированных клеток у 10 больных (14,3%, 95% ДИ 8,0–24,3%), а параллельное исследование двух биологических материалов от одного больного позволило подтвердить туберкулезную инфекцию у 63 из 70 пациентов (88,6%, 95% ДИ 79,0 – 94,1%).

Учитывая различия в характеристиках сравниваемых групп (таблица 1), был проведен анализ ЧПРТ у больных с разной формой туберкулеза и разной длительностью ПТТ (таблицы 4 и 5), который продемонстрировал отсутствие значимых взаимосвязей между этими факторами и результатами лабораторного теста. Этот вывод был подкреплён установлением слабых связей между ЧПРТ, формой процесса и длительностью ПТТ (таблица 6).

В отличие от периферической крови при работе с жБАЛ ограничена возможность концентрирования мононуклеарных клеток в рабочей суспензии с помощью градиента плотности. В связи с этим в исследуемых образцах жБАЛ доля мононуклеарных клеток варьировала в широком диапазоне значений в обеих группах. Так, в группе больных ТБ доля лимфоцитов в рабочей суспензии составляла 21,5–89,5%

(Ме 43,1%, ИКР 34,3–56,7%), в группе ВИЧ/ТБ 31,0–100,0% (Ме 53,4%, ИКР 38,3–66,5%). Значимых различий между исследуемыми группами по этому признаку не обнаружено, однако в отличие от больных ВИЧ/ТБ у больных ТБ была отмечена прямая умеренная связь между долей мононуклеарных клеток в исследуемом образце жБАЛ и ЧПРТ (таблица 6).

Также группы не различались по частоте обнаружения *M. tuberculosis* в образцах жБАЛ. В то же время у больных ВИЧ/ТБ была отмечена умеренная взаимосвязь между ЧПРТ и обнаружением *M. tuberculosis* в образцах жБАЛ.

Уровень иммуносупрессии у пациентов ВИЧ/ТБ не влиял на результаты лабораторного теста (p = 0,26).

Обсуждение

В данном исследовании изучались диагностические возможности лабораторной тест-системы IGRA в выявлении специфически сенсibilизированных клеток при исследовании жБАЛ у больных туберкулезом, включая пациентов с ВИЧ-инфекцией.

Лимфоциты играют важную роль в защите от микобактериальной инфекции. МБТ-специфичные лимфоциты рекрутируются и скапливаются в очагах туберкулезной инфекции, о чем свидетельствуют исследования плевральной, перикардальной, асцитической и спинномозговой жидкостей [13, 24, 25] у больных туберкулезом соответствующих локализаций.

Таблица 6. Сопряженность частоты положительных результатов T-SPOT®.TB при исследовании жБАЛ с некоторыми клиническими и лабораторными параметрами патологического процесса у больных туберкулезом

Table 6. Frequency conjugacy of positive results T-SPOT®.TB in the study of fBAL with some clinical and laboratory parameters of the pathological process in patients with tuberculosis

Параметр Parameter	Туберкулез • Tuberculosis		Коинфекция ВИЧ/ТБ • HIV/TB co-infection	
	Значение • Value (абс. • abs., %)	Сила связи; коэффициент ρ Bond strength; coefficient of ρ	Значение • Value (абс. • abs., %)	Сила связи; коэффициент ρ Bond strength; coefficient of ρ
Форма туберкулеза Form of tuberculosis	–	нет • no	–	нет • no
Длительность химиотерапии Duration of chemotherapy	–	слабая • low 0,27	–	нет • no
ТБ подтвержден культуральным методом (МБТ+) TB was confirmed by the cultural method (MBT+)	43/70 (61,4%)	нет • no	19/31 (61,3%)	нет • no
Доля лимфоцитов в рабочей сuspензии жБАЛ (Ме, ИКР) Proportion of lymphocytes in the working suspension of fBAL (IU, IQR)	49,1% (34,3 - 66,7)	слабая • low 0,28	53,4% (38,3 - 66,5)	нет • no
Наличие МБТ в образце жБАЛ Presence of MBT in the fBAL sample	23/70 (32,9%)	слабая • low 0,11	10/31 (32,3%)	умеренная • moderate 0,41

Данные об увеличении доли лимфоцитов, в частности CD4⁺ Т-клеток, в жБАЛ [11, 15] служат основанием для использования этого материала с целью обнаружения МБТ-специфичных лимфоцитов как маркера туберкулезного процесса в легких.

