© Коллектив авторов, 2021

Бородулина Е.А.¹, Кудлай Д.А.^{2,3}, Кузнецова А.Н.¹, Докторова Н.П.⁴,
Бородулин Б.Е.¹, Калашникова Е.В.¹

Возможности методики Enzyme-Linked Immunospot Assay (ELISPOT) в проведении противотуберкулезных мероприятий среди ВИЧ-серопозитивных лиц

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 443099, г. Самара, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, 115522, г. Москва, Российская Федерация

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), 119991, г. Москва, Российская Федерация

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127473, г. Москва, Российская Федерация

Резюме

Введение. Проблема туберкулеза (ТБ), сочетанного с ВИЧ-инфекцией, в настоящее время занимает центральное место во фтизиатрии. ВИЧ-инфекция значительно увеличивает риск реактивации латентной туберкулезной инфекции (ЛТИ) до клинической формы заболевания, что требует нового подхода к раннему выявлению ТБ на этапе развития ЛТИ в наиболее уязвимой группе пациентов. Для раннего выявления туберкулезной инфекции, в том числе ЛТИ, в настоящее время доступны иммунодиагностические тесты, основанные на определении иммунного ответа на белки ESAT6-CFP10, специфичные для вирулентного штамма микобактерий туберкулеза (МБТ). По данным многих авторов, наиболее эффективной для раннего выявления ТБ у ВИЧ-инфицированных пациентов представляется методика определения количества мононуклеарных клеток крови (спотов), выделяющих интерферон- γ (ИФН- γ) в ответ на стимуляцию ESAT-6 и CFP-10, и получения суспензии клеток определенной концентрации (ELISPOT). Оценка значимости метода в диагностике туберкулезной инфекции в скрининге пациентов с разным уровнем иммуносупрессии представляется актуальной.

Цель исследования – оценить результаты T-SPOT.TB у пациентов с ВИЧ-инфекцией при разном уровне CD4⁺-клеток, сопоставив с другими методами выявления ТБ на примере Самарской области.

Материал и методы. В 2019–2020 гг. выполнен анализ результатов T-SPOT.TB у 398 пациентов с ВИЧ-инфекцией, состоящих на диспансерном наблюдении в Центре по профилактике и борьбы со СПИДом и инфекционными заболеваниями. *Критерии включения:* возраст 18 лет и старше, диагноз «ВИЧ-инфекция», выполнение компьютерной томографии (КТ) легких, наличие анализа крови на T-SPOT.TB, наличие результата пробы с аллергеном туберкулезным рекомбинантным (АТР).

Результаты. Установлено, что при изменениях на КТ, характерных для ТБ, из 117 случаев верифицированного ТБ у пациентов с уровнем CD4⁺-клеток $230,05 \pm 15,3$ кл/мкл при доверительном интервале (ДИ) [190,91–256,2] положительный T-SPOT.TB зарегистрирован у 103 (88 %) пациентов. При сравнении результатов пробы с АТР и T-SPOT.TB при уровне CD4⁺-клеток 500–350 кл/мкл отмечено отсутствие статистически значимой разницы в эффективности тестов ($\chi^2 = 1,28$; $p = 0,2579$; ОШ = 2,28), при снижении уровня CD4⁺-клеток < 350 кл/мкл роль T-SPOT.TB в уточнении диагноза значительно увеличивается. При отсутствии изменений на КТ положительный результат T-SPOT.TB позволил диагностировать наличие ЛТИ у 17,9 % пациентов.

Заключение. Иммунодиагностические пробы могут использоваться в диагностическом комплексе наблюдения пациентов с ВИЧ-инфекцией для выявления туберкулезной инфекции, что позволит проводить своевременные противотуберкулезные мероприятия.

Для корреспонденции

Бородулина Елена Александровна –
доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой
фтизиатрии и пульмонологии
ФГБОУ ВО СамГМУ
Минздрава России,
Самара, Российская Федерация
E-mail: borodulinbe@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3063-1538>

Ключевые слова: T-SPOT.TB; проба с АТФ; туберкулез; диагностика; ВИЧ-инфекция; СПИД-центр

Статья получена 12.08.2021. **Принята в печать** 27.09.2021.

Для цитирования: Бородулина Е.А., Кудлай Д.А., Кузнецова А.Н., Докторова Н.П., Бородулин Б.Е., Калашникова Е.В. Возможности методики Enzyme-Linked Immunospot Assay (ELISPOT) в проведении противотуберкулезных мероприятий среди ВИЧ-серопозитивных лиц. Иммунология. 2021; 42 (5): 536–544. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-5-536-544>

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Borodulina E.A.¹, Kudlay D.A.^{2,3}, Kuznetsova A.N.¹, Doktorova N.P.⁴,
Borodulin B.E.¹, Kalashnikova E.V.¹**

Possibilities of the Enzyme-Linked Immunospot Assay (Elispot) method in carrying out anti-tuberculosis measures in patients with HIV infection

¹ Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, 443099, Samara, Russian Federation

² National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, 115522, Moscow, Russian Federation

³ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 119991, Moscow, Russian Federation

⁴ National Medical Research Center of Phthisiopulmonology and Infectious Diseases of the Ministry of Health of the Russian Federation, 127473, Moscow, Russian Federation

Abstract

Introduction. The problem of tuberculosis (TB), combined with HIV infection, currently occupies a central place in phthisiology. HIV infection significantly increases the risk of reactivation of latent tuberculosis infection to the clinical form of the disease, which requires a new approach to early detection of tuberculosis at the stage of development of latent tuberculosis infection (LTBI) in the most vulnerable group of patients. A key factor in the disruption of the immune defense mechanisms against tuberculosis, leading to the activation of LTBI, is a decrease in the number of CD4⁺-cells. For early detection of tuberculosis infection, including LTBI, immunodiagnostic tests based on the determination of the immune response to ESAT6-CFP10 proteins specific to the virulent MBT strain are currently available. According to many authors, the most effective method for early detection of TB in HIV-infected patients is the method of determining the number of mononuclear blood cells (spots) that release interferon- γ (IFN- γ) in response to stimulation of ESAT-6 and CFP-10 and obtaining a cell suspension a certain concentration (ELISPOT) Assessment of the significance of the method in the diagnosis of tuberculosis infection in screening patients with different levels of immunosuppression seems relevant.

