

**ПРАВИТЕЛЬСТВО МОСКВЫ
ДЕПАРТАМЕНТ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ГОРОДА МОСКВЫ**

СОГЛАСОВАНО

Главный внештатный специалист
фтизиатр Департамента
здравоохранения г. Москвы

 Е.М. Богородская
«02» _____ 2024 г.

РЕКОМЕНДОВАНО

Экспертным советом по науке
Департамента здравоохранения
города Москвы № 5

 «02» Апреля 2024 г.

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА
АСПЕРГИЛЛЕЗА ЛЕГКИХ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ**

Методические рекомендации № 21

Москва 2024

УДК 616.5-002.72-07-08(084.121)

ББК 55.17я61

Организация-разработчик:

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы»

Составители:

Кулько А.Б. – ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии, доктор биологических наук

Иванушкина Т.Н. – заведующая туберкулезным легочным отделением № 2 Клиники № 1, кандидат медицинских наук

Исакова А.И. – научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии

Сафонова С.Г. – заведующая отделом проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии, доктор биологических наук

Лабораторная диагностика аспергиллеза легких у больных туберкулезом: методические рекомендации / сост. Кулько А.Б., Иванушкина Т.Н., Исакова А.И., Сафонова С.Г. М.: ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ», 2024. – 24 с.

Рецензенты:

Миронов Андрей Юрьевич – руководитель отдела микробиологии ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, д.м.н., профессор

Собкин Александр Лазаревич – главный врач ГБУЗ «Туберкулезная клиническая больница №3 им. профессора Г.А. Захарьина Департамента здравоохранения города Москвы, к.м.н.

Методические рекомендации предназначены для врачей фтизиатров и пульмонологов, специалистов микробиологических (микологических) лабораторий, научных сотрудников, связанных с проблемой диагностики и лечения бронхолегочного аспергиллеза

Данные методические рекомендации разработаны в рамках выполнения научно-исследовательской работы «Разработка комплекса исследований для ускоренной диагностики и детекции лекарственной чувствительности возбудителя туберкулеза и сочетанных инфекций, в том числе с применением отечественных технологий»

Данный документ является собственностью Департамента здравоохранения города Москвы и не подлежит тиражированию и распространению без соответствующего разрешения.

ISBN

©Департамент здравоохранения города Москвы, 2024

©ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ»

©Коллектив авторов, 2024

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ.....	4
ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ.....	5
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	7
СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ АСПЕРГИЛЛЕЗА БРОНХОВ, ЛЕГКИХ И ПЛЕВРЫ ВО ФТИЗИАТРИЧЕСКОЙ КЛИНИКЕ	9
АЛГОРИТМЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ БИОМАТЕРИАЛОВ НА БРОНХОЛЕГОЧНЫЙ АСПЕРГИЛЛЕЗ.....	12
КРИТЕРИИ ИНТЕРПРЕТАЦИИ ПОЛУЧАЕМЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ДАННЫХ...	17
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	19
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	21

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящем документе использованы ссылки на следующие нормативные документы (стандарты):

1. ГОСТ Р 52623.4-2015 «Технологии выполнения простых медицинских услуг инвазивных вмешательств»
2. ГОСТ Р 53079.4-2008 «Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа»
3. ГОСТ Р 51088-97 «Наборы реагентов для клинической лабораторной диагностики. Общие технические условия»
4. ГОСТ Р 51352-99 «Наборы реагентов для клинической лабораторной диагностики. Методы испытаний»
5. Федеральный закон от 18.06.2001 N 77-ФЗ (ред. от 05.12.2022) "О предупреждении распространения туберкулеза в Российской Федерации"
6. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 21.03.2003 № 109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации»
7. Приказ МЗ РФ от 29 12.14 № 951 «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания»
8. Клинические рекомендации «Туберкулез у взрослых» (утвержденные министерством здравоохранения Российской Федерации) 2022 г.

ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящем документе применяют следующие термины с соответствующими определениями:

Алейроспора – латеральная или терминальная экзогенная спора, образующаяся на вершине ответвлений гиф вегетативного мицелия или конидиеносцев (таллическая конидия) и отделяющаяся при разрыве несущей ее клетки.

Антимикотики – противогрибковые препараты.

Аскоспора – эндогенная спора полового размножения у сумчатых грибов (*Ascomycota*).

Аспергиллез – заболевание, вызванное условно-патогенными грибами из рода *Aspergillus*.

Вегетативный мицелий – мицелий, не несущий спорообразующих органов и спор.

Вздутие (везикула, апикальное расширение) – расширенная (раздутая) вершина конидиеносца грибов рода *Aspergillus*, несущая конидиогенные клетки (фиалиды); типичный элемент морфологии структур бесполого (конидиального) размножения у рода *Aspergillus*, отличительный признак данного рода.

Клейстотеций – тип плодового тела у ряда сумчатых грибов (*Ascomycota*). Клейстотеции образуют представители порядка эвроциевых (*Eurotiales*), к которому относятся телеоморфы грибов рода *Aspergillus*.

Конидиальная головка – верхушечная часть конидиеносца *Aspergillus* spp., состоящая из вздутия, конидиогенных клеток и цепочек конидий. По характеру расположения цепочек относительно вздутия различают два типа конидиальных головок: колонковидную и радиальную.

Конидиеносец (конидиофор) – специализированная, дифференцированная гифа, несущая конидии. У грибов рода *Aspergillus* образуется на гифах субстратного или воздушного мицелия, ответвляясь от специализированных толстостенных опорных клеток (основание конидиеносца).

