

ИЗУЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ПРОТИВОГРИБКОВЫМ ПРЕПАРАТАМ ГРИБОВ РОДА *ASPERGILLUS* – ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БРОНХОЛЕГОЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ

А. Б. КУЛЬКО

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

Установлены и проанализированы уровни чувствительности к 10 противогрибковым препаратам для 12 видов грибов рода *Aspergillus*, обнаруженных при диагностике пневмомикозов у больных туберкулезом. Определение чувствительности 202 штаммов *Aspergillus* spp. к антимикотикам проводили методом микроразведений с определением МПК в мкг/мл (система «Sensititre»). Установлено, что возбудители аспергиллеза отличаются по уровням устойчивости к препарату амфотерицин В. Выделены три вида со сниженной чувствительностью к данному препарату: *A. terreus* (обладает природной устойчивостью к амфотерицину В), а также *A. flavus* и *A. ochraceus* (целесообразно определять чувствительность к амфотерицину В до начала лечения). Обнаружена высокая активность вориконазола, итраконазола и позаконазола в отношении грибов *Aspergillus* spp., за исключением некоторых штаммов *A. ustus* (возбудитель со сниженной чувствительностью к азольным препаратам, необходимо тестирование до начала лечения), а также нескольких штаммов *A. nidulans* и *A. niger*. Предложена модифицированная методика приготовления споровой суспензии грибов *Aspergillus* spp., повышающая безопасность проведения тестирования чувствительности и достоверность получаемых результатов.

Ключевые слова: вторичный аспергиллез легких у больных туберкулезом, чувствительность грибов *Aspergillus* к противогрибковым препаратам, тест-система «Sensititre»

Для цитирования: Кулько А. Б. Изучение чувствительности к противогрибковым препаратам грибов рода *Aspergillus* – возбудителей бронхолегочных инфекций у больных туберкулезом // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2017. – Т. 95, № 7. – С. 54-60. DOI: 10.21292/2075-1230-2017-95-7-54-60

INVESTIGATION OF SENSITIVITY TO ANTIFUNGAL AGENTS IN *ASPERGILLUS* FUNGI CAUSING BRONCHIAL PULMONARY INFECTION IN TUBERCULOSIS PATIENTS

A. B. KULKO

Moscow Municipal Scientific Practical Center of Tuberculosis Control, Health Department of Moscow, Moscow, Russia

The sensitivity levels of 12 fungal species of *Aspergillus*, identified when diagnosing pneumonycosis in tuberculosis patients, to 10 antifungal agents were identified and analyzed. The sensitivity of 202 strains of *Aspergillus* spp. to antifungal agents was tested by microdilution methods defining minimal inhibitory concentrations in µg/ml (Sensititre system). It was found out that agents causing aspergillosis differed in the level of their resistance to the medication of amphotericin B. Three species with poor sensitivity to this medication were identified: *A. terreus* (possesses natural resistance to amphotericin B), and *A. flavus* and *A. ochraceus* (it is reasonable to test sensitivity to amphotericin B prior to the treatment start). Voriconazole, itraconazole and posaconazole were found to be active against *Aspergillus* spp. fungi, but for certain strains of *A. ustus* (the fungus with poor sensitivity to medications of the azole group, the sensitivity to be tested prior to the start of treatment) as well as some strains of *A. nidulans* and *A. niger*. The article describes a modified method for preparation of *Aspergillus* spp. spore suspension enhancing safety of sensitivity testing and reliability of the results.

Key words: secondary pulmonary aspergillosis, sensitivity of *Aspergillus* fungi to antifungal agents, Sensititre system

For citations: Kulko A.B. Investigation of sensitivity to antifungal agents in *Aspergillus* fungi causing bronchial pulmonary infection in tuberculosis patients. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2017, Vol. 95, no. 7, P. 54-60. (In Russ.) DOI: 10.21292/2075-1230-2017-95-7-54-60

К настоящему времени известно уже около 50 видов грибов рода *Aspergillus*, описанных в качестве этиологических агентов поражений бронхов и легких человека [14, 17]. Возбудители аспергиллеза не передаются от человека к человеку, а инфицирование происходит, как правило, при вдыхании воздуха, в котором содержатся конидии грибов рода *Aspergillus*. Большинство видов *Aspergillus* spp., в том числе и все основные возбудители аспергиллеза (*Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* и *A. terreus*), широко распространены и присутствуют в воздухе внешней среды и внутри различных помещений, включая лечебные стационары [5, 8, 16]. Конидии болезнетворных грибов *Aspergillus* spp. (от 2 до

5 мкм в диаметре) способны проникать в дыхательные пути и достигать альвеол, вызывая у предрасположенных лиц различные клинические формы бронхолегочного аспергиллеза [1, 2, 15].

