

Сравнительное определение в плевральной жидкости биохимических маркеров туберкулезного плеврита у жителей Беларуси

Белорусский государственный медицинский университет

Целью настоящего исследования являлось сравнение диагностической значимости изменения активности АДА, изофермента АДА2 и концентрации интерферона γ в плевральной жидкости больных туберкулезным плевритом – жителей Беларуси. Установлен рост значений всех трех определяемых показателей в плевральной жидкости больных туберкулезным плевритом, но не больных плевритом другой этиологии.

Ключевые слова: аденозиндезаминаза, изоферменты, интерферон γ , туберкулезный плеврит, плевральная жидкость

Заболеваемость туберкулезом остается одной из главнейших проблем здравоохранения. В отсутствие должного контроля над распространением *Mycobacterium tuberculosis*, к 2020 году во всем мире прогнозируется инфицирование около 1 миллиарда и смерть от туберкулеза 35 миллионов человек [15].

Частым внелегочным проявлением туберкулеза является плеврит [12]. Туберкулезный плеврит (ТП) развивается тогда, когда микобактерии выделяют в плевральную полость антигенный белок. Тем самым запускается не до конца понятная реакция сенсибилизации замедленного типа, и в плевральной полости скапливается жидкость.

Трудности обычно заключаются не в диагностике самого плеврита, а в определении его этиологии для своевременного проведения этиотропного лечения. Дело в том, что наличие плеврального выпота, помимо туберкулеза, может быть обусловлено пневмонией, злокачественными новообразованиями, застойной сердечной недостаточностью, циррозом печени, нефротическим синдромом, инфекционным нетуберкулезным поражением легких, диффузными заболеваниями соединительной ткани.

Дифференциальная диагностика ТП обычно включает инвазивные процедуры, такие как биопсия плевры, торакоскопия [9, 13, 6]. Эти манипуляции требуют специальных навыков медперсонала, могут ухудшить состояние больного. Высокая стоимость и длительное время, необходимые для получения результатов, еще больше снижают эффективность применения плевральной биопсии и бактериологического метода, которые считаются «золотым стандартом» диагностики [14]. Трудность диагностики ТП дополняет сравнительно низкая чувствительность общепринятых методов.

Кислотоустойчивые бактерии выявляются только в 20%-30% случаев исследования плевральной жидкости и в 50%-80% случаев исследования биоптатов плевры. Даже при использовании полимеразной цепной реакции для обнаружения микобактерий чувствительность не превышает 78% [8].

Между тем известно, что плевральная жидкость содержит достаточно чувствительные биохимические маркеры, определение концентрации которых

может значительно облегчить дифференциальную диагностику ТП [2]. Так, в ответ на антигенную стимуляцию *Micobacterium tuberculosis* в организме включается клеточно-опосредованный иммунный ответ, важным звеном которого является выработка Т-лимфоцитами интерферона- γ (ИНФ- γ) [15]. ИНФ- γ способен усиливать фагоцитарную активность макрофагов, направленную против микобактерий, что обуславливает его гиперпродукцию на фоне ТП [15].

Фермент АДА присутствует в цитоплазме клеток всех тканей млекопитающих. Он участвует в пуриновом метаболизме и катализирует дезаминирование аденозина и 2-дезоксаденозина в инозин и дезоксинозин, соответственно. Имеется несколько изоферментных форм АДА, среди которых наиболее важное значение принадлежит АДА1 и АДА2. Изофермент АДА1 обнаруживается во всех клетках организма, но в наибольшей концентрации в лимфоцитах и моноцитах. Изофермент АДА2 имеется только в моноцитах и макрофагах.

Было установлено, что активность АДА и концентрация ИНФ- γ увеличены в плевральной жидкости больных ТП [11, 7, 10]. Однако, как оказалось, диагностическая ценность этих тестов зависит от распространенности туберкулеза в популяции, а также от самой популяции.

Целью настоящего исследования являлось сравнение диагностической значимости изменения активности АДА, изофермента АДА2 и концентрации интерферона в плевральной жидкости больных ТП – жителей Беларуси.

Материал и методы

В период с марта 2006 г. по сентябрь 2007 г. на базе РНПЦ пульмонологии и фтизиатрии МЗ РБ было обследовано 103 больных. Все они были разделены на 3 группы — (1) с ТП, (2) с инфекционным плевритом нетуберкулезной этиологии (пневмония, послеоперационный плеврит, эмпиема) и (3) с плевритом, обусловленным злокачественными новообразованиями легких (аденокарцинома, эпидермоидная карцинома, мелкоклеточная карцинома, метастатическая карцинома, лимфома и мезотелиома плевры). Возраст обследованных больных колебался в диапазоне от 22 до 80 лет. Характеристика групп приводится в табл. 1.

