

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ

Д-р Наталия Николаева Габровска

ДИСЕРТАЦИЯ

София, 2019 г.

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
КАТЕДРА ПО БЕЛОДРОБНИ БОЛЕСТИ
РЪКОВОДИТЕЛ НА КАТЕДРАТА:
ПРОФ. Д-Р ДИМИТЪР КОСТАДИНОВ, ДМ

Д-Р НАТАЛИЯ НИКОЛАЕВА ГАБРОВСКА

**СРАВНИТЕЛНО ПРОУЧВАНЕ ВЪРХУ
ДИАГНОСТИЧНАТА СТОЙНОСТ НА СЪВРЕМЕНЕН
ГАМА-ИНТЕРФЕРОНОВ ТЕСТ, ПРИЛОЖЕН В КРЪВ
И БРОНХОАЛВЕОЛАРЕН ЛАВАЖ ПРИ ДЕЦА,
СУСПЕКТНИ ЗА ТУБЕРКУЛОЗА**

*дисертационен труд за присъждане на
образователна и научна степен
”Доктор”*

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:

ПРОФ. Д-Р ДИМИТЪР ТЕМЕЛКОВ КОСТАДИНОВ, ДМ
ДОЦ. Д-Р СВЕТЛАНА АТАНАСОВА ВЕЛИЗАРОВА, ДМ

СОФИЯ, 2019 г.

СЪДЪРЖАНИЕ

I. УВОД	6
II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	7
1. Общи данни.....	7
2. Особенности на туберкулозата в детска възраст.....	8
3. Най-чести форми на туберкулоза в детска възраст.....	11
3.1. Туберкулоза на вътрегръдните лимфни възли.....	11
3.2. Първичен туберкулозен комплекс на белия дроб.....	14
3.3. Инфилтративно-пневмонична форма на туберкулоза.....	16
3.4. Туберкулозен плеврит.....	17
4. Съвременни диагностични методи.....	18
5. Диагностични имунологични изследвания за туберкуозна инфекция/болест.....	23
5.1. Туберкулинова проба на Mantoux.....	23
5.2. T-SPOT.TB тест.....	24
6. Имунологични особености на детския организъм.....	34
7. Основания за разработването на дисертационния труд.....	35
III. ЦЕЛ	36
IV. ЗАДАЧИ	36
V. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ	37

1. Материал.....	37
2. Методи.....	39
2.1. Анамнеза.....	39
2.2. Физикален статус и провеждане на стандартни изследвания.....	39
2.3. Взимане на биологични материали - венозна кръв и бронхоалвеоларен лаваж за провеждане на T-SPOT.TB тест.....	39
2.4. T-SPOT.TB тест.....	41
3. Събиране и обработка на информацията, статистическа обработка на резултатите.....	44
VI. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....	46
VII. ИЗВОДИ.....	82
VIII. ПРИНОСИ.....	83
IX. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	84
X. БИБЛИОГРАФИЯ.....	85

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

M. tuberculosis - *Micobacterium tuberculosis*

IGRA - Interferon-Gamma Release Assays

БАЛ - бронхоалвеоларен лаваж

PBMCs - Peripheral Blood Mononuclear cells/мононуклеарни клетки в периферна кръв

BCG - *Bacillus Calmette - Guérin*

PCR - Polymerase Chain Reaction полимеразна верижна реакция

PPD - Purified Protein Derivative

TST - Tuberculin Skin Test

КАТ - компютърна аксиална томография

ЯМР - ядрено-магнитен резонанс

IFN - interferon/интерферон

RD1 - Region of Differences-1

ТБ - туберкулоза/ туберкулозен

ЛТБИ - латентна туберкулозна инфекция

ХИВ (от англ. HIV) - човешки имунодефицитен вирус

НТМ - нетуберкулозни микобактерии

ESAT-6 - Early Secreted Antigen Target-6

CFP-10 - Culture Filtrate Protein-10

СИ - доверителен интервал

БК - бактерий на Кох

RIF - rifampicin/рифампицин

NAAT - nucleic acid amplification technique

I.УВОД

Туберкулозата е сред водещите причини за болестност и смъртност в световен мащаб [64,65]. Независимо от постоянното подобряване на диагностиката, ранното уточняване остава трудно в значителна част от случаите [63].

Идентификацията на *M. tuberculosis* с културелно изследване остава златния диагностичен стандарт. Това, обаче отнема повече от две седмици и диагностичната му сензитивност не надхвърля 80% [52].

В детска възраст от съществено значение е бързото поставяне на диагнозата туберкулоза и своевременното започване на специфично лечение. По литературни данни обаче, много малък процент от децата (8-15%), болни от туберкулоза, са директни бацилоотделители, т.е при детската популация не е възможно изцяло да се разчита на микробиологичното изследване за диагностично уточняване на туберкулозното заболяване.

Ранната диагностика на туберкулозата е трудна и когато първите микробиологични изследвания (директна микроскопия на храчка или стомашно-промивни води) са с отрицателен резултат.

В имунологичната диагностика на инфектирането на макроорганизма с *M. tuberculosis* вече повече от 10 години успешно се прилагат т.н. IGRA (IFN-gamma Release Assays) тестове - квантиферонов тест и T-SPOT.TB, чието основно предимство е висока им специфичност (специфичността на T-SPOT.TB е 97.1% [95% CI: 86.8-99.9%], а чувствителността на теста, установена при пациенти с активна туберкулоза е 95.6%) [44,94]. Обичайно те се прилагат като се използва венозна кръв от пациента. Други телесни течности, като бронхоалвеоларен лаваж, плеврални изливи или ликвор също са успешно изследвани (макар и не толкова рутинно в клиничната практика) с T-SPOT.TB теста с цел бърза **локална** идентификация на туберкулозната болест [79,80,81,82,121,170].

Ето защо, независимо от инвазивния характер на диагностичния метод, локалната имунодиагностика (имунологичен тест, приложен върху бронхоалвеоларна лаважна течност) е възможно да бъде обещаващ и бърз метод за диагностика на туберкулозно заболяване при суспектно болни деца.

II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1. Общи данни

Една трета от населението на света е инфектирано с *M. tuberculosis* и всяка секунда в света се заразява по един човек [65,156].

Над половин милион деца се разболяват от туберкулоза всяка година. Всеки ден над 200 деца умират от туберкулоза – едно предотвратимо и лечимо заболяване [60,167].

Седемдесет – осемдесет процента от децата, болни от туберкулоза страдат от белодробна туберкулоза [109,157].

В регионите с висока заболяемост 15-20% от всички случаи на туберкулоза са сред децата, като за сравнение в регионите с ниско засягане 2-7% от всички случаи на туберкулоза са сред детското население [95,115,158].

През 2017 г. в световен мащаб се отчита заболяемост 10 милиона (от които 1 милион детска) и смъртност - 1.6 милиона (от които 230 000 детска) [99,164].

В България общият брой на болните с туберкулоза през 2017 г. в страната е 1 462 души, спрямо 1 607 пациенти за 2016 г., като се запазва тенденцията броят на мъжете, засегнати от болестта, да е над два пъти по-голям от броя на жените. Най-засегнати са лицата във възрастовите групи над 65 г. – 20% и групата лица 45-54 г. [24].

От всички регистрирани случаи с туберкулоза над 86% са новооткрити, а останалите 14% са лица, които в миналото са боледували от туберкулоза (рецидиви, пациенти на повторно лечение, които са прекъсвали лечението). През последните години броят на децата от 0 до 17 г. представлява между 9% и 10% от всички случаи на туберкулоза в страната. През 2017 г. са регистрирани 135 деца с туберкулоза (новооткрити и рецидиви), а през 2016 г. техният брой е бил 160 [24].

Туберкулозата е второто по смъртност инфекциозно заболяване в света [96,108,145].

2. Особености на туберкулозата в детска възраст

Туберкулозата в детска възраст е в пряка корелативна връзка с туберкулозата при възрастните. След 1990 г., както при възрастните, така и при децата се наблюдава тенденция за нарастване на заболяемостта. През 1990 г. заболяемостта сред децата е в най-ниски граници – 8/100 000, а през 2007 г. същата е 22,6/100 000 детско население, като се отбелязва темп на нарастване почти трикратно за посочения период. През 2017 г. е отчетена детска заболяемост - 11,3/100 000 [24].

2.1. Причини за увеличението на заболяемостта от туберкулоза при децата за периода 1990-2007 г. [21,124]:

- Подценяване на заболяването сред различните медицински специалности
- Ниска здравна култура на населението
- Влошена комунално-битова хигиена
- Недостатъчен ветеринарно-медицински контрол
- Нерационално хранене на децата
- Липса на контрол по отношение обхвата и качеството на провежданата BCG - ваксинация
- Неефективност на диспансерната мрежа в страната
- Липса на контрол на импортната инфекция
- Неефективна дейност по отношение санирането на огнищата на туберкулозна инфекция. Най-често туберкулозата в детската възраст се разпространява по битов път – деца с фамилно обкръжение от туберкулозно болни, нерядко в огнища от ендемичен тип [146,147].

2.2. Начин на разпространение на туберкулозната инфекция сред децата

- Пътищата, по които се разпространява туберкулозната инфекция, най-често са:
- Въздушно-капков път - най-честия път на заразяване, в масивно битово обкръжение от туберкулозно болни, в съчетание с лоши битови условия и недостатъчна

жилищна площ, децата се заразяват от възрастните, които имат отворени белодробни форми на туберкулоза. Чрез кашлица възрастните болни директно предават инфекцията на живеещите с тях деца [39]. За това способстват лошата или липсваща вентилация на помещенията, както и пролежаване в едно легло на болен родител и дете. По същия механизъм източникът на инфекция може да бъде болен учител, лекар, стоматолог, готвач, кухненски работник, продавач в магазин или шофьор на превозно средство.

- „Улична” инфекция - липсата на достатъчна здравна култура много често е причина възрастните болни от туберкулоза да отделят храчки по улиците. Туберкулозните бактерии в храчките съхраняват своята жизненост до 7 дни, докато при пряка слънчева светлина загиват за 6 – 8 часа. Лошата комунално-битова хигиена способства за разпространението на инфекцията.

- Хранителен път на трансмисия на инфекцията - при децата този път на пренасяне на туберкулозната инфекция се осъществява чрез консумиране на непреварено краве мляко. Мляко от неваксинирани и болни крави, което се употребява без термична обработка, води до появата на чревен първичен комплекс и разпространение на инфекцията от коремната кухня.

- Контактен път на трансмисия на инфекцията - макар и рядко, туберкулозната инфекция може да бъде пренесена в детския организъм при наранена кожна повърхност. При децата това могат да бъдат раневи повърхности на лицето, краката, предмишниците. Първичните поражения от специфичен тип при този начин на заразяване са значително по-редки. Независимо от това, при раневи повърхности, които не зарастват бързо и наличието на персистиращ регионален лимфаденит, винаги трябва да се мисли и за туберкулоза [103].

2.3. Развитие на туберкулозната инфекция

Патогенезата на туберкулозното заболяване е сложен процес на взаимодействие между макроорганизъм (болното дете) и микроорганизъм (*M. tuberculosis*). В патогенезата на процеса са доказани три основни периода в еволюцията на заболяването:

- Начална бактериемия
- Органична фиксация

- Морфологични изменения, специфично обусловени в различните органи и системи

Предвид факта, че в обичайни условия моментът на заразяване на детето е неизвестен, първите два периода от патогенезата се развиват далеч от времето на първия клиничен преглед. Детето се явява за първи път най-често с нетипични оплаквания, с латентна туберкулозна инфекция или с форма на първична туберкулоза, които съответствуват на третия етап от развитие на патогенезата на туберкулозно заболяване.

2.4. Клинична картина на болното от туберкулоза дете

Туберкулозата е сложно в имунологично отношение, хронично по протичане и по проявление заболяване. Предвид това има различни форми на туберкулозното заболяване [45]. Всички те протичат с различно изразен по степен интоксикационен синдром. Проявява се с хроничен нисък фебрилитет, намален апетит, отслабване на тегло / дистрофия у кърмачета, адинамия, лесна уморяемост; намалена двигателна активност, липса на концентриране на вниманието, понижена успеваемост при ученици, емоционална неустойчивост, функционални разстройства от засегнатите органи и системи. При наличието на степенно изразен или напълно разгърнат интоксикационен синдром често може да има и клинични белези от различна органна патология – най-често от страна на бронхо-белодробната система, коремни органи, очи, горни дихателни пътища (ГДП), централна нервна система (ЦНС), отделителна система и т.н. [21].

И така, в обобщение:

- Децата са поставени в неблагоприятната позиция да бъдат заразявани най-често от своите близки, а самите те много рядко да заразяват (според различните източници едва между 8 и 15% от болните деца са бацилоотделители) [48]. Заразяването на децата с туберкулоза се осъществява най-често в семейна среда, при тесен битов контакт.

- При процесите на заразяване и развитие на заболяване сред децата трябва да се отчита провеждането или не на специфична имунопрофилактика с BCG ваксина.

- Децата обикновено боледуват от първични форми на туберкулозно заболяване, т.е. техният организъм се среща за първи път с вирулентен щам на *M. tuberculosis*.

- Първичната туберкулоза протича на фона на изразена сенсibiliзация на съдове и тъкани към *M. tuberculosis*. Това благоприятства лимфо - хематогенното дисеминиране и генерализирането на туберкулозното заболяване, особено в ранна детска възраст.

- Клиничната картина често е неспецифична - владее се от степенно изразен интоксикационен синдром - хроничен нисък субфебрилитет, отпадналост, адинамия, безапетитие, отслабване на телло, нощно изпотяване, емоционални промени. Кашлицата не е задължителен симптом.

- Характерно за детската възраст в оздравителната фаза е бързото повлияване на перифокалното възпаление, инактивиране на първичното огнище и бацилоотделяне и склонност към отлагане на калций в казеозните огнища [22].

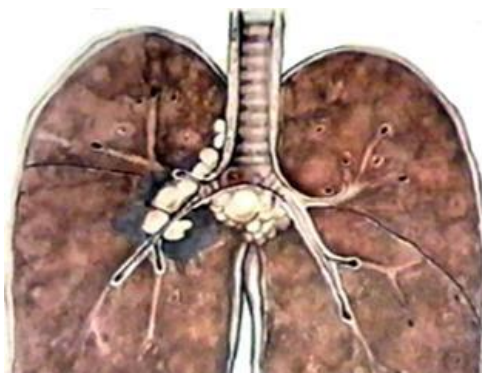
3. Най-чести форми на туберкулоза в детска възраст

Според последното ретроспективно проучване, извършено в Детска клиника на МБАЛББ " Св. София", обхващащо всички деца, лекувани в клиниката за 5 годишен период (2013-2017 г.) в структурата на туберкулозното заболяване най-голям относителен дял има туберкулозния бронхаденит (77,9%), следван от инфилтративно-пневмоничната форма на туберкулоза (8,5%). Трето място се заема от първичния туберкулозен комплекс (4,5%), а следващата по честота форма на туберкулозно заболяване е туберкулозният плеврит (4,2%) [5].

Именно тези четири форми на туберкулозното заболяване ще бъдат разгледани по-подробно като най-често представени сред децата.

3.1. Туберкулоза на вътрегърдните лимфни възли

Тази форма на туберкулоза (фиг.1) е най-разпространената форма на първична туберкулоза сред ваксинирани с BCG ваксина деца. Относителният и дял варира от **70 до 80% от всички форми на туберкулозно заболяване сред децата [22,37,136].**



Фиг. 1. Туберкулозен бронхаденит вляво - макроскопски вид

Най-удобна за клиничната практика е следната класификацията на вътрегърдните лимфни възли (фиг. 2):

- Паратрахеална (чифтна) група
- Бифуркационна (нечифтна) група
- Бронхопулмонална (чифтна) група от първи порядък
- Бронхопулмонална (чифтна) група от втори порядък



Фиг. 2. Трахеобронхиални лимфни възли - разположение

В зависимост от размера и съотношението между казеозната некроза и перифокалното възпаление в засегнатия лимфен възел, туберкулозният бронхаденит бива две форми - **инфилтративна** и **туморозна**.

Двете форми са патогенетично обусловени и определят относителната давност на туберкулозното заболяване.

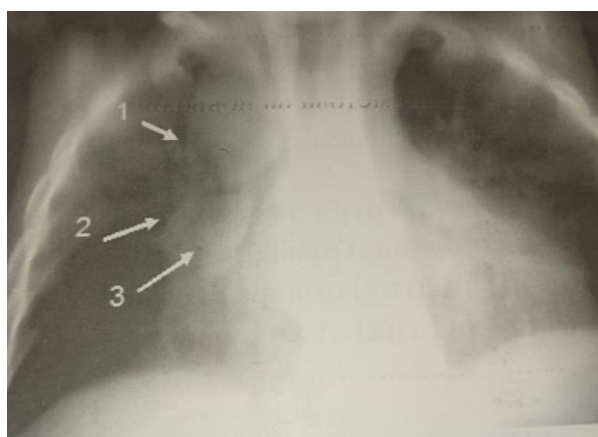
При инфилтративната форма (фиг. 3) относително по-малко е изразена казеозната некроза в лимфния възел, на фона на която преобладава значително изразено перифокално възпаление. Описаните промени настъпват сравнително бързо след проникването на туберкулозния микобактерий в лимфните възли.



Фиг. 3. Инфилтративна форма на туберкулозен бронхаденит

При туморозната форма (фиг.4) казеозната некроза е обхванала почти изцяло структурата на лимфния възел, има оскъдна или почти липсваща зона на перифокално възпаление. Тези изменения показват по-голяма давност на специфичния процес в лимфните възли.

При тази форма на заболяването, процесът излиза извън предела на капсулата на лимфните възли, увеличавайки значително техния размер.



Фиг. 4. Туморозна форма на туберкулозен бронхаденит

Съществуването на двете форми на туберкулозния бронхаденит е условно, тъй като те могат да преминават една в друга в зависимост от фазата на еволютивно или инволютивно развитие на заболяването.

Клиничната картина е дискретна, владее се от описания степенно проявен интоксикационен синдром [49].

Важно е да се споменат възможните усложнения при тази форма на туберкулозното заболяване [116]:

- Екзобронхиална обструкция - обструктивен емфизем при частична бронхиална обструкция; ателектаза при тотална бронхиална обструкция (често се проявява в областта на S-4, S-5 вдясно, описана като "синдром на средния дял" - Brock) [168].

- Формиране на лимфно-жлезна фистула - при пробив на лимфен възел в бронх, бронхогенна дисеминация на заболяването; деформиране на бронхиалното дърво.

- Хематогенни дисеминации на заболяването - характерно усложнение за деца в ранна и пубертетна възраст [28].

- Късни хематогенни дисеминации на заболяването - характерни за нелекувани деца, като се появяват средно 4-6 години след засягането на вътрегрудните лимфни възли. Могат да бъдат засегнати всички органи в детския организъм с изаявата на вторична форма на туберкулоза.

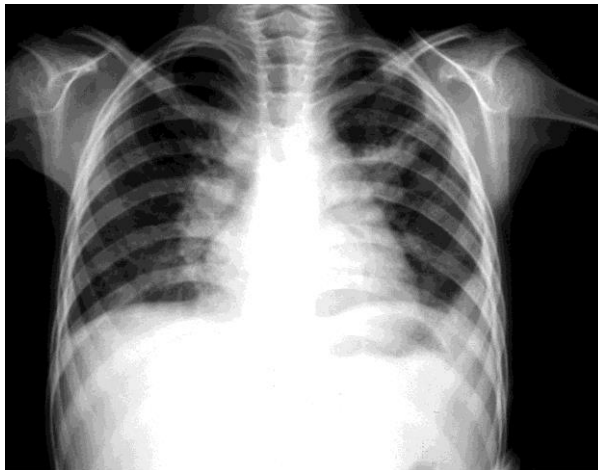
В диагностично отношение, при подозиран туберкулозен бронхаденит, е важно да бъде стриктно приложен утвърдения диагностичен алгоритъм, включващ епидемиологична анкета, анамнеза и физикален статус, кръвни, микробиологични, образни и имунологични изследвания (проба на Mantoux, IGRA - тест) [28].

Поради разположението на грануломатозно променените лимфни възли в средния медиастинум, много често скриниращата обзорна рентгенография не е достатъчно информативна. Ето защо, се препоръчва провеждането на срединна томография или компютърно-аксиална томография (КАТ).

3.2. Първичен туберкулозен комплекс на белия дроб

Тази форма е класическа проява на първична туберкулоза (фиг. 5). Среща се по-рядко поради наличната в България специфична ваксинапрофилактика.

При попадането на туберкулозния микобактерий в белия дроб за първи път, на мястото се образува първично туберкулозно възпалително огнище. То може да еволюира по различен начин - да се резорбира, да казеифицира, да се инкапсулира, да образува каверна или да се калцифицира. Това е т.нар първичен афект. Той може да има различна локализация в белия дроб, обичайно се засягат горните белодробни дялове. Процесът се разпространява и обхваща регионалните лимфни възли и съдове - развива се лифаденит и лимфангит. Съвкупността от първичен афект, регионален лифаденит и лимфангит се нарича първичен туберкулозен комплекс.



Фиг. 5. Първичен ТБК комплекс на белите дробове 0/1 - момче на 1 г. и 6 мес. възраст

В еволюцията на първичния туберкулозен комплекс съществуват три фази:

- Фаза на инфилтриране
- Фаза на разпадане
- Фаза на разсейване

Съвременните диагностични методи позволяват поставяне на диагнозата в първата фаза от развитието на заболяването. При ваксинирани обаче с BCG ваксина деца, клиничната картина е много бедна и ранната диагноза е затруднена.

В инволюцията на заболяването съществуват също три фази:

- Фаза на всмукване
- Фаза на уплътняване
- Фаза на калциране

При спонтанно involютивно развитие настъпва оздравяване на детето с отлагане на калций в първичното огнище - огнище на Ghon. Тези калцификати остават до края на живота на пациента и са причина за наличната винаги хиперергична туберкулинова проба на Mantoux.

3.3. Инфилтративно-пневмонична форма на туберкулоза

Това е най-честата форма на вторична туберкулоза сред възрастните (фиг. 6). **За съжаление се наблюдава трайна тенденция за заемане на тази форма на туберкулозно заболяване на по-челни позиции в структурата на детското заболяване [5].** Възрастовата граница на заболяването спада под 11 годишна възраст, което е свързано с акцелерацията при децата и често е съпроводена с бацилоотделяне.

Тази динамика се обяснява с пропуск в ранната диагностика на първичните форми на заболяването.



Фиг. 6. Инфилтративно-пневмонична форма на ТБК при момче на 13 г., собствено проучване

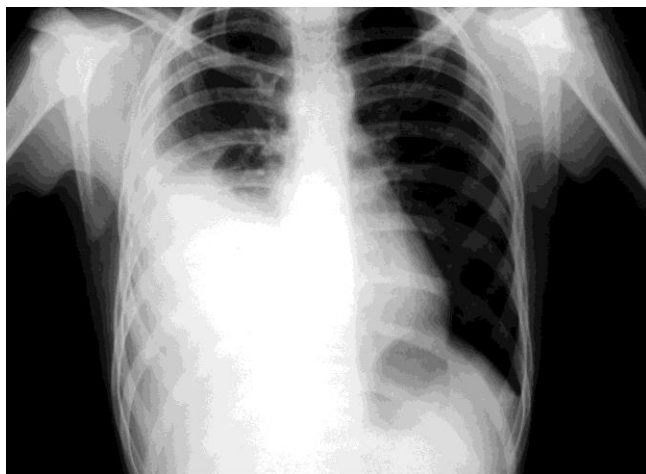
Туберкулозните инфилтрати могат да се развият във всички дялове на белите дробове, но предилекционно (60-80%) се засягат върховите отдели. Инфилтратите могат да бъдат различни по форма и засегната площ. При прогресиране на заболяването настъпват процеси на разпад (инфилтративно-пневмоничната туберкулоза преминава в казеозна пневмония), оформят се кухинни сенки - каверни.

Клиничната картина се владее от манифестно проявен интоксикационен синдром, кашлица с експекторация, възможно и хемоптоие.

Специфичното противотуберкулозно лечение с комбинация от познатите препарати трябва да е навременно, адекватно - дозирано, приложено и контролирано [163].

3.4. Туберкулозен плеврит

Тази форма на туберкулозно заболяване (фиг. 7) се проявява както при деца (обичайно в предпубертетна и пубертетна възраст), така и при възрастни и е резултат на плеврална сенсibilизация към *M. tuberculosis*. Редки са случаите, в които плевритът е самостоятелна форма на туберкулозно заболяване, обикновено възниква на фона на друга първична или вторична форма на заболяването.



Фиг. 7. Туберкулозен плеврит при момче на 14 год. възраст, собствено проучване

От патогенетична гледна точка съществуват четири форми на туберкулозен плеврит - алергичен плеврит, перифокален плеврит, туберкулоза на плеврата и туберкулозен емпием.

Алергичният плеврит се проявява много често в детско-юношеска възраст, резултат на сенсibilизацията на плеврата (както на всички тъкани и органи) към *M.*

tuberculosis по време на първична инфекция. Изливът е с качеството на трансудат, възможно е да е бързопреходен и мигриращ и да претърпи спонтанна резорбция.

Клиничната картина включва изразен интоксикационен синдром, болка в засегнатата страна, засилваща се при издишване, кашлица, обикновено суха, повишена потливост, лесна уморяемост.

