

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ГРИБКОВЫХ ИНФЕКЦИЙ ЛЕГКИХ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ

Кулько А. Б., Митрохин С. Д.

Московский научно-практический центр борьбы
с туберкулезом Департамента здравоохранения
города Москвы, Россия

© Кулько А. Б., Митрохин С. Д., 2005

В статье проанализированы результаты микологических обследований больных туберкулезом органов дыхания, полученные за два года исследований в клинике туберкулеза. Описана схема лабораторной диагностики грибковых инфекций легких и критерии интерпретации результатов исследования. К группе риска развития легочного микоза отнесено 42,6 % обследованных больных. Выявлено большое видовое разнообразие дрожжевых и плесневых грибов, колонизирующих нижние отделы дыхательных путей, а также вегетирующих в полостях легких и плевральных полостях у больных туберкулезом.

Ключевые слова: грибковые инфекции легких, оппортунистические грибы, туберкулез легких

LABORATORY DIAGNOSIS OF FUNGAL PULMONARY INFECTIONS IN PATIENTS WITH TUBERCULOSIS

Kulko A. B., Mitrokhin S. D.

Scientific and Clinical Antituberculosis Center of
Moscow Government Health Department, Russia

© Kulko A. B., Mitrokhin S. D., 2005

The results of mycological investigation of patients with various forms of pulmonary tuberculosis received during two years have been analyzed. The schema and the criteria of laboratory diagnosis are described. The risk group for pulmonary mycosis was 42,6 % of patients with pulmonary tuberculosis. High level of species diversity of yeast and mold fungi colonizing lower section of respiratory tract, lung and pleural cavities in tuberculosis patients has been revealed.

Key words: fungal pulmonary infection, opportunistic fungi, pulmonary tuberculosis

ВВЕДЕНИЕ

Одним из важных и необходимых направлений

в работе микробиологической лаборатории во фтизиатрической клинике является диагностика разнообразных оппортунистических грибковых инфекций. Больных туберкулезом легких относят к группе риска развития вторичных пневмомикозов, которые определяются течением самого туберкулезного процесса и наличием ряда предрасполагающих факторов: длительным применением комбинаций химиотерапевтических препаратов, в том числе — антибиотиков широкого спектра действия, ростом числа инвазивных процедур, наличием у больного полостей в легких и др. [1–3]. К факторам риска развития грибковых инфекций бронхов и легких относят также колонизацию условно-патогенными грибами слизистых оболочек нижних отделов дыхательных путей [4].

Отсутствие на сегодняшний день единых диагностических критериев и стандартизации лабораторной диагностики микозов органов дыхания, в том числе — у больных туберкулезом, приводит к неопределенности в интерпретации результатов лабораторного обследования больного [5]. Практикующие врачи-фтизиатры не располагают информацией о том, как следует оценивать результат, полученный тем или иным лабораторным методом.

В связи с этим, представляет интерес разработка алгоритма лабораторной диагностики грибковых инфекций нижних дыхательных путей у больных туберкулезом, приемлемого для рутинных исследований во фтизиатрической клинике. Изложенные ниже схема диагностики и критерии интерпретации полученных результатов основываются на собственных исследованиях, проведенных в микробиологической лаборатории Московского научно-практического центра борьбы с туберкулезом (МНПЦБТ) и данных, приведенных в ряде руководств по диагностике и лечению микозов [1, 4, 5–9].

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

В настоящее время основными клинически значимыми методами лабораторной диагностики микозов органов дыхания являются: микроскопия клинического материала, культуральное исследование и иммунологическая диагностика (обнаружение антигенов и антител в сыворотке крови по стандартным методикам: иммуноферментный анализ, латекс-агглютинация и др.). Однако все существующие прямые и непрямые методы имеют ограничения по чувствительности и специфичности и могут приводить как к ложноотрицательным, так и ложноположительным результатам, особенно — при однократном исследовании [1, 4, 5, 10]. Достоверные результаты, необходимые клиницисту для подтверждения или исключения «вероятного» микоза легких, в большинстве случаев, могут быть получены в ходе комплексного лабораторного обследования больного. Наиболее информативны повторные микро-

биологические исследования (микроскопия, посев) образцов бронхиальных смывов, мокроты и других клинических материалов, полученных от больного.