Таблица 1. Характеристика обследованных больных

| Группы | Количество обследованных больных | Мужчины | Женщины | Возрастной диапазон | Средний возраст |
|---------------------------------|----------------------------------|---------|---------|---------------------|-----------------|
| Контроль | 25 | 15 | 10 | 29-60 | 47 |
| Туберкулезный плеврит | 45 | 35 | 10 | 24-80 | 45 |
| Нетуберкулезный плеврит | 30 | 24 | 6 | 22-80 | 48 |
| Злокачественные новообразования | 28 | 19 | 9 | 31-79 | 57 |

Примечание: Контрольная группа включала 25 здоровых добровольцев, сыроворотка крови которых использовалась для сравнения активности АДА с таковой у обследованных больных.

Получение материала. Образцы плевральной жидкости получали путем торакоцентеза. У каждого обследованного отбиралось, приблизительно, 40 мл плевральной жидкости, которая использовалась для подсчета клеточного состава, цитологического исследования, окраски на кислотоустойчивость, измерения

количества белка и активности фермента лактатдегидрогеназы. Часть отобранной жидкости центрифугировали в течение 10 – 15 мин при 1500 об/мин, образовавшийся супернатант отделяли и сохраняли при -20°С до непосредственного исследования АДА и ИФН- γ .

Параллельно проводилась биопсия плевры, в ходе которой получали образцы ткани, использовавшиеся для патогистологического и микробиологического исследования.

Диагноз туберкулеза ставился на основании результатов перечисленных анализов в случае соответствия одному из следующих критериев: выявление *Mycobacterium tuberculosis* в плевральной жидкости или биоптате плевры, обнаружение в ткани плевры гранулем с положительной окраской на кислотоустойчивость либо обнаружение в ткани плевры гранулем с отрицательной окраской на кислотоустойчивость в сочетании с эффективностью проводимого противотуберкулезного лечения.

Диагноз плеврита вследствие рака легких ставился на основании положительных результатов цитологии плевральной жидкости или обнаружения злокачественных клеток в биоптатах плевры.

Измерение активности АДА и АДА2 в плевральной жидкости. Активность АДА определяли методом, описанным Giusti G. и Galanti B. [4]. Данный метод основан на бертолетовой реакции образования (при участии высвобождающегося из аденозина аммиака) окрашенного индофенольного комплекса и последующей спектрофотометрической оценке его концентрации. Результаты выражались в международных единицах активности (МЕ). За единицу активности АДА принималось количество фермента, необходимого для высвобождения при стандартных условиях анализа 1 ммоль аммиака в минуту.

Для разделения ферментативной активности АДА1 и АДА2 в среду инкубации вносили 200 мкмоль/л селективного ингибитора активности АДА1 — эритро-9-(2-гидрокси-3-нонил)-аденозин гидрохлорида (Sigma, США), после чего проводилось определение активности АДА2.

Измерение концентрации интерферона- γ . Концентрация интерферона- γ определялась методом иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия). Диапазон измеряемых концентраций составлял 0 – 2000 пг/мл, чувствительность анализа — 20 пг/мл.

Статистическая обработка. Для статистического анализа полученных данных использовались программы «Statistica 6.0» и SPSS. Распределение данных оценивалось на нормальность в тесте Колмогорова-Смирнова. Значения определяемых показателей представлены как медиана и интерквартильный размах (медиана: 25-й процентиль – 75-й процентиль). Сравнение групп проводилось при помощи непараметрического U-теста Манна-Уитни. Пороговое значение вычислялось на основании анализа ROC-кривых. Различия показателей в группах сравнения считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В плевральной жидкости больных ТП активность АДА и АДА2 была самой высокой (табл. 2). Она более чем в 5 раз превышала таковую у больных раком легкого и более чем в 4 раза – у больных инфекционным плевритом нетуберкулезной этиологии. В результате отношение АДА1/АДА2 при ТП было наименьшим, составляя 64% от медианы этого показателя у больных в группе

«нетуберкулезный плеврит» и 68% от медианы этого показателя у больных в группе «рак легких».