Aim of the study – to evaluate the results of T-SPOT.TB in patients with HIV infection with different levels of CD4⁺-cells, comparing them with other methods of detecting TB using the example of the Samara region.

Material and methods. In 2019–2020 an analysis of the T-SPOT.TB results was carried out in 398 patients with HIV infection who are under dispensary observation at the Center for the Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases. *Inclusion criteria:* age 18 years and older, diagnosis of HIV infection, CT scan of the lungs, the presence of a blood test for T-SPOT.TB, the presence of a test result with ATP.

Results. It was found that with changes on CT, characteristic of tuberculosis, out of 117 cases of verified tuberculosis in patients with CD4⁺-cells level 230.05 ± 15.3 CI [190.91–256.2], positive T-SPOT.TB was registered in 103 (88 %) patients. When comparing the results of the test with ATP and T-SPOT.TB at a CD4⁺-cells level of 500–350 cells/mcl, there was no statistically significant difference in the effectiveness of the tests ($\chi^2 = 1.28$, $p = 0.2579$, OR = 2.28), with a decrease in the level of CD4⁺-cells less than 350 cells/ μ l, the role of T-SPOT.TB increases significantly. With a positive T-SPOT.TB result and no changes on CT, persons with suspected tuberculosis were diagnosed with LTBI in 17.6 %.

For correspondence

Elena A. Borodulina – MD, PhD,
Professor, Head of the Department
of Phthisiology and Pulmonology,
SamSMU of the MOH of Russia,
Samara, Russian Federation
E-mail: borodulinbe@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3063-1538>

Conclusion. Immunodiagnostic tests can be used in a diagnostic complex for monitoring patients with HIV infections to detect tuberculosis infection, which will allow timely anti-tuberculosis measures.

Keywords: T-SPOT.TB; test with recombinant tuberculosis allergen; tuberculosis; diagnostics; HIV infection; AIDS center

Received 12.08.2021. Accepted 27.09.2021.

For citation: Borodulina E.A., Kudlay D.A., Kuznetsova A.N., Doktorova N.P., Borodulin B.E., Kalashnikova E.V. Possibilities of the Enzyme-Linked Immunospot Assay (ELISPOT) method in carrying out anti-tuberculosis measures in patients with HIV infection. *Immunologiya*. 2021; 42 (5): 536–44. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-5-536-544> (in Russian)

Funding. The study had no sponsor support.

Conflict of interests. Authors declare no conflict of interests.

Введение

Проблема туберкулеза (ТБ), сочетанного с ВИЧ-инфекцией, в настоящее время занимает центральное место во фтизиатрии [1]. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), люди, живущие с ВИЧ-инфекцией, в 21 раз, 95 % доверительный интервал (ДИ) [16–27], чаще заболевают активным ТБ, чем те, у кого нет ВИЧ-инфекции, и фактически 33 % смертей среди ВИЧ-серопозитивных пациентов связана с ТБ [2].

В России в последние годы можно говорить о стабилизации ситуации по ВИЧ-инфекции, в 2019–2020 гг. снижались показатели заболеваемости и смертности по ВИЧ-инфекции, сокращалось число умерших больных с сочетанием ТБ и ВИЧ-инфекции [3]. Однако соотношение показателей заболеваемости ТБ среди постоянного населения меняется в сторону увеличения среди них ВИЧ-инфицированных пациентов: так, в 2019 г. 1667 на 100 тыс. ВИЧ-инфицированных против 27,4 на 100 тыс. ВИЧ-неинфицированных [4]. ВИЧ-инфекция значительно увеличивает риск реактивации латентной туберкулезной инфекции (ЛТИ) до клинической формы заболевания [5–7], что требует нового подхода к раннему выявлению ТБ на этапе развития ЛТИ в наиболее уязвимой группе пациентов. Ключевым фактором нарушения иммунных механизмов защиты от ТБ, приводящим к активации ЛТИ, является снижение количества CD4⁺-клеток [8, 9]. В исследованиях, где иммуносупрессия индуцировалась антителами против CD4, реактивация туберкулезной инфекции была связана с большим истощением CD4⁺-Т-клеток в лимфатических узлах. Исследователи определили, что ответ CD4⁺-клеток может быть связан с активацией размножения микобактерий туберкулеза (МБТ) [10–12]. Для раннего выявления туберкулезной инфекции, в том числе ЛТИ, в настоящее время доступны иммунодиагностические тесты, основанные на определении иммунного ответа на специфичные для вирулентного штамма МБТ белки ESAT6-CFP10. Антигены ESAT-6 и CFP10 входят в состав микобактерий комплекса *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), но отсутствуют в вакцинном штамме BCG и во многих других невирулентных для человека

микобактериях, находящихся в окружающей среде, поэтому на результат не оказывает влияния вакцинация BCG. В настоящее время доступны кожные и лабораторные иммунодиагностические методы.

