

## ВЫЯВЛЕНИЕ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА В КРОВИ КАК МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОГО ТУБЕРКУЛЕЗА У ПАЦИЕНТОВ С ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ

В.Н. Зими́на<sup>1</sup>, О.Е. Ми́кова<sup>2</sup>, Т.А. Ва́рецкая<sup>2</sup>, Д.А. Обо́рин<sup>2</sup>, А.Г. Зе́мсков<sup>3</sup>, С.Ю. Де́гтярева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

<sup>2</sup>Пермский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, Пермь, Россия

<sup>3</sup>Пермская краевая клиническая инфекционная больница, Пермь, Россия

### Detection of Mycobacterium tuberculosis in blood for diagnosis of generalised tuberculosis in HIV-positive patients

V.N. Zimina<sup>1</sup>, O.E. Mikova<sup>2</sup>, T.A. Varetskaya<sup>2</sup>, D.A. Oborin<sup>2</sup>, A.G. Zemskov<sup>3</sup>, S.Yu. Degtyareva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Russian University of Peoples' Friendship, Moscow, Russia

<sup>2</sup>Perm Regional Center for Prevention and Control of AIDS and infectious diseases, Perm, Russia

<sup>3</sup>Perm Regional Clinical Infection Hospital, Perm, Russia

#### Резюме

**Цель:** изучить информативность культурального исследования крови на МБТ у больных ВИЧ-инфекцией с подозрением на туберкулезный сепсис и определить наиболее значимые предтестовые клинико-лабораторные критерии.

**Материалы и методы:** обследование для выявления микобактерий в крови выполнено 159 больным ВИЧ-инфекцией с подозрением на туберкулезный сепсис. Посев крови производили на среду Myco/F Lytic Culture Vials и помещали в гемоанализатор BACTEC 9050.

**Результаты:** микобактериальная инфекция кровотока выявлена у 19 пациентов (11,9% от числа тестируемых): у 18 человек обнаружен рост *M. tuberculosis complex* (25,3% от числа больных туберкулезом) и у одного больного – *Mycobacterium avium complex* (0,6% от числа тестируемых). Выявлено, что вероятность бактериемии наиболее связана с тяжестью состояния пациента; иммуносупрессией менее 100 клеток/мкл; снижением уровня гемоглобина менее 90 г/л (уровни были определены посредством поиска наиболее значимых порогов). Не удалось доказать, что менингоэнцефалит чаще развивается у лиц с подтвержденной бактериемией. Достоверных различий по частоте выявления МБТ в мокроте у больных с туберкулезным сепсисом и без него выявить не удалось.

**Ключевые слова:** ВИЧ-инфекция, туберкулез, микобактериальная бактериемия, туберкулезный сепсис, МБТ-бактериемия, гемокультура, инфекция кровотока.

#### Введение

Первые данные о возможности выявления возбудителя туберкулеза из образцов крови появились в начале XX в. Однако в течение нескольких десятилетий исследование практически не применялось в диагностике туберкулеза. Это было связано с чрезвычайно редким обнаружением микобактерий, зна-

#### Abstract

**Objective:** To study the informative value of the detection of mycobacteria in blood with the cultural method in patients with suspected tuberculous sepsis and to determine the most significant clinical and laboratory criteria for testing.

**Materials and methods:** The investigation to detect *M. tuberculosis* was fulfilled in 159 HIV-positive patients with suspected tuberculosis sepsis. Blood culture was completed with culture medium Myco/F Lytic Culture Vials and analyzer BACTEC 9050.

**Results:** Mycobacteria were detected in blood of 19 patients (11,9% of all patients): in 18 patients the growth of *M. tuberculosis complex* was detected (25,3% of all patients with diagnosed tuberculosis) and in 1 patient it was *Mycobacterium avium complex* (0,6% of all patients). It was shown, that the probability of *M. tuberculosis* detection was especially associated with the severity of the disease, immunosuppression (less than 100 cells/mkl), hemoglobin quantity less than 90 g/l (levels were determined through the seeking for the most significant cutoffs). It was not proofed, that meningoencephalitis develops more often in patients with proven bacteremia. There were no evident differences in detection frequency of mycobacteria in sputum between patients with tuberculous sepsis and without it.

