

Бактериологическая и молекулярно-генетическая верификация бактериемии у ВИЧ-инфицированных больных

Н.С. Соловьева, Т.Ф. Оттен, В.Ю. Журавлев, Н.Н. Гашченко, М.В. Шульгина

ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Проведено сравнение эффективности микробиологических и молекулярно-генетических методов идентификации инфекционного агента в 130 образцах венозной крови при септических состояниях у больных ВИЧ-инфекцией. Инфекционный агент был выявлен в 45,4% образцов. Посев на жидкие среды позволил выделить культуру возбудителя в 37,7% образцов, ПЦР-РВ для выявления ДНК микобактерий туберкулезного комплекса – еще в 10 (7,7%) образцах.

M. tuberculosis был выявлен в 29,2% этиологически верифицированных случаев, *M. avium* и *M. intracellulare* – в 9,2%. Комплекс молекулярно-генетических и современных микробиологических методов позволили повысить эффективность этиологической диагностики септических состояний и сократить время получения результатов исследования.

Ключевые слова: бактериемия, сепсис, ВИЧ-инфекция, туберкулез, *M. tuberculosis*.

Bacteriological and Molecular Diagnosis of Bacteremia in HIV-positive Patients

N.S. Solovieva, T.F. Otten, V.Yu. Zhuravlev, N.S. Gashchenko, M.V. Shulgina

Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Phtiziopulmonology, Saint-Petersburg, Russia

The study aimed to compare efficacy of microbiologic and molecular genetic methods in identification of an infectious agent in blood samples from HIV-positive patients with septic symptoms. 130 venous blood samples were studied using microbiological and molecular methods. Infectious agent was identified in 45.4% cases, by culture — in 37.7, by real-time PCR for mycobacterium tuberculosis complex specific DNA — in 10 additional samples (7.7%).

M. tuberculosis was found in 29.2% of all verified cases, *M. avium* and *M. intracellulare* — in 9.2%. The battery of molecular and modern microbiological tests led to increased efficacy of etiological diagnosis in patients with sepsis and decreased tests' turnaround time.

Key words: bacteremia, sepsis, HIV, tuberculosis, *M. tuberculosis*.

Введение

Генез и течение бактериемии и сепсиса у больных с ВИЧ-инфекцией в бессимптомной стадии заболевания с уровнем CD4-лимфоцитов более $0,5 \times 10^9/\text{л}$ не отличается от подобного состояния у лиц без ВИЧ-инфекции. Риск развития септических состояний значительно увеличивается у больных ВИЧ-инфекцией с низким уровнем CD4-лимфоцитов (менее $0,2 \times 10^9/\text{л}$) [1]. Лихорадка – главный диагностический признак сепсиса и достаточно часто при ВИЧ-инфекции является манифестирующим симптомом прогрессирования основного заболевания или сопутствующих патологических процессов. При этом бактериальный сепсис у данной категории пациентов регистрируется с начала эпидемии ВИЧ-инфекции и является частой причиной летальных исходов [2,3]. При проведении дифференциальной диагностики у данной категории пациентов для формулировки клинического диагноза необходимо назначение целенаправленного бактериологического исследования крови.

Клиническое значение выявления бактериемии заключается в верификации диагноза и определении этиологии инфекционного процесса, доказательстве механизма развития сепсиса, обосновании выбора, смены или оценки эффективности антибактериальной терапии [4]. Необходимо отметить, что в основном у иммунокомпрометированных пациентов с выраженным системным воспалением бактериемия может быть вызвана как туберкулезными, так и нетуберкулезными микобактериями (до 28% случаев), что требует использования специальных методов исследования [5, 6].

В связи с этим повышение эффективности методов этиологической верификации септических состояний, идентификации инфекционных агентов бактериемий и оценка возможностей современных микробиологических и молекулярно-генетических методов в диагностике этих состояний остается актуальной задачей.