Конидия – экзогенная спора бесполого размножения грибов.

Микромицеты – микроскопические грибы.

Минимальная подавляющая концентрация (МПК) – наименьшая концентрация препарата, подавляющая *in vitro* видимый рост исследуемой культуры гриба; выражается в мкг/мл.

Пневмомикоз – микотическое заболевание органов дыхания.

Телеоморфа – стадия полового размножения в цикле развития гриба (совершенная форма).

Условно-патогенные (оппортунистические) грибы – распространенные во внешней среде или обитающие на коже и слизистых оболочках человека в составе нормобиоты микромицеты, которые способны при определенных условиях проявлять патогенные свойства, вызывая заболевания инфекционной и аллергической природы.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АБЛА	Аллергический бронхолегочный аспергиллез
БАЛ	Жидкость бронхоальвеолярного лаважа
ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ»	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы»
МПК	Минимальная подавляющая концентрация
ФБС	Фибробронхоскопия
ХАЛ	Хронический аспергиллез легких
ХНАЛ	Хронический некротизирующий аспергиллез легких
CLSI	Институт клинических и лабораторных стандартов [Clinical and Laboratory Standards Institute]
EUCAST	Европейский комитет по определению чувствительности к антибиотикам [European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing]

ВВЕДЕНИЕ

Аспергиллез – группа опасных нозокомиальных инфекционных заболеваний легких микотической природы как воспалительного, так и аллергического характера, вызываемых условно-патогенными мицелиальными (плесневыми) грибами рода *Aspergillus* из отдела *Ascomycota* [24, 30, 40, 48]. Описано уже более 50 видов болезнетворных грибов *Aspergillus* spp. [8, 31, 44], среди которых выделяют четыре основных возбудителя аспергиллеза, регулярно вызывающих глубокие микозы с поражением легких: *A. fumigatus* (главный возбудитель всех форм аспергиллеза, наиболее значимый присутствующий в воздухе патогенный вид микроскопических грибов (микромикетов) [39]), *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* [3, 5, 41, 43].

Большинство клинически значимых видов рода *Aspergillus* – повсеместно распространенные во внешней среде эвритоппные сапротрофы, обнаруживаемые в большом количестве субстратов (почвы; растительные остатки; пищевые продукты; воздух внешней среды и внутри помещений, включая больницы; вентиляционные системы; системы распределения воды; строительная пыль) [13, 21, 28, 47]; их жизнеспособные зачатки постоянно присутствуют в воздухе лечебных стационаров [5, 15].

Конидии возбудителей аспергиллеза (от 2 до 5 мкм в диаметре), попадая в дыхательную систему человека непосредственно из воздуха или водных аэрозолей, способны проникать в альвеолярное пространство, прорастать гифами и размножаться, вызывая широкий спектр патологических процессов в легких – от состояния гиперчувствительности (реакция организма на антигены с развитием аллергии), до прогрессирующих хронических и острых агрессивных инвазивных инфекций (рост мицелия в очагах легочной ткани с последующей инвазией кровеносных сосудов и диссеминацией; возникают, как правило, у иммунокомпрометированных пациентов, часто при нейтропении) [6, 12, 19, 23, 32].

Вызванные грибами *Aspergillus* spp. заболевания легких отличаются значительным разнообразием клинических проявлений: аллергический бронхолегочный аспергиллез (АБЛА) (характеризуется реакцией гиперчувствительности I типа на антигены грибов *Aspergillus* spp.); поверхностная колонизация дыхательных путей *Aspergillus* spp. (неинвазивная форма); аспергиллез бронхов (неинвазивные и частично инвазивные формы): обструктивный аспергиллез бронхов, трахеобронхит (псевдомембранозный и язвенный); хронический аспергиллез легких (ХАЛ) (неинвазивные и частично инвазивные формы); аспергиллема легких,

хронический некротизирующий аспергиллез легких (ХНАЛ), аспергиллез культы бронха, другие более редкие формы ХАЛ; инвазивный аспергиллез легких (инвазивные и диссеминированные формы); аспергиллез плевры (аспергиллезный плеврит) [4, 10, 11, 19, 34, 35].

Развитие, форма и течение аспергиллеза зависят от: 1) наличия тяжелого сопутствующего (первичного) заболевания легких (туберкулез, саркоидоз, хроническая обструктивная болезнь легких, муковисцидоз, бронхоэктатическая болезнь); 2) состояния иммунного статуса пациента; 3) наличия факторов риска развития внутрибольничных микозов (хирургические вмешательства, инвазивные процедуры, длительная искусственная вентиляция легких, использование катетеров, в том числе сосудистых, парентеральное питание, воспалительные изменения слизистой оболочки бронхов, предшествующая колонизация дыхательных путей грибами *Aspergillus* spp.); 4) уровня контаминации помещений лечебного учреждения спорами возбудителей аспергиллеза [1, 10, 20, 22, 29].

Туберкулез – тяжелое инфекционное заболевание легких, вызываемое облигатно-патогенными бактериями *Mycobacterium tuberculosis*, остается наиболее частым первичным заболеванием, ассоциированным с аспергиллезом легких [9, 18, 27, 38]. Установлено, что эпидемиология хронических форм аспергиллеза неразрывно связана с проблемой глобального распространения туберкулеза. По оценкам, у 1,2 из 3 миллионов человек в мире больных ХАЛ данное заболевание ассоциировано с предшествующим туберкулезом легких [40]. Многочисленные данные указывают на то, что большинство случаев аспергиллемы легких и других форм ХАЛ связано с предшествующим туберкулезом легких – с фоновым кавернозным, фиброзно-кавернозным туберкулезом, наличием посттуберкулезной полости [2, 16, 19, 33, 36, 37]. Проведенные в ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ» многолетние диагностические исследования свидетельствуют об очевидно широкой распространенности неинвазивных форм бронхолегочного аспергиллеза среди пациентов медицинских организаций противотуберкулезного профиля [15, 16].