**Key words:** HIV-infection, tuberculosis, mycobacterial bacteremia, tuberculous sepsis, MBT-bacteremia, blood culture, bloodstream infection.

чительными ограничениями, связанными с техническими сложностями при посеве крови на плотные среды, а также с частой контаминацией крови микроорганизмами, находящимися на коже пациента [1, 2].

Однако уже в первые годы эпидемии ВИЧ-инфекции культуральное исследование крови стало широко применяться как для диагностики туберкулезного сепсиса, так (даже чаще) и для вы-

явления генерализованной инфекции, вызванной *Mycobacterium avium complex* (МАК-инфекции) [3].

По результатам ряда исследований в странах Африки и Юго-Восточной Азии основным патогеном среди инфекций кровотока у людей, живущих с ВИЧ, регистрировали *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) (23–54%). Вероятность выявления микобактерии в крови у ВИЧ-инфицированных пациентов варьирует от 5 до 30% от числа исследованных образцов [4, 5].

В настоящее время для выделения микобактерий из кровотока используется несколько анализаторов: ВАСТЕС 13А (Becton Dickinson, Sparks, Md.), ВАСТЕС Myco/FLytic (Becton Dickinson), BacT/AlertMB (bioMérieux, Durham, N.C.) и ISO-LATOR 10 (Wampole Laboratories, Cranbury, N.J.). Выделение микобактерий из крови с помощью других автоматизированных систем не рекомендуется производителями.

Несмотря на проводимые исследования в направлении выявления микобактерий из крови, все же про природу бактериемии, в особенности вызванной МБТ, известно далеко не все. До настоящего времени ограничены сведения о правильности забора материала и оптимальной кратности исследования крови (с учетом стоимости метода). До сих пор не решен вопрос о месте культурального исследования крови для выявления микобактерий (МБТ/МАК) в алгоритме обследования больных ВИЧ-инфекцией.

**Цель исследования** — изучить информативность культурального исследования крови на МБТ у больных ВИЧ-инфекцией с подозрением на туберкулезный сепсис и определить наиболее значимые предгестовые клинико-лабораторные критерии, при наличии которых наиболее вероятно выявление микобактерий в крови.

#### Материалы и методы

Обследование для выявления микобактерий в крови выполнено 159 больным ВИЧ-инфекцией с подозрением на туберкулезный сепсис, госпитализированных в Пермскую краевую клиническую инфекционную больницу в период с 01.07.14 г. по 01.08.15 г.

Культуральное исследование крови для выявления микобактерий назначалось при наличии следующих клинических критериев: тяжелое состояние больного и/или лихорадка выше 38,5°C при выявлении изменений в легких, расцененных рентгенологом как подозрительные на туберкулез, или отсутствие четко визуализируемых изменений в легких на рентгенограмме органов грудной клетки.

Алгоритм работы с гемокультурой был следующим:

а) производили посев крови на среду Мусо/FLytic Culture Vials и помещали в гемоанализатор ВАСТЕС 9050 (США);

б) положительные пробы подвергали дальнейшим исследованиям:

1) посев на кровяной агар, среду Сабуро, среду для контроля стерильности;

2) микроскопию по Циль-Нильсену и люминесцентным методом;

3) постановку ID — теста *M. tuberculosis complex*;

4) посев на плотную питательную среду Левенштейна — Йенсена;

5) посев на жидкую питательную среду Мидлбрук (ВАСТЕС 960Б США).

в) при наличии роста на питательных средах дальнейшее исследование проводилось согласно традиционному алгоритму бактериологического исследования на МБТ, представленного в приказе Минздрава РФ от 21.03.2003 № 109. При сомнительных и спорных результатах подтверждение видовой идентификации возбудителя проводилось при помощи ПЦР реального времени с использованием системы «АмплиТуб-РВ-Скрин» (Россия)

Помимо культурального исследования крови на МБТ, диагностический алгоритм включал двукратное исследование мокроты на КУМ/МБТ тремя методами: люминесцентной микроскопией, выявления ДНК МБТ в ПЦР реального времени с использованием системы «АмплиТуб-РВ-Скрин» («Синтол», Россия) и посевом с использованием автоматизированной системы ВАСТЕС MGIT 960 (с контрольным посевом на плотные среды).

