

**Департамент здравоохранения города Москвы
Московский научно-практический центр
борьбы с туберкулезом**

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА
ЛЕГОЧНЫХ МИКОЗОВ
ВО ФТИЗИАТРИЧЕСКОЙ
КЛИНИКЕ**



Москва – 2019

ПРАВИТЕЛЬСТВО МОСКВЫ
ДЕПАРТАМЕНТ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ГОРОДА МОСКВЫ

СОГЛАСОВАНО

Главный внештатный специалист
фтизиатр Департамента
здравоохранения города Москвы


М.В. Сеницын
2019 г.

РЕКОМЕНДОВАНО

Экспертным советом по науке
Департамента здравоохранения
города Москвы № 6


2019 г.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЛЕГОЧНЫХ МИКОЗОВ
ВО ФТИЗИАТРИЧЕСКОЙ КЛИНИКЕ

Методические рекомендации № 24

УДК 616.5-002.72-07-08(084.121)

ББК 55.17я61

Учреждение-разработчик:

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

Составители:

Кулько А.Б. – ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии, к.б.н.

Сафонова С.Г. – заведующая отделом проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии, д.б.н.

Иванушкина Т.Н. – заведующая туберкулезным легочным отделением № 2, к.м.н.

Ермачкова Е.В. – врач-бактериолог централизованной бактериологической лаборатории.

Рецензент:

Мионов А.Ю. – д.м.н, профессор, ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, руководитель отдела микробиологии.

Предназначено:

Для специалистов в областях медицинской микробиологии, фтизиатрии и пульмонологии.

В методических рекомендациях представлены разработанные усовершенствованные подходы к организации лабораторной диагностики пневмомикозов во фтизиатрической практике, включающие схему проведения комплексных диагностических исследований, алгоритмы микробиологической диагностики плесневых и дрожжевых пневмомикозов, критерии интерпретации получаемых лабораторных данных. Предложен алгоритм лабораторной диагностики бронхолегочных микозов, адаптированный для рутинных диагностических исследований у больных с подозрением на микотическое поражение бронхолегочной системы.

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

ISBN 978-5-6043340-9-6

© Коллектив авторов, 2019

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ	4
ОПРЕДЕЛЕНИЯ	5
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	6
ВВЕДЕНИЕ	7
ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЛЕГОЧНЫХ МИКОЗОВ ВО ФТИЗИАТРИЧЕСКОЙ КЛИНИКЕ	8
1. Организация микологической лаборатории	8
2. Сбор и доставка исследуемого материала	9
3. Методы лабораторной диагностики микозов бронхов, легких, плевры и схема обследования пациентов	10
3.1 Микроскопическое исследование	13
3.2 Культуральное исследование	14
3.2.1 Посев и режим культивирования	14
3.2.2 Методики идентификации дрожжевых грибов	16
3.2.3 Методики идентификации мицелиальных грибов	19
3.2.4 Методики определения лекарственной чувствительности дрожжевых грибов	20
3.2.5 Методика определения лекарственной чувствительности мицелиальных грибов рода <i>Aspergillus</i>	21
3.3 Иммунологические методы исследования	22
4. Интерпретация результатов лабораторных исследований	23
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	25
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	26

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

- ГОСТ Р 52623.4-2015 «Технологии выполнения простых медицинских услуг инвазивных вмешательств»
- ГОСТ Р 53079.4-2008 «Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа»
- ГОСТ Р 51088-97 «Наборы реагентов для клинической лабораторной диагностики. Общие технические условия»
- ГОСТ Р 51352-99 «Наборы реагентов для клинической лабораторной диагностики. Методы испытаний»
- Приказ МЗ РФ от 29.12.14 № 951 «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания»

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящем документе применяют следующие термины с соответствующими определениями:

Антимикотики – противогрибковые препараты.

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

Гиалогифомикоз – заболевание, вызванное светлоокрашенными аскомицетовыми плесневыми грибами из родов *Acremonium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Scedosporium*, *Scopulariopsis* и другими условно-патогенными гиалогифомицетами (за исключением *Aspergillus* spp.).

Зигомикоз – заболевание, вызванное грибами отдела *Zygomycota* из родов *Absidia*, *Basidiobolus*, *Cokeromyces*, *Conidiobolus*, *Cunninghamella*, *Lichtheimia*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus* и другими условно-патогенными зигомицетами.

Кандидоз – заболевание, вызванное условно-патогенными грибами из рода *Candida*.

Криптококкоз – заболевание, вызванное условно-патогенными грибами из рода *Cryptococcus*.

Микромицеты – микроскопические грибы.

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

Мукормикоз – заболевание, вызванное грибами порядка *Mucorales* отдела *Zygomycota* из родов *Absidia*, *Cokeromyces*, *Cunninghamella*, *Lichtheimia*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus* и другими условно-патогенными представителями *Mucorales* (синоним термина «зигомикоз» для микозов, вызванных грибами *Mucorales*).

Пневмомикоз – микотическое заболевание органов дыхания.

Редкие дрожжевые инфекции – редко встречаемые глубокие микозы, вызванные условно-патогенными дрожжевыми грибами из родов *Geotrichum*, *Malassezia*, *Saccharomyces*, *Saprochaete*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*.

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.

Феогифомикоз – заболевание, вызванное темноокрашенными аскомицетовыми плесневыми грибами из родов *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Bipolaris*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Exophiala* и другими условно-патогенными феогифомицетами.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

БАЛ	Жидкость бронхоальвеолярного лаважа
ИФА	Иммуноферментный анализ
КОЕ	Колониеобразующие единицы
ЛПУ	Лечебно-профилактические учреждения
МНПЦБТ	ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ»
МПК	Минимальная подавляющая концентрация
РАЛ	Реакция агглютинации латекса
РНГА	Реакция непрямой гемагглютинации
ФБС	Фибробронхоскопия
ЦНС	Центральная нервная система
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

Одной из актуальных проблем во фтизиатрической клинике является своевременная верификация у пациентов вторичных бронхолегочных инфекций, вызванных условно-патогенными (оппортунистическими) грибами: аспергиллеза, кандидоза, криптококкоза, зигомикоза (мукомикоза), гиалогифомикоза, феогифомикоза, редких дрожжевых инфекций с поражением легких. Поражения бронхолегочной системы мицелиальными (плесневыми) и дрожжевыми оппортунистическими микросциетами отличаются значительным клинико-морфологическим разнообразием [поверхностная колонизация слизистых оболочек бронхов, трахеобронхит, неинвазивные (аспергиллема и другие заболевания) и инвазивные формы микозов легких, микоз плевры], нередко протекая под маской туберкулеза и иных заболеваний легких [2, 6, 7, 18, 19].

Для диагностики и дифференциальной диагностики бронхолегочных микозов, сходных по клинической симптоматике с туберкулезом легких, применяют комбинацию клинических, радиологических и лабораторных методов исследования. Определяющее значение в диагностике микозов легких имеют результаты лабораторных исследований, позволяющие обнаруживать возбудитель и его биологические маркеры непосредственно в диагностическом материале [прямая микроскопия, культуральные и некультуральные (иммунологические) методы исследования] [3, 5, 8, 12].

Развитие пневмомикоза сопряжено с риском осложнений, в том числе опасных для жизни пациента; в ряде случаев необходимо проведение специальной антифунгальной терапии системными антимикотиками [4, 8]. Разные виды и группы видов возбудителей пневмомикозов отличаются по уровням чувствительности к применяемым в терапии лекарственным препаратам, что определяет необходимость проведения в лаборатории точной видовой идентификации выделенных штаммов. У видов возбудителей с вариативной или сниженной чувствительностью к распространенным препаратам перед назначением лекарственной терапии целесообразно определять чувствительность штаммов к антимикотикам по методикам, позволяющим корректировать данные *in vitro* с терапевтическим результатом [11, 17, 30].