Риск развития вторичного (оппортунистического) аспергиллеза бронхов и легких у больных туберкулезом органов дыхания определяется как течением самого первичного заболевания легких, вызванного *Mycobacterium tuberculosis*, так и присутствием ряда предрасполагающих факторов. К факторам риска следует отнести: наличие у пациента полостных изменений и бронхоэктазов в легких, различные иммуносупрессивные состояния, длительное применение антибиотиков широкого спек-

тра действия, инвазивные процедуры, а также колонизацию слизистых оболочек дыхательных путей грибами рода *Aspergillus* [3, 4, 6, 10]. Так, колонизация грибами дыхательных путей среди впервые выявленных больных туберкулезом легких высока и достигает 66,7%, в основном это грибы рода *Candida* в титре более 1×10^3 КОЕ/мл, но из них в 14,3% случаев имеется сочетание с другими грибами, в том числе рода *Aspergillus* [7].

Имеющиеся в литературе данные указывают на разную природную (исходную) чувствительность возбудителей аспергиллеза к противогрибковым препаратам [4, 5, 9, 14]. Однако опубликованные и проанализированные сведения по активности антимикотиков ограничены группой наиболее часто встречающихся возбудителей аспергиллеза. Уровни чувствительности к антимикотикам большинства более редких возбудителей до сих пор исследованы недостаточно или не определены. Отметим, что данные *in vitro*, полученные с помощью различных нестандартизованных методик, мало сопоставимы и не пригодны для достоверной характеристики природной чувствительности болезнетворного гриба к противогрибковому препарату.

Цель исследования: определение уровней чувствительности к противогрибковым препаратам различных видов грибов рода *Aspergillus*, штаммы которых выделены от больных туберкулезом.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили 202 клинических штамма грибов рода *Aspergillus*, относящиеся к 12 видам: *A. flavipes* (5 штаммов), *A. flavus* (25), *A. fumigatus* (61), *A. glaucus* (10), *A. nidulans* (10), *A. niger* (25), *A. ochraceus* (11), *A. oryzae* (4), *A. sydowii* (12), *A. terreus* (17), *A. ustus* (10), *A. versicolor* (12). Данные штаммы выделены из различного диагностического материала: мокроты; материалов, полученных при фибробронхоскопии (жидкость бронхоальвеолярного лаважа, бронхиальное содержимое, бронхиальный смыв); содержимого полостных образований легких (каверн, туберкулем, кист, аспергиллем); содержимого плевральной полости и полости эмпиемы.

Видовую идентификацию выделенных методом посева штаммов грибов рода *Aspergillus* проводили по общепринятым методикам с помощью специальных атласов-определителей, оценивая их микроморфологические признаки (морфология бесполой (конидиальной) стадии (рис.); морфология вегетативных структур, а также в случае образования *in vitro*, морфология половой (сумчатой) стадии в цикле развития) и макроморфологические признаки (морфология колоний) [5, 9, 14]. При идентификации возбудителя аспергиллеза в практической работе медицинских лабораторий рекомендуем дополнять стандартную справочную среду агар Чапека – Докса второй лабораторной



Рис. Микроморфология штамма *Aspergillus ustus* (Bainier) Thom et Church, ×1000. Штамм выделен из полости эмпиемы больного туберкулезом

Fig. Micromorphology of the strain of *Aspergillus ustus* (Bainier) Thom et Church, ×1000. The strain was isolated from empyema of a tuberculosis patient

средой – картофельно-декстрозным агаром или его модификацией при температурном режиме инкубации (30 и 37°C) [5].

Исследование чувствительности штаммов *Aspergillus* spp. к противогрибковым препаратам проводили методом микроразведений в бульоне со средой RPMI 1640 с определением минимальных подавляющих концентраций (МПК) в мкг/мл. Для тестирования использовали систему «Sensititre», TREK Diagnostics Systems (колориметрический тест «YeastOne»), которая сопоставима по рабочим характеристикам с эталонной методикой тестирования чувствительности мицелиальных грибов Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI) [11, 18] и включает пять противогрибковых препаратов группы азолов (вориконазол, итраконазол, позаконазол, флуконазол, кетоконазол), три препарата группы эхинокандинов (анидулафунгин, каспофунгин, микафунгин), а также амфотерицин В и флуцитозин (5-фторцитозин). Для интерпретации и сравнительной оценки результатов определения чувствительности грибов *Aspergillus* spp. к антимикотикам использовали ориентировочные значения МПК, приведенные в документе M38-A2 CLSI [10], и критерии клинической интерпретации Европейского комитета по определению чувствительности к антибиотикам (EUCAST), установленные для стандартного метода микроразведений [12, 13]. Стандартные методики CLSI [11] и EUCAST [12] для плесневых грибов аналогичны друг другу (противогрибковые препараты, процедура тестирования, условия инкубации, визуальный учет результатов), что дает возможность использовать установленные EUCAST пограничные значения МПК для оценки данных, полученных с помощью системы «Sensititre».