Лечението на специфичния плеврит включва туберкулоостатична комбинация, като допълнение се използват кортикостероиди и разбира се при необходимост провеждането на плеврална пункция (има терапевтична и диагностична стойност).

Перифокалният плеврит се появява около вече сформирани промени в бронхо-белодробната система, резултат от първична или вторична туберкулоза.

Туберкулозният перифокален плеврит представлява възпаление на плеврата, което се характеризира със серо - фибринозен ексудат.

Патогенетично възпалението на плеврата води до повишаване на пропускливостта на капилярите и води до отделяне на ексудат в плевралната кухина. Този ексудат е с високо съдържание на белтък - над 30 g/l. Макроскопски ексудатът изглежда мътен и има различни нюанси на жълтия цвят.

Туберкулозата на плеврата е рядка форма на засягане на плевралните листове и се характеризира с наличие на различни огнища - от зърнисти разсейки до големи и конфлуиращи казеозни огнища. Етиологичното уточняване изисква провеждането на видеоасистирана торакоскопия и взимането на материал за микробиологично и хистологично изследване.

Туберкулозният емпием е тежко усложнение на туберкулозният плеврит - изливът става с гноен характер, протича тежко, с изразена интоксикация, необходимо е хирургично лечение [22].

4. Съвременни диагностични методи

Невинаги, особено в детска възраст, може да се докаже етиологичния причинител на туберкулозното заболяване – *M. tuberculosis*. Липсата на етиологични доказателства при клинични и морфологични прояви на болестта, не отменя диагнозата туберкулоза.

Изключително важни са критериите, които доказват наличието на активен туберкулозен процес, което налага съответното терапевтично поведение [40].

Съществуват следните критерии за диагностика на туберкулозното заболяване [11,22,91]:

1. Анамнеза и епидемиологична анкета
2. Клинични симптоми и физикално изследване
3. Лабораторни изследвания
 - 3.1. Хемограма
 - 3.2. Микробиологично изследване на храчка, стомашно-промивни води, лаважна течност и др.
 - 3.2.1. Директна микроскопия
 - 3.2.2. Флуоресцентна микроскопия
 - 3.2.3. Посявка върху твърда хранителна среда на Lövenstain – Jensen
 - 3.2.4. MGIT – течна хранителна среда
 - 3.2.5. PCR
 - 3.2.6. PCR в реално време - Xpert®MTB/RIF assay
 - 3.3. Имунологични изследвания
 - 3.3.1. Туберкулинова чувствителност с 5 ТЕ PPD
 - 3.3.2. Квантиферонов тест
 - 3.3.3. T-SPOT.TB тест
 - 3.4. Биохимични изследвания
 - 3.5. Хистологични и цитологични изследвания
4. Апаратни изследвания
 - 4.1. Образни изследвания
 - 4.1.1. Конвенционална рентгенография на бял дроб (обзорна, профилна, томография)
 - 4.1.2. КАТ
 - 4.1.3. ЯМР
 - 4.2. Бронхоскопия с БАЛ
 - 4.3. Трансторакална тънкоиглена биопсия

4.4.Отворена биопсия

4.5. Ултразвукова диагностика

Бронхоскопия и бронхоалвеоларен лаваж - основни моменти:

Бронхоскопията е метод за визуализиране на дихателните пътища с оптичен инструмент. Показания за провеждане на бронхологично изследване са диагностични и терапевтични [16, 17, 18, 19]:

- кашлица с неясен произход
- кръвохрак
- рентгенови изменения в белия дроб
- взимане на БАЛ, биопсия
- спиране на кървене
- екстирпация на чужди тела
- фибробронхоскопска интубация
- дилатация
- поставяне на стентове
- лазерна обработка и др.

Противопоказания за провеждане на бронхоскопия [27,31,106,155]:

- Абсолютни:

- инфаркт на миокарда с давност по-малка от шест месеца
- хипертонична болест
- ритъмно-проводни нарушения – новопоявили се
- хипоксемия / хипоксия

- Относителни:

- остър инсулт
- състояние след травматично увреждане на мозъка
- заболяване на коронарната артерия

- остри респираторни инфекции на горните дихателни пътища
 - обостряне на бронхиална астма
 - белодробна хипертония
 - декомпенсиран захарен диабет
 - уголемяване на щитовидната жлеза (III-IV степен)
 - психиатрични и неврологични заболявания (шизофрения, епилепсия, и т.н.)
 - непоносимост на лекарства, които се използват за локална анестезия
 - тежко общо състояние на пациента, когато рискът от изследването надхвърля ползата от него
- през втората половина на бременността
 - алкохолизъм

Бронхоскопията бива два вида – ригидна (РБС) и флексибилна (ФБС). РБС е по-тежкото изследване, дискомфортът е по-сериозен, затова се извършва и под обща анестезия [41]. Достъпът е оротрахеален [12]. Това е метод на избор при необходимост от взимане на по-голям обем материал за хистологично изследване, екстирпирание на чужди тела, работа с лазер, обилно кървене. Недостатък на РБС е ограничението в достъпа – до нивото на главните бронхи [85].

При ФБС обичайно се използва локална или обща анестезия с премедикация [30,33,50,51,53,127,169]. Фибробронхоскопът се въвежда оротрахеално или назотрахеално. При локална анестезия кислород се подава чрез кислородна маска или назален катетър тип «очила». При обща анестезия се използва ларингеална маска или iGel, което предпазва от травмиране на истинските гласни връзки. Кашличните рефлексии се подтискат при обща анестезия и релаксация. При седация и местен анестетик рефлексът се подтиска с поетпано анестезиране с локален анестетик. [161].

Бронхоскопите разполагат с работни канали с различен диаметър в зависимост от размера на ендоскопа. През работния канал се въвеждат различни инструменти. Материал за микробиологично, имунологично, цитоморфологично изследване може да бъде взет чрез: катетър, четка, БАЛ, иглена биопсия, фиброщипкова/щипкова биопсия, криобиопсия [26,35,72].

Рискове и усложнения:

Съществува опасност от кървене от горните и долните дихателни пътища, увреждане на зъбите (при РБС), ларингоспазъм, травматично увреждане на гласните връзки и лигавицата на трахеята и бронхите (лезия), пневмоторакс, пневмомедиастинум, подкожен емфизем, аритмия, въздушна емболия, понижено оксигениране на кръвта, усложнения от анестетика – алергичен шок, ларинго-бронхо спазъм [31,102,123,139].

Недостатъци на метода:

- РБС - ограничение в диагностично-терапевтичните процедури: осъществява се само в проксималните отдели на дихателните пътища – трахея и главни бронхи до устията на сегментните бронхи. При необходимост от изследване на по-дистално разположени изменения се налага използването на допълнителни помощни средства, обикновено под рентгеноскопичен контрол, изисква обща анестезия;

- ФБС – ако се провежда с локална анестезия, трудно се коригира хипоксемията; може да се травмира самия фибробронхоскоп при работа с лазер, електрокаутер или при трансбронхиална иглена биопсия;

Специална подготовка:

Дванадесет часа преди процедурата се спира приема на храна и вода. При прием на лекарства, които увеличават риска от кървене – антиагреганти, антикоагуланти и нестероидни противовъзпалителни средства, се спират съгласно лекарските препоръки няколко дни по-рано, като при необходимост се прилага бързодействащ индиректен антикоагулант [25,88]. Запазва се само приема на антихипертензивните медикаменти – приемат се с малко количество вода.

И така, в **заключение по отношение на диагностичните методи**, които се използват за уточняване на туберкулозното заболяване в детска възраст:

Изисква се сложен, комплексен подход, като се започва от детайлното събиране на анамnestични и епидемиологични данни, премине се през физикалното изследване и през съответните параклинични изследвания [28]. Фокусът на настоящия научен труд е насочен към имунологичната диагностика на туберкулозното заболяване.

5. Диагностични имунологични изследвания за туберкуозна инфекция/ болест

5.1. Туберкулинова проба на Mantoux

Туберкулиновата проба на Mantoux до неотдавна е приемана като единственото средство за оценка на имунния отговор към *M. Tuberculosis* както при латентна инфекция, така и при активно заболяване. TST (Tuberculin Skin Test) в продължение на повече от сто години е златен стандарт в имунодиагностичен план [34]. Провежда се строго вътрекожно с 5 TE PPD, отчита се на 72-ри час с измерване на напречния диаметър на инфилтратата. Интерпретацията в България е както следва: 0-5 мм - отрицателна реакция, 6-14 мм - нормергична реакция, 15 и повече мм - хиперергична реакция. В зависимост от вида на инфилтратата, времето на задържането му и др. съществува и качествена оценка на туберкулиновата чувствителност, която допълва количествената [23].

Натрупаният многогодишен опит показва обаче, че тестът се съпътства от някои проблеми при изпълнението и интерпретацията му като:

- Ниска чувствителност:
 - Висок процент на фалшиво отрицателни резултати при иначе здрави индивиди (**до 25% от инфектираните могат да бъдат пропуснати**)
 - Повече от 50% фалшиво отрицателни резултати при имунокомпрометирани индивиди (особено при пациенти с HIV/СПИН много често се наблюдават фалшиво отрицателни кожни туберкулинови реакции)
- Ниска специфичност:
 - Наличие на фалшиво положителни резултати
 - Кръстосана реактивност след BCG ваксинация или след контакт с нетуберкулозни микобактерии
- При 1/3 от хората, на които е направен TST, резултатът не се отчита, поради повторното им невявяване
 - Неточности в измерване на кожната реакция
 - Субективна интерпретация на теста
 - Повлияване от BCG ваксинация или реимунизация

- Петнадесет процента междуиндивидуална вариабилност на теста
- Петнадесет процента вариабилност на теста, зависима от дейността на изпълнителя
- Повлияване от предишен тест: Booster ефектът от TST повлиява реакцията с фалшиво положителен резултат при често тествувани индивиди

По-слабата специфичност на TST е най-голямото ограничение, особено при BCG ваксинирани индивиди [97,109]. В повече от 20% от тези случаи, могат да се получат фалшиво-положителни резултати. Освен това, при пациентите с латентна туберкулозна инфекция (ЛТБИ) вътрекожният туберкулинов тест е чувствителен, докато при пациенти с активна и дисеминирана туберкулоза тази чувствителност е значително по-ниска. Ето защо, независимо от факта, че **TST остава най-лесния, бърз, достъпен и икономически изгоден имунологичен тест**, не би могло да се разчита единствено на него, тъй като той може да бъде положителен както при ЛТБИ, така и при активна туберкулоза, след скорошен контакт с *M. tuberculosis* или с нетуберкулозни микобактерии (НТМ), както и след BCG ваксинация.

5.2. T-SPOT.TB тест

Бързата диагностика на активната туберкулозна болест е трудна, когато киселинно-устойчивите туберкулозни бактерии не могат да бъдат установени в натривки от храчка (стомашно-промивни води) на директна микроскопия. Локалната имунодиагностика на *M. tuberculosis* – ELISPOT е обещаващ метод за бърза идентификация на пациенти, чиито микробиологични материали (храчка, стомашно-промивни води) са БК (Бактерий на Кох) отрицателни на директна микроскопия [82,92].

През последните години категорично се наложи необходимостта от създаването на нови, по-надеждни имунодиагностични тестове за доказване както на латентна, така и на активна туберкулозна инфекция. С помощта на интензивни сравнителни ДНК анализи бяха постигнати значителни успехи в идентификацията на *M. tuberculosis* (МТВ)-специфичните антигени и бе установено наличието на няколко генни области на МТВ, които не се срещат, както във всички ваксинални BCG щамове, така и в повечето НТМ.

RD1 (Region of Differences-1) регионът е обект на задълбочени проучвания с цел идентифициране на антигени, подходящи за имунодиагностика и за разработване на нови ваксини. Той кодира 11 протеина, включително и имуногенните **ESAT-6** (Early Secreted Antigen Target-6) и **CFP-10** (Culture Filtrate Protein-10), които са в основата на IFN- γ тестовете [14,15,118].

IGRA тестовете са сред най-големите научни постижения през последните сто години в областта на диагностиката на туберкулозното заболяване. Тъй като антигените ESAT-6 и CFP-10 липсват при всички ваксинални BCG щамове, то не се наблюдават и кръстосани реакции с BCG ваксината. IGRA тестовете почиват на принципа, че Т-клетките на сенсibiliзираните индивиди произвеждат IFN- γ , когато повторно срещнат антигените на МТВ. **Най-голямото предимство на тези тестове е тяхната висока специфичност** [29,59,97].

T-SPOT.TB тестът се базира на ELISPOT (Enzyme-Linked ImmunoSpot) метода, с който се постига бърза детекция на Т-клетките, специфични за антигените на *M. tuberculosis*. *Ex vivo* освободеният от тези клетки IFN- γ може да бъде установен от изключително чувствителния ELISPOT, тъй като прицелният цитокин се захваща пряко и здраво около секретирателната клетка, преди да бъде уловен от рецепторите на околните клетки или да се разрежи в супернатантата. Така всяка Т-клетка предизвиква възникването на тъмно петънце (spot), а разчитането на тестовия резултат се състои в преброяването на тези спотове. Изброяваните Т-клетки в ELISPOT са активирани ефektorни клетки, осъществили неотдавна контакт с антигените на МТВ[83,94]. При повторна ре-експозиция към специфичните антигени тези клетки освобождават бързо и в голямо количество IFN- γ . Обстоятелството, че ELISPOT методът може да установи една/60000 IFN- γ -продуцираща клетка, го прави значително по-чувствителен в сравнение с конвенционалните ELISA тестове [57,58].

Специфичността на T-SPOT.TB е **97.1%** [95% CI: 86.8-99.9%], а **чувствителността** на теста, установена при пациенти с активна туберкулоза е **95.6%**.

Lalvani и сътр. разработиха първото поколение на новите ELISPOT тестове за латентна туберкулоза, като използваха пептида ESAT-6, за да стимулират единична кръвна проба[89]. В предварително изпитване този тест е бил позитивен при 96% от изследваните пациенти с активна туберкулоза и при 85% от лицата с предполагаема

ЛТБИ. Тестът е бил негативен при 100% от BCG-ваксинираните контролни участници, като именно тази специфичност му осигурява огромно предимство пред туберкулиновата проба на Mantoux. Анализът на различни изследователски групи показва, че ELISPOT предлага по-прецизен подход, в сравнение с TST за идентифициране на индивиди с ЛТБИ. Тестът е подходящ за употреба при всички лица, изложени на риск от заразяване или със съмнение за ЛТБИ, независимо от тяхната възраст, пол, имунен статус и провеждана терапия [89,90]. Тестът намира много добро приложение особено при имunosупресирани индивиди, при лица, суспектни за туберкулоза, при контактни на източника на инфекция, при деца от всички възрасти, както и при серийно тестване на медицински персонал.

В достъпната медицинска литература не съществуват много проучвания на приложението на T-SPOT.TB сред децата. И все пак накратко представям изводите от най-интересните такива:

В Южна Африка Liebeschuetz S. и сътр. изследват 293 деца, суспектни за туберкулозно заболяване с T-SPOT.TB и TST, като преди това е снета анамнеза, проведено физикално изследване, ренгенографско изследване и микробиология за БК на директна микроскопия и на посевка. T-SPOT.TB тестът при 83% открива туберкулозна инфекция срещу 63% при TST. Туберкулиновата проба на Mantoux е със сигнификантно ниска сензитивност при деца под 3 години - 51%, ХИВ положителни - 36%, недохранени - 44%. Точно в тези случаи T-SPOT.TB прави диагнозата по-лесна. При негативен TST 53% от децата са дали положителен T-SPOT.TB тест. Когато се комбинират и дават теста, се стига до 91.4% успеваемост на новите случаи и това “прави диагностиката много по лесна” [93].

T-SPOT.TB тестът може да бъде индикатор и на резултатите от терапията при активна туберкулоза. Nicol M. и сътр. са изследвали активно болни деца на 1-ви, 3-ти и 6-ти месец след старта на терапията. Резултатите от T-SPOT.TB теста намаляват количествено още след първия месец докато TST се задържа до 6-ти месец. Освен като диагностичен тест, той може да бъде използван и като мониторинг по отношение ефективността на противотуберкулозната терапия [4,13,110,111,112,113].

Alasdair RJ. и др. през 2009 г. разглеждат всички изследвани деца в Англия и стигат до извода, че чувствителността на туберкулиновия тест е 82%, на квантифероновия тест - 78% и на T-SPOT.TB - 66%. Правят се изводи, че негативните IGRA - тестове не могат да отхвърлят диагнозата туберкулоза в детската възраст. При използването обаче на двата

теста - туберкулинова проба на Mantoux и T-SPOT.TB се достига до 96% чувствителност [34].

В бъдеще е необходимо да се изследват възможностите на IGRA тестовете особено в ранна детска възраст и да се обобщят случаите, при които могат да бъдат използвани. В Европа има твърде малко изследвания сред детската популация.

В България единственото сравнително проучване на съвременни имунологични методи е направено от Велизарова Св. и сътр. През 2010 г. са представени резултатите на изследваните 134 деца в различни възрастови групи с различни форми на туберкулозно заболяване, както и деца с ЛТБИ. Част от направените изводи са:

- T-SPOT.TB тестът има най-високи диагностични възможности при деца с Първичен туберкулозен комплекс - 80% положителни реакции.

- TST се доближава по диагностични възможности до T-SPOT.TB при най-срещаната форма на първична туберкулоза – Туберкулоза на трахеобронхиалните лимфни възли - 66% хиперергични /72% положителни.

- При деца с ЛТБИ хиперергията, установена с TST се увеличава с възрастта като най-изразена е след 8 годишна възраст - 93,8%. T-SPOT.TB тестът е позитивен само при 18,7%, което показва, че до този момент позитивните и негативни стойности при IGRA тестовете остават все още неизяснени при децата с ЛТБИ.

- При тежките форми на туберкулозно заболяване като Туберкулозен менингит и хематогенно-дисеминирана туберкулоза стойностите на двата теста са ниски, поради тежката имуносупресия при малките деца.

- Стойностите на T-SPOT.TB са по-високи спрямо TST във всички възрастови групи.

- T-SPOT.TB има най-високи възможности при извънбелодробните форми на туберкулоза. Тестът може да служи за маркер при диференциране на периферните лимфаденити, причинени от вирулентен или ваксинален щам [1,2,3,6,7].

Интерпретацията на T-SPOT.TB теста е следната [8,9,152]:

T-SPOT.TB тестът изисква 2.5×10^5 жизнени периферни кръвни мононуклеарни клетки на ямка. Общо четири ямки са необходими за един пациент, като посоченото количество трябва да е налично във всяко от тях. В противен случай може да се стигне до неправилна интерпретация на получения резултат.

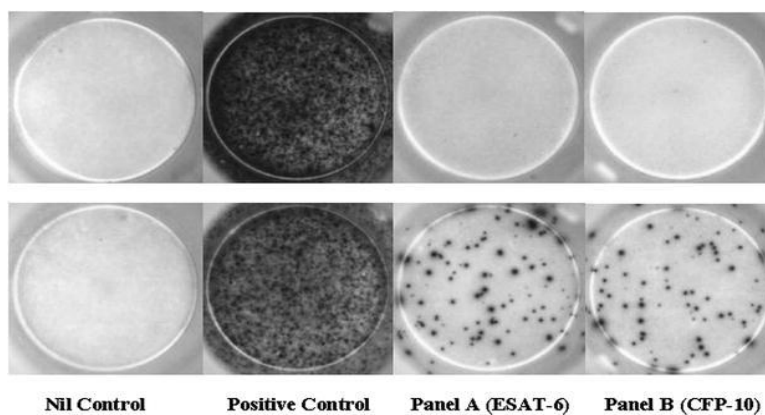
Интерпретацията на T-SPOT.TB теста е една и съща при използването на двата вида биологични течности - кръв и БАЛ и е представена в табл. 1. и фиг. 8:

Табл. 1. Определяне на резултатите от T-SPOT.TB теста

Отрицателна контрола (N) (брой спотове)	Панел А и/или Панел В (брой спотове)	Положителна контрола (Mitogen) (брой спотове)	Резултат
0-5	$\geq 6 + N$	≥ 20 ≥ 20	Положителен
	< 6	≥ 20	Отрицателен
6-10	$\geq 2N$	≥ 20	Положителен
	$< 2N$	≥ 20	Отрицателен
> 10	Всяка стойност	Всяка стойност	Неопределен*
0	0	0	Невалиден*
0	> 5	< 20	Положителен

* Да се повтори

T-SPOT (ELISPOT) test



Meier T et al, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 24:529 (2005)

Фиг. 8. Вид на 4 панела при валиден и позитивен тест

В достъпната медицинска литература липсват съобщения за провеждан Т-SPOT.TB тест в БАЛ сред детската популация.

Не са много и проучванията сред възрастните пациенти:

В проспективно мултицентрично TBNET проучване се доказва, че пациенти с активно туберкулозно заболяване (БК отрицателни на директна микроскопия от храчка) биха могли бързо да бъдат отличени от пациенти с ЛТБИ посредством M. Tuberculosis специфичния ELISPOT от клетки в бронхоалвеоларна лаважна течност, който е с висока диагностична чувствителност и специфичност [82]. Тези открития могат да имат голямо значение за вземане на бързо решение за започване на противотуберкуозна терапия при пациенти с рутинно осъществено бронхоскопско изследване, когато се касае за туберкулозно заболяване с БК отрицателен резултат на директна микроскопия от храчка.

Съществува и проучване в референтен център в Германия, което сравнява диагностичната стойност на съвременен и бърз молекулярен метод за диагностика на туберкулозно заболяване (GeneXpert® MTB/RIF) с имунологичен метод (Т-SPOT.TB в БАЛ). При изследваните 96 пациента с белодробна туберкулоза с БК отрицателен резултат на директна микроскопия от храчка се установява, че при наличие на позитивен резултат от GeneXpert® MTB/RIF, последният е силно индикативен за последващо културелно потвърждение на диагнозата, докато негативният резултат е недостатъчен да отхвърли активна туберкулоза. Когато въпреки негативен GeneXpert® MTB/RIF, клиничното подозрение за активна туберкулоза съществува, локалната имунодиагностика може да повиши диагностичната точност [80].

Най-обстойни проучвания при провеждането на съвременни имунологични тестове, основаващи се на освобождаването на гама-интерферон са проведени от Jafari и сътрудници.

Те смятат че, чувствителността на директната микроскопия на храчка или БАЛ за откриване на туберкулозни микобактерии е променлива при пациентите с белодробна туберкулоза и варира от 50 до 80% за три последователни проби. При пациенти с активна туберкулоза, които са отрицателни на директна микроскопия, чувствителността на МТВ-специфична ДНК амплификация на храчка или БАЛ варира от 48 до 80%. По този начин значителна част от пациентите с белодробна туберкулоза остават недиагностицирани с

настоящите лабораторни техники, докато не се получат резултатите от културелното изследване.

Приблизително 95 до 98% от Т-лимфоцитите са ограничени в лимфните органи. При туберкулоза, МТВ-специфичните Т-клетки се разпространяват и локализируют на мястото на инфекцията [52,137]. Следователно при пациенти с белодробна туберкулоза МТВ-специфичните Т-клетки трябва да могат да бъдат открити сред мононуклеарни клетки, получени от БАЛ на засегнатия белодробен сегмент [54,55]. При пациенти със съмнение за туберкулоза и отрицателна микроскопия, бронхоскопията с БАЛ е безопасна процедура, когато се следват насоките и може да се използва за изключване на други заболявания като бронхогенен карцином или саркоидоза [20]. Ето защо, обект на проучвания са пациенти със съмнение за белодробна туберкулоза с отрицателни първоначални микробиологични изследвания (директна микроскопия на храчка), които могат да бъдат открити бързо чрез изброяване на ESAT-6 - и CFP-10 - специфичен IFN-произвеждащи Т-клетки от БАЛ.

При едно от проучванията си, Jafari и колектив получават следните резултати:

От 37 изследвани пациенти, при 12 е установено, че имат белодробна туберкулоза с негативни директни микроскопии и 25 са открити като пациенти с друга диагноза. Пациентите с туберкулоза са имали среден брой от седемнадесет ESAT-6-специфични клетки и 24,5 CFP-10-специфични клетки на 200 000 PBMCs и 37,5 ESAT-6-специфични клетки и 49,5 CFP-10-специфични клетки на 200 000 клетки в БАЛ. Всички пациенти с други диагнози са имали среден брой една ESAT-6-специфична клетка и една CFP-10-специфична клетка на 200 000 PBMCs и без ESAT-6- и CFP-10-специфични клетки на 200 000 клетки в БАЛ течността ($p = 0,0001$). Всички пациенти с туберкулоза, но нито един от контролните пациенти с други диагнози, имат повече от 5 петно-образуващи клетки на 200 000 BALMCs с който и да е протеин (ELISPOT метод) в БАЛ. Авторите правят заключение, че негативната на директна микроскопия белодробна туберкулоза може да бъде диагностицирана бързо чрез идентифициране на МТВ-специфични клетки в БАЛ [79].

Представям резултатите от друго проучване на Jafari и сътр., проведено между март 2005 г. и май 2007 г. в Medical Clinic of the Research Center, Борстел, Германия.

От изследваните 135 пациента със съмнение за туберкулоза, 42 са имали туберкулоза, 10 са с нетуберкулозна микобактериална белодробна инфекция/колонизацията (един от пациентите е едновременно с туберкулоза и нетуберкулозна микобактериална белодробна инфекция), 84 са с друга алтернативна окончателна диагноза. Чувствителността и специфичността са 41% и 99% [съотношение на положителна вероятност (LR +) = 40] за микроскопия на храчка и 31% и 98% (LR + = 16) за БАЛ амплификация на нуклеинова киселина, съответно. При пациенти с туберкулоза с отрицателна директна микроскопия (25 от 42 - 59,5%) се установява, че *M. tuberculosis*-специфична БАЛ течност (IGRA) е 92% чувствителна и 87% специфична (LR + = 7) за диагностициране на туберкулозно заболяване.