Разработанные в ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ» (МНПЦБТ) и опубликованные в 2007 г. методические рекомендации Департамента здравоохранения города Москвы по проведению лабораторной диагностики пневмомикозов у больных туберкулезом [12] нуждаются в дополнении и модификации с учетом данных, накопленных в МНПЦБТ при их использовании, и новых сведений. Целью представленных методических материалов является дальнейшее совершенствование организации и проведения комплексной лабораторной диагностики пневмомикозов у больных туберкулезом в рутинной практике.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЛЕГОЧНЫХ МИКОЗОВ ВО ФТИЗИАТРИЧЕСКОЙ КЛИНИКЕ 1. ОРГАНИЗАЦИЯ МИКОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Оппортунистические микромицеты, способные поражать бронхолегочную систему человека, по уровню эпидемиологической опасности отнесены к III или IV группе патогенности [14, 16]. Согласно действующим российским санитарно-эпидемиологическим правилам [16], в III группу патогенности (грибы, регулярно вызывающие оппортунистические глубокие микозы) включены основные возбудители аспергиллеза (*Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. terreus*) [10, 26, 32], кандидоза (*Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*) [18, 31] и криптококкоза (*Cryptococcus neoformans*) [33]. Работа с плесневыми и дрожжевыми культурами возбудителей пневмомикозов III-IV групп требует специального оборудования и соблюдения необходимых мер предосторожности [1, 14, 15].

Учитывая клиническую значимость проблемы, в противотуберкулезных лечебно-профилактических учреждениях (ЛПУ) необходимо иметь возможности проводить у пациентов лабораторную диагностику вторичных пневмомикозов (микологические и серологические исследования) для своевременного выявления признаков микоза и установления этиологии поражения с предоставлением рекомендаций по адекватной лекарственной терапии. Микологическое подразделение в составе бактериологической лаборатории фтизиатрического ЛПУ должно располагаться в изолированном помещении и быть оснащено: ламинарным шкафом второго класса биологической безопасности для работы с клиническим материалом; отдельным изолированным боксом с ультрафиолетовым облучателем для предупреждения рассеивания спор мицелиальных грибов и заражения других подразделений лаборатории; многофункциональным микроскопом, укомплектованным объективами с увеличениями 10x, 40x, 100x для первичной микроскопии биоматериала (обнаружение в диагностическом материале элементов возбудителей микозов) и вторичной микроскопии культур грибов (исследование микроморфологии выделенных штаммов плесневых и дрожжевых возбудителей при проведении их видовой идентификации); отдельными термостатами, поддерживающими температуру культивирования в диапазоне от 30°C до 45°C.

2. СБОР И ДОСТАВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

При диагностике микозов органов дыхания исследуют мокроту; материалы, полученные при фибробронхоскопии (ФБС) [жидкость бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ), бронхиальный секрет, бронхиальный смыв]; образцы легочной ткани (биоптаты, резекционный материал) и бронхиальные биоптаты из очагов поражения; материалы из полостных образований легких (резекционный материал, биоптаты, аспираты, смывы) и плевральных полостей (аспираты, экссудаты, мазки). Дополнительным исследуемым материалом может быть отделяемое из зева (мазки); при верификации инвазивных и диссеминированных форм микозов – кровь (культуральные, серологические исследования).

Взятие материала необходимо производить с соблюдением правил асептики до начала антифунгальной терапии. Количество доставляемого в лабораторию материала должно быть достаточным для проведения микроскопического, культурального, серологического исследований.

Мокроту, самопроизвольно выделенную при откашливании, собирают в стерильный контейнер с завинчивающейся крышкой (утренняя порция, натошак). Перед сбором мокроты больному необходимо прополоскать полость рта теплой кипяченой водой или одним из растворов: раствором пищевой соды (1 чайная ложка на стакан воды), раствором перманганата калия (разбавленным раствором). Если мокрота отделяется плохо, накануне пациенту дают отхаркивающие средства.

Материал, полученный при ФБС, биопсийный и резекционный материал, материалы из полостных образований легких и плевральных полостей также собирают в стерильные контейнеры с крышкой.

Материал со слизистых оболочек полости рта и зева берут стерильным ватным тампоном сначала с внутренней поверхности щек, неба, губ, затем с языка, тщательно протирая тампоном спинку и область, прилегающую к корню языка, в заключение – круговым движением из зева. Тампон помещают в стерильную пробирку или контейнер с транспортной средой (предпочтительнее). Использование транспортной среды удлиняет время хранения образца.

Кровь берут из локтевой вены после тщательной дезинфекции кожи и тотчас же засевают во флакон с питательной средой. Объем крови для культурального исследования должен составлять не менее 10 мл. При серологических исследованиях венозную кровь в объеме 10 мл отбирают в стерильную пробирку и незамедлительно доставляют в лабораторию для приготовления сыворотки.

Биоматериал необходимо доставлять в лабораторию в специальной таре (биксы, пеналы) в максимально короткие сроки. Своевременная доставка биоматериала в лабораторию – важное условие получения адекватных результатов микробиологического (микологического) исследования. Мокроту, материалы, полученные при ФБС, образцы легочной ткани, бронхиальные биоптаты, материалы из полостных образований легких и плевральных полостей следует исследовать в течение одного часа после взятия, а при хранении в холодильнике при 4°C – не позднее чем через 3 ч. Несоблюдение сроков хранения биоматериала может вести к значительным изменениям количественного содержания возбудителя микоза и грибов-контаминантов, попадающих в образец при заборе материала [уменьшение или увеличение числа колониеобразующих единиц (КОЕ) гриба в биоматериале, гибель клеток].

В сопроводительном документе следует указать характер исследуемого материала, дату и время его взятия, сведения о пациенте (фамилия, имя, отчество, пол и возраст больного, имеющиеся заболевания, при подозрении на микоз – предполагаемый клинический диагноз), название учреждения, фамилию и подпись врача, направившего материал.

3. МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ МИКОЗОВ БРОНХОВ, ЛЕГКИХ, ПЛЕВРЫ И СХЕМА ОБСЛЕДОВАНИЯ ПАЦИЕНТОВ

Разработанная в МНПЦБТ и рекомендуемая для использования в противотуберкулезных ЛПУ схема проведения лабораторной диагностики оппортунистических пневмомикозов основана на использовании комплекса клинически значимых методов (таблица 1):

- методы микробиологической (микологической) диагностики – микроскопическое исследование респираторного, хирургического биоматериалов; культуральное исследование респираторного, хирургического биоматериалов и крови;
- серологический метод диагностики – обнаружение антигенов возбудителей и антител к антигенам возбудителей в сыворотке крови с помощью стандартизованных коммерческих тестов на основе иммуноферментного анализа (ИФА), латекс-агглютинации (РАЛ), реакции непрямой гемагглютинации (РНГА).

При подозрении на развитие пневмомикоза у больных туберкулезом проводят микологические исследования (прямая микроскопия, посев количественным методом) двух или более проб мокроты в динамике и пробы материала, полученного при ФБС. Если процедуру ФБС у пациента не проводят, лабораторное обследование на пневмомикоз ограничивается менее специфичными, но более доступными исследованиями проб мокроты. Мокрота и содержимое бронхов, полученное при ФБС, – основной диагностический материал на пневмомикоз. Дополнительным материалом является отделяемое из зева (посев).

У ряда пациентов противотуберкулезных ЛПУ проводят специальные микологические исследования (прямая микроскопия, посев) высокоспецифичных хирургических биоматериалов: образцы легочной ткани из очагов поражения (диагностика инвазивных микозов); материалы из полостных образований легких неясной этиологии (диагностика инфекций в легочной полости); материалы из плевральных полостей неясной или смешанной этиологии (диагностика микотических поражений плевры). Все случаи обнаружения в хирургическом материале грибов при посеве или методом прямой микроскопии имеют важное диагностическое значение, положительный результат следует незамедлительно доводить до сведения лечащего врача-фтизиатра.

