

Особенности диагностики туберкулеза у больных хронической почечной недостаточностью на программном гемодиализе и после трансплантации почки

Ватазин А. В., Прокопенко Е. И., Перлин Д. В., Щербакова Е. О., Михеев А. В., Старостенко Е. В., Владимирский М. А., Александров А. А., Шипина Л. К.

МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, НИИ пульмонологии, ММА им. И.М. Сеченова, Москва
Адрес для переписки: 129110, Россия, г. Москва, ул. Щепкина, д. 61/2, МОНИКИ им.
М.Ф.Владимирского, отделения хронического гемодиализа и трансплантации почки
Телефон: (095) 284-57-91, 284-56-86. Прокопенко Елена Ивановна

Ключевые слова: микобактерии туберкулеза, антитела, ДНК, полимеразная цепная реакция, трансплантация почки, диагностика

Абстракт.

Диагностика туберкулеза у больных с терминальной хронической почечной недостаточностью (тХПН) является сложной задачей, поскольку клиническая симптоматика часто бывает стертой, материал для бактериологического исследования нередко недоступен, а стандартная рентгенография не выявляет патологических изменений. Исследована группа из 77 больных тХПН, 12 из которых получали лечение программным гемодиализом, а 65 являлись реципиентами почечного трансплантата. Последние получали комбинированную иммунодепрессивную терапию циклоспорином А (ЦиА), преднизолоном и азатиоприном. В протокол был также включен кетоконазол для повышения концентрации ЦиА в крови. Туберкулез был диагностирован у 12 из 77 пациентов, 5 из которых лечились программным гемодиализом, 12 наблюдались в разные сроки после трансплантации почки. С целью диагностики туберкулеза проводили ряд стандартных исследований, включавших рентгенографию грудной клетки, УЗИ органов брюшной полости и забрюшинного пространства. Дополнительным методом диагностики было определение в сыворотке крови антител к микобактерии туберкулеза (МВТ). Небольшой группе пациентов с трансплантированной почкой проводилась рентгеновская компьютерная томография грудной клетки, брюшной полости, а также определение ДНК МВТ с помощью пациентов полимеразной цепной реакции (ГЦР) в различных биологических материалах. Определение антител к МВТ оказалось высокоспецифичным (98,5), но малочувствительным (50%) методом. Последнее может объясняться нарушением образования антител на фоне иммуносупрессии после трансплантации почки либо иммунодефицитом, связанным с уремией. Полученные данные позволяют считать более перспективным в таких случаях определение ДНК МВТ.

Tuberculosis in patients with end-stage renal disease is often difficult to diagnose. Due to the absence of sputum or bronchoalveolar aspirate culture, atypical x-ray image and various obscure symptoms, the diagnosis should be confirmed by additional testing. The aim of the study was to evaluate the clinical features of tuberculosis, the diagnostic significance of antibodies of *Mycobacterium tuberculosis* (MT) and MT DMA in polymerase chain reaction (PCR) in 15 patients with end-stage renal disease (5 hemodialysis patients, 10 kidney graft recipients). Immunosuppression included prednisolone, azatioprin and cyclosporin A combined with ketoconazol. Clinical observations confirmed the atypical course of tuberculosis in most patients. Detection of MT antibodies was highly specific (98,5%), but the method proved not sensitive (50%). The latter can be explained by the impaired formation of antibodies in the presence of immunosuppressive therapy in kidney graft patients, or by immunosuppression due to uremia. MT DNA in PCR appears much more effective for diagnoses of tuberculosis in immunosuppressed patients.

Туберкулез у больных тХПН, особенно у реципиентов почечных трансплантатов, получающих постоянную медикаментозную иммуносупрессию, является серьезным, часто угрожающим жизни заболеванием [1, 7, II]. Частота развития туберкулеза после трансплантации почки в различных регионах мира варьируется в широких пределах: от 0,8 [3] до 11,7% [16]. По данным некоторых исследователей, заболеваемость туберкулезом больных с трансплантированной почкой в 50 (!) раз превышает таковую в общей популяции [6]. Летальность, связанная с туберкулезом,

составляет у этой категории больных от 11 до 33% [3, 6] и особенно высока при наличии резистентности МВТ к противотуберкулезным препаратам [10].