Цель исследования – сравнение эффективности традиционных и новых микробиологических и молекулярно-генетических методов идентификации инфекционного агента в крови при септических состояниях у больных ВИЧ-инфекцией.

Материал и методы

Дизайн исследования. Были исследованы образцы венозной крови, полученные от 130 больных ВИЧ-инфекцией из городских стационаров Санкт-Петербурга и Областной больницы УФСИН Ленинградской области. Показанием для включения пациента в исследование было нали-

чие выраженного синдрома системного воспаления: аксиллярная температура выше 38°C , тахикардия больше 90 ударов в 1 мин., частота дыхания выше 20 в 1 мин. [7, 8], уровень CD4, равный или ниже $0,2 \times 10^9/\text{л}$.

Образцы крови собирались во флаконы со средами для автоматизированной системы ВАСТЕС™ 9050 и в дополнительную вакуумную пробирку Green Vac-Tube ЭДТА-К3, для исследования методом микроскопии, посева на плотные среды для выделения микобактерий туберкулеза и для *полимеразной цепной реакции в режиме реального времени* (ПЦР-РВ).

Реагенты, среды, оборудование. Применяли наборы реагентов для работы с автоматизированной системой ВАСТЕС™ 9050: автоматизированной системой для гемокультивирования BD ВАСТЕС™ 9050/FX, BD ВАСТЕС™ Myco/F Lytic medium, BD ВАСТЕС Plus Aerobic Lytic/F, BD ВАСТЕС Mycosis IC/F, тест-систем BD Enterotube™ II, MPT 64 *M. tuberculosis* complex (Becton Dickinson, США).

Посев крови также проводился на плотные яичные среды Левенштейна–Йенсена и Финн-П, приготовленные в лаборатории в соответствии с инструкцией [9].

Для идентификации микобактерий туберкулеза применяли иммунохроматографический тест для детекции антигена MPT 64 *M. tuberculosis* complex (Becton Dickinson, США). Для дифференцировки немикобактериальной флоры применяли BD Enterotube™ II.

Для окраски мазков крови по Граму и Цилю–Нильсену применяли готовые наборы «Микро-Грамм-НИЦФ» и «Микро-Циль–Нильсен-НИЦФ» (ЗАО «НИЦФ», СПб, РФ). Для выявления *кислотоустойчивых бактерий* (КУБ) люминесцентными красителями использовали 0,1% раствор аурамина О и 0,01% раствор родамина В (Sigma, США).

Выделение ДНК *M. tuberculosis* complex осуществляли с помощью набора «Амплитуб-РВ М-сорб-туб-2». Для амплификации нуклеотидной мультикопийной последовательности IS6110, специфичной для *M. tuberculosis* complex, использовали тест-набор «Амплитуб-РВ-Скрин» (ООО «Синтол», Россия). Амплификация проводилась в термоциклере с оптическим модулем ICycler IQ5 (Bio-Rad, Франция).

Для дифференциации нетуберкулезных микобактерий использовали реагенты GenoType® Mycobacterium CM/AS на основе мультиплексной амплификации с биотинилированными праймерами и последующей реверс-гибридизацией производства (Hain Lifescience, Германия).

Методы. Полученные образцы венозной крови засеивались на одну или три питательные среды ВАСТЕС 9050: 130 флаконов среды BD ВАСТЕС™ Мусо/F Lytic medium (для выявления микобактерий), по 80 флаконов среды BD ВАСТЕС Plus Aerobic Lytic/F (для выделения аэробной микрофлоры) и BD ВАСТЕС Mucosis IC/F (для выделения грибковой флоры). Параллельно проводился посев (130 образцов) на плотные яичные среды Левенштейна–Йенсена и Финн-2 для выделения микобактерий. Проводилось также исследование мазков, приготовленных из образцов и окрашенных по Граму и люминесцентными красителями для выявления КУБ.

