

ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ И ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИИ НЕТУБЕРКУЛЕЗНОГО МИКОБАКТЕРИОЗА У БОЛЬНЫХ НА ПОЗДНЕЙ СТАДИИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ (ПО ДАННЫМ ОРЕНБУРГСКОЙ ОБЛАСТИ)

А. М. МИХАЙЛОВСКИЙ¹, С. А. ЧУРКИН¹, Н. А. ПАШКОВА¹, Л. Н. ЛЕПЕХА²

¹ГБУЗ «Оренбургский областной клинический противотуберкулезный диспансер», г. Оренбург

²ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулеза», Москва

Цель: определение частоты выявления микобактериозов в Оренбургской области и изучение морфологии аутопсийного материала больных с сочетанной патологией ВИЧ-инфекция и микобактериоз.

Материалы и методы. Проведено исследование 7 488 культур микобактерий с дифференцировкой нетуберкулезных микобактерий и идентификацией их до вида молекулярно-генетическими методами. Выполнена посмертная диагностика, дано морфологическое описание генерализованных форм микобактериозов, вызванных *M. avium*.

Результаты. Показано, что в Оренбургской области многократно превалирует распространенность культур *Mycobacterium tuberculosis complex* (98,9%). Нетуберкулезные микобактерии у ВИЧ-негативных больных микобактериозом представлены *M. avium complex*, *M. xenopi*, *M. gordonae*. У больных с ВИЧ-инфекцией наиболее часто (75%) встречается *M. avium*. Морфологической особенностью микобактериоза является выявление неказеифицированных гранул, состоящих из гистиоцитов и «пенистых» макрофагов, содержащих большое количество кислотоустойчивых микобактерий в цитоплазме. Характерными являются диффузный фиброз макрофагально-гистиоцитарных гранул и склероз тканей в перифокальной области воспаления.

Ключевые слова: нетуберкулезный микобактериоз, *M. avium*, ВИЧ-инфекция.

FREQUENCY OF DETECTION AND SPECIFIC MORPHOLOGY OF NON-TUBERCULOUS MYCOBACTERIOSIS IN THOSE AT THE ADVANCED STAGE OF HIV (AS PER DATA FROM ORENBURG REGION)

A. M. MIKHAYLOVSKIY¹, S. A. CHURKIN¹, N. A. PASHKOVA¹, L. N. LEPEKHA²

¹Orenburg Regional Clinical Anti-tuberculosis Dispensary, Orenburg, Russia

²Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russia

Goal: to define frequency of detection of non-tuberculous mycobacterioses in Orenburg Region and to study the morphology of the autopsy samples of the patients suffering from HIV infection and non-tuberculous mycobacteriosis.

Materials and methods. 7488 mycobacterial cultures were analyzed in order to differentiate non-tuberculous mycobacteria and to identify their species by molecular genetic methods. Post mortem diagnostics was performed with morphological description of generalized forms of mycobacterioses caused by *M. avium*.

Results. The analysis showed that species of *Mycobacterium tuberculosis complex* significantly prevailed (98.9%) in Orenburg Region. The following non-tuberculous mycobacteria were found in HIV negative patients: *M. avium complex*, *M. xenopi*, *M. gordonae*. *M. avium* was the most common in HIV positive patients (75%). Non-tuberculous mycobacteriosis possesses a specific diagnostic feature i.e. detection of non-caseous granulomas, consisting of histiocytes and "foamy" macrophages, containing large number of acid-fast mycobacteria in cytoplasm. Diffusive fibrosis of macrophage-histiocyte granulomas and sclerosis of tissue in perifocal area of inflammation are the typical features of it.

Key words: non-tuberculous mycobacteriosis, *M. avium*, HIV infection.

Этиологическим фактором микобактериоза являются нетуберкулезные микобактерии (НТМБ), которые долгое время считались безопасными для человека и клиническое значение которых недооценивалось. Известны единичные описания инфекционных заболеваний, вызванных этими возбудителями [1, 6]. Во всем мире отмечают значительный рост заболеваемости микобактериозом, что во многом связано с прогрессирующим ростом числа больных с иммуносупрессивными состояниями и прежде всего ВИЧ-инфекцией/СПИДом [7]. Многие авторы указывают на то, что снижение уровня Т-лимфоцитов-хелперов менее 200 в 1 мм³ существенно увеличивает частоту развития микобактериоза [3].