Своевременная верификация вторичного бронхолегочного аспергиллеза у больных туберкулезом органов дыхания, дифференциальная диагностика аспергиллеза с туберкулезом, вирусными заболеваниями, оппортунистическими пневмомикозами иной этиологии – сложная клинко-лабораторная задача [7, 17, 26, 42, 46], решение которой невозможно без внедрения методик адекватной лабораторной диагностики аспергиллеза в рутинную практику противотуберкулезных организаций.

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ АСПЕРГИЛЛЕЗА БРОНХОВ, ЛЕГКИХ И ПЛЕВРЫ ВО ФТИЗИАТРИЧЕСКОЙ КЛИНИКЕ

Разработанный в ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ» комплекс лабораторных методов позволяет проводить в медицинских лабораториях противотуберкулезных организаций диагностику различных клинических форм оппортунистического аспергиллеза (инвазивный аспергиллез; аспергиллез, локализованный в легочной полости; аспергиллез плевры; колонизация нижних дыхательных путей грибами *Aspergillus* spp.) [15, 17].

Рекомендуемая для использования во фтизиатрической практике схема исследования респираторного материала у больных туберкулезом при подозрении на аспергиллез включает специальные микологические исследования (микроскопия, культуральное исследование (количественный метод)) двух или более проб мокроты в динамике (на 1 и 2 сутки, при необходимости, дополнительно на 3 (4)) и пробы содержимого бронхов, полученного при фибробронхоскопии (ФБС): жидкость бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ), бронхиальный секрет, трахео-бронхиальный аспират. Содержимое бронхов, полученное при ФБС и пробы мокроты – основной диагностический материал на пневмомикоз; при необходимости дополнительно проводится микологическое исследование отделяемого из зева (культуральное исследование). В случаях когда процедуру ФБС не проводят, лабораторное обследование диагностического пациента ограничивается исследованиями проб мокроты (менее специфичным и информативным для диагностики пневмомикозов, но более доступным материалом).

Обнаружение условно-патогенного гриба рода *Aspergillus* в содержимом бронхов и/или мокроте отражает, как правило, колонизацию дыхательных путей потенциальным возбудителем аспергиллеза, но может свидетельствовать и о развитии инфекционного процесса (у пациентов с ХАЛ и инвазивными формами заболевания). Обнаружение *Aspergillus* spp. в содержимом бронхов – важнейший признак «вероятного» бронхолегочного аспергиллеза и наиболее значимым критерий колонизации грибом нижних дыхательных путей [10, 16, 23, 26]. При исследованиях мокроты для более достоверного подтверждения колонизации и исключения контаминации целесообразно повторное выделение возбудителя аспергиллеза данного вида. К высоко значимым признакам вероятного бронхолегочного аспергиллеза

относят выделение из респираторного материала основных возбудителей заболевания: *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* [13].

Обнаружение характерных элементов плесневого гриба из рода *Aspergillus* (септированные гифы (фрагменты истинного мицелия), конидии, конидиальные головки *Aspergillus* spp. (структуры спороношения)) в респираторном материале методом прямой микроскопии не имеет самостоятельного диагностического значения, но рассматривается как дополнительное надежное подтверждение обнаружения грибов *Aspergillus* spp. в мокроте и содержимом бронхов методом посева.

У больных туберкулезом с полостными образованиями в легких (каверны, туберкулемы, кисты и др.), входящих в группу высокого риска развития вторичного аспергиллеза, в первую очередь ХАЛ, проводят микологические исследования (микроскопия, культуральное исследование) хирургических материалов из образований неясной этиологии (резекционный материал; пункционный биоптат, смывы, аспираты). Выделение гриба *Aspergillus* spp. из содержимого полостных образований легких имеет диагностическое значение при верификации аспергиллеза, локализованного в легочной полости (аспергиллема и другие формы ХАЛ) и сочетанных инфекций данной локализации.

При диагностике и лечении больных туберкулезом с заболеваниями плевры на аспергиллез исследуют (микроскопия, культуральное исследование) высокоспецифичные материалы из плевральных полостей неясной или смешанной этиологии (аспираты, экссудаты, мазки). Выделение гриба *Aspergillus* spp. из содержимого плевральной полости имеет диагностическое значение при выявлении у пациентов аспергиллезной или смешанной этиологии заболеваний плевры.

Обнаружение характерных элементов плесневого гриба при микроскопии материалов из полостных образований легких и плевры является важным показателем активности возбудителя в деструктивной полости.

При диагностике инвазивного аспергиллеза легких стандартной методикой является микологическое исследование (микроскопия, культуральное исследование) образцов легочной ткани из очагов поражения (биоптат, резекционный материал). Самостоятельное диагностическое значение имеют как результат выделения возбудителя аспергиллеза из посева легочной ткани – в норме стерильной (инвазивный аспергиллез легких), так и обнаружение элементов гриба при микроскопии препарата (инвазивный микоз; в случае обнаружения при микроскопии элементов плесневого гриба – инвазивный микоз, вызванный плесневым возбудителем).

