

РЕЗУЛЬТАТЫ КОМПЛЕКСНОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА У БОЛЬНЫХ КОИНФЕКЦИЕЙ ВИЧ/ТУБЕРКУЛЕЗ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП ДИСПАНСЕРНОГО УЧЕТА В ГОРОДЕ МОСКВЕ

М.А. Краснова¹, М.В. Синуцын¹, Т.В. Ванеева¹, А.А. Хахалина¹, А.Л. Собкин², С.Г. Сафонова¹

THE RESULTS OF COMPLEX LABORATORY DIAGNOSTICS OF TUBERCULOSIS IN CO-INFECTED HIV/TB PATIENTS BELONGING TO DIFFERENT GROUPS OF NOTIFIED CASES IN MOSCOW

M.A. Krasnova, M.V. Sinitzin, T.V. Vaneeva, A.A. Khakhalina, A.L. Sobkin, S.G. Safonova

Цель исследования – оценить вклад в диагностику туберкулеза и определение лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией методов, используемых в ГБУЗ «Московский научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы» для ускоренной лабораторной диагностики туберкулеза и микобактериозов.

В 2014–2016 гг. исследовано 837 проб различного диагностического материала, полученного от 539 пациентов с коинфекцией ВИЧ/туберкулез. Больные были разделены на две группы: впервые выявленные больные туберкулезом (группа I) и больные с рецидивирующим и хроническим течением туберкулеза (завершившие ранее основной курс или прервавшие лечение) из различных групп диспансерного учета (ГДУ) – группа II.

При изучении выявления микобактерий туберкулеза (МБТ) из диагностического материала различными методами (микроскопия, посев, поиск ДНК МБТ) установлено, что из материала впервые выявленных больных туберкулезом достоверно чаще выделяли культуру (20,8%) или ДНК МБТ (24,3%), разницы при использовании этих двух методов выявлено не было ($p > 0,05$). Напротив, из диагностического материала больных различных ГДУ достоверно чаще выявляли ДНК МБТ (26,4%), в то время как различий в частотах положительного результата люминесцентной микроскопии (12,1%) и посева (14,3%) выявлено не было. При этом для Xpert MTB/Rif и посева в BACTEC™ MGIT™ 960 получили высокую согласованность результатов (около 90%) независимо от принадлежности больных к группе I или группе II ($\kappa I = 0,684$, $\kappa II = 0,604$; $p < 0,05$).

Ключевые слова: коинфекция ВИЧ/туберкулез, диагностика, микробиологические методы, молекулярно-генетические методы

The aim of the study – to evaluate the contribution of each test from the complex of the rapid laboratory tools for diagnostics of tuberculosis and non-tuberculosis mycobacterium, and for detection of drug susceptibility, routinely performed in Moscow Research and Clinical Center for Tuberculosis Control of the Moscow Government Health Department in co-infected HIV/TB patients.

In 2014–2016 837 diagnostic samples, obtained from 539 HIV-infected TB patients, were tested. All the patients were divided into two groups: new patients (I group) and relapses or chronic cases (II group).

Results of the M. tuberculosis (MBT) detection by various methods (luminescent microscopy, cultural growth, molecular tests for DNA) showed, that the cultural growth or DNA of MBT were detected significantly more often in samples obtained from the new patients (20.8% and 24.3%, respectively, without differences between these two methods $p > 0.05$). On the contrary, in the samples obtained from patients of II group, DNA of MBT were detected significantly more often (26.4%) but the difference between the results of luminescent microscopy (12.1%) and cultural growth (14.3%) was not revealed. We obtained a good agreement of results (about 90%) using both XpertMTB/Rif molecular test and the cultural growth in BACTEC™ MGIT™ 960 for samples obtained from patients of the both groups ($\kappa I = 0.684$, $\kappa II = 0.604$; $p < 0.05$).

Keywords: HIV/TB co-infection, diagnostics, микробиологические методы, молекулярно-генетические методы

¹ ГБУЗ «Московский научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы».

² ГБУЗ «Туберкулезная клиническая больница № 3 им. профессора Г.А.Захарьина Департамента здравоохранения города Москвы».

Введение

Актуальность своевременной лабораторной диагностики туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией нельзя переоценить, поскольку до сих пор, несмотря на все усилия фтизиатрической службы по профилактике туберкулеза в этой группе риска, заболеваемость туберкулезом больных ВИЧ-инфекцией превышает почти в 80 раз заболеваемость туберкулезом постоянного населения г. Москвы [11, 13].

В г. Москве доля больных коинфекцией ВИЧ/туберкулез среди всех впервые выявленных случаев туберкулеза нарастала от 13,2% в 2009 г. до 20,3% в 2014 г. и 18,6% в 2015 г. (без учета больных, выявленных посмертно) при стабильном снижении показателя заболеваемости постоянного населения с 29,8 на 100 тыс. населения в 2008 г. до 14,5 на 100 тыс. в 2015 г. (с учетом больных, выявленных посмертно).

Одновременно с этим среди постоянного населения г. Москвы растет доля впервые выявленных больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) микобактерий (МБТ): в 2011 г. она составила 12,4%, а в 2015 г. – 19,4%, из которых доля больных ВИЧ-инфекцией составила 15,4% [11]. В то же время доля туберкулеза с МЛУ МБТ среди впервые выявленных больных коинфекцией ВИЧ/туберкулез в 2015 г. составила 22,9%. При этом известно, что сочетание ВИЧ и туберкулеза с МЛУ МБТ является одной из основных проблем фтизиатрии во всем мире [15].

В ГБУЗ «Московский научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы» (МНПЦ борьбы с туберкулезом) применяют комплекс методов, направленных на ускоренную лабораторную диагностику туберкулеза и микобактериозов у пациентов с ВИЧ-инфекцией. Комплексная лабораторная диагностика включает в себя как классические микробиологические методы – бактериоскопические исследования, посев на плотные питательные среды, так и ускоренные методы – посевы на жидкие питательные среды, в т.ч. с использованием автоматизированной системы ВАСТЕС™ MGIT™ 960, и молекулярно-генетические методы [7].