Авторите правят извода, че нито един от микробиологичните или имунологичните методи, които имат за цел да осигурят бърза диагностика на туберкулоза, докато изчакват потвърждаването на резултатите от културелното изследване за *M. tuberculosis*, не е сам по себе си достатъчно точен, за да диагностицира или изключи белодробна туберкулоза. Негативната микроскопия на храчка и *M. tuberculosis*-специфични NAAT резултати трябва да подтикнат към осъществяването на бронхоскопия, включително взимане на БАЛ за провеждане на IGRA тест при индивиди със съмнение за белодробна туберкулоза. ELISPOT в БАЛ е положителен в 33/117 (28,2%) случая и отрицателен в 78/117 (66,7%) случая; неопределими резултати са получени при шест (5,1%) пациенти. Двадесет и двама от 24 (91,7%) туберкулозни пациенти са имали положителен резултат от IGRA тест в БАЛ, а 76/87 (87,4%) нетуберкулозни пациенти са имали отрицателен резултат от IGRA тест в БАЛ. Чувствителността и специфичността на теста са съответно 91,7% и 87,4%.

В проучване с ХИВ - инфектирани пациенти, при които се изследва БАЛ с гама-интерферонов тест за диагностика на туберкулоза с отрицателна директна микроскопия се представят следните резултати [46,47]:

Включени са 94 ХИВ - инфектирани пациенти с изследван IGRA тест в периферна кръв и в БАЛ. Изследваната популация е била млада (средна възраст 34 години [IQR 28–40 години]) и е имала напреднал HIV/СПИН (среден брой на CD4 + Т-лимфоцитите 60 клетки/ μ l [IQR 22-200 клетки/ μ l]). Делът на неопределимите резултати от IGRA е по-висок при БАЛ течност, отколкото при периферните кръвни проби (34% срещу

14%, разлика 20%, 95% CI 7–33%, $p = 0,002$). БАЛ IGRA има умерена чувствителност (73%, 95% CI 50-89%), но слаба специфичност (48%, 95% CI 32-64%) за диагностика на туберкулоза. Чувствителността е сходна (75%, 95% CI 57-89%) и специфичността е по-висока (78%, 95% CI 63-88%), когато IGRA е извършена върху периферна кръв.

В резултат на получените резултати, авторите правят следния извод: IGRA тестът в БАЛ се представя незадоволително за диагностициране на отрицателна на микроскопия туберкулоза при коинфекция ХИВ/ТБ. Необходими са по-нататъшни проучвания, за да се установят причините за голямата част от неопределените резултати и ниската специфичност на IGRA в БАЛ за доказване на активната туберкулоза при коинфекция ХИВ/ТБ.

При проведен метаанализ по отношение на точността при използване на IGRA в БАЛ за диагностициране на белодробна туберкулоза [120] се прави извод, че БАЛ ELISPOT може значително да подпомогне диагностицирането на белодробна туберкулоза. Неговата относително висока чувствителност може да го направи подходящ за скрининг за белодробна туберкулоза. Необходими са по-нататъшни проучвания и оптимизация, за да се намали процентът на неубедителните резултати. Въпреки че БАЛ ELISPOT показва по-добра диагностична ефективност от TST и кръвния ELISPOT, той не е достатъчно точен, за да потвърди или изключи белодробна туберкулоза. **Ефективната комбинация от различни тестове остава най-важният елемент за диагностициране на туберкулозното заболяване [165,166].**

Туберкулозата е сред водещите причини за болестност и смъртност в световен мащаб [65]. Заболяването може да засегне всеки един орган в човешкото тяло, като белодробната туберкулоза остава основна форма на болестта [64]. Въпреки постоянното подобряване на диагностиката, бързото уточняване остава трудно в значителна част от случаите [118]. Идентификацията на *Mycobacterium tuberculosis* с културелно изследване остава златния диагностичен стандарт за активна туберкулоза [140]. Това, обаче, отнема повече от две седмици и диагностичната му сензитивност не надхвърля 80% [75].

Микроскопската идентификация на киселинно-устойчиви бактерии е бърз и евтин метод [141], но такива не се намират в храчката на до **85-90% от децата** [109] и в приблизително 50% от възрастните пациенти [52] с активна белодробна туберкулоза. В тези случаи, решението за започване на туберкулозостатична терапия може да бъде трудно,

особено защото чувствителността на техниката на амплификация на нуклеиновите киселини (NAAT) да установи нуклеинови киселини на *M. tuberculosis* от респираторен материал е твърде вариабилна и твърде ниска, за да изключи диагнозата белодробна туберкулоза [137].

При активно туберкулозно заболяване *M. tuberculosis* – специфични лимфоцити се концентрират на мястото на инфекцията [117,143,159]. Сравнението между системния и локалния имунен отговор срещу антигени на *M. tuberculosis* може да бъде полезно за бързото разграничаване на хрчка - негативните на директна микроскопия случаи с активна туберкулоза и тези с латентна туберкулозна инфекция.

В пилотно проучване са отчетени ESAT-6 и CFP-10 отговори чрез ELISPOT на БАЛ - моноклеарни клетки само от пациенти с белодробна туберкулоза с БК отрицателни резултати на директна микроскопия от хрчка. Такъв отговор липсва при пациенти с латентна туберкулозна инфекция, при пациенти с анамнеза за прекарана белодробна туберкулоза без настояща реактивация или при пациенти с белодробни инфилтрати от друг произход [79]. Изброявайки ESAT-6– and CFP-10–специфични БАЛ - моноклеарни клетки, се достига до извода, че пациентите с активна туберкулоза могат да бъдат напълно разграничени от пациентите с белодробни инфилтрати от друг произход. Цитираното проучване, обаче, е моноцентрично и включва ограничен брой пациенти.

Ако резултатите от комбинираните изследвания са негативни, имунодиагностика с IGRA-тест от периферна кръв и кожна туберкулинова проба могат да се използват като отхвърлящи тестове за активна туберкулоза при пациенти с белодробна туберкулоза с БК отрицателни резултати на директна микроскопия от хрчка [62,69,84]. От друга страна, обаче, позитивните IGRA-тест от периферна кръв и туберкулинова проба не могат да разграничат наличието на активна туберкулозна инфекция от тези с латентна инфекция [61,69].

T-клетки, получени от други телесни течности, като бронхоалвеоларен лаваж, плеврални изливи или ликвор са успешно изследвани с T-SPOT.TB тест с цел бърза **локална** идентификация на туберкулозна инфекция и болест [79,81,82,143]. Ако не се използват кръвни проби, е необходимо валидиране на процедури за вземане на достатъчен брой моноклеарни клетки.

6. Имунологични особености на детския организъм

Специфичният клетъчен имунитет се осъществява от Т-лимфоцитите, чието съзряване и специализация се осъществява в тимуса. Около 70% от лимфоцитите в периферната кръв представляват Т-лимфоцити.

Приблизително само около 2% от Т-лимфоцитите се откриват в периферната кръв, докато близо 10% се намират в белите дробове [32]. При активна туберкулоза, Т-клетките на имунната памет се разпространяват клонирано при среща с антигени и се концентрират на мястото на инфекцията [36,38]. Тези МТВ-специфични Т-клетки на паметта произвеждат интерферон (IFN) и други цитокини. Бързото продуциране на IFN след специфично представяне на антиген се осигурява предимно от популацията на ефекторни Т-клетки [73,76], които обикновено имат CD4CD45R0-позитивен, CD27-отрицателен и СС хемокин рецептор 7-отрицателен фенотип и са крайно диференцирани за бърз антиген -специфичен цитотоксичен имуен отговор [87].

При децата обаче, растежът и развитието включва всички органи и системи, включително и имунната. Много от нейните компоненти са функционално активни още от 20-та гестационна седмица, но продължават да се развиват чак до пубертета под влияние на генетичните фактори и тези на околната среда [74,76,171]. Това съзряване протича с различна скорост за отделните подсистеми на имунитета, което обуславя нейните морфофизиологични особености в детска възраст. Едни от тях са:

- Добро развитие на неспецифичната защита и в частност на макрофагеалната система, което обуславя склонността към бурни възпалителни реакции.

- Забавено развитие на клетъчния имунитет, особено по отношение на Т-хелперните лимфоцити. Т-клетките при децата пролиферират по-слабо и имат слаба цитокинова продукция [43,160].

В заключение, в детска възраст от съществено значение е бързото поставяне на диагнозата туберкулоза и своевременното започване на специфично лечение [40]. По литературни данни много малък процент от децата (8-15%), болни от туберкулоза, са директни бацилоотделители, т.е сред детската популация не можем изцяло да разчитаме на културелното изследване за диагностичното уточняване на туберкулозното заболяване [118]. От друга страна в структурата на болестта в детска възраст най-голям относителен

дъл има засягането на вътрегръдните лимфни възли (около 80%). Ето защо, независимо от инвазивния характер на диагностичния метод, **локалната имунодиагностика (имунологичен тест, приложен върху бронхоалвеоларна лаважна течност) е възможно да бъде обещаващ и бърз метод за диагностика на туберкулозно заболяване при суспектно болни деца, които са БК отрицателни на директна микроскопия от храчка или стомашно-промивни води.**

7. Основания за разработване на дисертационния труд

7.1. Затрудненията при поставянето на диагнозата "Туберкулоза" в детска възраст предвид специфичната патогенеза и начина на протичане на заболяването сред педиатричната популация

7.2. Усъвършенстването на имунологичната диагностика на заболяването

III. ЦЕЛ

Да се оцени диагностичната стойност, ефективност, безопасност и приложимост на съвременен имунологичен гама-интерферонов тест за диагностика на туберкуозна инфекция и заболяване (T-SPOT.TB), приложен върху два вида биологични течности – периферна венозна кръв и БАЛ при деца, суспектни за туберкуозно заболяване.

IV. ЗАДАЧИ

1. Да се направи клиничко-епидемиологична характеристика на деца, суспектни за туберкулоза и да се приложат методите за комплексна диагностика на заболяването.

2. Да се проведе фибробронхоскопия с вземане на БАЛ и да се опише алгоритъма на провеждането ѝ в детска възраст.

3. Да се изследва БАЛ микробиологично и цитологично и да се анализират получените резултати.

4. Да се проведе имунологично изследване с гама-интерферонов тест (T-SPOT.TB) в кръв и в БАЛ.

4.1. Да се анализира разпределението на изследваните деца по резултат от приложения T-SPOT.TB тест в кръв и в БАЛ.

4.2. Да се сравнят резултатите от T-SPOT.TB теста в кръв и в БАЛ с аналогични резултати на възрастни пациенти.

4.3. Да се потърси зависимост между получените имунологични резултати и определени характеристики (възраст, диагноза, контакт с туберкуозно болен, проба на Mantoux, BCG белег, цитологичен резултат, локални изменения) на изследваните деца.

4.4. Да се определят показателите чувствителност и специфичност на T-SPOT.TB теста в БАЛ и да се сравнят с тези на кръвния T-SPOT.TB тест.

5. Да се оцени необходимостта от провеждане на локална имунологична диагностика на туберкуозното заболяване в детска възраст.

V. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. Материал

1.1. Дизайн на проучването

Проучването е проспективно. Брой на участниците – 30 (подлежащи на статистическа обработка) + 1 (положителен контролен пациент). Осъществено е след спечелването на Научен проект към МУ - София.

Пациентите са включени в проучването след интервюиране и подписване на писмено информирано съгласие от родител (при малолетните лица) и от дете и родител (при непълнолетните лица). Бронхоскопското изследване е извършено от бронхолог със съответна специалност и опит. Имунологичните изследвания са проведени според препоръките на фирмата - производител на теста в сертифицирана имунологична лаборатория.

Клиничните данни са събирани в рамките на болничния престой. Усложнения и важни детайли са документирани и анализирани.

1.2. Участници в проучването

Деца на възраст от 7 до 17,9 години, хоспитализирани в Детска клиника на МБАЛББ „Св. София” ЕАД, гр. София за периода октомври 2017 - декември 2018 г. Клиниката е единствената в страната за диагностика и лечение на детска туберкулоза. Пациентите подлежат на диагностика и евентуално лечение на туберкулозно заболяване. Всички подбрани пациенти са със съмнение за туберкулозна инфекция/болест. В изследването се включиха деца с риск от инфекция (контактни на БК положителни възрастни), деца с ЛТБИ или със съмнение за активна туберкулоза. В проучването са включени само болни, при които се предвижда провеждане на бронхоскопско изследване.

Критерии за включване:

- наличие на съмнение за туберкулозно заболяване и отрицателен БК резултат от микроскопия на микробиологичен материал (храчка или стомашно-примивни води)
- възраст между 7 и 17,9 години
- подписано информирано съгласие

Критерии за изключване:

- противопоказания (абсолютни и относителни) за провеждане на бронхоскопско изследване
- отказ от участие в проучването

Участниците имаха право да се откажат от проучването му на всеки негов етап.

Контролен пациент - положителна контрола

В изследването се включи и 13-годишно момче, при което се установи значително бацилоотделяне (3+) още от първата директна микроскопия на храчка, впоследствие диагнозата бе потвърдена и с културелно изследване. В резултат на проведените образни изследвания (пулмография, КАТ) при пациента се установи Инфилтративно-пневмонична форма на туберкулоза с кухинна сянка в десен долен белодробен дял (6-ти сегмент) с размери около 3 см в диаметър и плътна стена.

Независимо от това, че детето е бацилоотделител с потвърдена диагноза, то се включи в проучването и при него също бе проведен T-SPOT.TB тест в кръв и в БАЛ с оглед на осъществяване на качествена и количествена оценка на резултатите от имунологичния тест в двата вида биологични течности при доказано болен пациент.

Получените при това дете резултати са изключени от статистическата обработка (като бацилоотделител то не отговаря на критериите за включване), а имат само сравнителна стойност.

2. Методи

2.1. Анамнеза

За скриниране на пациентите според критериите за включване и изключване се проведе медицинско интервю с родителите и детето със снемане на подробна анамнеза относно епидемиологичните данни, клиничните оплаквания, имунизационния статус на детето, битовите условия на живот, проведените до момента целенасочени изследвания и получените резултати. Цялата събрана информация бе надлежно отразена в "Историята на заболяването" на детето.

2.2. Физикален преглед и провеждане на стандартни изследвания

На участниците в проучването бе снет пълен физикален преглед, след което се проведе лабораторни и образни изследвания, предхождащи осъществяването на бронхоскопското изследване.

На всички деца, включени в проучването се взе кръв за изследване на пълна кръвна картина с диференциално броене и утайка, биохимични изследвания (ASAT, ALAT, GGTP, урея креатинин); обикновена урина; проведе се трикратно изследване на стомашно-промивни води (храчка) за БК на директна микроскопия и на посевка. На всички пациенти се проведе обзорна рентгенография на гръден кош (фасова и профилна при необходимост), на част от тях - КАТ на гръден кош. На всички деца, които нямаха направена туберкулинова проба на Mantoux в рамките на месец преди хоспитализацията се проведе такава с 5 ТЕ PPD, като беше отчитана на 24-ти, 48-ми, 72-ри час, 5-ти и 7-ми ден количествено и качествено.

2.3. Взимане на биологични материали - венозна кръв и БАЛ за провеждане на T-SPOT.TB тест

На всички, включени в проучването деца, се взе периферна венозна кръв (от 4 до 8 мл) за имунологично изследване от квалифициран медицински персонал, която се

съхрани, транспортира и обработи спрямо изискванията на производителя на T-SPOT.TB (OxfordImmunotec Ltd., Abingdon, UK).

Според достъпна ни научна литература съществуват различаващи методики за взимането на бронхоалвеоларна лаважна течност в детска възраст, но липсва приет единен консенсус [114].

В настоящото проучване се предлага следния модел на работа:

Всички деца, участвали в изследването, са премедикараха с Midazolam 0,5 mg/kg p.os, поради необходимостта от поставяне на периферен венозен източник. При част от децата се приложи локална, при останалите - обща анестезия. При прилагане на локална анестезия, се използва премедикация с Atropin 0,01 mg/kg i.v. и впръскване на Lidocaine 2% локално. При прилагане на обща анестезия, след непосредствената премедикация с Atropin 0,01 mg/kg i.v. и Fentanyl 2 mcg/kg i.v., се направи увод в анестезията с Propofol 3-6 mg/kg i.v., при титриране на дозата, след което се постави супраглотично устройство тип "i-gel" за поддържане на дихателните пътища. Процедурата се осъществи в условията на краткотрайна венозна анестезия и обдишване с вентилатор на Sanders през ларингеална маска. При мониториране на жизнени показатели - сърдечна честота, ЕКГ, пулсоксиметрия се осъществи бронхологично изследване с флексибилен бронхоскоп (на фирми OLYMPUS, PENTAX, FUJINON) с външен диаметър 4,4-4,9 мм и работен канал от 2,0 до 2,2 мм. Достъпът бе назотрахеален (при локална анестезия, като кислород се подава през кислородна маска или назален катетър) или оротрахеален (при обща анестезия). С фибробронхоскопът се прави цялостен оглед на трахеобронхиалното дърво. След оценка на локалния ендоскопски статус, съобразно физикална находка и/или рентгеноморфологичните изменения, се осъществиха диагностичните процедури - БАЛ и/или фиброщипкова биопсия. БАЛ се осъществи по приет от повечето ендоскописти метод за взимане на материал от среден дял или съответно от лингулата (в зависимост от локализацията на измененията). Въведе се, по сегментно, по 20 мл в сегментен бронх, предварително затоплен до 37°C физиологичен разтвор. Инсталирането се осъществи бавно, под мануален контрол. Максималното количество въведен физиологичен разтвор бе 80 мл - средно 60 мл. Впоследствие се реаспирира около 60% от въведеното количество физиологичен разтвор. Аспирирането се осъществи плавно веднага след въвеждането.

Полученият аспират се съхрани, транспортира и обработи спрямо изискванията на производителя на T-SPOT.TB теста (OxfordImmunotec Ltd., Abingdon, UK).

След провеждането на бронхологичното изследване, пациентите бяха под активно наблюдение в Детска клиника.

Освен за имунологична диагностика, БАЛ се изследва:

- за БК на директна микроскопия
- на посевка на твърда и течна хранителна среда
- хистологично

2.4. T-SPOT.TB тест

Имунологичното изследване на взетите биологични материали се осъществи в "Клиника по клинична имунология с банка за стволови клетки", болница "Александровска".

T-SPOT.TB тестът е *in vitro* диагностичен тест за откриване на ефекторни Т-клетки, отговарящи на стимулация с антигени на *M. tuberculosis* и е предназначен за употреба като помощно средство в диагностициране на туберкуозна инфекция. T-SPOT.TB тестът е опростен ензимносвързан имуноспот (ELISPOT) метод, който определя броя на специфичните активирани ефекторни Т-клетки [119].

Принципи на методиката

Мононуклеарните клетки в периферната кръв (PBMCs) се отделят от пробата с цялата кръв, измиват се, с оглед да бъдат отстранени източниците на възможни грешки. След това мононуклеарните клетки се изброяват с цел да се използва стандартизиран брой клетки. Това гарантира, че дори при тези пациенти, които имат нисък брой Т-клетки, дължащ се на отслабена имунна система (имунокомпрометирани и имуносупресирани), в пробата ще е достатъчен брой клетки, добавени към ямките. Етапите на измиване и преброяване, както и ELISPOT метода предоставят отлична възпроизводителност при откриването на туберкуозно заболяване и латентна туберкуозна инфекция. Четири ямки са задължителни за изработването на една проба:

1. Нулева контрола за определяне на неспецифично клетъчно активиране.
2. TB-специфични антигени, Панел А (ESAT-6).

3. ТВ-специфични антигени, Панел В (CFP10).

4. Положителна контрола, съдържаща фитохемаглутинин (РНА, известен оликлонал активатор 12), с оглед да бъде потвърдена функционалността на периферните моноклеарни клетки.

Моноклеарните клетки от периферна кръв се инкубират с антигените, за да се позволи стимулацията на всички налични чувствителни Т-клетки. Секретираният цитокин се улавя от специфични антитела върху мембраната, която формира основата на ямката, като клетките и други нежелани материали се отстраняват чрез измиване. Второ антитяло, конюгирано с алкална фосфатаза и насочено към различен епитоп на цитокиновата молекула, се добавя и се свързва с цитокина, захванат към мембранната повърхност. Останалият несвързан конюгат се отстранява чрез измиване. Добавя се разтворим субстрат към всяка ямка, който ензимно разкъсва връзките на свързания конюгат, за да формира „спот“ от неразтворима утайка на мястото на реакция. Всеки „спот“ представлява отпечатък на една индивидуална цитокин-секретираща Т-клетка и оценката на броя на получените „спотове“ предоставя измерване на наличието на чувствителни към *M. tuberculosis* ефекторни Т-клетки в периферната кръв.

Значително предимство на IGRA тестовете пред TST е обстоятелството, че в тях са включени отрицателна и положителна контрола. Отрицателната контрола показва нивото на неспецифична имунна реактивност, а положителната контрола, в която се измерва отговорът на Т-клетките към поликлонален митоген Фитохемаглутинин, показва функционалната активност на Т-лимфоцитите. При липсващ митогенен отговор, резултатът от теста е „неопределен“, но дава съществена информация за състоянието на имунната система, особено при имунокомпрометирани пациенти. За разлика от TST, IGRA тестовете могат да разграничат истински отрицателните резултати от анергичните [101].

В настоящото проучване БАЛ бе взет, съхранен и обработен спрямо Методическо указание за изследване на бронхоалвеоларна течност с T-SPOT.TB тест (Oxford Immunotec, Великобритания). Представеният протокол за БАЛ е разработен от Мартин Ернст, Forschungszentrum Borstel, Германия.

Първоначално се осъществява подготовка на пробата от БАЛ за извършването на T-SPOT.TB тест:

- Обемът на пробите от БАЛ варира от 20 ml до 200 ml. Течността от БАЛ се взима в контейнер със силиконизирано стъкло. Обемът на пробата трябва да бъде колкото е възможно по-голям. Пробите се съхраняват при стайна температура или при 2-8 °С, като не се замразяват [122].

- Течността от БАЛ може да се филтрира чрез подходящ филтър, поради наличието на слузни материи [132,133]. Може да се използва BD Falcon™ 100 µm клетъчен филтър за еднократна употреба (кат. номер 352360). Като алтернатива, може да се използва и автоклавно неръждаем филтър с размер на отворите 0.2 мм, използван за филтриране на чай. Той трябва да бъде увит в алуминиево фолио, когато е в автоклав.

- Филтрираният БАЛ се поставя в 50 ml полипропиленови центрофужни епруветки (напр. Nunc).

- Епруветките се центрофугират при 465 g в продължение на 15 минути при 8°C, след което супернатантата се отстранява.

Получената утайка може да е черна поради цигарения дим, който се абсорбира от макрофагите.

БАЛ съдържа по-висока концентрация на макрофаги в сравнение с Т-лимфоцитите, отколкото в кръвта [100,125,131]. Това е важно за по-късното разреждане на клетъчната суспензия [153,154].

Супернатантата се отстранява с пипета, вместо да се отдекантира, тъй като утайката от БАЛ може да не е стабилна и може да бъде изхвърлена със супернатанта.

- Ако утайката е явно "замърсена" с еритроцити, се прави опит да бъдат премахнати, като се извършва кратко хипотонично шоково третиране чрез повторно суспендиране на утайката в 2 ml стерилна, филтрирана дестилирана вода и последващо инкубиране за 50-60 секунди, след което се възстановява осмолалитета, като се добавя 2 ml двукратно концентриран PBS (фосфатен физиологичен разтвор). След това клетъчната суспензия се разрежда с нормален PBS или с културелна среда и след това суспензията отново се центрофугира (465 g в продължение на 15 минути при 8°C).

Клетките не трябва да се оставят повече от 50 - 60 секунди в дестилирана вода. Червените кръвни клетки ще бъдат унищожени през това време. По-дългата инкубация ще унищожи някои от белите кръвни клетки.

Резултатите могат да бъдат подобрили чрез добавяне на 2 ml фетален телешки серум към епруветката преди поставянето на клетъчната суспензия. Това може да адсорбира примесите в пробата. След центрофугиране полиморфнонуклеарните клетки (PVMC) са на слой под FCS. След това слой FCS може да бъде отстранен с пипета.

Утайката се ресуспендира в 0.7 ml от културелната среда AIM V и се започва T-SPOT.TB теста.

Клетките се преброяват като се използва хемоцитометър на Neubauer, за да се избегнат грешки в измерването, дължащи се на прекомерния брой макрофаги. Освен това, при добавяне на клетъчната суспензия, тя се поставя в центъра на ямката за подпомагане равномерното разпределение на клетките.

Необходими са 200 000 клетки на ямка, поради прекомерния брой макрофаги, които могат да блокират стеарично антители в ямката. При силно мътна проба от БАЛ, пробата може да наложи да се разрежи до 100 000 клетки / ямка.

Ако клетъчната суспензия изглежда тъмна, препоръчително е ямките да се измият от 6 до 8 пъти с PBS с последваща инкубация през нощта.

