

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЛЕГОЧНОГО АСПЕРГИЛЛЕЗА У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ: АЛГОРИТМ ИССЛЕДОВАНИЙ И КРИТЕРИИ ИНТЕРПРЕТАЦИИ ПОЛУЧАЕМЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

А.Б. Кулько

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

LABORATORY DIAGNOSIS OF PULMONARY ASPERGILLOSIS IN TUBERCULOSIS PATIENTS: ALGORITHM AND CRITERIA OF LABORATORY STUDY RESULTS

A.B. Kulko

Описан алгоритм лабораторной диагностики аспергиллеза легких у больных туберкулезом органов дыхания. Изложены и обоснованы критерии интерпретации результатов микологических (культуральное исследование, микроскопия) и иммунологических исследований.

Ключевые слова: лабораторная диагностика аспергиллеза легких, туберкулез легких

The algorithm of laboratory diagnosis of pulmonary aspergillosis in patients with various forms of pulmonary tuberculosis is described. The diagnostic criteria of results of mycological (microscopy and cultural studies) and immunological laboratory investigations are represented.

Keywords: laboratory diagnosis of pulmonary aspergillosis, pulmonary tuberculosis

Введение

Диагностика вторичного аспергиллеза у больных туберкулезом легких остается одной из актуальных проблем во фтизиатрической клинике. Поражения бронхолегочной системы грибами *Aspergillus spp.* отличаются значительным клинико-морфологическим разнообразием (аспергиллема легких, аллергический бронхолегочный аспергиллез – АБЛА, аспергиллезный трахеобронхит, аспергиллез плевры, инвазивный аспергиллез легких, другие клинические формы аспергиллеза), зачастую протекая под маской туберкулеза и других заболеваний легких [1-3, 8]. Вызывать инфекции бронхов и легких, в том числе у пациентов с различными формами туберкулеза, способны не только четыре основных возбудителя аспергиллеза – *Aspergillus fumigatus* (главный возбудитель всех форм заболевания), *A. flavus*, *A. niger* и *A. terreus*, но и некоторые редко встречающиеся возбудители, проводить идентификацию которых в практике микробиологических лабораторий значительно сложнее [4, 6, 14]. Колонизация дыхательных путей грибами *Aspergillus spp.* и тем более развитие аспергиллеза может сопровождаться токсическим (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. terreus*,

A. versicolor и другие *Aspergillus spp.*) и аллергическим действием (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. versicolor*) гриба на пациента. Следует учитывать, что основной возбудитель аспергиллеза грибок *A. fumigatus* обладает выраженными аллергенными свойствами (способен вызывать аллергические реакции, включая развитие бронхиальной астмы, АБЛА, аллергических риносинусита и альвеолита), а грибок *A. Flavus* (второй по частоте выявления) – вид с сильными токсическими свойствами (образует высокотоксичные метаболиты афлатоксины и ряд других микотоксинов) [4, 9, 10, 16].

Сходство клинической симптоматики и рентгенологических характеристик легочных форм туберкулеза и аспергиллеза существенно затрудняет диагностику вторичного аспергиллеза во фтизиатрической клинике [5, 7]. Решающее значение в диагностике и дифференциальной диагностике легочного аспергиллеза имеют данные лабораторных методов исследования, позволяющие обнаруживать возбудитель непосредственно в диагностическом материале (микологические и иммунологические исследования).

Вместе с тем диагностическая ценность положительных результатов лабораторных исследований различна, часто

вариабельна и определяется рядом показателей: методом исследования [выявление культур грибов рода *Aspergillus* при посеве, обнаружение клеток и клеточных структур гриба при первичной (прямой) микроскопии образцов исследуемого материала, выявление антигенов грибов *Aspergillus* и антител к ним в сыворотке крови при серологических исследованиях]; характером материала (респираторные биосубстраты, образцы легочной ткани, материалы из полостных образований легких и плевральных полостей, кровь); повторностью обнаружения возбудителя аспергиллеза при культуральных и серологических исследованиях.

Цель исследования

Обоснование критериев интерпретации результатов микологических и серологических исследований, получаемых при обследовании больных туберкулезом с подозрением на вторичный аспергиллез.

Материалы и методы исследования

Предлагаемый алгоритм лабораторной диагностики аспергиллеза и изложенные критерии оценки клинической значимости полученных результатов основываются на собственных многолетних исследованиях, проводимых с 2000 г. в микробиологической лаборатории ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», и подходах, описанных в ряде отечественных и зарубежных руководств по диагностике микозов [1–3, 6, 8, 11, 14].