Цель исследования

Оценить вклад микробиологических и молекулярно-генетических методов в диагностику туберкулеза и определение лекарственной устойчивости МБТ у больных ВИЧ-инфекцией из различных групп диспансерного учета.

Материал и методы

В 2014–2016 гг. исследовано 837 проб различного диагностического материала, полученного от 539 пациентов с ВИЧ-инфекцией в сочетании с впервые выявленным туберкулезом или с рецидивом туберкулеза, а также других больных коинфекцией ВИЧ/туберкулез, состоящих на учете у фтизиатра и поступивших на обследование или лечение в МНПЦ борьбы с туберкулезом и в ГБУЗ «Туберкулезная клиническая больница № 3 им. профессора Г.А. Захарьина Департамента здравоохранения города Москвы». Проведено сплошное исследование диагностического материала, поступившего в этот период на исследование в Централизованную бактериологическую лабораторию МНПЦ борьбы с туберкулезом от всех пациентов с коинфекцией ВИЧ/туберкулез, не начавших химиотерапию. Пациенты с неподтвержденным диагнозом туберкулеза из исследования были исключены.

Больные были разделены на две группы по данным, предоставленным отделом эпидемиологического мониторинга (извещение о больном с впервые в жизни установленным диагнозом туберкулеза или рецидивом туберкулеза ф. № 089-у/туб и электронные регистры): впервые выявленные больные туберкулезом (группа I – 143 чел., от которых получено 235 проб диагностического материала) и больные с рецидивирующим или хроническим течением туберкулеза (завершившие ранее основной курс или прервавшие лечение) из различных групп диспансерного учета (ГДУ) (группа II – 396 чел., 602 пробы диагностического материала). Всех пациентов обследовали до или в течение месяца с момента регистрации (группа I) или до момента возобновления химиотерапии (группа II).

Группу I составили 91 мужчина и 52 женщины в возрасте от 22 до 63 лет; медиана (Med) составила 36 лет, интерквартильный размах (ИКР) – 33–40 лет.

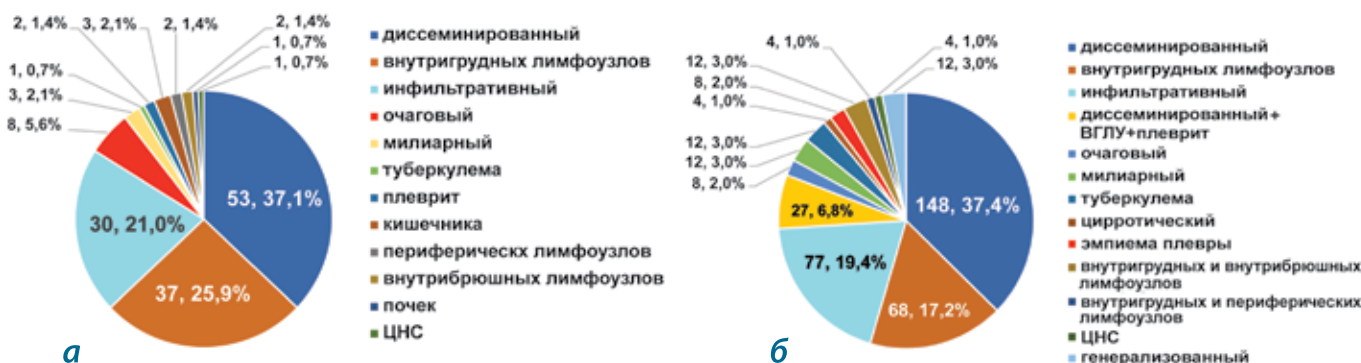


Рис. 1. Клинические формы туберкулеза у включенных в исследование больных коинфекцией ВИЧ/туберкулез: а – с впервые выявленным туберкулезом (143 пациента); б – с рецидивами и хроническим течением туберкулеза (396 пациентов)



Рис. 2. Диагностический материал, взятый на исследование у больных коинфекцией ВИЧ/туберкулез: а – с впервые выявленным туберкулезом (235 пробы); б – с рецидивами и хроническим течением туберкулеза (602 пробы)

Все пациенты были зарегистрированы по учетной форме № 89-у/туб и относились к впервые выявленным больным туберкулезом – IA ГДУ. Содержание CD4⁺ клеток находилось в диапазоне от 0 до 870 кл/мм³ (Med 172,3 кл/мм³, ИКР 51–277 кл/мм³). Среди клинических форм (рис. 1а) преобладал диссеминированный туберкулез (37,1%, 53 чел.); доля больных туберкулезом внутригрудных лимфатических узлов (ВГЛУ) составила 25,9% (37 чел.), инфильтративным туберкулезом – 21,0% (30 чел.), очаговым – 5,6% (8 чел.), милиарным – 2,1% (3 чел.), туберкулезом кишечника – 2,1% (3 чел.), туберкулезным плевритом, туберкулезом периферических лимфатических узлов (ПЛУ), туберкулезом внутрибрюшных лимфатических узлов (ВБЛУ) – по 1,4% (по 2 чел.), почек и ЦНС – по 0,7% (по одному пациенту). У одного больного (0,7%) диагностирована туберкулема легкого.

Пациентов группы I распределили на подгруппы по признаку локализации туберкулезного процесса. В группу Ia – туберкулез легких – вошло 95 больных (диссеминированный туберкулез с преимущественным поражением легких, инфильтративный, милиарный, очаговый, туберкулема), в группу Ib – туберкулез органов дыхания – вошло 39 больных (туберкулез ВГЛУ, экссудативный плеврит), в группу Ic – внелегочный туберкулез – вошло девять больных: (туберкулез кишечника, ПЛУ, ВБЛУ, почек, ЦНС).