При этом на поздних стадиях ВИЧ-инфекции заболевания, вызванные этими возбудителями, могут протекать в генерализованной форме, иметь клинико-рентгенологические проявления, сходные с туберкулезом. Поэтому больные микобактериозом чаще всего попадают в противотуберкулезные учреждения, где длительно получают специфическую химиотерапию без выраженной положительной динамики. Морфологическое исследование аутопсийного материала паренхиматозных органов свидетельствует об изменениях, не характерных для туберкулеза [2]. В этой связи важное значение приобретает своевременная верификация нетуберкулезного микобактериоза, возбудители которого

отличаются высокой природной устойчивостью к антибактериальным и противотуберкулезным препаратам [1].

Особую актуальность эти исследования имеют в Оренбургской области, где сложилась неблагоприятная эпидемическая обстановка по ВИЧ-инфекции/СПИДу, постоянно увеличивается число больных с поздними стадиями заболевания [5]. Основной причиной госпитализации и летальных исходов у этих больных является туберкулез, клинико-морфологические проявления которого достаточно хорошо изучены [4]. В последние годы в Оренбургской области, помимо *M. tuberculosis*, стали регистрировать отдельные случаи НТМБ. Возникла необходимость определить частоту их выявления в регионе, изучить особенности морфологии паренхиматозных органов больных, умерших при наличии сочетанной патологии ВИЧ-инфекция и микобактериоз (ВИЧ-и/МКБЗ), и причины смерти этих больных.

Цель исследования: определить частоту выявления микобактериозов в Оренбургской области и изучить морфологию аутопсийного материала больных с сочетанием ВИЧ-и/МКБЗ.

Материалы и методы

За последние пять лет (2011-2015 гг.) была проведена идентификация 7 488 культур микобактерий. При микробиологическом исследовании патологический материал засеивали на две плотные яичные питательные среды (Левенштейна – Йенсена и «Новая») и при использовании автоматизированной системы Bactec MGIT 960 – на жидкую питательную среду Middelbrook 7Н9 и среду Левенштейна – Йенсена согласно руководству, подготовленному Foundation for Innovative new Diagnostics (FIND).

Первичная идентификация микобактерий комплекса *M. tuberculosis* от НТМБ осуществлялась по скорости роста на плотных питательных средах, пигментообразованию, морфологии колоний и «косообразованию» на жидких средах, наличию кислотоустойчивости.

Для дифференцировки кислотоустойчивых культур НТМБ от микобактерий туберкулезного комплекса, полученных при классическом методе, культуры засеивали на плотные яичные среды, содержащие селективные препараты (гидразид тиофен-2 карболовая кислота, салицилат натрия, нитрат натрия), а дифференцировку культур, полученных на жидких средах, проводили иммунохроматографическим методом (ТВс ID test). Идентификацию НТМБ до вида осуществляли с помощью молекулярно-генетического метода (ПЦР в реальном времени с последующей гибридизацией продуктов амплификации на ДНК-стрипах – наборы GenoType CM/AS HAIN, Lifescience, Германия).

Патоморфологическое исследование проведено на аутопсийном материале 3 больных, имевших

сочетанную патологию ВИЧ-и/МКБЗ (мужчины 37 и 39 лет и женщина 36 лет, имевшие 4В стадию ВИЧ-инфекции с уровнем CD4 Т-лимфоцитов < 100 мм³, в крови определялся низкий уровень РНК HIV-1, до 200). Ретроспективное изучение включало анализ клинической картины развития заболевания у данных пациентов с использованием медицинской карты стационарного больного (учетная форма № 003/у-туб.). Патоморфологическое исследование включало макроскопическое описание внутренних органов, гистологическое, бактериологическое и молекулярно-генетическое изучение патологического материала. Кусочки внутренних органов после фиксации в 10%-ном нейтральном формалине заключали в парафин. Готовые срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону, по Цилю – Нильсену (для выявления кислотоустойчивых микобактерий – КУМ).

Результаты исследования

Как показали результаты исследования, нетуберкулезные микобактериозы остаются пока довольно редкой патологией у больных ВИЧ-инфекцией в Оренбургской области. Из всего исследованного материала (7 488 культур) 7 412 (98,9%) культур были отнесены к *Mycobacterium tuberculosis complex* и только 76 (1,1%) – к НТМБ. Из 76 культур НТМБ при классическом бактериологическом методе выделено 43 культуры и еще 33 культуры – при посеве на жидкую среду с использованием автоматизированной системы Bactec MGIT 960.