Сегодня общепризнанно, что для диагностики микозов органов дыхания более специфичны и предпочтительны микробиологические исследования клинических материалов, полученных инвазивным методом: биоптатов, смывов с бронхов и др. Однако следует учитывать, что чувствительность метода посева ограничена и, в частности, при развитии инвазивного легочного микоза не всегда удается выделить культуру возбудителя из образца ткани или бронхиального смыва. Нередко единственным лабораторным подтверждением микоза является обнаружение клеток и структур гриба при микроскопии биоматериала [4, 5].

Во фтизиатрических стационарах лабораторные исследования клинического материала от больного при подозрении на пневмомикоз ограничиваются, как правило, менее специфичным исследованием образца мокроты. Информативность данного исследования возрастает при двух- и трехкратном заборе материала.

Исследования мокроты, повторяющиеся многократно через определенные промежутки времени, позволяют оценивать количественное содержание предполагаемого возбудителя инфекции в динамике. Данные показатели особенно важны при диагностике инфекций бронхов и легких, вызванных условно-патогенными грибами *Candida* spp. и *Geotrichum candidum*. Следует учитывать, что различные виды *Candida*, а также *G. candidum* обнаруживают у здоровых лиц в составе нормобиоты на слизистых оболочках отделов верхних дыхательных путей, поскольку они могут быть распространенными контаминантами мокроты [10, 11].

В схему лабораторной диагностики микозов органов дыхания в МНПЦБТ включают микроскопические и культуральные исследования трех образцов мокроты в динамике и образца бронхиального смыва, полученного при бронхоскопии. При необходимости проводят культуральное исследование отделяемого из зева. На исследование (микроскопия, посев) также поступают образцы легочной ткани, материалы из полостных образований легких и плевральных полостей: биоптаты, резекционный материал, аспираты. При подозрении на аспергиллез или кандидоз легких в алгоритм диагностики включают иммунологическое исследование (обнаружение в сыворотке крови антигенов *Aspergillus* и *Candida* с помощью тест-наборов латекс-агглютинации Pastorex, Bio-Rad), а в ряде случаев — и посев крови на специальные питательные среды.

В МНПЦБТ применяют несколько распространенных методик прямой микроскопии. Препараты для микроскопии из образцов мокроты и бронхиальных смывов (осадок после центрифугирования пробы) окрашивают по Граму. Препараты из биоптатов ткани, резекционного материала, аспиратов содер-

жимого полостей легких и плевральных полостей готовят с добавлением 10% раствора щелочи (KOH) — с обработкой калькофлюором белым (люминесцентная микроскопия) или неокрашенными [4]. С нашей точки зрения, метод микроскопии со щелочью, применяемый с различными модификациями окраски, доступен и достаточно информативен при работе с биоптатом и материалом, полученным после резекции легких. Внедрение в практику микробиологической лаборатории фтизиатрической клиники специального гистологического исследования при микроскопии образцов легочной ткани ограничено организационными и методическими трудностями [12].

Первичный посев клинических образцов проводится нами на агар Сабуро с хлорамфениколом. Посевы инкубируют при двух температурных режимах — 30 и 37° С, что позволяет выявлять возможный дрожже-мицелиальный диморфизм возбудителя микоза [13] и обнаруживать культуры, не способные к росту на питательной среде при 37° С. Следует учитывать, что слабый рост или его отсутствие при 37° С характерны не только для большинства сапротрофных микромицетов из внешней среды, контаминирующих биоматериал [6], но также и для некоторых видов условно-патогенных грибов (*Absidia coerulea* [14], *Aspergillus restrictus* [11] и др.).