Алгоритм лабораторной диагностики аспергиллеза легких в клинике туберкулеза

Рекомендуемая для использования во фтизиатрических клиниках схема лабораторной диагностики бронхолегочного аспергиллеза у больных туберкулезом включает микологические исследования (микроскопия, культуральное исследование с количественной оценкой) двух и более проб мокроты в динамике и пробы материала, полученного при фибробронхоскопии (ФБС) (жидкость бронхоальвеолярного лаважа – БАЛ, бронхиальный секрет, бронхиальный смыв).

У пациентов с полостными образованиями в легких, входящих в группу высокого риска развития вторичного аспергиллеза, при подозрении на микоз исследуют (микроскопия, культуральное исследование) высокоспецифичные материалы из легочных полостей (резекционный материал, пункционный биоптат, аспираты, смывы). На микологическое исследование поступает также диагностический материал из плевральных полостей неясной этиологии (аспираты, экссудаты, мазки). При обнаружении роста гриба *Aspergillus spp.* в легочной или плевральной полости следует провести у пациента дополнительное микологическое исследование мокроты и, если возможно, иммунологическую диагностику аспергиллеза.

Все выделенные при культуральном исследовании на пневмомикоз штаммы грибов рода *Aspergillus* необходимо идентифицировать до вида с использованием общепринятых в медицинской микологии методов [4, 6, 14]. Подробные описания 14 видов клинически значимых грибов рода *Aspergillus*, способных вызывать поражения бронхов и легких, и методика их видовой идентификации были изложены нами в иллюстрированном атласе [4]. Видовая идентификация выделенных штаммов *Aspergillus spp.* важна как для окончательной интерпретации результатов диагностики, так и для выбора противогрибкового препарата для лекарственной терапии аспергиллеза. Так, необходимо учитывать, что один из основных возбудителей аспергиллеза – вид *A. terreus* обладает природной устойчивостью к амфотерицину В [1–3, 8, 12]. В ряде случаев (при выделении вида возбудителя аспергиллеза с вариативной или сниженной чувствительностью к одному или нескольким широко распространенным системным антимикотикам и в случае клинической неэффективности терапии) целесообразно исследовать культуру возбудителя на чувствительность к противогрибковым препаратам, используя стандартизованную методику. Следует отметить установленную нами более низкую по сравнению с иными видами активность итраконазола (МПК от 0,12 до 16 мкг/мл), вориконазола (МПК от 0,25 до 8 мкг/мл) и позаконазола (МПК от 0,12 до 8 мкг/мл) в отношении клинических штаммов *A. ustus*, причем у некоторых штаммов *A. ustus* была выявлена низкая чувствительность одновременно к нескольким препаратам группы азолов; установлена сниженная активность амфотерицина В против *A. flavus* (МПК 2–8 мкг/мл) и *A. ochraceus* (МПК 2–8 мкг/мл). Полученные нами данные, характеризующие уровни чувствительности *A. flavus* к амфотерицину В и *A. ustus* к азоловым препаратам, в целом согласуются со сведениями, имеющимися в специальной микологической литературе [14], а для редкого возбудителя *A. ochraceus* подобные сведения практически отсутствуют. Тестирование чувствительности клинических штаммов грибов *Aspergillus spp.* к противогрибковым препаратам мы рекомендуем проводить методом микроразведений в бульоне со средой RPMI 1640 с определением минимальных подавляющих концентраций (МПК) в мкг/мл, используя систему Sensititre (колориметрический тест YeastOne), TREK Diagnostics Systems. Система Sensititre соответствует международным стандартам тестирования чувствительности плесневых грибов [12, 13] и включает все распространенные противогрибковые препараты, активные *in vitro* в отношении грибов рода *Aspergillus*: амфотерицин В и препараты группы азолов (вориконазол, итраконазол, позаконазол, кетоконазол). В систему Sensititre включены также препараты группы эхинокандинов (анидулафунгин, каспофунгин, микафунгин), которые, не обладая фунгицидной активностью, способны проявлять фунгистатическое действие на рост мицелия грибов рода *Aspergillus*.

Активность эхинокандинов *in vitro* оценивают не по значениям МПК препаратов, а по показателям минимальной эффективной концентрации (МЭК) [12].