Было выделено 76 культур НТМБ от 36 больных без ВИЧ-инфекции и 14 культур НТМБ – от 6 больных с ВИЧ-инфекцией. При этом только у 8 больных без ВИЧ-инфекции культура НТМБ выделялась от 2 до 5 раз (в остальных случаях НТМБ выделялись однократно). У больных с ВИЧ-инфекцией от 2 до 5 культур НТМБ одного и того же вида выделялось у 4 человек. Рентгенологическая картина в легких в обеих группах пациентов проявлялась чаще в виде инфильтративных изменений (у 4 пациентов без ВИЧ-инфекции и 2 – с ВИЧ-инфекцией). В остальных случаях наблюдались: очаговый, диссеминированный процесс, фиброзная каверна и увеличение внутригрудных лимфатических узлов.

У больных без ВИЧ-инфекции наиболее часто из диагностического материала выделялись *M. gordonae* (22,4%), *M. avium* (21,1%), *M. intracellulare* (19,7%), *M. xenopi* (11,8%). Неоднократное выделение НТМБ одного вида у больных данной группы распределилось следующим образом: *M. gordonae* – 37,5%, *M. avium* и *M. intracellulare* – по 25%, *M. xenopi* – 12,5%.

Смешанные культуры *M. tuberculosis* и НТМБ встречались только в диагностическом материале от больных без ВИЧ-инфекции (3 пациента). Были выделены культуры *M. tuberculosis* с *M. intracellulare*, *M. tuberculosis* с *M. gordonae* и *M. tuberculosis* с

M. gordonae и *M. celatum*. У пациентов с ВИЧ-инфекцией смешанные культуры не выделялись.

У пациентов с ВИЧ-инфекцией при неоднократном выделении НТМБ в 75% случаев присутствовал *M. avium* и в 25% – *M. xenopi*.

Патоморфологическое исследование внутренних органов умерших больных с сочетанной патологией ВИЧ-инфекции и нетуберкулезного микобактериоза выявило поражение лимфатических узлов грудной клетки и брюшной полости, селезенки, почек, печени, костного мозга и легких. Во всех случаях из аутопсийного материала была выделена культура *M. avium*.

Проведенное морфологическое исследование свидетельствует о развитии генерализованной формы нетуберкулезного микобактериоза у всех этих больных. В одном случае органы дыхания оставались без выраженных изменений, НТМБ в них не определялись.

В остальных случаях при вскрытии обращала внимание тестоватая консистенция обоих легких, очаги уплотнения макроскопически не определялись. Ткань легких на разрезе обычно имела пестрый вид, темно-бурые участки чередовались со светлыми. С поверхности срезов стекало значительное количество светлой пенистой жидкости, которая определялась также в просвете трахеи и бронхов. Плевральные листки во всех слоях оставались интактными. Поражение лимфатической системы проявлялось увеличением лимфатических узлов грудной клетки (паратрахеальных, бифуркационных, бронхолегочных), мезентериальных и забрюшинных лимфоузлов. На разрезе ткань органа оставалась плотной, без распада и была представлена сливающимися в конгломераты белесоватыми очагами, количество которых варьировало у разных больных. Изменения, выявленные в печени и почках, во всех случаях характеризовались макроскопически выраженными признаками дистрофии. Селезенка была увеличена, у двух умерших выявлены белесоватые фокусы.

При гистологическом исследовании в легочной паренхиме имели место множественные неказеифицирующиеся гранулемы. Они состояли из хаотично расположенных гистиоцитов с признаками диффузного фиброза как в самой гранулеме, так и по ее периферии (рис. 1А). Помимо гранул, у всех больных обращали внимание мелкие и более крупные скопления округлых клеток со светлой вакуолизированной цитоплазмой, так называемых «пенистых» макрофагов. Кроме того, имели место: лимфоидная инфильтрация в перифокальной зоне воспаления, наличие гигантских многоядерных клеток и фиброзирование окружающей респираторной ткани (рис. 1В) различной степени выраженности как в пределах одного и того же наблюдения, так и у разных больных. В свободной от фиброза легочной ткани обнаруживались выраженный внутриальвеолярный отек и формирование единичных гиалиновых мембран.