Серологический метод включают в алгоритм лабораторных исследований при дифференциальной диагностике инвазивных и диссеминированных форм микозов (тесты на определение в сыворотке антигенов *Aspergillus* и/или *Cryptococcus*), аспергиллеза легких (тесты на определение в сыворотке антигенов *Aspergillus* и/или антител к ним), криптококкоза легких и центральной нервной системы (ЦНС) с поражением легких (тесты на определение в сыворотке антигенов *Cryptococcus*), кандидоза легких (тесты на определение в сыворотке антигенов *Candida* и/или антител к ним).

При подозрении на фунгемию и/или диссеминированный микоз с поражением легких у пациентов проводят культуральное исследование крови с использованием современных ручных или автоматических систем, соблюдая необходимое соотношение объемов крови и среды при посеве во флаконы для гемокультур.

Таблица 1. Схема комплексной лабораторной диагностики бронхолегочных микозов у больных туберкулезом органов дыхания

Материал	Методы диагностики
Мокрота Исследование проводят в динамике: при подозрении на пневмомикоз отбирают две пробы – на 1 и 2 сутки, а при необходимости, дополнительно, на 3 (4)	Прямая микроскопия; культуральное исследование (количественный метод)
Содержимое бронхов (материал, полученный при ФБС: БАЛ, бронхиальный секрет, бронхиальный смыв)	Прямая микроскопия; культуральное исследование (количественный метод)
Образцы легочной ткани, бронхиальные биоптаты (биоптат из очагов поражения, резекционный материал)	Прямая микроскопия; культуральное исследование
Содержимое полостных образований легких (каверны, туберкулемы, кисты и др.: резекционный материал, пункционный биоптат, аспираты, смывы)	Прямая микроскопия; культуральное исследование
Содержимое плевральных полостей (полости эмпиемы, остаточные плевральные полости: аспираты, эксудаты, мазки)	Прямая микроскопия; культуральное исследование
Отделяемое из зева; дополнительный диагностический материал	Культуральное исследование
Сыворотка крови исследования проводят при подозрении на инвазивный микоз (<i>Aspergillus</i> , <i>Cryptococcus</i> антигенемия); бронхолегочный аспергиллез, кандидоз, криптококкоз	Иммунологические исследования (стандартизованные коммерческие тесты); тесты на обнаружение антигенов <i>Aspergillus</i> , <i>Candida</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> ; тесты на количественное определение антител к антигенам <i>Aspergillus</i> , <i>Candida</i> .
кровь: Исследование проводят при подозрении на фунгемию и/или диссеминированный микоз.	Культуральное исследование

Разработанный и рекомендуемый алгоритм микробиологического исследования на пневмомикоз включает прямую микроскопию и культивирование проб респираторного материала на питательных средах, идентификацию выделенных штаммов

дрожжевых и мицелиальных грибов до уровня вида и определение чувствительности к антифунгальным препаратам (дрожжевые грибы, мицелиальные грибы рода *Aspergillus*) по стандартным методикам. Для получения достоверных и воспроизводимых результатов идентификации и определения чувствительности возбудителей к антимикотикам при работе с выделенными культурами грибов следует придерживаться указанного протокола исследования (рисунок 1).

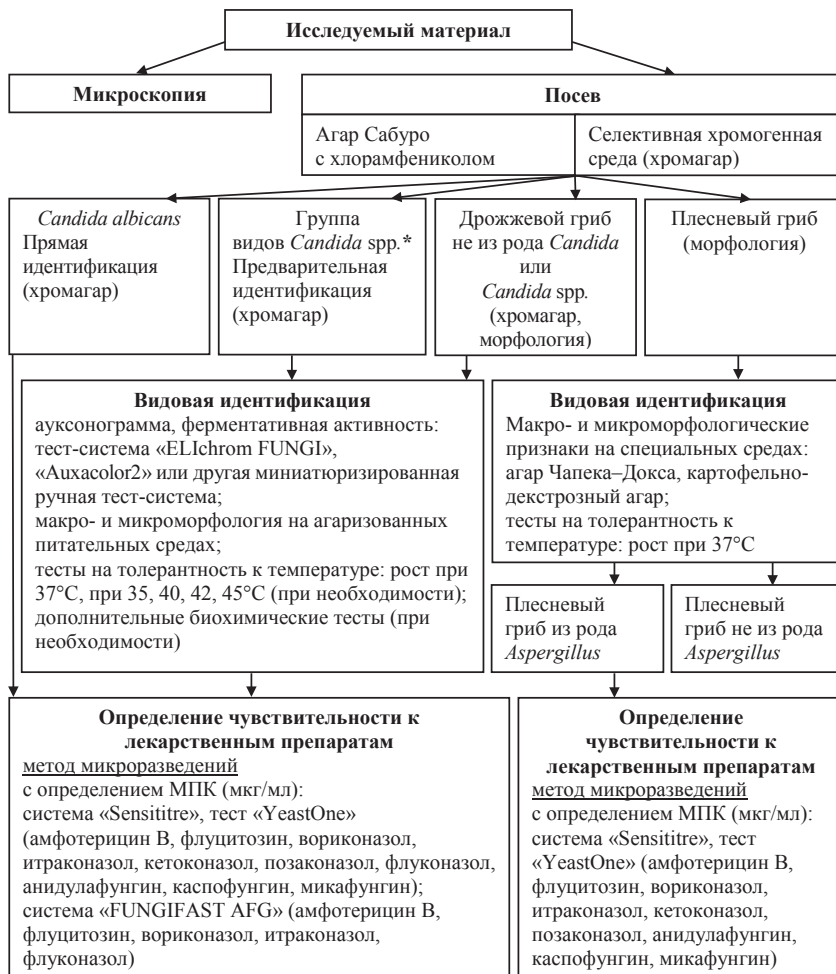


Рисунок 1. Алгоритм микробиологических исследований при диагностике пневмомикозов (мокрота, содержимое бронхов)

Примечание: * Предварительная идентификация *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* по наличию ферментативной активности и морфологическим характеристикам на хромогенных средах (CandiSelect 4, Brilliance Candida Agar, chromID Candida, BBL CHROMagar Candida Medium); хромагары Brilliance Candida Agar и BBL CHROMagar Candida Medium позволяют проводить прямую окончательную идентификацию *C. albicans*, *C. krusei* и *C. tropicalis*

3.1 МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Прямая микроскопия респираторного и хирургического биоматериалов – простой и доступный метод лабораторной диагностики пневмомикозов, позволяющий быстро обнаруживать элементы гриба в образцах легочной ткани из очагов поражения, в БАЛ, мокроте. Результаты микроскопического исследования диагностических материалов крайне важны для выявления микотической природы бронхолегочной инфекции и определения морфологической формы возбудителя в организме больного (дрожжевая, мицелиальная форма). Следует учитывать, что культуру возбудителя легочного микоза не всегда удается выделить из образца легочной ткани или содержимого бронхов и обнаружение клеток и структур гриба при микроскопии может являться единственным лабораторным подтверждением развития заболевания.

При исследовании биоматериалов на пневмомикоз применяют стандартные рутинные для микологической лаборатории методики прямой микроскопии [3, 19]. Жидкий (респираторный, хирургический) и плотный (хирургический) материал исследуют в неокрашенных (нативных) и окрашенных препаратах: окраски по Граму, по Романовскому–Гимзе и калькофлюором белым (люминесцентная микроскопия). Рекомендованные для практического применения методики эффективны для обнаружения элементов мицелиальных и дрожжевых грибов в респираторных биосубстратах, материалах из очага поражения в легких, содержимом легочных и плевральных полостей. Фиксированные препараты (над пламенем горелки) из образцов мокроты (без центрифугирования) и материалов, полученных при ФБС (осадок после центрифугирования пробы при 1500 об/мин в течение 10 мин), окрашивают по Граму и при необходимости по Романовскому–Гимзе (дополнительный метод окраски). Препараты из аспиринов и экссудатов из полостных образований (жидкий материал) готовят из осадка после центрифугирования (1500 об/мин в течение 10 мин), неокрашенными или в сочетании с окраской по Граму (при необходимости). Препараты из плотного биопсийного и резекционного материала готовят с добавлением 10% раствора щелочи (KOH) – с окраской калькофлюором белым или нативные. Препараты исследуют при x400 и x1000 увеличениях в световом микроскопе и при x200 и x400 увеличениях в люминесцентном микроскопе (препараты с калькофлюором). Метод микроскопии со щелочью, применяемый с различными модификациями окраски, доступен и достаточно информативен при работе с биоптатом и резекционным материалом. Внедрение в практику лабораторий противотуберкулезных ЛПУ специального гистологического исследования биопсийного материала из легочной ткани ограничено организационными и методическими трудностями [12].