Кожный диагностикум – проба с аллергеном туберкулезным рекомбинантным (АТР) зарекомендовала себя как высокоточная методика в скрининге туберкулезной инфекции. Однако сочетание ТБ и поздних стадий ВИЧ-инфекции изменило патогенез туберкулезного процесса, сдвинув его в сторону альтеративного воспаления с развитием генерализованных процессов лимфогенного и гематогенного генеза, что может способствовать снижению эффективности инвазивной пробы при выраженном уровне иммуносупрессии. По данным многих авторов, наиболее эффективной для раннего выявления ТБ у ВИЧ-инфицированных пациентов представляется методика определения количества моноклеарных клеток крови (спотов), выделяющих интерферон-γ (ИФН-γ) в ответ на стимуляцию ESAT-6 и CFP-10, и получение суспензии клеток определенной концентрации (ELISPOT) [13–16]. Чувствительность методики позволяет выделить 1 активированную клетку на 300 тыс. клеток и не зависит от уровня иммуносупрессии. В настоящее время методика ELISPOT является основой теста T-SPOT.TB (Oxford Immunotec Ltd., Великобритания, АО «Генериум», Россия).

T-SPOT.TB был официально включен в стандарты диагностики ТБ в Евросоюзе в 2004 г., в США и Канаде его включили в 2005-м, в Южной Корее – в 2006-м, в Тайване – в 2009-м, в Китайской Народной Республике – в 2010 г., в Российской Федерации и в Японии – в 2012 г. [16]. Данные, касающиеся применения T-SPOT.TB в диагностике туберкулезной инфекции у пациентов с ВИЧ-инфекцией на территории Российской Федерации, ограничены. В связи с этим представляется актуальной оценка значимости метода в диагностике как локальных форм ТБ, подтвержденных рентгенологически и бактериологически, так и ЛТИ в скрининге пациентов, поставленных на учет в Центре по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями, с разным уровнем иммуносупрессии.

Цель исследования – оценить результаты T-SPOT.TB у пациентов с ВИЧ-инфекцией при разном уровне CD4⁺-Т-клеток, сопоставив с другими методами выявления ТБ на примере Самарской области.

Материал и методы

Участники исследования. Настоящее исследование было одобрено комитетом по биоэтике Самарского государственного медицинского университета (протокол № 211 от 07.10.2020) в строгом соответствии с международными требованиями и российскими этическими принципами и нормами. В исследование вошли пациенты, проконсультированные фтизиатром в условиях Центра по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями. Все участники исследования подписали информированное согласие. Все пациенты (метод сплошной выборки) заполняли стандартизированную анкету, одобренную этическим комитетом, включающую данные по ВИЧ-инфекции и риску туберкулезной инфекции.

Критерии включения: возраст 18 лет и старше, диагноз «ВИЧ-инфекция», диспансерное наблюдение в Центре по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями, наличие компьютерной томограммы (КТ) легких, кожной пробы с АТР, результата исследования методом T-SPOT.TB, результата бактериоскопии мокроты с окраской по Цилю–Нильсену.

Всем участникам проводили комплексное обследование для диагностики ТБ, включающее оценку анамнеза, жалоб, возможного контакта с больным ТБ, физикальное обследование; лучевое обследование (КТ органов грудной клетки); поиск МБТ в мокроте больного и/или в бронхоальвеолярной жидкости (БАЛЖ), в случае проведения бронхоскопии. Для выявления МБТ использовали методики бактериоскопии мокроты с окраской по Цилю–Нильсену; молекулярно-генетический метод, основанный на технологии гибридизации – HAINGenoType MTBDRPlus (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Германия), посевы на жидких средах в автоматизированной системе BACTEC™ MGIT™ 960 (Becton Dickinson, США), посевы на плотных средах Левенштейна–Йенсена (АО «НПО Микроген», Россия). Была сформирована единая база MS Excel с исключением персональных данных участников исследования. Диагноз «туберкулез» считали верифицированным в случае подтверждения наличия МБТ любым способом.

Критерий ЛТИ – наличие положительного результата иммунологического теста T-SPOT.TB и/или пробы с АТР при отсутствии клинико-рентгенологически данных за активный туберкулез. Постановка и оценка результатов пробы с АТР проводилась в соответствии с инструкцией по медицинскому применению.

Лабораторные исследования. Серологическая диагностика ВИЧ-инфекции заключалась в определении суммарного спектра антител против антигенов ВИЧ с помощью иммуноферментного анализа (ИФА),