В группу II вошли 301 мужчина и 95 женщин в возрасте от 23 лет до 71 года (Med 36 лет, ИКР 34–40 лет). Количество CD4⁺ клеток находилось в пределах от 0 до 1272 кл/мм³ (Med 101,5 кл/мм³, ИКР 24–276 кл/мм³). Среди клинических форм (рис. 1б), как и в группе I, преобладал диссеминированный туберкулез – 37,4% (148 чел.). Доля больных инфильтративным туберкулезом составила 19,4% (77 чел.), туберкулезом ВГЛУ – 17,2% (68 чел.), диссеминированным туберкулезом в сочетании с ТВГЛУ и плевритом – 6,8% (27 чел.), милиарным туберкулезом – 3,0% (12 чел.). Туберкулема была диагностирована у 3,0% (12 чел.), очаговый туберкулез – у 2,0% (8 чел.), эмпиема плевры –

у 2,0% (8 чел.), цирротический туберкулез – у 1,0% (4 чел.). Генерализованный туберкулез имел место у 3,0% (12 чел.), туберкулез ВГЛУ и ВБЛУ – у 3,0% (12), туберкулез ВГЛУ и ПЛУ – у 1,0% (4 чел.), туберкулез ЦНС – у 1,0% (4 чел.).

У всех больных была поздняя стадия ВИЧ-инфекции: в 40,0% случаев – стадия 4Б, в 60,0% – стадия 4В. У 77,3% больных отмечали прогрессирование процесса, антиретровирусные препараты на момент исследования принимали 57,3% больных.

Все пробы диагностического материала исследовали методами люминесцентной микроскопии (ЛЮМ) и посева на жидкую питательную среду *Middlebrook 7H9* в автоматизированном анализаторе BACTEC™ MGIT™ 960 (Becton Dickinson, США) для выделения культуры *M. tuberculosis complex* (МБТ) с последующим определением лекарственной чувствительности к противотуберкулезным препаратам основного и резервного ряда.

Для одновременного выделения и выявления ДНК *M. tuberculosis complex*, а также определения генетических детерминант (мутаций), ответственных за лекарственную устойчивость к рифампицину, осадок обработанного диагностического материала исследовали с помощью картриджной тест-системы Xpert MTB/Rif в анализаторе Gene Xpert (Cepheid, США).

Выделение ДНК *M. tuberculosis complex* из осадка диагностического материала и культур микобактерий проводили с использованием реагентов МСорбТуб (Синтол, Россия) в роботизированной станции Freedom Evo (Tecan, Швейцария). Определение лекарственной чувствительности (выявление мутаций) к рифампицину, изониазиду, фторхинолонам в осадке диагностического материала и выделенной культуре *M. tuberculosis complex* проводили с использованием тест-систем ТБ-БИОЧИП и ТБ-БИОЧИП-2 (ООО «БИОЧИП», Россия).

Для количественных данных рассчитывали медиану (Med) и интерквартильный размах (ИКР). Оценку достоверности качественных признаков для одной группы проводили, используя

Таблица 1. Результаты исследования диагностического материала, полученного от больных ВИЧ-инфекцией с впервые выявленным туберкулезом (235 проб, 143 пациента)

№№	Исследование	Результат (пробы)						p
		положительный			отрицательный			
		абс.	%	95% ДИ	абс.	%	95% ДИ	
1	Микроскопия (ЛЮМ)	34	14,5	10,5–19,5	201	85,5	80,5–89,5	1–2 < 0,01
2	Посев (ВАСТЕС™ MGIT™ 960)	49	20,8	16,2–26,5	186	79,1	73,5–83,9	2–3 > 0,05
3	Xpert MTB/Rif	57	24,3	19,2–30,1	178	75,7	69,9–80,8	1–3 < 0,01

Таблица 2. Сопоставление результатов выделения микобактерий туберкулеза с использованием ВАСТЕС™ MGIT™ 960 и детекции ДНК микобактерий туберкулеза тест-системой Xpert MTB/Rif из диагностического материала больных ВИЧ-инфекцией с впервые выявленным туберкулезом (235 проб, 143 пациента)

Результаты (пробы)		Посев на ВАСТЕС™ MGIT™ 960				Всего	
		положительный		отрицательный			
		абс.	%	абс.	%	абс.	%
Xpert MTB/Rif	положительный	40	17,0	17	7,2	57	24,3
	отрицательный	9	3,8	169	71,9	178	75,7
Всего		49	20,8	186	79,2	235	100,0

критерий Мак-Нимара, для нескольких групп – χ^2 Пирсона, при сравнении малых выборок – точный критерий Фишера. Согласованность результатов лабораторных тестов и методик оценивали по значению коэффициента каппа Коэна (к). Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$ [3]. Статистический анализ проводили с помощью программы EpiInfo7 [14] и сетевых ресурсов Медицинская статистика, SciStatCalc [8, 18].

Результаты исследования

Исследование проходило в два этапа. На первом этапе изучено выявление МБТ из различного диагностического материала. На втором этапе оценивали результаты лабораторного исследования у впервые выявленных больных туберкулезом (группа I) и лиц из различных ГДУ (группа II).

1. Лабораторное исследование диагностического материала, полученного от больных ВИЧ-инфекцией.

1.1. Сравнение результатов лабораторных исследований диагностического материала, полученного от больных ВИЧ-инфекцией с впервые выявленным туберкулезом (группа I).

Исследовано 235 проб (рис. 2а) различного диагностического материала, (мокрота – 147, БАЛ – 45, ликвор – 13, содержимое плевральной полости – 12, кал – 3, лимфатический узел – 3, моча – 3, смыв с брюшной полости – 2, ткань кишки – 2, асцитическая жидкость – 2, содержимое перикардиальной полости, ткань селезенки, содержимое абсцесса – по одному образцу). Кратность исследования составила в среднем 1,6.

У больных с впервые установленным диагнозом положительные результаты получены методом ЛЮМ в 14,5%, методом посева в 20,8% и с применением молекулярного теста в 24,3% (табл. 1). Достоверно чаще МБТ выявляли бактериологическим и молекулярно-генетическим методами в сравнении с люминесцентной микроскопией ($p < 0,01$). Положительный результат Xpert MTB/Rif регистрировали на 4,5% чаще в

сравнении с посевом, но разница была статистически недостоверной.

Совпадение результатов исследования культуральным и молекулярно-генетическим методами отмечено в 89% случаев (табл. 2): в 17% случаев результаты обоих методов были положительными, в 72% – отрицательными. Полученные результаты показали высокую согласованность для двух методов ($\kappa = 0,684$; $p < 0,05$).

1.2 Сравнение результатов лабораторных исследований диагностического материала, полученного от больных ВИЧ-инфекцией с рецидивами и хроническим течением туберкулеза (группа II).

