

На правах рукописи

Кулько Александр Борисович

**БРОНХОЛЕГОЧНЫЕ МИКОЗЫ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ:
СОСТАВ И СВОЙСТВА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ, ЛАБОРАТОРНАЯ
ДИАГНОСТИКА**

03.02.03 – микробиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва – 2020

Работа выполнена в Государственном бюджетном учреждении здравоохранения города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы» (ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ»)

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, профессор
доктор биологических наук

Митрохин Сергей Дмитриевич
Сафонова Светлана Григорьевна

Официальные оппоненты:

Сергеев Алексей Юрьевич – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), кафедра клинической иммунологии и аллергологии, профессор

Багирова Наталия Сергеевна – доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, микробиологическая лаборатория, старший научный сотрудник

Арзумян Вера Георгиевна – доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», лаборатория физиологии грибов и бактерий, заведующий

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «__» _____ 2020 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10, <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Борисова Ольга Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Оппортунистические (вторичные) пневмомикозы (аспергиллез, кандидоз, криптококкоз, мукормикоз, гиалогифомикозы, феогифомикозы) и диссеминированные микозы с поражением легких становятся все более частыми осложнениями тяжелых хронических заболеваний: злокачественных новообразований, заболеваний системы крови, болезни, вызванной вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), туберкулеза и др. (Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В., 2008; Garbee D.D. et al., 2017). С ростом числа пациентов с иммунодефицитом и больных, предрасположенных к развитию глубоких микозов, условно-патогенные (оппортунистические) грибы стали одними из основных и опасных возбудителей внутрибольничных инфекций (Клясова Г.А., 2007; Pfaller M.A., Diekema D.J., 2010; Бурова С.А., 2014; Pegorie M., et al., 2017).

Список возбудителей микозов человека постоянно увеличивается за счет описания новых дрожжевых и мицелиальных (плесневых) грибов-оппортунистов – микромицеты, распространенные во внешней среде, которые способны сохраняться в организме человека (Марфенина О.Е, 2005; Чернов И.Ю., 2013); расширяется состав дрожжевых грибов, а также светлоокрашенных (гиалогифомицеты) и темноокрашенных (феогифомицеты) плесневых грибов – возбудителей глубоких инфекций, которые трудно диагностируются и поддаются лечению. В настоящий момент группа болезнетворных первично-патогенных и условно-патогенных грибов включает уже более 500 видов из отделов *Zygomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota* (Boekhout T. et al., 2009; Атлас грибковых заболеваний, 2010; Hoog de G. et al., 2011).

Поражения микромицетами бронхов, легких и плевры относятся к вероятным инфекционным осложнениям туберкулеза, что обусловлено наличием тяжелого первичного заболевания легких и рядом предрасполагающих факторов: формированием полостных изменений и бронхоэктазов в легких; иммуносупрессивными состояниями, включая случаи туберкулеза, сочетанного с ВИЧ-инфекцией; длительным применением нескольких антибактериальных препаратов широкого спектра действия; наличием колонизации нижних дыхательных путей условно-патогенными грибами; проведением инвазивных процедур (Рунке М., 2000). С проблемой глобального распространения туберкулеза неразрывно связана эпидемиология хронического аспергиллеза легких (ХАЛ) – аспергиллемы легких и других форм заболевания (Denning D.W. et al., 2011).

С учетом неспецифичности клинических и радиологических признаков пневмомикозов, определяющее значение в диагностике микозов бронхов и легких имеют данные микробиологических и иммунологических исследований, позволяющие установить и доказать этиологию поражения и дать рекомендации для разработки адекватной лекарственной терапии на основании свойств возбудителя (Дорожкова И.Р. 1997; Аравийский Р.А. и др., 2004). В последние годы изменились представления об этиологии и клинических формах глубоких оппортунистических микозов, усовершенствованы лабораторные методы диагностики инвазивных микозов и хронических форм аспергиллеза легких и повышена их достоверность, разработаны новые препараты с различным спектром действия (Brown G.D. et al., 2012; Митрофанов В.С., Свирщевская Е.В., 2013; Patterson T.F. et al., 2016). Учитывая вышесказанное, очевидна актуальность проблемы внедрения в работу противотуберкулезных учреждений адекватной лабораторной диагностики пневмомикозов на основе методических подходов, разработанных

специализированными научными центрами, с использованием стандартизированных и адаптированных для практических исследований методов.

Степень разработанности темы исследования

Работы по разработке подходов к лабораторной диагностике пневмомикозов у пациентов противотуберкулезных учреждений были проведены в 70–90-х гг. И.Р. Дорожкой и Е.П. Бахаровой (Бахарова Е.П., 1978; Дорожка И.Р., 1997), аспергиллеза – В.М. Лещенко (Лещенко В.М., 1973). В новом столетии развитие методологии научно-практических исследований при диагностике пневмомикозов во многом определяет научная и организационно-методическая деятельность Общероссийской общественной научной организации «Национальная академия микологии»; опубликованы монографии и руководства отечественных микологов из различных специализированных медицинских центров: Буровой С.А., Васильевой Н.В., Елинова Н.П., Клясовой Г.А., Липницкого А.В., Сергеева А.Ю., Сергеева Ю.В. и других специалистов (Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В., 2001; Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В., 2008; Климко Н.Н., 2008; Елинов Н.П. и др., 2010; Митрофанов В.С., Свирщевская Е.В., 2013). Многие основные работы зарубежных авторов были переведены на русский язык (Саттон Д. и др., 2001; Масчан А.А. и др., 2008; Атлас грибковых заболеваний, 2010; Диагностика и лечение микозов, 2013).

В тоже время актуальными остаются вопросы этиологии пневмомикозов, проведения и стандартизации лабораторной диагностики микозов в противотуберкулезных учреждениях, характеристики уровней чувствительности к антимикотикам у большинства возбудителей глубоких микозов. Применяемые сегодня во фтизиатрической практике лабораторные методы не соответствуют современным требованиям, не позволяют выявлять и достоверно идентифицировать возбудителей микозов легких и диссеминированных инфекций и нуждаются в стандартизации и усовершенствовании. К неопределенности в интерпретации результатов исследований приводит отсутствие единых диагностических подходов и критериев лабораторной диагностики пневмомикозов, в том числе у больных туберкулезом.

Цель исследования: изучение состава и свойств возбудителей, совершенствование лабораторной диагностики оппортунистических микозов бронхов и легких у больных туберкулезом органов дыхания.

Задачи исследования:

1. Определить спектр видового состава и таксономическую принадлежность условно-патогенных грибов, вероятных возбудителей вторичных бронхолегочных микозов у больных туберкулезом органов дыхания.
2. Исследовать чувствительность *in vitro* к антимикотикам дрожжевых видов грибов и плесневых грибов рода *Aspergillus*, выделенных при диагностике вторичных пневмомикозов, для оценки активности современных препаратов в отношении различных возбудителей микотических инфекций.
3. Оценить возможности использования общепринятых лабораторных методов исследования при диагностике и дифференциальной диагностике бронхолегочных микозов у больных туберкулезом органов дыхания.
4. Разработать комплекс эффективных методов лабораторной диагностики пневмомикозов у больных туберкулезом органов дыхания, адаптированный для рутинных диагностических и мониторинговых исследований во фтизиатрической клинике.

- 5 Обосновать критерии интерпретации результатов лабораторных исследований при диагностике бронхолегочных микозов у больных туберкулезом органов дыхания.
- 6 Провести мониторинг присутствия видов условно-патогенных грибов в воздухе противотуберкулезного стационара в сопоставлении с видовым составом грибов, выделенных из биоматериала на пневмомикоз.

Научная новизна

Впервые на основе систематизированных многолетних данных микологических исследований определен и охарактеризован видовой состав оппортунистических грибов, колонизирующих нижние отделы дыхательных путей и способных вызывать поражения бронхов, легких и плевры у больных туберкулезом. Выявлен состав мицелиальных и дрожжевых видов грибов, развивающихся в сформировавшихся полостных образованиях в легких и плевральных полостях у больных туберкулезом.

Получены данные о наличии генетической гетерогенности у редко встречаемого возбудителя аспергиллеза *Aspergillus sydowii* по участкам ITS1-5.8S-ITS2, D1/D2 28S рибосомальной ДНК (рДНК); сравнительное молекулярно-морфологическое исследование выделенных от больных туберкулезом клинических штаммов *A. sydowii* показало их отличие на генотипическом и фенотипическом уровнях.

Впервые определены уровни чувствительности к антимикотикам из различных групп лекарственных средств (полиены, азолы, эхинокандины, флюоропиримидины) с определением значений минимально подавляющих концентраций у широкого ряда видов грибов рода *Aspergillus* (12 видов), выделенных от больных туберкулезом.

Получены новые сведения об уровнях активности современных лекарственных препаратов в отношении клинических штаммов 34 видов болезнетворных грибов из 8 родов, включая основных возбудителей глубоких микозов человека с поражением легких. Определена и проанализирована активность современных антимикотиков для системного применения (флуконазол, итраконазол, вориконазол, позаконазол, кетоконазол (препараты группы азолов), анидулафунгин, каспофунгин, микафунгин (препараты группы эхинокандинов), амфотерицин В, флуцитозин) в отношении клинических штаммов грибов родов *Aspergillus* (12 видов), *Candida* (14 видов), *Cryptococcus* (2 вида), *Geotrichum* (1 вид), *Hanseniaspora* (1 вид), *Rhodotorula* (2 вида), *Saccharomyces* (1 вид), *Saprochaete* (1 вид).

По результатам тестирования чувствительности *in vitro* установлена и охарактеризована группа вероятных возбудителей аспергиллеза, кандидоза, криптококкоза и других дрожжевых микозов, обладающих вариативной или сниженной чувствительностью к отдельным широко применяемым в терапии антимикотикам.

Доказана необходимость стандартизации этапов комплексной лабораторной диагностики аспергиллеза, кандидоза, криптококкоза, редких оппортунистических пневмомикозов (зигомикоз (мукормикоз), гиалогифомикоз, феогифомикоз, дрожжевые инфекции) у больных туберкулезом, находящихся на обследовании или лечении в противотуберкулезных учреждениях.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость работы для микробиологии и микологии состоит в установлении уровней природной чувствительности основных и редких возбудителей аспергиллеза, кандидоза, криптококкоза и редких возбудителей дрожжевых микозов к современным системным лекарственным препаратам и группам антимикотиков с разными молекулярными механизмами действия на клетки грибов. Результаты

скринингового исследования способности к росту *in vitro* при 37°C и 35°C у 4730 клинических штаммов 67 условно-патогенных видов грибов из отделов *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota* существенно дополняют современные представления о термотолерантности как факторе патогенности (вирулентности) возбудителей оппортунистических пневмомикозов и уточняют описания свойств видов и групп грибов-оппортунистов.

Полученные при молекулярных исследованиях клинических штаммов *Aspergillus sydowii* нуклеотидные последовательности участков рДНК (ITS1, ITS2, D1/D2 28S, 5.8S) дополнили базы генетических данных GenBank/EMBL/DDJB, используемые для сбора информации о геноме и идентификации различных видов грибов рода *Aspergillus*.

Определены, научно обоснованы и внедрены во фтизиатрическую практику усовершенствованные методологические подходы к лабораторной диагностике пневмомикозов у больных туберкулезом, что позволило доказать эффективность использования комплекса клинически значимых культуральных, микроскопических и иммунологических методов, стандартизованных алгоритмов микробиологической диагностики плесневых и дрожжевых пневмомикозов, унифицированных критериев интерпретации получаемых данных.

Адаптированные для рутинных исследований алгоритмы лабораторной диагностики пневмомикозов изложены в методических рекомендациях Департамента здравоохранения города Москвы «Лабораторная диагностика бронхолегочных микозов у больных туберкулезом» (№9 от 2007 г. – утверждены 07.05.2007 г.), «Лабораторная диагностика легочных микозов во фтизиатрической клинике» (№24 от 2019 г. – утверждены 17.04.2019 г.). По результатам клинико-лабораторных исследований разработаны методические рекомендации Департамента здравоохранения города Москвы «Лечение итраконазолом в суспензии патологической колонизации грибами дыхательных путей у больных туберкулезом легких» (№8 от 2007 г. – утверждены 10.04.2007 г.).

Опубликован уникальный отечественный иллюстрированный «Атлас условно-патогенных грибов рода *Aspergillus* – возбудителей бронхолегочных инфекций» (2012), который включает описания 14 видов клинически значимых *Aspergillus* spp., их основные характеристики и свойства, микрофотографии и фотографии колоний клинических штаммов, разработанную полную схему описания грибов рода *Aspergillus*. Данный атлас предназначен для практической работы при видовой идентификации возбудителя аспергиллеза, а также может быть использован как справочное пособие по болезнетворным грибам рода *Aspergillus*.

Предложенная схема комплексной лабораторной диагностики бронхолегочных микозов позволяет врачам-фтизиатрам получать достоверные результаты, необходимые для подтверждения или исключения наличия у больных туберкулезом вероятного пневмомикоза и контроля лечения.

Разработаны и обоснованы необходимые для проведения диагностических исследований критерии интерпретации результатов лабораторного исследования на пневмомикоз у больных туберкулезом органов дыхания с выделением групп признаков: диагностически значимые результаты, подтверждающие диагноз бронхолегочного микоза; признаки «вероятного» бронхолегочного микоза; критерии колонизации нижних дыхательных путей различными оппортунистическими микромицетами – дрожжевыми грибами *Candida* spp., дрожжевыми грибами, не относящимися к роду *Candida*, условно-патогенными плесневыми грибами.

Результаты исследования активности антимикотиков в отношении ряда дрожжевых и плесневых грибов имеют клиническое значение и могут быть использованы при выборе препаратов для адекватного лечения пневмомикозов. Представлены и обоснованы рекомендации по целесообразности проведения тестирования чувствительности *in vitro* к широко применяемым в терапии глубоких микозов антимикотикам у возбудителей аспергиллеза, кандидоза, криптококкоза и редких дрожжевых инфекций, в зависимости от установленного уровня их исходной чувствительности к препаратам.

Разработана для практического применения схема разделения возбудителей пневмомикозов на группы, позволяющая быстро дифференцировать группы возбудителей с разными уровнями чувствительности к антимикотикам и упрощающая ход идентификации; схема основана на использовании для распознавания штаммов грибов простых морфологических признаков и стандартных биохимических тестов.

Предложена и успешно апробирована модифицированная методика приготовления споровой суспензии грибов рода *Aspergillus*, повышающая достоверность получаемых результатов и безопасность проведения тестирования чувствительности мицелиальных грибов к антимикотикам.