Все случаи обнаружения в хирургическом материале грибов *Aspergillus* spp. следует незамедлительно доводить до сведения лечащего врача-фтизиатра. У пациентов с выявленным аспергиллезом легких или плевры целесообразно провести дополнительные микологические исследования респираторного материала, в сочетании с исследованиями крови на обнаружение серологических маркеров инфекции (определение галактоманнанового антигена *Aspergillus* в сыворотке крови – ранняя диагностика и верификация инвазивного аспергиллеза (стандартизованные коммерческие тесты на основе иммуноферментного анализа, латекс-агглютинации); количественное определение специфических антител к грибам *Aspergillus* в сыворотке крови – диагностика и верификация хронических и аллергических форм аспергиллеза (стандартизованные коммерческие тесты на основе реакции непрямой гемагглютинации)).

Гриб *A. fumigatus* и некоторые другие возбудители аспергиллеза способны вызывать диссеминированные инфекции человека, однако обнаружение в посевах крови плесневой культуры рода *Aspergillus* не относят к маркерам инфекции, а неизменно трактуют как результат загрязнения посева из воздуха и не принимают в качестве доказательства инфекции [5, 23].

АЛГОРИТМЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ БИОМАТЕРИАЛОВ НА БРОНХОЛЕГОЧНЫЙ АСПЕРГИЛЛЕЗ

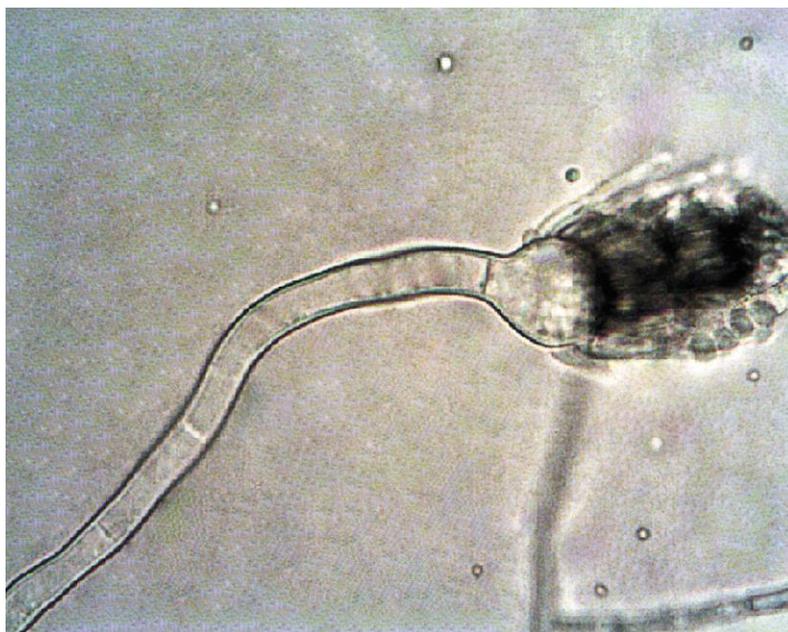
Рекомендуемая последовательность микробиологического исследования биоматериалов на вторичный аспергиллез бронхолегочной системы у больных туберкулезом включает [13, 15, 17]:

- прямую микроскопию образцов респираторного и хирургического (при добавлении хирургических материалов в схему лабораторного обследования) биоматериалов. Рекомендуемые методики прямой микроскопии для проведения рутинных микробиологических исследований в диагностических лабораториях противотуберкулезных организаций: мокрота (мазки готовят до гомогенизации пробы мокроты) – окраска по Граму, окраска по Романовскому–Гимзе (при необходимости), содержимое бронхов (мазки готовят из осадка после центрифугирования пробы) – окраска по Граму, окраска по Романовскому–Гимзе (при необходимости), плотный хирургический материал (биопсийный, резекционный) – препараты готовят в 10% растворе КОН с окраской калькофлюором белым или неокрашенными, жидкий хирургический материал (аспираты, экссудаты) (мазки готовят из осадка после центрифугирования) – нативные препараты, препараты с окраской по Граму (при необходимости);
- посевы образцов диагностических материалов на специальные питательные среды. Рекомендуемый набор питательных сред: агар Сабуро с хлорамфениколом (стандартная среда для посева респираторного и хирургического материалов), бульон Сабуро (среда обогащения для первичного выделения возбудителей аспергиллеза из хирургического материала), картофельно-декстрозный агар (дополнительная среда для посева хирургического материала при подозрении на аспергиллез, оптимальная среда для пересевов из среды обогащения для выделения возбудителей аспергиллеза из хирургического материала с последующей видовой идентификацией);
- культивирование посевов в термостате при оптимальном температурном режиме для выделения и дифференциации оппортунистических грибов. Рекомендуемый режим культивирования: мокрота, содержимое бронхов (посев проводят количественным методом, используя три чашки Петри: две чашки с дозированным объемом материала по 0,1 мл и контрольная чашка) – при 30°C (чашка с дозированным объемом материала и контрольная чашка) и 37°C (чашка с дозированным объемом материала) в