Този тест бе извършван според принципите за Добрата Лабораторна Практика и при стриктно спазване на инструкциите за употреба. Бяха използвани Визуален Наръчник на методиката и Технически Справочник, които описват събирането и подготовката на пробите, избора на средите за клетъчни култури и методите за броене на „спотове“. Те са изготвени от фирмата-производител на теста.

3. Събиране и обработка на информацията, статистическа обработка на резултатите

Клиничните данни бяха събирани в рамките на болничния престой.

Документирани са данните от анамнезата, физикалния статус и проведените изследвания (лабораторни, образни, бронхоскопски, имунологични).

Получените резултати бяха статистически обработени и нагледно представени.

Резултатите са анализирани за един конкретен случай и за групата като цяло.

В научната литература липсват публикации по проблема в детска възраст. Потенциално възможно е сравняване на статистически обработените резултати с тези на историческа контролна група (от възрастни участници) и последващото им анализиране.

Използвани статистически методи:

1. Дескриптивна статистика

- средна аритметична, медиана (Mean, Median) – мерки за оценка на централната тенденция;
- стандартно отклонение (SD) – мярка за оценка на разсейването;
- честотни таблици - абсолютни честоти (N) – броя на единиците в отделно взета група; относителни честоти (%) – броят на единиците в отделно взета група отнесен към общия брой единици в съвкупността;

2. Хи-квадрат тест (Chi-square test) или точен тест на Фишер (Fisher's exact test) – при изследване на зависимости между описателни (категорийни) данни с две или повече категории.

3. Знаково-рангов тест на Уилкоксон (Wilcoxon Signed Ranks Test) - при сравняване на две зависими групи – използва се при рангови данни или когато формата на честотното разпределение е различна от формата на нормалното разпределение.

Приетото критично ниво на значимост е $\alpha=0,05$. Съответната нулева хипотеза се отхвърля, когато р стойността (p-value) е по-малка от α . За обработка на данните от проучването е използван специализирания статистически пакет SPSS версия 13.0.

Чувствителност и специфичност – статистически мерки за изпълнението на двоичен тест на класиране.

Чувствителност - измерва реалните позитивни идентифицирани като такива (процента на болните, правилно идентифицирани като болни).

Специфичност - реалните негативни правилно идентифицирани като такива (процента на здравите, правилно идентифицирани като такива).

VI. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Клинико-епидемиологична характеристика на деца, суспектни за туберкулозно заболяване, прилагане на методи за комплексна диагностика на заболяването

В настоящото проучване бяха включени деца със съмнение за туберкулозно заболяване, чиито първи микробиологични изследвания (директна микроскопия на храчка или стомашно промивни води) са с отрицателен резултат.

Отделно от групата бе представен един пациент с микробиологично (директна микроскопия, културелно изследване) потвърдена диагноза - Инфилтративно-пневмонична форма на туберкулоза. При него се позитивира и кръвния, и лаважния T-SPOT.TB в много висока степен - кръвен имунологичен тест - панел А - 32, панел В - 54, лаважен имунологичен тест - панел А - 151, панел В - 160. Лаважната течност при него бе взета от десен долен белодробен дял (основно S6), тъй като каверната е разположена в 6-ти сегмент вдясно. Позитивният лаважен тест с голям брой спотове в двата панела е резултат именно на локалното взимане на БАЛ от мястото в белия дроб с големи морфологични изменения. Резултатите при това дете съвпадат с тези при възрастните пациенти - той е болен от вторична форма на туберкулоза (на 8-годишна възраст е боледувал от Първичен туберкулозен комплекс, като не е провел пълния курс на лечение) със значителни рентгено-морфологични изменения в белия дроб. Протичането на заболяването му е сходно с това на възрастните, имунологичните резултати - също.

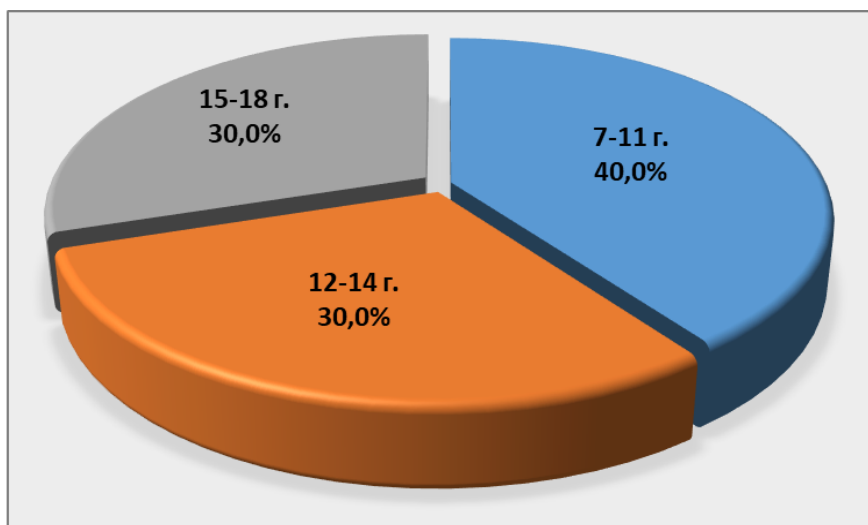
1.1. Разпределение на изследваните деца по възраст

Включените в изследването деца са на средна възраст $12,74 \pm 2,80$ години (диапазон от 7 до 17,9 години), (табл. 2).

Табл. 2. Средна възраст на изследваните деца

	N	Mean	Median	SD	Min	Max
Възраст	30	12,74	11,78	2,80	7,42	17,66

Според педиатричната класификация децата от 7 до 11 години са в ранна училищна възраст, от 12 до 14 години - в средна училищна възраст, а от 15 до 18 години - в юношеска възраст.

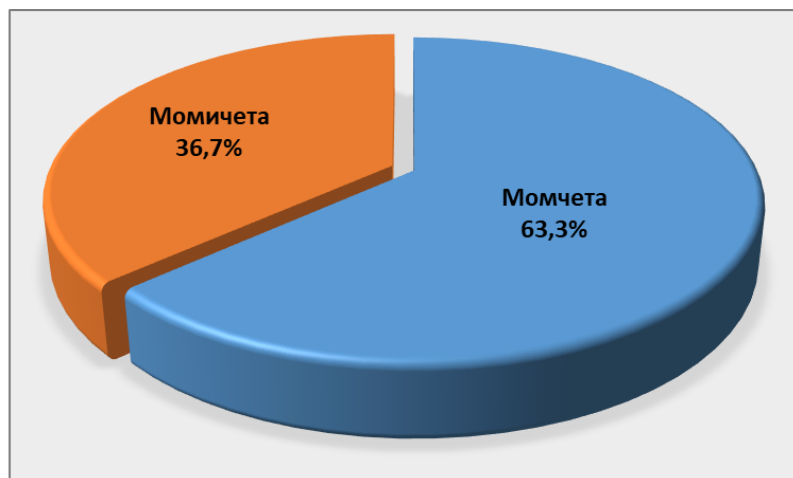


Фиг. 9. Разпределение на изследваните деца по възрастови групи

Средната възраст на изследваните деца е $12,74 \pm 2,80$ години - пред- и пубертетна възраст, която предвид хормоналната нестабилност е изключително благоприятна за изявата на туберкулозното заболяване. Разпределението в трите описани възрастови групи е несигнификантно - почти по равен дял деца във всяка една от тях - 40% са във възрастова група 7-11 г., 30% - във възрастова група 12-14 г., 30% - във възрастова група - 15-18 г. (фиг. 9).

1.2. Разпределение на изследваните деца по пол

При разпределение на всички изследвани деца по полов признак се наблюдава превес на момчетата - 63,3% ($n=19$), спрямо момичетата - 36,7% ($n=11$), (фиг. 10).

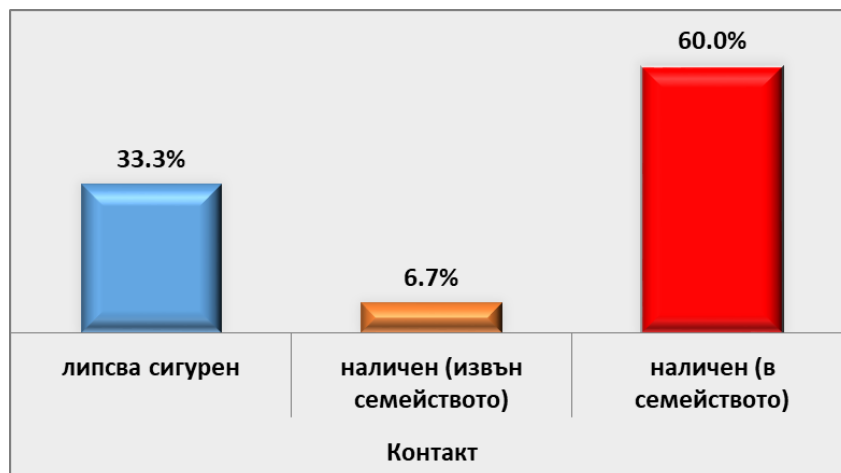


Фиг. 10. Разпределение на изследваните деца по пол

При разпределението по пол със съществен превес е мъжкият пол, което съвпада и с българските, и със световните литературни данни - мъжкият пол е засегнат 2 пъти по-често от туберкулозното заболяване [24,167].

1.3. Разпределение на изследваните деца по наличие на контакт с туберкулозно болен

Анамнестични данни за наличен сигурен контакт с друг туберкулозно болен пациент има при голяма част от изследваните деца - 66,7% (n=20), като значително преобладават децата с наличен тесен, битов и ежедневен контакт с туберкулозно болен в семейството, живеещ в един дом със съответното дете - 60% (n=18). При 33,3% (n=10) от изследваните деца липсват сигурни данни за контакт, което не отхвърля, разбира се, възможността за съществуването му (фиг. 11).



Фиг. 11. Разпределение на изследваните деца по наличен контакт с ТБ болен

Получените резултати са в подкрепа на литературните данни, посочващи, че инфектирането на деца с туберкулоза се осъществява обичайно в техните семейства, т.е. има бацилоотделител в близкото обкръжение на детето [66]. Контагиозният индекс на туберкулозата, сравнен със същия показател на други въздушно-капкови инфекциозни заболявания, е нисък - около 20 %, което показва, че инфектирането на пациенти чрез спорадичен контакт е относително рядко [168]. При диагностицирано болно дете от изключителна важност е откриването на източника на инфекцията (обичайно член от семейството) и неговото обезбацилиране, защото след началния етап на лечение на детето в Детска клиника, то се връща в семейството си за провеждане на продължителния етап на противотуберкулозното лечение и е необходимо да се предотврати евентуално реинфектиране.

1.4. Разпределение на изследваните деца по наличие на BCG белег

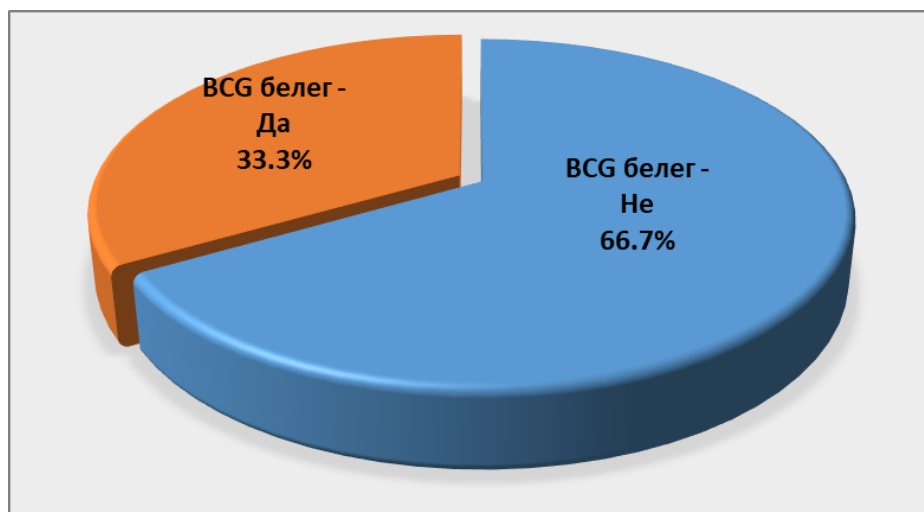
Наличието на BCG белег на лявото рамо на детето е сигурно доказателство за приложението на противотуберкулозна ваксина (ваксинация и/или реваксинация). Липсата на този белег се интерпретира по един от следните начини:

- Липса на специфична ваксинапрофилактика

- Приложена ваксина, но не според строгите изисквания на разтваряне и апликация, в резултат на което липсва сформирани имунитет

- Приложена ваксина, наличие на сформирани имунитет, но липса на кожен белег при детето, поради индивидуални особености в реактивността му.

Все пак е важно да се отбележи, че при 2/3 от децата - 66,7% (n=20) липсва белег, удостоверяващ налична специфична ваксинапрофилактика (фиг. 12).



Фиг. 12. Разпределение на изследваните деца по наличие на BCG белег

Редица държави в Европа и света не прилагат специфична противотуберкулозна ваксина или ваксинират само определени рискови групи. По този начин се повишава значително диагностичната стойност на туберкулиновата проба на Mantoux (с нея е трудно да се различи ваксинална от вирулентна чувствителност). В тези държави се разчита изключително на добрия контрол на импортната инфекция и в тях и заболяемостта от туберкулоза остава ниска [148]. За съжаление, през последните години, свободното движение на големи маси от хора (вкл. мигрантски вълни), идващи от държави с висока заболяемост оказва една неблагоприятна тенденция.

Важно е да се отбележи, че противотуберкулозната ваксина не осигурява траен пожизнен имунитет (5-7 години ефективност за българската BCG ваксина), но осигурява протекция на организма от тежките хематогенно-дисеминирани форми на заболяването, вкл. Туберкулозния менингоенцефалит, която остава най-сериозната форма на

туберкулозно заболяване със съмнителен изход по отношение на преживяемост и интактен неврологичен и интелектуален статус [5].

1.5. Разпределение на изследваните деца по резултат от приложена туберкулинова проба на Mantoux

На фиг. 13 е представена честотата на отчетените отрицателни, нормергични и хиперергични туберкулинови проби. При 60% (n=18) от изследваните деца на 72-ри час след приложението на туберкулин се измерва напречен размер на сформирания инфилтрат 15 или повече мм. При 26,7% (n=8) от децата TST е отчетен като нормергичен (между 6 и 14 мм) и при 13,3% (n=4) от децата TST е отрицателен (\leq на 5 мм) (фиг. 13).



Фиг. 13. Разпределение на изследваните деца по резултат от туберкулинова проба на Mantoux

В направеното проучване при повече от половината изследвани деца на 72-ри час след приложението на туберкулинова проба на Mantoux се измерва напречен размер на сформирания инфилтрат 15 или повече мм. Отчетен по този начин TST се интерпретира като хиперергичен и това е критерий за поставяне на диагноза ЛТБИ [23]. Ако се установят и морфологични изменения, тогава се диагностицира активно туберкулозно

заболяване. Сам по себе си TST е с чувствителност 70% и специфичност около 56% при ваксинирани с противотуберкулозна ваксина деца [66]. Поради неговата ниска цена и лесна приложимост в България продължава да бъде първи скриниращ имунологичен тест за верифициране на туберкулозна инфекция. Значително се повишава диагностичната му стойност, използван заедно със съвременните имунологични методи, основаващи се на отделянето на гама-интерферон [135].

Търсейки връзка между приложена специфична имунопрофилактика (противотуберкулозна ваксина) и отчетената туберкулинова чувствителност се установи следното:

При всички деца с отрицателна туберкулинова проба на Mantoux (n=4) липсва BCG белег, при повече от половината деца (55,6%) с хиперергична туберкулинова проба също липсва белег от BCG ваксина, но при сходен процент (44,4%) от хиперергичните деца BCG белегът е наличен т.е. в конкретния случай не се отчита статистическа значимост (p=0,221), (табл. 3).

Табл. 3. Разпределение на изследваните деца спрямо резултата от туберкулинова проба на Mantoux и наличието на BCG белег

BCG белег		Туберкулинова проба на Mantoux			Общо	P
		Отрицателна	Нормергична	Хиперергична		
Не	N	4	6	10	20	0,221
	%	100,0%	75,0%	55,6%	66,7%	
Да	N	0	2	8	10	
	%	0,0%	25,0%	44,4%	33,3%	
Общо	N	4	8	18	30	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

Бе потърсена зависимост и между отчетения резултат от туберкулиновата проба на Mantoux и поставената диагноза при съответното дете.

Повече от половината от хиперергичните деца (55,6%) са с най-честата форма на туберкулоза сред децата - Туберкулозен бронхаденит, две от децата с хиперергичен TST са с Инфилтративно-пневмонична форма и 27,8% от децата с хиперергична туберкулинова проба на Mantoux са с диагноза ЛТБИ.

Прави впечатление, че и двете деца с Туберкулозен плеврит, детето с Първичен туберкулозен комплекс, както и едно от децата с Инфилтративно-пневмонична форма на туберкулоза имат нормергична туберкулинова чувствителност.

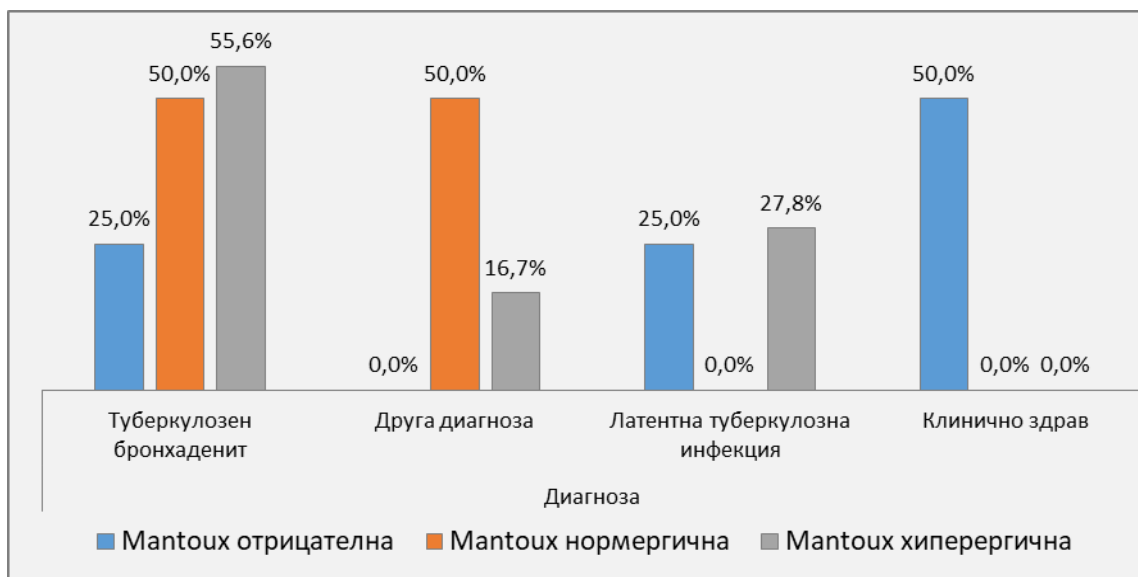
Всички клинично здрави деца имат TST, измерен 5 или под 5 мм ($p=0,019$), (табл. 4, табл. 5), (фиг. 14).

Табл. 4. Разпределение на изследваните деца спрямо резултата от туберкулинова проба на Mantoux и поставената диагноза

Диагноза		Туберкулинова проба на Mantoux			Общо
		Отрицателна	Нормергична	Хиперергична	
Туберкулозен бронхаденит	N	1	4	10	15
	%	25,0%	50,0%	55,6%	50,0%
Инфилтративно-пневмонична туберкулоза	N	0	1	2	3
	%	0,0%	12,5%	11,1%	10,0%
Първичен туберкулозен комплекс	N	0	1	0	1
	%	0,0%	12,5%	0,0%	3,3%
Туберкулозен плеврит	N	0	2	0	2
	%	0,0%	25,0%	0,0%	6,7%
Латентна туберкулозна инфекция	N	1	0	5	6
	%	25,0%	0,0%	27,8%	20,0%
Ендобронхиална туберкулоза	N	0	0	1	1
	%	0,0%	0,0%	5,6%	3,3%
Клинично здрав	N	2	0	0	2
	%	50,0%	0,0%	0,0%	6,7%
Общо	N	4	8	18	30
	%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Табл. 5. Разпределение на изследваните деца спрямо резултата от туберкулинова проба на Mantoux и поставената диагноза (Fisher's Exact Test)

Диагноза		Туберкулинова проба на Mantoux			Общо	P
		Отрицателна	Нормергична	Хиперергична		
Туберкулозен бронхаденит	N	1	4	10	15	0,019
	%	25,0%	50,0%	55,6%	50,0%	
Друга диагноза	N	0	4	3	7	
	%	0,0%	50,0%	16,7%	23,3%	
Латентна туберкулозна инфекция	N	1	0	5	6	
	%	25,0%	0,0%	27,8%	20,0%	
Клинично здрав	N	2	0	0	2	
	%	50,0%	0,0%	0,0%	6,7%	
Общо	N	4	8	18	30	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	



Фиг. 14. Разпределение на изследваните деца спрямо резултата от туберкулинова проба на Mantoux и поставената диагноза

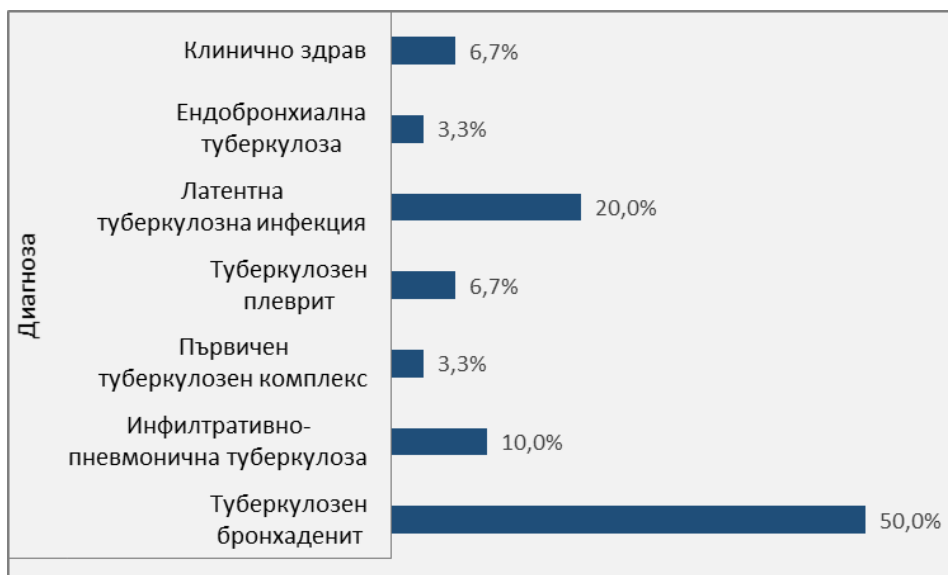
През 1978 г. П. Минчев и сътрудници установяват, че хиперергията, установена с туберкулинова проба на Mantoux (проведена с 5 ТЕ PPD) е белег за инфектиране на организма с *M. tuberculosis* [23]. При болни от туберкулоза деца, TST може да бъде

хиперергичен (15 и повече мм), но при умерена или тежка имуносупресия може да бъде отчетен съответно като нормергичен (между 6 и 14 мм) или анергичен (5 и под 5 мм).

Според редица публикации [91] туберкулиновата проба на Mantoux има редица недостатъци, особено при имунизирани с противотуберкулозна ваксина деца, но остава лесен, бърз и евтин скриниращ тест за туберкулозна инфекция/болест.

1.6. Разпределение на изследваните деца по диагноза

Петдесет процента (n=15) от изследваните деца са диагностицирани с най-често срещаната форма на туберкулоза в детска възраст сред имунизираните деца - Туберкулоза на вътрегръдните лимфни възли или т.н. Туберкулозен бронхаденит. Инфилтративно-пневмоничната форма на туберкулоза е представена при 10% (n=3) от децата. Прави впечатление, че тази форма на вторична туберкулоза (характерна за възрастните пациенти) изпреварва по честота Първичния туберкулозен комплекс - 3,3% (n=1) - класическа форма на първична туберкулоза (характерна за децата) дори и в рамките на това малко проучване. Туберкулозният плеврит е представен при 6,7% (n=2) от децата, а Ендобронхиална туберкулоза се диагностицира при 3,3% (n=1) от децата. При 20% (n=6) от децата се диагностицира ЛТБИ, а 6,7% (n=2) от изследваните деца са клинично здрави (фиг. 15).



Фиг. 15. Разпределение на изследваните деца по диагноза

Тази промяна в разпределението на различните форми на заболяването (все по-често регистриране на вторични форми на туберкулоза сред децата) е резултат от късно поставена диагноза, от неефективно и недостатъчно лекуване на първична туберкулоза [5].

Анализира се и разпределението на децата в различните възрастови групи по съответно поставената диагноза, като най-важните резултати са както следва:

Почти половината от децата във всяка една от трите изследвани възрастови групи са с диагноза Туберкулозен бронхаденит, всички деца (n=3) с една от тежко протичащите форми на заболяването - Инфилтративно-пневмонична туберкулоза са във възрастовата група - 15-18 г. - най-близка до тази на възрастните.

Във възрастовата група 7-11 г. - ранна училищна възраст или т.н. предпубертетна възраст 41,7% от децата са с установена ЛТБИ (p=0,069), (табл. 6, табл. 7).