Создана коллекция культур микромицетов, выделенных из респираторного и хирургического биоматериалов, крови и спинномозговой жидкости (СМЖ) с целью дальнейшего изучения их свойств, которая насчитывает 160 штаммов дрожжевых грибов, относящихся к 23 видам из 8 родов и 105 штаммов мицелиальных грибов, относящихся к 44 видам из 16 родов.

На клинических штаммах дрожжевых (родов *Candida*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*) и мицелиальных (родов *Aspergillus*, *Curvularia*) грибов, с низкой чувствительностью к отдельным широко применяемым препаратам, проведено исследование антифунгальной активности новых природных антибиотиков различных химических классов, разрабатываемых в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе». Для дальнейшей оценки перспективности соединений в качестве новых антимикотиков отобраны наиболее активные природные соединения из нафтохиноновых макролидов: астолиды 18/11 А и В (выделены из *Streptomyces hygroscopicus*) и антимикробных пептидов: полипептиды – тионины NsW1, NsW2, NsW4 (из семян черного тмина), пептаиболы №28, №29, №30, №32 (из *Trichoderma citrinoviride* ВКПМ F-1228), пептаибол А 118 11/37 (из *Emericellopsis alkalina* ВКПМ F-1428).

Результаты исследований внедрены и используются в работе Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы»: в Централизованной бактериологической лаборатории, терапевтических и хирургических отделениях, Городском клинико-диагностическом центре (акт внедрения от 24.10.2019 г.).

Материалы диссертации используются в педагогическом процессе: в программе дополнительного профессионального образования повышения квалификации для врачей на базе Негосударственного образовательного частного учреждения дополнительного профессионального образования «Высшая медицинская школа» (Москва) – разработан учебно-методический материал, подготовлена и прочитана видеолекция (<https://youtu.be/V8T9USG3Bn4>); в лекционных курсах по

почвенной микологии, читаемых на факультете Почвоведения Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (акт внедрения от 18.10.2019 г.).

Методология и методы исследования

Методология работы спланирована соответственно поставленной цели. Предметом исследования стали состав и свойства условно-патогенных грибов, развивающихся в дыхательных путях у больных туберкулезом, совершенствование лабораторной диагностики оппортунистических пневмомикозов. Объектами исследования являлись биологический материал (мокрота; материалы, полученные при фибробронхоскопии (ФБС) – жидкость бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ), бронхиальный секрет, бронхиальный смыв; материалы из полостных образований легких и плевральных полостей; отделяемое из зева; кровь; СМЖ) и штаммы грибов, полученные от больных туберкулезом. Анализ научной литературы, посвященный проблеме, проведен на основе формально-логических методов исследования. В работе использованы микроскопические, современные и классические культуральные, иммунологические (серологический), молекулярно-генетические и статистические методы исследования. Все исследования были одобрены локальным этическим комитетом ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ» (выписка из протокола заседания от 10.12.2013 г.).

Объекты исследования

В период с 2002 по 2017 гг. были получены и проанализированы результаты микробиологических и иммунологических исследований биоматериалов от больных туберкулезом с подозрением на пневмомикоз, которые находились на лечении и наблюдались в ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ». Всего было обследовано 7683 пациента с различными формами туберкулеза, включая 61 больного с сопутствующей ВИЧ-инфекцией.

При определении спектра возбудителей бронхолегочных микозов у больных туберкулезом проведены микробиологические исследования (прямая микроскопия, посев) 10414 образцов мокроты, 3725 образцов содержимого бронхов (ФБС), 17 образцов биоптатов бронхов, 613 образцов резецированных участков легкого и содержимого полостных образований легких, 535 образцов содержимого плевральных полостей; культуральные исследования 109 образцов отделяемого из зева, 92 образцов крови; иммунологические исследования 318 образцов сыворотки крови (тесты на обнаружение антигенов грибов *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* и антител к грибам *Aspergillus*, *Candida*).

После исключения повторов идентификаций в исследование были включены 3540 штаммов дрожжевых грибов *Ascomycota*, 54 штамма дрожжевых грибов *Basidiomycota*, 27 штаммов мицелиальных грибов *Zygomycota* и 1109 штаммов мицелиальных грибов *Ascomycota*, выделенных из посевов образцов респираторных, хирургических материалов, крови, СМЖ (7 штаммов грибов, выделенных при рутинных бактериологических исследованиях СМЖ). В работе использовано 9 типовых коллекционных штаммов, полученных из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) (Россия): *Aspergillus flavipes* (ВКМ F-739, ВКМ F-2990, ВКМ F-4308), *A. sydowii* (ВКМ F-441, ВКМ F-968, ВКМ F-2488), *A. terreus* ВКМ F-2269; коллекций National Center for Agricultural Utilization Research, Agricultural Research Service Culture Collection, USDA Peoria (NRRL) (США): *A. sydowii* NRRL 254Т и American Type Culture Collection (ATCC) (США): *Candida albicans* ATCC 2091.

У 67 обнаруженных видов оппортунистических грибов были исследованы температурные границы роста (30, 35 и 37°C); у 34 видов грибов из родов *Aspergillus*

(12 видов; 243 штамма), *Candida* (14 видов; 330 штаммов), *Cryptococcus* (2 вида; 15 штаммов), *Geotrichum* (1 вид; 14 штаммов), *Hanseniaspora* (1 вид; 1 штамм), *Rhodotorula* (2 вида; 16 штаммов), *Saccharomyces* (1 вид; 10 штаммов), *Saprochaete* (1 вид; 2 штамма) изучена чувствительность к 10 современным лекарственным препаратам тест-системой «Sensititre» (TREK Diagnostic Systems, США).

При изучении молекулярно-генетических свойств *Aspergillus sydowii* методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенирования ДНК объектами исследования были 3 клинических штамма, выделенные из БАЛ в ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ» (2 штамма) и Государственном учреждении Гематологический научный центр РАМН (ГНЦ РАМН) (1 штамм); 4 референтных штамма, полученные из коллекций ВКМ (3 природных штамма) и NRRL (1 типовой штамм).

Микробиологические методы исследования

Методики микроскопического исследования биоматериала. Для обнаружения элементов грибов в биоматериале применяли ряд стандартных методик приготовления окрашенных и нативных препаратов (Аравийский Р.А. и др., 2004; Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В., 2008). Препараты из образцов мокроты (без центрифугирования) и материалов, полученных при ФБС (осадок после центрифугирования пробы) окрашивали по Граму и при необходимости по Романовскому – Гимзе. Препараты из аспиратов и экссудатов из легочных и плевральных полостей готовили из осадка, неокрашенными и с окраской по Граму. Препараты из плотного биопсийного и резекционного материала готовили с добавлением 10% раствора КОН: с обработкой флюорохромным красителем калькофлюором белым с использованием набора BactiDrop Calcofluor White (Remel, США) (люминесцентная микроскопия) или неокрашенными. При микроскопии отмечали среднее количество элементов грибов в поле зрения препарата в категориях «единичные клетки/структуры», «умеренно», «значительно», «обильно» и морфологию и размеры вегетативных и репродуктивных структур.

Методики культурального исследования. Культуральные исследования диагностического материала проводили согласно методическим рекомендациям №9 Департамента здравоохранения города Москвы от 2007 г., разработанным в ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ», которые в дальнейшем были актуализированы.

Для посева биоматериала были использованы среды: агар Сабуро с хлорамфениколом (Bio-Rad, Франция); селективные хромогенные среды («CandiSelect 4» (Bio-Rad, Франция) или «Brilliance Candida Agar» (Oxoid, Великобритания)); жидкая среда Сабуро; картофельно-декстрозный агар (Bio-Rad, Франция).

Посев мокроты и материала, полученного при ФБС, проводили количественным методом на агар Сабуро с хлорамфениколом и хромагар (парные посева дозированного объема материала и контрольная чашка); посевы инкубировали при 30°C и 37°C.

Посев плотного хирургического материала (биоптаты легочной ткани и резецированных участков легкого), жидкого хирургического материала (аспираты, экссудаты из легочных и плевральных полостей) и мазков (отделяемое со слизистых оболочек зева, содержимое плевральных полостей) проводили на агар Сабуро с хлорамфениколом и бульон Сабуро; при необходимости в набор питательных сред добавляли картофельно-декстрозный агар. Посевы инкубировали при 30°C.

Образцы крови засевали в коммерческие флаконы BACTEC Myco/F-Lytic (Becton Dickinson, США) и инкубировали в автоматическом анализаторе Bactec 9050

(Becton Dickinson, США). Содержимое флаконов после выявления роста окрашивали по Граму и пересевали на агар Сабуро. Другая используемая методика включала первичный посев крови во флаконы двухфазной системы «HiCombi» (HIMEDIA, Индия), инкубацию при 37°C в течение 10 суток и высев на агар Сабуро при выявлении признаков роста.

Исследования СМЖ проводили по соответствующей микробиологической методике, которая включала центрифугирование образца, микроскопию осадка, посев на стандартные дифференциально-диагностические бактериологические среды, включая агар Сабуро. Посевы инкубировали при 37°C (как в обычной атмосфере, так и при повышенной концентрации CO₂) и 28°C в течение 10 дней; при отсутствии роста делали высев из среды накопления на плотные питательные среды.

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

Методики видовой идентификации дрожжевых грибов. Для видовой идентификации дрожжевых культур использовали комбинацию современных и классических общепринятых методик:

- Хромогенные среды «CandiSelect 4» (Bio-Rad, Франция), «Brilliance Candida Agar» (Oxoid, Великобритания), «chromID Candida» (BioMerieux, Франция), «BBL CHROMagar Candida Medium» (Becton Dickinson, США) – для визуальной идентификации распространенных в медицинской практике *Candida* spp. по специфическому окрашиванию колоний (ферментативная активность) и макроморфологии;
- Миниатюризированные ручные тест-системы «ELIchrom FUNGI» (ELITech MICROBIO, Франция), «Auxacolor 2» (Bio-Rad, Франция) – для идентификации клинически значимых дрожжевых грибов по ауксонограмме, ферментативной активности и дополнительным тестам;
- Тесты быстрой идентификации возбудителей кандидоза – «ELITex Bicolor dubliniensis» (ELITech MICROBIO, Франция) (*C. dubliniensis*; тест латекс-агглютинации (ПАЛ)), «ELIchrom glabrata» (ELITech MICROBIO, Франция) (*C. glabrata*; трегалозный тест), «ELITex krusei» (ELITech MICROBIO, Франция) (*C. krusei*; тест ПАЛ);
- Макроморфологические признаки на среде агар Сабуро – признаки колоний: цвет поверхности и синтез каротиноидов, консистенцию и характер роста, характер поверхности, край колонии, наличие мицелиальных структур;
- Микроморфологические признаки на среде агар Сабуро и хромогенных средах (во влажных неокрашенных препаратах, в тушевых препаратах) – форма и размер дрожжевых клеток, клеточных структур (образование почек, псевдо- и мицелиальных структур), наличие артростор (признак *Geotrichum*, *Saprochaete*, *Trichosporon*) и капсулы (признак *Cryptococcus* – тушевые препараты);
- Тесты на толерантность к повышенной температуре – способность к росту при 37°C и 45°C (при необходимости);
- Тест на способность к ассимиляции нитратов (при необходимости) – способность к росту на среде с KNO₃ в качестве единственного источника азота (Максимова И.А., Чернов И.Ю., 2006).

Методики видовой идентификации мицелиальных грибов. Видовую идентификацию плесневых культур проводили с помощью специальных атласов-определителей (Саттон Д. и др., 2001; Hoog de G. et al., 2011) по общепринятым

морфологическим и физиологическим признакам (идентификационные среды: агар Чапека–Докса (HIMEDIA, Индия) и картофельно-декстрозный агар (Bio-Rad, Франция), а также, при необходимости, солодовый агар (HIMEDIA, Индия) или овсяный агар (HIMEDIA, Индия)):

- Микроморфологические признаки (во влажных неокрашенных препаратах) – морфология бесполой стадии гриба, морфология вегетативных структур (гифы мицелия, хламидоспоры, склеротии и др.), морфология половой стадии, в случае образования *in vitro*;
- Макроморфологические признаки роста на агаре Чапека–Докса и картофельно-декстрозном агаре – признаки колоний: цвет поверхности, окраска реверзума, структура, характер и зональность поверхности, наличие и окраска экссудата и пигмента, скорость и характер роста;
- Тесты на толерантность к повышенной температуре – способность к росту при 37°C.

Методики определения лекарственной чувствительности дрожжевых грибов. Тестирование чувствительности штаммов дрожжевых грибов к антимикотикам проводили стандартизованным методом микроразведений в бульоне со средой RPMI 1640 с определением минимально подавляющих концентраций (МПК) в мкг/мл. Были использованы модификации метода с колориметрической оценкой результатов на основе стандартов организации Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): тест-системы «Sensititre» (TREK Diagnostic Systems, США) (тест «YeastOne» – амфотерицин В, флуцитозин, флуконазол, итраконазол, вориконазол, позаконазол, кетоконазол, анидулафунгин, каспофунгин, микафунгин); «FUNGIFAST AFG» (ELITech MICROBIO, Франция) (амфотерицин В, флуцитозин, флуконазол, итраконазол, вориконазол); «Fungitest» (Bio-Rad, Франция) (амфотерицин В, флуцитозин, флуконазол, итраконазол, кетоконазол, миконазол). Клиническую интерпретацию значений МПК препаратов («Sensititre») проводили по критериям CLSI (CLSI document M27-S3, 2008; CLSI document M27-S4, 2010).

Методика определения лекарственной чувствительности мицелиальных грибов рода *Aspergillus*. Тестирование чувствительности грибов рода *Aspergillus* к антимикотикам проводили методом микроразведений в бульоне со средой RPMI 1640 с определением МПК в мкг/мл системой «Sensititre» (TREK Diagnostic Systems, США), соответствующей стандарту тестирования чувствительности мицелиальных грибов CLSI. В работе была использована модифицированная нами методика приготовления споровой суспензии грибов *Aspergillus* spp., повышающая достоверность получаемых результатов и безопасность проведения тестирования. Интерпретацию значений МПК антимикотиков проводили по рекомендациям CLSI (CLSI document M38-A2, 2008) и критериям организации European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (EUCAST Antifungal Agents Breakpoint tables for interpretation of MICs. Version 9.0, 2018).

Контроль качества осуществляли с использованием штаммов из коллекции ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ»: *Candida krusei* 1447м16, *C. parapsilosis* 1986м16, *Aspergillus flavus* 905м16, *A. fumigatus* 163м16 и контрольных штаммов: *A. terreus* ВКМ F-2269 (коллекция ВКМ), *C. albicans* ATCC 2091 (коллекция ATCC).