Результаты исследования

Важный этап тестирования, влияющий на достоверность результатов исследования, – получение споровой суспензии выделенной чистой культуры возбудителя аспергиллеза. Споровая суспензия штаммов *Aspergillus* spp. для инокуляции в планшеты «Sensititre» не должна содержать обрывков мицелия, что может приводить к неверным результатам (из-за более интенсивного роста внесенных зачатков культуры), поэтому использовали следующую модифицированную методику для ее приготовления. Тестируемый штамм рода *Aspergillus* пересеивали в пробирку со скошенным агаром, предпочтительно со средой картофельно-декстрозный агар (или со средой Чапека – Докса), и инкубировали в течение 5-7 сут при 35°C (проводится визуальный контроль развития споронотения культуры); перед инокуляцией планшета: в пробирку с культурой стерильной пипеткой добавляют 5 мл стерильного физиологического раствора с 0,05% Твин 20 и легко встряхивают на миксере типа Вортекс в течение 1-3 мин, полученную споровую суспензию фильтруют через стерильный фильтр с диаметром пор 10-11 мкм [12] (при невозможности использовать стерильные фильтры их заменяют стерильной марлей, сложенной в два слоя), далее полученный фильтрат доводят до необходимой плотности споровой суспензии с помощью физиологического раствора, определяя ее по методике «Sensititre» на спектрофотометре или нефелометре [18]. Перед инокуляцией споровой суспензии в случае необходимости проводят контрольное микроскопическое исследование с помощью камеры Горяева, которое позволяет определить концентрацию в ней конидий (КОЕ/мл) и подтвердить отсутствие фрагментов мицелия. Использование для пересева штаммов *Aspergillus* spp. пробирок со скошенным агаром вместо чашек Петри упрощает процедуру и значительно повышает безопасность проведения тестирования для персонала микологической лаборатории. Отметим также, что быстрорастущие виды болезнетворных грибов рода *Aspergillus* (*A. niger*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. nidulans*, *A. flavus*), как правило, образуют достаточное количество конидий для проведения тестирования уже на 5-е сут инкубации.

Требуется уточнения и время считывания результатов исследования. В методике «Sensititre» указано, что штаммы *Aspergillus* spp. следует инкубировать от 48 до 72 ч при 35°C [18]. По нашим данным, учет результатов тестирования всех штаммов быстрорастущих видов *Aspergillus* spp. (*A. niger*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. nidulans*, *A. flavus*) необходимо проводить через 48 ч инкубации при 35°C. Для тестирования части штаммов других видов *Aspergillus* spp. может потребоваться инкубировать планшеты дополнительно (оценивают наличие роста в контрольной лунке) и учитывать результат исследования у таких штаммов следует через 72 ч инкубации.

Согласно полученным данным (табл. 1, 2), десять противогрибковых препаратов по показателям МПК следует разделить на две группы: проявляющие активность против большинства протестированных штаммов *Aspergillus* spp. (преобладание средних значений МПК исследуемого диапазона препарата в системе «Sensititre»): вориконазол, итраконазол, позаконазол, кетоконазол (менее активен, чем остальные препараты групп азолов) и амфотерицин В и неактивные против большинства штаммов *Aspergillus* spp. (преобладание высоких и максимально высоких значений МПК диапазона препарата): флуконазол, флуцитозин, а также анидулафунгин, каспофунгин и микафунгин.

Установленные интервалы значений МПК, показатели МПК₅₀ и МПК₉₀ препаратов подтверждают наличие природной устойчивости грибов рода *Aspergillus* к флуконазолу (табл. 1) и в целом низкую активность препарата флуцитозин (табл. 2) против *Aspergillus* spp., за исключением некоторых штаммов (высокие значения МПК флуцитозина в интервале 32 -> 64 мкг/мл были обнаружены для более 86% протестированных штаммов).