При дифференциальной диагностике инвазивного аспергиллеза легких и аспергиллемы (положительные культуральные и/или клинические и рентгенологические данные) в алгоритм лабораторных исследований целесообразно включать диагностические некультуральные тесты на определение в сыворотке крови антигенов *Aspergillus* и антител к ним.

Интерпретация результатов микологических исследований

Основным клинически значимым (классическим) методом лабораторной диагностики бронхолегочного аспергиллеза остается культуральное исследование необходимого диагностического материала (мокрота, различные материалы, полученные при ФБС, биоптаты легочной ткани из очагов поражения, а также материалы из полостных образований легких и плевральных полостей) с предварительным проведением первичной микроскопии [1–3, 8, 11]. Специальное микологическое исследование, включающее микроскопию и посев, позволяет не только обнаружить возбудитель аспергиллеза в диагностическом материале, но и выделить его в чистой культуре с последующим проведением видовой идентификации и тестирования чувствительности *in vitro* к противогрибковым препаратам. Однако следует учитывать, что чувствительность микологического исследования мокроты и любых диагностических материалов, полученных инвазивными методами, ограничена, что может приводить к ложноотрицательным результатам, в частности, в случаях несвоевременной доставки материала в лабораторию или взятия пробы после начала лечения противогрибковыми препаратами. Таким образом, не следует исключать развитие бронхолегочного аспергиллеза при отсутствии роста грибов рода *Aspergillus* в диагностическом материале, особенно при однократном исследовании.

Рассмотрим подробнее диагностические характеристики различного материала, поступающего в лабораторию на микологическое исследование от больных туберкулезом органов дыхания с подозрением на бронхолегочный аспергиллез (мокрота, полученный при ФБС материал, содержимое полостных образований легких, содержимое плевральных полостей, образцы легочной ткани).

Мокрота – основной и наиболее доступный для исследования диагностический материал при подозрении на пневмомикотоз, в том числе и аспергиллезной этиологии. Исследования мокроты менее специфичны и информативны в сравнении с БАЛ, так как мокрота в значительно большей степени подвержена контаминации микробиотой (микобиотой) верхних дыхательных путей. Однако доступность материала позволяет проводить повторные культуральные исследования для диагностики и контроля лечения аспергиллеза. Выделение гриба

рода *Aspergillus* из мокроты – критерий колонизации нижних дыхательных путей данным видом и признак «вероятного» легочного аспергиллеза. Для более достоверного подтверждения колонизации и исключения контаминации образца целесообразно повторное выделение возбудителя аспергиллеза данного вида из образца мокроты. Важно учитывать, что обнаружение в посевах мокроты болезнетворных грибов рода *Aspergillus* может свидетельствовать не только о колонизации слизистых оболочек дыхательных путей (что также является значимым результатом лабораторного исследования), но и о вероятном развитии у больного туберкулезом вторичной аспергиллезной инфекции [3, 5, 8].

Образцы БАЛ и бронхиального секрета, полученные при ФБС – основной диагностический материал, высокоспецифичный при диагностике различных клинических форм бронхолегочного аспергиллеза [1–3, 8]. Выделение гриба рода *Aspergillus* при посеве данного материала расценивается как признак «вероятного» легочного микоза, но не является диагностическим критерием развития инвазивной инфекции [8, 11]. Таким образом, выделение *Aspergillus spp.* из материала, полученного при ФБС – важный признак «вероятного» легочного микоза и наиболее значимый критерий колонизации грибом нижних дыхательных путей.

Обнаружение клеток и клеточных структур плесневых грибов в образцах мокроты и БАЛ методом прямой микроскопии не имеет решающего диагностического значения при верификации аспергиллеза бронхов и легких. Кроме того, результаты микроскопии в большинстве случаев не позволяют дифференцировать грибы *Aspergillus spp.* от плесневых грибов *Acremonium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* и многих других родов. Однако результаты микроскопического исследования материала важны для подтверждения и окончательной интерпретации результатов посева. Для грибов рода *Aspergillus* характерны следующие элементы, обнаруживаемые при проведении прямой микроскопии образцов мокроты, БАЛ и других материалов: септированные гифы мицелия, конидии и конидиальные головки (структуры бесполого спороношения *Aspergillus spp.*).