Иммунологические методы исследования

В работе использованы стандартизованные иммунологические методики диагностики микозов: обнаружение в сыворотке антигенов *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus neoformans* методом РАЛ с помощью тестов «Pastorex *Aspergillus*»,

«Pastorex Candida», «Pastorex Crypto Plus» (Bio-Rad, Франция); количественное определение в сыворотке антител против *A. fumigatus*, *C. albicans* методом непрямой гемагглютинации с помощью тест-систем ELI.H.A *Aspergillus*, ELI.H.A *Candida* (ELITech MICROBIO, Франция) (обнаружение от 1/80 до 1/5120).

Молекулярно-генетические методы исследования

Характеристику молекулярно-генетических свойств штаммов *Aspergillus sydowii* проводили по локусам внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS) ITS1 и ITS2, 5.8S, D1/D2 локусам 28S рДНК. Выделение ДНК, ПЦР-анализ, секвенирование выполняли по описанной стандартной процедуре, на базе ГНЦ РАМН (Фомичева Г.М. и др., 2006). Для выделения ДНК использовали пятидневные культуры (жидкая среда Чапека). ПЦР проводили с праймерами ITS1F, NL4; секвенирование – с праймерами ITS1F, ITS3, ITS4, NL4. Молекулярно-филогенетический анализ данных проводили с использованием программ Chromas 2.3 (анализ последовательностей, сборка общих контигов), ClustalX 1.83 (кладиристический анализ методом Neighbor-Joining, бутстреп-анализ), TreeView 1.6.6 (визуализация кладограммы; для внешней группы при ее построении брали фрагменты рДНК штамма *Emericella nidulans* из GenBank с кодом доступа AJ937756.1). Сравнение последовательностей с базами данных GenBank/EMBL/DDJB выполняли по алгоритму BLAST.

Методика исследования состава микромицетов в воздухе противотуберкулезного стационара

Определение состава микромицетов в воздухе лечебного стационара ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ» проводили методом седиментации (экспонирование открытых чашек Петри со средой картофельно-декстрозный агар в течение 30 мин). Мониторинг распространения грибов в воздухе проводили в течение 2002-2016 гг. (20 серий исследований).

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Epi-info 7.1.4.0. Использован критерий χ^2 Пирсона и точный критерий Фишера для сопоставления частотных характеристик качественных показателей. Оценку значимости различных количественных показателей между независимыми выборками осуществляли с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни (для сравнения двух групп), непараметрического критерия Крускала-Уоллиса (для оценки различий в трех и более группах), t-критерия Стьюдента, а также рассчитывался 95% доверительный интервал (ДИ). Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Для оценки сходства структуры групп грибов в различных материалах по частоте обнаружения видов проведен кластерный анализ по методу одиночной связи (Методология и организация доказательных научно-медицинских исследований во фтизиатрии, 2017).

Личное участие автора в получении результатов

Участие автора заключалось в выборе темы диссертации, формулировке целей и задач, проведении микробиологических и иммунологических исследований, разработке алгоритмов, схем и интерпретации результатов лабораторной диагностики пневмомикозов, анализе полученных данных, написании диссертации, автореферата и основных печатных работ. Автором выполнен весь объем микологических исследований по видовой идентификации мицелиальных грибов и определению чувствительности к антимикотикам штаммов дрожжевых и мицелиальных грибов с помощью тест-системы «Sensititre». Диагностические лабораторные исследования выполнялись совместно с сотрудниками ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ»

д.м.н. Дорожкой И.Р., к.м.н. Исаевой Е.Л., Тарасенко Т.Л., Чеклецов Н.В. Статистическая обработка данных проведена совместно с сотрудником ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ» Чижиной А.О. Культивирование ряда микромицетов с изучением их свойств было проведено совместно с сотрудниками кафедры биологии почв МГУ им. М.В. Ломоносова д.б.н. Марфениной О.Е., к.б.н. Ивановой А.Е., к.б.н. Максимовой И.А., к.б.н. Фомичевой Г.М. Молекулярно-генетические исследования и филогенетический анализ данных проводились на базе ГНЦ РАМН под руководством сотрудника ГНЦ РАМН к.б.н. Василенко О.В. Исследования чувствительности грибов-оппортунистов к разрабатываемым в ФГБНУ НИИНА новым природным антибиотикам выполнялись совместно с сотрудниками ФГБНУ НИИНА д.б.н. Садыковой В.С., к.б.н. Кувариной А.Е.

Группы пациентов с подозрением на микоз были сформированы врачами лечебных подразделений ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ» д.м.н. Борисовым С.Е., к.м.н. Иванушкиной Т.Н., к.м.н. Кузьминым А.В., к.м.н. Воробьевым А.А., к.м.н. Древалем П.А., к.м.н. Дубровским А.В., к.м.н. Трусовым В.Н., Кузьминым Д.Е., к.м.н. Синецким М.В., к.м.н. Чистяковой Н.И.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Внедрение научно обоснованных алгоритмов лабораторной диагностики пневмомикозов во фтизиатрическую практику позволяет выявлять у пациентов микотические поражения различной этиологии при вторичных острых и хронических воспалительных заболеваниях бронхов и легких и получать данные, необходимые для подбора лекарственного препарата.
2. Группу грибов – вероятных возбудителей микозов бронхов и легких у больных туберкулезом отличает разнообразие видового состава и морфологических форм, а также широкая таксономическая принадлежность. Выявлено, что ряд оппортунистических дрожжевых и плесневых грибов из *Ascomycota*, *Basidiomycota* и *Zygomycota* колонизируют нижние отделы дыхательных путей у больных туберкулезом; различные по таксономии и морфологии возбудители развиваются также в сформировавшихся легочных и плевральных полостях.
3. Болезнетворные грибы родов *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saprochaete* обладают разными уровнями исходной чувствительности к отдельным современным лекарственным препаратам и группам антимикотиков; у ряда возбудителей аспергиллеза и дрожжевых микозов была установлена или подтверждена на клинических штаммах вариативная или сниженная чувствительность к отдельным широко применяемым для лечения препаратам.
4. Сочетание характерных видовых микроморфологических и макроскопических признаков позволяет достоверно дифференцировать различные возбудители аспергиллеза с помощью общепринятых и наиболее доступных морфологических методов идентификации, несмотря на имеющуюся вариабельность морфологии клинических штаммов у ряда оппортунистических видов рода *Aspergillus*.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

О достоверности результатов свидетельствует использование современных адекватных методологических подходов к лабораторной диагностике пневмомикозов, сертифицированных и стандартизованных микробиологических и иммунологических методов исследования, которые характеризуются высокой чувствительностью и специфичностью. Проведен достаточный объем исследований, что позволило корректно осуществить статистическую обработку полученных данных. Определение

чувствительности к лекарственным препаратам у широкого круга видов микроскопических грибов позволило получить данные, сопоставимые с данными научной литературы, что также свидетельствует о достоверности полученных результатов.

Диссертация выполнена в рамках комплексных тем научно-исследовательских работ научных программ Департамента здравоохранения города Москвы: «Совершенствование выявления, диагностики и лечения туберкулеза и микобактериозов, а также сопутствующих грибковых поражений у больных ВИЧ-инфекцией» (2014-2016 гг., номер государственной регистрации 01201457860); «Повышение эффективности диагностики, лечения и профилактики туберкулеза», подтема «Персонализированный подход к формированию терапии сопровождения и лечения сопутствующей патологии у больных туберкулезом» (2017-2019 гг., номер государственной регистрации АААА-А18-118022190079-8).

Диссертация апробирована на заседании Ученого совета ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ» (протокол № 10 от 20 декабря 2018 г.).

Материалы диссертации были доложены на VI научно-практической конференции по медицинской микологии (VI Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 2003); 2-м всероссийском конгрессе по медицинской микологии (Москва, 2004); VI Российской конференции «Современные проблемы антимикробной химиотерапии» (Москва, 2004); 3-м всероссийском конгрессе по медицинской микологии (Москва, 2005); 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Nice, France, 2006); 4-м всероссийском конгрессе по медицинской микологии (Москва, 2006); 5-м всероссийском конгрессе по медицинской микологии (Москва, 2007); 2-м Съезде микологов России (Москва, 2008); VIII Московской ассамблее «Здоровье столицы» (Москва, 2009); I Междисциплинарном микологическом форуме (Москва, 2009); 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Vienna, Austria, 2010); Межрегиональной научно-практической конференции лаборантов и микробиологов Приволжского федерального округа «Современные стандарты и технологии лабораторной диагностики, лечения и профилактики инфекционных болезней» (Нижний Новгород, 2012); III Межрегиональном совещании Национального общества детских гематологов и онкологов (Москва, 2012); 3-м Съезде микологов России (Москва, 2012); юбилейной конференции по медицинской микологии (к 100-летию З.Г. Степанищевой) (Москва, 2013); 6th Advances Against Aspergillosis conference (Madrid, Spain, 2014); школе практического врача «Современные технологии диагностики и терапии при муковисцидозе» (Москва, 2014); III Междисциплинарном микологическом форуме (Москва, 2015); III Ежегодной конференции московских фтизиатров «Профилактика заболеваний как основа для снижения смертности от туберкулеза в мегаполисе» (Москва, 2015); 4-м Съезде микологов России (Москва, 2017); X Межрегиональной научно-практической конференции «Современная лабораторная медицина: эффективность, доступность, качество» (Москва, 2017); конференции по медицинской микологии «Социально-значимые микозы» (Москва, 2019).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 73 печатные работы, из них 20 статей в рецензируемых изданиях, 11 – в других изданиях, 11 тезисов в рецензируемых изданиях, 23 – в других изданиях, 2 работы в сборниках научных трудов, 2 раздела в коллективных монографиях, 1 – авторская монография, аннотированная в научных изданиях, в том числе в рецензируемом, 3 – методические рекомендации.

Структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 374 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, шести глав собственных исследований и их обсуждений, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка использованных литературных источников и приложения. Работа иллюстрирована 61 таблицей, 70 рисунками (в том числе 60 с авторскими фотографиями) и включает 2 приложения. Список литературы включает 414 работ, из них 146 отечественных и 268 зарубежных источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Алгоритмы комплексной лабораторной диагностики микозов органов дыхания у больных туберкулезом легких и интерпретация результатов

Разработанные методологические подходы к организации лабораторной диагностики пневмомикозов во фтизиатрической практике включают:

- схему проведения комплексных диагностических исследований с использованием клинически значимых методов лабораторной диагностики (прямая микроскопия биоматериала, культуральное исследование, иммунологические методики на обнаружение антигенов грибов и антител к антигенам грибов в сыворотке крови);
- алгоритмы микробиологической диагностики пневмомикозов, обусловленных дрожжевыми и плесневыми грибами;
- критерии интерпретации данных, получаемых с помощью микробиологических и иммунологических методов исследования.

Комплекс методов позволяет проводить лабораторную диагностику оппортунистических пневмомикозов различной этиологии (аспергиллез, кандидоз, криптококкоз, зигомикоз, гиалогифомикоз, феогифомикоз, редкие дрожжевые микозы) и клинических форм (инвазивный микоз, микоз, локализованный в легочной полости, микотическое поражение плевры, колонизация нижних дыхательных путей) у пациентов противотуберкулезных учреждений, а также вести научно-исследовательскую работу в данной области медицинской микологии.

Схема проведения и организация лабораторной диагностики оппортунистических микозов бронхов и легких во фтизиатрической клинике

Схема обследований больных туберкулезом на пневмомикоз, методы лабораторной диагностики и характеристики биоматериалов приведены в таблице 1.

При диагностике пневмомикозов у больных туберкулезом проводят специальные микологические исследования (прямая микроскопия, посев) двух или более проб мокроты в динамике и пробы материала, полученного при ФБС. Данный формат лабораторного обследования пациентов позволяет наиболее достоверно выявлять признаки заболевания, состав дрожжевых и плесневых грибов, колонизирующих дыхательные пути, а также количественное содержание грибов в респираторном материале. Если процедуру ФБС у пациента не проводят, лабораторное обследование на пневмомикоз ограничивается менее специфичными, но более доступными исследованиями образцов мокроты. Дополнительным материалом является отделяемое из зева (посев).

У ряда больных туберкулезом проводят специальные микологические исследования (прямая микроскопия, посев) высокоспецифичных хирургических биоматериалов: образцов легочной ткани из очага поражения (диагностика инвазивных микозов; доступность биопсийного материала ограничена); материалов из полостных образований легких неясной этиологии (диагностика микотических

инфекций в легочной полости); материалов 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.

Таблица 1 – Схема лабораторной диагностики пневмомикозов у больных туберкулезом

Материал	Методы диагностики	Характеристика материала
<u>Мокрота</u> Исследование проводят в динамике: при подозрении на пневмомикоз отбирают две пробы – на 1 и 2 сутки, а при необходимости также на 3(4)	Прямая микроскопия Культуральное исследование (количественный метод)	Основной диагностический материал; наиболее доступный материал для повторных исследований при диагностике и контроле эффективности лечения пневмомикоза
<u>Содержимое бронхов</u> (материал, полученный при ФБС: БАЛ, бронхиальный секрет, бронхиальный смыв)	Прямая микроскопия Культуральное исследование (количественный метод)	Основной диагностический материал; высоко специфичен при диагностике различных форм бронхолегочного микоза
<u>Образцы легочной ткани</u> (биоптат из очагов поражения, резекционный материал)	Прямая микроскопия Культуральное исследование	Высокоспецифичный материал; верификация инвазивных форм микоза легких
<u>Содержимое полостных образований легких</u> (каверны, туберкулемы, кисты и др.: резекционный материал, биоптаты, аспираты, смывы)	Прямая микроскопия Культуральное исследование	Высокоспецифичный материал; верификация микоза, локализованного в легочной полости (аспергиллема, другие формы ХАЛ, или др.)
<u>Содержимое плевральных полостей</u> (полости эмпиемы и др.: аспираты, экссудаты, мазки)	Прямая микроскопия Культуральное исследование	Высокоспецифичный материал; диагностика заболеваний плевры
<u>Отделяемое из зева</u>	Культуральное исследование	Дополнительный материал
<u>Сыворотка крови</u>	Иммунологические исследования (стандартизованные коммерческие тесты): тесты на обнаружение антигенов <i>Aspergillus</i> , <i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i> ; тесты на количественное определение антител к <i>Aspergillus</i> , <i>Candida</i>	Исследования проводят при подозрении на: <u>инвазивный микоз</u> (<i>Aspergillus</i> , <i>Cryptococcus</i> антигенемия); <u>бронхолегочные аспергиллез</u> (<i>Aspergillus</i> антигенемия и/или антитела к антигенам <i>Aspergillus</i>), <u>криптококкоз</u> (<i>Cryptococcus</i> антигенемия), <u>кандидоз</u> (<i>Candida</i> антигенемия и/или антитела к антигенам <i>Candida</i>)
<u>Кровь</u>	Культуральное исследование	Исследование проводят при подозрении на фунгемию и/или диссеминированный микоз

Специальные иммунологические (серологические) методики целесообразно включать в схему исследований при проведении дифференциальной диагностики (положительные культуральные и/или клинические и рентгенологические данные): инвазивного микоза (детекция в сыворотке антигенов *Aspergillus* и/или *Cryptococcus*; методики выявления ранних признаков инвазивного аспергиллеза и криптококкоза),

аспергиллеза легких (детекция в сыворотке антигена *Aspergillus* и/или антител к антигенам *Aspergillus*), криптококкоза легких и ЦНС с поражением легких (детекция в сыворотке антигена *Cryptococcus*), кандидоза легких (детекция в сыворотке антигена *Candida* и/или антител к антигенам *Candida*).