Тестирование чувствительности также показало, что три препарата группы азолов – вориконазол, итраконазол и позаконазол – проявляют в целом высокую активность против штаммов грибов рода *Aspergillus* (табл. 1). Для сравнительной оценки активности препаратов против *Aspergillus* spp. использовали критерии EUCAST: для вориконазола (критерии установлены для вида *A. fumigatus*) – S ≤ 1 мкг/мл (чувствительные штаммы), I = 2 мкг/мл (штаммы с промежуточной чувствительностью), R > 2 мкг/мл (устойчивые штаммы); для итраконазола (критерии установлены для *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. terreus*) – S ≤ 1 мкг/мл, I = 2 мкг/мл, R > 2 мкг/мл; для позаконазола (установлены для *A. fumigatus* и *A. terreus*) – S ≤ 0,12 мкг/мл, I = 0,25 мкг/мл, R > 0,25 мкг/мл [13]. Отметим, что ни у одного вида с установленными пограничными значениями МПК не выделено штаммов, устойчивых к вориконазолу, итраконазолу или позаконазолу (табл. 1).

Вместе с тем у трех из 12 видов (*A. ustus*, *A. nidulans*, *A. niger*) выделены штаммы с величинами МПК вориконазола, итраконазола или позаконазола, предполагающих вероятную устойчивость к ним. Повышенные значения МПК вориконазола (4 или 8 мкг/мл) обнаружены для семи штаммов *Aspergillus* spp. (3,5% от общего числа протестированных штаммов): 5 штаммов *A. ustus*, 1 – *A. niger*, 1 – *A. nidulans*. Предельно высокие значения МПК позаконазола (> 8 мкг/мл) обнаружены для трех штаммов *Aspergillus* spp. (1,5% от общего числа): 2 штамма *A. ustus*, 1 – *A. nidulans*. Обнаружен единственный штамм, устойчивый к итраконазолу (0,5% от общего числа) – штамм *A. ustus* со значе-

Таблица 1. Показатели минимальных подавляющих концентраций препаратов группы азолов (вориконазол, итраконазол, позаконазол, кетоконазол, флуконазол) в отношении грибов рода *Aspergillus* (тест-система «Sensititre»)

Table 1. Rates of minimal inhibitory concentrations of the medications within azolum group (voriconazolum, intraconazolum, pozaconazolum, ketoconazolum, fluconazolum) respective fungi of *Aspergillus* species (Sensititre test system)

Вид <i>n</i>	Показатели МПК	Препарат, МПК (мкг/мл)				
		VOR	IZ	PZ	KZ	FZ
<i>A. flavipes</i> 5	Диапазон	0,12-0,50	0,12-0,25	0,06-0,25	0,25-0,50	64-128
	МПК ₅₀	0,25	0,25	0,12	0,25	128
	МПК ₉₀	–	–	–	–	–
<i>A. flavus</i> 25	Диапазон	0,12-1,00	0,06-0,50	0,06-0,50	0,25-4,00	128 -> 256
	МПК ₅₀	0,5	0,25	0,25	2	> 256
	МПК ₉₀	0,5	0,5	0,25	4	> 256
<i>A. fumigatus</i> 61	Диапазон	0,06-1,00	0,03-1,00	0,015-0,250	1-16	256 -> 256
	МПК ₅₀	0,25	0,25	0,12	4	> 256
	МПК ₉₀	0,5	0,5	0,25	8	> 256
<i>A. glaucus</i> 10	Диапазон	0,03-0,25	0,015-0,12	0,015-0,060	0,03-1,00	32 -> 256
	МПК ₅₀	0,12	0,06	0,03	0,25	> 256
	МПК ₉₀	0,25	0,06	0,06	0,5	> 256
<i>A. nidulans</i> 10	Диапазон	0,06-4,00	0,06-2,00	0,06 -> 8,00	0,25-8,00	128 -> 256
	МПК ₅₀	0,12	0,12	0,25	1	256
	МПК ₉₀	0,25	0,25	0,5	2	> 256
<i>A. niger</i> 25	Диапазон	0,25-8,00	0,25-2,00	0,12-0,50	4 -> 16	> 256
	МПК ₅₀	0,5	0,5	0,25	8	> 256
	МПК ₉₀	1	1	0,5	16	> 256
<i>A. ochraceus</i> 11	Диапазон	0,06-1,00	0,12-0,50	0,06-0,50	1-16	> 256
	МПК ₅₀	0,25	0,5	0,25	8	> 256
	МПК ₉₀	0,5	0,5	0,5	16	> 256
<i>A. oryzae</i> 4	Диапазон	0,25-0,50	0,06-0,25	0,06-0,12	1-4	256 -> 256
	МПК ₅₀	0,5	0,12	0,12	2	256
	МПК ₉₀	–	–	–	–	–
<i>A. sydowii</i> 12	Диапазон	0,25-2,00	0,25-1,00	0,06-1,00	0,5-8,0	> 256
	МПК ₅₀	0,5	0,5	0,25	2	> 256
	МПК ₉₀	1	1	0,5	4	> 256
<i>A. terreus</i> 17	Диапазон	0,12-1,00	0,12-0,25	0,06-0,25	1-16	256 -> 256
	МПК ₅₀	0,25	0,25	0,12	2	> 256
	МПК ₉₀	0,5	0,25	0,25	8	> 256
<i>A. ustus</i> 10	Диапазон	0,25-8,00	0,12 -> 16,00	0,12 -> 8,00	0,25-160	> 256
	МПК ₅₀	2	0,5	0,5	2	> 256
	МПК ₉₀	4	2	> 8	8	> 256
<i>A. versicolor</i> 12	Диапазон	0,12-2,00	0,12-1,00	0,03-0,50	0,25-4,00	256 -> 256
	МПК ₅₀	0,25	0,5	0,25	1	> 256
	МПК ₉₀	1	0,5	0,5	2	> 256