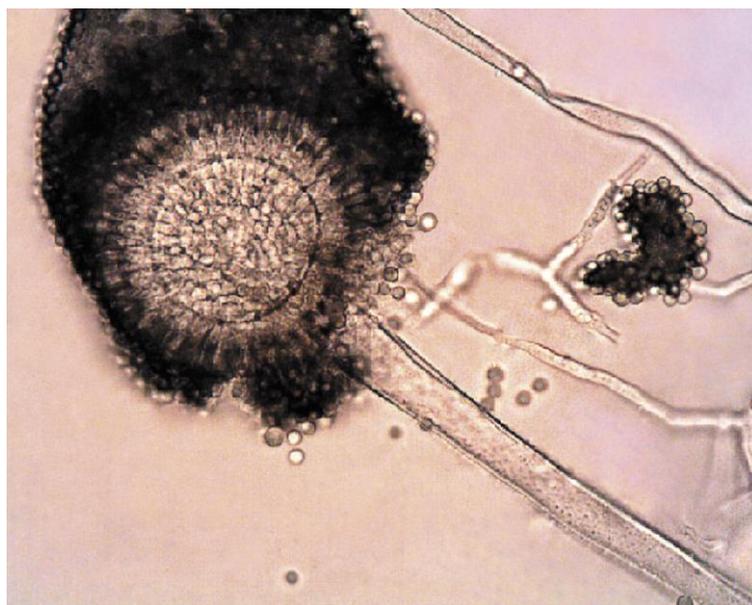
обычной атмосфере, плотный и жидкий хирургический материал – при 30°C в обычной атмосфере;

- идентификацию выделенных из посевов клинических штаммов грибов рода *Aspergillus* до уровня вида. Видовую идентификацию плесневых грибов рода *Aspergillus* проводят с помощью специальных атласов-определителей [13, 21, 31], после обязательного субкультивирования штаммов на стандартных идентификационных средах (агар Чапека–Докса (стандартная справочная среда), картофельно-декстрозный агар) по совокупности микроморфологических признаков: 1) морфология бесполой стадии гриба (конидиеносцы, вздутия (шаровидные, полушаровидные, эллиптические, булавовидные или другой формы), конидиальные головки (колонковидные, рыхлоколонковидные или радиальные), конидиогенные структуры (однорусные или двухъярусные), конидии), 2) морфология вегетативных структур (гифы вегетативного мицелия, покровные клетки (при образовании), склероции (при образовании), алейроспоры (при образовании)), 3) морфология половой стадии (телеоморфы), в случае образования *in vitro* (структуры полового спороношения (клеистотеции, сумки (аски)), аскоспоры; телеоморфы в культуре формируются у возбудителей *A. glaucus* (регулярно), *A. nidulans* (у части штаммов), *Eurotium amstelodamii* (= *A. hollandicus*) (регулярно)); макроморфологических признаков (характеристика колоний: цвет поверхности; структура, характер и зональность поверхности; наличие и окраска экссудата; наличие и окраска растворимого в среде пигмента; окраска обратной стороны колонии (реверзума); скорость и характер роста (по диаметру колонии в процессе роста), интенсивность спороношения); способности к росту *in vitro* при 37°C (важный дополнительный дифференцирующий признак). Микроскопическое исследование штаммов проводят сразу после начала споруляции (как правило, на 3 сутки исследования); культуру гриба на предметное стекло с каплей дистиллированной воды переносят с помощью микологического крючка и накрывают покровным стеклом; препараты исследуют при x400 и x1000 (при необходимости) увеличениях;
- тестирование чувствительности выделенных штаммов *Aspergillus* spp. к антифунгальным препаратам (триазольным антимикотикам (вориконазолу, итраконазолу, позаконазолу), амфотерицину В). Согласно данным по наличию вариативной активности антимикотиков, применяемых для терапии аспергиллеза, в отношении ряда возбудителей [14, 15, 31], выбор препарата для эффективной терапии аспергиллеза

целесообразно проводить на основании результатов тестирования *in vitro*. По нашим данным, для возбудителей *A. terreus* (рис. 1), а также *A. flavus* (рис. 2), *A. ochraceus* характерна сниженная природная чувствительность к препарату амфотерицин В; для возбудителя *A. ustus* (рис. 3) – сниженная чувствительность ко всем триазольным препаратам. У части клинических штаммов *A. ustus*, *A. nidulans* была обнаружена перекрестная резистентность к двум или более антимикотикам группы азолов, что может существенно осложнять подбор препарата для лечения аспергиллеза, вызванного этими возбудителями [14, 15]. Для определения чувствительности клинических штаммов *Aspergillus* spp. с последующей интерпретацией значений минимальной подавляющей концентрации (МПК) препаратов следует использовать только стандартизованные тест-системы, рекомендованные для применения в клинических лабораториях для тестирования плесневых грибов [15, 46]. Мы рекомендуем использовать тест-систему «Sensititre» (колориметрический тест «YeastOne»), TREK Diagnostic Systems, соответствующую стандарту тестирования чувствительности плесневых грибов организации CLSI [14, 25]. Система включает препараты, обладающие активностью в отношении грибов рода *Aspergillus*, адаптирована для определения лекарственной чувствительности у возбудителей аспергиллеза (необходимое условие – способность выделенного штамма *Aspergillus* spp. к росту *in vitro* при 35°C) и позволяет использовать для оценки чувствительности грибов *Aspergillus* spp. к вориконазолу, итраконазолу, позаконазолу, амфотерицину В пограничные значения МПК, установленные организацией EUCAST (на основании соответствия методик тестирования и учета результатов). Для повышения достоверности получаемых результатов и безопасности проведения тестирования рекомендуем использовать модифицированную нами методику приготовления споровой суспензии грибов *Aspergillus* spp. [14, 17].