При микроскопии отмечают *среднее количество элементов грибов в поле зрения препарата* («единичные клетки/структуры», «умеренно», «значительно», «обильно»), *морфологию и размеры вегетативных и репродуктивных структур грибов* [дрожжевые клетки; почкующиеся дрожжевые клетки; фрагменты псевдомицелия; комбинации дрожжевых клеток, псевдогиф и/или гиф; фрагменты истинного мицелия – гифы (характер септированности гиф, наличие ветвления); артроконидии; споры (конидии); структуры конидиального спороношения].

Данные прямой микроскопии являются одним из показателей активности гриба в процессе болезни. Диагностическая ценность положительных результатов микроскопии определяется характером клинического материала; при исследовании нестерильных в норме биологических субстратов определяющего диагностического значения эти данные не имеют [5, 19]. В целом при положительном результате культурального исследования диагностическая значимость положительного результата микроскопии возрастает.

3.2. КУЛЬТУРАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Культуральные исследования имеют определяющее значение в диагностике оппортунистических пневмомикозов и необходимы для обнаружения возбудителя микоза в исследуемом материале, его идентификации (этиология микоза) и изучения свойств штамма возбудителя, включая оценку чувствительности к лекарственным препаратам (рисунок 1). При проведении культуральных исследований на пневмомикоз необходимо использовать специальные питательные среды, соблюдать методики посева различных биоматериалов и режимы их культивирования.

3.2.1 ПОСЕВ И РЕЖИМ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Для выделения грибов из биологического материала (мокрота, содержимое бронхов, содержимое легочных и плевральных полостей, биоптаты тканей, отделяемое из зева, кровь) в МНПЦБТ используют следующие специальные питательные среды:

- агар Сабуро с антибактериальным препаратом хлорамфениколом – стандартная универсальная среда для селективного выделения дрожжевых и плесневых грибов различных групп из материала с бактериальной контаминацией (среда может использоваться для исследования микроморфологии выделенных дрожжей при их последующей идентификации и не подходит для получения спороношения у выделенных плесневых грибов);
- селективные хромогенные среды («CandiSelect 4», Bio-Rad или «Brilliance Candida Agar», Oxoid) – для выявления смешанных культур дрожжевых грибов и одновременной прямой или ориентировочной идентификации ряда болезнетворных *Candida* spp.;
- жидкая среда Сабуро – среда накопления (используют при посеве хирургического материала и отделяемого из зева);
- картофельно-декстрозный агар – среда для быстрой изоляции плесневых грибов с их последующей идентификацией (получение быстрого спороношения у плесневых грибов различных групп).

При инкубации посевов используют два оптимальных температурных режима для выделения и дифференциации оппортунистических грибов – 30°C и 37°C. Хотя большинство возбудителей пневмомикозов активно развиваются в диапазоне от 37 до 40°C, ряд дрожжевых и плесневых возбудителей не растут (или слабо развиваются) *in vitro* при 37°C, а отдельные виды – и при 35°C [17, 30]. Оптимальной температурой для выделения условно-патогенных грибов при посеве респираторного и хирургического материалов является температура 30°C; при отсутствии термостата, поддерживающего данный режим, посевы возможно культивировать при комнатной температуре 22-25°C [3, 19]. Проведение парных посевов респираторных материалов и их одновременная инкубация при температуре 30°C и 37°C необходимы для выявления возможного диморфизма возбудителя микоза (дрожжевая и мицелиальная форма) и позволяют дифференцировать возбудители, растущие и неспособные к росту *in vitro* при 37°C [3, 19].

Посев мокроты и материала, полученного при ФБС, проводят количественным методом для последующего учета числа выросших колоний грибов определенного вида (учет однотипных дрожжевых колоний проводят через 48 ч инкубации, плесневых колоний – через 2-5 суток). Перед посевом мокроту в течение 5-10 мин гомогенизируют встряхиванием с трипсином, затем разводят стерильным физиологическим раствором (изотонический раствор хлорида натрия) в соотношении 1:10 и сеют из данного разведения (1:10), а при необходимости также из разведений 1:100 и 1:1000 или неразведенной. Материал, полученный при ФБС, центрифугируют при 1500 об/мин в течение 10 мин. После центрифугирования надосадочную жидкость сливают и осадок засевают без разведения. При посеве респираторного материала используют три чашки Петри: две чашки для посева дозированного объема материала – по 0,1 мл (питательные среды: агар Сабуро и хромогенная среда или агар Сабуро; инкубация при 30°C и 37°C) и контрольную чашку (питательная среда агар Сабуро; инкубация при 30°C). Дозированный объем материала равномерно засевают газонно на поверхность среды с помощью стерильного шпателя. На поверхность контрольной чашки материал переносят бактериальной петлей не дозированно и помещают в три (четыре) точки, отмечая место посева на обратной стороне дна чашки Петри. Расчет количества КОЕ (n) гриба в 1 мл исследуемого образца респираторного материала проводят по формуле: $n = a \times b \times c$, где a – среднее число однотипных колоний на засеянных чашках; b = 10, при объеме посевного материала 0,1 мл; c – степень разведения материала (10, 100, 1000).

Рост идентичной культуры на опытной чашке и в контроле достоверно подтверждает наличие клеток гриба в исследуемом материале. При отсутствии роста культуры гриба на контрольной чашке результат исследования регистрируют как отрицательный. В случае роста плесневого гриба на контрольной чашке и отсутствии его роста на чашках с количественным посевом материала результат регистрировали как положительный (наличие роста) с последующей идентификацией культуры. При интерпретации содержания грибов *Candida* spp. в мокроте учитывают, что в норме число колоний гриба рода *Candida*, выросших из 1 мл мокроты, не должно превышать 1×10^3 КОЕ/мл [5, 12].

Посев хирургического материала и отделяемого со слизистых оболочек зева проводят на две питательные среды – агар Сабуро с хлорамфениколом и бульон Са-

буро; при подозрении на пневмомикоз, вызванный плесневым возбудителем, в набор питательных сред добавляют картофельно-декстрозный агар.

Посев плотного хирургического материала (биоптаты, резекционный материал) проводят по следующей схеме: фрагмент материала помещают на агар Сабуро и растирают стерильным шпателем по поверхности среды, одновременно кусочки материала помещают в пробирку с бульоном Сабуро (среда обогащения).

Посев жидкого хирургического материала (аспираты, экссудаты из полостных образований легких и плевральных полостей) проводят по следующей схеме: материал засевают на агар Сабуро, равномерно распределяя 2-3 капли материала по поверхности агара стерильным шпателем, оставшуюся жидкость переносят в бульон Сабуро (среда обогащения).

Отделяемое со слизистых оболочек зева, содержимое остаточных плевральных полостей (мазки) засевают на агар Сабуро, проводя тампоном с вращением по поверхности питательной среды (следует использовать стандартную методику посева), затем помещают тампон в пробирку с бульоном Сабуро (среда обогащения).

Посевы хирургического материала и мазки из зева инкубируют при 30°C. Просмотр посевов производят ежедневно. При наличии роста колоний грибов в первичном посеве на чашках с агаризованной средой отмечают интенсивность роста: скудный (единичные колонии), умеренный, обильный (при сплошном росте гриба) рост. При отсутствии роста инкубацию продолжают 7-10 дней, повторный высев из среды обогащения проводят на агар Сабуро и/или картофельно-декстрозный агар. Результат посева регистрируют как отрицательный только после отсутствия роста высева из бульона на чашки с плотной питательной средой.