Диагностика туберкулеза у больных тХПН непростая, так как заболевание часто протекает у них стерто. Частота внелегочного туберкулеза колеблется - 12-86%, при этом встречается необычная локализация и атипичные проявления туберкулезного поражения. Описаны, например, туберкулез собственных поликистозных почек [8], гранулематозный интерстициальный нефрит почечного трансплантата [9], туберкулезный пиомиозит [19], туберкулезное поражение костного мозга с панцитопенией [18]. Именно поэтому в диагностике туберкулеза у диализных больных и реципиентов почечного трансплантата начали использовать иммунологические методы [2, 5, 13, 14]. Однако результаты определения противотуберкулезных антител не всегда информативны из-за особенностей иммунологической реактивности этих больных. Решением этой проблемы может быть применение у иммунодефицитных пациентов ПЦР для выявления ДНК МВТ в биологическом материале [12, 15, 17].

Целью настоящего исследования было изучение клинических особенностей туберкулеза у больных тХПН и оценка эффективности лабораторных, включая ПЦР, и рентгенологических методов в диагностике заболевания.

Материалы и методы

В исследование были включены 77 больных тХПН, наблюдавшихся в отделении хронического гемодиализа и трансплантации почки МОНКИ им. М.Ф. Владимирского с 1995 по 1998 г. Из них 12 получали лечение программным гемодиализом, а 65 были реципиентами почечных трансплантатов. Причинами развития тХПН являлись следующие заболевания: хронический гломерулонефрит - у 59 пациентов (76,6%), хронический пиелонефрит - у 5 (6,5%), поликистоз почек - у 4 (5,2%), аномалии развития мочевой системы - у 3 (3,9%), системные васкулиты - у 3 (3,9%), диабетическая нефропатия - у 2 (2,6%), интерстициальный нефрит - у 1 (1,3%) пациента. Средний возраст больных составил $36,2 \pm 2,6$ года (у диализных пациентов - $37,4 \pm 7,2$ года; у реципиентов ренальных трансплантатов - $36,0 \pm 2,9$ года). Пациенты после трансплантации почки получали комбинированную иммуносупрессивную терапию циклоспорином А ("Сандиммун"), преднизолоном, азатиоприном. В протокол иммуносупрессии был также включен кетоконазол (низорал) для повышения и стабилизации концентрации в крови циклоспорино А.

Всем пациентам проводилось стандартное для больных тХПН клиническое и лабораторное обследование, рентгенография грудной клетки, ультразвуковое исследование органов брюшной полости и забрюшинного пространства. Дополнительно в сыворотке крови определяли антитела к МВТ: больным на гемодиализе при длительной неясной лихорадке, реципиентам почечных трансплантатов планово в день трансплантации и через 3-4 недели после операции, а также в более отдаленные сроки посттрансплантационного периода при подозрении на развитие туберкулеза. Небольшой группе пациентов с трансплантированной почкой для уточнения диагноза была выполнена рентгеновская компьютерная томография (РКТ) грудной клетки, брюшной полости, а также определение ДНК МВТ с помощью ПЦР в различных биологических материалах.

Определение антител к МВТ и ДНК возбудителя туберкулеза производилось в лаборатории иммунодиагностики Российского НИИ фтизиопульмонологии. Противотуберкулезные антитела в сыворотке крови определялись методом иммуноферментного анализа (ИФА) при использовании специальных тест-систем. С помощью тест-системы специфические антитела к МВТ выявляли за счет образования комплексов с антигенами, фиксированными на пластине. Образовавшийся комплекс "антиген-антитело" определялся с помощью конъюгата белка А с пероксидазой, которая катализирует расщепление субстрата, вызывая изменение окраски индикатора ОФД. Положительная и отрицательная контрольные сыворотки служили для контроля специфической активности тест-системы. Проводился визуальный и инструментальный учет результатов (измерение оптической плотности при длине волны 492 нм непосредственно в планшетах на спектрофотометре типа "Мультискан").