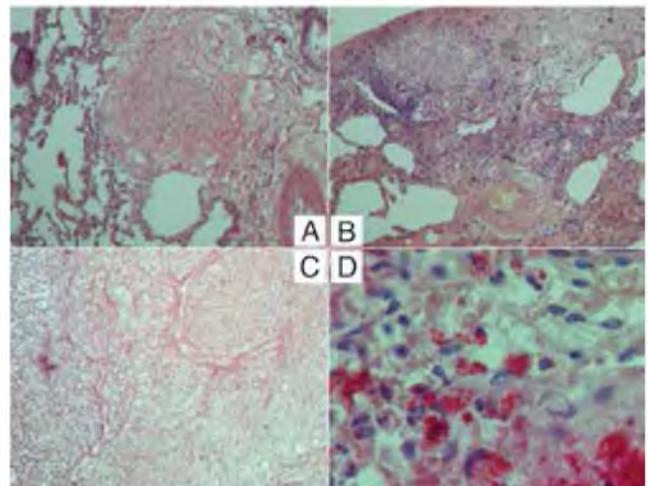


Рис. 1. А. Легочная ткань. Неказеифицированная гистиоцитарная гранулема с выраженным фиброзом. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$. **В.** Легочная ткань. Гранулема, состоящая из «пенистых» макрофагов, с наличием гигантской многоядерной клетки, лимфоидной инфильтрации и выраженным фиброзированием в окружающей респираторной ткани. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$. **С.** Лимфатический узел. Обширные поля фиброза, окруженные округлыми клетками со светлой эозинофильной пенистой цитоплазмой. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$.

Д. Лимфатический узел. Не поддающиеся счету кислотоустойчивые микобактерии в цитоплазме макрофагов. Окраска по Цилю – Нильсену, $\times 400$

Fig. 1. A. Lung tissue. Non-caseous histiocytic granuloma with expressed fibrosis. Stained by hematoxylin and eosin, $\times 400$. **B.** Lung tissue. Granuloma consisting of foamy macrophages with the giant multinucleated cell, lymphoid infiltration and expressed fibrosis in the surrounding respiratory tissue. Stained by hematoxylin and eosin, $\times 200$. **C.** Lymph node. Extensive fibrosis, surrounded by rounded cells with light eosinophilic foamy cytoplasm. Stained by hematoxylin and eosin, $\times 200$. **D.** Lymph node. Uncountable acid-fast mycobacteria in macrophages' cytoplasm. Stained by Ziel-Nelson, $\times 400$

Микроскопическое исследование лимфатических узлов различных групп выявило у всех умерших однотипную, практически полную атрофию лимфоидной ткани. Последняя была замещена обширными полями фиброза с наличием по периферии скоплений мноморфных округлых клеток со светлой пенистой цитоплазмой, напоминающих «пенистые» макрофаги легкого (рис. 1С). При окраске срезов лимфатических узлов по Цилю – Нильсену в цитоплазме этих клеток (рис. 1D) обнаружено большое количество КУМ.

В ткани печени у всех умерших обнаружены множественные, со склонностью к фиброзированию гранулемы, состоящие из гистиоцитов и небольшого числа гигантских многоядерных клеток. Признаков некроза в этих гранулемах также не выявлено (рис. 2А). Дистрофические изменения проявлялись гидропической дистрофией гепатоцитов, нарушением балочно-радиарного строения печеночных долек,

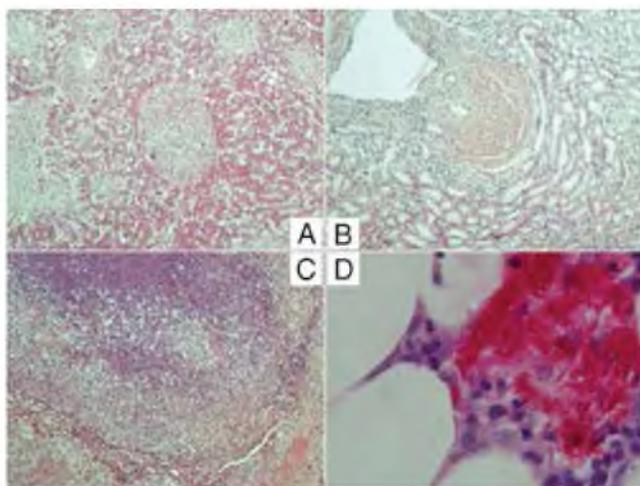


Рис. 2. А. Ткань печени. Гистиоцитарная гранулема без признаков некроза с фиброзированием и наличием гигантских многоядерных клеток. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$.

В. Ткань почки. Расположенная периваскулярно гранулема с выраженным фиброзированием. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$.