Образцы крови засевают в коммерческие флаконы ВАСТЕС Мусо/F-Lytic, Becton Dickinson и инкубируют в автоматическом анализаторе Vactec 9050, Becton Dickinson. Содержимое флаконов Мусо/F-Lytic после выявления роста окрашивают по Граму и пересевают на питательную среду Сабуро для выделения гемокультур грибов. Другая используемая методика включает: первичный посев крови во флаконы двухфазной системы «HiCombi», HIMEDIA, инкубацию посевов при 37°C в течение 10 суток и высев на питательную среду Сабуро при выявлении признаков роста.

Контроль загрязнения воздуха лаборатории спорами плесневых грибов проводят с помощью экспонирования открытой чашки Петри с агаром Сабуро в посевном боксе во время проведения посева с последующей инкубацией при 30°C.

3.2.2 МЕТОДИКИ ИДЕНТИФИКАЦИИ ДРОЖЖЕВЫХ ГРИБОВ

Выделенные при культуральных исследованиях на пневмомикоз штаммы грибов следует идентифицировать для вида. Идентификация культуры гриба – важнейший этап микологического исследования, необходимый для точной дифференциации этиологии микоза, корректной интерпретации полученных результатов и подбора противогрибковых препаратов для лечения.

При просмотре первичного посева на агаре Сабуро определяют принадлежность колоний микромицетов к дрожжевым или плесневым грибам по их культуральным признакам: наличие или отсутствие воздушного мицелия, структура и характер поверхности колонии, скорость и характер роста, цвет колонии и ее обратной стороны

(реверзума) и др. Штаммы определенного морфологического типа выделяют в чистой культуре на питательной среде. Перед этим следует убедиться в чистоте культуры. При последующих исследованиях выделенных штаммов используют специальные методики для идентификации и определения чувствительности дрожжевых или плесневых грибов.

Болезнетворные дрожжевые микромицеты разделяют на *дрожжи, размножающиеся с образованием почек* [формируют одиночные почкующиеся клетки и нити псевдомицелия (часть видов)], и *дрожжеподобные грибы, размножающиеся артроспорами* (формируют гифы мицелия, которые распадаются на одиночные артроконидии; в краевой части колоний характерно образование различного субстратного мицелия). При работе с культурами дрожжевых возбудителей пневмомикозов и глубоких микозов с поражением легких важно дифференцировать группы возбудителей, различающихся по уровням природной чувствительности к лекарственным препаратам: *аскомицетовые белые дрожжи* (*Candida*, *Saccharomyces*, *Yarrowia*), *базидиомицетовые белые дрожжи* (*Cryptococcus*, *Malassezia*), *базидиомицетовые красные дрожжи* (*Rhodotorula*, *Sporobolomyces*), *аскомицетовые дрожжеподобные грибы* (*Geotrichum*, *Saprochaete*), *базидиомицетовые дрожжеподобные грибы* (*Trichosporon*). Для быстрой дифференциации дрожжевых культур предлагаем использовать простые морфологические характеристики: признаки колоний (цвет поверхности и синтез каротиноидов, характер поверхности, край колонии, наличие мицелиальных структур) и микроморфологические признаки [наличие почкующихся клеток или артроспор (микроскопия нативных препаратов), наличие капсул (микроскопия тушевых препаратов)], а также стандартный биохимический тест на наличие фермента уреазы для разделения аскомицетов (не образуют уреазу) и базидиомицетов (образуют уреазу).

Видовая идентификация штаммов дрожжевых грибов включает определение их специфических биохимических и физиологических характеристик с обязательным исследованием морфологических признаков.

Для видовой идентификации дрожжевых болезнетворных грибов в МНЦБТ используется комбинация современных и классических методик:

- Хромогенные среды различных производителей («CandiSelect 4», Bio-Rad; «Brilliance Candida Agar», Oxoid; «chromID Candida», BioMerieux; «BBL CHROMagar Candida Medium», Becton Dickinson) для визуальной окончательной или ориентировочной идентификации распространенных в медицинской практике возбудителей кандидоза по специфическому окрашиванию колоний (ферментативная активность) и их макроморфологическим характеристикам – высоко специфичный скрининг-тест лабораторной диагностики кандидоза (рисунок 1). Для рутинных исследований достаточно использовать одну из вышеперечисленных хромогенных сред;

- Миниатюризированные ручные тест-системы («ELIchrom FUNGI», Elitech MICROBIO; «Auxacolor 2», Bio-Rad) – для идентификации клинически значимых дрожжевых грибов родов *Candida*, *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Kloeckera* (*Hanseniaspora*), *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saprochaete*, *Trichosporon* по ауконограмме (способность к аэробной ассимиляции углеводов), ферментативной активности и дополнительным тестам (рисунок 1). Для рутинных исследований достаточно использовать одну из вышеперечисленных тест-систем;

- Тесты быстрой идентификации возбудителей кандидоза «ELITex Bicolor *dublinskiensis*», Elitech MICROBIO (идентификация *C. dublinskiensis* – тест РАЛ), «ELIchrom *glabrata*», Elitech MICROBIO (идентификация *C. glabrata* – трегалозный тест), «ELITex *krusei*», Elitech MICROBIO (идентификация *C. krusei* – тест РАЛ);

- Макроморфологические признаки роста на среде агар Сабуро – признаки колоний: цвет поверхности и синтез каротиноидов (присутствие каротиноидных пигментов специфично для базидиомицетовых красных дрожжей), консистенция и характер роста, характер поверхности, край колонии, наличие или отсутствие мицелиальных структур (субстратный мицелий, короткий воздушный мицелий);

- Микроморфологические признаки на среде агар Сабуро и хромогенных средах – форма и размер дрожжевых клеток, наличие и форма клеточных структур (образование почек, псевдомицелиальных и мицелиальных структур), наличие и размеры артроспор (диагностический признак дрожжеподобных грибов *Geotrichum*, *Saprochaete*, *Trichosporon*), наличие и размеры капсулы (диагностический признак грибов *Cryptococcus*). Микроморфологию культур изучают во влажных неокрашенных препаратах с добавлением дистиллированной воды, в тушевых препаратах (капсулообразование) и при необходимости в мазках, окрашенных по Граму. Препараты исследуют при x400 и x1000 увеличениях;

- Тесты на толерантность к повышенной температуре – способность к росту на среде агар Сабуро при 37°C (дополнительный дифференцирующий признак для сходных по основным характеристикам видов) и 45 °C [при необходимости – дополнительный дифференцирующий признак для *C. albicans* (растет при 45°C) и *C. dublinskiensis* (не растет при 45°C)].

- Тест на способность к ассимиляции нитратов (при необходимости) – способность к росту на среде с KNO_3 в качестве единственного источника азота [дополнительный дифференцирующий признак для *Rhodotorula glutinis* (растет на среде с KNO_3) и *Rh. mucilaginosa* (не растет на среде с KNO_3)].