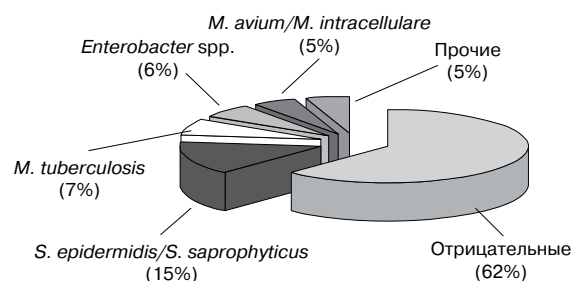
Выделение общей ДНК проводили из 1,0 мл венозной крови с последующей амплификацией специфичного для микобактерий туберкулезного комплекса ДНК-последовательности IS6110 по программе, согласно рекомендациям производителя тест-системы ООО «Синтол» (Россия).

Идентификацию выделенных культур микобактерий проводили методами окраски по Цилю–Нильсену, иммунохроматографическим тестом и с помощью детекции антигена МРТ 64 *M. tuberculosis* complex (Becton Dickinson, США). Идентификация неспецифической бактериальной флоры проводилась с использованием тест-систем BD Enterotube™ II для грам(–) бактерий и биохимических тестов для грам(+) бактерий. При наличии отрицательного результата амплификации, положительного роста на среде ВАСТЕС™ Мусо F/Lytic, отрицательного результата хроматографического теста BD и при положительной микроскопии КУМ проводилась дифференцировка нетуберкулезных микобактерий молекулярно-генетическим методом, по программе и инструкциям производителя тест-системы.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием приложений «Microsoft Office Excel 2003». 95% доверительный интервал рассчитывался по методу Клоппера–Пирсона, для выявления статистической достоверности различий между группами был использован критерий Стьюдента. Различия в сравниваемых группах считались достоверными при уровне двусторонней статистической значимости (p) менее 0,05.

Результаты исследований

Образцы крови от 80 больных с синдромом системного воспалительного ответа были помещены в три жидкие среды (Мусо/F Lytic, Plus Aerobic/F и Mucosis IC/F). Рост микроорганизмов был обнаружен в 31 образце, 28 из которых (90,3%) дали рост на среде Мусо/F Lytic. Доля



Результаты этиологической верификации септических состояний методом посева.

культур, выросших на средах Plus Aerobic/F и Mucosis IC/F, была значимо ниже: 38,7% ($p=0,01$) и 29% ($p=0,01$) соответственно. Различия в эффективности Plus Aerobic/F и Mucosis IC/F были статистически недостоверными ($p=0,49$). Из 12 образцов, выросших на среде Plus Aerobic /F, 10 выросли и на среде Мусо/F Lytic; две культуры, выросшие только на этой среде, были идентифицированы как *Enterococcus faecalis*. Среди 9 образцов, выросших на среде Mucosis IC/F, 2 культуры выросли только на этой среде (*Staphylococcus epidermidis* и *E. faecalis*). Микобактерии дали рост только на среде Мусо/F Lytic.

В связи с большей эффективностью среды Мусо/F Lytic, дополнительные исследования 50 образцов крови были проведены с использованием именно этой среды. Суммарно на эту среду было посеяно 130 образцов крови.

Рост микроорганизмов на всех жидких средах был выявлен в 49 образцах (37,7%, 95% ДИ=29,3–46,6) (рисунок). Суммарная эффективность выделения микобактерий методом посева составила 11,5% (15 из 130 образцов, 95% ДИ=6,6–18,3), значительная часть из них оказались нетуберкулезными. *M. tuberculosis* были выявлены в 9 случаях (6,9%, 95% ДИ=3,2–12,7), *M. avium* – в 5 (3,9%, 95% ДИ=1,2–8,8), *M. intracellulare* – в 1 случае (0,8%, 95% ДИ=0,2–4,2) из 130. Методом ПЦР-РВ удалось выявить ДНК *M. tuberculosis* еще в 10 образцах и увеличить суммарную диагностическую эффективность комплекса тестов до 45,4% (95% ДИ=36,6–54,4); частота выявления *M. tuberculosis* составила при этом 14,6% (95% ДИ=11,0–21,9). Ни в одном случае не были обнаружены смешанные культуры.