Исследовано 602 пробы различного диагностического материала (рис. 2б), в основном – мокрота (54,8%, 330 проб), БАЛЖ и БАС (24,9%, 150 проб), ликвор (4,5%, 27 проб), пунктаты лимфатических узлов (3,5%, 21 проба), содержимое плевральной полости (3,3%, 20 проб), моча (2,7%, 16 проб) и кал (1,8%, 11 проб). Остальные виды диагностического материала (гной, смыв из брюшной полости, биоптаты различной локализации, отделяемое из свища, асцитическая жидкость, содержимое абсцесса или раны, казеоз) исследованы в единичных случаях. Кратность исследования для группы II составила 2,0. Результаты лабораторных исследований представлены в таблице 3.

Частота регистрации положительных результатов составила: методом ЛЮМ – 12,3%, методом посева – 14,3% и 26,4% – с использованием Xpert MTB/Rif (табл. 3). Положительные результаты, полученные молекулярно-генетическим методом, по сравнению с методами ЛЮМ и посева, имели место достоверно чаще ($p < 0,01$), тогда как более частое выявление МБТ методом посева в сравнении с результатами ЛЮМ было статистически недостоверным ($p > 0,05$).

Совпадение результатов исследования культуральным и молекулярно-генетическим методами отмечено в 87%

Таблица 3. Результаты исследования диагностического материала, полученного от больных ВИЧ-инфекцией из различных ГДУ (кроме впервые выявленных больных) (602 пробы, 396 пациентов)

№№	Исследование	Результат						p
		положительный			отрицательный			
		абс.	%	95% ДИ	абс.	%	95% ДИ	
1	Микроскопия (ЛЮМ)	73	12,1	9,8–14,4	529	87,9	85,0–90,2	1–2 > 0,05
2	Посев (ВАСТЕС™ MGIT™ 960)	86	14,3	11,7–17,3	516	85,7	82,7–88,3	2–3 < 0,01
3	Xpert MTB/Rif	159	26,4	23,1–30,1	443	73,6	69,9–77,0	1–3 < 0,01

Таблица 4. Сопоставление результатов выделения микобактерий туберкулеза с использованием ВАСТЕС™ MGIT™ 960 и детекции ДНК МБТ тест-системой Xpert MTB/Rif из диагностического материала больных ВИЧ-инфекцией из различных ГДУ (за исключением впервые выявленных больных) (602 пробы, 396 пациентов)

Результаты (пробы)		Посев на ВАСТЕС™ MGIT™ 960				Всего	
		положительный		отрицательный			
		абс.	%	абс.	%	абс.	%
Xpert MTB/Rif	положительный	83	13,8	76	12,6	159	26,4
	отрицательный	3	0,5	440	73,1	443	73,6
Всего		86	14,3	516	85,7	602	100,0

случаев (табл. 4). В 14% результаты обоих методов были положительными, в 73% – отрицательными. Полученные результаты показали высокую согласованность двух методов ($k = 0,604$; $p < 0,05$).

2. Результаты лабораторного исследования у больных коинфекцией ВИЧ/туберкулез: впервые выявленных больных туберкулезом (группа I) и лиц из различных групп диспансерного учета (группа II).

На втором этапе исследования анализировали результаты выявления МБТ и определения лекарственной чувствительности у 539 больных коинфекцией ВИЧ/туберкулез.

2.1. Результаты выявления МБТ у больных коинфекцией ВИЧ/туберкулез.

При анализе результатов под «выявлением МБТ» понимали выявление кислотоустойчивых микобактерий (КУМ) методом люминесцентной микроскопии, выделение культуры МБТ культуральным методом и выявление ДНК МБТ молекулярно-генетическим методом.

В целом у всех больных коинфекцией ВИЧ/туберкулез доля больных с положительным результатом исследования методом ЛЮМ составила 14,7%, культуральным методом – 18,2% и молекулярно-генетическим методом – 27,6%. Разница в частотах выявления больных разными методами была статистически значимой ($p < 0,05$) (табл. 5). Однако представляло интерес определить вклад каждого метода в диагностику туберкулеза в зависимости от дефиниций больных, вошедших в исследо-

вание. То есть определить доли больных групп I и II с положительным результатом каждого из трех методов и рассчитать достоверность внутригрупповых и межгрупповых различий. В таблице 6 представлены результаты выявления МБТ тремя методами у больных коинфекцией ВИЧ/туберкулез из I и II группы.

Среди больных группы I положительный результат методом ЛЮМ получен у 17,5%, методом посева – у 27,7% и с применением теста Xpert MTB/Rif – у 26,5%. Больных с положительным результатом посева было больше, нежели с определенным молекулярно-генетическим методом положительным результатом, но полученная разница была недостоверной ($p > 0,05$). Достоверно чаще регистрировали больных с положительным результатом посева и теста Xpert MTB/Rif по сравнению с методом ЛЮМ ($p < 0,05$).

Среди больных II группы у 13,64% получен положительный результат методом ЛЮМ, у 14,9% выделена культура МБТ, а у 28,0% – выявлена ДНК МБТ. В данной группе разница доли больных с положительным результатом микроскопии и посева была недостоверной ($p > 0,05$), тогда как больных с положительным результатом молекулярно-генетического метода было больше, чем лиц с положительной ЛЮМ или с выделенной культурой МБТ ($p < 0,01$).

При сравнении результатов выявления МБТ у больных из I и II групп различными методами установлено, что у больных из группы I достоверно чаще выделяли культуры МБТ ($p < 0,01$).