Примечание: VOR – вориконазол, IZ – итраконазол, PZ – позаконазол, KZ – кетоконазол, FZ – флуконазол; *n* – число протестированных штаммов; МПК – минимальная подавляющая концентрация (в мкг/мл), МПК₅₀ и МПК₉₀ – минимальные значения МПК, необходимые для подавления роста 50 и 90% штаммов

нием МПК препарата > 16 мкг/мл (максимально высокое значение, превышающее значение 8 мкг/мл, установленное CLSI для устойчивых к итраконазолу штаммов [11]). Характерной особенностью для некоторых штаммов *A. ustus* (2 штамма, выделены из бронхиального смыва и мокроты) и *A. nidulans* (1 штамм, выделен из жидкости БАЛ) была пони-

женная чувствительность одновременно к четырем препаратам группы азолов, активных против *Aspergillus* spp.: к вориконазолу, итраконазолу, позаконазолу и кетоконазолу. На основании установленных верхних значений диапазонов МПК данных препаратов и величин показателей МПК₉₀ (табл. 1), гриб *A. ustus* (рис.) следует расценивать как вид с

Таблица 2. Показатели минимальных подавляющих концентраций амфотерицина В, флуцитозина и препаратов группы эхинокандинов (анидулафунгин, каспофунгин, микафунгин) в отношении грибов рода *Aspergillus* (тест-система «Sensititre»)

Table 2. Rates of minimal inhibitory concentrations of amphotericin B and the medications within echinocandins group (anidulafungin, caspofungin, micafungin) respective fungi of *Aspergillus* species (Sensititre test system)

Вид n1, n2	Показатели МПК	Препарат, МПК (мкг/мл)				
		AB	5FC	AND	CAS	MF
		(n1)	(n1)	(n2)	(n1)	(n2)
<i>A. flavipes</i> 5, 2	Диапазон	0,5-1,0	1 -> 64	> 8	> 16	> 8
	МПК ₅₀	1	> 64	> 8	> 16	> 8
	МПК ₉₀	–	–	–	–	–
<i>A. flavus</i> 25, 13	Диапазон	2-8	32-> 64	> 8	> 16	> 8
	МПК ₅₀	2	> 64	> 8	> 16	> 8
	МПК ₉₀	4	> 64	> 8	> 16	> 8
<i>A. fumigatus</i> 61, 15	Диапазон	0,5-2,0	32 -> 64	> 8	8 ->16	> 8
	МПК ₅₀	1	> 64	> 8	>16	> 8
	МПК ₉₀	2	> 64	> 8	>16	> 8
<i>A. glaucus</i> 10, 5	Диапазон	0,5-1,0	4-64	≤ 0,015	0,015-0,06	≤ 0,008
	МПК ₅₀	0,5	8	≤ 0,015	0,015	≤ 0,008
	МПК ₉₀	1	32	–	0,03	–
<i>A. nidulans</i> 10, 4	Диапазон	0,5-2,0	64 -> 64	> 8	> 16	> 8
	МПК ₅₀	1	> 64	> 8	> 16	> 8
	МПК ₉₀	2	> 64	–	> 16	–
<i>A. niger</i> 25, 12	Диапазон	0,5-2,0	8 -> 64	> 8	> 16	> 8
	МПК ₅₀	1	> 64	> 8	> 16	> 8
	МПК ₉₀	2	> 64	> 8	> 16	> 8
<i>A. ochraceus</i> 11, 4	Диапазон	2-8	4 -> 64	> 8	> 16	> 8
	МПК ₅₀	4	32	> 8	> 16	> 8
	МПК ₉₀	8	> 64	–	> 16	–
<i>A. oryzae</i> 4, 2	Диапазон	1-4	> 64	> 8	> 16	> 8
	МПК ₅₀	1	> 64	> 8	> 16	> 8
	МПК ₉₀	–	–	–	–	–
<i>A. sydowii</i> 12, 5	Диапазон	1-4	8 -> 64	> 8	8-> 16	> 8
	МПК ₅₀	2	32	> 8	> 16	> 8
	МПК ₉₀	4	> 64	–	> 16	–
<i>A. terreus</i> 17, 7	Диапазон	2-8	64 -> 64	> 8	4 -> 16	> 8
	МПК ₅₀	4	> 64	> 8	> 16	> 8
	МПК ₉₀	4	> 64	–	> 16	–
<i>A. ustus</i> 10, 5	Диапазон	1-4	32 -> 64	> 8	> 16	> 8
	МПК ₅₀	2	64	> 8	> 16	> 8
	МПК ₉₀	4	> 64	–	> 16	–
<i>A. versicolor</i> 12, 9	Диапазон	0,25-4,00	16-64	> 8	8 -> 16	> 8
	МПК ₅₀	2	16	> 8	> 16	> 8
	МПК ₉₀	4	64	–	> 16	–