Доля случаев с туберкулезной бактериемией, подтвержденной микробиологическими методами и ПЦР, среди всех верифицированных случаев составила 32,2% (95% ДИ=20,1–45,6).

Сравнение эффективности выявления микобактерий из образцов крови различными методами (табл. 1) показало наибольшую эффективность

Таблица 1. Выявление микобактерий в крови 130 больных ВИЧ-инфекцией с симптомами сепсиса (% образцов, в которых были выявлены микобактерии)

Методы	<i>M. tuberculosis</i>			<i>M. avium/M. intracellulare</i>			
	абс.	%	95% ДИ	абс.	%	95% ДИ	
Люминесцентная микроскопия	3	2,3	0,5–6,6	2	1,5	0,2–5,5	
Посев на среды	Мусо/F Lytic	9	6,9	3,2–12,7	6	4,6	1,7–9,8
	Левенштейна–Йенсена	6	4,6	1,7–9,8	2	1,5	0,5–6,6
	Финн II	7	5,4	2,2–10,8	3	2,3	0,5–6,6
ПЦР-РВ	19	14,6	11,0–21,9	–	–	–	

Таблица 2. Спектр микроорганизмов, выделенных из крови больных ВИЧ-инфекцией с симптомами сепсиса методом посева на жидкие среды

Микроорганизм	Количество выделенных культур		95% ДИ
	абс.	%	
<i>S. epidermidis</i>	17	34,7	21,7–49,6
<i>M. tuberculosis</i>	9	18,4	8,8–32,0
<i>M. avium</i>	5	10,2	3,4–22,2
<i>M. intracellulare</i>	1	2,0	0,1–10,8
<i>Enterobacter</i> spp.	6	12,2	4,6–26,8
<i>Citrobacter</i> spp.	2	4,1	0,5–14,0
<i>Acinetobacter</i> spp.	1	2,0	0,1–10,8
<i>S. saprophyticus</i>	2	4,1	0,5–14,0
<i>Candida glabrata</i>	1	2,0	0,1–10,8
<i>E. faecalis</i>	1	2,0	0,1–10,8
Всего	49	100	–

при выявлении *M. tuberculosis* ПЦР-РВ – 19 положительных образцов (14,6%, 95% ДИ=9,0–21,9%). Однако этот метод не позволяет выявить нетуберкулезные микобактерии. Эффективность использования двух плотных сред (Левенштейна–Йенсена и Финн II) и жидкой среды Мусо/F Lytic для выделения *M. tuberculosis* оказалась достоверно ниже эффективности ПЦР-РВ: 4,6% (95% ДИ=1,7–9,8, $p=0,006$), 5,4% (95% ДИ=2,2–10,8, $p=0,01$) и 6,9% (95% ДИ=3,2–12,7, $p=0,04$). Различия в эффективности использования плотных и жидкой сред были недостоверны ($p=0,422$).

Диагностическая эффективность применения плотных сред при выделении *M. avium* составила 1,5% для среды Левенштейна–Йенсена (95% ДИ=0,2–5,5) и 2,3% для среды Финн II (ДИ=0,03). Различия со средой Мусо/F Lytic недостоверны ($p=0,051$ и $0,074$ соответственно). Единственный штамм *M. intracellulare* был выделен только на среде Мусо/F Lytic.

Эффективность метода люминесцентной микроскопии для выявления КУБ в мазках крови составила 2,3% (95% ДИ=0,5–6,6) для *M. tuberculosis*

($p=0,01$ по сравнению с ПЦР-РВ и $p=0,074$ по сравнению со средой Мусо/F Lytic) и 1,5% (95% ДИ=0,2–5,5) для *M. avium* ($p>0,05$ по сравнению со средой Мусо/F Lytic – различия недостоверны).