подтвержденная иммуноблотом. Клинические стадии ВИЧ-инфекции устанавливали в соответствии с классификацией, рекомендованной приказом № 166 Министерства здравоохранения и социального развития России от 17.03.2006. Для установления иммунодефицитного состояния определяли абсолютное содержание CD4⁺-лимфоцитов на мкл крови. Методика проведения теста T-SPOT.TB соответствовала инструкции к тест-системе. Кровь из вены забирали обычным способом, из нее выделяли моноклеарные клетки (МНПК), далее промывали клетки для удаления любых источников фонового сигнала, мешающего учету. Затем МНПК подсчитывали и стандартизировали количество клеток. Подсчет служит гарантией того, что даже для анализа образцов крови лиц с низкими содержанием Т-клеток вследствие ослабления иммунной системы (иммунная недостаточность и иммуносупрессия) в лунки планшета будет добавлено соответствующее количество клеток. После добавления специфических антигенов (раздельно для ESAT6 – панель А и CFP10 – панель В) лейкоцитарную массу помещали в специальные лунки, обработанные антителами к ИФН-γ. После инкубации в течение суток учитывали результат – число пятен на дне лунки, которое соответствовало числу активированных Т-лимфоцитов, высвобождающих ИФН-γ в ответ на воздействие специфических антигенов. Методика выполнения каждого теста включала положительный и отрицательный контроли. Результаты интерпретировали следующим образом: положительный – количество пятен в лунке с антигеном ESAT-6 (панель А) и/или антигеном CFP-10 (панель В) от 8 до 100 с учетом числа пятен в нулевом контроле; отрицательный – количество пятен на обеих панелях А и В ≤ 4 с учетом результатов нулевого контроля; пограничный – количество точек в панели А и/или панели В от 5 до 7; неопределенный – в нулевом контроле > 11 точек или количество пятен положительного контроля < 20. Положительный результат свидетельствовал, что образец содержит эффекторные Т-клетки, реактивные (специфически сенсibilизированные) к *M. tuberculosis*. Отрицательный результат – образец, вероятно, не содержит эффекторных Т-клеток, реактивных (специфически сенсibilизированных) к *M. tuberculosis*.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного пакета Statistica 10, проверка нормальности распределения количественных признаков – с использованием критерия Колмогорова–Смирнова. Для количественных признаков в сравниваемых группах оценивали средние арифметические и среднеквадратичные ошибки среднего ($M \pm m$), рассчитывали границы ДИ. Критическое значение уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принималось равным 0,05. В случае превышения достигнутого уровня принималась нулевая гипотеза.

Для определения достоверности различий в группах сравнения использовали критерий Манна–Уитни. Анализ качественных признаков проводили через исследу-

Рис. 1. Распределение пациентов с ВИЧ-инфекцией по уровню CD4⁺-Т-лимфоцитов

дование их частот посредством таблиц сопряженности с использованием критерия согласия χ^2 (критерия Пирсона). При работе с малыми выборками применяли критерий Фишера. Для определения зависимостей между переменными проводили корреляционный анализ с расчетом коэффициента ранговой корреляции Кендалла (τ). Достоверным для всех используемых процедур статистического анализа считали уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты

Среди обследованных было 269 (68 %) мужчин, 127 (32 %) женщин, средний возраст – $40,95 \pm 8,02$ года, ДИ [39,95–41,95], статистически значимые различия не установлены ($p = 0,0709$). Большинство были неработающими трудоспособного возраста – 249 (62,9 %), непостоянный характер работы и низкоквалифицированный труд зарегистрирован у 84 (21,2 %) пациентов, 52 (13,1 %) имели высшее образование и постоянную работу, 11 (2,8 %) являлись инвалидами. Установлено, что в 80 % случаев заражение ВИЧ-инфекцией произошло при потреблении инъекционных наркотиков (ПИН).

Положительные результаты, полученные различными методами выявления туберкулезной инфекции у пациентов с ВИЧ-инфекцией

Рис. 2. Результаты применения методов, использованных как скрининговые, для выявления туберкулеза у пациентов с ВИЧ-инфекцией, состоящих на учете в Центре по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями

Давность выявления ВИЧ-инфекции среди всех обследованных – $7,80 \pm 6,41$ года, ДИ [7,0–8,6]. Давность постановки на учет – $3,40 \pm 4,75$ года, ДИ [2,81–3,99]. Постоянно наблюдались в Центре по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями в течение последнего года 174 (43,9 %) пациента.

При анализе уровня CD4⁺-Т-клеток в 100 % случаев отмечено снижение их уровня < 500 кл/мкл (рис. 1).

Результаты применения методов выявления ТБ среди пациентов с ВИЧ-инфекцией представлены на рис. 2.

При оценке результатов КТ, проведенной в качестве скринингового метода, у 217 (56,1 %) пациентов изменений в легочной ткани не выявлено, активный ТБ легких исключен. У 169 (43,9 %) в легочной ткани обнаружены изменения разного характера, пациенты детально обследованы на ТБ всеми заявленными методами.

При анализе мокроты методом бактериоскопии с окраской по Цилю–Нильсену кислотоустойчивые микобактерии (КУМ) выявлены у 54 пациентов, что составило 13,9 % от всех обследованных.

Таблица 1. Результаты иммунодиагностических проб в зависимости от уровня CD4⁺-клеток и наличия бактериовыделения

Стадии ВИЧ-инфекции	МБТ (+)	T-SPOT.TB		Проба с АТР	
		положительный результат T-SPOT.TB, МБТ+	выявляемость на 1000 обследованных	положительный результат пробы с АТР, МБТ+	выявляемость на 1000 обследованных
Стадия 4А (n = 45) (500–350 CD4 ⁺ -клеток/мкл)	24	22	488,9	20	444,4
Стадия 4Б (n = 134) (350–200 CD4 ⁺ -клеток/мкл)	49	44	328,4	40	298,5
Стадия 4В (n = 219) (< 200 CD4 ⁺ -клеток/мкл)	44	13	59,3	1	4,6

Таблица 2. Результативность методов выявления туберкулеза в зависимости от стадии ВИЧ-инфекции