Определение ДНК МВТ в различном материале, полученном от больных, производили с использованием набора "Амплитуб". Диагностика туберкулеза с помощью ПЦР основана на специфическом взаимодействии синтетических олигонуклеотидов (праймеров - IS, 123 н.п.) с ДНК возбудителя туберкулеза и синтезе с помощью ДНК-полимеразы специфического участка ДНК в результате многократного повторения циклов денатурации ДНК при 94 °С, сплавания с

исследуемой ДНК праймеров при 50 °С и синтеза с них комплементарных цепей ДНК при 72 °С. Проводилось 30 циклов амплификации на амплификаторе "Биотерм". Наличие синтезированного участка ДНК выявлялось в виде светящихся красноватых полос после проведения электрофореза продуктов ПЦР в агарозном геле. Результаты электрофореза учитывали в УФ-свете с длиной волны 254 нм на приборе трансиллюминатор. Положительными считались пробы, в которых полосы, выявляемые в геле, располагались точно на таком же расстоянии от старта, что и полоса, соответствующая положительному контролю.

Результаты и обсуждение

Антитела к антигенам МВТ определялись у 77 пациентов: у 12 больных на гемодиализе и у 65 реципиентов почечных трансплантатов в различные сроки после операции. Из 16 анализов сывороток, полученных от больных с подтвержденным впоследствии туберкулезом, положительный результат был получен в 8 случаях (табл. 1). У пациентов без туберкулеза ^ 67 исследованиях антитела были обнаружены только в одном случае.

У больных тХПН на программном гемодиализе и после трансплантации почки чувствительность определения антител к МВТ с помощью ИФА составила 50%, что является относительно невысоким показателем. Тем не менее такой уровень чувствительности все же позволяет использовать метод в клинической практике при комплексном обследовании пациентов. Низкая чувствительность определения противотуберкулезных антител у данной категории больных может быть объяснена, по-видимому, нарушениями антителогенеза, связанными у реципиентов почечных трансплантатов с постоянной медикаментозной иммуносупрессией, а у гемодиализных пациентов - с уреимией, анемией, дефицитом белка, иногда гипергликемией. Зато специфичность метода в нашем исследовании оказалась весьма высокой - 98,5%- Показатели положительной и отрицательной прогностической ценности, характеризующие вероятность наличия заболевания при положительном результате обследования и отсутствия заболевания при отрицательном результате, также являются высокими - 88,9% и 89,2% соответственно. Относительный риск (интегральная характеристика метода) составил 8,2; это свидетельствует о клинической значимости определения антимикобактериальных антител с помощью ИФА у больных тХПН.

У 5 больных, получающих лечение регулярным гемодиализом, мы выявили различные формы туберкулеза (табл. 2). Двое из этих пациентов поступили в клинику для лечения гемодиализом с уже имеющимся активным туберкулезным процессом. У одной из них (больная К.), страдавшей диссеминированным туберкулезом легких и туберкулезом гортани, лихорадка, кашель с мокротой и рентгенологические изменения в легких появились за 1,5 месяца до начала лечения гемодиализом, на фоне нарастающей уремии, что резко затруднило оценку рентгенограмм и диагностику туберкулеза. У другого пациента (больной Р.), который в течение многих лет был болен сахарным диабетом I типа, осложненным диабетической нефропатией, туберкулез был диагностирован за 36 месяцев до выявления тХПН и поступления для лечения гемодиализом. В тот период это был инфильтративный туберкулез легких и туберкулезный плеврит, а к моменту начала диализного лечения сформировалась хроническая туберкулезная эмпиема плевры.