*Рисунок 1 - Микроморфология штамма *Aspergillus terreus* Thom 1918, x1000. Штамм выделен из резецированной кисты легкого больной туберкулезом бронхов*



*Рисунок 2 - Микроморфология штамма *Aspergillus flavus* Link 1809, x4000. Штамм выделен из бронхиального аспирата больной фиброзно-кавернозным туберкулезом*



Рисунок 3 –Микроморфология штамма Aspergillus ustus (Bainier) Thom et Church, x1000. Штамм выделен из полости эмпиемы больного туберкулезом

КРИТЕРИИ ИНТЕРПРЕТАЦИИ ПОЛУЧАЕМЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ДАННЫХ

Интерпретацию значимых результатов лабораторных исследований на бронхолегочный аспергиллез у больных туберкулезом следует проводить в категориях «диагностически значимый признак микоза», «признак вероятного микоза», «признак колонизации» [15, 17].

К результатам лабораторного обследования на аспергиллез, имеющим самостоятельное диагностическое значение, относят:

- выделение гриба рода *Aspergillus* из посева образца легочной ткани с признаками поражения (инвазивный легочный аспергиллез);
- микроскопические находки элементов плесневого гриба в образце легочной ткани с признаками поражения (инвазивный плесневый микоз);
- выделение гриба рода *Aspergillus* из посева содержимого полостного образования легких (аспергиллез, локализованный в легочной полости (аспергиллема, другие формы ХАЛ) или сочетанная инфекция данной локализации; признак также может свидетельствовать о развитии инвазивного микоза легких);
- выделение гриба рода *Aspergillus* из посева материала из плевральной полости (аспергиллез плевры или заболевание плевры смешанной этиологии; признак также может свидетельствовать о развитии инвазивного микоза).

К критериям колонизации слизистых оболочек бронхов и признакам вероятного бронхолегочного аспергиллеза относят:

- выделение гриба рода *Aspergillus* из посева содержимого бронхов (ФБС);
- выделение гриба рода *Aspergillus* из посева мокроты.

Обнаружение гриба *Aspergillus* spp. в содержимого бронхов и повторное выделение гриба рода *Aspergillus* одного вида из образцов мокроты являются надежными критериями выявления колонизации нижних дыхательных путей потенциальным возбудителем аспергиллеза.

К признакам вероятного аспергиллеза относят:

- обнаружение в сыворотке крови антигенов грибов *Aspergillus* (признак вероятного инвазивного и/или диссеминированного микоза [5, 15]).
- обнаружение в сыворотке крови антител к грибам *Aspergillus* (признак вероятного бронхолегочного аспергиллеза (аспергиллемы, других форм легочного аспергиллеза) [26].

Представляется целесообразным проведение специального клинико-лабораторного обследования больных туберкулезом, у которых выявлены

следующие лабораторные признаки аспергиллеза:

- обнаружение гриба рода *Aspergillus* при посеве образца легочной ткани;
- обнаружение элементов плесневого гриба при микроскопии образца легочной ткани;
- выделение гриба рода *Aspergillus* из посева содержимого полостного образования легких;
- выделение гриба рода *Aspergillus* из посева содержимого плевральной полости;
- колонизация нижних дыхательных путей вероятными возбудителями бронхолегочных аспергиллеза;
- обнаружение *Aspergillus* антигенемии;
- обнаружение присутствия в сыворотке крови специфических антител к грибам *Aspergillus* (в количестве, которое интерпретируется производителем тест-системы как достоверная реакция в пользу развития глубокого аспергиллеза).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование в практических исследованиях разработанных алгоритмов комплексной лабораторной диагностики вторичного аспергиллеза у пациентов фтизиатрического профиля позволило подтвердить имеющиеся данные о высокой частоте ассоциации туберкулеза легких и различных форм вторичного бронхолегочного аспергиллеза: аспергиллемы и других форм ХАЛ, обусловленных колонизацией полостей легких, сформировавшихся в результате предшествующего туберкулеза, болезнетворными грибами рода *Aspergillus*; аспергиллеза плевры; колонизации нижних дыхательных путей грибами *Aspergillus* spp. По результатам многолетних диагностических исследований, группа больных туберкулезом с признаками развития бронхолегочного аспергиллеза составила 8,8% от числа обследованных методами микробиологической диагностики. У пациентов были обнаружены следующие признаки заболевания: выделение возбудителя аспергиллеза из биоптата бронхов; выделение возбудителя аспергиллеза из легочной полости; выделение возбудителя аспергиллеза из плевральной полости; колонизация дыхательных путей болезнетворными грибами *Aspergillus* spp. Доля случаев обнаружения возбудителя аспергиллеза в легочной полости составляла 10,1% от числа обследованных; в плевральной полости – 8,2% от числа обследованных. Грибы, вызывающие развитие аспергиллеза, колонизировали дыхательные пути у 8,1% обследованных больных туберкулезом (от 1 до 4 видов).

Среди выявленных 14 возбудителей аспергиллеза по частоте обнаружения у больных туберкулезом и по числу выделенных штаммов преобладали грибы *A. fumigatus* (доминирующий вид, обнаруженный во всех видах респираторного и хирургического материалов; 30,0% штаммов) *A. niger* (доминирующий вид; 22,6% штаммов), *A. flavus* (9,0% штаммов) (рис. 2), *A. versicolor* (7,7% штаммов). Гриб *A. terreus* (рис. 1), обладающий природной устойчивостью к амфотерицину В и относящийся к группе основных возбудителей аспергиллеза, обнаруживался реже (4,3% штаммов), однако вызывал значительное число случаев микозов легочной полости, уступая лишь *A. fumigatus*. Доля штаммов *A. ustus* (рис. 3), обладающего пониженной чувствительностью к триазолам, составляла 3,4%.

