

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ *IN VITRO* И *IN VIVO* В ДИАГНОСТИКЕ ТУБЕРКУЛЕЗА У ПАЦИЕНТОВ С ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ ИММУНОСУПРЕССИИ

В.В. Манина¹, А.А. Старшинова¹, А.М. Пантелеев^{2,3}, В.Ю. Журавлев¹, О.А. Якунова¹, П.К. Яблонский^{1,4}

IMMUNOLOGICAL TEST *IN VITRO* AND *IN VIVO* FOR DIAGNOSTIC OF TUBERCULOSIS IN HIV-INFECTED PATIENTS DEPEND ON THE LEVEL OF THE IMMUNOSUPPRESSION

V.V. Manina, A.A. Starshinova, A.M. Panteleev, V.Yu. Zhuravlev, O.A. Yakunova, P.K. Yablonsky

Диагностика туберкулеза у пациентов с ВИЧ-инфекцией продолжает оставаться самой актуальной проблемой сегодняшнего дня, что связано с неуклонным ростом ВИЧ-инфекции. В мировой практике уделяют большое значение применению тестов на высвобождение гамма-интерферона (IGRA - interferon gamma release assay) – SPOT (ELISPOT) и QuantiFERON®-TB Gold тест, которые могут быть полезны в ранней диагностике туберкулеза у пациентов с ВИЧ-инфекцией, в особенности с различным уровнем иммуносупрессии. В Российской Федерации наиболее распространены тесты *in vivo* (проба Манту с 2 ТЕ и проба с Диаскинтестом®). Сравнения результатов тестов *in vitro* и *in vivo* у пациентов с ВИЧ-инфекцией не проводилось. В настоящем исследовании получены данные при обследовании 56 пациентов с коинфекцией ВИЧ/туберкулез и 41 пациента из числа лиц, живущих с ВИЧ-инфекцией. На фоне ВИЧ-инфекции кожные пробы (проба Манту с 2 ТЕ и проба с Диаскинтестом®) продемонстрировали прямую зависимость от уровня иммуносупрессии в отличие от IGRA-тестов, что позволяет проводить данные исследования в условиях, когда существующие кожные пробы не работают.

Ключевые слова: ВИЧ, диагностика, иммунологические методы, кожные пробы, туберкулез, IGRA-тесты

Combination of TB and HIV-infection is still the most nowadays important problem, and it connects not only with steady growth of HIV-infection, but also with difficulties in TB diagnosis. At the same time in global practice IGRA-tests applying, to which they belong to T-SPOT®.TB test and QuantiFERON®-TB Gold test, they pay great attention to it, particularly among patients with HIV-infection. In Russia, skin tests are commonly used (Mantoux test with 2 TU and test with Diaskintest®). In the present study, 56 smear positive HIV/TB patients and 41 patients living with HIV tested with all for immunological tests. In active TB cases, IGRA-test and test with Diaskintest® show comparable the same results. Against the backdrop of HIV skin tests (Mantoux test with 2 TE and tests with Diaskintest®) it was demonstrated direct dependence of level immunosuppression in contrast to IGRA-tests, that allows to carry out these researches in conditions when standard skin tests do not work.

Keywords: HIV, diagnosis, immunologic methods, skin tests, tuberculosis, IGRA-tests.

Введение

ВИЧ-инфекция продолжает оставаться важнейшей медицинской проблемой [8, 10, 12]. В настоящее время известна высокая частота генерализованных форм туберкулеза в сочетании с ВИЧ-инфекцией на стадии СПИДа. ВИЧ и микобактерия туберкулеза (МБТ) являются синергистами, и их сочетание приводит к трудностям диагностики и лечения туберкулеза, тем самым увеличивая риск смертности в два раза [3, 11].

Диагностика туберкулеза у пациентов с ВИЧ-инфекцией основана на клинической симптоматике, рентгенодиагностике, туберкулинодиагностике и поиске МБТ [1, 4, 5, 6, 10]. Рентгенографические проявления туберкулеза легких у этих пациентов часто имеют нетипичный характер в связи с первичным туберкулезом (38%) и без рентгенологических изменений – 8,5% [6]. При этом бактериовыделение среди пациентов с туберкулезом и ВИЧ-инфекцией зафиксировано лишь в 48,8% случаев

¹ ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России

² Городская туберкулезная больница № 2, г. Санкт-Петербург

³ ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России

⁴ ФГБУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет»