Выделенные штаммы грибов идентифицируют до уровня вида/рода. Для идентификации дрожжевых грибов используют селективные хромогенные среды «CandiSelect 4» (Bio-Rad) и «Albicans ID2» (BioMerieux) — для идентификации *Candida albicans* и предварительной идентификации *C. glabrata*, *C. krusei* и *C. tropicalis*; среду кукурузный агар — для определения микроморфологических признаков культуры, а также коммерческие тест-системы, основанные на исследовании ауксанограммы: «Auxacolor 2» (Bio-Rad) и «API 20 C AUX» (BioMerieux) [2]. Штаммы плесневых (мицелиальных) грибов пересевают на картофельно-декстрозный агар и, в ряде случаев, на стандартную среду — агар Чапека и идентифицируют по макро- и микроскопическим признакам культуры (микроморфологию гриба изучают во влажных неокрашенных препаратах) [11, 14].

Как известно, в алгоритм микологической диагностики глубоких кандидозов необходимо включать современную методику определения чувствительности выделенных от больных штаммов *Candida* spp. к антимикотикам, обеспечивающую высокую воспроизводимость результатов [8,10]. Однако определение чувствительности дрожжевых грибов макро-методом серийных разведений в бульоне или в среде RPMI 1640 (стандартная методика Национального комитета по клиническим лабораторным стандартам (NCCLS) [15]) представляет собой крайне трудоемкую и дорогостоящую процедуру, непригодную, по нашему мнению, для рутинных лабораторных исследований во фтизиатрической клинике. Упростить и ускорить процедуру тестирования позволяет метод

микроразведений в той же среде и его модификации, использованные в ряде коммерческих тест-систем [4, 11]. Для определения чувствительности дрожжевых грибов к антимикотикам нами была выбрана тест-система «Fungitest» (Bio-Rad), позволяющая определять чувствительность к следующим противогрибковым препаратам: флуконазолу, итраконазолу, кетоконазолу, миконазолу, амфотерицину В, 5-фторцитозину (флуцитозину) [16, 17].

К сожалению, стандартные методы определения чувствительности различных плесневых грибов к настоящему времени еще не разработаны в полном объеме. Кроме того, недостаточно сведений о клиническом значении тестирования чувствительности плесневых грибов, выделенных в качестве этиологических агентов при микозах легких, в частности, у больных туберкулезом. Учитывая вышесказанное, включать данное исследование в практику микробиологической лаборатории во фтизиатрической клинике представляется нецелесообразным [4, 11].

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Обнаружение дрожжевого или плесневого гриба в биоптате легочной ткани, в норме стерильной — микроскопически и/или культурально-диагностически значимый критерий грибковой инфекции, подтверждающий диагноз инвазивного легочного микоза [4, 9, 10].

Наличие грибковой инфекции у больных туберкулезом (сочетанная инфекция, микоз) подтверждается выделением культуры гриба из материала, полученного из полостного образования легких (каверна, туберкулема) или из плевральной полости. Очевидно, что данные больные входят в группу риска развития инвазивного легочного/диссеминированного микоза. При дифференциальной диагностике «вероятной» инвазии в лаборатории МНПЦБТ проводят дополнительные микробиологические исследования мокроты и бронхиального смыва, а в случае выделения из полости грибов *Aspergillus* или *Candida* — специальное иммунологическое исследование на присутствие антигенов в сыворотке крови.

Выделение условно-патогенного гриба из бронхиального смыва или мокроты относят к критериям «вероятного» легочного микоза, поскольку результат исследования не позволяет дифференцировать микоз от колонизации [4, 5, 9, 13].

Наиболее достоверно состав грибов, колонизирующих слизистые оболочки нижних отделов дыхательных путей, определяют при посеве материала, полученного при бронхоскопии [4, 18]. Колонизация проявляется также неоднократным выделением из мокроты гриба, заселившего поверхность слизистой оболочки [4]. С учетом имеющихся в литературе рекомендаций, мы использовали следующие крите-

рии культуральной диагностики колонизации грибами нижних отделов дыхательных путей: выделение гриба из бронхиального смыва и повторное выделение гриба одного вида из образцов мокроты. Обнаружение в двух и более образцах мокроты у больного туберкулезом *Candida* sp. в количестве $\geq 1 \cdot 10^3$ КОЕ/мл мы расценивали как критерий массивной колонизации нижних отделов дыхательных путей грибами *Candida* и признак «вероятного» легочного кандидоза [1, 3].