В ранее опубликованных работах авторы не детализируют клеточный состав рабочей сuspензии жБАЛ. В то же время он не настолько однороден, как при работе с кровью или плевральной жидкостью. Доступные методы обработки жБАЛ позволяют освободиться от макрофагов, доля которых в исходном материале варьирует от 50 до 90% [11], но не дают возможности изменить исходное соотношение между содержанием лимфоцитов и нейтрофилов. Таким образом, если при работе с кровью и плевральной жидкостью в результате подготовки образца доля лимфоцитов (потенциальных продуцентов ИФН- γ) в рабочей сuspензии составляет более 80%, то при работе с жБАЛ этот показатель варьирует от 34,3% до 66,5%, по нашим данным. В работе продемонстрировано, что такого количества лимфоцитов в рабочей сuspензии достаточно для проведения исследования; более того, не обнаружено связи между долей лимфоцитов в жБАЛ и результатом иммунологического теста, независимо от ВИЧ-статуса пациента.

Анализ результатов, полученных в группе больных ТБ, продемонстрировал отсутствие статистически значимых различий ЧПРТ при исследовании жБАЛ и периферической крови. В то же время показано, что у 55,6% пациентов с отрицательным результатом тестирования крови можно выявить специфически сенсibilизированные клетки в жБАЛ, а совместное исследование двух типов диагностического материала позволяет повысить чувствительность тест-системы до 88,6%. Полученные данные согласуются с результатами ранее проведенных

зарубежных исследований, подтвердивших увеличение антиген-специфических ИФН- γ -продуцирующих клеток в жБАЛ по сравнению с периферической кровью [10, 14, 17, 18]. Тем не менее отсутствует консенсус относительно взаимосвязи клинических проявлений туберкулезного процесса с результатами лабораторного теста. Часть авторов прослеживает прямую взаимосвязь между наличием бактериовыделения и положительным результатом иммунологического лабораторного теста и, соответственно, обратную – между результатом теста и длительностью противотуберкулезной терапии [17]. Проведенное исследование продемонстрировало слабое влияние учтенных клинических и терапевтических факторов на результаты используемого теста, что согласуется с выводами Q. Guo et al. (2020) [10].

В отличие от многочисленных исследований, посвященных влиянию ВИЧ на МБТ-специфический иммунный ответ клеток периферической крови, в месте заражения это влияние изучено значительно хуже. Установлено, что в лимфоцитарном пуле клеток жБАЛ от больных сочетанной инфекцией ВИЧ/ТБ абсолютное количество Т-клеток и доля активированных CD4⁺ Т-клеток значительно выше, чем в жБАЛ от больных туберкулезом, не инфицированных ВИЧ [6, 12]. Эти данные позволили предположить, что использование жБАЛ даст возможность увеличить частоту выявляемости специфически сенсibilизированных ИФН- γ -продуцирующих клеток и, как следствие, повысить чувствительность лабораторной тест-системы при использовании ее у ВИЧ-инфицированных пациентов.

В проведенном исследовании у больных с сочетанной инфекцией ВИЧ-ТБ отмечены снижение ЧПРТ при работе с жБАЛ по сравнению с периферической кровью и по сравнению

с жБАЛ от больных туберкулезом без ВИЧ-инфекции. Как и в случае с ВИЧ-негативными больными ТБ, в этой группе были слабыми или отсутствовали взаимосвязи между частотой положительных результатов иммунологического теста и факторами туберкулезного процесса, учтенными в работе. Более того, не обнаружено влияния уровня иммуносупрессии на результаты лабораторного теста. Таким образом, наличие ВИЧ-инфекции явилось определяющим фактором низкого специфического иммунного ответа в жБАЛ у больных активным туберкулезом легких.