Таблица 5. Выявление микобактерий туберкулеза у больных с коинфекцией ВИЧ/туберкулез (539 пациентов)

№№	Исследование	Результаты выявления КУМ/МБТ (пациентов)						p
		положительный			отрицательный			
		абс.	%	95% ДИ	абс.	%	95% ДИ	
1	Микроскопия (ЛЮМ)	79	14,7	11,9–17,9	460	85,3	82,1–88,1	1–2 < 0,05
2	Посев (ВАСТЕС™ MGIT™ 960)	98	18,2	15,2–21,7	441	81,8	78,3–84,9	2–3 < 0,01
3	Xpert MTB/Rif	149	27,6	24,0–31,6	390	72,4	68,4–75,9	1–3 < 0,01

Таблица 6. Выявление микобактерий туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией с впервые выявленным туберкулезом (I группа, 143 больных) и лиц из различных групп диспансерного учета (396 пациентов)

№№	Исследование	Группы	Результат выявления КУМ/МБТ						p		
			положительный			отрицательный			для различий между результатами исследований		для различий между группами I и II
			абс.	%	95% ДИ	абс.	%	95% ДИ	в группе I	в группе II	
1	Микроскопия (ЛЮМ)	I	25	17,5	12,1–24,5	118	82,5	75,5–87,9	1–2 < 0,05 2–3 > 0,05 1–3 < 0,01	1–2 > 0,05 2–3 < 0,01 1–3 < 0,01	> 0,05
		II	54	13,6	10,6–17,4	342	86,4	82,6–89,4			
2	Посев (ВАСТЕС™ MGIT™ 960)	I	39	27,3	20,6–35,1	104	72,7	64,9–79,4	1–2 < 0,05 2–3 > 0,05 1–3 < 0,01	1–2 > 0,05 2–3 < 0,01 1–3 < 0,01	< 0,01
		II	59	14,9	11,7–18,7	337	85,1	81,3–88,3			
3	Хpert MTB/Rif	I	38	26,6	20,0–34,4	105	73,4	65,6–80,0	1–2 < 0,05 2–3 > 0,05 1–3 < 0,01	1–2 > 0,05 2–3 < 0,01 1–3 < 0,01	> 0,05
		II	111	28,0	23,8–32,7	285	72,0	67,4–76,2			

В то же время статистически значимых различий для результатов ЛЮМ и теста Хpert MTB/Rif среди больных двух групп получено не было ($p > 0,05$).

В таблице 7 приведены положительные результаты лабораторных методов у больных из группы I, распределенных по подгруппам в зависимости от локализации туберкулезного процесса: Ia (туберкулез легких), Ib (туберкулез органов дыхания), Iv (туберкулез внелегочных локализаций). Достоверных различий в детекции МБТ, как внутригрупповых, так и межгрупповых, для того или иного метода в нашем исследовании получено не было ($p > 0,05$).

2.2. Результаты определения лекарственной чувствительности у больных с коинфекцией ВИЧ/туберкулез.

Также представляет интерес анализ данных о лекарственной чувствительности (ЛЧ) МБТ, полученных фенотипическим (культуральным) и молекулярно-генетическим методами. У 98 больных коинфекцией ВИЧ/туберкулез (39 чел. из груп-

пы I и 59 чел. из группы II) из диагностического материала были выделены культуры МБТ и определена их фенотипическая лекарственная чувствительность (табл. 8).

В структуре лекарственной устойчивости МБТ учитывали моноустойчивость к рифампицину, к изониазиду, МЛУ, ШЛУ. Доля больных с МЛУ МБТ составила 40,8%, а с ШЛУ возбудителя – 9,2%. Эти показатели были сходны в группе I (43,6% и 5,1%) и II (39,0% и 11,9%). Больных с моноустойчивостью к рифампицину регистрировали только в группе II. В целом при сравнении двух групп по результатам ЛЧ статистически значимых различий выявлено не было ($p > 0,05$).

Результаты выявления мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью у больных коинфекцией ВИЧ/ТБ, различными методами представлены в таблице 9.

При исследовании непосредственно диагностического материала с помощью Хpert MTB/Rif у 76 из 143 больных (53,2%) выявили ДНК МБТ с рифампицин-устойчивым генотипом и

Таблица 7. Частота положительных результатов лабораторных исследований у больных ВИЧ-инфекцией с впервые выявленным туберкулезом легких (Ia), туберкулезом органов дыхания (Ib) и внелегочным туберкулезом (Iv)

№№	Исследование	Группа I (n = 143)							
		Ia (n = 95)		Ib (n = 39)		Iv (n = 9)		Всего (n = 143)	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
1	Микроскопия (ЛЮМ)	16	16,8	8	20,5	1	11,1	25	17,5
2	Посев (ВАСТЕС™ MGIT™ 960)	24	25,3	12	30,8	3	33,3	39	27,3
3	Хpert MTB/Rif	26	27,4	11	28,2	1	11,1	38	26,6

Примечание: межгрупповые различия для Ia, Ib, Iv, рассчитанные отдельно для каждого метода, недостоверны ($p > 0,05$).

Таблица 8. Фенотипическая лекарственная устойчивость микобактерий туберкулеза при коинфекции ВИЧ/туберкулез (98 пациентов)

Спектр лекарственной устойчивости (по ВАСТЕС™ MGIT™ 960)	Группа I (n = 39)			Группа II (n = 59)			Всего (n = 98)		
	абс.	%	95%ДИ	абс.	%	95%ДИ	абс.	%	95%ДИ
Сохранена чувствительность	14	35,9	22,7–51,6	21	35,6	24,6–48,3	35	35,7	26,9–45,6
Устойчивость только к изониазиду	6	15,4	7,3–29,7	5	8,5	3,7–18,4	11	11,2	6,4–19,0
Устойчивость только к рифампицину	–	–	–	3	5,1	1,7–13,9	3	3,1	1,1–8,6
ШЛУ	2	5,1	1,4–16,9	7	11,9	5,9–22,5	9	9,2	4,9–16,5

Примечание: различия между I и II группами по результатам исследований лекарственной чувствительности микобактерий недостоверны ($p > 0,05$).