К признакам «вероятного» инвазивного/диссеминированного микоза относят обнаружение в сыворотке крови антигена грибов *Aspergillus* или *Candida* [9, 10].

Таким образом, представляется целесообразным проведение специального клинико-лабораторного обследования больных туберкулезом из группы высокого риска развития микоза органов дыхания, у которых выявлены следующие лабораторные признаки инфекции:

- обнаружение дрожжевого или плесневого гриба при микроскопии и/или посеве биоптата легочной ткани;
- выделение гриба при посеве материала из полостного образования легких или плевральной полости (аспираты, резекционный материал, биоптаты);
- массивная колонизация нижних отделов дыхательных путей условно-патогенными грибами р. *Candida*, входящих в состав нормальной микрофлоры слизистых оболочек верхних отделов дыхательных путей (посев количественным методом и микроскопия бронхиальных смывов и мокроты);
- колонизация нижних отделов дыхательных путей условно-патогенными плесневыми грибами, известными как возбудители оппортунистических бронхиальных и легочных инфекций, обладающих выраженными аллергенными и/или токсигенными свойствами (исследования бронхиальных смывов и мокроты);
- антигенемия (обнаружение в сыворотке крови антигена *Aspergillus* или *Candida*).

РЕЗУЛЬТАТЫ ЛАБОРАТОРНЫХ ОБСЛЕДОВАНИЙ БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ

В течение 2003-2005 гг. было обследовано 467 больных с туберкулезом органов дыхания, находящихся на лечении в МНПЦБТ. При культуральных исследованиях из посевов клинических материалов было выделено 43 вида грибов из 17 родов, относящихся к различным таксонам и группам [11, 14]: анаморфные мицелиальные грибы (гифомицеты) — представители родов *Aspergillus* (11 видов), *Fusarium* (3 вида), *Geotrichum* (1 вид), *Paecilomyces* (1 вид), *Penicillium* (6 видов), *Trichoderma* (2 вида) и темноокрашенные грибы (*Alternaria alternata*, *Aureobasidium*

pullulans, *Cladosporium cladosporioides*, *Curvularia lunata*, *Scopulariopsis brevicaulis*); мицелиальные низшие грибы — зигомицеты *Mucor* spp. (2 вида) и *Rhizopus oryzae*, аскомицет *Chaetomium globosum*; дрожжевые грибы — *Candida* spp. (8 видов), *Rhodotorula mucilaginosa (rubra)*, *Saccharomyces cerevisiae*.

Группа больных туберкулезом с риском развития микоза органов дыхания, выделенная по результатам лабораторных исследований (критерии отбора перечислены выше), составила 42,6% от числа обследованных.

Группа больных с риском развития кандидоза составила 31,7%. Массивную колонизацию нижних отделов дыхательных путей грибами р. *Candida* выявляли у 30,0% больных, причем у 88,6% из них результаты посевов подтверждены положительными результатами прямой микроскопии. У двоих больных туберкулезом легких виды р. *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*) были выделены из содержимого туберкулемы, а у 15 больных *Candida* spp. высевали из содержимого плевральной полости (аспирааты и резекционный материал). Частота выявления антигенемии (порог чувствительности набора *Pastorex Candida* — 2,5 нг/мл) у больных туберкулезом из группы риска развития легочного кандидоза составила 13,5%.