В более ранних работах авторы исследовали местный иммунитет и специфический иммунный ответ клеток жБАЛ у больных ВИЧ-инфекцией преимущественно с целью определения факторов, способствующих повышению риска развития активного туберкулеза. В соответствии с целью в исследования включали ВИЧ-инфицированных лиц с умеренной иммуносупрессией без признаков активного туберкулеза легких. Специфический иммунный ответ клеток жБАЛ изучали у ВИЧ-инфицированных больных с ЛТИ, подтвержденной кожной пробой с туберкулином или тестом IGRA. Было отмечено, что риск развития активного туберкулеза повышается еще до значительного истощения CD4⁺ Т-клеток, удваиваясь в течение первого года ВИЧ-инфекции. Это позволяет предположить, что другие ВИЧ-ассоциированные изменения в иммунной системе могут способствовать повышению риска развития туберкулеза у людей с ВИЧ [8]. R. Bunjun с соавторами (2021) показали, что иммунная среда дыхательных путей нарушается при ВИЧ-инфекции, при этом накапливаются активированные Т-лимфоциты [6]. Было доказано, что ВИЧ-инфекция влияет не только на количество Т-клеток, но и на их функциональность, что отражается на спектре и количестве продуцируемых цитокинов [26]. Установлено, что легкое является местом репликации ВИЧ, и CD4⁺ Т-клетки, инфильтрирующие легкие, преимущественно инфицированы ВИЧ [22]. D. Муета с соавторами (2020) пришли к заключению о взаимосвязи ВИЧ с цитолитическим CD8⁺ Т-клеточным инфильтратом в бронхоальвеолярном отделе [21]. В совокупности эти данные указывают на различия

в изменениях, вызванных ВИЧ, в бронхоальвеолярном отделе и периферической крови, что выражается в специфических нарушениях функции CD4⁺ Т-клеток в жБАЛ и снижением МБТ-специфической продукции ИФН-γ мононуклеарными клетками жБАЛ у больных ВИЧ-инфекцией с ЛТИ.

Сведения, полученные в процессе исследования, демонстрируют схожесть проявлений МБТ-специфичных иммунных процессов в легких при латентной и активной туберкулезной инфекции у ВИЧ-инфицированных больных вне зависимости от выраженности CD4⁺ Т-клеточной иммуносупрессии. Приведенные результаты согласуются с данными работы, в которой у трети ВИЧ-инфицированных больных с ЛТИ не было обнаружено специфических для МБТ реакций в жБАЛ, несмотря на обнаружение Т-клеточных реакций в образцах крови [5].

Ограничениями данного исследования являются малый объем выборки больных ВИЧ-инфекцией и недоучет при сборе и анализе данных таких факторов, как длительность ВИЧ-инфекции, факт проведения и длительность антиретровирусной терапии, уровень вирусной нагрузки на момент исследования.

Учитывая полученные результаты и данные современных зарубежных публикаций, в настоящий момент нет оснований полагать, что использование жБАЛ позволит повысить выявляемость туберкулезной инфекции с помощью лабораторной тест-системы у больных ВИЧ-инфекцией. В то же время внедрение в практику исследования жБАЛ методом IGRA у пациентов с подозрением на туберкулез, не инфицированных ВИЧ, может служить в качестве вспомогательного диагностического теста наряду с исследованием периферической крови.

Заключение

Проведенная работа показала, что исследование жБАЛ с помощью тест-системы T-SPOT®.TB позволяет повысить выявляемость туберкулезной инфекции у пациентов, не инфицированных ВИЧ, и менее информативно по сравнению с исследованием периферической крови у больных ВИЧ-инфекцией.