При диагностике и лечении больных с деструктивными полостными образованиями в легких (каверны, туберкулемы, кисты, аспергиллемы) на микологическое исследование поступают высокоспецифичные **материалы из легочных полостей** (резекционный материал, пункционный биоптат, аспираты, смывы). Выделение гриба рода *Aspergillus* из содержимого полостного образования легких имеет диагностическое значение при верификации аспергиллеза, локализованного в легочной полости (аспергиллема) [15] и сочетанных инфекций данной локализации, а также может свидетельствовать о развитии инвазивного аспергиллеза [8]. В случае обнаружения возбудителя аспергиллеза в легочной полости целесообразно

исследовать у пациента пробы мокроты и иной доступный диагностический материал для дифференциальной диагностики вероятного инвазивного аспергиллеза легких.

От больных туберкулезом с заболеваниями плевры на микологическое исследование поступает высокоспецифичный материал (аспираты, экссудаты, мазки) из патологических плевральных полостей неясной этиологии. Выделение возбудителя аспергиллеза из данного материала имеет диагностическое значение при выявлении аспергиллезной или смешанной этиологии хронических заболеваний плевры у больных туберкулезом.

Обнаружение при прямой микроскопии материала из полостных образований легких и плевры элементов грибов, характерных для *Aspergillus spp.*, не только подтверждает результат культурального исследования, но и является одним из показателей активности гриба в деструктивной полости.

При диагностике инвазивного аспергиллеза легких наиболее ценным диагностическим материалом являются **образцы легочной ткани**, в норме стерильной. Обнаружение гриба рода *Aspergillus* в биоптате легочной ткани имеет диагностическое значение при верификации инвазивных форм аспергиллеза легких. Диагностическое значение (инвазивный микоз легких) имеют также и положительные результаты прямой микроскопии легочной ткани [2, 8, 11].

Интерпретация результатов иммунологических исследований

Серологические методы исследования позволяют проводить экспресс-диагностику аспергиллеза легких, быстрое развитие инвазивных форм которого сопряжено с риском осложнений, опасных для жизни пациента. общепринятый эффективный метод ранней диагностики инвазивного аспергиллеза – обнаружение в сыворотке крови циркулирующих галактоманнановых антигенов грибов *Aspergillus* (иммуноферментный анализ, латекс-агглютинация). Вместе с тем выявление *Aspergillus* антигемии относят к признакам «вероятного» инвазивного аспергиллеза, а при интерпретации результатов следует учитывать вероятность получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов. [2, 11]. С учетом этого положения диагностическая значимость выявления антигена *Aspergillus spp.* возрастает при повторном обнаружении галактоманнана и подтверждении положительного результата иммунологического исследования методом посева. При дифференциальной диагностике аспергиллемы и аллергических форм заболевания (АБЛА и др.) целесообразно определять в сыворотке крови и наличие специфических антител к грибам *Aspergillus spp.*; данное исследование обычно не рекомендуют проводить при диагностике инвазивных форм аспергиллеза, предполагая, что иммунный ответ у пациентов может быть недостаточно выражен [2, 8]. Выявление в сыворотке крови антител к грибам

рода *Aspergillus* также относят к признакам «вероятного» аспергиллеза.

Заключение

Все существующие прямые и непрямые лабораторные методы диагностики аспергиллеза легких имеют ограничения по чувствительности и специфичности и могут приводить как к ложноотрицательным, так и ложноположительным результатам. Культуральное исследование остается основным клинически значимым и наиболее распространенным методом лабораторной диагностики пневмомикозов, однако его чувствительность также ограничена. Не следует исключать развитие у пациента легочного аспергиллеза при отсутствии роста болезнетворного гриба, особенно при однократном исследовании материала. При интерпретации результатов микологического исследования важно учитывать характер материала, из которого были выделены грибы рода *Aspergillus* и данные, полученные методом прямой микроскопии. К результатам, имеющим диагностическое значение, относят выделение гриба рода *Aspergillus* из легочной ткани (инвазивный аспергиллез) и из содержимого легочной или плевральной полости (аспергиллез, локализованный в полости). В сравнении с мокротой культуральные исследования материалов, полученных при ФБС (БАЛ, бронхиальный секрет, бронхиальный смыв) значительно более специфичны. Информативность микологического исследования мокроты при диагностике пневмомикоза возрастает при двух- и трехкратном заборе материала.

Выявление антигенов грибов *Aspergillus* и антител к ним в сыворотке крови следует интерпретировать как признак «вероятного» аспергиллеза; диагностическая значимость положительного результата серологического исследования существенно возрастает при выделении гриба рода *Aspergillus* из посева. Серологические тесты на выявление антигенов *Aspergillus spp.* в сыворотке крови – достаточно высокочувствительные и специфичные некультуральные методы ранней диагностики системного аспергиллеза.