Стадии ВИЧ-инфекции	КТ+	МБТ+	Проба с АТР+	T-SPOT.TB+
Стадия 4А (n = 45) (500–350 CD4 ⁺ -клеток/мкл)	29 $\chi^2 = 10,03$ $p = 0,0026$ ОШ = 2,76	24 $\chi^2 = 14,01$ $p = 0,0002$ ОШ = 3,20	35 $\chi^2 = 81,14$ $p = 0,00001$ ОШ = 17,09	40 $\chi^2 = 61,62$ $p = 0,00001$ ОШ = 19,42
Стадия 4Б (n = 134) (350–200 CD4 ⁺ -клеток/мкл)	63 $\chi^2 = 1,91$ $p = 0,1668$ ОШ = 1,34	49 $\chi^2 = 5,00$ $p = 0,0253$ ОШ = 1,66	59 $\chi^2 = 45,18$ $p = 0,00001$ ОШ = 4,98	90 $\chi^2 = 85,61$ $p = 0,00001$ ОШ = 8,14
Стадия 4В (n = 219) (< 200 CD4 ⁺ -клеток/мкл)	77 $\chi^2 = 10,63$ $p = 0,0011$ ОШ = 0,51	44 $\chi^2 = 20,32$ $p = 0,00001$ ОШ = 0,37	1 $\chi^2 = 144,08$ $p = 0,00001$ ОШ = 0,004	13 $\chi^2 = 190,29$ $p = 0,00001$ ОШ = 0,023
Итого: n = 398	169	117	95	143

Результаты проведения иммунологических проб: положительный результат пробы с АТР – 95 (24,6 %) пациентов, положительный результат T-SPOT.TB – 143 (37,0 %).

По результатам комплексного обследования с применением различных методов поиска МТБ верифицированы у 117 пациентов. Средний уровень CD4⁺-клеток в этой группе составил $230,05 \pm 15,3$ 95 %, ДИ [210,91–356,2]. Из 117 случаев положительный T-SPOT.TB был у 103 (88 %) пациентов, положительная проба с АТР – у 60 (51,3 %) пациентов.

Результаты иммунодиагностических проб в зависимости от уровня CD4⁺-клеток и наличия бактериовыделения представлены в табл. 1.

Как следует из табл. 1, среди лиц со стадиями 4А и 4В ВИЧ-инфекции, обследованных методом T-SPOT.TB, выявление случаев ТБ с бактериовыделением превышало этот показатель в группе пациентов, где при обследовании была использована проба с АТР. Необходимо отметить диагностические затруднения при диагностике специфического процесса у лиц со стадией 4В ВИЧ-инфекции с отрицательными иммунологическими пробами: в большинстве случаев регистрировался генерализованный процесс с бактериовыделением, и развитие ареактивности было следствием тяжести патологического процесса.

При отсутствии изменений на КТ у 40 пациентов был положительный результат T-SPOT.TB, из них у 35 пациентов – положительная проба с АТР. Так как у всех были дополнительные факторы риска ТБ, у всех пациентов диагностировано наличие ЛТИ и назначена химиопрофилактика ТБ в условиях Центра по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями.

При наличии изменений на КТ (n = 169) положительные результаты T-SPOT.TB получены в 103 (60,9 %) случаях, отрицательные – в 66 (39,1 %).

При отсутствии изменений на КТ (n = 227) положительные результаты T-SPOT.TB были у 40 (17,6 %) пациентов, отрицательные – у 177 (82,4 %) обследованных.

Отрицательный результат T-SPOT.TB получен у 253 из 398 обследованных пациентов, из них у 177 пациентов изменения на КТ отсутствуют. У 62 пациентов с отрицательным результатом T-SPOT.TB на КТ описаны фиброзные изменения (остаточные изменения ранее перенесенного ТБ) и консолидация легочной ткани ограниченного характера с подозрением на ТБ, МБТ не обнаружены, активный ТБ на данном этапе исключен. Эти пациенты направлены к фтизиатрам для дифференциальной диагностики и определения активности туберкулезного процесса.

Таблица 3. Результативность методов иммунодиагностики туберкулеза в выявлении туберкулезной инфекции в зависимости от стадии ВИЧ-инфекции

Стадии ВИЧ-инфекции	Проба с АТР+	T-SPOT.TB+	Критерий Пирсона, уровень значимости (χ^2 ; p)
Стадия 4А (n = 45) (500–350 CD4 ⁺ -клеток/мкл)	35	40	$\chi^2 = 1,28$ $p = 0,2579$ ОШ = 2,28
Стадия 4Б (n = 134) (350–200 CD4 ⁺ -клеток/мкл)	59	90	$\chi^2 = 14,53$ $p = 0,0002$ ОШ = 2,60
Стадия 4В (n = 219) (< 200 CD4 ⁺ -клеток/мкл)	1	13	$\chi^2 = 8,93$ $p = 0,0028$ ОШ = 13,75
Итого: n = 398	95	143

Рис. 3. Распределение пациентов с верифицированным туберкулезом легких по стадиям ВИЧ-инфекции

По совокупности обследований можно отметить, что при положительных результатах T-SPOT.TB и изменениях на КТ чаще выявляется МБТ: коэффициент ранговой корреляции Кендалла (τ) $\tau = 0,4052$ ($Z = 12,0427$; $p = 0,0000$).

Проведена оценка значимости каждого метода при выявлении туберкулезной инфекции у лиц с ВИЧ-инфекцией в зависимости от стадии заболевания (табл. 2).

При сравнении результатов пробы с АТР и T-SPOT.TB отмечено, что при уровне $CD4^+$ -клеток 500–350 кл/мкл значимой разницы в эффективности не выявлено ($\chi^2 = 1,28$; $p = 0,2579$; ОШ = 2,28), при снижении уровня $CD4^+$ -клеток < 350 кл/мкл роль T-SPOT.TB значительно увеличивается, при этом при уровне $CD4^+$ -клеток < 200 кл/мкл шансы выявить ТБ при T-SPOT.TB увеличиваются в 13 раз ($\chi^2 = 8,93$; $p = 0,0028$; OR = 13,75) (табл. 3).