Литература

1. Ванеева Т.В., Абу-Аркуб Т.И., Куликовская Н.В. и др. Использование лабораторного иммунологического теста для исследования плевральной жидкости при диагностике туберкулезного плеврита // *Туберкулез и социально значимые заболевания*. – 2019. – Т. 19, № 3. – С. 17-22.
2. Патент 2708388 Российская Федерация. Способ модификации теста для *in vitro* диагностики туберкулезного плеврита. / Ванеева Т.В., Куликовская Н.В., Абу-Аркуб Т.И. и др. Заявитель и патентообладатель: ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы». – № 2019110224; заявл. 08.04.2019; опубли. 06.12.2019, Бюл. № 34.
3. Федеральная служба государственной статистики [Электронный ресурс]. URL: rosstat.gov.ru (дата обращения: 04.03.2025)
4. Цыбикова Э.Б., Пунга В.В., Русакова Л.И. Туберкулез, сочетанный с ВИЧ-инфекцией, в России: статистика и взаимосвязи // *Туберкулез и болезни легких*. – 2018. – Т. 96, № 12. – С. 9-17.
5. Bunjun R., Riou C., Soares A.P. et al. Effect of HIV on the frequency and number of *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD4⁺ T cells in blood and airways during latent *M. tuberculosis* infection // *J. Infect. Dis.* – 2017. – V. 216, № 12. – P. 1550-1560.

6. Bunjun R., Soares A.P., Thawer N. et al. Dysregulation of the Immune Environment in the Airways During HIV Infection // *Front. Immunol.* – 2021. V. 12. P. 707355.
7. Chen X., Yang Q., Zhang M. et al. Diagnosis of active tuberculosis in China using an in-house gamma interferon enzyme-linked immunospot assay // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2009. – Vol.16, № 6. – P. 879-884.
8. Day C.L., Abrahams D.A., Harris L.D. et al. HIV-1 Infection is associated with depletion and functional impairment of Mycobacterium tuberculosis-specific CD4 T cells in individuals with latent tuberculosis infection // *J. Immunol.* – 2017. – V. 199, № 6. – P. 2069-2080.
9. Global tuberculosis report 2023. Geneva: World Health Organization; 2023. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
10. Guo Q., Zhang J., Li G. et al. Elevated antigen-specific IFN- γ responses in bronchoalveolar lavage fluid impervious to clinical comorbidities improve the pulmonary tuberculosis diagnosis // *Tuberculosis (Edinb.)*. – 2020. – Vol. 122. – P. 101942.
11. Herrera M.T., Guzmán-Beltrán S., Bobadilla K. et al. Human pulmonary tuberculosis: understanding the immune response in the bronchoalveolar system // *Biomolecules*. – 2022. – V. 12, № 8. – P. 1148.
12. Jambo K.C., Banda D.H., Afran L. et al. Asymptomatic HIV-infected individuals on antiretroviral therapy exhibit impaired lung CD4(+) T-cell responses to mycobacteria // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2014. – V. 190, № 8. P. 938-947.
13. Kim S.H., Cho O.H., Park S.J. et al. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by T cell-based assays on peripheral blood and cerebrospinal fluid mononuclear cells // *Clin. Infect. Dis.* – 2010. – V. 50, № 10. – P. 1349-1358.
14. Li H., Yang L., Zheng C.Y. et al. Use of bronchoalveolar lavage enzyme-linked immunospot for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis // *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* – 2012. – V. 16, № 12. – P.1668-1673.
15. Li J., Jing Q., Hu Z. Et al. Mycobacterium tuberculosis-specific memory T cells in bronchoalveolar lavage of patients with pulmonary tuberculosis // *Cytokine*. – 2023. – Vol. 171. – P.156374.
16. Liao M., Yang Q., Zhang J. et al. Gamma interferon immunospot assay of pleural effusion mononuclear cells for diagnosis of tuberculous pleurisy // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2014. – Vol.21, № 3. – P. 347-353.
17. Liu F., Du F.J., Jia H.Y. et al. Inadequate values from an interferon-gamma release assay for smear-negative tuberculosis in a high-burden setting // *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* – 2014. – V. 18, № 12. – P. 1496-1501.
18. Liu X., Hou X.F., Gao L. et al. Indicators for prediction of Mycobacterium tuberculosis positivity detected with bronchoalveolar lavage fluid// *Infect. Dis. Poverty* // 2018. – V. 7, № 1. – P. 22.
19. Metcalfe J.Z., Everett C.K., Steingart K.R. et al. Interferon- γ release assays for active pulmonary tuberculosis diagnosis in adults in low- and middle-income countries: systematic review and meta-analysis // *J. Infect. Dis.* – 2011. – Vol. 15 № 204. – P. 1120-1129.
20. Meyer K.C., Raghu G., Baughman R.P. et al. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012. – V. 185, № 9. – P. 1004-1014.
21. Muema D.M., Mthembu M., Schiff A.E. et al. Contrasting inflammatory signatures in peripheral blood and bronchoalveolar cells reveal compartment-specific effects of HIV infection // *Front. Immunol.* – V. 11. – P. 864.
22. Petrelli A., Mijnheer G., Hoytema van Konijnenburg D.P. et al. PD-1+CD8+ T cells are clonally expanding effectors in human chronic inflammation // *J. Clin. Invest.* – 2018. – V. 128, № 10. – P. 4669-4681.
23. Shi F., Qiu X., Yu M. et al. Tuberculosis-specific antigen stimulated and unstimulated interferon- γ for tuberculous meningitis diagnosis: A systematic review and meta-analysis // *PLoS One*. – 2022. – Vol. 17 № 8. – e0273834.
24. Thomas M.M., Hinks T.S., Raghuraman S. et al. Rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis meningitis by enumeration of cerebrospinal fluid antigen-specific T-cells // *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* – 2008. – V. 12, № 6. – P. 651-657.
25. Wilkinson K.A., Wilkinson R.J., Pathan A. et al. Ex vivo characterization of early secretory antigenic target 6-specific T cells at sites of active disease in pleural tuberculosis // *Clin. Infect. Dis.* – 2005. – V. 40, № 1. – P. 184-187.
26. Xiao G., Huang W., Zhong Y. et al. Uncovering the bronchoalveolar single-cell landscape of patients with pulmonary tuberculosis with human immunodeficiency virus type 1 coinfection // *J. Infect. Dis.* – 2024. – V. 230, № 3. P. 524-535.
27. Zhang M., Wang H., Liao M. et al. Diagnosis of latent tuberculosis infection in bacille Calmette-Guerin vaccinated subjects in China by interferon-gamma ELISpot assay // *Int. J. Tubercul. Lung. Dis.* – 2010. – Vol.14, № 12. – P. 1556-1563.

