



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.12.3.012>
УДК 616-002.5:578.245



Будник О.А.¹✉, Суркова Л.К.¹, Иванова А.Л.¹, Путрик Т.В.¹, Кривошеева Ж.И.²

¹ Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии,
Минск, Беларусь

² Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Оценка эффективности скрининга латентной туберкулезной инфекции с помощью теста, основанного на высвобождении гамма-интерферона

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция, дизайн, анализ материала – Суркова Л.К., Кривошеева Ж.И.; сбор информации и обработка материала – Иванова А.Л., Будник О.А., Путрик Т.В.; статистическая обработка материала – Иванова А.Л.; написание текста – Будник О.А.; редактирование текста – Кривошеева Ж.И., Суркова Л.К.

Подана: 27.03.2023

Принята: 12.09.2023

Контакты: olya.budnik@gmail.com

Резюме

Цель. Определить информативность иммунодиагностического теста, основанного на высвобождении гамма-интерферона Т-клетками крови, в диагностике латентной туберкулезной инфекции.

Материалы и методы. В исследование включено 1815 пациентов, которым проведено тестирование на инфицирование микобактериями туберкулеза с использованием теста QFT-plus (Qiagen, Германия), выполненное в РНПЦ пульмонологии и фтизиатрии в период 2019–2022 гг. при проведении дифференциальной диагностики с легочной и внелегочной формами туберкулеза.

Результаты. Тестирование с помощью теста QFT-plus выявило инфицирование микобактериями туберкулеза у 23,69% (95% ДИ 21,7–25,6) лиц со значительной вариабельностью частоты инфицирования в разных возрастных группах с наиболее высокой частотой в группах пациентов в возрасте 0–20 лет и 61–70 лет (21,16% (95% ДИ 17,3–25,0) и 18,37% (95% ДИ 14,7–22,0) соответственно). В когорте пациентов с положительными результатами теста QFT-plus после клиничко-рентгенологического и лабораторного обследования латентная туберкулезная инфекция выявлена у 58,46% пациентов. Выявлены статистически значимые различия частоты латентной туберкулезной инфекции у пациентов с различными хроническими соматическими заболеваниями по сравнению с пациентами без сопутствующих заболеваний (75,44% (95% ДИ 70,6–85,7) и 24,56% (95% ДИ 16,7–32,5) соответственно ($\chi^2=59,018$; $p<0,001$)).

Заключение. Тест QFT-plus обеспечивает точность и эффективность тестирования на инфицирование *M. tuberculosis* за счет клеточно-опосредованного иммунного ответа как CD4+ Т-клетками, так и CD8+ Т-клетками. QFT-plus не позволяет дифференцировать латентную и активную туберкулезную инфекцию. В то же время применение теста позволяет идентифицировать пациентов для углубленного обследования с целью выявления латентной туберкулезной инфекции и проведения лечения

в группах высокого риска развития латентного туберкулеза, что будет способствовать снижению заболеваемости туберкулезом.

Ключевые слова: туберкулезная инфицированность, тест, основанный на высвобождении гамма-интерферона, латентная туберкулезная инфекция, группы риска, диагностика латентного туберкулеза

Volha A. Budnik¹✉, Larisa K. Surkova¹, Anastasia L. Ivanova¹, Tatsiana V. Putryk¹,
Zhanna I. Krivosheeva²

¹ Republican Scientific and Practical Center of Pulmonology and Phthisiology,
Minsk, Belarus

² Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Evaluation of the Effectiveness of Screening for Latent Tuberculosis Infection Using a Test Based on the Release of Interferon Gamma

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: concept, design, material analysis – Larisa K. Surkova, Zhanna I. Krivosheeva; collection of information and processing of material – Anastasia L. Ivanova, Volha A. Budnik, Tatsiana V. Putryk; statistical processing of the material – Anastasia L. Ivanova; writing the text – Volha A. Budnik; text editing – Zhanna I. Krivosheeva, Larisa K. Surkova.

Submitted: 27.03.2023

Accepted: 12.09.2023

Contacts: olya.budnik@gmail.com

Abstract

Purpose. To determine the informative value of the immunodiagnostic test based on the release of gamma-interferon by T-cells of the blood in the diagnosis of latent tuberculosis infection.

Materials and methods. The study included 1815 patients who were tested for MBT infection using the QFT-plus test (Qiagen, Germany), performed at the Republican Scientific and Practical Center for Pulmonology and Phthisiology in the period 2019–2022 during differential diagnosis with pulmonary and extrapulmonary forms of tuberculosis.