Данные о результатах обследования каждого пациента вносились в специально разработанную базу данных электронной таблицы Microsoft Excel 2003. Кроме информации о исследовании на МБТ, из истории болезни вносились все сведения, которые можно получить при сборе анамнеза и рутинном обследовании пациента.

#### Статистический анализ

Статистический анализ проводили с помощью программы Statistica v.6, также использовали вычислительные и графические возможности электронной таблицы Excel.

Построили модель дискриминантного анализа, позволяющую с помощью факторов (переменных), включенных в анализируемые данные, провести классификацию между группами интереса.

Для оценки влияния уровня гемоглобина и количества CD4+ лимфоцитов на вероятность выявления МБТ в крови была проведена группировка и поиск наиболее четких порогов. Анализ таблиц сочетанных частот проводили методом Хи-квадрат и точным двусторонним критерием Фишера. Приведены значения непараметрического коэффициента корреляции Гамма, позволяющие учитывать повторяющиеся значения.

Отличие времен выживания между группами оценивали с помощью кривых Каплана – Мейера и непараметрического теста Вилкоксона. Проводили разведочный корреляционный и кластерный анализ методом Варда по коэффициентам корреляции.

При  $p < 0,05$  считали, что статистические различия достоверны.

## Результаты и обсуждение

### Характеристика пациентов

Туберкулез установлен 71 (67,1%) пациенту от числа обследованных: доказанный – 67 больным (у 62 выявлен возбудитель, у 6 диагноз подтвержден результатами аутопсии); вероятный – в 3 случаях. Наблюдение за больными продолжалось до 01.01.2016 г. (72 недели).

При исследовании мокроты тремя методами МБТ или ее генетический материал были выявлены у 59 больных (83,1%): методом микроскопии у 21 (29,5%); методом ПЦР у 38 (53,5%); культуральным методом у 49 (69,0%) пациентов. Несмотря на более высокую чувствительность культуральных методов выявления МБТ, в 5 случаях ДНК МБТ в мокроте выявляли при отрицательных или неинформативных результатах посева.

Положительный результат посева крови на микобактерии получен в 19 наблюдениях (11,9% от числа тестируемых); у 18 человек обнаружен рост *M. tuberculosis complex* (25,3% от числа больных туберкулезом) и у одного больного – *Mycobacterium avium complex* (0,6% от числа тестируемых).

Проведен анализ различий среди больных туберкулезом с положительным и отрицательным результатами гемокультуры. Основную группу (ОГ) составили 18 пациентов с наличием туберкулезной микобактериемии, группу сравнения (ГС) – 53 человека без бактериемии. Пациентов основной группы условно признаем как больных с туберкулезным сепсисом (термин неакадемический).

Характеристики пациентов на момент тестирования представлены в таблице 1.

### Сравнительный анализ выявления МБТ в крови и в мокроте

В мокроте МБТ одним из трех методов этиологического обследования на туберкулез удалось выявить у подавляющего большинства пациентов в группах сравнения (83,3 и 79,6% соответственно). Однако быстрыми методами (ПЦР и люминесцентной микроскопией) только у половины больных (44,4 и 55,5% соответственно). Достоверных различий по частоте выявления МБТ в мокроте у больных с туберкулезным сепсисом и без него выявить не удалось. Таким образом, среди больных с положительной гемокультурой в большинстве случаев выявить возбудителя удавалось из мокроты, а

положительный анализ крови стал самостоятельным критерием этиологического подтверждения диагноза только у трех пациентов (16,6%).

Таблица 1

### Общая характеристика пациентов в группах сравнения

Характеристика пациента	ОГ	ГС
Женщины	6 (33,4%)	23 (43,4%)
Возраст, годы $\pm$ SD	32,92 $\pm$ 3,76	34,17 $\pm$ 3,41
Медиана CD4+ клеток/мкл	38	92
Больных с CD4 менее 100 клеток/мкл	15 (83,3%)	27 (50,9%)
Гемоглобин M $\pm$ SD*	90,11 $\pm$ 14,7	105,5 $\pm$ 18,8
Индекс массы тела M $\pm$ SD*	21,37 $\pm$ 3,44	21,2 $\pm$ 2,9
МЛС** последние 5 лет	5 (27,7%)	14 (26,4%)
ПИН***	13 (72,2%)	44 (81,5%)
HBV и/или HCV	17 (94,4%)	48 (88,9%)
ТБ менингоэнцефалит	3 (16,6%)	6 (11,1%)
Состояние удовлетворительное	–	3 (5,7%)
Состояние средней степени тяжести	13 (72,9%)	44 (83,0%)
Состояние тяжелое	5 (27,8%)	6 (11,3%)
МБТ+, мазок мокроты	4 (22,2%)	17 (31,5%)
ДНК МБТ+, из мокроты	8 (44,4%)	30 (55,5%)
МБТ+, культура из мокроты	15 (83,3%)	37 (68,5%)
МБТ+ любым методом из мокроты	15 (83,3%)	43 (79,6%)