Таблица 1. Результаты иммунологических методов в исследуемых группах

Группа наблюдения	Иммунологические тесты							
	Проба Манту с 2 ТЕ		Проба с Диаскинтестом®		QuantiFERON®-TB Gold		T-SPOT®.TB	
	Отриц. % (абс.)	Полож. % (абс.)	Отриц. % (абс.)	Полож. % (абс.)	Отриц. % (абс.)	Полож. % (абс.)	Отриц. % (абс.)	Полож. % (абс.)
I (ВИЧ-инфекция, n = 46)	93,5 (43)	6,5 (3)	86,9 (40)	13,1 (6)	89,2 (41)	10,8 (5)	73,9 (34)	26,1 (12)
II (коинфекция ВИЧ/ТБ, n = 56)	80,4 (47)	19,6 (9)	82,6 (46)	17,4 (11)	37,5 (21)	62,5* (35)	30,2 (17)	69,8* (39)

* различия между I и II группами достоверны

(в 53,3% – методом микроскопии, в 26,6% – методом посева и лишь в 0,1% – с применением молекулярно-генетических методов). Смертность пациентов с ВИЧ-инфекцией обусловлена в 50% случаев наличием туберкулезной инфекции, при этом выявление данного контингента пациентов в 61,8% случаев происходит по жалобам [1].

Многочисленные исследования, проведенные в мировой практике, посвящены новым иммунологическим тестам, основанным на высвобождении гамма-интерферона под воздействием специфических туберкулезных антигенов – так называемых IGRA-тестов (*interferon gamma release assay*). Широко используют два коммерческих теста – T-SPOT®.TB (T-SPOT) и QuantiFERON®-TB Gold (QFT), открывающие широкие перспективы ранней диагностики туберкулезной инфекции, в том числе на фоне ВИЧ-инфекции [9, 13, 14, 15]. В Российской Федерации эти тесты начали применять только с 2012 года [2]. При этом в нашей стране широкое распространение имеют тесты *in vivo* – проба Манту с 2 ТЕ и проба с аллергеном туберкулезным рекомбинантным (препарат «Диаскинтест»® [7]). Однако детального сравнения результатов тестов *in vitro* и *in vivo* у пациентов с ВИЧ-инфекцией в современных российских эпидемических условиях, в том числе у пациентов с различным уровнем иммуносупрессии, не проводили.

Цель исследования

Сравнить результаты иммунологических методов *in vitro* и *in vivo* при диагностике туберкулезной инфекции у пациентов с ВИЧ-инфекцией с различным уровнем иммуносупрессии.

Материалы и методы исследования

В 2014-2015 гг. проведено проспективное сравнительное исследование лиц, живущих с ВИЧ инфекцией (I группа, 46 чел.), и больных туберкулезом органов дыхания с бактериовыделением в сочетании с ВИЧ-инфекцией (II группа, 56 чел.). Из исследования исключены лица, у которых были выделены культуры нетуберкулезных микобактерий.

Пациенты были распределены на четыре подгруппы по уровню CD4⁺-лимфоцитов: 100 кл/мкл и менее, от 101 до 200 кл/мкл, от 201 до 350 кл/мкл и более 350 кл/мкл.

Диагностический комплекс включал оценку клинических проявлений заболевания, иммунологические тесты (проба Манту с 2 ТЕ, проба с Диаскинтестом® (ДСТ), тесты QuantiFERON®-TB Gold и T-SPOT®.TB), рентгенологическое обследование (обзорная рентгенограмма грудной клетки, многосрезовая компьютерная томография (МСКТ), микробиологическое исследование респираторного материала (промывных вод бронхов, мокроты) на наличие МБТ (бактериоскопия, посев на плотные питательные среды – Левенштейна-Йенсена, Финна-II, на жидкую питательную среду в системе BACTEC MGIT 960), поиск ДНК МБТ с использованием системы «Амплитуб-РВ-Скрин» (ООО «Синтол», Россия).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы SPSS 16.0. Применяли критерий χ^2 , различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение

Число положительных результатов иммунологических проб было достоверно выше во II группе как при использовании теста QuantiFERON®-TB Gold (QFT) (62,5%), так и теста T-SPOT®.TB (T-SPOT) (69,8%), причем достоверных отличий по частоте положительных результатов у больных с коинфекцией ВИЧ/туберкулез между тестами *in vitro* не выявлено (табл. 1). Положительные результаты тестов достоверно коррелировали с наличием туберкулеза ($r = 0,564$). Следует отметить, что у каждого четвертого пациента с ВИЧ-инфекцией, не болеющего туберкулезом, был положительным тест T-SPOT®.TB.