У остальных 3 пациентов активный туберкулез развился во время лечения гемодиализом. В одном случае это был инфильтративный туберкулез легких, диагностированный через 2 месяца после начала гемодиализной терапии, в другом милиарный туберкулез, выявившийся спустя 18 месяцев программного гемодиализа, в третьем - туберкулезный спондилит, который был верифицирован через 8 месяцев после поступления пациентки для лечения гемодиализом.

У всех больных имели место лихорадка и общая слабость; у больных с легочным туберкулезом - кашель. Стандартное рентгенологическое исследование позволило во всех случаях заподозрить и диагностировать туберкулез. Однако характерная рентгенологическая картина чаще всего развивалась не сразу: у 3 больных из 5 в дебюте заболевания отмечалась длительная лихорадка и интоксикация неясного генеза. Бактериологическое подтверждение туберкулеза было получено у 2 больных, выделявших мокроту. У 3 пациентов получить какой-либо материал для посева не было возможности. Среди реципиентов почечных трансплантатов выявлено 10 больных туберкулезом. Среднее значение времени от момента трансплантации до возникновения туберкулеза составило 45,11 24,7 месяца (от 0,33 до 112,6 месяца). Встречались следующие клинические формы туберкулеза: туберкулезный плеврит - 3 больных, милиарный туберкулез легких - 2 больных, инфильтративный туберкулез легких в сочетании с плевритом - 2 пациента, туберкулез мочевой системы - 1 больная, туберкулезный сепсис Ландузи - 1 больная, и у одного пациента выявлен генерализованный туберкулез с поражением легких, перикарда, предстательной железы, мозговых оболочек. Анализ клинической симптоматики туберкулеза у

больных после трансплантации почки (табл. 3) показал, что почти у всех пациентов (у 90%) отмечалась лихорадка, не исчезающая после применения антибиотиков широкого спектра действия. Чаще всего длительная лихорадка неясной этиологии была первым симптомом заболевания и поводом для обследования на туберкулез. Не было этого клинического признака только у одной пациентки, страдавшей туберкулезом мочевого пузыря.

Всех пациентов без исключения беспокоила немотивированная общая слабость, утомляемость. Далее в порядке убывания по частоте встречались одышка - 50% больных, снижение массы тела - 40%, кашель и боли в грудной клетке (по 30%). Дизурические явления, обусловленные туберкулезным поражением мочевого пузыря, отмечены у одной больной. Необходимо подчеркнуть, что эта пациентка с многолетней стабильной функцией трансплантата в течение 4 месяцев безуспешно лечилась по месту жительства в связи с циститом, проявлявшимся мучительной дизурией с частотой мочеиспускания до 6-8 в течение часа. Полного отсутствия клинических симптомов не было ни у одного из наших больных с туберкулезом.

Важно отметить, что у реципиентов почечных трансплантатов с туберкулезом изменения, выявляемые с помощью клинического анализа крови, не являются специфичными: лейкоцитоз, нейтрофильный сдвиг влево, повышение СОЭ могут быть вызваны другими инфекциями. Кроме того, хорошо известно, что применение некоторых иммуносупрессантов (преднизолона, азатиоприна) влияет на состав периферической крови.

В диагностике туберкулеза у пациентов после аллотрансплантации трупной почки (АТП), получающих постоянную иммуносупрессивную терапию, особое значение приобретает использование РКТ и иммунологических методов (табл. 4).

При обычной рентгенографии из 10 обследованных (с верифицированным впоследствии туберкулезом) характерные изменения были выявлены у 6 пациентов. Трудности вызывало в основном обнаружение милиарного туберкулеза и плеврита с небольшим объемом выпота. РКТ позволила диагностировать туберкулез у 3 из 4 обследованных, причем у больной с отрицательным результатом исследования был выявлен туберкулезный сепсис без видимого поражения легких.