Фунгемия является маркером инвазивного кандидоза и других микозов с поражением легких (криптококкоз, редкие дрожжевые микозы, фузариоз и др.), за исключением инвазивного аспергиллеза (Parras P.G. et al., 2016). Специальные исследования крови (посев) с использованием современных ручных или автоматических систем проводят у больных туберкулезом при подозрении на диссеминированный микоз с поражением легких и/или фунгемию.

Микологическая лаборатория во фтизиатрической клинике должна располагаться в изолированном помещении и быть оснащена: ламинарным шкафом второго класса биологической безопасности; отдельным изолированным боксом с ультрафиолетовым облучателем; современным многофункциональным микроскопом для обнаружения в материале возбудителя микоза (первичная микроскопия) и проведения идентификации культур грибов (вторичная микроскопия); отдельными термостатами, поддерживающими температуру культивирования в диапазоне от 30 до 45°C. Забор биоматериалов на пневмомикоз (Таблица 1) необходимо проводить с соблюдением асептики до начала антифунгальной терапии; количество доставляемого в лабораторию материала должно быть достаточным для проведения необходимых лабораторных исследований. Важное условие получения адекватных результатов микологического исследования – своевременная доставка биоматериала в лабораторию. Мокроту, материалы, полученные при ФБС, образцы легочной ткани, 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 часа.

Необходимым условием получения достоверных результатов при лабораторной диагностике пневмомикозов является использование специальных питательных сред (для первичного выделения грибов и последующей их идентификации) и оптимальных режимов инкубации биоматериала. Рекомендованные для применения наборы питательных сред и режимы инкубации биоматериалов, методики приготовления мазков для прямой микроскопии апробированы на практике.

Установлено, что использование для первичного посева содержимого бронхов и мокроты селективных хромогенных сред для визуальной идентификации ряда *Candida* spp. сокращает время идентификации возбудителей кандидоза и значительно упрощает выявление в посевах смешанных культур различных видов *Candida*, дрожжевых аскомицетовых грибов не из рода *Candida* и базидиомицетовых дрожжей, а также различных дрожжевых грибов в сочетании с мицелиальными грибами. Включение в набор питательных сред для посева образцов хирургического материала жидкой среды накопления (бульон Сабуро) существенно повышает высеваемость и позволяет обнаруживать возбудитель пневмомикоза даже при скудном содержании в материале, когда первичный рост гриба на агаризованных средах не отмечается.

Для выделения из посевов оппортунистических грибов следует использовать температурный режим 30°C (оптимален для роста большинства видов; позволяет выявлять в первичном посевах виды, не растущие *in vitro* при 35-37°C). Проведение парных посевов мокроты и содержимого бронхов при 30°C и 37°C необходимо для быстрой дифференциации грибов, способных и не способных к росту при 37°C, а также для обнаружения диморфизма возбудителя (дрожжевая – мицелиальная

формы). Посев респираторного материала проводят количественным методом для оценки содержания в образцах колониеобразующих единиц (КОЕ) грибов.

Использование при диагностике пневмомикозов набора стандартных методик приготовления окрашенных (окраска по Граму, по Романовскому – Гимзе, калькофлюором белым) и нативных препаратов позволяет достоверно выявлять и дифференцировать морфологические элементы дрожжевых и плесневых возбудителей в респираторном и хирургическом (плотном и жидком) материале. Обнаруживаемые при микроскопии биоматериалов на пневмомикоз элементы дрожжевых грибов: одиночные дрожжевые клетки без почек и почкующиеся дрожжевые клетки; нити псевдомицелия; гифы многоклеточного дрожжевого мицелия; комбинации дрожжевых клеток, псевдогиф и/или гиф; артроконидии и их комбинации с гифами мицелия. Обнаруживаемые элементы мицелиальных грибов: гифы плесневого мицелия с септами или без них; структуры конидиального спороношения (конидиеносцы, конидиальные головки *Aspergillus* spp. или другие структуры); одиночные конидии; элементы феоидных «черных дрожжей». При исследовании респираторных и хирургических материалов на пневмомикоз было установлено, что выявление характера элементов грибов в мазках биоматериалов, позволяет проводить обоснованную корреляцию данных микроскопии с результатами посевов при инфекциях, вызванных возбудителями кандидоза (разные виды), дрожжеподобными грибами с артроспорами (*Geotrichum candidum*, *Saprochaete capitata*), возбудителями аспергиллеза (разные виды), темноокрашенными грибами из группы «черных дрожжей» (*Aureobasidium pullulans*).

Алгоритмы микробиологической диагностики бронхолегочных микозов, вызванных условно-патогенными дрожжевыми и мицелиальными грибами

Рекомендуемый алгоритм микологического исследования респираторного материала представлен на рисунке 1. Алгоритм исследования включает прямую микроскопию и культивирование проб материала на питательных средах, идентификацию штаммов грибов до уровня вида и определение чувствительности к антифунгальным препаратам (дрожжевые грибы, мицелиальные грибы рода *Aspergillus*) по стандартным методикам. При работе с выделенными культурами грибов следует придерживаться указанного протокола исследования для получения достоверных и воспроизводимых результатов идентификации и определения чувствительности возбудителей к антимикотикам.

Для идентификации плесневых грибов по совокупности их морфологических признаков и способности к росту при 37°C с помощью атласов-определителей необходимо применять стандартные идентификационные среды для их культивирования (агар Чапека–Докса, картофельно-декстрозный агар и др.) и соблюдать правила для приготовления микропрепаратов с ненарушенными морфологическими структурами (наиболее доступная методика – приготовление после начала споруляции нативных препаратов в капле воды при помощи микологического крючка). Точная идентификация штаммов дрожжевых и дрожжеподобных грибов с использованием коммерческих систем (хромагары, тест-системы для идентификации дрожжевых грибов) возможна при обязательном изучении микроморфологии (нативные препараты в капле воды), макроморфологии и температурных границ роста.

С учетом вариативной чувствительности к антимикотикам у ряда возбудителей, перед назначением лекарственной терапии целесообразно определять чувствительность штаммов грибов к лекарственным препаратам по методикам,

позволяющим корректировать данные *in vitro* с терапевтическим результатом (коммерческие тест-системы на основе стандартов CLSI, EUCAST).

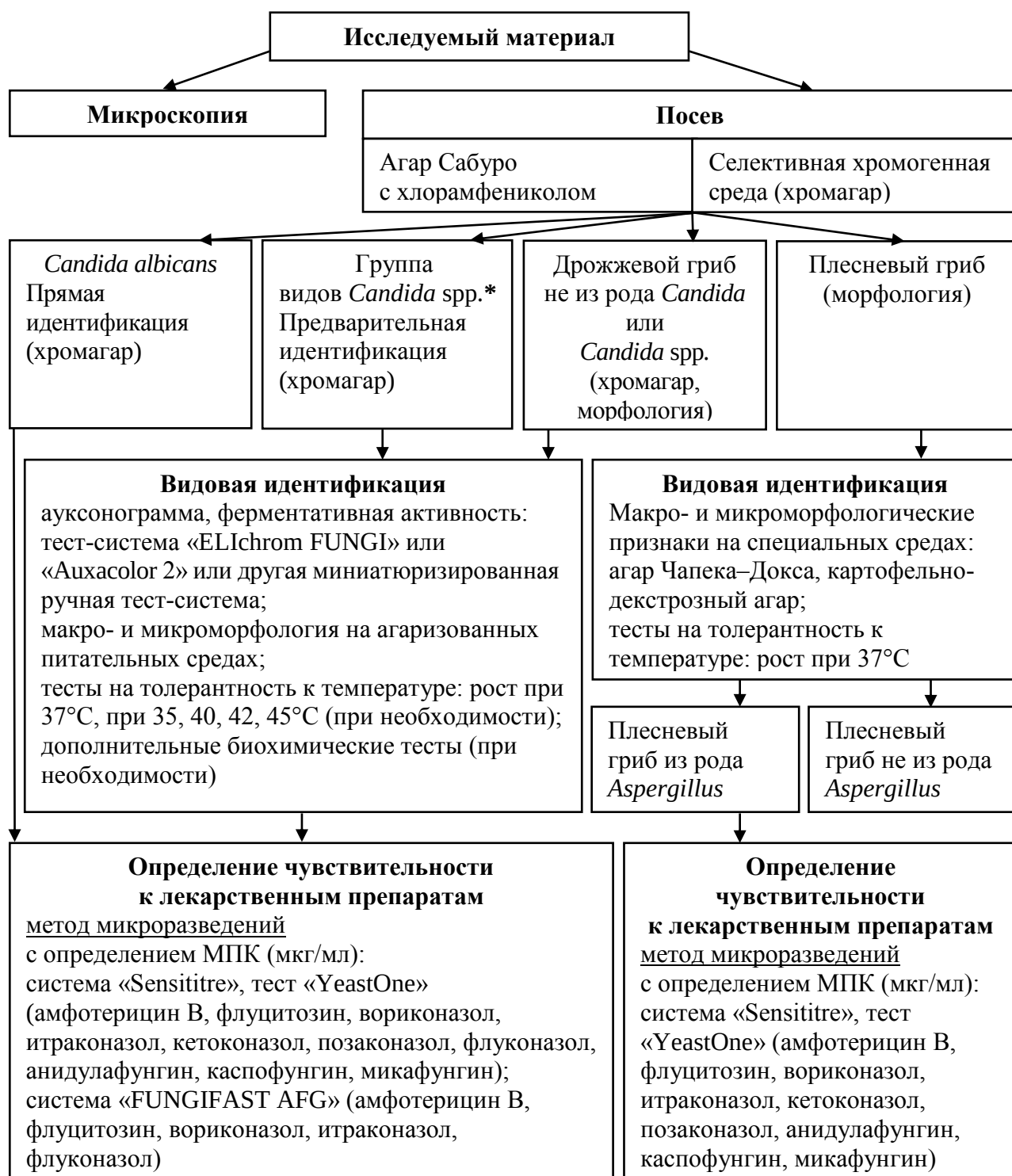


Рисунок 1 – Алгоритм микробиологических исследований основного диагностического материала на пневмомикоз (мокрота, содержимое бронхов)

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*

Для быстрой дифференциации возбудителей пневмомикозов с различными уровнями природной чувствительности к антимикотикам была составлена схема разделения штаммов грибов на группы (9 групп – с учетом многообразия микромицетов, способных вызывать поражения легких): возбудители феоидных грибов из групп диморфных «черных дрожжей» (1) или мицелиальных феоидных грибов (2), возбудители зигомикоза (Zygomycota) (3), группа светлоокрашенных плесневых возбудителей (включает гиалогифомицеты, телеоморфные *Ascomycota*, *Basidiomycota*) (4), базидиомицетовые дрожжи из группы «красных дрожжей» (5), аскомицетовые дрожжи (6), базидиомицетовые непигментированные дрожжи (7), аскомицетовые дрожжеподобные грибы (8), базидиомицетовые дрожжеподобные грибы (9) (Рисунок 2).



Рисунок 2 – Диаграмма для дифференцировки девяти групп болезнетворных грибов, вероятных возбудителей бронхолегочных микозов

Выделенные микромицеты разделяют по окраске колоний, реверзума на светлоокрашенные грибы и темноокрашенные грибы. Темноокрашенные грибы разделяют по макро- и микроморфологическим признакам на группу диморфных грибов «черные дрожжи» (1) (дрожжеподобные темные колонии; формируют в талломе как одиночные почкующиеся клетки, так и гифы септированного мицелия) и

группу мицелиальных феоидных грибов (2) (типичные плесневые темные колонии с темными мицелием и конидиями). Светлоокрашенные грибы разделяют по морфологии колоний на группы плесневых грибов и дрожжевых грибов. Плесневые светлоокрашенные грибы разделяют по макро- и микроморфологии на группу возбудителей зигомикоза (*Zygomycota*) (3) (быстрорастущие колонии с обильным воздушным шерстистым мицелием, заполняющим чашку Петри за 2-3 суток и темными спорангиями; гифы и спорангиеносцы несептированные или с редкими перегородками) и группу грибов *Dikarya*: гиалогифомицеты, телеоморфные *Ascomycota* или *Basidiomycota* (4) (колонии с развитым воздушным мицелием; таллом из регулярно септированных, бесцветных гиф мицелия, образуют конидиеносцы с конидиогенными структурами и конидиями). Дрожжевые (немеланизированные) грибы разделяют по цвету колоний (синтез каротиноидных пигментов) на группу белых дрожжевых грибов и группу красных базидиомицетовых дрожжевых грибов (5). Группу белых дрожжей разделяют по макро- и микроморфологии на дрожжевые грибы, образующие почкующиеся клетки и дрожжеподобные грибы, формирующие артроспоры. Непигментированные дрожжевые грибы, образующие почкующиеся клетки, разделяют с помощью специфического биохимического признака – теста на образование уреазы (базидиомицеты: положительный, проводят гидролиз мочевины, аскомицеты: отрицательный, не проводят) на аскомицетовые дрожжи (6) и базидиомицетовые дрожжи (7). Аналогичным образом, дрожжеподобные грибы, формирующие артроспоры, разделяют на аскомицетовые дрожжеподобные грибы (8) и базидиомицетовые дрожжеподобные грибы (9).