3.2.3 МЕТОДИКИ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

При работе с культурами плесневых грибов необходимо дифференцировать группы возбудителей пневмомикозов, различающихся по уровням природной чувствительности к лекарственным препаратам: *возбудители зигомикоза* – мукоральные и некоторые другие низшие грибы-зигомицеты [формируют быстрорастущие колонии с обильным воздушным шерстистым мицелием; образуют широкие (5-20 мкм) не-септированные или с редкими перегородками гифы, спорангиеносцы со спорангиями и эндогенными спорангиоспорами, некоторые виды образуют также половую стадию (зигоспоры), вегетативные структуры (ризоиды, столоны, хламидоспоры, оидии)]; *возбудители аспергиллеза* – аскомицетовые светлоокрашенные грибы рода *Aspergillus* [формируют колонии с развитым воздушным мицелием; образуют регулярно септированные бесцветные гифы, конидиеносцы с характерным вздутием, конидиогенными клетками и конидиями, некоторые виды образуют половую стадию (аскокарпы – клей-стотеций)]; *возбудители гиалогифомикозов* – аскомицетовые светлоокрашенные грибы различных родов [формируют колонии с развитым воздушным мицелием; образуют регулярно септированные бесцветные гифы, конидиеносцы с конидиогенными структурами и конидиями]; *возбудители феогифомикозов из группы диморфных грибов «черные дрожжи»* – аскомицетовые темноокрашенные грибы родов *Aureobasidium*, *Eo-philiala* [формируют дрожжеподобные темные колонии с ворсинчатым краем; образуют в талломе как одиночные почкующиеся клетки, так и регулярно септированные темно-окрашенные гифы]; *возбудители феогифомикозов из группы мицелиальных феоидных грибов* – аскомицетовые темноокрашенные грибы различных родов [формируют плесневые темные колонии; образуют регулярно септированные темноокрашенные гифы, темноокрашенные конидиеносцы с конидиогенными структурами и конидиями].

Заключительную видовую идентификацию штаммов плесневых грибов проводят после получения спороношения на специальных идентификационных средах [агаре Чапека–Докса и картофельно-декстрозном агаре, а при необходимости также на солодовом агаре (идентификация зигомицетов) или овсяном агаре (идентификация *Acremonium* spp., *Fusarium* spp., темноокрашенных грибов, включая группу «черных дрожжей»)] по общепринятым методикам с помощью атласов-определителей [10, 17, 30]. Для видовой идентификации используют комбинацию характерных морфологических и физиологических признаков:

- Микроморфологические признаки – морфология бесполой стадии гриба (спорангиеносцы со спорангиями и спорангиоспорами у зигомицетов, конидиеносцы с конидиогенными структурами и конидиями у гиалогифомицетов, феогифомицетов), морфология вегетативных структур (гифы мицелия, хламидоспоры, склероции и др.), морфология половой стадии в случае образования *in vitro*.

- Макроморфологические признаки роста на средах агар Чапека–Докса и картофельно-декстрозный агар – признаки колоний: цвет поверхности, окраска реверзума (разделение штаммов на темноокрашенные и светлоокрашенные проводят по наличию или отсутствию окраски от бурого до черного цветов), структура, характер и зональность поверхности, наличие и окраска экссудата и пигмента, скорость и характер роста (по диаметру колонии в процессе роста).

● Способность к росту при температуре 37 °С – наличие или отсутствие роста на среде картофельно-декстрозный агар (дополнительный признак для дифференциации ряда видов, близких по морфологическим характеристикам).

Микроскопическое исследование штаммов плесневых грибов проводят сразу после начала споруляции (как правило, на 3 сутки исследования) во влажных нативных препаратах с добавлением дистиллированной воды; культуру на предметное стекло переносят с помощью микологического крючка и накрывают покровным стеклом. Препараты исследуют при x400 и x1000 увеличениях.

3.2.4 МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ДРОЖЖЕВЫХ ГРИБОВ

Тестирование чувствительности к лекарственным препаратам – необходимый этап проведения лабораторной диагностики пневмомикозов; результаты тестирования позволяют определить спектр активных препаратов и своевременно обнаружить у возбудителя устойчивость к широко применяемым антимикотикам. Для определения чувствительности дрожжевых и плесневых грибов следует пользоваться стандартизованными доступными методиками, обеспечивающими высокую воспроизводимость результатов и позволяющими проводить клиническую интерпретацию тестирования штаммов: чувствительные к препарату штаммы, устойчивые к препарату штаммы, штаммы с промежуточной чувствительностью (неопределенный результат терапии) или чувствительные дозозависимые штаммы (для эффективной терапии следует подбирать дозу препарата, превышающую среднюю терапевтическую) [9, 24, 30].

Ведущими организациями – Институтом клинических и лабораторных стандартов [Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)] и Европейским комитетом по определению чувствительности к антибиотикам [European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)] – разработаны международные стандарты тестирования чувствительности дрожжевых и плесневых грибов – референтные методики метода серийных разведений в бульоне со средой RPMI 1640 [21, 22, 27, 28]. Для проведения интерпретации значений минимальной подавляющей концентрации (МПК) препаратов, полученных по стандартным и сопоставимым с ними методиками, организации EUCAST и CLSI устанавливают пограничные значения МПК [23, 24, 29]. Метод микроразведений в бульоне со средой RPMI 1640 с определением МПК в мкг/мл рекомендован и адаптирован для работы с патогенными дрожжевыми и плесневыми грибами Межрегиональной ассоциацией по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии [9].

Проводить тестирование чувствительности штаммов дрожжевых грибов к антимикотикам (у возбудителей кандидоза, криптококкоза, редких дрожжевых инфекций) рекомендуется модифицированным методом микроразведений в бульоне с колориметрической оценкой результатов – с помощью ручных стандартизованных коммерческих тест-систем (системы «Sensititre», TREK Diagnostic Systems; «FUNGI-FAST AFG», ELITech MICROBIO и аналогичные ручные тесты).

Используемая в МНПЦБТ для диагностической и научно-исследовательской работы система «Sensititre» (колориметрический тест «YeastOne»), TREK Diagnostic Systems соответствует стандарту тестирования чувствительности дрожжевых грибов CLSI [22] и включает препараты группы азолов (флуконазол, итраконазол, ворико-

назол, позаконазол, кетоконазол), группы эхинокандинов (анидулафунгин, каспофунгин, микафунгин), амфотерицин В, флуцитозин. Тестирование чувствительности проводится в 11 (7, 10) или 12 концентрациях [планшеты «YeastOne» (Y08 и Y010)]. Клиническую интерпретацию значений МПК препаратов для возбудителей кандидоза проводят по критериям, установленным CLSI [23, 24]. В случаях, когда критерии интерпретации не установлены, проводят ориентировочную оценку чувствительности штаммов к антимикотикам в категориях «вероятно чувствительные к препарату» (штаммы с низкими и средними значениями МПК препарата в системе «Sensititre») и «вероятно устойчивые к препарату» (штаммы с высокими и максимально высокими значениями МПК препарата в системе «Sensititre»).

Тестирование дрожжевых грибов при диагностических и скрининговых исследованиях в МНПЦБТ проводят также более доступной и простой в использовании коммерческой тест-системой «FUNGIFAST AFG», Elitech MICROBIO. Стандартизованная тест-система «FUNGIFAST AFG» включает препараты группы азолов (флуконазол, итраконазол, вориконазол), амфотерицин В, флуцитозин, представленные в в 3 или 4 концентрациях. Было установлено, что систему «FUNGIFAST AFG» отличает высокий уровень сходимости результатов с системой «Sensititre» (значения МПК флуконазола, вориконазола, амфотерицина В и флуцитозина для штаммов грибов рода *Candida*). При интерпретации результатов используют актуальные значения пограничных концентраций МПК препаратов, установленные CLSI. Необходимо учитывать вероятность ошибки при учете результатов активности препарата итраконазола из-за развития остаточного роста, особенно при тестировании *Candida albicans* (остаточный затухающий рост возможен в лунке с МПК итраконазола и в соседних лунках с более высокими концентрациями препарата).

3.2.5 МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ РОДА *ASPERGILLUS*

Тестирование чувствительности штаммов плесневых грибов рода *Aspergillus* к антимикотикам мы рекомендуем проводить методом микроразведений в бульоне с определением МПК в мкг/мл с помощью тест-системы «Sensititre» (колориметрический тест «YeastOne»), TREK Diagnostic Systems. Система соответствует стандарту тестирования чувствительности мицелиальных грибов CLSI [21], включает препараты, обладающие активностью в отношении грибов рода *Aspergillus* и адаптирована для определения лекарственной чувствительности у возбудителей аспергиллеза (необходимое условие – способность выделенного штамма *Aspergillus* spp. к росту *in vitro* при 35 °С).