Таблица 2. Активность АДА в плевральной жидкости больных плевритом различной этиологии

| Определяемые показатели | Исследуемые группы | | |
|------------------------------------|-------------------------|-------------------|----------------------------------|
| | Нетуберкулезный плеврит | Рак легких | Туберкулезный плеврит |
| Активность АДА, МЕ/л | 18,7 12,6 – 21,7 | 15,5 13,1-21,1 | 80,0 ^{#†} 51,2-110,6 |
| Активность АДА ₂ , МЕ/л | 11,4 7,9-16,8 | 12,1 9,6-16,5 | 57,9 ^{#†} 45,0-77,2 |

Примечание: # – $p < 0,05$ по сравнению с группой «нетуберкулезный плеврит»; † – $p < 0,05$ по сравнению с группой «рак легких».

Концентрация ИФН- γ в плевральной жидкости больных ТП также существенно, более чем в 10 раз, превышала таковую в других обследованных группах и составила 1514,2 (931,2-2187,5) пг/мл. При сравнении больных с плевритом вследствие рака легких или с плевритом инфекционной нетуберкулезной этиологии статистически значимых различий в концентрации ИФН- γ в плевральной жидкости больных выявлено не было.

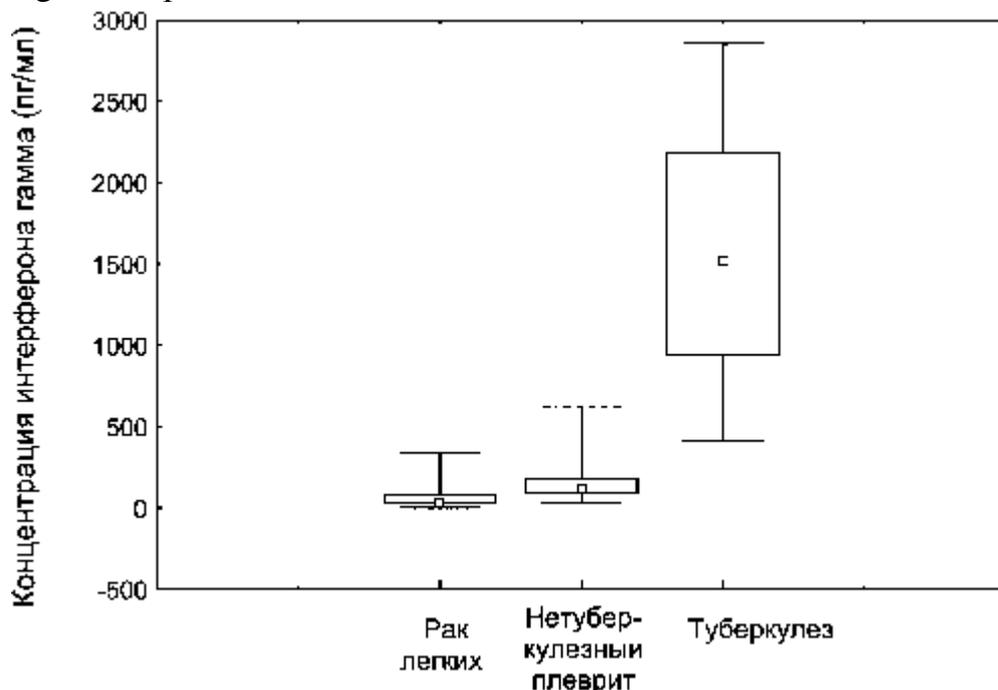


Рис. 1. Концентрация ИФН- γ в плевральной жидкости больных с плевритом различной этиологии.

Для выявления оптимального порогового значения, определяемого как максимальная сумма чувствительности и специфичности теста и характеризующего активность АДА, АДА₂ или концентрацию ИФН- γ в плевральной жидкости, превышение которой свидетельствует о наличии у пациента плеврита туберкулезной этиологии, нами были построены характеристические кривые (ROC-кривые), являющиеся универсальным способом оценки диагностической эффективности метода (рис. 2,3). Анализ данных ROC-кривых выявил их заметный изгиб на уровне 39,8 МЕ/л для АДА, 26,2 МЕ/л для АДА₂ и 299,5 пг/мл для концентрации ИФН- γ .