Таблица 9. Выявление мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулеза, у больных коинфекцией ВИЧ/туберкулез

Исследование	Группа I (n = 38)	Группа II (n = 105)	Всего
Выявление мутаций, ответственных за устойчивость к рифампицину (Xpert MTB/Rif, n = 143)			
Мутации отсутствуют	22	45	67 (46,85%)
Мутации выявлены	16	60	76 (53,15%)
Всего	38	105	143 (100%)
Выявление мутаций, ответственных за лекарственную устойчивость к изониазиду, рифампицину, фторхинолонам (биочипы, n = 77)			
Чувствительный генотип (n = 24)			
wt/S95T	8	11	19
wt/ wt	1	4	5
Устойчивость только к изониазиду (n = 12)			
Ser315Thr/S95T	6	4	10
Ser315Thr/wt	–	1	1
T15/ S95T	–	1	1
Устойчивость только к рифампицину (n = 3)			
Ser531Leu/ S95T	–	2	2
His526Asp/S95T	–	1	1
МЛУ (n = 24)			
Ser531Leu,Ser315Thr/S95T	8	11	19
Ser531Leu,T15/S95T	1	1	2
Ser531Leu,Ser315Thr, T15/S95T	–	1	1
Ser531Leu,Ile335Val, Ser315Thr/S95T	–	1	1
His526Arg, Ser315Thr/S95T	1	–	1
МЛУ + устойчивость к фторхинолонам (n = 14)			
Ser531Leu,Ser315Thr/ Ala90Val,S95T	1	2	3
Ser531Leu,Ser315Thr/ Ala94Val,S95T	1	–	1
Ser531Leu,Ser315Thr/ Asp94Gly,S95T	–	3	3
Ser531Leu,Ser315Thr/ Asp94Ala,S95T	–	1	1
Ser531Leu,Ser315Thr/ Ser 91Pro,S95T	–	1	1
Ser531Leu,Ile335Val, Ser315Thr/Asp94 Gly, S95T	–	1	1
Ser531Leu,Ser315Thr,T15/ Ala90Val,S95T	–	1	1
Ser531Leu,Ser315Thr,T15/ Asp94Gly,S95T	–	1	1
Ser531Leu,Ser315Thr,A8/ Asp94Gly,S95T	–	1	1
Ser531Leu,Ser315Thr,A8/ Asp94Ala,S95T	–	1	1
Всего	27	50	77

у 67 больных (46,9%) – ДНК МБТ с рифампицин-чувствительным генотипом. Результаты Xpert MTB/Rif совпали с результатами фенотипического определения чувствительности в 100% случаев.

Спектр генотипов, характеризующих ЛЧ, удалось определить в диагностическом материале с помощью биочипов у 77 (53,8%) из 143 больных с положительным результатом Xpert MTB/Rif: 71,1% (27 из 38 чел.) в группе I и 47,6% (50 из 105 чел.) в группе II. Это связано с недостаточной концентрацией ДНК в пробах диагностического материала для расширенного определения мутаций, ассоциированных с ЛУ с помощью биочипов.

В группе I было выявлено 27 больных с одиночными мутациями МБТ, причем МБТ с мутациями только к рифампицину выявлены не были. Чаще выявляли замены, приводящие к МЛУ: Ser531Leu, Ser315Thr/S95T (8 случаев) и к устойчивости к изониазиду Ser315Thr/S95T (6 случаев). Всего в группе I было определено шесть типов сочетаний мутаций к рифампицину, изониазиду, фторхинолонам.

В группе II выявлено 50 больных с одиночными, а также с двойными мутациями в генах *rpoB*, *katG*, *inhA*. Чаще выявляли мутации, приводящие к МЛУ: Ser531Leu, Ser315Thr/S95T (11 случаев), к устойчивости к изониазиду Ser315Thr/S95T (4 случая) и к рифампицину Ser531Leu/S95T (2 случая). Всего в группе II было определено 18 типов сочетаний мутаций к рифампицину, изониазиду, фторхинолонам.

Обсуждение

За последние годы в г. Москве наблюдается стабильное снижение показателя заболеваемости туберкулезом, но отмечен рост числа зарегистрированных больных ВИЧ-инфекцией, которые являются основной группой риска развития туберкулеза [11, 13]. В этой связи наибольший интерес представляет группа впервые выявленных больных, так как именно они отражают ситуацию по заболеваемости и распространенности случаев туберкулеза с МЛУ и ШЛУ МБТ среди больных ВИЧ-инфекцией [2].

В настоящее исследование (2014–2016 гг.) вошло 539 больных коинфекцией ВИЧ/туберкулез из различных групп диспансерного учета: 143 из IA ГДУ (впервые выявленные больные) и 396 – из других групп. По данным эпидемиологического мониторинга, за эти годы в г. Москве из IA ГДУ выявлено больных коинфекцией ВИЧ/туберкулез: в 2014 г. – 400 больных (16 больных посмертно), 2015 г. – 331 больной (12 посмертно); в 2016 г. (данные не опубликованы) – 295 больных (15 посмертно). Таким образом, проанализированная выборка впервые выявленных больных коинфекцией ВИЧ/туберкулез (143 чел.) составила 14,5% от всех больных IA ГДУ, взятых на учет в Москве за три года наблюдений [11].

По половозрастной и клинической структуре группа I была подобной IA ГДУ с ВИЧ-инфекцией, зарегистрированной

в г. Москве, однако «закономерно» отличалась от других регионов [2, 11]. При сравнении двух групп исследования можно отметить их сходство по ряду показателей: преобладание мужчин, одинаковая медиана возраста (в обеих группах – 36 лет), диссеминированный туберкулез как наиболее частая форма заболевания. Медиана числа $CD4^+$ клеток составила 172,3 кл/мм³ в группе I и 101,5 кл/мм³ – в группе II. В то же время клиническая структура и диагностический материал группы II были более разнообразными.

На первом этапе исследования при изучении выявления МБТ (КУМ, культура МБТ, ДНК МБТ) из диагностического материала различными методами показано, что в материале впервые выявленных больных туберкулезом достоверно чаще выделяли культуру (20,8%) или ДНК МБТ (24,3%), различия при использовании этих двух методов выявлено не было ($p > 0,05$). Однако необходимо отметить, что средний срок детекции ДНК МБТ и выявление мутаций, ассоциированных с ЛУ к рифампицину, для Xpert MTB/Rif составляет 2,5 часа, а для выделения культуры МБТ в анализаторе ВАСТЕС™ MGIT™ 960 – 14 дней. Исходя из этого, становится понятным, что данные тесты – не взаимозаменяющие, а взаимодополняющие друг друга [1, 12]. Напротив, из диагностического материала больных различных ГДУ достоверно чаще выявляли ДНК МБТ (26,4%), в то время как различий в частотах положительного результата ЛЮМ (12,1%) и посева (14,3%) не выявлено.