С. Ткань селезенки. Фокус некроза с нейтрофильной инфильтрацией в центре и скоплением макрофагов со светлой эозинофильной пенистой цитоплазмой по периферии. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$. **Д.** Костный мозг грудины. Большое количество кислотоустойчивых микобактерий в макрофагах и внеклеточно. Окраска по Цилю – Нильсену, $\times 400$

Fig. 2. A. Liver tissue. Histiocytic granuloma without signs of necrosis, with fibrosis and giant multinucleated cells. Stained by hematoxylin and eosin, $\times 200$. **B.** Kidney tissue. Perivascular located granuloma with expressed fibrosis. Stained by hematoxylin and eosin, $\times 400$. **C.** Spleen tissue. Focus of necrosis with neutrophilic infiltration in the center and accumulation of macrophages with light eosinophilic foamy cytoplasm in the periphery. Stained by hematoxylin and eosin, $\times 200$. **D.** Sternum bone marrow. Large number of acid-fast mycobacteria in macrophages and extracellularly. Stained by Ziel-Nelson, $\times 400$

расширением перисинусоидальных пространств Диссе.

Аналогичного вида, но с более выраженным фиброзированием, гранулемы обнаружены в тканях почек, где они располагаются преимущественно периваскулярно (рис. 2В). Как в печени, так и в почках не выявлено признаков инфильтрации паренхимы лимфоидными элементами или нейтрофильными лейкоцитами. Отмечена выраженная дистрофия эпителия извитых канальцев.

Несколько иная картина наблюдалась в селезенке, где обнаружены особенно крупные скопления

пенистых макрофагов, в том числе в стадии разрушения. Они инфильтрированы нейтрофильными лейкоцитами, которые формируют микронекрозы в центре, где макрофаги полностью разрушены. В зонах некроза и в цитоплазме макрофагов при окраске по Цилю – Нильсену определяется большое количество КУМ. Так же как и в других паренхиматозных органах, макрофагальные гранулемы имеют тенденцию к склерозированию, а паренхима органа в перифокальной зоне подвергается фиброзированию (рис. 2D).

Заключение

Проведенное исследование показало, что в Оренбургской области многократно превалирует распространенность культур *Mycobacterium tuberculosis complex* (98,9%), а не НТМБ, составляющих только 1,1% всех наблюдений. Среди последних у пациентов без ВИЧ-инфекции определяются: *M. avium complex*, *M. xenopi*, *M. gordonae*. У больных с ВИЧ-инфекцией наиболее часто (75%) встречается *M. avium*. Крайне редкое обнаружение НТМБ у больных с ВИЧ-инфекцией объясняется высокой распространенностью туберкулеза с бактериовыделением в регионе.

Тем не менее в Оренбургской области на фоне увеличения числа больных с поздними стадиями ВИЧ-инфекции вероятен определенный рост случаев микобактериоза. При снижении CD4 Т-лимфоцитов < 100 кл./мкл у больных с терминальной стадией ВИЧ-инфекции описана морфологическая картина генерализации *M. avium* без характерных для туберкулеза некротических изменений внутренних органов. Морфологической особенностью микобактериоза является выявление неказеифицированных гранул, состоящих из гистиоцитов и «пенистых» макрофагов, содержащих большое количество КУМ в цитоплазме (окраска по Цилю – Нильсену). Характерными являются диффузный фиброз макрофагально-гистиоцитарных гранул и склероз тканей в перифокальной области воспаления. Периваскулярное расположение гранул и генерализация процесса свидетельствуют о наличии микобактериального сепсиса и полиорганной недостаточности как причины смерти таких больных.

Нахождение этих морфологических особенностей в биопсийном, операционном или секционном материале позволяет заподозрить наличие микобактериоза. Для подтверждения диагноза необходимо проведение молекулярно-генетических исследований с идентификацией НТМБ до вида.