\* M – среднее значение; SD-стандартное отклонение.

\*\* МЛС – места лишения свободы.

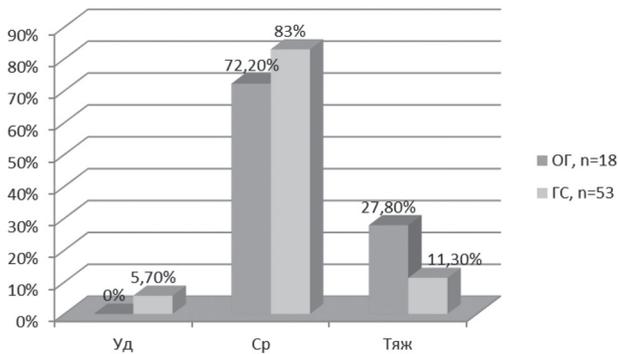
\*\*\* ПИН – потребитель инъекционных наркотиков.

### Базовые предикторы МБТ-бактериемии

Потенциальными предикторами положительного результата гемокультуры были выбраны: пол; возраст; факт потребления инъекционных наркотиков; факт нахождения в МЛС в последние 5 лет; количество CD4+ лимфоцитов на момент развития туберкулеза; индекс массы тела; тяжесть состояния; лейкоцитоз более  $10 \times 10^9$ /л или лейкопения менее  $3 \times 10^9$ /л; развитие туберкулезного менингоэнцефалита.

Распределение больных по полу и возрасту в группах достоверно не отличалось. Различий в доле пациентов, заразившихся ВИЧ при употреблении инъекционных наркотиков, и больных, страдавших хроническими вирусными гепатитами, среди пациентов сравниваемых групп также выявлено не было. Не было различий и по частоте регистрации туберкулезного менингоэнцефалита как наиболее значимого критерия, связанного с неблагоприятным исходом у больных ко-инфекцией (ВИЧ-и/ТБ).

При построении корреляционной матрицы (использовали непараметрический коэффициент Гамма) выявлена связь наличия бактериемии с тяжестью состояния больного ( $r=0,56$ ), а также наличия лейкоцитоза или лейкопении ( $r=0,56$ ) и иммуносупрессии менее 100 клеток/мкл ( $r=0,52$ ) (рис. 1).



**Рис. 1.** Распределение больных групп сравнения в зависимости от тяжести состояния на момент госпитализации

Дискриминантный анализ показал, что вероятность обнаружения МБТ в крови тесно не связана с каким-то одним анализируемым критерием и зависит от комплексной информации о пациенте. Однако анализ таблиц сочетанных частот выявил, что наиболее значимым предиктором обнаружения МБТ в мокроте являются степень иммуносупрессии и анемия.

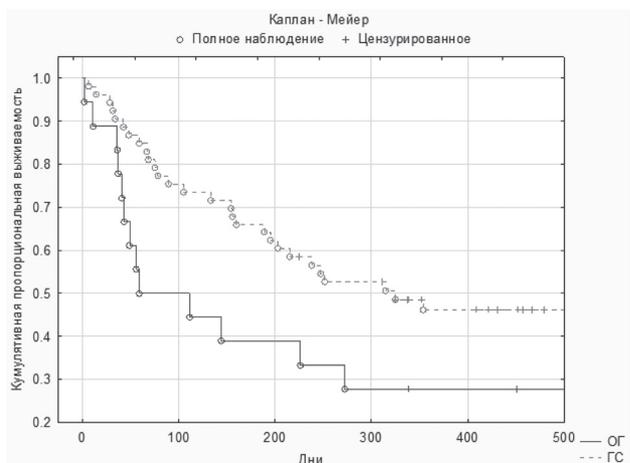
Исходное количество CD4+ лимфоцитов значительно различалось в группах сравнения (38 и 92 клеток/мкл по медиане в ОГ и ГС). Среди больных с глубоким иммунодефицитом (CD4 – менее 100 клеток/мкл) больных с туберкулезным сепсисом было достоверно больше (ХИ-квадрат = 5,83, с.с. = 1,  $p=0,016$ ,  $p<0,05$ ). Отмечена тесная корреляционная связь между этими лабораторными критериями ( $r=-0,656$ ). Уровень в 100 клеток/мкл был определен посредством поиска наиболее значимого порога.