Время появления роста культуры немикобактериальных бактерий на жидких средах составляло в среднем 1,2 (1–3) сут, рост единственной культуры *Candida* – 3 сут. Среднее время появления роста микобактерий туберкулеза на среде Мусо/F Lytic было 28,2 (17–38) сут, *M. avium* – 19,1 (7–26) сут, для единственной культуры *M. intracellulare* – 34 сут. Тест ПЦР-РВ на выявление ДНК микобактерий туберкулеза в образцах крови занимал один рабочий день.

Спектр выделенных микроорганизмов на всех средах представлен в табл. 2. Значительную долю среди выделенных культур составили коагулазонегативные стафилококки (*S. epidermidis* и *S. saprophyticus*), являющиеся представителями нормальной микрофлоры человека (38,8% от всех выделенных штаммов, 95% ДИ=25,2–53,8), что может быть результатом нарушения асептики при взятии крови.

Обсуждение результатов

Востребованность быстрых и эффективных методов этиологической диагностики при синдроме системного воспаления у больных ВИЧ-инфекцией обусловлена непосредственной угрозой жизни для таких пациентов, связанной с быстрым прогрессированием полиорганной недостаточности.

Бактериемию как ключевой фактор в патогенезе специфического воспалительного процесса при туберкулезе в историческом аспекте отмечали многие исследователи. Однако, по обобщенным данным, бактериемия отмечалась у 3,7–5,3% больных с различными формами туберкулеза [10, 11]. По данным последних десятилетий, при использовании молекулярно-генетических методов ДНК микобактерий туберкулеза в крови обнаружили у 3,5% пациентов с различными клиническими формами туберкулеза и отрицательным ВИЧ-статусом и у 14,6–21,4% (при исследовании периферической крови) с ко-инфекцией туберкулеза и ВИЧ [12, 13].

На основании полученных нами результатов можно сделать вывод, что наиболее эффективным методом выявления возбудителей сепсиса/септических состояний у больных ВИЧ-инфекцией является культуральный метод с помощью автоматизированной системы ВАСТЕС (среда Мусо/F lytic): микроорганизмы были выделены в 37,7% образцов. Применение комплекса микробиологических и молекулярно-генетических методов позволило выявить возбудителя сепсиса в 45,4% случаев у ВИЧ-инфицированных больных с синдромом системного воспаления. Микобактерии были выявлены в 11 из 49 случаев выделения возбудителей культуральным методом. Дополнительно к методу посева, ПЦР-РВ, специфичный для микобактерий туберкулеза, позволил выявить инфекционный агент (микобактерии туберкулезного комплекса) еще в 10 случаях.

Эффективность ПЦР-РВ для выявления *M. tuberculosis* составила 14,6% против 6,9% при использовании наиболее эффективной среды Мусо/F Lytic. Сравнение временных затрат ПЦР-РВ диагностики и бактериологических методов в случае туберкулезного сепсиса показывает значительные преимущества молекулярно-генетической технологии: подтверждение туберкулезной природы системного воспаления методом ПЦР-РВ соста-

вило 1 сутки, а при посеве на жидкую среду Мусо/F Lytic – в среднем 28 суток (от 17 до 38 суток).

Однако только посев на жидкую среду позволил выделить культуру возбудителя немикобактериальной природы и нетуберкулезных микобактерий у 6 пациентов, на этом основании установить достоверный диагноз и начать адекватную терапию.

Применение молекулярно-генетических методов для идентификации как туберкулезных, так и нетуберкулезных микобактерий, вместо методов биохимической и фенотипической идентификации, позволило сократить время постановки этиологического диагноза от нескольких суток до двух недель.