ЛИТЕРАТУРА

1. Альварес Фигероа М. В., Зюзя Ю. Р., Прокопенко А. В. и др. Диагностика сочетания туберкулеза и микобактериоза при ВИЧ-инфекции // Туб. и социально значимые заболевания. – 2015. – № 4. – С. 50-57.
2. Бердников Р. Б., Гринберг Л. М., Евсеев А. Ю. и др. Летальный случай генерализованного микобактериоза у больного с терминальной стадией ВИЧ-инфекции // Туб. и болезни легких. – 2016. – № 4. – С. 57-61.
3. Литвинов В. И., Макарова М. В., Краснова М. А. Нетуберкулезные микобактерии. – М.: МНПЦБТ, 2008. – 256 с.: ил.
4. Материалы III Всероссийской конференции «Туберкулез с лекарственной устойчивостью МБТ у больных ВИЧ-инфекцией». – М. – Тверь: Триада, 2009.
5. Михайловский А. М. Особенности клинико-морфологических проявлений туберкулеза, сочетанного с ВИЧ-инфекцией, в Оренбургской области: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2011. – 27 с.
6. Оттен Т. Ф., Васильев А. В. Микобактериоз. – СПб.: Медицинская пресса, 2005. – 224 с.
7. Piersimoni C., Daley C. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria // Clin. Chest Med. – 2002. – Vol. 23. – P. 553-567.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

ГБУЗ «Оренбургский областной клинический противотуберкулезный диспансер»,
460041, г. Оренбург, Нежинское шоссе, д. 6.

Михайловский Алексей Модестович
кандидат медицинских наук, заведующий
патологоанатомическим отделением.
Тел.: 8 (3532) 32-83-43.
E-mail: michailovsky2007@yandex.ru

Чуркин Сергей Александрович
кандидат медицинских наук, главный врач.
Тел.: 8 (3532) 32-74-54.
E-mail: oobo5@mail.ru

Пашкова Наталья Анатольевна
заведующая лабораторией.
E-mail: pashkova.dom@mail.ru

Лепеха Лариса Николаевна
ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулеза»,
доктор биологических наук, профессор, заведующая
отделом патоморфологии, клеточной биологии и биохимии.
107564, Москва, Яузская аллея, д. 2.
Тел.: 8 (499) 785-91-79.
E-mail: lep3@yandex.ru

Поступила 15.07.2016

REFERENCES

1. Alvares Figeroa M.V., Zyuzya Yu.R., Prokopenko A.V. et al. Diagnostics of concurrent tuberculosis and mycobacteriosis in HIV patients. Tub. i Sots. Znach. Zabolevaniya, 2015, no. 4, pp. 50-57. (In Russ.)
2. Berdnikov R.B., Grinberg L.M., Evseev A.Yu. et al. The lethal case of generalized mycobacteriosis in the patient at the terminal stage of HIV infection Tub. i Bolezni Legkikh, 2016, no. 4, pp. 57-61. (In Russ.)
3. Litvinov V.I., Makarova M.V., Krasnova M.A. Netuberkulyoznye mikobakterii. [Non-tuberculous mycobacteria]. Moscow, MNPTsBT Publ., 2008, 256 p.
4. Materialy III Vserossiyskoy konferentsii Tuberkulez s lekarstvennoy ustoychivostyu mikobakterii u bolnykh VICH-infektsiy. [Abstract book of III All-Russian Conference with Drug Resistant Tuberculosis in HIV Patients]. Moscow, Tver, Triada Publ., 2009.
5. Mikhailovskiy A.M. Osobennosti kliniko-morfologicheskikh proyavleniy tuberkuleza, sochetannogo s VICH-infektsiy, v Orenburgskoy oblasti. Diss. kand. med. nauk. [Specific clinical morphological features of tuberculosis with concurrent HIV infection in Orenburg Region. Cand. Diss.]. Moscow, 2011, 27 p.
6. Otten T.F., Vasiliev A.V. Mikobakterioz. [Mycobacteriosis]. St. Petersburg, Meditsinskaya Pressa Publ., 2005, 224 p. (In Russ.)
7. Piersimoni C., Daley C. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria. Clin. Chest Med., 2002, vol. 23, pp. 553-567.

FOR CORRESPONDENCE:

Orenburg Regional Clinical TB Dispensary,
6, Nezhinskoye Rd,
Orenburg, 460041

Aleksey M. Mikhailovskiy
Candidate of Medical Sciences,
Head of Autopsy Department.
Phone: +7 (3532) 32-83-43.
E-mail: michailovsky2007@yandex.ru

Sergey A. Churkin
Candidate of Medical Sciences, Head Doctor.
Phone: +7 (3532) 32-74-54.
E-mail: oobo5@mail.ru

Natalya A. Pashkova
Laboratory Head.
E-mail: pashkova.dom@mail.ru

Larisa N. Lepekha
Central Tuberculosis Research Institute,
Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of Department
for Pathoanatomy, Cellular Biology and Biochemistry.
2, Yauzskaya Alleya, Moscow, 107564
Phone: +7 (499) 785-91-79.
E-mail: lep3@yandex.ru

Submitted as of 15.07.2016