Окончательную интерпретацию результатов лабораторной диагностики вторичного бронхолегочного аспергиллеза у пациентов фтизиатрического профиля следует проводить по совокупности всех полученных микологических и серологических данных. В целом наиболее информативны повторные микологические исследования различных диагностических материалов, полученных от больного, причем в алгоритм культурального исследования целесообразно включать видовую идентификацию всех выделенных штаммов *Aspergillus spp.*, а в ряде случаев и определение их чувствительности к противогрибковым препаратам.

Литература

1. Гролл А.Х., Уолш Т.Д. Аспергиллез : атлас грибковых заболеваний / под ред. К.А. Кауфман, Д.Л. Манделла. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – С. 133-159.
2. Диагностика и лечение микозов / под ред. Д. Р. Хоспентала, М. Дж. Риналди. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 448 с.
3. Климко Н.Н. Микозы: диагностика и лечение: руководство для врачей. – 2-е изд. перераб. и доп. – М.: Ви Джи Групп, 2008. – 336 с.
4. Кулько А.Б. Атлас условно-патогенных грибов рода *Aspergillus* – возбудителей бронхолегочных инфекций. – М.: МНПЦБТ, 2012. – 160 с.
5. Кулько А.Б., Древалъ П.А., Воробьев А.А., Трусов В.Н. Лабораторная диагностика бронхолегочного аспергиллеза у больных туберкулезом с полостными образованиями в легких. // Проблемы медицинской микологии. – 2008. – Т. 10. – № 4. – С. 25-28.
6. Самтон Д., Фотергилл А., Ринальди М. (Sutton D., Fothergill A., Rinaldi M.) Определитель патогенных и условно патогенных грибов / пер. с англ. – М.: Изд-во Мир. – 2001. – 468 с.
7. Свищевская Е.В., Митрофанов В.С., Шендерова Р.И., Чужова Н.М. Иммуитет при туберкулезе и аспергиллезе (обзор). // Проблемы медицинской микологии. – 2005. – Т. 7. – № 1. – С. 3-13.
8. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Грибковые инфекции: руководство для врачей. – М.: Изд-во Бином, 2008. – 480 с.
9. ALLERGEN NOMENCLATURE IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee.
[Электронный ресурс] URL: // <http://www.allergen.org/index.php>. (Дата обращения 25.04.2016).
10. Alonso V., Aminahuel C., Díaz Vergara L. et al. Ecophysiology of environmental *Aspergillus fumigatus* and comparison with clinical strains on gliotoxin production and elastase activity // Lett Appl Microbiol. – 2016. – Vol. 62. – N. 2. – P. 160-168.
11. Ascioglu S., Rex J.H., de Pauw B. et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus // Clin. Infect. Dis. – 2002. – Vol. 34. – P. 7-14.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard. – 2nd ed. – SLCI document M38-A2. CLSI: Wayne, PA, 2008. – 40 p. [Электронный ресурс] URL: <http://shop.clsi.org/microbiology-documents/M38.html>. (Дата обращения 25.04.2016).
13. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST): EUCAST Definitive Document E.DEF 9.1. – 2008. – 13 p. [Электронный ресурс] URL: <http://www.indabook.org/preview/9iBO7-QTGRpRgsj0SNwnWljFD2efZmtu0u53KnLIGA4/EUCAST-DEFINITIVE-DOCUMENT-E-DEF-9-1-Method-for.html?query=EUCAST-definitions>. (Дата обращения 25.04.2016).
14. Hoog de G., Guarro J., Gene J., Figueras M. Atlas of clinical fungi: electronic version 3.1. – 3th ed. – Netherlands: CBS-KNAW FUNGAL BIODIVERSITY CENTRE, 2011.
15. Kulko A. The fungi of the genus *Aspergillus* in lung cavities of tuberculosis patients: a species spectrum and susceptibility to antimycotics. / 6th Advances against aspergillosis conference: abstract book. – P. 87.
16. The Aspergillus Website. [Электронный ресурс] URL: <http://www.aspergillus.org.uk/>. (Дата обращения 25.04.2016)

Сведения об авторе

Кулько Александр Борисович – ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ «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 (499) 268-70-33

e-mail: kulko-fungi@yandex.ru