Обсуждение

Проведенный анализ показал, что для эффективного скрининга на туберкулезную инфекцию у пациентов с ВИЧ-инфекцией нет «золотого стандарта».

Проявления ТБ легких в значительной степени зависят от степени иммунодефицита [17]. Результаты бактериологического исследования мокроты и данные лучевого обследования легких часто отличаются на ранней (уровень $CD4^+$ -клеток > 350 кл/мкл) и поздней (уровень $CD4^+$ -клеток < 200 кл/мкл) стадиях ВИЧ-инфекции. На поздней стадии снижается способность иммунной системы сдерживать размножение и диссеминацию МБТ в организме. Наиболее трудно диагностировать диссеминированный ТБ в связи с редким выделением МБТ и отрицательными кожными пробами, что связано с особенностью морфологических и иммунологических проявлений (см. табл. 2). Поэтому при этой форме ТБ нередко диагностические ошибки, отмечается позднее выявление ТБ на стадии распада и бактериовыделения. В нашем исследовании показана значимая роль иммунодиагностических тестов у лиц с ВИЧ-инфекцией. На стадии 4А выше шанс выявить ТБ по специфическим иммунологическим тестам и диагностиро-

вать ЛТИ, на стадии 4В ТБ чаще выявлялся по характерным изменениям на КТ и выявлению МБТ в мокроте.

Выявление МБТ у пациентов с ВИЧ-инфекцией можно отнести к абсолютному диагностическому критерию, но результат зависит от применяемой методики идентификации микобактерий. Большинство пациентов с верифицированным ТБ были на стадии 4Б ВИЧ-инфекции (рис. 3).

У пациентов с положительным результатом T-SPOT.TB при отсутствии изменений на КТ и отсутствии МБТ выявление ЛТИ позволила обоснованно сформировать группы повышенного риска по ТБ для проведения превентивной химиотерапии и предупреждения развития локальных форм ТБ.

Заключение

Снижение количества $CD4^+$ -клеток у пациентов с ВИЧ-инфекцией создает условия как для инфицирования МБТ, так и для реализации ЛТИ в ТБ. Перспективным представляется использование методики Enzyme-Linked Immunospot Assay (ELISPOT), отражающей реакцию Т-лимфоцитов на стимуляцию специфическими белками *M. tuberculosis* (ESAT-6 и CFP-10). Проведенный скрининг 398 пациентов с ВИЧ-инфекцией, состоящих на диспансерном учете в Центре по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями, с помощью различных методов (тест T-SPOT.TB, КТ, кожная проба с АТР и микроскопия мокроты на МБТ в диагностическом материале), показал наибольшую сопоставимую результативность лучевой диагностики с T-SPOT.TB. У 117 пациентов обнаружено наличие МБТ, что позволило установить диагноз активного ТБ, из них 103 (88,0 %) пациента имели положительный результат T-SPOT.TB. При положительном результате T-SPOT.TB при отсутствии изменений на КТ в 17,6 % случаев диагностирована ЛТИ. При сравнении результатов пробы с АТР и T-SPOT.TB при уровне $CD4^+$ -клеток 500–350 кл/мкл отмечено отсутствие статистически значимой разницы в эффективности тестов ($\chi^2 = 1,28$; $p = 0,2579$; ОШ = 2,28), при снижении уровня $CD4^+$ -клеток < 350 кл/мкл роль T-SPOT.TB значительно увеличивается, при этом при уровне $CD4^+$ -клеток < 200 кл/мкл шансы выявить ТБ при применении T-SPOT.TB увеличиваются в 13 раз ($\chi^2 = 8,93$; $p = 0,0028$; ОШ = 13,75). Таким образом, иммунодиагностические тесты могут результативно использоваться в диагностическом комплексе наблюдения пациентов с ВИЧ-инфекцией для выявления туберкулезной инфекции, что позволит проводить своевременные противотуберкулезные мероприятия.

Вклад авторов. Концепция и дизайн исследования – Кудлай Д.А., Бородулина Е.А.; сбор и обработка материала – Кузнецова А.Н., Докторова Н.П.; статистическая обработка – Калашникова Е.В.; написание текста – Кузнецова А.Н., Калашникова Е.В.; редактирование – Бородулин Б.Е.