Примечание: АВ – амфотерицин В, 5-FC – флуцитозин, AND – анидулафунгин, CAS – каспофунгин, MF – микафунгин; n1 – число протестированных штаммов по амфотерицину В, флуцитозину и каспофунгину, n2 – число протестированных штаммов по анидулафунгину и микафунгину; МПК – минимальная подавляющая концентрация (в мкг/мл), МПК₅₀ и МПК₉₀ – минимальные значения МПК, необходимые для подавления роста 50 и 90% штаммов

вариативной и в целом с пониженной природной чувствительностью к вориконазолу, итраконазолу и позаконазолу.

Установлено, что активность препарата амфотерицин В не одинакова в отношении различных

болезнетворных видов *Aspergillus*, что отражают обнаруженные отличия границ диапазонов МПК, а также показателей МПК₅₀ и МПК₉₀ (табл. 2). Как вероятно устойчивые к амфотерицину В расценивались штаммы *Aspergillus* spp. с МПК препа-

рата > 2 мкг/мл, как вероятно чувствительные – штаммы с МПК < 2 мкг/мл [11-13]. Сниженная чувствительность к амфотерицину В обнаружена у трех из 12 протестированных видов возбудителей аспергиллеза: *A. flavus*, *A. terreus* и *A. ochraceus* (интервалы МПК препарата для данных видов составляли от 2 до 8 мкг/мл). Следует отметить, что у гриба *A. terreus* ранее была описана природная устойчивость к амфотерицину В [1, 2, 4, 5, 11] и, согласно рекомендациям EUCAST [13], клинические штаммы *A. terreus* обозначаются как устойчивые к данному препарату без интерпретации значения МПК. В специальной литературе также представлены данные о более низком уровне чувствительности к амфотерицину В вида *A. flavus* по сравнению с другими *Aspergillus* spp. [2, 5, 9, 14]. Сведения об уровне природной чувствительности *in vitro* к амфотерицину В редкого возбудителя *A. ochraceus* практически отсутствуют. Обнаружено, что доля клинических штаммов *A. ochraceus* с МПК препарата в интервале от 4 до 8 мкг/мл составила более 81%, а значение МПК₉₀ – 8 мкг/мл, что превышало аналогичные показатели для штаммов *A. terreus*. Значения МПК амфотерицина В, превышающие величину 2 мкг/мл (4 мкг/мл), обнаружены также для части штаммов редких возбудителей аспергиллеза: *A. oryzae*, *A. sydowii*, *A. ustus* и *A. versicolor* (табл. 2).

Из данных табл. 2 следует, что активность эхинокандинов (анидулафунгин, каспофунгин, микафунгин) *in vitro* не выявлена в отношении 11 из 12 видов рода *Aspergillus*; исключение составляли только штаммы *A. glaucus* – наиболее медленно растущего из протестированных видов. По имеющимся в литературе сведениям, эхинокандины, в отличие от амфотерицина В и азольных препаратов (вориконазола, итраконазола и позаконазола), не обладают фунгицидной активностью против *Aspergillus* spp., а клиническая активность определяется их фунгистатическим действием на рост мицелия грибов рода *Aspergillus* [2]. При определении чувствительности протестированных штаммов *Aspergillus* spp. к эхинокандинам оценено только их фунгицидное действие (показатель МПК, 48 ч инкубации), а фунгистатическое действие препаратов не оценивали (показатель минимальной эффективной концентрации (МЭК) [11, 12]), что связано с методикой учета результатов в системе «Sensititre» YeastOne [18]. Следует также

отметить, что клиническая значимость тестирования чувствительности *Aspergillus* spp. к эхинокандинам с использованием показателей МЭК или МПК к настоящему моменту не определена.