При организации лабораторной диагностики аспергиллеза в медицинских организациях противотуберкулезного профиля целесообразно придерживаться изложенных нами методических подходов. Вероятность обнаружения возбудителя в биоматериале высоко зависима от качества

методов, применяемых в лаборатории: методик приготовления образцов для прямой микроскопии, набора питательных сред, методов посева и режимов культивирования.

Все выделенные при исследовании на аспергиллез клинические штаммы *Aspergillus* spp. необходимо идентифицировать до вида. Оценку активности амфотерицина В и триазольных антимикотиков (вориконазол, итраконазол, позаконазол) в отношении обнаруженных возбудителей следует проводить на основании данных о видовой принадлежности выделенных штаммов и по результатам лабораторного тестирования чувствительности *in vitro* с определением МПК.

Для оценки чувствительности мицелиальных грибов рода *Aspergillus*, проявляющих вариативную или сниженную чувствительность к антимикотикам (амфотерицин В, триазольные антимикотики) или в случае неэффективности терапии, необходимо проводить определение чувствительности к препаратам с определением МПК.

Окончательную интерпретацию результатов лабораторного обследования на бронхолегочный аспергиллез следует проводить по совокупности всех получаемых микробиологических и серологических данных.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Аравийский Р.А., Климко Н.Н., Васильева Н.В. Диагностика микозов. – СПб.: СПб МАПО. – 2004. – 186 с.
2. Борзова Ю.В., Десятик Е.А., Хостелиди С.Н. и др. Хронический инвазивный аспергиллез легких у больных в Санкт-Петербурге // Проблемы медицинской микологии. – 2009. – Т. 11, № 3. – С. 20-25.
3. Бутова С.А., Курбатова И.В. Системные микозы – возрастающая проблема // Успехи медицинской микологии. – 2006. – Т. 8 – С. 112-113.
4. Гролл А.Х., Уолш Т.Д. (Groll A.H., Walsh T.J.) Аспергиллез. // В кн.: Атлас грибковых заболеваний. Под ред. К.А. Кауфман, Д.Л. Манделла. Пер. с англ. – М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2010. – с. 133-159.
5. Диагностика и лечение микозов. Под ред. Д. Р. Хоспентала, М. Дж. Риналди. – М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2013. – 448 с.
6. Диагностика и лечение микозов в отделениях реанимации и интенсивной терапии: Российские рекомендации /Отв. ред. Н.Н. Климко. – 2-е изд., доп. и перераб. – М.: Фармтек, 2015. – 96 с.
7. Дорожкова И.Р. Методы комплексной лабораторной диагностики воспалительных и аллергических грибковых поражений легких. Пособие для врачей. – М., 1997. – 17 с.
8. Иванушкина Н.Е. Род *Aspergillus*: номенклатура, классификация, распространение // В сб.: Новое в систематике и номенклатуре грибов / под ред. Ю.Т. Дьякова, Ю.В. Сергеева. – М.: Национальная академия микологии. Медицина для всех, 2003. – С. 136-163.
9. Казарова Т.А. Значение грибов рода *Aspergillus* в развитии бронхолегочной патологии (обзор литературы) // Проблемы туберкулеза. – 1998. – № 1. – С. 57-61.
10. Климко Н.Н. Микозы: диагностика и лечение. Руководство для врачей. 2-е изд. перераб. и доп. – М.: Ви Джи Групп, 2008. – 336 с.
11. Климко Н.Н., Васильева Н.В. Микозы легких. // В кн.: Пульмонология: Национальное руководство. Под ред. А. Г. Чучалина. – М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2016. – с. 236–249.
12. Клясова Г.А., Петрова Н.А., Паровичникова Е.Н. и др. Инвазивный аспергиллез легких // Терапевтический архив. – 2005. – № 7. – С. 65-71.
13. Кулько А.Б. Атлас условно-патогенных грибов рода *Aspergillus* – возбудителей бронхолегочных инфекций. – М.: МНПЦБТ. – 2012. – 160с.
14. Кулько А. Б. Изучение чувствительности к противогрибковым препаратам грибов рода *Aspergillus* – возбудителей бронхолегочных инфекций у

- больных туберкулезом // Туберкулез и болезни легких. – 2017. – Т. 95. – №7. – С. 54-60.
15. Кулько А.Б. Бронхолегочные микозы у больных туберкулезом: состав и свойства возбудителей, лабораторная диагностика: автореф. дис. ... докт. биол. наук: 03.02.03. – Москва – 2020. – 49 с.
 16. Кулько А.Б., Древаль 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.
 17. Лабораторная диагностика легочных микозов во фтизиатрической клинике. Методические рекомендации №24 / А.Б. Кулько, С.Г. Сафонова, Т.Н. Иванушкина, Е.В. Ермачкова – М., 2019. – 28 с. (Рекомендовано Департаментом здравоохранения города Москвы, 17.04.2019 г.).
 18. Масчан А.А., Клясова Г.А., Веселов А.В. Обзор рекомендаций американского общества по инфекционным болезням по лечению аспергиллеза // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2008. – Т. 10, № 2. – С. 96-143.
 19. Митрофанов В.С., Свирщевская Е.В. Аспергиллез легких. 2-е изд., перераб. и доп. – СПб.: Изд-во Фолиант, 2013. – 184 с.
 20. Рунке М. Грибковые инфекции у иммунокомпрометированных пациентов (эпидемиология, диагностика, терапия, профилактика) // Проблемы медицинской микологии. – 2000. – Т. 2, № 1. – С. 4-16.
 21. Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М. (Sutton D., Fothergill A., Rinaldi M.) Определитель патогенных и условно патогенных грибов: Пер. с англ. – М.: Издательство Мир. – 2001. – 468 с.
 22. Свирщевская Е.В., Митрофанов В.С., Шендерова Р.И., Чужова Н.М. Иммунитет при туберкулезе и аспергиллезе (обзор) // Проблемы медицинской микологии. – 2005. – Т. 7, № 1. – С. 3-13.
 23. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Грибковые инфекции. Руководство для врачей. 2 изд. – М.: Изд-во Бином, 2008. – 480 с.
 24. Bennett J.W. An overview of the genus *Aspergillus* In: *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics* / Eds. M. Machida, K. Gomi. – Caister Academic Press, 2010. – P. 1-17.
 25. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard – Second edition. CLSI document M38-A2. CLSI: Wayne, PA., 2008. – 35 p.