У больных туберкулезом при отсутствии иммунодефицита или медикаментозной иммуносупрессии в диагностике туберкулеза большую роль играет люминесцентная микроскопия (ЛМ) и посев материала из очага поражения (мокроты, мочи, плеврального выпота и др.) для выявления МВТ. Более того, именно обнаружение возбудителя туберкулеза является бесспорным доказательством специфической природы заболевания. У наших пациентов информативность этих методов также была высока: методом ЛМ

МВТ были обнаружены у обоих обследованных больных (2 из 2), посев мочи у пациентки с туберкулезом мочевого пузыря дал положительный результат. Однако возможности применения ЛМ и посева ограничиваются тем, что у реципиентов почечных трансплантатов часто отсутствует материал для исследования. Такие больные редко выделяют мокроту. Небольшой объем плеврального выпота в ряде случаев не позволяет осуществить диагностическую плевральную пункцию с последующим исследованием экссудата. Проведение бронхоскопии для получения бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ) у пациентов после трансплантации почки с лихорадкой неясного генеза проблематично в обычной клинической практике. Получение результата посева на МВТ требует значительного времени, что чаще всего неприемлемо для клинициста, решающего вопрос о назначении специфической терапии пациенту с иммуносупрессией.

Учитывая эти факторы, мы начали использовать ИФА для определения антител к антигенам МВТ у больных после трансплантации почки. Результат можно считать хорошим, несмотря на нарушения образования антител у больных, получающих иммуносупрессивную терапию. У 6 из 9 обследованных больных туберкулезом были обнаружены антитела к возбудителю туберкулеза. Метод приобретает особую ценность у реципиентов донорских органов, поскольку для исследования используется сыворотка крови - материал, который можно получить у всех больных без исключения. В последнее время для диагностики различных инфекций все чаще используется ПЦР, представляющая собой молекулярно-биологический метод, основанный на обнаружении специфических участков ДНК или РНК с помощью олигонуклеотидных праймеров. За рубежом этот метод начинают успешно применять в диагностике туберкулеза. Мы выполнили 5 ПЦР у 4 наших больных: ДНК МВТ определялась в моче, в крови, в моче и крови одновременно, в БАЛЖ. Геном МВТ был обнаружен у всех больных туберкулезом во всех определениях. Хотя

метод ПЦР применен нами пока у небольшого числа больных, предварительные результаты позволяют оценить его как весьма эффективный в диагностике туберкулеза. Это согласуется с данными других авторов [12, 17]. Преимуществом ПЦР является выявление у больного именно микобактерий туберкулеза, при этом ДНК нетуберкулезных микобактерий не определяется.

Заключение

Диагностика туберкулеза у больных тХПН на программном гемодиализе и у реципиентов почечных трансплантатов является сложной задачей, поскольку из-за иммунных нарушений клиническая симптоматика заболевания у таких пациентов слабо выражена и атипична, материал для бактериологического исследования нередко недоступен, а стандартная рентгенография в ряде случаев не выявляет патологических изменений.

По нашему мнению, при длительной лихорадке неясной этиологии у больных после АТП шире должна использоваться РКТ грудной клетки и брюшной полости для выявления возможного туберкулезного поражения.

Определение антител к антигенам МВТ с помощью ИФА может успешно использоваться как дополнительный метод диагностики туберкулеза у пациентов с тХПН, в т. ч. и реципиентов ренальных трансплантатов. Поскольку метод обладает хорошей специфичностью, но не очень высокой чувствительностью у данной категории больных, отрицательный результат определения антител к МВТ у пациента с подозрением на туберкулез не должен быть поводом к прекращению дальнейшего диагностического поиска.

Перспективным развивающимся направлением в диагностике туберкулеза, особенно у больных с иммунными нарушениями, является определение ДНК МВТ с помощью ПЦР.