Из вышеперечисленного можно заключить, что из проб с положительным результатом выявления ДНК МБТ в диагностическом материале впервые выявленных больных, вероятно, будет выделена культура МБТ. А в пробах диагностического материала от больных из прочих ГДУ положительный результат люминесцентной микроскопии, вероятно, будет подтвержден культуральным методом. При этом для Xpert MTB/Rif и посева в ВАСТЕС™ MGIT™ 960 получили высокую согласованность методов и совпадение результатов исследования (около 90%) независимо от принадлежности больных к группе I или группе II ($kI = 0,684$, $kII = 0,604$; $p < 0,05$).

На втором этапе исследования оценивали вклад каждого метода выявления МБТ (люминесцентная микроскопия, посев на жидкие среды в ВАСТЕС™ MGIT™ 960, Xpert MTB/Rif) в диагностику туберкулеза в зависимости от дефиниций больных, вошедших в исследование. Обращало на себя внимание достоверное нарастание доли больных коинфекцией ВИЧ/ТБ с положительными результатами: методом ЛЮМ – (14,7%), методом посева – (18,2%), теста Xpert Mtb/Rif – (27,6%) ($p < 0,05$).

При разделении больных на группы эти показатели изменились. Среди впервые выявленных больных достоверно чаще выявляли лиц с положительным результатом посева или молекулярно-генетического теста в сравнении с микроскопией, а среди больных из других ГДУ – лиц с положительным результатом молекулярно-генетического теста в сравнении с

микроскопией и посевом ($p < 0,05$). Также стоит отметить, что на результаты лабораторных исследований у больных из обеих групп не повлияла кратность исследования, которая для впервые выявленных больных составила 1,6 и для больных из других ГДУ – 2,0.

При изучении межгрупповых отличий установлено, что доля впервые выявленных больных с положительной культурой МБТ была достоверно выше таковой у больных из других ГДУ, в то время как для других методов отличий обнаружено не было. В 2015 г. в г. Москве доля больных с бактериовыделением среди всех впервые выявленных больных туберкулезом легких (независимо от ВИЧ-статуса) методом ЛЮМ составила 30,4% (30,1% – для постоянного населения) и методом посева 41,0% (41,7% – для постоянного населения) [11]. Многие исследователи отмечают отсутствие различий в частотах бактериовыделения в зависимости от ВИЧ-статуса больных туберкулезом, а некоторые указывают на увеличение данного показателя при прогрессировании ВИЧ-инфекции с показателями $CD4^+$ 200 кл/мм³ и менее [2, 4, 5]. В настоящем исследовании обращает на себя внимание в целом низкий показатель бактериовыделения у больных ВИЧ как при использовании метода ЛЮМ (группа I – 17,5%, группа II – 13,6%, все больные – 14,7%), так и бактериологического метода (группа I – 27,3%, группа II – 14,9%, все больные – 18,2%).

Далее проведено сравнение результатов выделения МБТ различными методами у впервые выявленных больных туберкулезом в зависимости от локализации туберкулезного процесса [2]. При анализе полученных результатов для трех методов внутригрупповых и межгрупповых отличий выявлено не было ($p > 0,05$). То есть частота бактериовыделения не зависела от локализации туберкулезного процесса среди больных ВИЧ-инфекцией с впервые выявленным туберкулезом. Возможно, это связано с малыми размерами анализируемых выборок, хотя при статистической обработке результатов этот параметр учитывали. Скорее всего, это связано со «смещением» внутри анализируемой выборки. Как говорилось ранее, при ее формировании применяли данные, полученные из учетной формы 089-у/туб, однако необходимо уточнить, что в форму заносят данные о ведущей локализации туберкулезного процесса, без учета множественной локализации. Возможность подобного «смещения» для впервые выявленных больных описана в работе Е.М. Богородской и соавт. (2015) [2].

При анализе результатов исследования ЛЧ МБТ обращает на себя внимание высокая доля больных с МЛУ (43,6%) и ШЛУ (5,1%) среди впервые выявленных больных коинфекцией ВИЧ/туберкулез, что в два раза выше, чем у подобных больных, зарегистрированных в г. Москве и в других регионах в 2014–2016 гг. [2, 9, 11]. В то же время некоторые авторы представляют данные о еще большей доле МЛУ среди больных ВИЧ/ТБ. Так, в г. Санкт-Петербурге А.М. Пантелеев и соавт.

(2011) выявили МЛУ МБТ у 56,1% больных коинфекцией ВИЧ/ТБ, а в исследовании Н.М. Корецкой, И.А. Большаковой (2017) – в 73,1% у впервые выявленных случаев коинфекции [6, 10].

Также не было установлено отличий в результатах ЛЧ между впервые выявленными больными и больными из других ГДУ ($p > 0,05$).

Возможно, полученные в исследовании высокие частоты регистрации МЛУ и ШЛУ МБТ у больных при низкой частоте выявления бактериовыделения методом посева, связаны с концентрацией в выборке больных с тяжелым течением заболевания, госпитализированных в стационары МНПЦ борьбы с туберкулезом.

Молекулярно-генетическое выявление мутаций, ответственных за ЛУ МБТ к изониазиду, рифампицину, фторхинолонам непосредственно в диагностическом материале удалось провести для 53,8% больных с положительным результатом теста Xpert MTB/Rif, что говорит об исходно низкой концентрации ДНК МБТ в исследуемых пробах. При этом достоверно чаще данное исследование проводили у впервые выявленных больных в 71,7% случаев против 47,6% случаев у больных из других ГДУ ($p < 0,05$).

При исследовании лекарственно-устойчивых генотипов чаще всего выявляли мутации в 531 кодоне гена *rpoB* (рифампицин) и 315 кодоне гена *katG* (изониазид), причем преимущественно эти замены выявляли одновременно (МЛУ) и в сочетании с мутациями в 94 и 90 кодонах гена *gyrA* (фторхинолоны). Подобные результаты были получены в различных регионах мира [17]. По данным литературы, приведенные выше мутации связаны с высоким уровнем устойчивости возбудителя к противотуберкулезным препаратам [16]. В то же время данные мутации не влияют на физиологические показатели МБТ, такие как жизнеспособность и вирулентность, формируя наиболее агрессивные, высокотрансмиссивные, эпидемиологически опасные и трудно поддающиеся лечению штаммы МБТ [6, 19].