Results. Testing with the QFT-plus test revealed MBT infection in 23,69% (95% CI 21,7–25,6) of individuals, with the presence of variability in the frequency of infection in different age groups with the highest frequency in groups of people aged 0–20 years and 61–70 years (21,16% (95% CI 17,3–25,0) and 18,37% (95% CI 14,7–22,0 respectively)). In the cohort of patients with QFT-plus test results after clinical, radiological and laboratory studies, latent tuberculosis infection (LTBI) was detected in 58,46% of patients. Statistically significant rates of LTBI were found in patients with chronic somatic diseases compared with patients without concomitant diseases (75,44% (95% CI 70,6–85,7) and 24,56% (95% CI 16,7–32,5) respectively ($\chi^2=59,018$; $p<0,001$)).

Conclusion. The QFT-plus assay provides accuracy and efficiency in testing for M.tuberculosis infection through a cell-mediated immune response from both CD4+ T-cells and CD8+ T-cells. QFT-plus does not allow differentiation between latent and active



TB infection. At the same time, the use of the test makes it possible to identify patients for in-depth examination in order to detect LTBI and provide treatment in groups at high risk of developing latent tuberculosis, which will help reduce the incidence of tuberculosis.

Keywords: tuberculosis infection, interferon-gamma release test, latent tuberculosis infection, risk groups, diagnosis of latent tuberculosis

■ ВВЕДЕНИЕ

Контакт с микобактериями туберкулеза (МБТ) может привести к инфицированию макроорганизма человека, не проявляющегося клинико-рентгенологическими симптомами активного туберкулезного процесса. Единственным показателем состояния инфицирования МБТ является развитие стойкого иммунного ответа на стимуляцию антигенами МБТ при отсутствии клинико-рентгенологических проявлений активного туберкулеза, определяемое в настоящее время как латентная туберкулезная инфекция (ЛТБИ) [1].

ЛТБИ – состояние, при котором МБТ длительное время присутствуют в макроорганизме человека в «дремлющем» состоянии, обуславливая положительную реакцию на туберкулезные антигены.

По оценкам ВОЗ, 1/3 населения планеты инфицирована возбудителем туберкулеза. Без лечения от 5 до 10% инфицированных лиц в какой-то момент своей жизни заболевают активными формами туберкулеза и становятся источником распространения инфекции. ВОЗ признает, что основополагающим фактором для эффективной борьбы с туберкулезом является точное определение и лечение не только активной формы заболевания, но и ЛТБИ, что крайне важно для снижения туберкулезной нагрузки в обществе и предотвращения дальнейшего распространения заболевания [1].

До недавнего времени единственным убедительным свидетельством инфицирования МБТ без признаков активного туберкулеза являлась реакция гиперчувствительности замедленного типа, которая проявляется положительной реакцией на туберкулин. Постановка туберкулиновой пробы Манту 2 ТЕ ППД-Л позволяет выявить иммунитет и специфическую сенсибилизацию организма, обусловленные как инфицированием МБТ, так и введением вакцины БЦЖ, что не дает возможности проведения точного тестирования на туберкулезную инфекцию. В последние годы были внедрены в практику новые диагностические тесты, такие как Диаскинтест с рекомбинантным туберкулезным аллергеном и тесты, основанные на высвобождении гамма-интерферона (Interferon Gamma Release Assay – IGRA-тесты), или подсчет количества лимфоцитов в ответ на стимуляцию специфическими антигенами МБТ, позволяющие более точно диагностировать ЛТБИ, особенно у вакцинированных лиц. Наиболее значимыми антигенами МБТ являются ранний секретрируемый антиген – ESAT-6 (early secretory antigenic target 6), белок клеточного фильтрата – CFP-10 (culture filtrate protein 10) и пептид TB 7.7, которые кодируются геном RD1 (region of difference 1) генома *M. tuberculosis*. Указанные антигены отсутствуют в вакцинном штамме *M. bovis* BCG и у пациентов с выделением нетуберкулезных микобактерий, за исключением *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*.

В то же время IGRA-тесты, в частности QuantiFERON-TB Gold, отличаются меньшей чувствительностью у иммунокомпрометированных лиц и у детей младшего возраста [2], а также низкой корреляцией с риском прогрессирования активного туберкулеза [3].

Тест-система QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-plus) представляет собой новую более совершенствованную версию QuantiFERON-TB Gold, обеспечивая более точную оценку клеточно-опосредованного иммунного ответа на туберкулезную инфекцию как CD4+, так и CD8+ Т-клетками на множественные антигены с количественной оценкой результатов и высокой чувствительностью (95%) и специфичностью (98%).