Интерпретация результатов лабораторных исследований

Диагностическая ценность положительных результатов лабораторных исследований различна, нередко вариабельна и определяется рядом показателей: методом исследования (выделение культуры гриба из посева, обнаружение элементов грибов при микроскопии, выявление антигенов грибов и антител к ним в сыворотке при серодиагностике); характером материала (респираторные или хирургические материалы, кровь); видовой принадлежностью, количественным содержанием и повторностью обнаружения гриба. Интерпретацию значимых результатов лабораторных исследований на пневмомикоз целесообразно проводить в категориях: «признак колонизации», «признак вероятного микоза», «диагностически значимый признак микоза».

Результаты, имеющие диагностическое значение: 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); выделение гриба из посева крови (фунгемия; за исключением обнаружения *Aspergillus* spp., что интерпретируется как контаминация).

К критериям колонизации бронхов, а также 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*). Особого внимания заслуживают случаи выделения плесневых грибов – *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Aureobasidium pullulans* и *Exophiala dermatitidis* (возбудители из группы «черных дрожжей»), *Bipolaris* spp., *Curvularia* spp., *Paecilomyces* spp., *Rhizopus arrhizus* (основной

возбудитель зигомикоза), *Scedosporium* spp., а также дрожжевого гриба *Cryptococcus neoformans* (основной возбудитель криптококкоза). При интерпретации результатов посевов респираторного материала у больных туберкулезом необходимо учитывать, что выделение гриба из содержимого бронхов или мокроты, не является доказательством микоза, а, как правило, отражает колонизацию дыхательных путей.

Положительные результаты серодиагностики (обнаружение в крови пациентов антигенов *Aspergillus*, *Cryptococcus* или *Candida*; антител к антигенам *Aspergillus* или *Candida* в диагностически значимом титре) интерпретируют как признаки вероятного бронхолегочного микоза; диагностическая ценность признака возрастает при подтверждении результата методами посева и прямой микроскопии. Диагностика аспергиллеза легких включает иммунологические исследования крови, которые используют для верификации как инвазивных форм (определение галактотрипана антигена *Aspergillus*), так и хронических и аллергических форм (определение специфических антител к грибам *Aspergillus* (Denning D.W. et al., 2016)). Признаком диссеминации криптококковой инфекции за пределы очага в легких является обнаружение антигена *Cr. neoformans* в сыворотке, однако, при развитии изолированного поражения легких антиген в крови обнаруживается в редких случаях (Диагностика и лечение микозов, 2013; Baddley J.W. et al., 2008). Имеющиеся рекомендации не исключают использование выявления *Candida* антигемии (маннанный антиген) и антител к антигенам *Candida* в сыворотке крови в качестве дополнительных лабораторных признаков поражения легких грибами *Candida*; возможности серодиагностики кандидоза органов дыхания ограничены из-за неоднозначной и вариабельной интерпретации получаемых результатов, в том числе и у больных туберкулезом.

Окончательную интерпретацию результатов лабораторных исследований на пневмомикоз следует проводить по совокупности всех полученных микологических и иммунологических данных. Необходимым условием своевременной диагностики и назначения обоснованной терапии вторичных пневмомикозов у больных туберкулезом является совместная диагностическая работа клинических и лабораторных специалистов (на основе сочетания специфичных лабораторных признаков с клиническими и инструментальными признаками).

Результаты выявления состава и таксономии вероятных возбудителей бронхолегочных и диссеминированных микозов у больных туберкулезом **Состав, классификация, свойства обнаруженных болезнетворных грибов**

В результате многолетних микологических исследований биоматериала лабораторные признаки глубокого микоза были обнаружены у 2918 из 7683 (38,0% ДИ 36,9-39,1%) обследованных больных различными формами туберкулеза (Таблица 2). Критерии диагностики: выделение из мокроты мицелиального гриба, дрожжевого гриба не из рода *Candida* или гриба рода *Candida* в количестве $>1 \times 10^3$ КОЕ/мл; выделение гриба из содержимого бронхов (ФБС), биоптата бронхов, содержимого легочной или плевральной полости, эндобронхиального клапана; выделение гриба *Candida* из крови; выделение *Cryptococcus neoformans* из СМЖ. Признаки микоза легких и/или плевры были обнаружены у 2903 из 7657 обследованных на пневмомикоз пациентов (37,9% ДИ 36,8-39,0%); фунгемия (кандидемия) – у 11, криптококкоз ЦНС – у 7.

Диссеминированные микозы (кандидемия, криптококкоз ЦНС) развивались достоверно чаще у больных с ВИЧ-инфекцией, чем у больных без ВИЧ-инфекции ($p=0,00000471372$ с использованием критерия Фишера).

Таблица 2 – Число больных различными формами туберкулеза, инфицированных грибами (диагностика пневмомикозов, фунгемии, криптококкоза ЦНС)

Форма туберкулеза	Число пациентов		
	абс.	%	95% ДИ
Туберкулез внутригрудных лимфатических узлов	157	5,4	4,6-6,3
Очаговый туберкулез легких	223	7,65	6,7-8,7
Инфильтративный туберкулез легких	1229	42,1	40,3-43,9
Диссеминированный туберкулез легких	255	8,75	7,7-9,8
Цирротический туберкулез легких	61	2,1	1,6-2,7
Кавернозный туберкулез легких	27	0,9	0,6-1,3
Фиброзно-кавернозный туберкулез легких	501	17,2	15,8-18,6
Туберкулема легких	336	11,5	10,4-12,7
Туберкулезная эмпиема	68	2,3	1,8-3,0
Туберкулезный плеврит	28	1,0	0,6-1,4
Генерализованный туберкулез	33	1,1	0,8-1,6
Всего	2918	100,0	–

У инфицированных грибами пациентов было обнаружено от 1 до 5 видов грибов: у 36% (34,4–37,9%) пациентов – 2 или более видов, у 12% (10,6–13,0%) – 3 или более видов, у 3% (2,1–3,3%) – 4 или 5 видов (Рисунок 3).

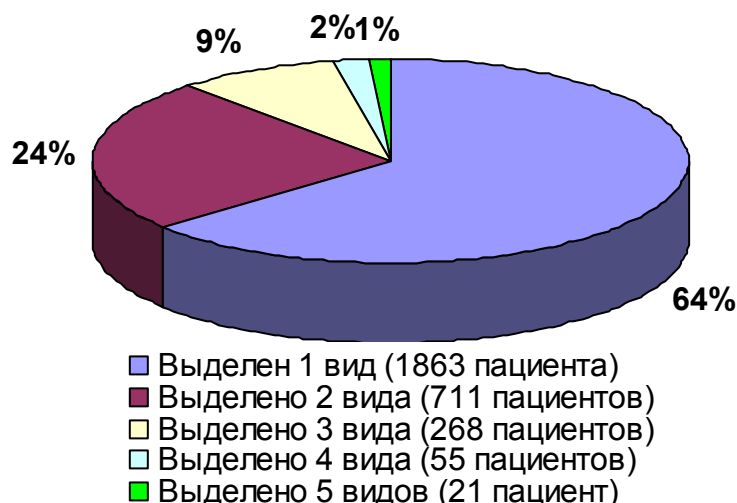


Рисунок 3 – Распределение пациентов по числу выделенных видов микромицетов (от 1 до 5)

Всего было выделено 67 видов грибов из 24 родов (Таблица 3): возбудители аспергиллеза (14 видов рода *Aspergillus*); возбудители кандидоза (14 видов из родов *Candida*, *Yarrowia*); возбудители криптококкоза (3 вида рода *Cryptococcus*); возбудители зигомикоза (3 вида из родов *Mucor*, *Rhizopus*); возбудители гиалогифомикоза (19 видов из родов *Acremonium*, *Chaetomium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Talaromyces*, *Trichoderma*); возбудители феогифомикоза (8 видов из родов *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Ulocladium*); возбудители редких дрожжевых глубоких микозов (6 видов из родов *Geotrichum*, *Hanseniaspora*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saprochaete*). В таблице 3 указаны группы болезнетворных грибов, к которым относят выделенные виды (аскомицетовые дрожжи, базидиомицетовые дрожжи, зигомицеты, гиалогифомицеты, феогифомицеты, аскомицеты, образующие плодовые тела в культуре (Hoog de G. et al., 2011), а также современные и традиционные синонимы видовых названий (syn.). Обнаружено 23 вида дрожжевых грибов (34%), включая 2 вида дрожжеподобных грибов с артроспорами (*Sacch. cerevisiae*, *Sapr. capitata*) и 44 вида плесневых грибов (66%), включая 1 вид из группы «черных дрожжей» (*Aur. pullulans*).

Таблица 3 – Классификация выделенных видов грибов в группах возбудителей микозов

Микоз; количество видов, (п)	Группа видов ¹	Обнаруженные возбудители
Аспергиллез (14)	Гиалогифомицеты	<i>Aspergillus flavipes</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. glaucus</i> , <i>A. hollandicus</i> (syn. <i>Eurotium amstelodami</i>), <i>A. nidulans</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. restrictus</i> , <i>A. sydowii</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. ustus</i> , <i>A. versicolor</i>
Кандидоз (14)	Аскомицетовые дрожжи	<i>Candida albicans</i> , <i>C. dubliniensis</i> , <i>C. famata</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. kefyr</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. lusitaniae</i> , <i>C. norvegensis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. rugosa</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. zeylanoides</i> ; <i>Yarrowia lipolytica</i> (syn. <i>C. lipolytica</i>)
Криптококкоз (3)	Базидиомицетовые дрожжи	<i>Cryptococcus albidus</i> , <i>Cr. laurentii</i> , <i>Cr. neoformans</i>
Зигомикоз (3)	Зигомицеты порядка <i>Mucorales</i>	<i>Mucor circinelloides</i> , <i>M. hiemalis</i> ; <i>Rhizopus arrhizus</i>
Гиалогифомикоз (19)	Гиалогифомицеты	<i>Acremonium kiliense</i> (syn. <i>Sarocladium kiliense</i>), <i>Acr. strictum</i> (syn. <i>Sar. strictum</i>); <i>Fusarium chlamydosporum</i> , <i>F. dimerum</i> , <i>F. oxysporum</i> ; <i>Paecilomyces lilacinus</i> (syn. <i>Purpureocillium lilacinum</i>), <i>Paec. variotii</i> ; <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. commune</i> , <i>P. decumbens</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. spinulosum</i> ; <i>Talaromyces purpureogenus</i> (syn. <i>P. purpureogenum</i>), <i>T. rugulosus</i> (syn. <i>P. rugulosum</i>); <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> ; <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Tr. viride</i>
	Аскомицеты с плодовыми телами в культуре	<i>Chaetomium globosum</i>
Феогифомикоз (8)	Феогифомицеты порядка <i>Pleosporales</i>	<i>Alternaria alternata</i> ; <i>Curvularia hawaiiensis</i> (syn. <i>Bipolaris hawaiiensis</i>), <i>Curv. lunata</i> ; <i>Ulocladium chartarum</i>
	Феогифомицеты «черные дрожжи» и родственные виды	<i>Aureobasidium pullulans</i> ; <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Cl. herbarum</i> , <i>Cl. sphaerospermum</i>
Редкие дрожжевые микозы (6)	Аскомицетовые дрожжи	<i>Geotrichum candidum</i> ; <i>Hanseniaspora uvarum</i> (syn. <i>Kloeckera apiculata</i>); <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; <i>Saprochaete capitata</i>
	Базидиомицетовые дрожжи	<i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Rh. mucilaginosa</i>

Примечание: ¹ – По: (Hoog de G. et al., 2011); syn. – синоним

К *Ascomycota* относятся 59 видов (88%) из порядков *Capnodiales* (3 вида), *Dothideales* (1), *Eurotiales* (24), *Hypocreales* (7), *Microascales* (1), *Pleosporales* (4), *Saccharomycetales* (18), *Sordariales* (1); к *Basidiomycota* – 5 видов (7,5%) из *Sporidiobolales* (2), *Tremellales* (3); к *Zygomycota* – 3 вида (4,5%) из *Mucorales* (3).

По уровню патогенности (группы биологического риска Biological Safety Levels (BSL): от BSL-1 до BSL-4 (наиболее опасной)) 67 микромицетов относят к группам: BSL-2 – 15 видов (22%; культуры *Cr. neoformans* в диплоидной фазе, образующие

базидиоспоры, относят к группе BSL-3), BSL-1 – 51 вид (76%), GRAS (микроорганизмы, рассматриваемые как безопасные) – 1 вид *Sacch. cerevisiae* (2%) (Озерская С.М. и др., 2011; Hoog de G. et al., 2011). В аналогичную BSL-2 III группу патогенности входят 8 из 67 видов (12%); в аналогичную BSL-1 IV группу патогенности – 52 вида (78%) (Санитарно-эпидемиологические правила. СП 1.3.2322-08, 2008). Аллергенными свойствами обладают 14 видов (21%) (ALLERGEN NOMENCLATURE IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee), токсигенными – 23 вида (34%).

По обнаруженной способности клинических штаммов к росту *in vitro* при 37°C 67 видов грибов были разделены на три группы: термотолерантные виды с наличием роста у всех выделенных штаммов (37 видов; 55%), виды с вариативным ростом штаммов (23 вида; 34%), виды с отсутствием роста у всех штаммов (7 видов; 11%). В группу термотолерантных видов вошли 16 из 23 дрожжевых грибов (70%) и 21 из 44 мицелиальных грибов (48%). Виды из группы с вариативным ростом различались долей штаммов, растущих при 37°C – от менее 10% (20%) до более 90% штаммов. Не обладали способностью к росту *in vitro* при 37°C штаммы 6 видов мицелиальных грибов (14%) и 1 вид дрожжей (4%).

В таблице 4 обобщены данные по количеству и соотношению выявленных термотолерантных штаммов в различных группах грибов. Обнаружено, что доля штаммов, способных к росту при 37°C, была выше у дрожжевых грибов по сравнению с мицелиальными, а также у возбудителей распространенных микозов (аспергиллез, кандидоз, криптококкоз, зигомикоз) по сравнению с возбудителями более редких вариантов (гиалогифомикоз, феогифомикоз, редкие дрожжевые инфекции). Общая доля штаммов, растущих при 37°C, превышала 93%.