В работе лаборатории МНПЦБТ при приготовлении споровой суспензии грибов *Aspergillus* spp. используется модифицированная методика, повышающая достоверность получаемых результатов (удаление обрывков мицелия из споровой суспензии с помощью фильтрования) и безопасность проведения тестирования чувствительности (использование для посева штаммов пробирок со скошенным агаром вместо чашек Петри) [11]. Исследуемый штамм гриба рода *Aspergillus* пересевают в пробирку со скошенным агаром со средой картофельно-декстрозный агар или агар Чапека–Докса и инкубируют в течение 5-7 суток при 35°С (проводится визуальный

контроль развития спороношения культуры). Штаммы пяти часто встречаемых возбудителей аспергиллеза *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. terreus* образуют достаточное количество конидий для проведения тестирования, как правило, уже на 5 сутки инкубации. 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 [21]; при невозможности использовать стерильные фильтры их заменяют на стерильную марлю, сложенную в два слоя. Полученный фильтрат доводят до необходимой плотности споровой суспензии с помощью физиологического раствора, определяя ее по методике «Sensititre» на нефелометре (до 0,5 ед. по МакФарланду). Перед инокуляцией споровой суспензии, в случае необходимости, проводят контрольное микроскопическое исследование с помощью камеры Горяева для определения в суспензии концентрации конидий (КОЕ/мл) и подтверждения отсутствия фрагментов мицелия [11].

Референтные методики CLSI [21] и EUCAST [9, 27] для мицелиальных грибов аналогичны друг другу и сходны с методикой «Sensititre»: процедура тестирования, температура и время инкубации, визуальный учет результатов. Это дает возможность при работе с «Sensititre» использовать для оценки чувствительности грибов *Aspergillus* spp. к триазольным препаратам (вориконазол, итраконазол, позаконазол), амфотерицину В пограничные значения МПК, установленные EUCAST [29]. При оценке чувствительности грибов *Aspergillus* spp. к азолам (вориконазол, итраконазол, позаконазол, кетоконазол, флуконазол), амфотерицину В, флуцитозину следует учитывать относительную величину значения МПК препарата в диапазоне тестируемых концентраций системы «Sensititre»: низкое, среднее, высокое, максимально высокое. Пригодная для практического применения методика оценки фунгистатической активности эхинокандинов (анидулафунгин, каспофунгин, микафунгин) в отношении *Aspergillus* spp. к настоящему времени не разработана в полном объеме.

3.3 ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Доступные для использования в микробиологических лабораториях противотуберкулезных ЛПУ стандартизованные серологические методики следует использовать в сочетании с культуральными исследованиями при дифференциальной диагностике инвазивных и неинвазивных форм легочного аспергиллеза, легочного криптококкоза, криптококкоза ЦНС с поражением легких, легочного кандидоза и для проведения экспресс-диагностики инвазивного аспергиллеза и криптококкоза. В качестве маркеров пневмомикозов используют растворимые антигены возбудителей аспергиллеза (галактоманнан клеточной стенки грибов рода *Aspergillus*), кандидоза (маннан клеточной стенки грибов рода *Candida*) и криптококкоза (гликуроноксилманнан капсулы грибов *Cryptococcus neoformans*) и специфические сывороточные антитела к грибам *Aspergillus* и *Candida*. Включение в схему исследований дополнительных некультуральных серологических методик значительно расширяет диагностические возможности лабораторной диагностики инвазивного аспергиллеза, хронического аспергиллеза легких, легочного кандидоза, криптококкоза.

Для проведения серодиагностики вторичных пневмомикозов у пациентов фтизиатрических ЛПУ рекомендуется использовать стандартизованные коммерческие

тест-системы на основе РАЛ (обнаружение в сыворотке растворимых антигенов грибов *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*) и РНГА (количественное определение в сыворотке антител против *Aspergillus*, *Candida*).

При интерпретации результатов тестирования антигемии и определения титра специфических антител к антигенам возбудителей микозов следует учитывать вероятность развития ложноположительных и ложноотрицательных реакций. Диагностическая значимость положительного результата любого серологического исследования возрастает при его подтверждении методом посева [13, 20].

4. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Диагностическая ценность положительных результатов лабораторных исследований на пневмомикоз различна, часто вариабельна. При интерпретации лабораторных данных необходимо учитывать: метод исследования (обнаружение элементов гриба при микроскопии, выделение гриба, обнаружение антигенов грибов и антител к ним в сыворотке серологическим методом); характер материала (респираторные материалы, хирургические материалы, кровь); видовую принадлежность выделенного гриба; количественное содержание гриба (при оценке посевов респираторного материала); повторность обнаружения гриба и его биологических маркеров (при культуральном и серологическом исследованиях). Интерпретацию значимых результатов лабораторных исследований на пневмомикоз проводят в категориях: «признак колонизации», «признак вероятного микоза», «диагностически значимый признак микоза» [13].

К результатам, имеющим диагностическое значение, относят:

- обнаружение дрожжевого или плесневого гриба в образце легочной ткани с признаками поражения при посеве и/или при микроскопии (инвазивный микоз);

- выделение гриба из посева содержимого полостного образования легких или плевральной полости (микоз, локализованный в полости – у данных больных вероятно развитие инвазивного легочного микоза);

- выделение гриба из посева крови (фунгемия) – за исключением обнаружения культуры *Aspergillus* spp. (интерпретируется как контаминация).

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

- выделение условно-патогенного гриба любого вида из посева содержимого бронхов (ФБС);

- выделение плесневого гриба или дрожжевого гриба не из рода *Candida* из посева мокроты;

- выделение гриба из рода *Candida* в количестве $>1 \times 10^3$ КОЕ/мл из посева мокроты (критерий массивной колонизации нижних дыхательных путей грибами *Candida*).

Присутствие в содержимом бронхов и мокроте грибов *Aspergillus fumigatus* (основной возбудитель аспергиллеза) или *Cryptococcus neoformans* (основной возбудитель криптококкоза) предположительно более характерно для инфекционного процесса, чем для колонизации [3, 7, 26]. К высоко значимым лабораторным признакам микотической инфекции бронхолегочной системы следует отнести обнаружение в

содержимом бронхов и/или мокроте больного туберкулезом возбудителей аспергиллеза *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* и *A. terreus* [10].

Наиболее достоверно состав грибов, колонизирующих слизистые оболочки бронхов, определяется при посеве материала, полученного при ФБС. Колонизация проявляется также неоднократным выделением гриба, колонизировавшего поверхность слизистой оболочки, из мокроты [19]. Выделение гриба из содержимого бронхов (ФБС) и повторное выделение гриба одного вида из образцов мокроты являются надежными критериями выявления микотической колонизации нижних дыхательных путей.

Обнаружение в сыворотке крови антигенов грибов *Aspergillus* или *Cryptococcus* относят к признакам вероятного инвазивного и/или диссеминированного микоза [13, 20, 25]. Как признак вероятного бронхолегочного аспергиллеза (аспергиллемы и других форм легочного аспергиллеза) следует интерпретировать обнаружение в сыворотке крови антител к грибам *Aspergillus* [26]. Как признак вероятного бронхолегочного кандидоза следует интерпретировать обнаружение в сыворотке крови антител к грибам *Candida*. Обнаружение в сыворотке крови антигенов *Candida* следует интерпретировать как дополнительный признак развития кандидоза органов дыхания (диагностическое значение тестирования *Candida* антигемией при дифференциальной диагностике инвазивного кандидоза не вполне определено и вариабельно).