■ Литература

1. Цыбикова Э.Б., Сюнякова Д.А. Туберкулез, сочетанный с ВИЧ-инфекцией: обзор материалов ВОЗ, использованных российскими авторами в своих публикациях. Медицинский альянс. 2020; 8 (2): 21–31.
2. World Health Organization. Global Tuberculosis Report. Geneva, 30 October 2017.
3. Нечаева О.Б. Эпидемическая ситуация по ВИЧ-инфекции в России на период начала действия Государственной стратегии противодействия распространению ВИЧ-инфекции. Туберкулез и болезни легких. 2021; 99 (5): 15–24. DOI: <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2021-99-5-15-24>
4. Нечаева О.Б. Состояние и перспективы противотуберкулезной службы России в период COVID-19. Туберкулез и болезни легких. 2020; 98 (12): 7–19. DOI: <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2020-98-12-7-19>
5. Bastian I., Coulter C.; National Tuberculosis Advisory Committee (NTAC). Position statement on interferon- γ release assays for the detection of latent tuberculosis infection. Commun. Dis. Intell. Q. Rep. 2017; 41 (4): E322–36.
6. Selwyn P.A., Hartel D., Lewis V.A. et al. A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. N. Engl. J. Med. 1989; 320: 545–50. DOI: <http://doi.org/10.1056/NEJM198903023200901>
7. Каминский Г.Д., Кудлай Д.А., Панова А.Е., Паролина Л.Е., Перегудова А.Б., Пшеничная Н.Ю., Самойлова А.Г., Тестов В.В., Тинькова В.В. Тактика врача при выявлении, диагностике и профилактике сочетанной инфекции ВИЧ и туберкулез: практическое руководство / под ред. И.А. Васильевой. Москва, 2020: 152 с.
8. Козлов В.А., Савченко А.А., Кудрявцев И.В., Козлов И.Г., Кудлай Д.А., Продеус А.П., Борисов А.Г. Клиническая иммунология. Красноярск: Поликор, 2020: 386 с. DOI: <http://doi.org/10.17513/np.438>
9. Pai M., Sotgiu G. Diagnostics for latent TB infection: incremental, not transformative progress. Eur. Respir. J. 2016; 47 (3): 704–6. DOI: <http://doi.org/10.1183/13993003.01910-2015>
10. Кудлай Д.А. Биомаркеры и иммунологические тесты. Экспериментально-клинические параллели латентной туберкулезной инфекции. Туберкулез и болезни легких. 2020; 98 (8): 63–74. DOI: <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2020-98-8-63-74>
11. Lin P.L., Rutledge T., Green A.M., Bigbee M., Fuhrman C., Klein E. et al. CD4 T cell depletion exacerbates acute Mycobacterium tuberculosis while reactivation of latent infection is dependent on severity of tissue depletion in cynomolgus macaques. AIDS Res. Hum. Retroviruses. 2012; 28 (12): 1693–702. DOI: <http://doi.org/10.1089/AID.2012.0028>
12. Ganchua S.K.C., Cadena A.M., Maiello P., Gideon H.P., Myers A.J. et al. Lymph nodes are sites of prolonged bacterial persistence during Mycobacterium tuberculosis infection in macaques. PLoS Pathogens. 2018; 14 (11): e1007337. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007337>
13. Higuchi K., Sekiya Y., Igari H., Watanabe A., Harada N. Comparison of specificities between two interferon-gamma release assays in Japan. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2012; 16 (9): 1190–2. DOI: <http://doi.org/10.5588/ijtld.11.0829>
14. Huo Z., Peng L. Accuracy of the interferon- γ release assay for the diagnosis of active tuberculosis among HIV-seropositive individuals: a systematic review and meta-analysis. BMC Infect. Dis. 2016; 16: 350. DOI: <http://doi.org/10.1186/s12879-016-1687-8>
15. Kussen G.M.B., Dalla-Costa L.M., Rossoni A., Raboni S.M. Interferon-gamma release assay versus tuberculin skin test for latent tuberculosis infection among HIV patients in Brazil. Braz. J. Infect. Dis. 2016; 20 (1): 69–75. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.10.007>
16. Русских О.Е., Кудлай Д.А. Место ИГРА-тестов (тесты на определение интерферона-гамма) в диагностике туберкулезной инфекции. Педиатрия. Журнал имени Г.Н. Сперанского. 2020; 99 (6): 231–5. DOI: <http://doi.org/10.24110/0031-403X-2020-99-6-231-235>
17. Hopewell P.C., Chaisson R.E. Tuberculosis and human immunodeficiency virus infection. In: L.B. Reichman, E.S. Hershfield (eds). Tuberculosis: a Comprehensive International Approach. New York: Marcel Dekker, 2000; 144: 525–47.