Заключение

Лабораторное исследование выявило высокую активность трех азольных препаратов – вориконазола, итраконазола и позаконазола – в отношении различных возбудителей аспергиллеза, за исключением некоторых штаммов *A. ustus*, а также *A. nidulans* и *A. niger*. Высокая чувствительность к вориконазолу и итраконазолу была характерна для всех протестированных клинических штаммов главного возбудителя аспергиллеза *A. fumigatus*, а также для штаммов *A. flavus* (второй по частоте выявления возбудитель аспергиллеза) и *A. terreus* (один из распространенных возбудителей). Вместе с тем обнаружены единичные клинические штаммы *A. ustus* и *A. nidulans*, обладающие низкой чувствительностью одновременно к ряду препаратов группы азолов, что может осложнять подбор препарата для лечения аспергиллеза, вызванного этими возбудителями. Согласно полученным данным, гриб *A. ustus* (единственный из протестированных видов) был охарактеризован как вид с вариативной и в целом с пониженной чувствительностью к вориконазолу, итраконазолу и позаконазолу.

Чувствительность исследованных клинических штаммов *Aspergillus* spp. к препарату амфотерицин В в значительной мере определялась их видовой принадлежностью. Установлено, что три из 12 протестированных видов рода *Aspergillus* характеризуются сниженной природной чувствительностью к амфотерицину В: *A. terreus* (гриб, обладающий природной устойчивостью к данному препарату), *A. flavus* и *A. ochraceus*.

При обнаружении в качестве возбудителя бронхолегочного аспергиллеза грибов *A. flavus*, *A. ochraceus* или *A. ustus*, видов со сниженной природной чувствительностью к одному или нескольким используемым для лечения аспергиллеза противогрибковым препаратам (азолы, амфотерицин В), рекомендуем определять чувствительность штаммов к антимикотикам до начала лечения. Для проведения тестирования следует использовать стандартизованную для плесневых грибов методику.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии у него конфликта интересов.

Conflict of Interests. The author state that he has no conflict of interests.