Таблица 4 – Количество клинических штаммов грибов, способных к росту *in vitro* при 37°C

Группа грибов	Общее число видов		Общее число штаммов		Количество штаммов с наличием роста при 37°C*	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%*
Дрожжевые грибы	23	34,3	3594	76,0	3539	98,5
Плесневые грибы	44	65,7	1136	24,0	873	76,9
Возбудители аспергиллеза	14	20,9	793	16,8	627	79,1
Возбудители кандидоза	14	20,9	3448	72,9	3437	99,7
Возбудители криптококкоза	3	4,5	21	0,4	18	85,7
Возбудители зигомикоза	3	4,5	27	0,6	22	81,5
Возбудители гиалогифомикоза	19	28,4	242	5,1	177	73,1
Возбудители феогифомикоза	8	11,9	74	1,6	47	63,5
Возбудители редких дрожжевых микозов	6	8,9	125	2,6	84	67,2
Все виды	67	–	4730	–	4412	93,3

Примечание: * – доля растущих при 37°C штаммов от общего числа в группе грибов

К группе несовершенных грибов относят 55 видов *Ascomycota* и 5 видов *Basidiomycota* (60 видов; 90%); к группе совершенных грибов – 4 вида *Ascomycota* и 3 вида *Zygomycota* (7 видов; 10%). Половая стадия обнаружена у 22 из 60

несовершенных грибов (37%): у 8 видов (36%) – гомоталличные телеоморфы, у 14 видов (64%) – гетероталличные (раздельнополые) телеоморфы. Формировать половые структуры размножения *in vitro* способны 13 из 67 видов (19%): 5 мицелиальных (*A. flavipes*, *A. glaucus*, *A. hollandicus*, *A. nidulans*, *Ch. globosum*) и 8 дрожжевых (*C. famata*, *C. kefir*, *C. krusei*, *C. norvegensis*, *Cr. neoformans* – штаммы в диплоидной фазе, *H. uvarum*, *Sacch. cerevisiae*, *Y. lipolytica*). На практике, обнаружение половых структур в культуре имеет значение признака при идентификации 4 видов плесневых аскомицетов (6%): гифомицетов *A. glaucus* (клеистотеции; формировались регулярно), *A. hollandicus* (формировались регулярно), *A. nidulans* (формировались у 31% штаммов) и совершенного гриба *Ch. globosum* (перитеции). Вероятность формирования клеистотециев у *A. flavipes* крайне мала (не формировались у 100% штаммов). Все выделенные 15 штаммов *Cr. neoformans* оставались в анаморфной дрожжевой стадии, не образуя базидиоспор. Установлено, что у клинических штаммов *Sacch. cerevisiae* регулярно формируются аски с 1-4 аскоспорами.

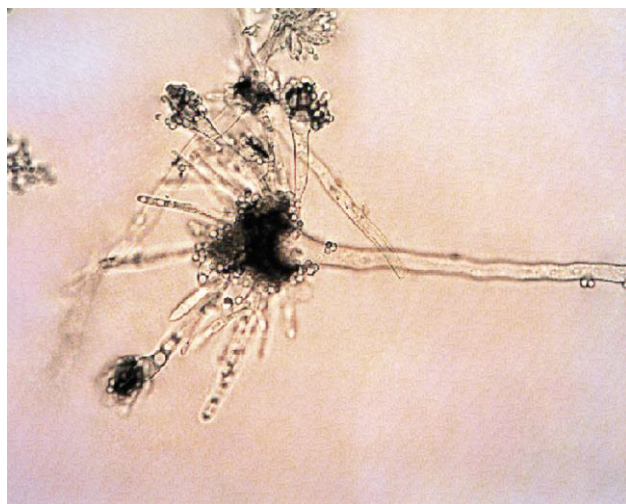
Исследование морфологии дрожжевых грибов, проводимое совместно с изучением их биохимических характеристик, позволяет быстро дифференцировать дрожжевые возбудители на группы (Рисунок 2), избегая случайных ошибок при их идентификации. За исключением *C. famata* и *C. glabrata*, обнаруженные возбудители кандидоза (12 видов – 86%) формировали на питательных средах псевдомицелиальные структуры различной морфологии; грибы *C. albicans* образовывали также и настоящие гифы с септами. Для 3 грибов рода *Cryptococcus* специфично образование капсулы, отчетливо различимой в тушевых препаратах.

Все 44 вида плесневых грибов (40 гифомицетов, 1 совершенный вид *Ascomycota*, 3 вида *Zygomycota*) хорошо или удовлетворительно развивались на стандартных питательных средах (агаре Чапека–Докса, картофельно-декстрозном агаре). Морфокультуральные признаки штаммов отдельных возбудителей обладали достаточным сходством и в целом соответствовали описаниям, приведенным в атласах-определителях (Саттон Д. и др., 2001; Hoog de G. et al., 2011).

Проведено специальное скрининговое исследование морфологических характеристик 793 штаммов *Aspergillus* spp., выделенных от больных туберкулезом (сравнительное изучение морфологии 14 видов возбудителей аспергиллеза на средах агар Чапека–Докса и картофельно-декстрозном агаре при 30, 35, 37, 40 и 45°C; от 7 до 21 суток). Было установлено, что наличие у клинических штаммов 14 возбудителей пневмомикозов комплекса характерных микроморфологических и макроскопических признаков позволяет достоверно выявлять данные возбудители и дифференцировать их в пределах рода *Aspergillus*. Вариабельность диагностических микроморфологических признаков, усложняющая идентификацию, была обнаружена у штаммов 7 из 14 видов *Aspergillus* (50%): *A. flavipes*, *A. flavus*, *A. fumigatus* (Рисунок 4), *A. glaucus*, *A. oryzae*, *A. restrictus*, *A. versicolor*. У части штаммов данных видов наряду с типичными по морфологии конидиеносцами формируются нетипичные или реже встречаемые: пролиферирующие, разветвленные, укороченные, с редуцированными структурами. У группы атипичных штаммов *A. fumigatus* (менее 10% штаммов) различия наблюдались и на макроскопическом уровне – в результате редукции способности к конидиогенезу (до полной утраты). Обнаружено, что атипичные непигментированные штаммы *A. fumigatus* выделяются от пациентов, как правило, после проведения терапии антимикотиками. Клинические штаммы грибов *A. hollandicus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. sydowii*, *A. terreus* (Рисунок 5), *A. ustus* (50% видов) строго образовывали типичные для них репродуктивные структуры.



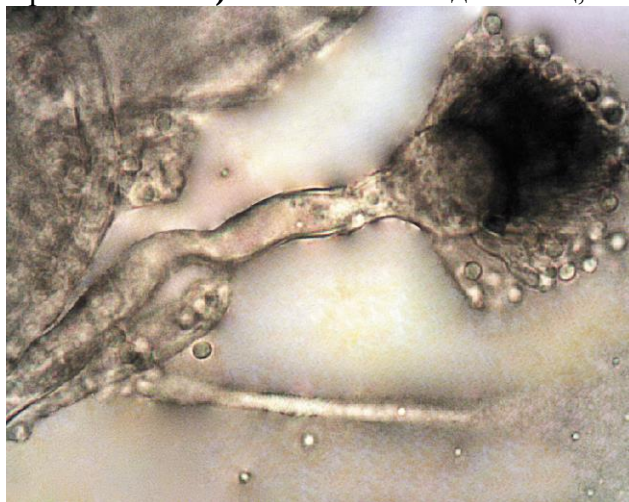
А



Б

Рисунок 4 – Микроморфология двух штаммов (бронхиальный секрет, киста легкого) *Aspergillus fumigatus* Fresen.

Примечание: А) Типичный конидиеносец, x1000; Б) Нетипичный конидиеносец, x400



А



Б

Рисунок 5 – Микроморфология штамма (каверна легких) *Aspergillus terreus* Thom, x1000

Примечание: А) Типичный конидиеносец. Б) Алейроспоры (вегетативные структуры)

Для точной идентификации возбудителей аспергиллеза необходимо использовать стандартную среду агар Чапека–Докса и два температурных режима 30°C и 37°C. При работе с возбудителями плесневых пневмомикозов целесообразно дополнять идентификационную среду агар Чапека–Докса питательной средой картофельно-декстрозный агар (или его модификацией), способствующей более быстрому и обильному спороношению у гиомицетов и зигомицетов.

Спектр вероятный возбудителей пневмомикозов у больных туберкулезом

При диагностике пневмомикозов выделено 67 видов грибов: возбудителей аспергиллеза – 14 видов (21%), кандидоза – 14 видов (21%), криптококкоза – 3 вида (4,5%), зигомикоза – 3 вида (4,5%), гиалогифомикоза – 19 видов (28%), феогифомикоза – 8 видов (12%), редких дрожжевых глубоких микозов – 6 видов (9%) (Таблица 5).

В таблице 5 указаны: число случаев обнаружения у пациентов каждого из 67 возбудителей в респираторном материале (мокрота, содержимое бронхов – повторы исключены), бронхиальном биоптате, содержимом легочных полостей, содержимом плевральных полостей; общее число пациентов, у которых грибок был обнаружен («Всего пациентов»: у ряда больных грибы одного вида были выявлены в

респираторном и хирургическом материале); сведения по общему количеству инфицированных грибами (от 1 до 5 видов) и обследованных пациентов («Общее количество пациентов»: результаты исследования отдельного и всех биоматериалов).
Таблица 5 – Число случаев и частота обнаружения у пациентов различных видов болезнетворных грибов в диагностическом материале на бронхолегочный микоз

Вид	Биоматериал (случаи обнаружения грибов)								Всего пациентов	
	Респ-й материал		Бронх. биоптат		Легочн. полости		Плеврал. полости			
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>Acremonium kiliense</i>	8	0,1	—	—	—	—	—	—	8	0,1
<i>Acr. strictum</i>	31	0,4	—	—	2	0,3	1	0,2	34	0,4
<i>Alternaria alternata</i>	12	0,2	—	—	2	0,3	1	0,2	15	0,2
<i>Aspergillus flavipes</i>	13	0,2	—	—	—	—	—	—	13	0,2
<i>A. flavus</i>	58	0,8	—	—	5	0,8	4	0,9	66	0,9
<i>A. fumigatus</i>	174	2,4	2	11,8	38	6,2	13	3,1	215	2,8
<i>A. glaucus</i>	20	0,3	—	—	1	0,2	—	—	21	0,3
<i>A. hollandicus</i>	11	0,2	—	—	—	—	1	0,2	12	0,2
<i>A. nidulans</i>	35	0,5	—	—	—	—	3	0,7	38	0,5
<i>A. niger</i>	162	2,2	—	—	5	0,8	7	1,7	174	2,3
<i>A. ochraceus</i>	24	0,3	—	—	1	0,2	—	—	25	0,3
<i>A. oryzae</i>	7	0,1	—	—	—	—	—	—	7	0,09
<i>A. restrictus</i>	24	0,3	—	—	2	0,3	3	0,7	29	0,4
<i>A. sydowii</i>	34	0,5	—	—	—	—	1	0,2	35	0,5
<i>A. terreus</i>	23	0,3	—	—	8	1,3	3	0,7	34	0,4
<i>A. ustus</i>	24	0,3	—	—	—	—	2	0,5	26	0,3
<i>A. versicolor</i>	57	0,8	—	—	2	0,3	1	0,2	60	0,8
<i>Aureobasidium pullulans</i>	16	0,2	—	—	3	0,5	2	0,5	20	0,3
<i>Candida albicans</i>	1995	27,1	—	—	5	0,8	14	3,3	2008	26,2
<i>C. dubliniensis</i>	15	0,2	—	—	—	—	—	—	15	0,2
<i>C. famata</i>	3	0,04	—	—	—	—	—	—	3	0,04
<i>C. glabrata</i>	368	5,00	—	—	3	0,5	8	1,9	377	4,9
<i>C. guilliermondii</i>	41	0,6	—	—	—	—	—	—	41	0,5
<i>C. kefyr</i>	106	1,4	—	—	1	0,2	1	0,2	107	1,4
<i>C. krusei</i>	199	2,7	—	—	—	—	6	1,4	204	2,7
<i>C. lusitaniae</i>	15	0,2	—	—	—	—	—	—	15	0,2
<i>C. norvegensis</i>	29	0,4	—	—	—	—	—	—	29	0,4
<i>C. parapsilosis</i>	57	0,8	—	—	—	—	12	2,8	66	0,9
<i>C. rugosa</i>	14	0,2	—	—	—	—	—	—	14	0,2
<i>C. tropicalis</i>	238	3,2	—	—	1	0,2	3	0,7	241	3,2
<i>C. zeylanoides</i>	11	0,2	—	—	—	—	—	—	11	0,1
<i>Chaetomium globosum</i>	1	0,01	—	—	—	—	—	—	1	0,01
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	19	0,3	—	—	2	0,3	—	—	21	0,3
<i>Cl. herbarum</i>	2	0,03	—	—	1	0,2	—	—	3	0,04
<i>Cl. sphaerospermum</i>	3	0,04	—	—	—	—	—	—	3	0,04
<i>Cryptococcus albidus</i>	3	0,04	—	—	—	—	—	—	3	0,04
<i>Cr. laurentii</i>	3	0,04	—	—	—	—	—	—	3	0,04
<i>Cr. neoformans</i>	6	0,08	—	—	1	0,2	1	0,2	8	0,1
<i>Curvularia hawaiiensis</i>	1	0,01	—	—	1	0,2	—	—	1	0,01
<i>Curv. lunata</i>	2	0,03	—	—	—	—	2	0,5	4	0,05

Продолжение таблицы 5

Вид	Биоматериал (случаи обнаружения грибов)								Всего пациентов	
	Респ-й материал		Бронх. биоптат		Легочн. полости		Плеврал. полости			
	п	%	п	%	п	%	п	%	п	%
<i>Fusarium chlamydosporum</i>	3	0,04	–	–	–	–	–	–	3	0,04
<i>F. dimerum</i>	2	0,03	–	–	–	–	1	0,2	3	0,04
<i>F. oxysporum</i>	7	0,1	–	–	1	0,2	1	0,2	9	0,1
<i>Geotrichum candidum</i>	33	0,5	–	–	3	0,5	1	0,2	37	0,5
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	6	0,08	–	–	–	–	–	–	6	0,08
<i>Mucor circinelloides</i>	3	0,04	–	–	–	–	–	–	3	0,04
<i>M. hiemalis</i>	4	0,05	–	–	–	–	2	0,5	6	0,08
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	2	0,03	–	–	1	0,2	–	–	3	0,04
<i>Paec. variotii</i>	28	0,4	–	–	2	0,3	–	–	30	0,4
<i>Penicillium chrysogenum</i>	55	0,8	–	–	2	0,3	1	0,2	57	0,7
<i>P. citrinum</i>	19	0,3	–	–	1	0,2	2	0,5	22	0,3
<i>P. commune</i>	8	0,1	–	–	–	–	2	0,5	10	0,1
<i>P. decumbens</i>	13	0,2	–	–	–	–	–	–	13	0,2
<i>P. expansum</i>	6	0,08	–	–	–	–	–	–	6	0,08
<i>P. spinulosum</i>	3	0,04	–	–	–	–	–	–	3	0,04
<i>Rhizopus arrhizus</i>	17	0,2	–	–	1	0,2	–	–	18	0,2
<i>Rhodotorula glutinis</i>	8	0,1	–	–	–	–	–	–	8	0,1
<i>Rh. mucilaginosa</i>	24	0,3	–	–	–	–	1	0,2	25	0,3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38	0,5	–	–	–	–	–	–	38	0,5
<i>Saprochaete capitata</i>	9	0,1	–	–	–	–	–	–	9	0,1
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	6	0,08	–	–	–	–	–	–	6	0,08
<i>Talaromyces purpureogenus</i>	17	0,2	–	–	1	0,2	3	0,7	21	0,3
<i>T. rugulosus</i>	2	0,03	–	–	–	–	–	–	2	0,03
<i>Trichoderma harzianum</i>	2	0,03	–	–	–	–	–	–	2	0,03
<i>Tr. viride</i>	8	0,1	–	–	–	–	–	–	8	0,1
<i>Ulocladium chartarum</i>	3	0,04	–	–	–	–	1	0,2	4	0,05
<i>Yarrowia lipolytica</i>	15	0,2	–	–	–	–	–	–	15	0,2
Общее количество пациентов, (n)	ИГ	2794	2		96		72		2903	
	Об	7369	17		613		425		7657	