Тест-система QFT-plus, основанная на принципах контакта лимфоцитов крови с высокоспецифическими антигенами ESAT-6, CFP-10, TB 7.7, включает пробирки TB1 для определения клеточного иммунного ответа CD4+-лимфоцитов (Т-хелперов) и TB2 (что позволяет одновременно оценить CD4+ и CD8+ Т-клеточный ответ), нулевую контрольную пробирку (Nil) – для контроля фоновых реакций и пробирку с митогеном (Mitogen) – положительный контроль.

Высокий процент ложноположительных результатов туберкулиновых проб (до 40%) по сравнению с результатами IGRA-тестов ведет к значительным финансовым затратам на дообследование туберкулиноположительных лиц. Применение тестов, основанных на высвобождении гамма-интерферона, обуславливает более точную диагностику ЛТБИ за счет повышения диагностической чувствительности и специфичности исследования. Точная диагностика ведет к снижению количества лиц с ложноположительными результатами и, соответственно, к снижению финансовых затрат на лечение пациентов с латентной туберкулезной инфекцией.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определить информативность иммунодиагностического теста, основанного на высвобождении гамма-интерферона Т-клетками крови, в диагностике латентной туберкулезной инфекции.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведен ретроспективный анализ результатов тестирования на инфицирование МБТ в различных выборках лиц с использованием теста QFT-plus (Qiagen, Германия), выполненных в РНПЦ пульмонологии и фтизиатрии в период 2019–2022 гг.

Тестирование проводилось у лиц, направленных к фтизиатру для обследования и/или на консультацию, и у пациентов, которым требовалась дифференциальная диагностика с легочной и внелегочной формами туберкулеза, согласно инструкции производителя. Группы лиц были стратифицированы по возрасту без учета факторов риска и ВИЧ-инфицирования.

Результаты теста интерпретировались согласно критериям, установленным производителем тест-системы. Результат теста QFT-plus считается положительным (наличие инфекции *M. tuberculosis*), если значения IFN- γ в любых пробирках (TB1 или TB2) значительно превышают значение IFN- γ в нулевой контрольной пробирке, т. е. TB1 минус Nil $\geq 0,35$ МЕ/мл и $\geq 25\%$ Nil МЕ/мл. При отрицательном результате (отсутствие инфекции *M. tuberculosis*) значение TB1 или TB2 минус значение нулевой пробы должно быть $< 0,35$ МЕ/мл или $\geq 0,35$ МЕ/мл и $< 25\%$ Nil МЕ/мл значения нулевой пробирки. Слабый ответ на митоген $< 0,5$ МЕ/мл при отрицательных реакциях TB1



и TB2 указывает на сомнительный результат, который в большинстве случаев связан с нарушением взятия и транспортировки образцов. Уровень гамма-интерферона определялся методом ELISA, что обеспечивало измерение иммунного Т-клеточного ответа на МБТ.

Для исключения активного туберкулеза все лица с положительными результатами теста QFT-plus были обследованы клинически и рентгенологически (обзорная рентгенограмма или компьютерная томография органов грудной клетки).

Статистическую обработку материала производили с использованием программы Statistica 10.0. Использовали метод доверительных интервалов (95% ДИ) и критерий χ^2 Пирсона. Различия в сравниваемых группах считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

За период 2019–2022 гг. проведено тестирование инфицирования МБТ 1815 пациентам в возрасте от 3 до 93 лет (соотношение мужчин и женщин 1:1,3). Положительные результаты теста QFT-plus были получены у 23,69% (430/1815; 95% ДИ 21,7–25,6) пациентов.

Анализ результатов IGRA-тестирования инфицирования МБТ в зависимости от возраста пациентов выявил значительную вариабельность частоты инфицирования в разных возрастных группах. Лица в возрасте 0–20 лет составили 21,16% (91/430; 95% ДИ 17,3–25,0), 21–30 лет – 9,53% (41/430; 95% ДИ 6,8–12,3), 31–40 лет – 14,65% (63/430; 95% ДИ 11,3–17,9), 41–50 лет – 12,09% (52/430; 95% ДИ 9,0–15,2), 51–60 лет – 12,79% (55/430; 95% ДИ 9,6–15,9), 61–70 лет – 18,37% (79/430; 95% ДИ 14,7–22,0), 71–80 лет – 8,60% (37/430; 95% ДИ 5,9–11,3), 81–90 лет и старше – 2,79% (12/430; 95% ДИ 1,2–4,4) (табл. 1).