Табл. 6. Разпределение на изследваните деца в различните възрастови групи по поставена диагноза

Диагноза		Възрастова група			Общо
		7-11 г.	12-14 г.	15-18 г.	
Туберкулозен бронхаденит	N	6	5	4	15
	%	50,0%	55,6%	44,4%	50,0%
Инфилтративно-пневмонична туберкулоза	N	0	0	3	3
	%	0,0%	0,0%	33,3%	10,0%
Първичен туберкулозен комплекс	N	0	1	0	1
	%	0,0%	11,1%	0,0%	3,3%
Туберкулозен плеврит	N	0	1	1	2
	%	0,0%	11,1%	11,1%	6,7%
Латентна туберкулозна инфекция	N	5	0	1	6
	%	41,7%	0,0%	11,1%	20,0%
Ендобронхиална туберкулоза	N	1	0	0	1
	%	8,3%	0,0%	0,0%	3,3%
Клинично здрав	N	0	2	0	2
	%	0,0%	22,2%	0,0%	6,7%
Общо	N	12	9	9	30
	%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Табл.7. Разпределение на изследваните деца в различните възрастови групи по поставена диагноза (Fisher's Exact Test)

Диагноза		Възрастова група			Общо	Р
		7-11 г.	12-14 г.	15-18 г.		
Туберкулозен бронхаденит	N	6	5	4	15	0,069
	%	50,0%	55,6%	44,4%	50,0%	
Друга диагноза	N	1	2	4	7	
	%	8,3%	22,2%	44,4%	23,3%	
Латентна туберкулозна инфекция	N	5	0	1	6	
	%	41,7%	0,0%	11,1%	20,0%	
Клинично здрав	N	0	2	0	2	
	%	0,0%	22,2%	0,0%	6,7%	
Общо	N	12	9	9	30	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

В настоящото проучване се установява, че почти половината от децата във всяка една от трите изследвани възрастови групи са с диагноза Туберкулозен бронхаденит, а всички деца (n=3) с една от тежко протичащите форми на заболяването - Инфилтративно-пневмонична туберкулоза са във възрастовата група - 15-18 г. - най-близка до тази на възрастните, за които именно са характерни вторичните форми на туберкулоза. Във възрастовата група 7-11 г. - ранна училищна възраст или т.н. предпубертетна възраст 41,7% от децата са с установена ЛТБИ, т.е. необходимо е стриктно проверяване на състоянието на инфектираност (чрез TST или IGRA - тест) с оглед предотвратяване на развитието на активно туберкулозно заболяване [163].

1.7. Разпределение на изследваните деца по налични рентгеноморфологични изменения

Разпределението на децата по установените рентгеноморфологични изменения (при част от децата потвърдени и с КАТ) съответства на разпределението им по диагнози.

Петдесет процента от изследваните деца (n=15) имат образни данни за грануломатозно уголемени вътрегръдни лимфни възли, което подкрепя диагнозата Туберкулозен бронхаденит.

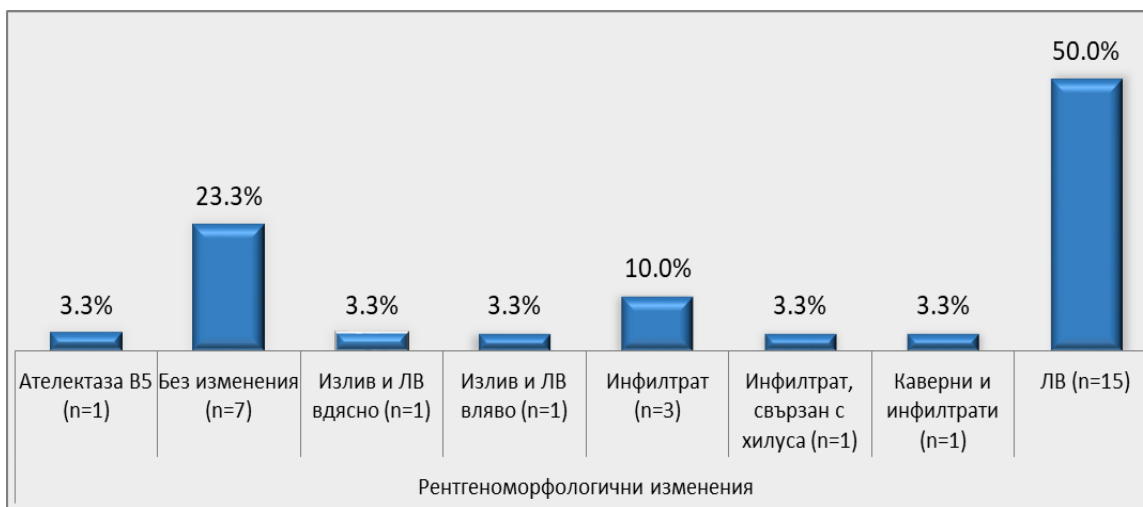
При 23,3% (n=7) не се установяват рентгеноморфологични изменения - това са децата, които са клинично здрави (n=2) и 5 от децата с ЛТБИ (при 6-тото дете с ЛТБИ се установи инфилтрат в средно дясно белодробно поле, впоследствие се диагностицира белодробна ехинококоза).

При 10% +3,3% (n=3+1) от изследваните деца има образни данни за белодробни инфилтрати и инфилтрат с каверна - тези изменения съответстват на 3-те деца, диагностицирани с Инфилтративно-пневмонична форма на туберкулоза и на 1 дете с белодробна ехинококоза.

При 6,6% (n=2) от децата имат рентгенологични данни за плеврален излив и уголемени вътрегрудни лимфни възли - те са с поставена диагноза Туберкулозен плеврит.

При едно дете на направената обзорна рентгенография има данни за първичен афект, лимфангит и лимфаденит - при него диагнозата е Първичен туберкулозен комплекс на белия дроб.

При едно дете има образни данни за ателектаза (5-ти сегмент вдясно). След проведените допълнителни изследвания при него се постави диагнозата Ендобронхиална туберкулоза (фиг. 16).

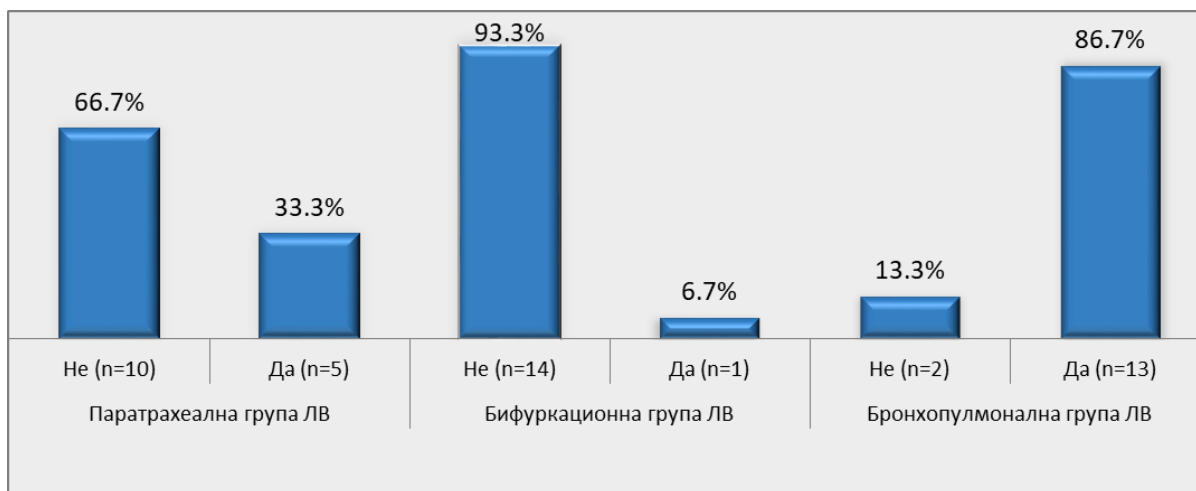


Фиг. 16. Разпределение на изследваните деца по наличие на рентгеноморфологични изменения

Рентгеноморфологичните изменения са силно насочващи и с висока диагностична стойност при туберкулозно болни деца [68]. Измененията съответстват на различните форми на туберкулозното заболяване.

1.8. Честотата на засягане на отделните групи лимфни възли при децата с диагноза Туберкулозен бронхаденит

При най-голям процент - 86,7% (n=13) от изследваните деца се установява засягане на бронхопулмонална група лимфни възли - самостоятелно или в съчетание с други групи вътрегръдни лимфни възли (паратрахеални и/или бифуркационна група), (фиг. 17).



Фиг. 17. Честота на засягане на отделните групи лимфни възли

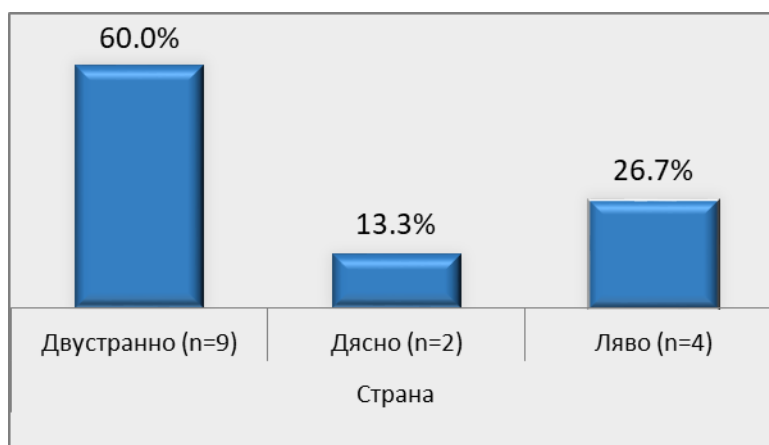
С методите на образната диагностика се установява, че при децата с Туберкулозен бронхаденит най-често е засегната бронхопулмоналната група лимфни възли, факт, който благоприятства локалната имунологична диагностика (провеждане на гама-интерферонов тест в БАЛ).

В публикациите на Jafari и сътр. се описват възрастни пациенти с активна белодробна туберкулоза (в общоприетата класификация Туберкулозният бронхаденит принадлежи към извънбелодробните форми на туберкулоза). Именно на тях е проведена специфична локална имунодиагностика.

Поради липсата на проучвания по темата сред детската популация, получените от настоящото изследване резултати са сравнени с аналогични, но получени от изследвания на възрастни пациенти.

1.9. Честота на локализация на засегнатите лимфни възли при децата с диагноза Туберкулозен бронхаденит

Двустранно засягане на лимфните възли се установява при около $2/3$ - 60% (n=9) от децата с Туберкулозен бронхаденит (фиг. 18).

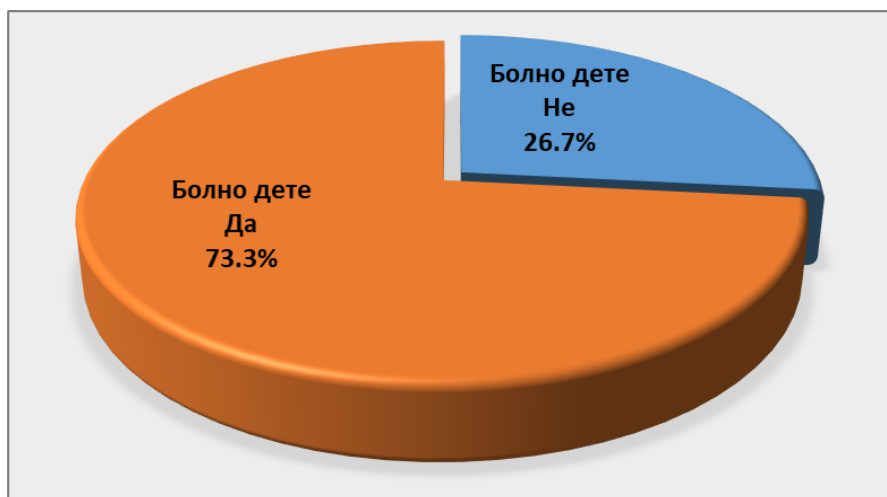


Фиг.18. Честота на локализация на засегнатите лимфни възли

Установява се, че липсва характерно засягане на групи лимфни възли вляво или вдясно, а по-характерно е двустранното засягане на лимфо-жлезния апарат на децата.

1.10. Разпределение на изследваните деца по наличие на туберкулозно заболяване

От изследваните 30 деца при 73,3% (n=22) се установяват рентгеноморфологични данни за наличие на различни форми на туберкулозно заболяване. От останалите 8 деца - при 6 от тях се поставя диагноза ЛТБИ, а при 2 не се установява наличие на туберкулозна инфекция или болест (фиг. 19).



Фиг. 19. Разпределение на изследваните деца по наличие на туберкулозно заболяване

При 73,3% от изследваните деца, използвайки всички диагностични методи, се поставя диагнозата туберкулоза, а при 20% - ЛТБИ - състояние на инфектираност без клинично-лабораторни данни за наличие на болест. Болните деца са подложени на противотуберкулозно лечение, а инфектираните - на профилактика [66]. Представената извадка е неголяма, но все пак се отчита висок процент на диагностициране на туберкулоза в различните ѝ клинични форми.

При анализиране на зависимостта между възрастовата група, към която принадлежи детето и наличието на туберкулозна болест не се установява статистическа значимост, анализирайки връзката между двата белега ($p=0,353$), (табл. 8).

Табл. 8. Възрастова група / наличие на туберкулозно заболяване (Fisher's Exact Test)

Болно дете		Възрастова група			Общо	P
		7-11 г.	12-14 г.	15-18 г.		
Не	N	5	2	1	8	0,353
	%	41,7%	22,2%	11,1%	26,7%	
Да	N	7	7	8	22	
	%	58,3%	77,8%	88,9%	73,3%	
Общо	N	12	9	9	30	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

Почти по равен брой деца (съотв. 7, 7 и 8 бр.) от трите изследвани възрастови групи са с доказано туберкулозно заболяване. Все пак не е за пренебрегване факта, че почти 90% от децата в най-високата възрастова група - 15-18 г. са болни.

2. Фибробронхоскопия и взимане на БАЛ

Работейки по предложения в методологията алгоритъм, при осъществяване на бронхоскопията не настъпиха никакви усложнения и всички деца, включени в проучването понесоха добре изследването. Според редица автори, независимо от инвазивния му характер, провеждането на бронхоскопско изследване и последващото изследване на взетия БАЛ са ключови при диагностиката на редица респираторни заболявания в детска възраст [42,67,142,144].

В настоящото проучване, благодарение на изследването се диагностицираха освен 22-те деца с туберкулоза (разбира се, в съчетание и с останалите диагностични методи) и едно дете с белодробна ехинококоза. Двукратното провеждане на бронхоскопско изследване бе и от съществено значение за поставяне на диагнозата Ендобронхиална туберкулоза при едно от изследваните деца.

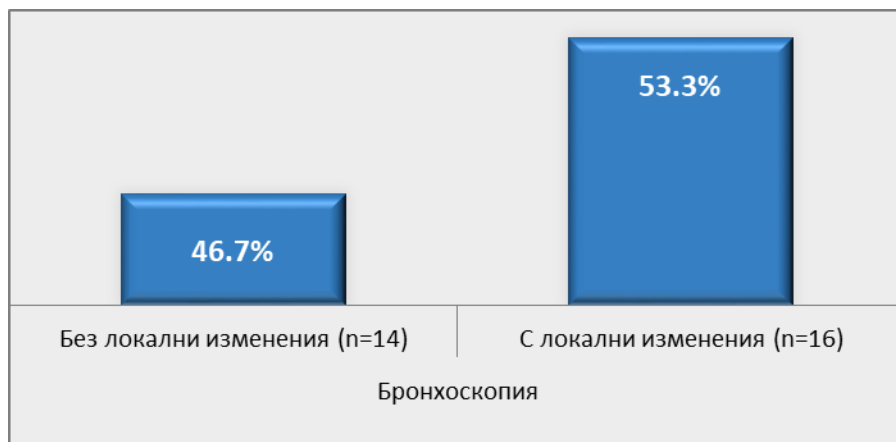
Предложения в методологията алгоритъм за провеждане на бронхоскопско изследване в детска възраст е приложим и безопасен [98,126].

В хода на проведената бронхоскопия се потърсиха и локални изменения, които биха могли да имат определена диагностична стойност.

При 53,3% (n=16) от децата в хода на проведеното бронхоскопско изследване се установяват локални изменения - хиперемия на бронхиалната лигавица, наличие на секрет, ектазирани бронхиални съдове при някои от децата (фиг. 20).

При детето с ендобронхиална туберкулоза и сегментна ателектаза се установиха съществени ендоскопски промени - вдясно обтуриран В5, без видим ход дистално, а само добре оформен еперон. При повторната бронхоскопия локално се визуализира казеозоподобна материя - решаващо по отношение на диагностичното уточняване.

При едно от децата с ЛТБИ в хода на бронхоскопията се визуализира стена на ехинококова киста, в последствие диагнозата бе потвърдена серологично и хирургично.

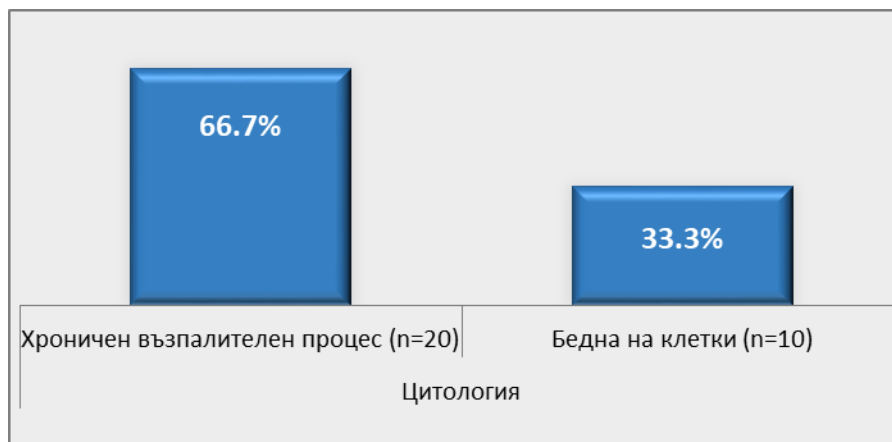


Фиг.20. Разпределение на изследваните деца по наличие на локални изменения в дихателните пътища

3. Микробиологично и цитологично изследване на БАЛ и анализиране на получените резултати

Взетият БАЛ бе изследван и микробиологично - с директна микроскопия и на посевка. При всичките 30 деца резултатите бяха отрицателни, т.е. не се установи наличие на *M. tuberculosis*. Те потвърждават резултатите от микробиологичното изследване на хрчка (стомашно-промивни води) при пациентите. Изследваната група пациенти е малка, с пет различни форми на туберкулозно заболяване, но бацилоотделяне (дори от изследван материал от долните дихателни пътища) не се установи. В следващи проучвания е възможно като микробиологичен диагностичен метод да бъде добавен и PCR in real time (Gene Xpert MBT/RIF) и да се направи сравнителен анализ на получените резултати [56,70,71,162].

При значителен процент от децата 66,7% (n=20) при цитологично изследване на БАЛ се установява хроничен възпалителен процес, представен с групи от макрофаги, лимфоцити и неутрофили в повлекла от слуз. При 33,3% (n=10) изготвените препарати са бедни на клетки (фиг. 21).



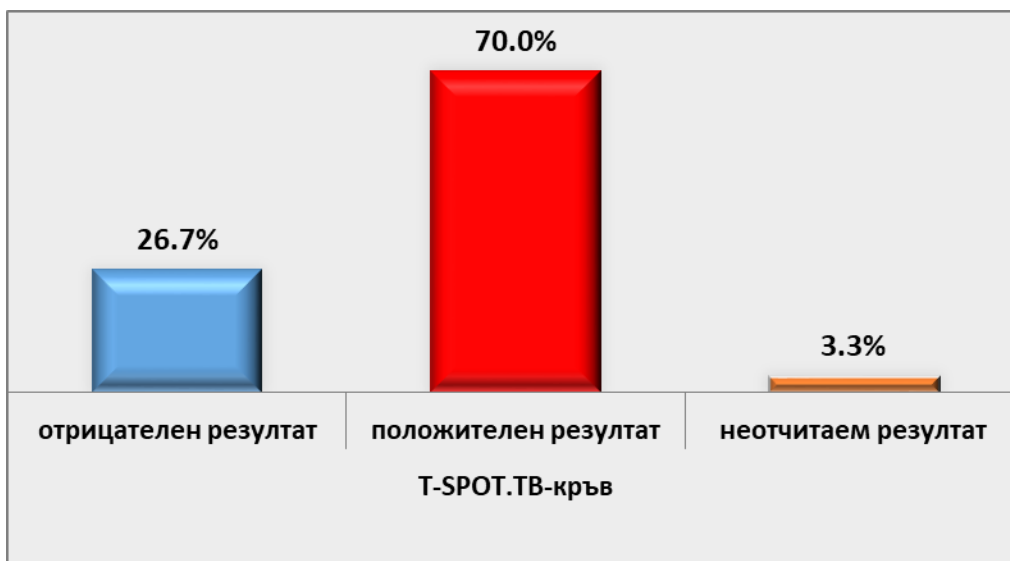
Фиг.21. Разпределение на изследваните деца по резултат от цитология на БАЛ

Получените цитологични резултати са неспецифични и потвърждават наличието на хроничен възпалителен процес. Само при едно дете (с Ендобронхиална туберкулоза), при което в хода на бронхоскопията се взе и локална щипкова биопсия от цитохистологичното изследване се установи наличие на специфичен гранулом с централно разположена казеозна некроза и перифокален вал от клетки на възпалението. В нашето проучване се установява, че цитологичното изследване на БАЛ в детска възраст не би могло да постави специфична диагноза, а има само насочващ характер. Цитологичното изследване на БАЛ в детска възраст е специфично за определени нозологични единици, но не и за туберкулозното заболяване [128,129].

4. Имунологично изследване с гама-интерферонов тест (T-SPOT.TB) в кръв и в БАЛ

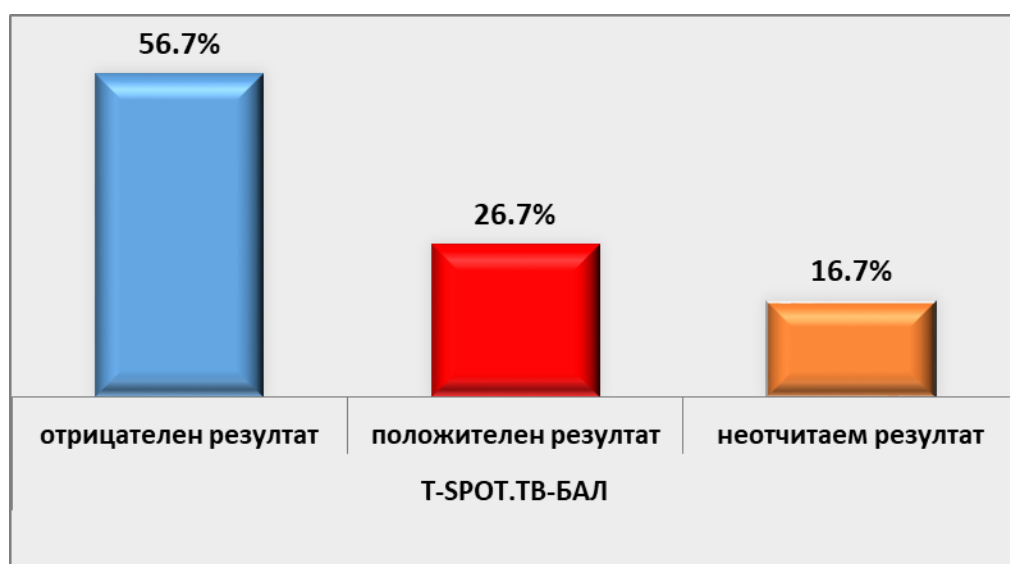
4.1. Разпределение на изследваните деца по резултат от приложен T-SPOT.TB в кръв и в БАЛ

При приложение на имунологичния тест в кръв се установява, че при значителен процент - 70% (n=21) от изследваните деца тестът се интерпретира като положителен (наличие на 6 или повече спота в панел А и/или в панел В). Тестът е отрицателен при 26,7% (n=8) от децата и неотчитаем при 3,3% (n=1). Неотчитаем е резултатът при едно дете - така се интерпретира тестът, когато при отчитането на резултатите има над 10 спота в Нулевата контрола и по-малко от 20 спота в Положителната контрола (фиг.22).



Фиг. 22. Разпределение на изследваните деца по резултат от кръвен T-SPOT.TB

Резултатите от имунологичния тест в БАЛ обаче съществено се различават от кръвните такива. Само при 26,7 % (n=8) от децата се установява положителен резултат, при 56,7% (n=17) - отчетения резултат е отрицателен и при 16,7% (n=5) от изследваните пациенти резултатът не може да бъде отчетен нито като положителен, нито като отрицателен (фиг. 23).



Фиг. 23. Разпределение на изследваните деца по резултат от лаважен T-SPOT.TB

В хода на настоящото изследване потърсихме една от най-важните зависимости - сравнение на резултатите, получени от приложение на имунологичния тест Т-SPOT.TB паралелно в кръв и в БАЛ.

Установява се, че всички положителни тестове от БАЛ (n=8) са положителни и от кръв, т.е. лаважният тест потвърждава кръвния такъв. По отношение на отрицателните резултати от БАЛ - при 29,4% от тях е отрицателен и кръвния Т-SPOT.TB - сходство в двата резултата, но при 64,7% кръвният тест е положителен - има разминаване в получените резултати от кръв и БАЛ. Само 8 от положителните кръвни тестове (n=21) са положителни и от БАЛ (p=0,070), (табл. 9).