Примечание: п – число случаев обнаружения гриба у пациентов, % – доля случаев обнаружения от числа обследованных пациентов; Общее количество пациентов, (n): ИГ – количество инфицированных грибами (от 1 до 5 видов), Об – количество обследованных

Выделенные 67 возбудителей микозов были разделены на три группы по частоте обнаружения у пациентов при диагностике пневмомикозов (Таблица 5). К группе часто встречаемых возбудителей отнесены 7 видов (11%) с частотой обнаружения >1%: 2 возбудителя аспергиллеза (14%), 5 возбудителей кандидоза (36%). К группе среднераспространенных возбудителей отнесен 31 вид (46%) с частотой обнаружения от 0,2% до 1%: 11 возбудителей аспергиллеза (79%), 7 возбудителей кандидоза (50%), 1 возбудитель зигомикоза (33%), 6 возбудителей гиалогифомикоза (32%), 3 возбудителя феогифомикоза (37,5%), 3 возбудителя редких дрожжевых микозов (50%). К группе редко встречаемых возбудителей отнесены 29 видов (43%) с частотой обнаружения ≤0,1%: 1 возбудитель аспергиллеза (7%), 2 возбудителя кандидоза (14%), 3 возбудителя криптококкоза (100%), 2 возбудителя

зигомикоза (67%), 13 возбудителей гиалогифомикоза (68%), 5 возбудителей феогифомикоза (62,5%), 3 возбудителя редких дрожжевых микозов (50%). Среди мицелиальных грибов чаще других выделялись *A. fumigatus* (215 пациентов – 2,8% обследованных), *A. niger* (174 – 2,3%), *A. flavus* (66 – 0,9%), *A. versicolor* (60 – 0,8%); среди дрожжевых грибов – *C. albicans* (2008 – 26,2%), *C. glabrata* (377 – 4,9%), *C. tropicalis* (241 – 3,2%), *C. krusei* (204 – 2,7%), *C. kefyr* (107 – 1,4%).

Колонизация грибами дыхательных путей (от 1 до 5 видов) была выявлена у 2794 из 7369 обследованных пациентов (37,9% ДИ 36,8-39,0%). Все выделенные у больных 67 видов грибов были обнаружены в респираторном материале.

В легочной полости (каверна, туберкулема, киста) возбудитель микоза был обнаружен у 96 из 613 обследованных больных (15,7% ДИ 12,9-18,8%). Выделенные грибы относились к 27 видам из 14 родов. Возбудитель аспергиллеза в полости легких был обнаружен у 62 из 96 больных (64,6%): *A. flavus* (5 пациентов), *A. fumigatus* (38), *A. glaucus* (1), *A. niger* (5), *A. ochraceus* (1), *A. restrictus* (2), *A. terreus* (8), *A. versicolor* (2); возбудитель кандидоза – у 10 больных (10,4%): *C. albicans* (5), *C. glabrata* (3), *C. kefyr* (1), *C. tropicalis* (1); возбудитель гиалогифомикоза – у 10 больных (10,4%): *Acr. strictum* (2), *F. oxysporum* (1), *Paec. lilacinus* (1), *Paec. variotii* (2), *P. chrysogenum* (2), *P. citrinum* (1), *Tal. purpureogenus* (1); возбудитель феогифомикоза – у 9 больных (9,4%): *Alt. alternata* (2), *Aur. pullulans* (3), *Cl. herbarum* (1), *Cl. cladosporioides* (2), *Curv. hawaiiensis* (1); возбудитель редких дрожжевых микозов – у 3 больных (3,1%): *G. candidum* (3); возбудитель зигомикоза – у 1 пациента (1,05%): *Rh. oryzae* (1); возбудитель криптококкоза – у 1 пациента (1,05%): *Cr. neoformans* (1). У 16 из 96 пациентов (16,7%) выделенный из полости возбудитель был обнаружен в другом биоматериале (в содержимом бронхов, мокроте, содержимом плевральной полости): *A. flavus* (у 1 пациента), *A. fumigatus* (9), *Aur. pullulans* (1), *C. albicans* (1), *C. kefyr* (1), *C. tropicalis* (1), *Curv. hawaiiensis* (1), *P. chrysogenum* (1).

В плевральной полости грибы (от 1 до 3 видов) были обнаружены у 72 из 425 больных (16,9% ДИ 13,5-20,9%). У 30,6% больных из полости было выделено более одного вида возбудителя: 2 вида – у 12, 3 вида – у 10 пациентов. Всего из плевральных полостей у 72 пациентов было выделено 104 штамма грибов (104 случая), которые относились к 31 виду из 14 родов. Грибы рода *Aspergillus* в плевральной полости были обнаружены у 35 из 72 больных (48,6%) и в 38 из 104 случаев (36,5%): *A. flavus* (4 случая), *A. fumigatus* (13), *A. hollandicus* (1), *A. nidulans* (3), *A. niger* (7), *A. restrictus* (3), *A. sydowii* (1), *A. terreus* (3), *A. ustus* (2), *A. versicolor* (1); грибы рода *Candida* – у 29 больных (40,3%) и в 44 случаях (42,3%): *C. albicans* (14 случаев), *C. glabrata* (8), *C. kefyr* (1), *C. krusei* (6), *C. parapsilosis* (12), *C. tropicalis* (3); возбудитель гиалогифомикоза – у 11 больных (15,3%) и в 11 случаях (10,6%): *Acr. strictum* (1), *F. dimerum* (1), *F. oxysporum* (1), *P. chrysogenum* (1), *P. citrinum* (2), *P. commune* (2), *Tal. purpureogenus* (3); возбудитель феогифомикоза – у 6 больных (8,3%) и в 6 случаях (5,8%): *Alt. alternata* (1), *Aur. pullulans* (2), *Curv. lunata* (2), *Ulocladium chartarum* (1); возбудитель редких дрожжевых инфекций – у 2 больных (2,8%) и в 2 случаях (1,9%): *G. candidum* (1), *Rh. mucilaginosa* (1); возбудитель зигомикоза – у 2 больных (2,8%) и в 2 случаях (1,9%): *M. hiemalis* (2); возбудитель криптококкоза – у 1 пациента (1,4%), в 1 случае (1,0%): *Cr. neoformans* (1). У 11 из 72 пациентов (15,3%) выделенные из полости возбудители (от 1 до 3 видов) были обнаружены в другом биоматериале (в содержимом бронхов, мокроте, содержимом легочной полости): *A. flavus* (1 случай), *A. fumigatus* (2), *C. albicans* (5), *C. glabrata* (2), *C. krusei* (1), *C. parapsilosis* (3).

У двух больных гриб *A. fumigatus* был обнаружен в биоптате бронхов.

Анализ состава грибов, выделенных из крови, спинномозговой жидкости, канала эндобронхиального клапана

У 6 ВИЧ-инфицированных (35,3%) и у 5 ВИЧ-отрицательных (8,8%) пациентов при посеве крови была обнаружена кандидемия, вызванная *C. albicans* (2 случая; 18%), *C. glabrata* (2; 18%), *C. guilliermondii* (6; 55%), *C. parapsilosis* (1; 9%). У 7 ВИЧ-инфицированных больных туберкулезом при посеве образцов СМЖ был обнаружен криптококкоз ЦНС, вызванный *Cr. neoformans*. У 3 больных грибы были выделены из канала эндобронхиального клапана, удаленного из бронха: *A. flavus*, *C. lusitaniae*, а также *A. sydowii* и *C. albicans* (выделены совместно у одного пациента).

Результаты сравнительного исследования молекулярно-генетических свойств ряда клинических и сапротрофных штаммов *Aspergillus sydowii*

Для оценки перспектив использования молекулярно-генетических методов при идентификации трудно распознаваемых по морфологии возбудителей аспергиллеза проведены сравнительные исследования вариабельных регионов рДНК у 3 клинических и 4 референтных из разных местообитаний штаммов *Aspergillus sydowii*. Состав клинических штаммов: NHRC-FC095 (C95), NHRC-FC096 (C96) – БАЛ, ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ»; NHRC-FC014 (C14) – БАЛ, ГНЦ РАМН. Состав референтных штаммов: VKM F-441 (E84) – почва Московской области, ВКМ; VKM F-968 (E85) – вода Черного моря, ВКМ; VKM F-2488 (E86) – лед Антарктики, ВКМ; NRRL 254T (Type strain) (E93) – клинический изолят, типовой штамм NRRL. Идентификация штаммов по культурально-морфологическим признакам выявила их принадлежность к *A. sydowii* (Фомичева Г.М., 2007). У подробно охарактеризованных по разработанной нами схеме клинических штаммов ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ» C95 и C96 обнаружены различия по ряду фенотипических признаков: наличие экссудата, окраска реверзума, ширина конидиеносца, диаметр вздутия, формирование нетипичных конидиогенных структур, диаметр конидий, наиболее значимый из которых – способность у штамма C96 к образованию нетипичных конидиеносцев с упрощенным (микроциклическим) спорогенезом.

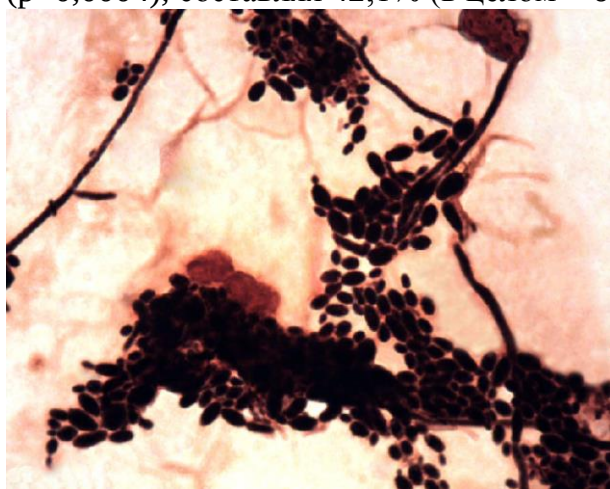
По данным секвенирования регионов ITS1-5.8S-ITS2 и D1/D2 28S рДНК было установлено: 1) все проанализированные штаммы относятся к виду *A. sydowii*; 2) штаммы *A. sydowii* разделяются на две гомогенные группы с идентичными последовательностями на исследованных участках рДНК, различающиеся на 3 нуклеотида по локусам ITS и на 1 нуклеотид по локусам D1/D2; 3) отличные по фенотипу клинические штаммы C95 и C96 относятся к разным по генотипу группам вида *A. sydowii*; 4) клинические и сапротрофные штаммы *A. sydowii* не составляют единых клад, образуя смешанные группы по последовательностям ITS и D1/D2 регионов рДНК; 5) с учетом последовательностей из баз данных GenBank/EMBL/DDJB, центральную кладу вида *A. sydowii* образует группа изолятов, идентичных с типовым E93, типичным по морфологии клиническим C95 и сапротрофным E84 штаммами. Полученные результаты свидетельствуют о гетерогенности гриба *A. sydowii* как по генотипическим, так и по фенотипическим признакам, и указывают на характерную для этого возбудителя высокую степень изменчивости. Сходство двух групп штаммов по ITS региону составляет 99,4%.

Результаты применения алгоритмов лабораторной диагностики для верификации бронхолегочных инфекций, вызванных дрожжевыми грибами Анализ данных лабораторной диагностики кандидоза

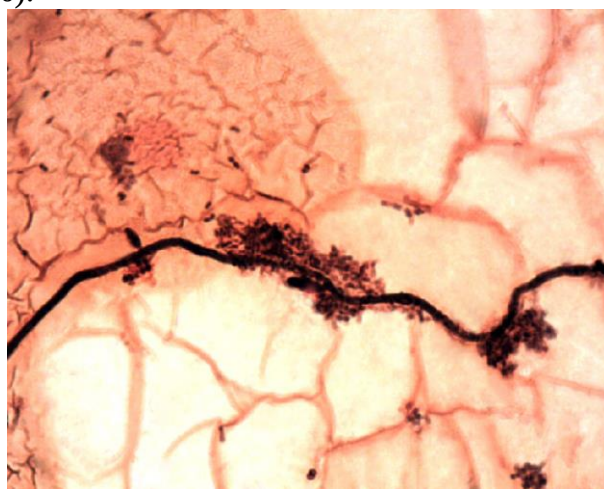
Признаки бронхолегочного кандидоза (культуральные исследования) были обнаружены у 2313 из 7657 больных туберкулезом (30,2% ДИ 29,2-31,3%):

колонизация дыхательных путей грибами *Candida*, интерпретируемая как признак микоза (массивная колонизация) – у 2289 из 7369 больных (31,1% ДИ 30,0-32,1%); выделение возбудителя из легочной полости (каверна, туберкулема, киста) – у 10 из 613 больных (1,6% ДИ 0,8-3,0%); выделение возбудителя из плевральной полости (1, 2 или 3 вида) – у 29 из 425 больных (6,8% ДИ 4,6-9,7%). Данными прямой микроскопии (обнаружены элементы дрожжевых грибов различной морфологии) подтверждено: 89,1% случаев выявления у пациентов массивной колонизации *Candida* spp.; 2 случая выделения возбудителя из полости легких (*C. albicans*). Было обнаружено, что возбудители кандидоза, способные образовывать псевдомицелиальные структуры, развиваются *in vivo* как в форме почкующихся клеток, так и в форме псевдомицелия (Рисунок 6А), а *C. albicans* также формирует и характерный истинный мицелий с грамположительным окрашиванием (Рисунок 6Б).