Достоверных различий между результатами тестов *in vivo* при сравнении I и II групп не получено. Проба Манту с 2 ТЕ и проба с Диаскинтестом показали положительный результат лишь в 6,5% и 13,1% случаев, соответственно.

В группе II, у пациентов с туберкулезом и ВИЧ-инфекцией, положительные результаты QFT определяли достоверно чаще как в сравнении с пробой Манту (62,5% против 19,6%, $p < 0,05$), так и с ДСТ (62,5% против 17,4%, $p < 0,001$). Результаты T-SPOT также были достоверно чаще положительными по сравнению с пробой Манту (69,8% против 19,6%, $p < 0,001$) и ДСТ (69,8% против 17,4%, $p < 0,001$). Результаты T-SPOT и QFT коррелировали между собой ($r = 0,498$, $p < 0,01$).

Таблица 2. Результаты иммунологических методов у пациентов с туберкулезом и ВИЧ-инфекцией (II группа) при различном уровне CD4⁺-лимфоцитов

Количество CD4 ⁺ -лимфоцитов	Иммунологические тесты							
	Проба Манту с 2 ТЕ		Проба с Диаскинтестом®		QuantiFERON®-TB Gold		T-SPOT®.TB	
	Отриц. % (абс.)	Полож. % (абс.)	Отриц. % (абс.)	Полож. % (абс.)	Отриц. % (абс.)	Полож. % (абс.)	Отриц. % (абс.)	Полож. % (абс.)
100 кл/мкл и менее (n = 17)	100,0 (17)	–	100,0 (17)	–	47,1 (8)	52,9 (9)	41,2 (7)	58,8 (10)
101-200 кл/мкл (n = 12)	91,7 (11)	8,3 (1)	91,7 (11)	8,3 (1)	33,3 (5)	66,7 (7)	45,5 (5)	58,4 (7)
201-350 кл/мкл (n = 13)	76,9 (10)	23,1 (3)	92,3 (12)	7,7 (1)	38,4 (5)	61,6 (8)	38,4 (5)	61,6 (8)
Более 350 кл/мкл (n = 17)	70,6 (12)	29,4 (5)	82,4 (14)	17,6 (3)	29,4 (5)	70,6 (12)	23,5 (4)	76,5 (13)

При сравнении результатов тестов у больных ТБ+ВИЧ с различным уровнем CD4⁺-лимфоцитов выявили, что у самой сложной для диагностики категории пациентов (уровень CD4⁺-лимфоцитов **100 кл/мкл и менее**) проба Манту и ДСТ во всех случаях не показали ни одного положительного результата (табл. 2).

Положительные результаты QFT и T-SPOT регистрировали у 52,9% и 58,8% пациентов с максимальной иммуносупрессией. Достоверных различий между частотой положительных результатов этих тестов найдено не было. Однако частота положительных результатов QFT была достоверно выше, чем пробы Манту с 2 ТЕ ($p < 0,05$) и ДСТ ($p < 0,05$). Аналогичные результаты были получены при сравнении T-SPOT и проб *in vivo* ($p < 0,05$).

В группе больных с уровнем CD4⁺-лимфоцитов **от 101 до 200 кл/мкл** по кожным пробам были получены идентичные результаты, также с низким процентом положительного результата (8,3% в обеих подгруппах). Результаты QFT и T-SPOT были достоверно более высокими (66,7% и 58,4%, соответственно, $p < 0,05$). Так же как в группе с максимальной иммуносупрессией, результаты тестов *in vitro* у пациентов с уровнем CD4⁺-лимфоцитов от 101 до 200 кл/мкл достоверно между собой не различались ($p < 0,05$), тогда как различия между ними и пробами *in vivo* были достоверными.

У пациентов с уровнем CD4⁺-лимфоцитов **от 201 до 350 кл/мкл** достоверных различий между частотой положительных реакций при пробе Манту и ДСТ не было выявлено. Также между собой не различались результаты тестов *in vitro*.

Различия между результатами пробы Манту и T-SPOT, ДСТ и T-SPOT оставались достоверными ($p < 0,05$), а при сопоставлении положительных результатов QFT и пробы Манту различия оказались недостоверными.

У больных с максимально высоким иммунным статусом (выше 350 кл/мкл) частота положительных результатов пробы Манту была выше, чем ДСТ: 29,4% и 17,6%, соответственно. Частота положительного теста T-SPOT была несколько выше (76,5%), чем теста QFT (70,6%), однако достоверных различий между этими результатами найдено не было.