Табл. 9. Разпределение на изследваните деца по имунологични резултати - лаважен / кръвен тест (Fisher's Exact Test)

Т-SPOT.TB - кръв		Т-SPOT.TB - БАЛ			Общо	Р
		Отрицателен резултат	Положителен резултат	Неотчитаем резултат		
Отрицателен резултат	N	5	0	3	8	0,070
	%	29,4%	0,0%	60,0%	26,7%	
Положителен резултат	N	11	8	2	21	
	%	64,7%	100,0%	40,0%	70,0%	
Неотчитаем резултат	N	1	0	0	1	
	%	5,9%	0,0%	0,0%	3,3%	
Общо	N	17	8	5	30	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

При отстраняване на неотчитаемите резултати от статистическата обработка взаимовръзката между двата изследвани показателя - Т-SPOT.TB-БАЛ и Т-SPOT.TB-кръв не търпи съществена промяна (табл. 10).

Табл. 10. Разпределение на изследваните деца по имунологични резултати - лаважен / кръвен тест (Fisher's Exact Test) - неотчитаемите резултати са отстранени

T-SPOT.TB - кръв		T-SPOT.TB - БАЛ		Общо	P
		Отрицателен резултат	Положителен резултат		
Отрицателен резултат	N	5	0	5	0,130
	%	31,3%	0,0%	20,8%	
Положителен резултат	N	11	8	19	
	%	68,8%	100,0%	79,2%	
Общо	N	16	8	24	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

При задълбочен анализ се установява, че от всички болни деца, само при две от тях кръвният T-SPOT.TB не е с положителен резултат (при едното дете резултатът е отрицателен, а при другото - неотчитаем). Това показва, че кръвният имунологичен тест е с висока диагностична стойност по отношение на туберкулозното заболяване в детска възраст [10].

В групата на болните деца (общ брой 22), обаче при 12 деца (повече от половината) лаважният T-SPOT.TB е с отрицателен резултат. Същите тези деца имат положителен кръвен имунологичен тест. Съществуващото противоречие от резултатите, публикувани с възрастни пациенти, болни от туберкулоза, при които в голям процент лаважният имунологичен тест е с положителен резултат [79,80], се обяснява с имунологичните особености на детския организъм по отношение на Т-клетъчния имунитет - неефективна локална концентрация на Т-клетките, отделящи гама-интерферон и съответно наличие на отрицателни имунологични резултати от лаважна течност.

4.2. Сравнение на получените резултати от T-SPOT.TB в кръв и в БАЛ с аналогични резултати на възрастни пациенти

Резултатите от настоящото проучване **не кореспондират** с тези, получени при изследванията на възрастни пациенти с активна туберкулоза [79,80,81,82], при които положителните гама-интерферон тестове, направени в БАЛ преобладават.

Jafari и сътрудници смятат че,чувствителността на директната микроскопия на храчка или БАЛ за откриване на туберкулозни микобактерии е променлива при възрастни пациенти с белодробна туберкулоза и варира от 50 до 80% за три последователни проби. При пациенти с активна туберкулоза, които са отрицателни на директна микроскопия, чувствителността на МТВ-специфична ДНК амплификация на храчка или БАЛ варира от 48 до 80%. По този начин значителна част от пациентите с белодробна туберкулоза остават недиагностицирани с настоящите лабораторни техники, докато не се получат резултатите от културелното изследване. При едно от своите проучвания авторите правят извод, че при пациенти с активна туберкулоза с отрицателна директна микроскопия (25 от 42 бр.; 59,5%) се установява, че *M. tuberculosis*-специфична БАЛ течност (IGRA) е 92% чувствителна и 87% специфична ($LR + = 7$) за диагностициране на туберкулоза [80].

Това несъответствие между получените в настоящото проучване резултати и публикуваните при възрастни пациенти се обяснява с факта, че голям процент от изследваните деца боледуват от т.н. затворена форма на туберкулоза (Туберкулозен бронхаденит), т.е. тяхното заболяване е локализирано в лимфните възли и поради това няма наличие на туберкулозни бактерии в бронхите [105]. За разлика от тях, изследваните възрастни пациенти боледуват най-често от Инфилтративно-пневмонична форма на заболяването, която нерядко търпи и бронхогенна дисеминация [104].

Втора, но изключително съществена разлика между двете изследвани групи - деца/възрастни е имунологичната особеност в миграцията, локалната концентрация и интерфероновата продукция от сенсibiliзираните Т-лимфоцити - процеси, зависими от имунологичната реактивност на отделния индивид и различаващи се съществено в различните му възрастови периоди [74,76,171].

4.3. Зависимост между получените имунологични резултати и определени характеристики (възраст, диагноза, контакт с туберкулозно болен, проба на Mantoux, BCG белег, цитологичен резултат, локални изменения) на изследваните деца

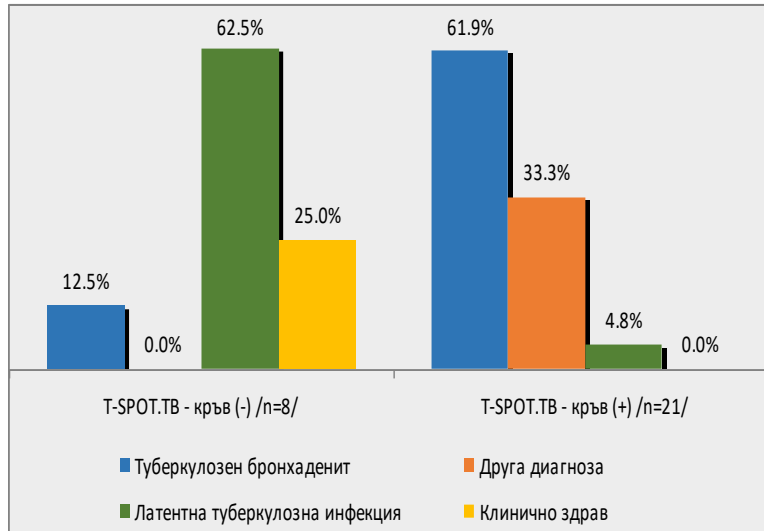
Най-голям процент отрицателни резултати от кръвния T-SPOT.TB - 62,5% се отчитат при децата във възрастова група 7-11 год. Не се открива друга съществена статистическа значимост при анализиране на резултатите от имунологичния кръвен тест спрямо възрастните групи, в които попадат изследваните деца (табл. 11).

Табл. 11. Разпределение на изследваните деца спрямо резултат от кръвен имунологичен тест и възрастова принадлежност (Fisher's Exact Test)

Възрастова група		T-SPOT.TB - кръв			Общо	P
		Отрицателен резултат	Положителен резултат	Неотчитаем резултат		
7-11 г.	N	5	7	0	12	0,342
	%	62,5%	33,3%	0,0%	40,0%	
12-14 г.	N	2	7	0	9	
	%	25,0%	33,3%	0,0%	30,0%	
15-18 г.	N	1	7	1	9	
	%	12,5%	33,3%	100,0%	30,0%	
Общо	N	8	21	1	30	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

По отношение на зависимостта между резултата от кръвния T-SPOT.TB и диагнозата се установява, че при 61,9% (n=13) от децата с положителен резултат се поставя диагноза Туберкулозен бронхаденит. Този резултат съвпада с получените и публикувани резултати при изследването на кръвен имунологичен тест при деца с първични форми на туберкулозно заболяване [150].

Висок процент от децата (62,5%), диагностицирани само като инфектирани, т.е. с ЛТБИ имат отрицателен кръвен T-SPOT.TB, но при тях е отчетен хиперергичен TST, въз основа на което е поставена и диагнозата (p<0,001), (фиг. 24).



Фиг. 24. Разпределение на изследваните деца спрямо резултат от кръвен имунологичен тест и поставена диагноза (неотчитаемите имунологични резултати са отстранени)

При 66,7% (n=14) от децата с положителни кръвни тестове се установява наличен контакт с туберкулозно болен в семейството, а при 62,5% от децата с отрицателен кръвен T-SPOT.TB липсват данни за контакт с болен от туберкулоза, като не се установява статистическа връзка между резултата от кръвния тест и наличието на контакт с туберкулозно болен (p=0,238), (табл. 12).

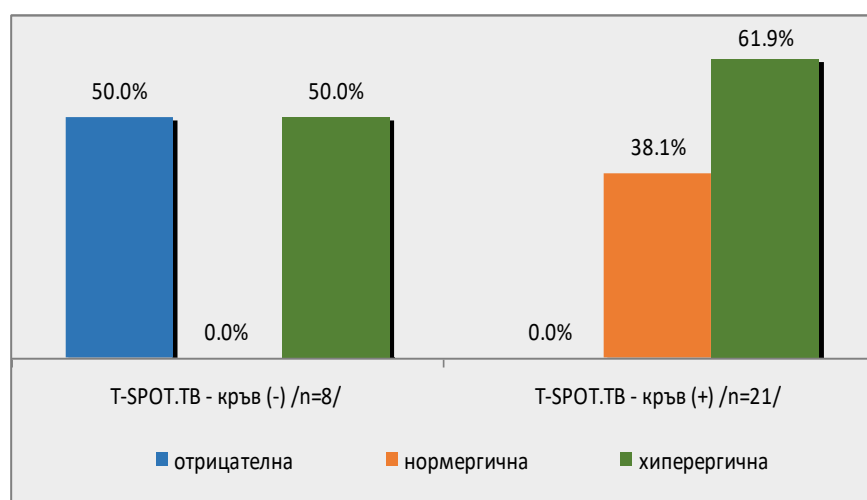
Получените резултати са в подкрепа на публикуваните, при които се твърди, че децата се инфектират с туберкулозни микобактерии предимно в семейната си среда, в близкото си обкръжение [48,146,147].

Табл. 12. Разпределение на изследваните деца спрямо резултат от кръвен имунологичен тест и наличен контакт с ТБ болен

Контакт		T-SPOT.TB - кръв			Общо	P
		Отрицателен резултат	Положителен резултат	Неотчитаем резултат		
Липсва сигурен	N	5	5	0	10	0,238
	%	62,5%	23,8%	0,0%	33,3%	
Наличен (извън семейството)	N	0	2	0	2	
	%	0,0%	9,5%	0,0%	6,7%	
Наличен (в семейството)	N	3	14	1	18	
	%	37,5%	66,7%	100,0%	60,0%	
Общо	N	8	21	1	30	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

Установява се статистическа значимост между получените резултати от два имунологични теста - кръвен T-SPOT.TB и кожен туберкулинов тест на Mantoux. При 61,9 % от положителните кръвни тестове се установява хиперергичен TST, при 38,1% - нормергичен TST и липсват деца с положителен T-SPOT.TB, които да имат отрицателна туберкулинова проба на Mantoux.

Половината от децата с отрицателен кръвен тест са и с отрицателен кожен имунологичен тест, но другата половина пациенти с отрицателен кръвен T-SPOT.TB са с отчетени хиперергични туберкулинови проби ($p=0,003$), (фиг. 25).



Фиг. 25. Разпределение на изследваните деца спрямо резултат от кръвен имунологичен тест и резултат от туберкулинова проба на Mantoux (неотчитаемите имунологични резултати са отстранени)

Получените резултати отново повдигат въпроса за диагностичната стойност на TST и на гама-интерфероновия тест, използвани заедно и поотделно, за субективното отчитане на TST и недостатъците му като цяло [34, 110,149].

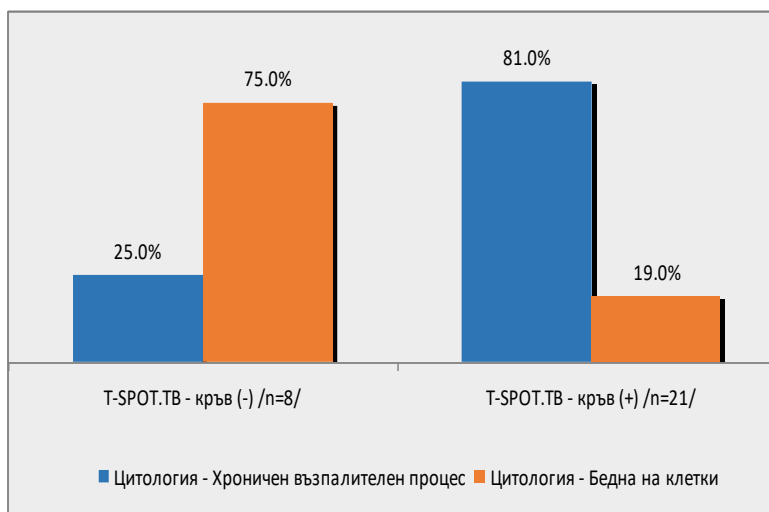
При висок процент (71,4%) от децата с положителен кръвен имунологичен тест не се установява наличие на BCG белег, но при децата с отрицателни резултати от кръвния T-SPOT.TB - половината от тях имат, а останалата половина нямат BCG белег - не се установява статистическа значимост между двата изследвани признака ($p=0,594$), (табл. 13).

Табл. 13. Разпределение на изследваните деца спрямо резултат от кръвен имунологичен тест и наличие на BCG белег

BCG белег		T-SPOT.TB - кръв			Общо	P
		Отрицателен резултат	Положителен резултат	Неотчитаем резултат		
Не	N	4	15	1	20	0,594
	%	50,0%	71,4%	100,0%	66,7%	
Да	N	4	6	0	10	
	%	50,0%	28,6%	0,0%	33,3%	
Общо	N	8	21	1	30	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

Установява се обаче статистическа връзка между получените резултати от кръвния имунологичен тест и тези от цитологичното изследване на взетия БАЛ. При 81% от децата с положителен кръвен T-SPOT.TB на цитологичното изследване се установява хроничен възпалителен процес с обилие от макрофаги, неутрофили, лимфоцити, а при 75% от децата с отрицателен кръвен имунологичен тест се установява беден на клетки цитологичен препарат ($p=0,007$), (фиг. 26).

Това може да бъде обяснено с активиране основно на неспецифичната имунологична защита, както е при всеки един възпалителен процес [109].



Фиг. 26. Разпределение на изследваните деца спрямо резултат от кръвен имунологичен тест и резултат от цитологично изследване (неотчитаемите имунологични резултати са отстранени)

Не се открива статистическа връзка между получените резултати от кръвния имунологичен тест и наличието на локални изменения, установени с проведената бронхоскопия ($p=1,000$), (табл. 14).

Табл. 14. Разпределение на изследваните деца спрямо резултат от кръвен имунологичен тест и налични локални изменения в дихателните пътища

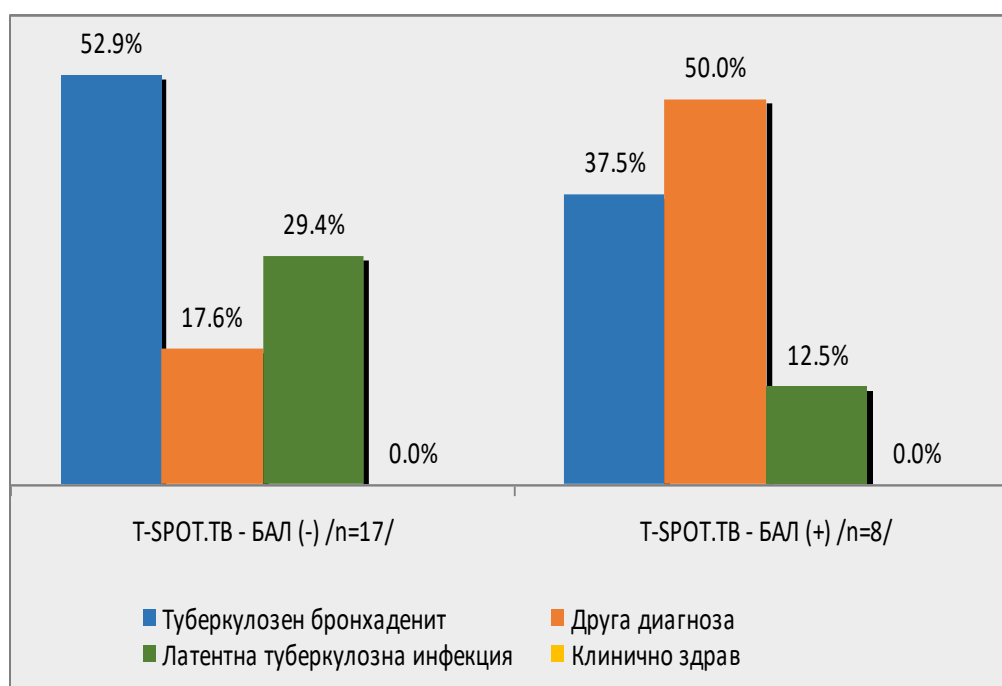
Бронхоскопия		Т-SPOT.TB - кръв			Общо	P
		Отрицателен резултат	Положителен резултат	Неотчитаем резултат		
Без локални изменения	N	4	10	0	14	1,000
	%	50,0%	47,6%	0,0%	46,7%	
С локални изменения	N	4	11	1	16	
	%	50,0%	52,4%	100,0%	53,3%	
Общо	N	8	21	1	30	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

От анализът на показателите лаважен Т-SPOT.TB и възрастова група, в която попада детето се установи, че липсва статистическа връзка между тях ($p=0,734$), (табл. 15).

Табл. 15. Разпределение на изследваните деца спрямо резултат от лаважен имунологичен тест и възрастова принадлежност (Fisher's Exact Test)

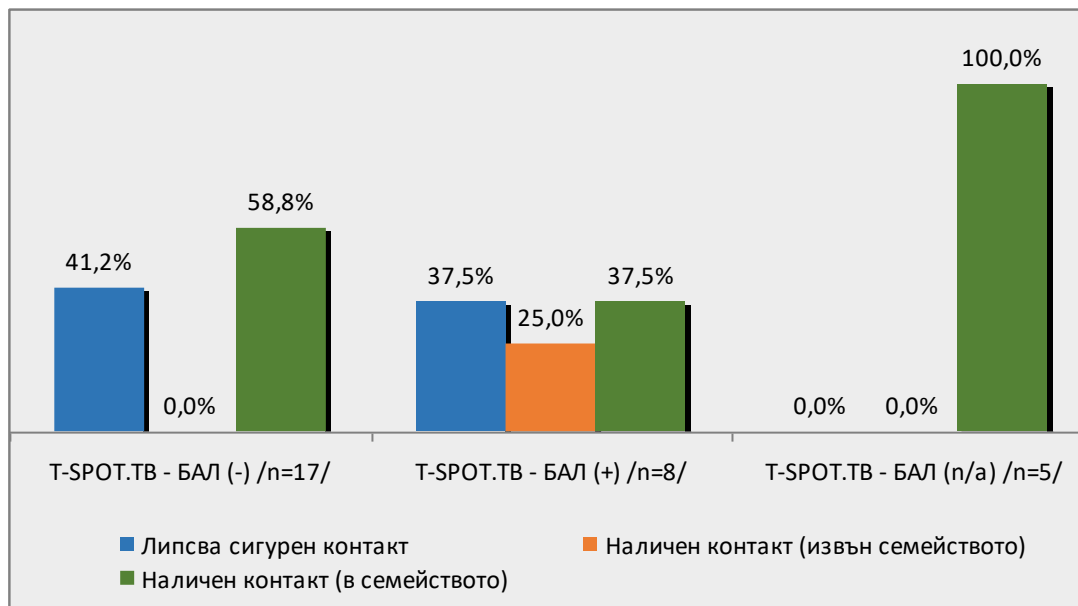
Възрастова група		Т-SPOT.TB - БАЛ			Общо	P
		Отрицателен резултат	Положителен резултат	Неотчитаем резултат		
7-11 г.	N	8	3	1	12	0,734
	%	47,1%	37,5%	20,0%	40,0%	
12-14 г.	N	4	2	3	9	
	%	23,5%	25,0%	60,0%	30,0%	
15-18 г.	N	5	3	1	9	
	%	29,4%	37,5%	20,0%	30,0%	
Общо	N	17	8	5	30	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

Най-висок процент от децата с положителен лаважен тест (50%) са с друга диагноза (Инфилтративно-пневмонична форма на туберкулоза, Туберкулозен плеврит), а не с Туберкулозен бронхаденит. Тези деца са с вторични форми на заболяването, по подобие на изследваните възрастни пациенти и поради тази причина, резултатите съвпадат с публикуваните за възрастната популация [81,82]. При 37,5% от децата с положителен лаважен тест е поставена диагнозата Туберкулозен бронхаденит, а при 12,5% - ЛТБИ. Около половината от децата с Туберкулоза на вътрегръдните лимфни възли са с отрицателен лаважен T-SPOT-TB. ($p=0,053$), (фиг. 27).



Фиг. 27. Разпределение на изследваните деца спрямо резултат от лаважен имунологичен тест и поставена диагноза (неотчитаемите имунологични резултати са отстранени)

Не се установява статистическа връзка между резултата от лаважния имунологичен тест и наличието на контакт с туберкулозно болен ($p=0,064$), (фиг. 28).



Фиг. 28. Разпределение на изследваните деца спрямо резултат от лаважен имунологичен тест и наличието на контакт с ТБ болен

Половината от децата с положителен лаважен тест са с хиперергична туберкулинова проба на Mantoux, а останалата половина - с нормергична. При висок процент (76,5%) от децата с отрицателен лаважен T-SPOT.TB обаче, се установява хиперергична туберкулинова проба на Mantoux ($p=0,017$), (табл. 16).

Табл. 16. Разпределение на изследваните деца спрямо резултат от лаважен имунологичен тест и резултат от туберкулинова проба на Mantoux

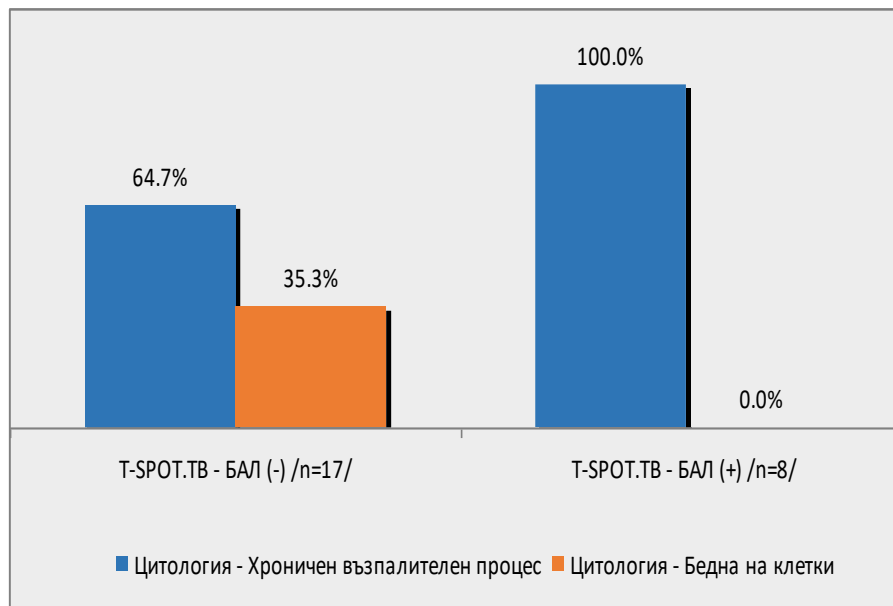
Mantoux		T-SPOT.TB - БАЛ			Общо	P
		Отрицателен резултат	Положителен резултат	Неотчитаем резултат		
Отрицателна	N	1	0	3	4	0,017
	%	5,9%	0,0%	60,0%	13,3%	
Нормергична	N	3	4	1	8	
	%	17,6%	50,0%	20,0%	26,7%	
Хиперергична	N	13	4	1	18	
	%	76,5%	50,0%	20,0%	60,0%	
Общо	N	17	8	5	30	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

Висок процент (75%) от децата с положителен лаважен имунологичен тест нямат BCG белег, без да се установява статистическа връзка между двата показателя ($p=0,152$), (табл. 17).

Табл. 17. Разпределение на изследваните деца спрямо резултат от лаважен имунологичен тест и наличие на BCG белег

BCG белег		T-SPOT.TB - БАЛ			Общо	P
		Отрицателен резултат	Положителен резултат	Неотчитаем резултат		
Не	N	9	6	5	20	0,152
	%	52,9%	75,0%	100,0%	66,7%	
Да	N	8	2	0	10	
	%	47,1%	25,0%	0,0%	33,3%	
Общо	N	17	8	5	30	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

При всички деца с положителен лаважен тест на цитологичното изследване на взетия БАЛ се установява хроничен възпалителен процес ($p=0,008$), (фиг. 29).



Фиг. 29. Разпределение на изследваните деца спрямо резултат от лаважен имунологичен тест и резултат от цитологично изследване (неотчитаемите имунологични резултати са отстранени)

Независимо, че 62,5% от децата с положителен лаважен T-SPOT.TB имат и установени бронхоскопски локални изменения, не се установява статистическа връзка между резултата от лаважния имунологичен тест и наличието на локални изменения ($p=0,883$), (табл. 18).