По данным IGRA-тестирования, высокий удельный вес инфицирования отмечен в возрастной группе до 20 лет, в возрасте от 21 до 30 лет инфицирование МБТ сохраняется, но на невысоких уровнях, однако к 61–70 годам число лиц, инфицированных МБТ, достоверно возрастает до 18,37% (79/430) по сравнению с другими возрастными группами старше 20 лет, за исключением группы лиц в возрасте 31–40 лет. Среди лиц пожилого возраста старше 70 лет и вплоть до 80 лет инфицированность сохраняется, но на более низких уровнях. Самая низкая инфицированность МБТ отмечена в возрастной группе 81–90 лет и старше – 2,79% (12/430; 95% ДИ 1,2–4,4).

Анализ количественных показателей продукции гамма-интерферона в когорте пациентов с положительными результатами теста QFT-plus ($n=254$) показал, что величина продукции гамма-интерферона на стимуляцию CD4+ Т-клеток (TB1) и одновременно CD4+ и CD8+ Т-клеток (TB2) варьировала в широких пределах от 0,35 МЕ/мл до 10 МЕ/мл.

Высокие значения уровня продукции гамма-интерферона одновременно в TB1 и TB2 установлены в 81,88% (208/284) случаев. Выявлена разница между величинами продукции гамма-интерферона для TB1 и TB2 у 46 пациентов (18,11%, 46/254), обусловленная более значительным одновременным CD4+ и CD8+ Т-клеточным иммунным ответом (TB2) либо ответом только CD4+ Т-клеток (TB1).

Повышенная продукция гамма-интерферона при комбинированной стимуляции CD4+ и CD8+ Т-клеток (TB2) определялась у 47,82% (22/46) пациентов при более низких значениях гамма-интерферона на стимуляцию только CD4+ Т-клеток (TB1).

Таблица 1
Возрастная характеристика лиц с положительным результатом теста QFT-plus за период 2019–2022 гг.
Table 1
Age characteristics of individuals with a positive QFT-plus test result for the period 2019–2022

Показатель	Кол-во QFT	Кол-во положительных результатов	Возраст, абс. ч., %, 95% ДИ							
			0–20	21–30	31–40	41–50	51–60	61–70	71–80	81–90 и старше
			1	2	3	4	5	6	7	8
Абс.	1815	430	91	41	63	52	55	79	37	12
% (95% ДИ)	100	23,69 (21,7–25,6)	21,16 (17,3–25,0)	9,53 (6,8–12,3)	14,65 (11,3–17,9)	12,09 (9,0–15,2)	12,79 (9,6–15,9)	18,37 (14,7–22,0)	8,60 (5,9–11,3)	2,79 (1,2–4,4)

Примечания: достоверность: 2–6 – $\chi^2=13,985$ ($p<0,001$); 3–6 – $\chi^2=2,159$ ($p=0,142$); 4–6 – $\chi^2=6,565$ ($p=0,011$); 5–6 – $\chi^2=5,092$ ($p=0,025$); 6–7 – $\chi^2=17,578$ ($p<0,001$) 6–8 – $\chi^2=55,167$ ($p<0,001$).

В то же время у 52,17% (24/46) пациентов была выявлена разница между значениями TB1 и TB2 с более высокой продукцией гамма-интерферона на стимуляцию только CD4+ Т-клеток ($\chi^2=0,174$; $p=0,677$).

В литературе широко обсуждается вопрос о клинической специфичности продукции гамма-интерферона на стимуляцию одновременно CD4+ и CD8– Т-клеток множественными специфическими для МБТ антигенами. Считается, что CD8+ Т-клетки могут дать дополнительную клиническую информацию и чаще определяются у пациентов с активным туберкулезом по сравнению с ЛТБИ [4, 5] либо у недавно инфицированных МБТ лиц [6].

По данным C.L. Day et al., 2011 [4], CD8+ Т-клетки коррелируют с увеличением микобактериальной нагрузки и обнаруживаются у пациентов с активным туберкулезом легких.

Комбинация стимуляции одновременно CD4+ Т-клеток (TB1) и CD4+ и CD8+ Т-клеток (TB2) в определенной степени повышает точность и улучшает диагностику ЛТБИ у пациентов с низкой продукцией IFN- γ CD4+ Т-клетками.