26. Denning D.W., Cadranel J., Beigelman-Aubry C. Ader F. et al. Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. // *Eur Respir J.* – 2016. – Vol. 47. – P. 45-68.
27. Denning D.W., Pleuvry A., Cole D.C. Global burden of chronic pulmonary aspergillosis as a sequel to pulmonary tuberculosis // *Bull World Health Organ.* – 2011. – Vol. 1, № 89(12). – P. 864-872.
28. Domsch K.H., Gams W., Anderson T.-H. Compendium of soil fungi. 2nd ed. revised by W. Gams. – IFW Verlag Eching, 2007. – 672 p.
29. Enoch D.A., Ludlam H.A., Brown N.M. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options // *J Med Microbiol.* – 2006. – Vol. 55. – P. 809-818.
30. Gao Y., Soubani A.O. Advances in the diagnosis and management of pulmonary aspergillosis. // *Adv Respir Med.* – 2019. – Vol. 87. – P. 231-243.
31. Hoog de G.S., Guarro J., Gene J., Figueras M.J. Atlas of clinical fungi. Electronic Version 3.1 – CBS: Reus, 2011.
32. Hope W.W., Walsh T.J., Denning D.W. The invasive and saprophytic syndrome due to *Aspergillus* spp. // *Med Mycol.* – 2005. – Vol. 43(1). – P. 207-238.
33. Ikeda M., Sonobe M., Date H. Resection of bronchial stricture and destroyed lung after pulmonary tuberculosis // *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* – 2012. – Vol. 14(5). – P. 652-654.
34. Kanj A., Abdallah N., Soubani A.O. The spectrum of pulmonary aspergillosis // *Respir Med.* – 2018. – Vol. 141. – P. 121-131.
35. Kousha M., Tadi R., Soubani A.O. Pulmonary aspergillosis: a clinical review // *Eur Respir Rev.* – 2011. – Vol. 20(121). – P. 156-174.
36. Koyama K., Ohshima N., Suzuki J. et al. Evaluation of clinical characteristics and prognosis of chronic pulmonary aspergillosis depending on the underlying lung diseases: Emphysema vs prior tuberculosis // *J Infect Chemother.* – 2015. – Vol. 21(11). – P. 795-801.
37. Kulko A. The fungi of the genus *Aspergillus* in lung cavities of tuberculosis patients: a species spectrum and susceptibility to antimycotics // Abstract book 6th Advances Against Aspergillosis conference (Madrid, Spain, 27 February - 1 March 2014). – 2014. – P. 87.
38. Kulko A., Dreval P. Yeasts and mycelial fungi in lung cavities of tuberculosis patients // Abstracts on CD-ROM 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Vienna, Austria, 10-13 April 2010). *Clinical Microbiology and Infection.* – 2010. – Vol. 16 (2).
39. Latgé J.P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis // *Clin Microbiol Rev.* – 1999. – Vol. 12(2). – P. 310-350.

- 40.LIFE (Leading International Fungal Education). – URL: <https://fungalinfectiontrust.org/what-we-do/life-worldwide-org/>
- 41.Patterson T.F. *Aspergillus* species // In: Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases / Eds. G.L. Mandell, J.E. Bennett, R. Dolin. – 7th ed. – Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2010. – P. 3241-3256.
- 42.Patterson T.F., Thompson G.R., Denning D.W. et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. – Clin Infect Dis. – 2016. – Vol. 63(4). – P. 433-442.
- 43.Sugui J.A., Kwon-Chung K.J., Juvvadi P.R. et al. *Aspergillus fumigatus* and related species // Cold Spring Harb Perspect Med. – 2014. – Vol. 5(2). – a019786.
- 44.The Aspergillus Website - Aspergillus and Aspergillosis. – URL: <http://www.aspergillus.org.uk>
- 45.The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs for antifungal agents, version 10.0, 2020.
- 46.Ullmann A.J., Aguado J.M., Arikan-Akdagli S., et al. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. // Clin Microbiol Infect. – 2018. – Vol. 24. – P. e1-e38.
- 47.Warris A., Verweij P.E. Clinical implications of environmental sources for *Aspergillus* // Med Mycol. – 2005. – Vol. 43 (1). – P. 59-65.
- 48.Zmeili O.S., Soubani A.O. Pulmonary aspergillosis: a clinical update // Q J Med. – 2007. – Vol. 100(6). – P. 317-334.