При ведении больных с тХПН требуется особая клиническая настороженность в отношении возможного развития туберкулеза. Любая лихорадка неясного происхождения, устойчивая к антибиотикам широкого спектра, служит показанием к комплексному обследованию на туберкулез.

Список литературы:

1. Воробьев П.А., Колендо С.Е., Дворецкий Л.И. и др. Туберкулез у больных с хронической почечной недостаточностью. Тер Архив 1996; N 5: 68-71.
2. Agnado J.M., Herrero J.A., Gavalda J. et al. Clinical presentation and outcome of tuberculosis in kidney, liver, and heart transplant recipients in Spain. Spanish Transplantation Infection Study Group, GESITRA. Transplantation 1997; 63: 1278-1286.
3. Chander J., Subrahmanyam S., Gupta R. Sensitivity of EIA in the diagnosis of tuberculosis using 38-kDa antigen. J Indian Med Assoc 1996; 156:376-378.
4. Chiang I.H., Suo J., Bai K.J. et al. Serodiagnosis of tuberculosis. A study comparing three specific mycobacterial antigens. Am J Respir Crit Care Med 1997; 156: 906-911.
5. Garcia-Leoni M.E., Martin-Scapa C., Rodeno P. et al. Incidence of tuberculosis in renal patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1990; 29:283-285.
6. Higgins R.M., Cahn A.P., Porter D. et al. Mycobacterial infections after renal transplantation. QJ Med 1991; 29: 145-153.
7. Induhara R., Singh S.K., Minz M. et al. Tuberculous pyomyositis in a renal transplant recipient. Tuber Lung Dis 1992; 29: 239-241.
8. John G.T., Mutaindan U., Vincent L. et al. Primary drug resistance to Mycobacterium tuberculosis in renal transplant recipients. Nati Med J India 1995; 63:211-212.
9. Kanstova J. Serological IgG, IgM and IgA diagnosis and prognosis of mycobacterial diseases in routine practice. Eur J Med Res 1996; 1:393-403.
10. Khomenko A.G., Bayensky A.V., Chemousova L.N. et al. Serodiagnosis of tuberculosis: detection of mycobacterial antibodies and antigens. Tuber Lung Dis 1996; 37: 510-515.
11. Klempner J.D., Wang J., Hartman B.J. et al. Mycobacterium tuberculosis infection of a native polycystic kidney following renal transplantation. Transplantation 1998; 63: 118-120.
12. Napathorn S., Praditpornsilpa K., Yenrudi S. Granulomatous interstitial nephritis in renal transplant recipient. J Med Assoc Thai 1996; 63: 44-48.
13. Naqvi A., Akhtar F., Naqvi R. et al. Problems of diagnosis and treatment of tuberculosis following renal transplantation. Transplant Proc 1997; 29: 3051-3052.

14. Ozdemir F.N., GEnz G., Kayataes M. et al. Tuberculosis remains an important factor in the morbidity and mortality of hemodialysis patients. *Transplant Proc* 1998; 30: 846-847.
15. Qunibi W.Y., al-Sibal M.B., Taher S. et al. Mycobacterial infection after renal transplantation - report of 14 cases and review of the literature. *QJ Med* 1990; 63: 1039-1060.
16. Sakhuja V., Jha V., Varma P.P. et al. The high incidence of tuberculosis among renal transplant recipients in India. *Transplantation* 1996; 63:211-215.
17. Tamg D.C., Su W.J., Hnang T.P. PCR diagnosis on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues with acid-fast stain and culture negativity in chronic dialysis patients of cervico-mediastinal tuberculous lymphadenitis. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 1543-1546.
18. Yang C.W., Lee J.H., Kirn Y.G. et al. Thberculosis-associated hemophagocytic syndrome in a hemodialysis patient: case report and review of the literature. *Nephron* 1996; 29:690-692.
19. Zambardi G., Druetta A., Roure C. et al. Rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infections by an ELISA-like detection of polymerase chain reaction products. *Mol Cell Probes* 1995; 72:91-99.