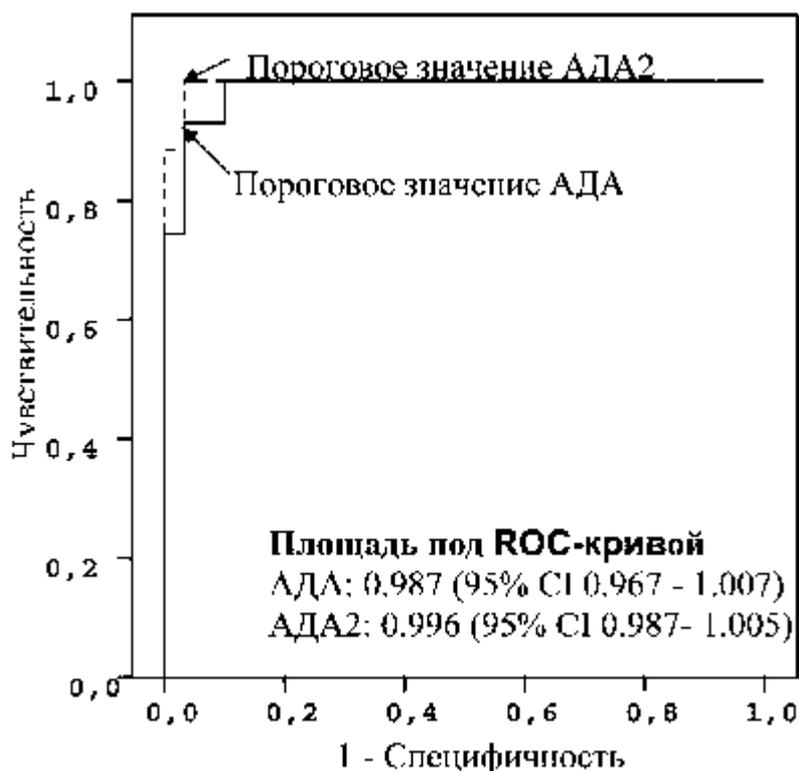


Рис. 2. ROC-кривая соотношения чувствительности и специфичности определения активности АДА и АДА2 в плевральной жидкости больных туберкулезным плевритом

Примечание: сплошная линия – ROC-кривая для АДА; пунктирная линия – ROC-кривая для АДА2; CI – доверительный интервал.

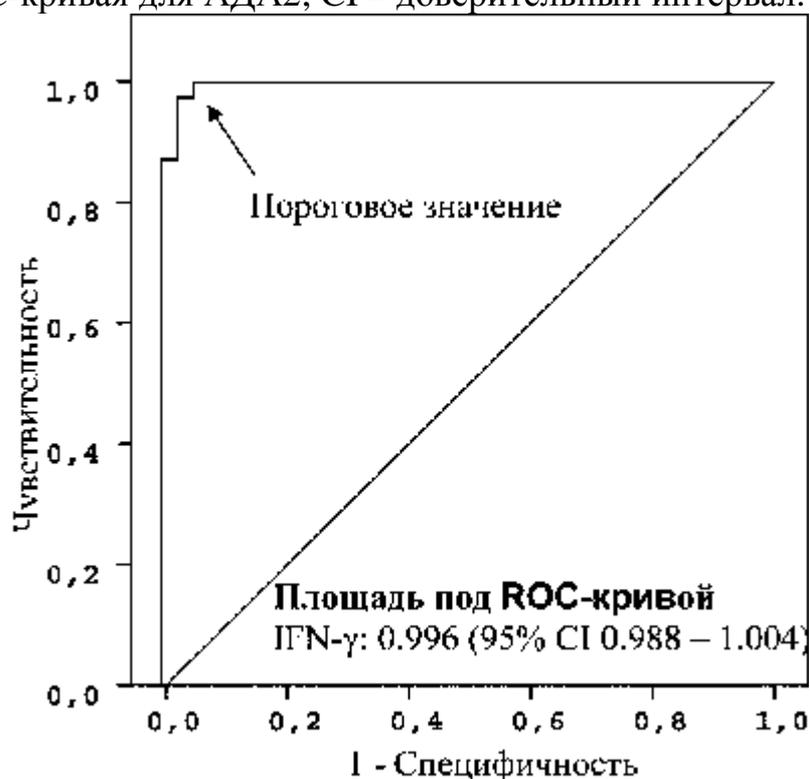


Рис. 3. ROC-кривая соотношения чувствительности и специфичности определения концентрации ИФН-γ в плевральной жидкости больных туберкулезным плевритом

Нами были оценены диагностические характеристики определения АДА, АДА2 и ИФН-γ в плевральной жидкости при ТП (табл. 3).