Представляется целесообразным проведение специального клиничко-лабораторного обследования больных туберкулезом, у которых выявлены следующие лабораторные признаки пневмомикоза (глубокого микоза):

- обнаружение дрожжевого или плесневого гриба при посеве и/или микроскопии образца легочной ткани;

- выделение гриба из посева содержимого полостного образования легких или плевральной полости;

- колонизация нижних дыхательных путей условно-патогенными плесневыми грибами – возбудителями бронхолегочных аспергиллеза, зигомикоза, гиалогифомикоза, феогифомикоза (исследования содержимого бронхов, полученного при ФБС и мокроты);

- колонизация нижних дыхательных путей условно-патогенными дрожжевыми грибами – возбудителями криптококкоза и редких дрожжевых микозов с поражением легких (исследования содержимого бронхов, полученного при ФБС и мокроты);

- массивная колонизация нижних дыхательных путей условно-патогенными дрожжевыми грибами – возбудителями кандидоза (исследования содержимого бронхов, полученного при ФБС и мокроты);

- антигемия (обнаружение в сыворотке крови антигена *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*);

- присутствие в сыворотке крови специфических антител к грибам *Aspergillus* (в количестве, которое интерпретируется производителем тест-системы как достоверная реакция в пользу развития глубокого аспергиллеза).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рекомендуемая для использования схема лабораторной диагностики оппортунистических пневмомикозов у больных туберкулезом включает специальные микробиологические исследования (микроскопия, посев количественным методом) респираторного биоматериала: двух или более проб мокроты в динамике и одной пробы содержимого бронхов, полученного при ФБС. При дифференциальной диагностике инвазивных форм пневмомикозов, поражений ранее возникших полостей легких и заболеваний плевры неясной этиологии у пациентов проводят высокоспецифичные микробиологические исследования (микроскопия, посев) хирургического биоматериала: легочных и бронхиальных биоптатов, содержимого полостных образований легких и плевральных полостей. При необходимости у пациентов дополнительно исследуют отделяемое из зева культуральным методом. Культуральные исследования крови проводят при подозрении на фунгемию, гематогенное распространение грибов *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans* и других оппортунистических дрожжевых возбудителей.

Все выделенные при исследовании на пневмомикоз штаммы дрожжевых и плесневых грибов необходимо идентифицировать до вида с использованием комплекса доступных и общепринятых в медицинской микологии методов, а штаммы возбудителей кандидоза, криптококкоза и редких дрожжевых инфекций перед назначением специфической терапии целесообразно исследовать на чувствительность к лекарственным препаратам 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, рекомендуется проводить определение чувствительности с определением МПК.

При дифференциальной диагностике легочного аспергиллеза и кандидоза, криптококкоза легких и ЦНС с поражением легких целесообразно проводить специальные серологические исследования на наличие в сыворотке крови антигенов *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* и антител к *Aspergillus*, *Candida*. Для проведения серодиагностики в лабораториях противотуберкулезных ЛПУ рекомендуется использовать доступные стандартизованные тесты, основанные на методиках агглютинации (РАЛ, РНГА).

Окончательную интерпретацию результатов лабораторного обследования на пневмомикоз следует проводить по совокупности всех микробиологических и серологических данных. Достоверные результаты, необходимые клиницисту для подтверждения или исключения вероятного микоза легких, в большинстве случаев могут быть получены в ходе комплексного лабораторного обследования больного.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Аравийский Р.А., Климко Н.Н., Васильева Н.В. Диагностика микозов. – СПб.: СПб МАПО, – 2004. – 186 с.
2. Атлас грибковых заболеваний. Под ред. К.А. Кауфман, Д.Л. Манделла. – М.: ГЭОТАР-Медиа, – 2010. – 240 с.
3. Диагностика и лечение микозов. Под ред. Д. Р. Хоспентала, М. Дж. Риналди. – М.: ГЭОТАР-Медиа, – 2013. – 448 с.
4. Диагностика и лечение микозов в отделениях реанимации и интенсивной терапии: Российские рекомендации /Отв. ред. Н.Н. Климко. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Фармтек, 2015. – 96 с.
5. Дорожкова И.Р. Методы комплексной лабораторной диагностики воспалительных и аллергических грибковых поражений легких. Пособие для врачей. – М., 1997. – 17 с.
6. Климко Н.Н. Микозы легких. Пособие для врачей. – М.: Премьер МТ, – 2005. – 96 с.
7. Климко Н.Н. Микозы: диагностика и лечение. Руководство для врачей. 2-е изд. перераб. и доп. – М.: Ви Джи Групп, 2008. – 336 с.
8. Климко Н.Н. Васильева Н.В. Микозы легких. // В кн.: Пульмонология: Национальное руководство. Под ред. А. Г. Чучалина. – М.: ГЭОТАР-Media, – 2016. – с. 236–249.
9. Клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам». Версия-2018-03. – Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии. – М., – 2018. – 206 с.
10. Кулько А. Б. Атлас условно-патогенных грибов рода *Aspergillus* – возбудителей бронхолегочных инфекций. – М.: МНПЦБТ., – 2012. – 160 с.
11. 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.
12. Кулько А.Б., Дорожкова И.Р. Лабораторная диагностика бронхолегочных микозов у больных туберкулезом // Методические рекомендации №9 Департамента здравоохранения правительства Москвы – М., 2007. – 28 с.
13. Кулько А.Б., Федорова Н.И., Жерносенко А.О. Критерии интерпретации результатов лабораторных исследований при диагностике оппортунистических бронхолегочных микозов различной этиологии // Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова. – 2017. – Т. 12. – № 2. – С. 117-120.
14. Озерская С.М., Иванушкина Н.Е., Кочкина Г.А. Микроскопические грибы в связи с проблемами биологической безопасности (обзор). // Проблемы медицинской микологии. – 2011. – Т. 13. – №3. – С. 3-12.
15. Санитарно-эпидемиологические правила. СП 1.3.1318-03. Порядок выдачи санитарно-эпидемиологического заключения о возможности проведения работ с возбудителями инфекционных заболеваний человека I-IV групп патогенности (опасности), генно-инженерно-модифицированными микроорганизмами, ядами биологического происхождения и гельминтами. – Минздрав России – 2003. – 39 с.

16. Санитарно-эпидемиологические правила. СП 1.3.2322-08. Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. – М.: Госкомсанэпиднадзор РФ, 2008. – 57 с.
17. Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М. (Sutton D., Fothergill A., Rinaldi M.) Определитель патогенных и условно-патогенных грибов: Пер. с англ. – М.: Мир, 2001. – 468 с.
18. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Кандидоз: природа инфекции, механизмы агрессии и защиты, диагностика и лечение. – М.: Триада-Х, 2001. – 472 с.
19. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Грибковые инфекции. Руководство для врачей. – 2-е Изд. – М.: Бином, 2008. – 480 с.
20. Ascioğlu S., Rex J.H., de Pauw B. et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hemato-poietic stem cell transplants: an international consensus// Clin. Infect. Dis, 2002, Vol. 34, P.7–14.
21. 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.
22. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard – Third edition. CLSI document M27-A3, 2008, 25 p.
23. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Third Informa-tional Supplement. CLSI document M27-S3. CLSI: Wayne, PA., 2008.
24. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth Informa-tional Supplement. CLSI document M27-S4. CLSI: Wayne, PA., 2010, 29 p.
25. De Pauw B., Walsh T.J., Donnelly J.P. et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Insti-tute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. // Clin. Infect. Dis. – 2008, Vol. 46(12). – P. 1813-1821.
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. EUCAST Definitive Document E.DEF 9.3. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for co-nidia forming moulds, 2015, 23 p.
28. EUCAST Definitive Document EDEF 7.3.1. Method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts, 2017, 21 p.
29. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antifungal Agents Breakpoint tables for interpretation of MICs. Version 9.0, valid from 2018-02-12, 2018.
30. Hoog de G.S., Guarro J., Gene J., Figueras M.J. Atlas of clinical fungi. Electronic Version 3.1 – CBS: Reus, 2011.
31. Pappas P.G., Kauffman C.A., Andes D.R. et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. // Clin Infect Dis. 2016, Vol. 62(4) e1-50, Epub 2015 Dec 16.

32. 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.

33. Perfect J.R., Dismukes W.E., Dromer F. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of America. // *Clin Infect Dis*, 2010, Vol. 50(3), P. 291-322.