Табл. 18. Разпределение на изследваните деца спрямо резултат от лаважен имунологичен тест и налични локални изменения в дихателните пътища

Бронхоскопия		T-SPOT.TB - БАЛ			Общо	P
		Отрицателен резултат	Положителен резултат	Неотчитаем резултат		
Без локални изменения	N	9	3	2	14	0,883
	%	52,9%	37,5%	40,0%	46,7%	
С локални изменения	N	8	5	3	16	
	%	47,1%	62,5%	60,0%	53,3%	
Общо	N	17	8	5	30	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

4.4. Определяне на показателите чувствителност и специфичност на T-SPOT.TB теста в БАЛ и сравнение с тези на кръвния T-SPOT.TB тест

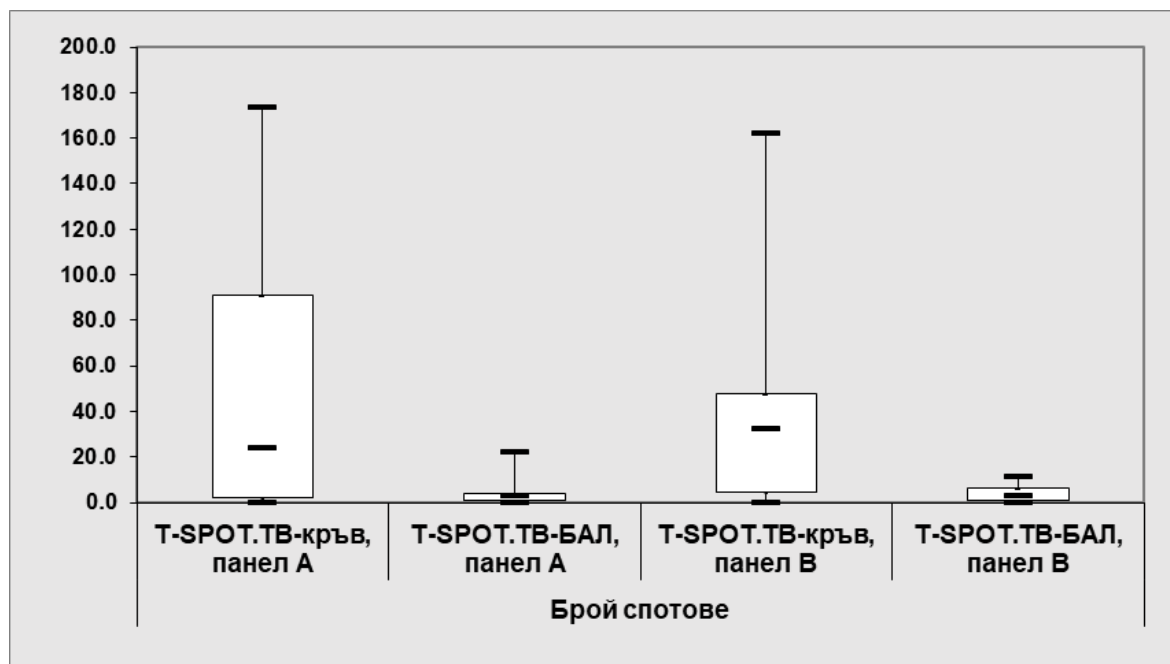
Прави впечатление съществената количествена разлика в средния брой спотове в двата панела (А и В) в двата приложения T-SPOT.TB теста - в кръв и в БАЛ. Средната стойност на брой спотове в панел А в кръвен имунологичен тест е повече от 10 пъти по-висока (48,16) от същата стойност в лаважния имунологичен тест (3,72). Стойностите на броя спотове в панел В в кръвен и в лаважен тест са в почти същото съотношение (35,88:3,80), (табл. 19). Използвайки теста на Уилкоксон се установява, че съществува статистически достоверна разлика в средния брой спотове в кръвния и лаважния тест в полза на кръвния ($p<0,001$).

Това повдига няколко въпроса основно относно качествата на методиката за изработване и отчитане на гама-интерферонов тест в лаважна течност [107,134] и разбира се дискутираните вече количествени разлики между Т-лимфоцитите в БАЛ при деца и при възрастни пациенти [151].

Общият брой спотове в панел А (както в кръв, така и в БАЛ) е по-голям в сравнение с броя спотове в панел В, което е показател за по-голяма давност на туберкулозната инфекция сред изследваните деца (фиг. 30).

Табл. 19. Среден брой спотове в кръвен и в лаважен тест по панели (Wilcoxon Signed Ranks Test)

Брой спотове	N	Mean	Median	SD	Min	Max	P
Т-SPOT.TB - кръв, панел А	25	48.16	24.00	50.65	0.00	173.00	<0,001
Т-SPOT.TB - БАЛ, панел А	25	3.72	3.00	4.94	0.00	22.00	
Т-SPOT.TB - кръв, панел В	25	35.88	32.00	38.53	0.00	162.00	<0,001
Т-SPOT.TB - БАЛ, панел В	25	3.80	3.00	3.39	0.00	11.00	



Фиг. 30. Среден брой спотове в кръвен и в лаважен тест (Box-plot изображение)

Диагностични характеристики на T-SPOT.TB теста в БАЛ (спрямо статуса на детето /болно-здрово/)

При 12 от болните от туберкулоза деца се отчита отрицателен резултат от лаважния имунологичен тест, а при 7 от болните деца тестът е положителен. При 5 от здравите деца T-SPOT.TB тестът в лаваж е с отрицателен резултат, а при едно дете (с ЛТБИ) е положителен (табл. 20).

Табл. 20. Зависимост между наличието на болест и резултата от T-SPOT.TB в БАЛ

T-SPOT.TB - БАЛ	Болно дете	
	Не	Да
Отрицателен резултат	5	12
Положителен резултат	1	7

Спрямо получените резултати от табл. 20, се определят показателите чувствителност - 36,84% и специфичност - 83,33% за имунологичния тест в БАЛ (табл. 21).

Табл. 21. Диагностични характеристики на имунологичния тест в БАЛ спрямо зравния статус на детето

Показател	Value	95% CI
Sensitivity	36,84%	16,29% to 61,64%
Specificity	83,33%	35,88% to 99,58%
Positive Predictive Value	87,50%	47,35% to 99,68%
Negative Predictive Value	29,41%	10,31% to 55,96%
Disease prevalence	76,00%	54,87% to 90,64%

Спрямо анализираната зависимост между здравния статус на детето и получените от лаважния имунологичен тест резултати, показателите чувствителност и специфичност се определят както следва - 36,84% и 83,33% за имунологичния тест в БАЛ.

За сравнение, тези показатели на T-SPOT.TB в кръв са със значително по-високи стойности - съответно 95,6% и 97,1%. Този резултат за пореден път подкрепя по-високата диагностична стойност на имунологичния тест, приложен в кръв в детска възраст.

5. Оценка на необходимостта от провеждане на локална имунологична диагностика на туберкулозното заболяване в детска възраст

Предвид особеностите в протичането на туберкулозата в детска възраст и особеностите на специфичния клетъчен имунитет при децата, гама-интерфероновият тест (T-SPOT.TB) проведен в кръв се оказва с по-висока диагностична стойност от същия тест, проведен в БАЛ.

Провеждането на бронхоскопия и взимането на БАЛ за изследване могат да подпомогнат диагностиката на заболяването, особено при определени форми на туберкулоза (напр. Ендобронхиална туберкулоза), като методът е с висока степен на приложимост и безопасност.

Локалната имунологична диагностика в детска възраст не надвишава по чувствителност и специфичност кръвния имунологичен тест, базиран на отделянето на гама-интерферон. Провеждането на T-SPOT.TB тест в бронхоалвеоларна течност в детска възраст е с ограничени диагностични възможности по отношение на туберкулозното заболяване.

Недостатъци на проучването:

Инвазивният характер на изследването и необходимостта от подписано родителско информирано съгласие затрудни включването на по-голям брой деца в проучването. Разширяване на диагностичните критерии (напр. включване и на PCR микробиологични методи) [77,78,86], както и увеличаване на броя на изследваните деца, включително и

такива в по-малка възраст, е възможно и препоръчително да се осъществи на следващ етап.

Заклучение:

Поставянето на диагнозата "туберкулоза" сред педиатричната популация и в днешно време продължава да бъде предизвикателство за детския пневмолог и фтизиатър. Създаването на нови диагностични методи и усъвършенстването на наличните е ангажимент както на изследователите, така и на клиничните специалисти [138].

Потвърждаването на туберкулозното заболяване в детска възраст се осъществява чрез комплексното използване на всички диагностични критерии - анамнестични и епидемиологични данни, физикален статус, имунологични, образни и микробиологични методи на диагностика.

Провеждането на бронхоскопия и взимането на БАЛ за изследване могат да подпомогнат диагностиката на заболяването, особено при определени форми на заболяването (напр. Ендобронхиална туберкулоза), като методът е с висока степен на приложимост и безопасност.

Имунологичната диагностика на туберкулозната инфекция търпи бурно развитие през последното десетилетие, основно с използването на кръвните имунологични тестове, базирани на отделянето на гама-интерферон от Т-лимфоцитите. Те са с изключително висока чувствителност и специфичност по отношение на туберкулозната инфекция, но имат допълващ диагностичен характер по отношение на туберкулозното заболяване заедно с останалите налични критерии.

Използването на бронхоалвеоларна лаважна течност за имунологично изследване и потвърждаване на заболяването дава добри резултати при възрастни пациенти, което улеснява диагностиката и ускорява началото на лечението им.

Имунологичното изследване обаче, на БАЛ в детска възраст не дава толкова потвърждаващи резултати.

Предвид особеностите в протичането на туберкулозата в детска възраст и особеностите на специфичния клетъчен имунитет при децата, гама-интерфероновият тест (T-SPOT.TB) проведен в кръв се оказва с по-висока диагностична стойност от същия тест, проведен в БАЛ.

VII. ИЗВОДИ

1. Клинико-епидемиологичната характеристика на описаните деца не се различава съществено от предходно направените, с изключение на повишаване на честотата на вторичните форми на заболяването, което се потвърждава от структурата на заболяемостта от туберкулоза в последните 5 години.

2. Туберкулозното заболяване в детска възраст се диагностицира успешно с утвърдените, описани и използвани критерии.

3. Бронхоскопското изследване с взимане на БАЛ по предложения алгоритъм е безопасен, приложим и допълващ диагностиката метод.

4. Микробиологичното и цитологично изследване на БАЛ има подкрепящ и допълващ диагностичен характер.

5. Имунологично изследване с гама-интерферонов тест (T-SPOT.TB) в кръв и в БАЛ е приложим диагностичен метод в детска възраст, като диагностичните възможности на кръвния тест превъзхождат тези на лаважния.

6. Резултатите от T-SPOT.TB в БАЛ в детска възраст не кореспондират със съответните резултати на възрастни пациенти.

7. Не се доказва връзка между резултатите от T-SPOT.TB в кръв и в БАЛ с проведената или не специфична имунопрофилактика (BCG ваксинация).

8. Доказа се статистически достоверна връзка между положителния кръвен имунологичен тест и най-честата форма на туберкулоза в детска възраст - Туберкулозен бронхаденит, както и такава между положителния лаважен имунологичен тест и по-тежките форми на туберкулоза сред децата.

9. Резултатите от имунологичния тест в кръв потвърждават в по-висока степен отчетената туберкулинова чувствителност с TST в сравнение с резултатите от лаважния тест.

10. Кръвният имунологичен тест превъзхожда лаважния такъв по отношение на показателите чувствителност и специфичност.

11. Локалната имунологична диагностика на туберкулозното заболяване в детска възраст има ограничени възможности и е показана само при определени случаи.

VIII. ПРИНОСИ

1. Осъществена е съвременна клинико-епидемиологична характеристика на деца, суспектни за туберкулозно заболяване.
2. Предложен е приложим и безопасен алгоритъм за провеждане на бронхоскопско изследване в детска възраст.
3. За първи път в Европа е проведено имунологично изследване на БАЛ с гама-интерферонов тест в детска възраст и е осъществен анализ на получените резултати.
4. Определена е зависимостта между имунологичните резултати и останалите диагностични критерии в детска възраст.
5. Изследвани са и са сравнени диагностичните възможности на кръвен и лаважен имунологичен тест в детска възраст.

IX. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Публикации:

1. **Габровска, Наталия.** Сравнителна стойност на T-SPOT.TB в периферна кръв и бронхоалвеоларен лаваж при деца с различни форми на туберкулозно заболяване. *Български медицински журнал*, 2017;3: 7-13 стр.
2. Велizarова, Св., Спасова, А., **Габровска, Н.** IGRA - тестове - съвременна имунологична диагноза на туберкулозното заболяване в детска възраст. *GP news*, 2017;2: 27-31 стр.
3. Velizarova Sv, **Natalia G**, Spasova A et all. Management and outcome of severe childhood tuberculosis in the paediatric intensive care setting: can we identify best practice? *Jornal Brasileiro de Pneumologia*; April 2019; 45(2). DOI: 10.1590/1806-3713/e20190043 (IF 1.532)

Участия в научни форуми:

1. **Gabrovska N**, Velizarova Sv, Kostadinov D et al. Comparison of the diagnostic value of immunological test, applied to two types of biological fluids - venous blood and bronchoalveolar lavage in children with tuberculosis. *European Respiratory Journal* 2018 52: PA4761
2. Velizarova Sv, **Gabrovska N**, Paskova M. Children with TB treated in the one clinic for childhood TB in Sofia – Bulgaria for the period 2013-2017. *European Respiratory Journal* 2018 52: PA2732
3. **Габровска, Н.**, Велizarова, Св., Спасова, А. Сравнително проучване върху диагностичната стойност на съвременен гама-интерферонов тест, приложен в кръв и бронхоалвеоларен лаваж при деца, суспексни за туберкулоза. XX-та национална конференция за педиатри и ОПЛ, Слънчев бряг 2019 г. постер II-ра награда

Х. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Велизарова, Св., Спасова А. Диагностична стойност на T-SPOT.TB при извънбелодробни форми на туберкулоза в детската възраст. Торакална медицина, 2011, том III, N 1, с. 44-49 ISSN 1313-9827.
2. Велизарова, Св., Спасова А. Сравнителни проучвания на диагностичните възможности на TST, T-SPOT.TB и QFT при деца с различни форми на туберкулозно заболяване. Наука Пулмология, 2011, N 2, ISSN1312-8202.
3. Велизарова, Св., Спасова, А. Диагностични стойности на T-SPOT.TB при деца в ранна детска възраст до 3 години с първични форми на туберкулоза. Наука Пулмология, 2010, N 3-4, с. 30-35 ISSN1312-8202.
4. Велизарова, Св., Спасова, А. Показатели на T-SPOT.TB - критерий за ефективността на противотуберкулозната терапия. Български Медицински Журнал, 2011, vol.V, N 1 ISSN 1313-1516.
5. Велизарова, Св., Спасова, А., Габровска, Н. Структура на туберкулозното заболяване при бецежирани деца. GP news, 2018, N 2, стр. 24-26.
6. Велизарова, Светлана. Имунодиагностика на туберкулозното заболяване в детска възраст - T- SPOT.TB. Медикарт, 2017, N 9.
7. Велизарова, Светлана. T-SPOT.TB диагностична стойност при различни форми на туберкулозно заболяване и латентна туберкулозна инфекция в детска възраст. Дисертационен труд. София, 2010.
8. Велизарова, Светлана. T-SPOT.TB метод за по-прецизна диагностика на туберкулозното заболяване и латентна туберкулозна инфекция – обзор. Български Медицински Журнал, 2007, N 2 ISSN 1313-1516.
9. Велизарова, Светлана. Диагностична стойност на T-SPOT.TB при деца с Латентна Туберкулозна Инфекция. Български Медицински Журнал, 2010, vol.IV, № 1 ISSN 1313-1516.
10. Велизарова, Светлана. Имунологична основа на IGRA тестовете, значение за комплексната диагноза на туберкулозното заболяване. GP news, 2017, N7.
11. Велизарова, Светлана. Съвременна диагностика на туберкулозата при децата T-SPOT.TB друга алтернатива. Български Медицински Журнал, 2009, N 4 ISSN 1313-1516.

12. Гаврилова, Н., Методиев, Я., Костадинов, Д. и сътр. Ларингеална маска за бронхоскопии при малки пациенти. Педиатрия, 1, 2011, 47-48.
13. Дренска, Р., Маркова, Р., Терзиева, В., и сътр. Определяне на ESAT-6 и CFP-10 специфични Т-лимфоцити при пациенти с активна туберкуозна инфекция в хода на специфичната терапия. Пневмология и Фтизиатрия. 2006, N1, с. 21-24.
14. Костадинов, Д., Ремичкова, М., Раданова, В. и сътр.. Ролята на IFN- γ и ADA в БАЛ при белодробна туберкулоза. Торакална медицина, II, 4, 2010: 32-36.
15. Костадинов, Димитър. Белодробна туберкулоза – нов прочит. Медицинфо, 2015, 12: 28-37.
16. Костадинов, Димитър. Бронхологични диагностични и терапевтични методи. Глава 10, Белодробни болести, част I – Основи на Пулмологията, под редакцията на проф. К. Костов. Inspiro, I, 2016: 219-243.
17. Костадинов, Димитър. Бронхоскопия. II. Съвременни изследвания. Инвазивни изследвания. Пропedeutика и съвременни изследвания на Вътрешните болести, том I, под редакцията на проф. Ж. Милева, доц. Г. Нешев и д-р Ал. Шинков. Издателство „АРСО“ – АРСО-КП ЕООД, София – 2016:122-132.
18. Костадинов, Димитър. Диагностична и интервенционална бронхология. Ръководство по хирургия с атлас, изд. Марин Дринов, т. VII – Гръдна хирургия: гръден кош, бял дроб, медиастинум, под ръков. на проф. Д. Петров, 2011, глава 3: 40-46.
19. Костадинов, Димитър. Интервенционална пулмология. Медицинфо, 12, 2010: 1-5.
20. Къртев, Ст., Янкова, Зл., Костадинов, Д. Белодробен карцином. Ново ръководство по белодробни болести и туберкулоза. Под редакцията на доц. д-р Зл. Янкова, ЦМБ, МУ – София, 2012: 148 – 171.
21. Методично указание за ранна диагноза и поведение при туберкулоза за лекари от лечебни заведения за първична извънболнична медицинска помощ, 2008 г.
22. Минчев, Петко. Клинична туберкулоза. Централна медицинска библиотека. София, 2013.
23. Минчев, Петко. Туберкулини и туберкулинова чувствителност. АКТ,1996.
24. НСИ. Здравеопазване.2018
25. Стенева, Й., Алексов, Св., Петков, Р. и сътр. Цялостен белодробен лаваж за лечение на белодробна алвеоларна протеиноза. Торакална медицина, том II, 4, 2010: 44-48.

26. Abadco DL, Amaro-Galvez R, Rao M, Steiner P. Experience with flexible fiberoptic bronchoscopy with bronchoalveolar lavage as a diagnostic tool in children with AIDS. *Am J Dis Child* 1992; 146: 1056±1059.
27. Albertini RE, Harrel JH, Kurihara N. Arterial hypoxemia induced by fiberoptic bronchoscopy. *Chest* 1974; 65: 117±118.
28. American Thoracic Society Centers for Disease Control and Prevention. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1376–1395.
29. Amicosante M, Ciccozzi M, Markova R. Rational use of immunodiagnostic tools for tuberculosis infection: guidelines and cost effectiveness studies. *The new microbiologica*. 2010;33(2):93-107.
30. Amitai Y, Zylber KE, Avital A, Zangen O, Noviski N. Serum lidocaine concentrations in children during bronchoscopy with topical anesthesia. *Chest* 1990; 98: 1370±1373.
31. Antonelli M, Conti G, Riccioni L, Meduri GU. Noninvasive positive pressure ventilation via face mask during bronchoscopy with BAL in high-risk hypoxemic patients. *Chest* 1996; 110: 724±728.
32. Apollonj et al (1975) *Immunol. Commum.*, 4(5): 453-463.
33. Bahal-O'Mara N, Nahata MC, Murray RD, et al. Sedation with meperidine and midazolam in paediatric patients undergoing endoscopy. *Eur J Clin Pharmacol* 1994; 47: 319±323.
34. Bamford AR, Crook AM, Clark JE, et al. Comparison of interferon-gamma release assays and tuberculin skin test in predicting active tuberculosis (TB) in children in the UK: a paediatric TB network study. *Archives of disease in childhood*. 2010;95(3):180-186.
35. Barbato A, Magarotto M, Crivellaro M, et al. Use of paediatric bronchoscope, flexible and rigid, in 51 European Centres. *Eur Respir J* 1997; 10: 1761±1766.
36. Barnes PF, Lu S, Abrams JS, et al. Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis. *Infect Immun* 1993; 61:3482–3489.
37. Barry SM, Lipman MC, Bannister B, et al. Purified protein derivative-activated type 1 cytokine-producing CD4+ T lymphocytes in the lung: a characteristic feature of active pulmonary and nonpulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 2003; 187:243–250.

38. Baughman R, Strohofer S, Kim K. Variation of differential cell counts of bronchoalveolar lavage fluid. *Arch Pathol Lab Med* 1986; 110: 341±343.
39. Bothamley GH, Ditiu L, Migliori GB, et al. Active case finding of tuberculosis in Europe: a tuberculosis network European trials group (TBNET) survey. *Eur Respir J* 2008; 32:1023–1030.
40. Brigden G, Furin J, van Gulik C, Marais B. Getting it right for children: improving TB treatment access and new treatment options. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2015; 13: 451-61
41. Burkle H, Dunbar S, Van Aken H. Remifentanyl: a novel short-acting, mu-opioid. *Anesth Analg* 1996; 83: 646±651.
42. Burns DM, Shure D, Francoz R, et al. The physiologic consequences of saline lobar lavages in healthy human adults. *Am Rev Respir Dis* 1983; 127: 695±701.
43. Caccamo N, Meraviglia S, La Mendola C, et al. Phenotypical and functional analysis of memory and effector human CD8 T cells specific for mycobacterial antigens. *J Immunol* 2006; 177:1780–1785.
44. Canadian Tuberculosis Committee. Updated recommendations on interferon gamma release assays for latent tuberculosis infection. *Can Commun Dis Rep* 2010; 36:1–21.
45. Carvalho ACC, Cardoso CAA, Martire TM, Migliori GB, Sant'Anna CC. Epidemiological aspects, clinical manifestations, and prevention of pediatric tuberculosis from the perspective of the End TB Strategy. *J Bras Pneumol*. 2018;44(2):134-144.
46. Cattamanchi A, Smith R, Steingart KR, et al. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection in HIV-infected individuals: a systematic review and meta-analysis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2011; 56:230–238.
47. Cattamanchi A, Ssewenyana I, Nabatanzi R, Miller CR, Den Boon S, Davis JL, et al. Bronchoalveolar lavage enzyme-linked immunospot for diagnosis of smear-negative tuberculosis in HIV-infected patients. *PloS one*. 2012;7(6):e39838.
48. Childhood TB: Training Toolkit, WHO, Geneva, 2014.
49. Chisti MJ, Parvin I, Ashraf H, Saha H, Matin FB, Pietroni MA. Interstitial lung disease and profound hypoxaemia in a severely-malnourished child with very severe pneumonia and potential lymph-node tuberculosis: an uncommon but serious co-morbidity. *J Health Popul Nutr*. 2013;31(1):133-7.

50. Chuang E, Wenowe WJ, Piccoli DA, Altschuler SM, Liacouras CA. Intravenous sedation in paediatric upper gastrointestinal endoscopy. *Gastrointest Endosc* 1995; 42: 156±160.
51. Clarkson K, Power CK, O'Connell F, Pathmakanthan S, Burke CM. A comparative evaluation of propofol and midazolam as sedative agents in fiberoptic bronchoscopy. *Chest* 1993; 104: 1029±1031.
52. Daniel TM. The rapid diagnosis of tuberculosis: a selective review. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1990;116(3):277-282.
53. De Blasio F, Daughton D, Thompson A, et al. General versus local anaesthesia. *Chest* 1993; 104: 1032±1037.
54. de Blic J, Blanche S, Danel C, Le Bourgeois M, Caniglia M, Scheinmann P. Bronchoalveolar lavage in HIV infected patients with interstitial pneumonitis. *Arch Dis Child* 1989; 64: 1246±1250.
55. de Blic J, McKelvie P, Le Bourgeois M, Blanche S, Benoist MR, Scheinmann P. Value of bronchoalveolar lavage in the management of severe acute pneumonia and interstitial pneumonitis in the immunocompromised child. *Thorax* 1987; 42: 759±765.
56. Detjen AK, DiNardo AR, Leyden J, et al. Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Respir Med* 2015; 3:451–461.
57. Dheda K, Udwardia ZF, Huggett JF, et al. Utility of the antigen-specific interferon-gamma assay for the management of tuberculosis. *Curr Opin Pulm Med* 2005; 11:195–202.
58. Dheda K, van Zyl-Smit K, Meldau R, et al. Quantitative lung T cell responses aid the rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Thorax* 2009; 64:847–853.
59. Diel R, Goletti D, Ferrara G, et al. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: a systematic review and meta-analysis. *The European respiratory journal*. 2011;37(1):88-99.
60. Dodd, PJ, Yuen, CM et al. The global burden of tuberculosis mortality in children: a mathematical modelling study, *Lancet Glob Health* 2017;5:e898-e906
61. Dominguez J, Ruiz-Manzano J, De Souza-Galvao M, et al. Comparison of two commercially available gamma interferon blood tests for immunodiagnosis of tuberculosis. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2008;15(1):168-171.