Вторым статистически значимым фактором, связанным с бактериемией, оказалась анемия. Так, среди больных с положительной гемокультурой число лиц с уровнем гемоглобина менее 90 г/л (был выбран порог, который, согласно классификации, соответствует анемии средней степени тяжести) встречалось достоверно чаще, чем среди пациентов группы сравнения (Хи-квадрат = 5,67, степень свободы = 1,  $p=0,017$ ,  $p<0,05$ ). Отмечена отрицательная корреляция между анемией и обнаружением МБТ в крови ( $r=-0,585$ ). При попытке смещения выбранного порога гемоглобина до 95 г/л выявленная зависимость стала еще более показательной (Хи-квадрат = 11,64, с.с. = 1,  $p=0,00065$ ,  $p<0,05$ ;  $r=-0,745$ ).

### Выживание в группах сравнения (72 недели наблюдения)

В обеих группах наблюдали чрезвычайно высокий уровень летальности. За период наблюдения в группе больных с бактериемией умерло 13 (72,2%), а в группе сравнения 28 (52,8%) человек.

Проведен анализ выживаемости по методу Каплан – Мейера (рис. 2). Первый квартиль выживаемости для групп сравнения составил 39 дней для ОГ и 93 для ГС, а медиана – 59 и 318 дней соответственно. Выявлено, что кривые выживаемости для групп сравнения статистически различаются ( $p<0,05$ ).



**Рис. 2.** Кривые выживаемости по методу Каплан – Мейера для групп сравнения

Результаты исследования показали, что микобактериальная инфекция кровотока у ВИЧ-инфицированных пациентов Пермского края встречается достаточно часто. Рост МБТ из этого биосубстрата удалось получить у каждого четвертого больного туберкулезом с подозрением на туберкулезный сепсис и более чем у каждого десятого от числа обследованных. Любопытным оказался факт, что бактериемия, вызванная *Mycobacterium avium complex*, была зарегистрирована лишь в одном случае. Важно отметить, что «золотым стандартом» диагностики генерализованной МАК-инфекции у ВИЧ-инфицированных является именно культуральное исследование крови. Имеются сведения, что *Mycobacterium avium complex* способны не только определяться, но и размножаться в крови в условиях автоматизированных гемоанализаторов, тогда как МБТ в крови не реплицируются [6]. Такое соотношение выявления видов микобактерий (МБТ/МАК) из кровотока больше характерно для популяции пациентов Южной Африки и Юго-Восточной Азии, нежели для Западно-Европейского региона, где ситуация диаметрально противоположная [5, 7].

Учитывая относительно небольшую выборку сравниваемых пациентов с наличием МБТ-

бактериемии и без нее (18 и 53 человека) для выявления значимых различий между группами и связи ряда критериев с фактом обнаружения МБТ в крови, пришлось применять разнообразные методы статистического анализа. Выявлено, что вероятность бактериемии наиболее отчетливо связана с тяжестью состояния пациента; иммуносупрессией менее 100 клеток/мкл; анемией как минимум средней степени тяжести (менее 90 г/л) (уровни были определены посредством поиска наиболее значимых порогов), что согласуется с большинством исследований по проблеме [2, 3, 5]. Не удалось доказать, что менингоэнцефалит чаще развивается у лиц с подтвержденной бактериемией. Вероятно, с осторожностью следует относиться к выявленному факту связи микобактериемии с лейкоцитозом и лейкопенией, так как в исследовании не сравнивались группы микобактериального и бактериального сепсиса.

Включение в комплекс обследования посева крови пациентам, у которых проводилось трехкратное исследование мокроты мазком, ПЦР и посевом, дополнительно добавило ценности в установлении этиологического диагноза трем больным, что составило 16,7% от основной группы.