Об авторах

Ванеева Татьяна Валерьевна – ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат медицинских наук

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Строминка, д. 10, стр. 1

Тел. 8 (495) 603-30-33

e-mail: vaneevatv2020@gmail.com

Быков Сергей Владимирович – врач-эндоскопист Клиники № 2 ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы»

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Барболина, д. 3

Тел. 8 (499) 268-25-00

e-mail: serg.bykov73@mail.ru

Свириденко Мария Александровна – ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат медицинских наук

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Строминка, д. 10, стр. 1

Тел. 8 (495) 603-30-33

e-mail: rna77@mail.ru

Сафонова Светлана Григорьевна – заведующая отделом проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», доктор биологических наук

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Строминка, д. 10

Тел. 8 (499) 268-08-76, тел./факс 8 (499) 785-20-82

e-mail: safonova.s.g@inbox.ru

Синицын Михаил Валерьевич – заместитель главного врача по медицинской части (по хирургии) НМИЦ фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний Минздрава России, профессор кафедры фтизиатрии Российской академии непрерывного медицинского образования Минздрава России, доктор медицинских наук

Адрес: 127463, г. Москва, ул. Достоевского, д. 4, корп. 2

Тел. 8 (495) 631-15-15

e-mail: msinitsyn@mail.ru