При корреляционном анализе была выявлена обратная зависимость ($r = -0,27$) между положительным результатом ДСТ и уровнем CD4⁺-лимфоцитов у пациентов с коинфекцией ВИЧ/туберкулез. Аналогичная связь была выявлена и при анализе результатов пробы Манту и уровня CD4⁺-лимфоцитов в крови ($r = -0,34$). Важно отметить, что между результатами T-SPOT, QFT и уровнем CD4⁺-лимфоцитов корреляция была очень слабой ($r = -0,16$ и $r = -0,04$, соответственно).

При сопоставлении частоты положительных результатов T-SPOT в группах больных туберкулезом и ВИЧ-инфекцией с уровнем CD4⁺-лимфоцитов менее 200 кл/мкл и более 350 кл/мкл достоверных различий выявлено не было. Аналогичные результаты были получены при анализе результатов QFT.

Закономерность, полученная по данным тестов при различном уровне иммуносупрессии у пациентов с ВИЧ-инфекцией и туберкулезом (II группа), прослеживалась и при анализе результатов тестов в I группе – у лиц, живущих с ВИЧ-инфекцией (табл. 3).

Таблица 3. Результаты иммунологических тестов у пациентов с ВИЧ-инфекцией (I группа исследования) при различном уровне CD4⁺-лимфоцитов

Количество CD4 ⁺ -лимфоцитов	Иммунологические тесты							
	Проба Манту с 2 ТЕ		Проба с Диаскинтестом®		QuantiFERON®-TB Gold		T-SPOT®.TB	
	Отриц. % (абс.)	Полож. % (абс.)	Отриц. % (абс.)	Полож. % (абс.)	Отриц. % (абс.)	Полож. % (абс.)	Отриц. % (абс.)	Полож. % (абс.)
100 кл/мкл и менее (n = 16)	100,0 (16)	–	100,0 (16)	–	87,5 (14)	12,5 (2)	81,3 (13)	18,7 (3)
101-200 кл/мкл (n = 10)	100,0 (10)	–	100,0 (10)	–	70,0 (7)	30,0 (3)	90,0 (9)	10,0 (1)
Более 200 кл/мкл (n = 15)	93,3 (14)	6,7 (1)	86,7 (13)	13,3 (2)	66,7 (10)	33,3 (5)	60,0 (9)	40,0 (6)

Положительные результаты тестов *in vivo* получены только у пациентов с уровнем CD4⁺ кл/мкл от 201 и более: в 13,3% при пробе с Диаскинтестом® и в 6,7% при пробе Манту с 2 ТЕ. Увеличение числа положительных результатов в зависимости от уровня CD4⁺-клеток прослеживается и при проведении тестов *in vitro*. У пациентов с уровнем CD4⁺ кл/мкл 201 и более, в сравнении с пациентами со 100 кл/мкл и менее, тест QFT давал положительные результаты в 2,5 раза чаще (33,3% в сравнении с 12,5%), а тест T-SPOT – в 2,1 раза чаще (40,0% и 18,7%). Таким образом, тесты на высвобождение гамма-интерферона позволяют выявлять латентную туберкулезную инфекцию у самой уязвимой в отношении развития активного туберкулеза категории живущих с ВИЧ-инфекцией лиц – пациентов с высоким уровнем иммуносупрессии. При этом тесты *in vivo* не могут быть использованы у данных лиц в связи с низкой информативностью.

Заключение

Положительные результаты тестов на высвобождение гамма-интерферона (QFT и T-SPOT) и пробы с аллергеном туберку-

лезным рекомбинантным регистрируют, в сравнении с пробой Манту с 2 ТЕ, в группе больных активным туберкулезом достоверно чаще. При этом результаты кожных проб (ДСТ и пробы Манту) продемонстрировали зависимость от уровня иммуносупрессии у пациентов с ВИЧ-инфекцией, так как при ее наличии эти диагностические методы были отрицательными.

Наряду с этим, важным аспектом является отсутствие зависимости тестов на высвобождение гамма-интерферона от степени снижения показателей CD4⁺-лимфоцитов у пациентов с ВИЧ-инфекцией, что позволяет проводить данные исследования в условиях значительной иммуносупрессии, когда стандартные кожные туберкулиновые пробы не работают. Однако тесты на высвобождение гамма-интерферона позволяют выявить группу повышенного риска развития активного туберкулеза у лиц, живущих с ВИЧ-инфекцией, и провести курс профилактической терапии с дальнейшим наблюдением в динамике.