Таблица 3. Показатели диагностической значимости определения АДА, АДА2 и ИФН-γ в плевральной жидкости при ТП

| Показатели | АДА МЕ/л | АДА2 МЕ/л | ИФН-γ, пг/мл |
|--|----------|-----------|--------------|
| Пороговое значение активности | 40 | 26 | 299 |
| Число истинноположительных результатов | 40 | 43 | 39 |
| Число ложноположительных результатов | 1 | 1 | 2 |
| Число ложноотрицательных результатов | 3 | 0 | 0 |
| Число истинноотрицательных результатов | 29 | 29 | 35 |
| Чувствительность, % | 93,0 | 100 | 100 |
| Специфичность, % | 96,7 | 96,7 | 94,5 |
| ПЦПР, % | 97,6 | 97,7 | 95,1 |
| ПЦОР, % | 90,6 | 100 | 100 |
| ДЭ, % | 94,5 | 98,6 | 97,3 |

Примечание: ПЦПР – прогностическая ценность положительного результата (вероятность того, что у больного действительно ТП, если результат теста превышает пороговое значение). ПЦОР – прогностическая ценность отрицательного результата (вероятность того, что у больного плеврит нетуберкулезной этиологии, если результаты теста не превышают пороговое значение). ДЭ – диагностическая эффективность.

В представленной работе приведены результаты первого исследования, реализованного в Республике Беларусь по оценке использования активности АДА и концентрации ИФН-γ в плевральной жидкости с целью дифференциальной диагностики ТП. Они свидетельствуют об уникальности этих тестов. Рост общей активности АДА в плевральной жидкости обусловлен, главным образом, изоферментной формой АДА2. Подобное явление наблюдали и другие исследователи [1, 2, 5]. Проведение теста по определению общей активности АДА в плевральной жидкости, как оказалось, характеризуется высокими значениями чувствительности и специфичности по сравнению с результатами, полученными в других странах [3]. Еще большей чувствительностью (100%) к этому заболеванию обладает определение в плевральной жидкости активности АДА2.

Анализ данных литературы показал, что среди Европейских стран пороговые значения АДА в плевральной жидкости больных туберкулезным плевритом колеблются от 41 до 70 МЕ/л, а чувствительность теста – от 79 до 100% [3]. Еще большие колебания, по данным различных лабораторий, характерны для порогового уровня ИФН-γ (от 12 до 240 пг/мл) [16, 14]. Причинами столь больших различий является использование разных наборов реагентов для иммуноферментного или радиоиммунного анализа, частота заболеваемости туберкулезом в популяции и особенности самой популяции [11]. Вместе с тем все исследователи приходят к заключению о высокой диагностической эффективности определения концентрации ИФН-γ в плевральной жидкости при ТП. По нашим данным, чувствительность и специфичность данного теста также чрезвычайно высоки, 100 и 94,5%, соответственно.

Таким образом, все три определяемые показатели продемонстрировали пригодность для использования их в качестве маркеров ТП в белорусской популяции. Однако специфичность определения ни для одного из них не абсолютна, поскольку не достигает 100%.

Возникает вопрос, какому из маркеров следует отдать предпочтение для использования в практической деятельности лечебных учреждений. В этом плане,

необходимо отметить, что ни одна из комбинаций определяемых показателей существенно не улучшила их диагностическую значимость (табл. 4).\

Таблица 4. Показатели диагностической ценности при использовании комбинации маркеров туберкулезного плеврита в плевральной жидкости

| Показатели | АДА+АДА2+ ИФН-γ | АДА+АДА2 | АДА+ ИФН-γ | АДА2+ ИФН-γ |
|---------------------|-----------------|----------|------------|-------------|
| Подтвержденный ТП | 46 | 46 | 46 | 46 |
| Чувствительность, % | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Специфичность, % | 96,7 | 96,7 | 96,7 | 96,7 |
| ПЦПР, % | 97,7 | 97,7 | 97,6 | 97,7 |
| ПЦОР, % | 100 | 100 | 100 | 100 |
| ДЭ, % | 98,6 | 98,6 | 97,3 | 98,6 |

Из трех больных с подтвержденным диагнозом «туберкулезный плеврит», у которых активность АДА была ниже установленного порогового значения, и одного больного с фибринозно-экссудативным плевритом нетуберкулезной этиологии, у которого активность АДА и АДА2 была выше установленных пороговых значений, концентрация ИФН-γ оказалась, соответственно, выше и ниже своего порогового значения. То есть использование ИФН-γ дополняет в некоторых случаях результаты АДА теста, улучшая (до 100%) положительную ценность его отрицательного результата и диагностическую эффективность в целом. Однако концентрация ИФН-γ оказалась выше порогового значения у одного больного с правосторонним экссудативным плевритом и у одного больного с левосторонней мультилакунарной эмпиемой плевры нетуберкулезной этиологии.