62. Dosanjh DP, Hinks TS, Innes JA, et al. Improved diagnostic evaluation of suspected tuberculosis. *Annals of internal medicine*. 2008;148(5):325-336.
63. Duarte R, Silva DR, Rendon A, Alves TG, Rabahi MF, Centis R, et al. Eliminating tuberculosis in Latin America: making it the point. *J Bras Pneumol*. 2018;44(2):73-76.
64. Dye C, Scheele S, Dolin P, et al. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO global surveillance and monitoring project. *JAMA* 1999; 282:677–686.
65. Dye C. Global epidemiology of tuberculosis. *Lancet* (London, England). 2006;367(9514):938-940.
66. Getahun H, Matteelli A, Abubakar I, Aziz MA, Baddeley A, Barreira D, et al. Management of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: WHO guidelines for low tuberculosis burden countries. *Eur Respir J*. 2015;46(6):1563-76
67. Ghows M, Rosen M, Chciang M, Sacks H. Transcutaneous oxygen monitoring during fiberoptic bronchoscopy. *Chest* 1986; 89: 543±54.
68. Giacomini G, Miranda JR, Pavan AL, et al. Quantification of pulmonary inflammatory processes using chest radiography: tuberculosis as the motivating application. *Medicine* 2015; 94:e1044.
69. Goletti D, Carrara S, Butera O, et al. Accuracy of immunodiagnostic tests for active tuberculosis using single and combined results: a multicenter TBNET-Study. *PloS one*. 2008;3(10):e3417.
70. Greco S, Girardi E, Navarra A, et al. Current evidence on diagnostic accuracy of commercially based nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Thorax* 2006; 61:783–890.
71. Greco S, Rulli M, Girardi E, et al. Diagnostic accuracy of in-house PCR for pulmonary tuberculosis in smear-positive patients: meta-analysis and meta-regression. *J Clin Microbiol* 2009; 47:569–576.
72. Grigg J, van den Borre C, Malfroot A, Pierard D, Wang D, Dab I. Bilateral fiberoptic bronchoalveolar lavage in acute unilateral lobar pneumonia. *J Pediatr* 1993; 122: 606±608.
73. Guyot-Revol V, Innes JA, Hackforth S, et al. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in tuberculosis patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173:803–810.

74. Haddad R, et al. Dynamics of thymus-colonizing cells during human development. *Immunity* 2006; 24, 217–230.
75. Hanna BA, Ebrahimzadeh A, Elliott LB, et al. Multicenter evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria. *Journal of clinical microbiology*. 1999;37(3):748-752.
76. Hebel K, et al. CD4+ T cells from human neonates and infants are poised spontaneously to run a nonclassical IL-4 program. *J. Immunol* 2014;192, 5160–5170.
77. Hillemann D, Rusch-Gerdes S, Boehme C, Richter E. Rapid molecular detection of extrapulmonary tuberculosis by the automated GeneXpert MTB/RIF system. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(4):1202-5.
78. Hillemann D, Weizenegger M, Kubica T, et al. Use of the geno-Type MTB DR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol* 2005; 43:3699–3703.
79. Jafari C, Ernst M, Kalsdorf B, et al. Rapid diagnosis of smear-negative tuberculosis by bronchoalveolar lavage enzyme-linked immunospot. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006;174(9):1048-1054.
80. Jafari C, Ernst M, Kalsdorf B, Lange C. Comparison of molecular and immunological methods for the rapid diagnosis of smear-negative tuberculosis. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. 2013;17(11):1459-1465.
81. Jafari C, Ernst M, Strassburg A, et al. Local immunodiagnosis of pulmonary tuberculosis by enzyme-linked immunospot. *The European respiratory journal*. 2008;31(2):261-265.
82. Jafari C, Thijsen S, Sotgiu G, et al. Bronchoalveolar lavage enzyme-linked immunospot for a rapid diagnosis of tuberculosis: a Tuberculosis Network European Trialsgroup study. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2009;180(7):666-673.
83. Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nature reviews Immunology*. 2002;2(4):251-262.
84. Khalil KF, Butt T. Diagnostic yield of bronchoalveolar lavage gene Xpert in smear-negative and sputum-scarce pulmonary tuberculosis. *J Coll Physicians Surg Pak* 2015; 25:115–118.

85. Klech H, Pohl W and the European Society of Pneumology Task Group on BAL. Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage (BAL). *Eur Respir J* 1989; 2: 561±585.
86. Ko Y, Lee HK, Lee YS, et al. Accuracy of Xpert(®) MTB/RIF assay compared with AdvanSure™ TB/NTM real-time PCR using bronchoscopy specimens. *Int J Tuberc Lung Dis* 2016; 20:115–120.
87. Koller et al (2003) *Clin. Exp. Immunol.*, 132(2): 225-231.
88. Kozak EA, Brath LK. Do "screening" coagulation tests predict bleeding in patients undergoing fiberoptic bronchoscopy with biopsy? *Chest* 1994; 106: 703±705.
89. Lalvani A, Brookes R, Wilkinson RJ, et al. Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8+ T lymphocytes specific for Mycobacterium tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(1):270-275.
90. Lalvani A, Pathan AA, McShane H, et al. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen-specific T cells. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;163(4):824-828.
91. Lange C, Mori T. Advances in the diagnosis of tuberculosis. *Respirology* 2010; 15:220–240.
92. Li H, Yang L, Zheng CY, et al. Use of bronchoalveolar lavage enzyme-linked immunospot for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2012; 16:1668–1673.
93. Liebeschuetz S, Bamber S, Ewer K, et al. Diagnosis of tuberculosis in South African children with a T-cell-based assay: a prospective cohort study. *Lancet* 2004; 364:2196–2203.
94. Ling DI, Flores LL, Riley LW, et al. Commercial nucleic-acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: meta-analysis and meta-regression. *PLoS One* 2008; 3:e1536.
95. Lönnroth K, Migliori GB, Abubakar I, D'Ambrosio L, de Vries G, Diel R, et al. Towards tuberculosis elimination: an action framework for low-incidence countries. *Eur Respir J*. 2015;45(4):928-52.
96. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet (London, England)*. 2012;380(9859):2095-2128.

97. Mack U, Migliori GB, Sester M, et al. LTBI: latent tuberculosis infection or lasting immune responses to *M. tuberculosis*? A TBNET consensus statement. *The European respiratory journal*. 2009;33(5):956-973.
98. Malfoot A, Lanciers S, Ahlenajafi N, Dab I. Is bronchoalveolar lavage safe in acute airway infection in children? *Eur Respir J* 1995; 8: 521A.
99. Marais BJ, Tadolini M, Zignol M, Migliori GB. Paediatric tuberculosis in Europe: lessons from Denmark and inclusive strategies to consider. *Eur Respir J*. 2014 Mar;43(3):678-84.
100. Marcy TW, Merrill WW, Rankin JA, Reynolds HY. Limitations of urea to quantify epithelial lining fluid by bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 1276±1280.
101. Mazurek GH, Jereb J, Vernon A, et al. Updated guidelines for using interferon gamma release assays to detect mycobacterium tuberculosis infection-United States. *MMWR Recomm Rep* 2010; 59:1–25.
102. McCubbin MM, Trigg ME, Hendricker CM, Wagener JS. Bronchoscopy with bronchoalveolar lavage in the evaluation of pulmonary complications of bone marrow transplantation in children. *Pediatr Pulmonol* 1992; 12: 43±47.
103. Meier et al (2005) *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 24: 529-536.
104. Metcalfe JZ, Everett CK, Steingart KR, et al. Interferon-gamma release assays for active pulmonary tuberculosis diagnosis in adults in low- and middle-income countries: systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis* 2011; 204 (suppl 4):1120–1129.
105. Midulla F, Villani A, Merolla R, Bjermer L, Sandstrom T, Ronchetti R. Bronchoalveolar lavage studies in children without parenchymal lung disease: cellular constituents and protein levels. *Pediatr Pulmonol* 1995; 20: 112±118.
106. Montravers P, Ganzit R, Flombret MC, Blanchet F, Desmonts JM. Cardiopulmonary effects of bronchoalveolar lavage in critically ill patients. *Chest* 1993; 104: 1541± 1547.
107. Mordelet-Dambrine M, Arnoux A, Stanislas-Leguern G, Sandron D, Chretien J, Huchon G. Processing of lung lavage fluid causes variability in bronchoalveolar cell count. *Am Rev Respir Rev* 1984; 130: 305±306.
108. Murray CJ, Ortblad KF, Guinovart C, et al. Global, regional, and national incidence and mortality for HIV, tuberculosis, and malaria during 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet (London, England)*. 2014;384(9947):1005-1070.

109. Newton SM, Brent AJ, Anderson S, Whittaker E, Kampmann B. Paediatric tuberculosis. *The Lancet Infectious diseases*. 2008;8(8):498-510.
110. Nicol MP, Davies MA, Wood K, et al. Comparison of T-SPOT.TB assay and tuberculin skin test for the evaluation of young children at high risk for tuberculosis in a community setting. *Pediatrics*. 2009;123(1):38-43.
111. Nicol MP, Kampmann B, Lawrence P, et al. Enhanced anti-mycobacterial immunity in children with erythema nodosum and a positive tuberculin skin test. *The Journal of investigative dermatology*. 2007;127(9):2152-2157.
112. Nicol MP, Pienaar D, Wood K, et al. Enzyme-linked immunospot assay responses to early secretory antigenic target 6, culture filtrate protein 10, and purified protein derivative among children with tuberculosis: implications for diagnosis and monitoring of therapy. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2005;40(9):1301-1308.
113. Nicol MP, Wilkinson RJ. The clinical consequences of strain diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2008;102(10):955-965.
114. Novello A Jr, Barbato A. The use of bronchoscopy in the neonatal intensive care unit. In: Barbato A, Landau L, Scheinmann P, Warner JO, Zach M, eds. *The Bronchoscope - Flexible and Rigid - in Children*. Treviso/Italy, Arcari, 1995; pp. 55±60.
115. Oliwa J, Karumbi J, Marais BJ, Madhi SA, Graham S. Tuberculosis as a cause or comorbidity of childhood pneumonia in tuberculosis-endemic countries: a systematic review. *Lancet Resp Med* 2015; 3: 235-43
116. Otu A, Hashmi M, Mukhtar AM, Kwizera A, Tiberi S, Bacrae B, et al. The critically ill patient with tuberculosis in intensive care: clinical presentations, management and infection control. *J Crit Care* 2018;45:184–196
117. Padovan CS, Behr J, Allmeling AM, Tilman Gerlach J, Vogelmeier C, Krombach FP. Immunophenotyping of lymphocyte subsets in bronchoalveolar lavage fluid- comparison of flow cytometric and immunocytochemical techniques. *J Immunol Methods* 1992; 147: 27±32.
118. Pai M, O'Brien R. New diagnostics for latent and active tuberculosis: state of the art and future prospects. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2008;29(5):560-568.

119. 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; 149:177–184.
120. Pang C, Wu Y, Wan C, Shen K, Hu Y, Yang T, et al. Accuracy of the Bronchoalveolar Lavage Enzyme-Linked Immunospot Assay for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: A Meta-analysis. *Medicine*. 2016;95(12):e3183.
121. Pang CS, Shen YC, Tian PW, et al. Accuracy of the interferon-gamma release assay for the diagnosis of tuberculous pleurisy: an updated meta-analysis. *PeerJ* 2005; 3:e951.
122. Pingleton AK, Harrison GF, Stechschulte DJ, Wesselius LJ, Kerby GR, Ruth WE. Effect of location, pH and temperature of instillate in bronchoalveolar lavage in normal volunteers. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128: 1035±1037.
123. Pirozynski M, Siwinski P, Polubiez M, Zieinski J, Radwan L. Atropine influences bronchoalveolar lavage induced arterial oxygen desaturation. *Eur Respir J* 1988; 1 (Suppl. 2): 312s.
124. Plan to Stop TB in 18 High-priority Countries in the WHO European Region, 2007–2015 – <http://www.euro.who.int/en/what-we-publish/abstracts/plan-to-stop-tb-in-18-high-priority-countries-in-the-who-european-region,-2007-2015>
125. Pohunek P, Pokorna H, Striz I. Comparison of cell profiles in separately evaluated fractions of bronchoalveolar lavage (BAL) fluid in children. *Thorax* 1996; 51: 615± 618.
126. Prakash UBS. Does the bronchoscope propagate infection? *Chest* 1993; 104: 552±559.
127. Raeder JC, Misvaer G. Comparison of propofol induction with thiopentone in short outpatient general anaesthesia. *Acta Anaesthesiol Scand* 1988; 32: 607±613.
128. Ratjen F, Bredendiek M, Brendel M, Meltzer J, Costabel U. Differential cytology of bronchoalveolar lavage fluid in normal children. *Eur Respir J* 1994; 7: 1865±1870.
129. Ratjen F, Bredendiek M, Zheng L, Brendel M, Costabel U. Lymphocytes subsets in bronchoalveolar lavage fluid of children without bronchopulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 174±178.
130. Ratjen F, Bruch J. Adjustment of bronchoalveolar lavage volume to body weight in children. *Pediatr Pulmonol* 1996; 21: 184±188.
131. Rennard SI, Basset G, Lecossier D, et al. Estimation of volume of epithelial lining fluid recovered by lavage using urea as marker of dilution. *J Appl Physiol* 1986; 60: 532±538.

132. Report of the European Task Force for noncellular components of bronchoalveolar lavage: special considerations in children. *Eur Respir Rev* 1999; 66: 1±157.
133. Reynolds HY, Newball HH. Analysis of proteins and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage. *J Lab Clin Med* 1974; 84: 559±574.
134. Riedler J, Grigg J, Stone C, Tauro G, Robertson CF. Bronchoalveolar lavage cellularity in healthy children. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 163±168.
135. Roy R, Sotgiu G, Altet N, Tsolia M, Ruga E, Velizarova S, Kampmann B. Identifying Predictors of Interferon-gamma Release Assay Results in Pediatric Latent Tuberculosis: A Protective Role of Bacillus Calmette-Guerin? *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, Vol:186, p.378-384 ISSN:1073-449X.
136. Sandgren A, Cuevas LE, Dara M, Gie RP, Grzemska M, Hawkrigde A, et al. Childhood tuberculosis: progress requires an advocacy strategy now. *Eur Respir J*. 2012;40(2):294-7.
137. Sarmiento OL, Weigle KA, Alexander J, Weber DJ, Miller WC. Assessment by meta-analysis of PCR for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(7):3233-3240.
138. Silva DR, Mello FCQ, Kritski A, Dalcolmo M, Zumla A, Migliori GB. Tuberculosis series. *J Bras Pneumol*. 2018 Apr;44(2):71-72.
139. Spach DH, Silverstein FE, Stamm WE. Transmission of infection by gastrointestinal endoscopy and bronchoscopy. *Ann Inf Med* 1993; 118: 117±128.
140. Steingart KR, Ng V, Henry M, et al. Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *The Lancet Infectious diseases*. 2006;6(10):664-674.
141. Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, et al. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2014.
142. Stokes DC, Shenep JL, Parham D, Bozeman PM, Marienchek W, Mackert PW. Role of flexible bronchoscopy in the diagnosis of pulmonary infiltrates in pediatric patients with cancer. *J Pediatr* 1989; 115: 561±567.
143. Strassburg A, Jafari C, Ernst M, Lotz W, Lange C. Rapid diagnosis of pulmonary TB by BAL enzyme-linked immunospot assay in an immunocompromised host. *The European respiratory journal*. 2008;31(5):1132-1135.

144. The BAL Cooperative Group Steering Committee. Bronchoalveolar lavage constituents in healthy individuals, idiopathic pulmonary fibrosis and selected comparison groups. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: S169±S201.
145. The Beijing “Call For Action” On Tuberculosis Control And Patient Care: Together Addressing The Global M/XDR-TB Epidemic – http://www.who.int/tb_beijingmeeting/media/en_call_for_action.pdf
146. The Global Plan to Stop TB 2006-2015 – <http://www.stoptb.org/global/plan/>
147. The Stop TB Strategy – <http://www.who.int/tb/strategy/en/>
148. United Nations Millennium Development Goals – <http://www.un.org/millenniumgoals/>
149. Velizarova Sv. Comparison of T-SPOT.TB and Tuberculin Skin Test in children with tuberculosis of intrathoracic lymph nodes. *Journal of US-China Medical Science*. Jul.-Sep. 2014, Vol. 11, No. 3 (Serial No. 95) p. 115-120, ISSN 1548-6648.
150. Velizarova Sv. Diagnostic value of T- SPOT.TB in infant to 5-year old children with primary forms of tuberculosis. *Journal of US-China Medical Science*, vol.11, number 1-3, march 2014 p.19-26, ISSN 1548-6648.
151. Von Wichert P, Joseph K, Mueller B, Franck WM. Bronchoalveolar lavage. Quantification of intraalveolar fluid? *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 148±152.
152. Wang YS, Ning L, Jiang FP, et al. The application value of TSPOT. TB in bronchoalveolar lavage fluid to diagnose active tuberculosis. *Sichuan Med J* 2014; 35:423–424.
153. Ward C, Duddridge M, Fenwick J, et al. Evaluation of albumin as a reference marker of dilution in bronchoalveolar lavage fluid of asthmatic and control subjects. *Thorax* 1993; 48: 518±522.
154. Ward C, Duddridge M, Fenwick J, et al. The origin of water and urea sampled at bronchoalveolar lavage in asthmatic and control subjects. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 444±447.
155. Weiss S, Hert R, Gianola F, Clark J, Crawford S. Complications of fiberoptic bronchoscopy in thrombocytopenic patients. *Chest* 1993; 104: 1025±1108.
156. WHO European Ministerial Forum: “All against Tuberculosis”: Berlin Declaration on Tuberculosis – http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0008/68795/E91369.pdf
157. WHO, Global Tuberculosis Report, 2017
158. WHO, Global Tuberculosis Report, Geneva, 2016

159. Wilkinson KA, Wilkinson RJ, Pathan A, et al. Ex vivo characterization of early secretory antigenic target 6-specific T cells at sites of active disease in pleural tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2005; 40:184–187.
160. Wilmott RW, Kassab JT, Kilian PL, Benjamin WR, Douglas SO, Wood RE. Increased levels of interleukin-1 washing from children with bacterial pulmonary infections. *Am Rev Resp Dis* 1990; 142: 365±368.
161. Wood RE. Pitfalls in the use of the flexible bronchoscope in paediatric patients. *Chest* 1990; 97: 190±203.
162. World Health Organization, World Health Organization. Policy Update: Xpert MTB/RIF Assay for the Diagnosis of Pulmonary and Extrapulmonary TB in Adults and Children, 2013. 2013.
163. World Health Organization. Best practices in child and adolescent tuberculosis. Document n. WHO/CDS/TB/2018.23. Geneva: World Health Organization; 2018.
164. World Health Organization. Global Tuberculosis report 2018. Document n. WHO/CDS/TB/2018.20. Geneva, World Health Organization, 2018.
165. World Health Organization. Global Tuberculosis Report: WHO Report 2015. WHO/HTM/TB/2015.22.
166. World Health Organization. Rapid Implementation of the Xpert MTB/RIF Diagnostic Test. Technical and Operational ‘How-to’. Practical Considerations. WHO/HTM/TB/2011. 2. World Health Organization: Geneva; 2011.
167. World Health Statistics 2015. Geneva: World Health Organization 2015.
168. Zellweger et al (2005) *Int. J. Tuberculosis and Lung Dis.*, 9(11): 1242-1247.
169. Zetter LK, Jay SM, Fisher NM. The management of pain associated with paediatric procedures. *Pediatr Clin North Am* 1989; 36: 941±964.
170. Zhou Q, Chen YQ, Qin SM, et al. Diagnostic accuracy of T-cell interferon- γ release assays in tuberculous pleurisy: a meta-analysis. *Respirology* 2011; 16:473–480.
171. Zlotoff DA, Schwarz BA, A Bhandoola. The long road to the thymus: the generation, mobilization, and circulation of T-cell progenitors in mouse and man. *Semin. Immunopathol* 2008; 30, 371–382.

Сравняване на диагностичната стойност на IGRA-тест (T-spot.TB) в кръв и в бронхоалвеоларна лаважна течност

Описание

За диагностика на заболяването на Вашето дете ще му бъде взето малко количество венозна кръв и ще му бъде направено бронхоскопско изследване. Поканен(а) сте да участвате в клинично проучване, като дадете съгласие по време на болничния престой на детето Ви да бъде осъществено взимане на венозна кръв и провеждане на бронхоскопско изследване. Освен това, в рамките на проучването, ще трябва да предоставите здравна информация, която ще бъде получена при стандартните медицински грижи за лечението на заболяването. Ще бъдат осъществени медицински прегледи и ще бъдат проучени получените резултати от имунологичния тест (T-spot.TB) в кръв и в бронхоалвеоларна лаважна течност.

Цел

Въвеждане в България на нов подход при имунологичната верификация на туберкулозното инфектиране и заболяване в детска възраст с потенциал да подобри диагностиката му.

Процедура

В рамките на предвидения болничен престой на Вашето дете ще се направи имунологично изследване (T-spot.TB) на венозна кръв (около 8 мл, взета от периферен венозен съд) и на бронхоалвеоларна лаважна течност (около 30 мл, взета посредством бронхоскопско изследване). Целта на тези изследвания е по-добрата и бърза диагностика на туберкулозното заболяване и по-ранното започване на противотуберкулозно лечение при Вашето дете.

Рискове

Според научната литература, усложнения от бронхоскопията се срещат в около 10% от случаите. От тях 48% са вследствие трансбронхиална белодробна биопсия – не се провежда в настоящото изследване.

Основните рискове при бронхоскопия са: ларингоспазъм; конвулсивна кашлица; бронхоспазъм; кръвене; инфекция;

При процедурата съществува и известен риск от появата на: аритмия; проблеми с дишането; треска; сърдечен пристъп при хора с предшестващо сърдечно заболяване; пневмоторакс; пневмомедиастинум; възпаление на гърлото; травматично увреждане на ларинкса и бронхите; подкожен емфизем; въздушна емболия; Рисковете, свързани с общата анестезия (ако се прилага такава) включват: токсични алергични реакции от анестетика; мускулна болка; промени в артериалното налягане; понижаване на сърдечната честота; гадене, повръщане.

Ползи

Да се подобри и ускори диагностиката на туберкулозното заболяване в детска възраст.

Поверителност

Имате право на анонимност и цялата информация, получена във връзка с това проучване, която може да идентифицира детето Ви, ще бъде запазена в тайна в съответствие с българското законодателството. Изследователският екип поема задължението да съхранява и пази в тайна документацията по това проучване. Специфична изследователска информация ще бъде предоставена на лекари от МБАЛББ „Св. София” ЕАД, гр. София. Вашето дете няма да бъде идентифицирано по име. Ако информация относно заболяването му бъде публикувана като част от данните, получени от това проучване, имената и идентифициращата информация няма да бъдат разкрити.

Права

Ако се съгласите да участвате в проучването, Ви предоставяте съгласие за осъществяване на описаната процедура върху Вашето дете и давате права за ползване на събраната информация на изследователския екип. Тази информация ще бъде обработена и анализирана без да се налага

допълнително одобрение или съгласие от Ваша страна.

Стойност

Вие няма да бъдете финансово компенсирани(а) за участието на Вашето дете в проучването, както и за диагностичните изследвания, които са част от стандартната диагностика и лечение на заболяването. Вие/Вашата здравна осигуровка, според българското законодателство, ще поемете/поеме разходите, свързани с обичайните грижи по заболяването. Някои консумативи за настоящото проучване ще бъдат покрити от настоящия проект.

Въпроси

Член на изследователския екип Ви е разяснил това проучване и е отговорил на въпросите Ви. Ако имате някакви други въпроси относно проучването, можете да се обадите на посочения телефон.

Усложнения

Лечението на възможни усложнения, свързани с бронхоскопското изследване, ще бъдат осъществени в рамките на болничния престой, като ще бъдат финансирани по бюджетна линия на МЗ (по този начин се финансира и стандартната диагностика на заболяването и лечение на Вашето дете).

Доброволно участие

Участието на Вашето дете в това клинично проучване е доброволно. Отказът от участие няма да бъде свързан със загуба на ползи или намеса в грижите за здравето му.

Човешки права в медицинските изследвания

Законодателството изисква да бъдете информиран(а) относно:

1. Същността и целта на проучването.
2. Процедурите и методите, които следва да бъдат приложени.
3. Неразположенията и рисковете, които биха могли да бъдат очаквани при провеждането на проучването.
4. Ползите, които биха могли да бъдат очаквани от проучването.
5. Възможността да се задават всякакви въпроси относно проучването.
6. Възможността да откажете участие или да се оттеглите във всеки един от етапите на проучването без това да повлияе на грижата за здравето на Вашето дете.
7. Да получите копие от писменото информирано съгласие за това проучване.
8. Възможността да дадете съгласие за участие - свободно, без принуда.
9. Отговорност при евентуални усложнения, възникнали във връзка с проучването.

Ако имате някакви въпроси относно тези права или характера на проучването, можете да ги обсъдите с лице, провеждащо изследването на тел. +359 887 931 009.

ИНФОРМИРАНО СЪГЛАСИЕ

Бях изчерпателно информиран(а) и беше възможно да задам всички възникнали въпроси относно настоящото проучване, на които получих задоволителен отговор.

След обмисляне на предоставената ми информация, съм съгласен(на) детето ми да участва доброволно в настоящото проучване.

ИМЕ НА ПАЦИЕНТА; НАВЪРШЕНИ ГОДИНИ

ПОДПИС

ДАТА

ИМЕ НА РОДИТЕЛЯ (НАСТОЙНИКА)

ПОДПИС

ДАТА

ИМЕ НА ИЗСЛЕДОВАТЕЛЯ

ПОДПИС

ДАТА