Таблица 2
Характеристика пациентов с положительным результатом теста QFT-plus (n=195)
Table 2
Characteristics of patients with a positive QFT-plus test result (n=195)

Показатель	Кол-во положительных результатов	Активный туберкулез	Посттуберкулезные изменения	ЛТБИ, всего	В т.ч. ЛТБИ	
					без сопутствующих заболеваний	со множественными сопутствующими заболеваниями
		1	2	3	3.1	3.2
Абс.	195	73	8	114	28	86
% (95% ДИ)	100	37,43 (30,6–44,2)	4,10 (1,3–6,9)	58,46 (51,5–65,4)	24,56 (16,7–32,5)	75,44 (67,5–83,3)

Примечания: достоверность: 1–3 – $\chi^2=17,270$ ($p<0,001$); 3.1–3.2 – $\chi^2=59,018$ ($p<0,001$).



Получены доказательства участия Т-клеток CD8+ в защите организма от *M. tuberculosis* путем секреции IFN- γ и других факторов, активирующих макрофаги, подавляющие рост *M. tuberculosis* [7].

В когорте пациентов с положительными результатами теста QFT-plus (n=195) после клиничко-рентгенологического и лабораторного обследования ЛТБИ выявлялась у 58,46% лиц (114/195, 95% ДИ 51,5–65,4), по сравнению с активным туберкулезом – 37,43% (73/195, 95% ДИ 30,6–44,2) ($\chi^2=17,270$; $p<0,001$), посттуберкулезные изменения установлены у 4,10% (8/195; 95% ДИ 1,3–6,9) обследованных пациентов. ЛТБИ чаще выявлялась у пациентов с различными хроническими соматическими заболеваниями по сравнению с лицами без сопутствующих заболеваний – 75,44% (86/114; 95% ДИ 67,5–83,3) против 24,56% (28/114; 95% ДИ 16,7–32,5) соответственно ($\chi^2=59,018$; $p<0,001$) (табл. 2).

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тестирование инфицирования МБТ группы лиц, стратифицированных по возрасту, на основе теста количественной оценки состояния иммунного Т-клеточного ответа на стимуляцию специфическими антигенами выявило инфицирование МБТ у 23,69% пациентов. Наиболее высокая частота инфицирования отмечена в возрастных группах 0–20 и 61–70 лет.

Тест QFT-plus позволяет оценить выраженность клеточно-опосредованного иммунного ответа на инфицирование *M. tuberculosis* как для CD4+ Т-клеток, так и для CD8+ Т-клеток за счет введения новой пробирики TB2, что обеспечивает точность и эффективность тестирования. Выявление несоответствия в величинах продукции IFN- γ в пробирках TB1 и TB2 позволяет клиницисту получить дополнительную информацию о туберкулезной инфицированности у лиц с нарушением иммунной функции CD4+ Т-лимфоцитов (ВИЧ-инфицированные, лица, принимающие иммуносупрессивную терапию).

Выполнение теста QFT-plus не предоставляет возможности дифференцировать латентный и активный туберкулез. Установить или исключить диагноз активного туберкулеза возможно только в совокупности с рентгенологическими и другими клиничко-лабораторными данными. В то же время применение теста позволяет идентифицировать пациентов для углубленного обследования с целью выявления латентного туберкулеза и проведения терапии ЛТБИ в группах высокого риска, что делает целесообразным включение QFT-теста в диагностический комплекс фтизиатрического обследования.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. World Health Organization. Guidelines on the management of latent tuberculosis infection. Geneva, 2015 (in Russian).
2. Pai M., Zwerling A., Menzies D. Systematic review: T-cell based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Ann. Intern. Med.* 2008;149(3):177–184. DOI: 10.7326/0003-4819-149-3-200808050-00241.
3. 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;37(1):100–111. DOI: 10.1183/09031936.00114810
4. Day C.L., Abrahams D.A., Lerumo L. et al. Functional capacity of *Mycobacterium tuberculosis* specific T-cell responses in humans is associated with mycobacterial load. *J. Immunol.* 2011;187(5):222–232. DOI: 10.4049/jimmunol.1101122.
5. Rozot V., Vignani S., Mazza-Stalder J. et al. *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD8+ T-cells are functionally and phenotypically different between latent infection and active disease. *Eur. J. Immunol.* 2013;43(6):1568–1577. DOI: 10.1002/eji.201243262.
6. Nikolova M., Markova R., Drenska R. et al. Antigen-specific CD4- and CD8-positive signatures in different phases of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2013;75(3):277–281. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.11.023.
7. Brookes R.H., Pathan A.A., McShane H. et al. CD8+ T cell-mediated suppression of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* growth in activated human macrophages. *Eur. J. Immunol.* 2003;33(12):3293–3302. DOI: 10.1002/eji.200324109.