Благодарность

Коллектив авторов выражает благодарность Евгению Михайловичу Белиловскому, заведующему отделом эпидемиологического мониторинга туберкулеза ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», за плодотворное сотрудничество и помощь в вопросах мониторинга и учета больных туберкулезом в городе Москве.

Литература

1. Андреевская С.Н., Смирнова Т.Г., Ларионова Е.Е. Сравнение картриджной технологии Xpert MTB/Rif с микробиологическими методами выявления микобактерий туберкулеза и определения лекарственной чувствительности // Туберкулез и социально значимые заболевания. – 2013. – № 2. – С. 25-29.
2. Богородская Е.М., Синицын М.В., Белиловский Е.М. и др. Влияние ВИЧ-инфекции на структуру показателя заболеваемости туберкулезом в условиях мегаполиса // Туберкулез и социально значимые заболевания. – 2016. – № 3. – С. 3-17.
3. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М., Практика, 1998. – 459 с.
4. Зимица В.Н., Батыров Ф.А., Кравченко А.В. и др. Спектр первичной лекарственной устойчивости микобактерий у больных туберкулезом органов дыхания в сочетании с ВИЧ-инфекцией // Туберкулез и болезни легких. – 2011. – № 8. – С. 31-35.
5. Зимица В.Н., Микова О.Е., Варецкая Т.А. и др. Выявление микобактерий туберкулеза в мокроте и массивность бактериовыделения у больных туберкулезом с различным ВИЧ-статусом // Туберкулез и болезни легких. – 2017. – № 7. – С. 17-23.
6. Корецкая Н.М., Большакова И.А. Характеристика первичной лекарственной устойчивости и жизнеспособности микобактерий у больных туберкулезом в сочетании с ВИЧ-инфекцией // Туберкулез и болезни легких. – 2017. – № 2. – С. 16-20.
7. Краснова М.А., Ванеева Т.В., Макарова М.В. и др. Комплексная лабораторная диагностика туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией // Туберкулез и социально значимые заболевания. – 2016. – № 4. – С. 19-24.
8. Медицинская статистика. [Электронный ресурс] URL: <http://www.medstatistic.ru>. (Дата обращения 01.09.2017).
9. Панов Г.В., Скорняков С.Н., Цветков А.И. и др. Характеристика лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза, выделенных от впервые выявленных больных туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией // Туберкулез и болезни легких. – 2015. – № 2. – С. 50-54.
10. Пантелеев А.М. Бактериовыделение и лекарственная устойчивость МБТ при туберкулезе у ВИЧ-инфицированных людей в Санкт-Петербурге // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2011. – № 2. – С. 57-61.
11. Противотуберкулезная работа в городе Москве. Аналитический обзор статистических показателей по туберкулезу, 2015 г. / Под ред. Е.М. Богородской, В.И. Литвинова, Е.М. Белиловского. – М.: МНПЦБТ, 2016. – 244 с.
12. Севастьянова Э.В., Пузанов В.А., Смирнова Т.Г. и др. Оценка комплекса микробиологических и молекулярно-генетических методов исследований для диагностики туберкулеза // Туберкулез и болезни легких. – 2015. – № 1. – С. 35-41.
13. Туберкулез в Российской Федерации, 2012/2013/2014 гг. Аналитический обзор статистических показателей, используемых в Российской Федерации и в мире. – М., 2015. – 312 с.
14. EpiInfo 7.2.1.0. [Электронный ресурс] URL: <http://www.cdc.gov/epiinfo/support/downloads.html>. (Дата обращения 01.09.2017).

15. Isaakidis P., Casas E., Das M. et al. Treatment outcomes for HIV and MDR-TB co-infected adults and children: systematic review and meta-analysis // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2015. – Vol. 19. – P. 969-978.
16. Kambli P., Ajbani K., Sadani M. et al. Defining multidrug-resistant tuberculosis: correlating GenoType MTBDRplus assay results with minimum inhibitory concentrations // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2015. – Vol. 82. – P. 49-53.
17. Manson A., Cohen K., Abeel T. et al., Genomic analysis of globally diverse *Mycobacterium tuberculosis* strains provides insights into the emergence and spread of multidrug resistance // *Nat. Genet.* – 2017. – Vol. 49. – P. 395-402.
18. SciStatCalc. [Электронный ресурс] URL:<http://www.scistatcalc.blogspot.ru>. (Дата обращения 01.09.2017).
19. Spies F., Groll A., Ribeiro A. Biological cost in *Mycobacterium tuberculosis* with mutations in the *rpsL*, *rrs*, *rpoB* and *katG* genes // *Tuberculosis.* – 2012., <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2012.11.004>

Сведения об авторах

Краснова Мария Александровна – ведущий научный сотрудник отдела лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат медицинских наук

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10

Тел. + 7 (495) 603-30-33

e-mail: dna77@mail.ru

Синицын Михаил Валерьевич – заместитель директора по научной и организационно-методической работе ГБУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», заместитель главного врача по медицинской части (для работы с пациентами сочетанной ВИЧ/туберкулез инфекцией), кандидат медицинских наук

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Барболина, д. 3

Тел. + 7 (499) 268-27-46

e-mail: msinitsyn@mail.ru

Ванеева Татьяна Валерьевна – ведущий научный сотрудник отдела лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ города Москвы «Московский научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат медицинских наук

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10

Тел. + 7 (495) 603-30-33

Хахалина Анастасия Александровна – ведущий научный сотрудник отдела лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат биологических наук

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10

Тел. + 7 (495) 603-30-33

e-mail: nastec@bk.ru

Собкин Александр Лазаревич – главный врач ГБУЗ «Туберкулезная клиническая больница № 3 им. профессора Г.А. Захарьина Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат медицинских наук

Адрес: 125466, г. Москва, Куркинское ш., д. 29

Тел. + 7 (495) 572-71-45

e-mail: tkb3@zdrav.mos.ru

Сафонова Светлана Григорьевна – заведующая отделом лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», доктор биологических наук

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10

Тел. + 7 (495) 603-30-33

e-mail: safonova.s.g@inbox.ru