ЛИТЕРАТУРА

REFERENCES

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. Елинов Н. П., Митрофанов В. С., Чернопытова Р. М. Аспергиллезная инфекция; подходы к ее диагностике и лечению // Пробл. медицинской микологии. – 2002. – Т.4, № 1. – С. 4-8.
4. Клишко Н. Н. Микозы: диагностика и лечение. Руководство для врачей. 2-е изд. перераб. и доп. – М.: Ви Джи Групп, 2008. – 336 с.
5. Кулько А. Б. Атлас условно-патогенных грибов рода *Aspergillus* – возбудителей бронхолегочных инфекций. – М.: МНПЦБТ. – 2012. – 160 с.
6. Кулько А. Б., Древал П. А., Воробьев А. А., Трусов В. Н. Лабораторная диагностика бронхолегочного аспергиллеза у больных туберкулезом с полостными образованиями в легких // Пробл. медицинской микологии. – 2008. – Т.10, № 4. – С. 25-28.
7. Ловачева О. В., Корниенко И. И., Кулько А. Б., Слогодская Л. В., Литвинов В. И. Лечение итраконазолом в суспензии патологической колонизации грибами дыхательных путей у больных туберкулезом легких // Пробл. туберкулеза и болезней легких. – 2008. – № 1. – С. 42-46.
8. Марфенина О. Е. Антропогенная экология почвенных грибов. – М.: Медицина для всех. – 2005. – 196 с.
9. Саттон Д., Фотергилл А., Риналди М. Определитель патогенных и условно патогенных грибов: Пер. с англ. – М.: Мир. – 2001. – 468 с.
10. Сергеев А. Ю., Сергеев Ю. В. Грибковые инфекции. Руководство для врачей. – М.: Бином, 2008. – 480 с.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard – Second edition. SLCI document M38-A2. CLSI: Wayne, PA., 2008. – 40 p.
12. EUCAST Definitive Document E.DEF 9.1: 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), 2008. – 13 p.
13. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antifungal Agents Breakpoint tables for interpretation of MICs. Version 8.0, valid from 2015-11-16, 2015.
14. Hoog de G. S., Guarro J., Gene J., Figueras M. J. Atlas of clinical fungi. Electronic Version 3.1 – CBS: Reus, 2011.
15. Latge J-P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis // Clin. Microbiol. Rev. – 1999. – Vol. 12, № 2. – P. 310-350.
16. Samson R. A., Hoekstra E. S., Frisvad J. C. Introduction to Food- and Airborne Fungi, ed. 7. – Utrecht, Netherlands, CBS. – 2004. – 389 p.
17. The Aspergillus Website <http://www.aspergillus.org.uk/>
18. TREK Diagnostics Systems <http://www.trekds.com/techinfo/default.asp>
1. Groll A.H., Walsh T.D. *Aspergilez. Atlas gribkovykh zabolevaniy*. [Aspergillosis. Atlas of fungal diseases]. Ed. by K.A. Kaufman, D.L. Mandell. Moscow, GEOTAR-Media Publ., 2010, pp. 133-159.
2. D.R. Hospenthal, M.G. Rinaldi. *Diagnostika i lecheniye mikozov*. (Russ. Ed.: D.R. Hospenthal, M.G. Rinaldi. Diagnosis and Treatment of Human Mycoses). Moscow, GEOTAR-Media Publ., 2013, 448 p.
3. Elinov N.P., Mitrofanov V.S., Chernopyatova R.M. Aspergilleous infection: approaches to its diagnostic and treatment. *Probl. Meditsinskoy Mikologii*, 2002, vol. 4, no. 1, pp. 4-8. (In Russ.)
4. Klimko N.N. *Mikozy: diagnostika i lechenie. Rukovodstvo dlya vrachev*. [Mycoses: diagnostics and treatment. Doctors' Manual]. 2nd Edition, Moscow, V G Group Publ., 2008, 336 p.
5. Kulko A.B. *Atlas uslovno-patogennykh gribov roda Aspergillus – vzbuditeley bronkholegichnykh infektsiy*. [Atlas of opportunistic fungi of Aspergillus species – causative agents of bronchial and pulmonary infection]. Moscow, MNPTSBT Publ., 2012, 160 p.
6. Kulko A.B., Dreval P.A., Vorobiev A.A., Trusov V.N. Laboratory diagnostics of bronchopulmonary aspergillosis in tuberculosis patients with cavities in the lungs. *Probl. Meditsinskoy Mikologii*, 2008, vol.10, no. 4, pp. 25-28. (In Russ.)
7. Lovacheva O.V., Kornienko I.I., Kulko A.B., Slogotskaya L.V., Litvinov V.I. Treatment of itraconazolom suspension of opportunistic fungal colonization of the respiratory tract in pulmonary tuberculosis patients. *Probl. Tuberkuleza i Bolezni Legkikh*, 2008, no. 1, pp. 42-46. (In Russ.)
8. Marfenina O.E. *Antropogennaya ekologiya pochvennykh gribov*. [Anthropogenic ecology of soil fungi]. Moscow, Meditsina Dlya Vsekh Publ., 2005, 196 p.
9. Sutton D., Fothergill A., Rinaldi M. *Opredelitel patogennykh i uslovno patogennykh gribov*. (Russ. ed.: Sutton D., Fothergill A., Rinaldi M., Determinant of pathogenic and opportunistic fungi.) Moscow, Mir Publ., 2001, 468 p.
10. Sergeev A.Yu., Sergeev Yu.V. *Gribovye infektsii. Rukovodstvo dlya vrachev*. [Fungal infections. Doctors' guidelines]. Moscow, Binom Publ., 2008, 480 p.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard – Second edition. SLCI document M38-A2. CLSI: Wayne, PA., 2008, 40 p.
12. EUCAST Definitive Document E.DEF 9.1: 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), 2008. 13 p.
13. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antifungal Agents Breakpoint tables for interpretation of MICs. Version 8.0, valid from 2015-11-16, 2015.
14. Hoog de G.S., Guarro J., Gene J., Figueras M.J. Atlas of clinical fungi. Electronic Version 3.1 – CBS: Reus, 2011.
15. Latge J-P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1999, vol. 12, no. 2, pp. 310-350.
16. Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C. Introduction to Food- and Airborne Fungi, ed. 7. Utrecht, Netherlands, CBS. 2004, 389 p.
17. The Aspergillus Website <http://www.aspergillus.org.uk/>
18. TREK Diagnostics Systems <http://www.trekds.com/techinfo/default.asp>

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

FOR CORRESPONDENCE:

Кулько Александр Борисович

ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии.
107014, Москва, ул. Стромынка, д. 10.
Тел.: 8 (499) 268-70-33.
E-mail: kulko-fungi@yandex.ru

Aleksandr B. Kulko

Moscow Municipal Scientific Practical Center of Tuberculosis Control, Health Department of Moscow, Candidate of Biological Sciences, Researcher of Department of Laboratory Diagnostics of Tuberculosis and Pathomorphology.
10, Stromynka St.,
Moscow, 107014
Phone: +7 (499) 268-70-33.
E-mail: kulko-fungi@yandex.ru