Полученные в лаборатории МНПЦБТ данные о чувствительности клинических штаммов *Candida* spp. к антимикотикам *in vitro*, в целом, совпадают с имеющимися в литературе сведениями о разной исходной устойчивости видов *Candida* к современным противогрибковым препаратам [4, 8, 10]. Всего за два года был исследован 361 штамм *Candida* spp., из них: 209 штаммов *C. albicans*, 54 штамма *C. glabrata*, 4 — *C. guilliermondii*, 10 — *C. kefyr*, 30 — *C. krusei*, 6 — *C. lusitaniae*, 22 — *C. parapsilosis*, 26 — *C. tropicalis*. Все штаммы были выделены у больных туберкулезом из группы риска развития кандидоза до проведения специфической терапии. Устойчивость к флуконазолу обнаруживали у 6% штаммов *Candida* spp. (у 2% штаммов *C. albicans*, 11% — *C. glabrata*, 20% — *C. krusei*, 17% — *C. lusitaniae*, 5% — *C. parapsilosis* и 19% — *C. tropicalis*). Устойчивость к итраконазолу выявили у 10% штаммов *Candida* spp. (у 8% штаммов *C. albicans*, 22% — *C. glabrata*, 7% — *C. krusei*, 17% — *C. lusitaniae* и 15% — *C. tropicalis*). У выделенного из мокроты штамма *C. lusitaniae* выявлена устойчивость к амфотерицину В. Обнаруживали также штаммы *Candida* spp., устойчивые к миконазолу (2%), кетоконазолу (6%) и 5-фторцитозину (2%).

Колонизацию нижних дыхательных путей грибами *Aspergillus* обнаруживали у 10,1% больных туберкулезом. У пяти больных грибы *Aspergillus* (*A. fumigatus* — в трех случаях, *A. flavus*, *A. restrictus*) выделяли из резекционного материала, полученного из легочной полости, у двух больных культура *A. fumigatus* была выделена из посева бронхиального биоптата. У четверых больных из 68 обследованных в сыворотке крови обнаруживали антиген *Aspergillus* spp. В целом, группа больных с риском развития бронхоле-

гочного аспергиллеза составляла 11,6%, причем у 15 из 54 больных данной группы (27,8%) выявляли также и признаки «вероятного» кандидоза.

У 8,1% больных была выявлена колонизация дыхательных путей плесневыми грибами, не относящимися к р. *Aspergillus*. При посеве бронхиального смыва и/или в повторных посевах мокроты обнаруживали *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Curvularia lunata*, *Fusarium chlamydosporum*, *F. dimerum*, *Paecilomyces varioti*, *Penicillium chrysogenum*, *P. citrinum*, *Rhizopus oryzae*, *Trichoderma koningii* и другие виды. У троих больных из посевов содержимого легочной полости (резекционный материал) выделяли темноокрашенные грибы: *A. alternata* (в двух случаях) и *Cl. cladosporioides*. У больного туберкулезом легких из содержимого туберкулемы был выделен *F. oxysporum*. Следует отметить, что грибы *Fusarium* spp., *Rhizopus oryzae* и темноокрашенные грибы родов *Alternaria*, *Cladosporium*, *Curvularia* известны как возбудители оппортунистических легочных инфекций [4, 11, 14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По данным лабораторных исследований, проведенных во фтизиатрической клинике в течение двух лет, группа больных туберкулезом легких с риском развития микоза органов дыхания составила 42,6% от числа обследованных. Выявлено большое родовое и видовое разнообразие условно-патогенных дрожжевых и плесневых грибов, колонизирующих нижние отделы дыхательных путей, а также вегетирующих в полостях легких и плевральных полостях у больных туберкулезом.