### Заключение

Таким образом, у больных ВИЧ-инфекцией с подозрением на сепсис микобактерии в кровотоке выявили у 11,9% тестируемых (у 25,3% от числа больных с туберкулезом). Результаты исследования показали, что наиболее оправдано исследовать кровь для выявления МБТ у ВИЧ-инфицированных пациентов с подозрением на туберкулез при комбинации следующих так называемых «предгестовых маркеров»:

- иммуносуперссия с количеством CD4 менее 100 клеток/мкл;
- анемия средней степени тяжести и тяжелая;
- тяжелое состояние больного;
- слабый кашлевой рефлекс (невозможность собрать мокроту).

### Литература

1. Clough MC. The cultivation of tubercle bacilli from the circulating blood in miliary tuberculosis. *Am. Rev. Tuberc.* 1917;1:598-621.
2. Negre L, Bretey J. Role of Mycobacterium tuberculosis not completely developed in experimental tuberculous bacteremia in laboratory animals. *C R Hebd. Seances Acad. Sci.* 1954;238(1):171-172.
3. Eng RH, Bishburg E, Smith SM, Mangia A. Diagnosis of Mycobacterium bacteremia in patients with acquired immunodeficiency syndrome by direct examination of blood films. *Journal of clinical microbiology.* 1989;27(4):768-769.
4. Jacob ST, Pavlinac PB, Nakiyingi L, Banura P, Baeten JM, Morgan K, Magaret A, Manabe Y, Reynolds SJ, Liles WC, Wald A, Joloba ML, Mayanja-Kizza H, Scheld WM. Mycobacterium tuberculosis bacteremia in a cohort of hiv-infected patients hospitalized with severe sepsis in Uganda – high frequency, low clinical suspicion [corrected] and derivation of a clinical prediction score. *PLoS One.* 2013;8(8):e7030510.
5. Varma JK, McCarthy KD, Tasaneeyapan T, Monkongdee P, Kimerling ME, Buntheoun E, Sculier D, Keo C, Phanuphak P, Teeratakulpisarn N, Udomsantisuk N, Dung NH, Lan NT, Yen NT, Cain KP. Bloodstream Infections among HIV-Infected Outpatients, Southeast Asia. *Emerging Infectious Diseases.* 2010;16(10):1569-1575.
6. Motyl, MR., Saltzman B, Levi MH, McKittrick JC, Friedland GH, Klein RS. The recovery of Mycobacterium avium complex and Mycobacterium tuberculosis from blood specimens of AIDS patients using the nonradiometric Bactec NR 660 medium. *American Journal of Clinical Pathology.* 1990;94(1):84-86.
7. Archibald LK, den Dulk MO, Pallangyo KJ, Reller LB. Fatal Mycobacterium tuberculosis bloodstream infections in febrile hospitalized adults in Dar es Salaam, Tanzania. *Clinical Infectious Diseases.* 1998; 26(2):290-296.

### Авторский коллектив:

*Зимина Вера Николаевна* – профессор кафедры инфекционных болезней с курсами эпидемиологии и фтизиатрии медицинского института Российского университета дружбы народов, д.м.н.; тел./факс: 8(495)365-25-33, e-mail: vera-zim@yandex.ru

*Микова Оксана Евстегнеевна* – заместитель главного врача Пермского краевого центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями; тел.: 8(342)223-60-13, e-mail: mikovaoe@mail.ru

*Варецкая Татьяна Альбертовна* – заведующая бактериологической лабораторией Пермского краевого центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями; тел.: 8(342)223-64-12, e-mail: varetskaya.tatiana@yandex.ru

*Оборин Денис Александрович* – врач-бактериолог Пермского краевого центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями; тел.: 8(342)223-64-12, e-mail: daoborin@yandex.ru

*Земсков Алексей Геннадьевич* – заведующий отделением ВИЧ-инфекции Пермской краевой клинической инфекционной больницы; тел.: 8(342)239-31-44, e-mail: zemskov.al@mail.ru

*Дегтярева Светлана Юрьевна* – ассистент кафедры инфекционных болезней с курсами эпидемиологии и фтизиатрии медицинского института Российского университета дружбы народов; тел./факс: 8 (495)365-25-33; e-mail: degtyareva\_svet@mail.ru