С учетом приведенных данных в выборе приоритета определения теста на первый план выступают вопросы экономичности. Как показывают исследования, определение общей АДА активности в плевральной жидкости обладает не только клинической, но и экономической эффективностью, поскольку метод прост в исполнении, не требует дорогого оборудования и реагентов. Результат может быть получен в течение 2ч. Этот метод следует, прежде всего, рекомендовать для широкого внедрения в практическую медицину. Определение активности АДА2 и концентрации ИФН-γ в плевральной жидкости также имеет высокую диагностическую ценность. Их использование для дифференциальной диагностики ТП улучшает диагностическую эффективность аденозиндезаминазного теста.

Литература

1. Andreasyan, N. A., Hairapetian, H. L., Sargisova, Y. G. et al. Activity of adenosine deaminase and its isoforms in pleural fluid in tuberculous pleuritis // Med. Sci. Monit. 2002. Vol. 8, N 10. P. CR708 – CR712.
2. Arif, R., Misbahul, I., Abrar, A. et al. Serum adenosine deaminase (ADA) level in the cases of tuberculous pleural effusion // Pakistan. J. Med. Res. 2002. Vol. 41, N 3. P. 110 – 116.
3. Chen, M. L., Yu, W. C., Lam, C. W. et al. Diagnostic value of pleural fluid adenosine deaminase activity in tuberculous pleurisy // Clin. Chem. Acta. 2004. Vol. 341. P. 101 – 107.
4. Giusti, G., Galanti, B. // Methods of enzymatic analysis. 1984. Vol. 4. P. 315 – 323.

5. Gorguner, M., Cerci, M., Gorguner, I. Determination of adenosine deaminase activity and its isoenzymes for diagnosis of pleural effusions // *Respirology*. 2000. Vol. 5. P. 321 – 324.
6. Hiraki, A., Aoe, K., Eda, R. et al. Comparison of six biological markers for the diagnosis of tuberculous pleuritis // *Chest*. 2004. Vol. 125. P. 987 – 989.
7. Hsu, WH, Chiang, CD, Chen, WT. et al. Diagnostic value of adenosine deaminase and gamma-interferon in tuberculous and malignant pleural effusions // *Formosan Medical Association*. 1989. Vol. 88(9). P. 879 – 82.
8. Kataria, Y.P., Khurshid, I. Adenosine deaminase in the diagnosis of tuberculous pleural effusion // *Chest*. 2001. Vol. 120. P. 334 – 336.
9. Khatami, K. Pleural Tuberculosis.// *semj*. 2002. Vol.3 (3). P. 137 – 151.
10. Luis, V., David, A., Esther, S. J. et al. Tuberculous Pleurisy // *Arch Intern Med*. 1998. Vol. 158. P. 2017 – 2021.
11. Maria, V. V., Luz, A. L., Nancy, G. S. Evaluation of Polymerase Chain Reaction, Adenosine Deaminase, and Interferon- γ in Pleural Fluid for the Differential Diagnosis of Pleural Tuberculosis // *Chest*. 2000. Vol. 118. P. 1355 – 1364.
12. Mayank, V., Rakesh, C. G., Pramod, D. et al. ADA Assay in Pleural Fluids: A Diagnostic Tool in Tuberculosis Pleural Effusion // *Chestjournal*. 2003. abstract. Vol.124 (4). P. 115.
13. Perez-Rodriguez, E., Castro, D.J. The use of adenosine deaminase and adenosine deaminase isoenzymes in the diagnosis of tuberculous pleuritis // *Current Opinion in Pulm. Med*. 2000. Vol. 6. P. 259 – 266.
14. Poyraz, B., Kaya, A., Ciledag, A. et al. Diagnostic significance of gamma-interferon in tuberculous pleurisy // *Pulmonary Diseases*. 2004. Vol.52 (3). P. 211 – 217.
15. Taggart, E.W., Hill, H.R., Ruegner, R.G. et al. Evaluation of an in vitro assay for gamma interferon production in response to *Mycobacterium tuberculosis* infections // *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004. Vol. 11(6). P. 1089 – 93.
16. Wongtim, S., Silachamroon, U., Ruxrungtham, K. et al. Interferon gamma for diagnosing tuberculous pleural effusions // *Thorax*. 1999. Vol. 54(10). P. 921 – 4