Литература

1. Алексеева Л.П. Особенности выявления, клинического течения и лечения больных туберкулезом и ВИЧ-инфекцией: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2008. – 22 с.
2. Белокуров М.А., Старшинова А.А., Журавлев В. Ю. и др. Возможности иммунологических методов в дифференциальной диагностике саркоидоза и туберкулеза органов дыхания // Журнал инфектологии. – 2015. – Т. 7. – № 2. – С. 98-104.
3. Вирус иммунодефицита человека – медицина / под. ред. Н.А. Белякова и А.Г. Рахмановой. – СПб.: Балтийский медицинский образовательный центр, 2010. – 752 с.
4. Журавлев В.Ю., Беляков М.В., Арчакова Л.И. и др. Инновационные технологии в диагностике и лечении туберкулезного поражения // Медицинский академический журнал. – 2009. – № 4. – С. 68-75.
5. Журавлев В.Ю., Нарвская О.В., Вязовая А.А. и др. Молекулярно-генетические технологии в этиологической диагностике диссеминированного туберкулеза легких // Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунобиологии. – 2010. – № 3. – С. 77-81.
6. Зимица В.Н., Васильева И. А., Кравченко А. В. и др. Профилактика туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией // Туберкулез и болезни легких. – 2013. – № 10. – С. 3-8.
7. Литвинов В.И., Слогодца Л.В., Сельцовский П.П. Новый кожный тест для диагностики туберкулезной инфекции // Российский медицинский журнал. – 2009. – № 1. – С. 1-4.
8. Нечаева О.Б., Стерликов С.А., Хуриева Н.Б. Целевые индикаторы и показатели государственной программы развития здравоохранения России до 2020 г. // Туберкулез и болезни легких. – 2014. – № 12. – С. 25-34.
9. Пантелеев А.М., Манина В. В., Старшинова А. А. Применение T-SPOT TB у больных ВИЧ-инфекцией // Туберкулез и болезни легких. – 2014. – № 9. – С. 52-53.
10. Покровский В.В., Ермак Т.Н., Беляева В.В., Юрин О.Г. ВИЧ-инфекция: клиника, диагностика, лечение. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. – 496 с.
11. Рахманова А.Г., Яковлев А.А., Комарова Д.В. и др. Характеристика летальных исходов от туберкулеза у больных с ВИЧ-инфекцией // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2012. – Т. 4. – № 2. – С. 120-123.
12. Яблонский П.К. Российская фтизиатрия сегодня – выбор пути развития // Медицинский альянс. – 2013. – № 3. – С. 5-24.
13. Chen J., Zhang R., Wang J. et al. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of active tuberculosis in HIV-infected patients: a systematic review and meta-analysis // PLoS One. – 2011. – Vol. – N. 11. – e26827.
14. Rangaka M.X., Wilkinson K.A., Glynn J.R. Predictive value of interferon-γ release assays for incident active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis // Lancet Infect. Dis. – 2012. – Vol. 12. – N. 1. – P. 45–55.
15. Sester M., Sotgiu G., Lange C. et al. Interferon-γ release assays for the diagnosis of active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis // Eur. Respir. J. – 2011. – Vol. 37. – P. 100-111.

Сведения об авторах

Манина Вера Владимировна – аспирант ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России

Адрес: 191036, г. Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2-4

Тел. + 7 (812) 297-22-63, факс + 7 (812) 579-25-73

e-mail: manivera@yandex.ru

Старшинова Анна Андреевна – руководитель отдела фтизиопульмонологии ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России, доктор медицинских наук

Адрес: 191036, г. Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2-4

Тел. + 7 (812) 297-22-63, факс + 7 (812) 579-25-73

e-mail: starshinova_777@mail.ru

Пантелеев Александр Михайлович – профессор кафедры социально значимых инфекций ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, заведующий отделением туберкулеза и ВИЧ Санкт-Петербургского ГБУЗ «Городская туберкулезная больница № 2», доктор медицинских наук

Адрес: 194214, г. Санкт-Петербург, пр. Мориса Тореза, д. 93

Тел. + 7 (812) 293-54-22, факс + 7 (812) 554-16-91

e-mail: alpanteleev@gmail.com

Журавлев Вячеслав Юрьевич – руководитель лабораторного отдела ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России, кандидат медицинских наук, доцент

Адрес: 191036, г. Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2-4

Тел. + 7 (812)

Якунова Ольга Александровна – заведующая лабораторией клинической иммунологии ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России

Адрес: 194064, г. Санкт-Петербург, ул. Политехническая, д. 32

Тел. + 7 (812) 297-67-31

Яблонский Петр Казимирович – директор ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России, декан медицинского факультета ФГБУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», доктор медицинских наук, профессор

Адрес: 191036, г. Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2-4

Тел.: + 7 (812) 606-65-74, + 7 (812) 579-25-54

e-mail: spbniif_all@mail.ru