Несмотря на то что в связи с малым количеством исследованных образцов и выделенных культур, достоверных различий в эффективности применения жидкой среды и двух плотных сред не выявлено, на среде Мусо/F Lytic удалось выделить больше культур *M. tuberculosis* и нетуберкулезных микобактерий, чем на плотных яичных средах. При этом не было ни одной культуры, которая выросла бы только на плотных средах и не выросла на жидкой среде. В связи с этим, мы считаем применение среды Мусо/F Lytic предпочтительным, особенно при подозрении на микобактериоз.

Туберкулезная природа сепсиса была выявлена в 32,2% от всех всех этиологически верифицированных случаев. Нетуберкулезные микобактерии (*M. avium*/*M. intracellulare*) были выявлены в 9,2% от всех этиологически верифицированных случаев системного воспаления.

Применение комплекса микробиологических методов с использованием жидких питательных сред и молекулярно-диагностических методов для выявления этиологии септического состояния сегодня является наиболее эффективным способом верификации диагноза при синдроме системного воспаления и, особенно, у ВИЧ-инфицированных пациентов. При подозрении на туберкулезную природу воспаления в первоочередном порядке необходимо применять молекулярно-генетические методы.

Благодарность.

Исследование проводилось с реагентами и при использовании оборудования, предоставленными безвозмездно компанией BD Diagnostics.

Литература

1. Хаертынова И.М., Романенко О.М., Сиразиева Ф.К., Замятина Э.А., Курмашева Е.В., Микусев Р.Ю. и др. Особенности течения сепсиса у больных ВИЧ-инфекцией. В кн.: Материалы научно-практической конференции с международным участием «Сепсис: проблемы диагностики, терапии и профилактики» Харьков, 2006. - С. 232-3.
2. Markowitz N., Hansen N.I., Hopewell P.C., et al. Incidence of tuberculosis in the United States among HIV-infected persons. The pulmonary complications of HIV infection study group. *Ann Intern Med* 1997; 126:123-32.
3. Пантелеев А.М. Туберкулез органов дыхания у больных с ВИЧ-инфекцией. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессия* 2010; (1):16-22.
4. Грувер К.П., Белобородов В.Б. Клиническое значение бактериемии у больных сепсисом. *Клин микробиол антимикроб химиотер* 2011; 13(1):90-7.
5. Grinsztejn B., Fandinho F.C., Veloso V.G., et al. Mycobacteremia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Intern Med* 1997; 157:2359-63.
6. Waddell R.D., Lishimpi K., von Reyn C.F., et al. Bacteremia due to *Mycobacterium tuberculosis* or *M. bovis*, bacille Calmette-Guérin (BCG) among HIV-positive children and adults in Zambia. *AIDS* 2001; 15:55-60.
7. American College of Chest Physicians/society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee: American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference. Definition for sepsis and multiple organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 20:864-74.
8. Abraham E., Matthay M.A., Dinarello C.A., et al. Consensus conference definitions for sepsis, septic shock, acute lung injury, and acute respiratory distress syndrome: Time for a reevaluation. *Crit Care Med* 2000; 28:232-5.
9. Приказ МЗ РФ от 21 марта 2003 г №109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации». Приложение 11. Инструкция по унифицированным микробиологическим исследованиям при выявлении, диагностике и лечении туберкулеза.
10. Беневоленский П.И. Туберкулезная бациллемия при туберкулезе и нетуберкулезных заболеваниях. Л.: Военно-морская медицинская академия, 1945. - 57 с.
11. Dalencour F. La bacillémie tuberculeuse et la phtisiogénèse; essai d'une synthèse de la phtisiologie. Paris: Doin (Clamart: impr. de Habauzit); 1954.
12. Richter C., Kox L.F., Van-Leeuwen J.V., Mtoni I., Kolk A.H. Clinical significance of mycobacteremia in pulmonary tuberculosis. *Eur J Clin. Microbiol Infect Dis* 1996; 15:813-7.
13. Mumtaz A.K., Sajjad H.M., Shahid A.A., Tariq B., Masood A. Peripheral blood-based polymerase chain reaction in diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Ayub Med Col Abbottabad* 2006; 18:25-8.