В применяемую нами схему лабораторной диагностики грибковых инфекций легких у больных туберкулезом включены микроскопические и культуральные исследования трех образцов мокроты в динамике и образца бронхиального смыва, полученного при бронхоскопии. При необходимости у ряда больных проводят дополнительные микробиологические исследования легочных и бронхиальных биоптатов, содержимого полостных образований легких и плевральных полостей, отделяемого из зева. Выделенные при культуральном исследовании штаммы дрожжевых и плесневых грибов идентифицируют до уровня вида/рода с использованием общепринятых методик, а штаммы *Candida* spp. перед назначением специфической терапии кандидоза исследуют на чувствительность к антимикотикам. При дифференциальной диагностике легочного аспергиллеза или кандидоза у больного проводят специальное иммунологическое исследование на обнаружение в сыворотке крови антигенов *Aspergillus* и *Candida* по стандартной методике латекс-агглютинации. Окончательную интерпретацию результатов лабораторного исследования проводят на основании совокупности всех полученных данных.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Дорожкова И.Р.* Методы комплексной лабораторной диагностики воспалительных и аллергических грибковых поражений легких/Пособие для врачей. — М., 1997. — 17 с.
2. *Кулько А.Б.* Лабораторная диагностика микозов при туберкулезе//Лабораторная диагностика туберкулеза. — М.: Изд-во Медицина и жизнь, 2001. — С 59-66.
3. *Кулько А.Б., Митрохин С.Д., Кузьмин Д.Е. и др.* Бронхолегочные инфекции, вызванные грибами рода *Candida*, во фтизиатрической практике//Успехи медицинской микологии. — Т. 6. Материалы 3-го всероссийского конгресса по медицинской микологии. — М.: Национальная академия микологии, 2005.— С. 75-77.
4. *Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В.* Грибковые инфекции. Руководство для врачей. — М.: Изд-во Бином, 2003. — 439 с.
5. *Климко Н.Н., Васильева Н.В., Елинов Н.П. и др.* Перечень основных методов и критериев диагностики микозов. — СПб.: СПб МАПО, 2001. — 24 с.
6. *Кашкин П.Н., Лусин В.В.* Практическое руководство по медицинской микологии. — Л.: Изд-во Медицина, 1983. — 191 с.
7. *Ричардсон М.Д., Кокки М.* Руководство по лечению системных микозов//Пер. с англ. Н. Климко — London.: Current Medical Literature LTD, 1998. — 64 с.
8. *Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В.* Кандидоз: природа инфекции, механизмы агрессии и защиты, диагностика и лечение. — М.: Изд-во Триада-Х, 2001. — 472 с.
9. *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//Проблемы медицинской микологии. — 2003. — Т.5, № 1. — С. 3-16.
10. *Елинов Н.П.* *Candida* species и кандидемия. Состояние проблемы. (Обзор)//Проблемы медицинской микологии. — 2001. — Т.3, № 1. — С. 4-15.
11. *Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М.* Определитель патогенных и условно- патогенных грибов. — М.: Изд-во Мир, 2001. — 468 с.
12. *Шевяков М.А.* Кандидоз слизистых оболочек пищеварительного тракта//Проблемы медицинской микологии. — 2000. — Т.2, № 2. — С. 6-10.
13. *Елинов Н.П.* Краткий микологический словарь. — СПб., 2004. — 176 с.
14. *De Hoog G.S., Guarro J.* Atlas of clinical fungi. — CBS: Reus, 1996. — 720 p.
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard — Second edition. NCCLS document M27-A2. Pa: NCCLS, 2002. — 30 p.
16. *Wuytack C., Van Looveren K., Swinne D.* Evaluation of antifungal susceptibility testing of yeasts by Fungitest and Neo-Sensitabs comparison with NCCLS M27 — T reference technique//Laborama. — 1999. — №. 6. — P. 28-29.
17. *Kulko A., Mitrokhin S.* Species distribution and antimycotic susceptibility of *Candida* strains isolated from pulmonary tuberculosis patients//15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Copenhagen, Denmark. 2-5 April 2005. Abstracts. Clinical Microbiology and Infection. — 2005. — Vol.11, Suppl.2. — P. 714-715.
18. *Рунке М.* Грибковые инфекции у иммунокомпрометированных пациентов (эпидемиология, диагностика, терапия, профилактика)//Проблемы медицинской микологии. — 2000. — Т.2, № 1. — С. 4-16.

Поступила в редакцию журнала 29.08.05

Рецензент: Шевяков М. А.