■ References

1. Tsybikova E.B., Syunyakova D.A. Tuberculosis combined with HIV infection: a review of WHO materials used by Russian authors in their publications. Medical alliance. 2020; 8 (2): 21–31. (in Russian)
2. World Health Organization. Global Tuberculosis Report. Geneva, 30 October 2017.
3. Nechaeva O.B. HIV situation in Russia at the beginning of implementation of state strategy aimed to combat the spread of HIV infection. Tuberculosis and lung diseases. 2021; 99 (5): 15–24. DOI: <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2021-99-5-15-24> (in Russian)
4. Nechaeva O.B. The state and prospects of TB control service in Russia during the COVID-19 pandemic. Tuberculosis and lung diseases. 2020; 98 (12): 7–19. DOI: <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2020-98-12-7-19> (in Russian)
5. Bastian I., Coulter C.; National Tuberculosis Advisory Committee (NTAC). Position statement on interferon- γ release assays for the detection of latent tuberculosis infection. Commun. Dis. Intell. Q. Rep. 2017; 41 (4): E322–36.
6. Selwyn P.A., Hartel D., Lewis V.A., et al. A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. N. Engl. J. Med. 1989; 320: 545–50. DOI: <http://doi.org/10.1056/NEJM198903023200901>
7. Kaminsky G.D., Kudlay D.A., Panova A.E., Parolina L.E., Peregudova A.B., Pshenichnaya N.Yu., Samoylova A.G., Testov V.V., Tin'kova V.V. Doctor's tactics in the detection, diagnosis and prevention of co-infection with HIV and tuberculosis. Practical guide. In: I.A. Vasil'eva (ed.). Moscow, 2020: 152 p. (in Russian)
8. Kozlov V.A., Savchenko A.A., Kudryavtsev I.V., Kozlov I.G., Kudlay D.A., Prodeus A.P., Borisov A.G. Clinical immunology. Krasnoyarsk: Polikor, 2020: 386 p. DOI: <http://doi.org/10.17513/np.438> (in Russian)
9. Pai M., Sotgiu G. Diagnostics for latent TB infection: incremental, not transformative progress. Eur. Respir. J. 2016; 47 (3): 704–6. DOI: <http://doi.org/10.1183/13993003.01910-2015>
10. Kudlay D.A. Biomarkers and immunological tests. Experimental and clinical parallels of latent tuberculosis infection. Tuberculosis and lung diseases. 2020; 98 (8): 63–74. DOI: <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2020-98-8-63-74> (in Russian)
11. Lin P.L., Rutledge T., Green A.M., Bigbee M., Fuhrman C., Klein E., et al. CD4 T cell depletion exacerbates acute Mycobacterium tuberculosis while reactivation of latent infection is dependent on severity of tissue depletion in cynomolgus macaques. AIDS Res. Hum. Retroviruses. 2012; 28 (12): 1693–702. DOI: <http://doi.org/10.1089/AID.2012.0028>
12. Ganchua S.K.C., Cadena A.M., Maiello P., Gideon H.P., Myers A.J., et al. Lymph nodes are sites of prolonged bacterial persistence during Mycobacterium tuberculosis infection in macaques. PLoS Pathogens. 2018; 14 (11): e1007337. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007337>
13. Higuchi K., Sekiya Y., Igari H., Watanabe A., Harada N. Comparison of specificities between two interferon-gamma release assays in Japan. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2012; 16 (9): 1190–2. DOI: <http://doi.org/10.5588/ijtld.11.0829>
14. Huo Z., Peng L. Accuracy of the interferon- γ release assay for the diagnosis of active tuberculosis among HIV-seropositive individuals: a systematic review and meta-analysis. BMC Infect. Dis. 2016; 16: 350. DOI: <http://doi.org/10.1186/s12879-016-1687-8>
15. Kussen G.M.B., Dalla-Costa L.M., Rossoni A., Raboni S.M. Interferon-gamma release assay versus tuberculin skin test for latent tuberculosis infection among HIV patients in Brazil. Braz. J. Infect. Dis. 2016; 20 (1): 69–75. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.10.007>
16. Russkikh O.E., Kudlay D.A. Place of IGRA tests (tests for interferon-gamma determination) in tuberculosis infection diagnosis. Pediatrics. The Journal named after G.N. Speransky. 2020; 99 (6): 231–5. DOI: <http://doi.org/10.24110/0031-403X-2020-99-6-231-235> (in Russian)
17. Hopewell P.C., Chaisson R.E. Tuberculosis and human immunodeficiency virus infection. In: L.B. Reichman, E.S. Hershfield (eds). Tuberculosis: a Comprehensive International Approach. New York: Marcel Dekker, 2000; 144: 525–47.

Сведения об авторах

Бородулина Елена Александровна – д-р мед. наук, проф., зав. каф. фтизиатрии и пульмонологии ФГБОУ ВО «СамГМУ» Минздрава России, Самара, Российская Федерация
E-mail: borodulinbe@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3063-1538>

Кудлай Дмитрий Анатольевич – д-р мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. персонализированной медицины и молекулярной иммунологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России; проф. кафедры фармакологии Института фармации ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Российская Федерация
E-mail: D624254@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-1878-4467>

Кузнецова Алена Николаевна – аспирант каф. фтизиатрии и пульмонологии ФГБОУ ВО «СамГМУ» Минздрава России, Самара, Российская Федерация
E-mail: alena-suetina@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7634-0106>

Докторова Наталья Петровна – канд. мед. наук, науч. сотр. отд. дифференциальной диагностики и лечения туберкулеза и сочетанных инфекций ФГБУ «НИМЦ ФПИЗ» Минздрава России, Москва, Российская Федерация
<https://orcid.org/0000-0002-8890-8958>

Бородулин Борис Евгеньевич – д-р мед. наук, проф. каф. фтизиатрии и пульмонологии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, Самара, Российская Федерация
E-mail: borodulinprof@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6676-8587>

Калашникова Елена Викторовна – врач-рентгенолог, лаборант каф. фтизиатрии и пульмонологии ФГБОУ ВО «СамГМУ» Минздрава России, Самара, Российская Федерация
E-mail: kalashnikovaev@sanamet.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8862-6520>

Authors' information

Elena A. Borodulina – MD, PhD, Prof., Head of the Phthiology and Pulmonology Chair, SamSMU, MOH of Russia, Samara, Russian Federation
E-mail: borodulinbe@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3063-1538>

Dmitry A. Kudlay – MD, PhD, Leader Researcher of Personalized Medicine and Molecular Immunology Lab., NRC Institute of Immunology FMBA of Russia; Prof. of Pharmacology Chair, Institute of Pharmacy, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation
E-mail: D624254@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-1878-4467>

Alena N. Kuznetsova – Post-Graduate Student of the Phthiology and Pulmonology Chair, SamSMU, MOH of Russia, Samara, Russian Federation
E-mail: alena-suetina@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7634-0106>

Natalia P. Doktorova – PhD, Researcher, Dept. of Differential Diagnosis and Treatment of Tuberculosis and Combined Infections, NRMС PPID, Moscow, Russian Federation
<https://orcid.org/0000-0002-8890-8958>

Boris E. Borodulin – MD, PhD, Professor of the Phthiology and Pulmonology Chair, SamSMU, MOH of Russia, Samara, Russian Federation
E-mail: borodulinprof@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6676-8587>

Elena V. Kalashnikova – Radiologist, Lab. Assistant of the Phthiology and Pulmonology Chair, SamSMU, MOH of Russia, Samara, Russian Federation
E-mail: kalashnikovaev@sanamet.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8862-6520>