Признаки кандидозной инфекции легких были выявлены у 2278 ВИЧ-отрицательных (29,9%) и 35 ВИЧ-инфицированных (89,7%) пациентов. При сравнении групп пациентов с ВИЧ-инфекцией и без ВИЧ-инфекции выявлен ряд достоверно значимых различий ($p < 0,01$ с применением критерия χ^2 Пирсона): присутствие более одного возбудителя кандидоза наблюдалось достоверно чаще у больных туберкулезом с ВИЧ-инфекцией ($p < 0,00001$), составляя 46,2% (в целом – 8,6%); доля больных с массивной колонизацией респираторного тракта *Candida* spp. была значимо выше в группе ВИЧ-инфицированных пациентов ($p < 0,00001$), достигая крайне высокого уровня 92,1% (в целом – 31,1%); доля случаев обнаружения *C. albicans* от общего числа случаев обнаружения *Candida* spp. в респираторном материале значимо уменьшалась в группе ВИЧ-инфицированных пациентов ($p = 0,0004$), составляя 42,1% (в целом – 64,2%).



А



Б

Рисунок 6 – Элементы возбудителей кандидоза в мазках мокроты, $\times 1000$ (окраска по Граму)
Примечание: А) Дрожжевые клетки и нити псевдомицелия; Б) Настоящая гифа *Candida albicans*

У 13 из 59 пациентов (22,0%) обнаружено присутствие в крови антигена *Candida* (у 84,6% пациентов с *Candida* антигенемией выявлена массивная колонизация дыхательных путей *Candida* spp.). У 29 из 48 пациентов (60,4%) обнаружены в диагностическом титре ($\geq 1:320$) антитела к *C. albicans* (у 100% больных с антителами к *C. albicans* выявлена массивная колонизация дыхательных путей *Candida* spp., *C. albicans* выделен в 82,8% таких случаев).

Группа больных с признаками глубокого кандидоза (диагностика кандидоза легких, кандидемии) составила 2322 пациента или 30,2% (ДИ 29,2-31,3%). Была

сформирована группа больных туберкулезом с высоким риском развития глубокого кандидоза, которая составила 1405 пациентов или 18,3% (ДИ 17,4-19,2%). Критерии для включения в группу: повторное выделение возбудителя кандидоза одного вида из мокроты ($>1 \times 10^3$ КОЕ/мл); выделение возбудителя из содержимого бронхов; выделение возбудителя из легочной или плевральной полости, или с поверхности эндобронхиального клапана; кандидемия; *Candida* антигенемия.

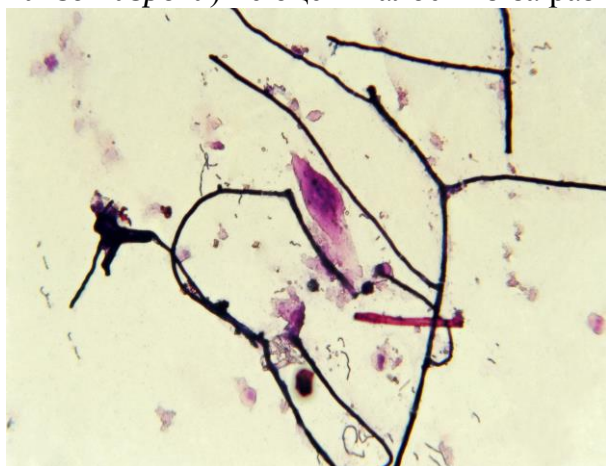
Анализ данных лабораторной диагностики криптококкоза

Признаки криптококкоза легких (культуральные исследования) были обнаружены у 14 из 7657 больных туберкулезом (0,2% ДИ 0,1-0,3%): колонизация дыхательных путей грибами *Cryptococcus* – у 12 из 7369 больных (0,2% ДИ 0,1-0,3%), у 6 из 12 пациентов (50%) обнаружен *Cr. neoformans*; выделение *Cr. neoformans* из легочной каверны – у 1 из 613 больных (0,2% ДИ 0,004-0,9%); выделение *Cr. neoformans* из плевральной полости – у 1 (с ВИЧ-инфекцией) из 425 больных (0,2% ДИ 0,005-1,3%). Данными прямой микроскопии (обнаружены дрожжевые клетки) подтверждено 75,0% случаев выявления у пациентов колонизации *Cryptococcus* spp.

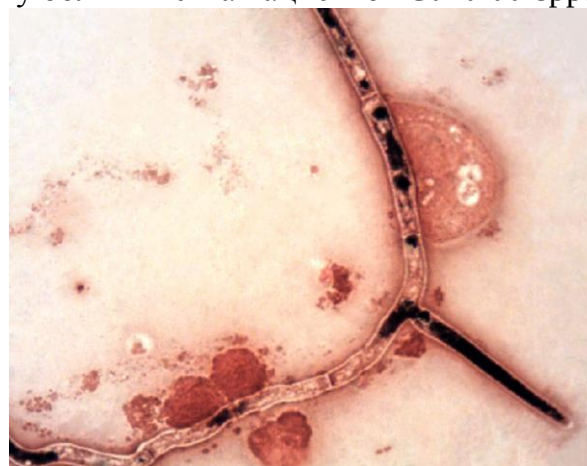
Вероятный криптококкоз легких был обнаружен у 13 ВИЧ-отрицательных (0,2%) и 1 ВИЧ-инфицированного (2,6%) пациентов. У 7 ВИЧ-инфицированных больных *Cr. neoformans* был обнаружен в СМЖ. Общее число больных с признаками криптококкоза составило 21 человек (0,3% ДИ 0,2-0,4%) – из них 8 с ВИЧ-инфекцией (38,1%). Иммунологические исследования на *Cryptococcus* антигенемия у больных с лабораторными признаками криптококкоза не проводились.

Анализ данных лабораторной диагностики поражений легких, вызванных редко встречающимися дрожжевыми возбудителями

Признаки редкой дрожжевой инфекции легких были обнаружены у 119 из 7657 больных туберкулезом (1,6% ДИ 1,3-1,9%): колонизация дыхательных путей редко встречающимися дрожжевыми возбудителями – у 114 из 7369 больных (1,6% ДИ 1,3-1,9%); выделение возбудителя из легочной полости (каверна, туберкулема) – у 3 из 613 больных (0,5% ДИ 0,1-1,4%); выделение возбудителя из плевральной полости – у 2 из 425 больных (0,5% ДИ 0,06-1,7%). Данными прямой микроскопии (обнаружение артроконидий) подтверждено 15,2% случаев выявления у пациентов колонизации дрожжеподобными грибами (*G. candidum* (Рисунок 7А), *Sapr. capitata* (Рисунок 7Б)); подтверждение микроскопией колонизации дрожжами (*Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Hanseniaspora*) не оценивалось из-за развития у большинства пациентов *Candida* spp.



А



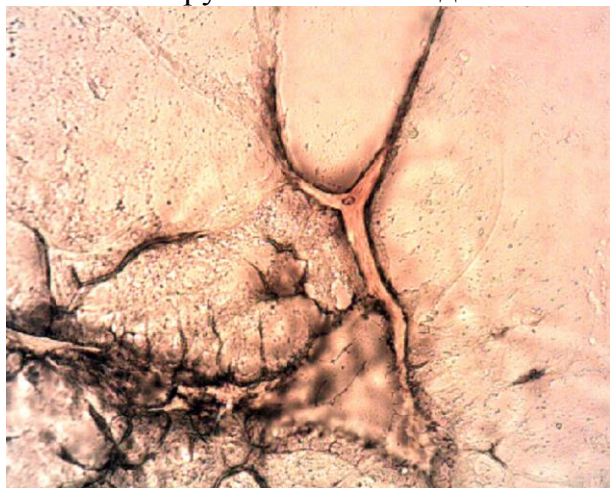
Б

Рисунок 7 – Элементы дрожжеподобных грибов в мазках мокроты (окраска по Граму)
Примечание: А) Структуры *Geotrichum candidum*, x400; Б) Структуры *Saprochaete capitata*, x1000

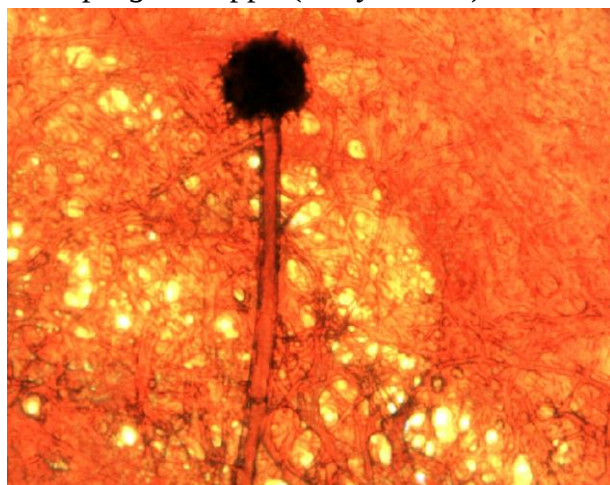
Возбудители данной группы были выявлены у 118 ВИЧ-отрицательных (1,6%) и 1 ВИЧ-инфицированного (2,6%) пациента – *Sacch. cerevisiae* (содержимое бронхов).

Результаты применения алгоритмов лабораторной диагностики для верификации бронхолегочных инфекций, вызванных мицелиальными грибами
Анализ данных лабораторной диагностики аспергиллеза

Признаки бронхолегочного аспергиллеза (культуральные исследования) были обнаружены у 675 из 7657 больных туберкулезом (8,8% ДИ 8,2-9,5%): колонизация дыхательных путей грибами *Aspergillus* – у 596 из 7369 больных (8,1% ДИ 7,5-8,7%); выделение возбудителя из легочной полости (каверна, туберкулема, киста) – у 62 из 613 больных (10,1% ДИ 7,8-12,8%); выделение возбудителя из плевральной полости (1 или 2 вида) – у 35 из 425 больных (8,2% ДИ 5,8-11,3%); выделение *A. fumigatus* из биоптата бронхов – у 2 из 17 больных (11,8%). Данными прямой микроскопии (обнаружены гифы мицелия) подтверждено: 10,9% случаев выявления у пациентов колонизации *Aspergillus* spp.; 17 случаев выделения возбудителя из полости легких (*A. flavus*, *A. fumigatus* (Рисунок 8А), *A. niger*, *A. terreus*). В 1,2% случаях колонизации в мазках обнаруживались конидиальные головки *Aspergillus* spp. (Рисунок 8Б).



А



Б

Рисунок 8 – Элементы *Aspergillus* spp. в мазках материала, х400

Примечание: А) Гифы мицелия *Aspergillus fumigatus* в мазке содержимого легочной каверны (нативный препарат); Б) Конидиальная головка *Aspergillus* spp., гифы мицелия в мазке БАЛ (окраска по Граму)

Грибы *Aspergillus* spp. выявлены только у ВИЧ-отрицательных пациентов.

У 8 из 82 пациентов (9,8%) обнаружено присутствие в крови антигена *Aspergillus* (у 87,5% пациентов с *Aspergillus* антигенемией при посеве биоматериала обнаружены 1-3 вида грибов *Aspergillus*). У 3 из 51 пациента (5,9%) обнаружены в диагностическом титре (1:640) антитела к *A. fumigatus* (у 100% больных с антителами к *A. fumigatus* был обнаружен грибок *A. fumigatus*).

По результатам микологических (биоматериалы, эндобронхиальный клапан) и иммунологических исследований общее число больных туберкулезом с признаками аспергиллеза составило 677 пациентов (8,8% ДИ 8,2-9,5%).

Анализ данных лабораторной диагностики зигомикоза

Признаки зигомикоза легких (культуральные исследования) были обнаружены у 27 из 7657 больных туберкулезом (0,4% ДИ 0,2-0,5%): колонизация дыхательных путей грибами *Zygomycota* порядка *Mucorales* – у 24 из 7369 больных (0,3% ДИ 0,2-0,5%), у 17 из 24 пациентов (70,8%) обнаружен *Rh. arrhizus*; выделение *Rh. arrhizus* из легочной каверны – у 1 из 613 больных (0,2% ДИ 0,004-0,9%); выделение *M. hiemalis*

из плевральной полости – у 2 из 425 больных (0,5% ДИ 0,06-1,7%). Данными прямой микроскопии (обнаружены гифы мицелия, характерные для зигомикетов) подтверждено 12,5% случаев выявления у пациентов колонизации зигомикетами.

Грибы *Zygomycota* выявлены только у ВИЧ-отрицательных пациентов.

Анализ данных лабораторной диагностики гиалогифомикозов

Признаки гиалогифомикоза легких были обнаружены у 238 из 7657 больных туберкулезом (3,1% ДИ 2,7-3,5%): колонизация дыхательных путей возбудителями гиалогифомикоза – у 218 из 7369 больных (3,0% ДИ 2,6-3,4%); выделение возбудителя из легочной полости (каверна, туберкулема, киста) – у 10 из 613 больных (1,6% ДИ 0,8-3,0%); выделение возбудителя из плевральной полости – у 11 из 425 больных (2,6% ДИ 1,3-4,6%). Данными прямой микроскопии (обнаружены гифы мицелия) подтверждено 6,4% случаев выявления у пациентов колонизации возбудителями гиалогифомикоза.

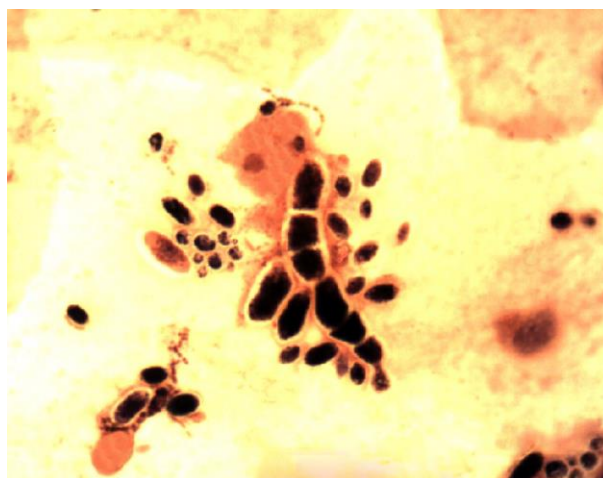
Возбудители гиалогифомикоза, были выявлены у 237 ВИЧ-отрицательных (3,1%) и 1 ВИЧ-инфицированного (2,6%) пациента – *P. citrinum* (мокрота).

Анализ данных лабораторной диагностики феогифомикозов

Признаки феогифомикоза легких были обнаружены у 70 из 7657 больных туберкулезом (0,9% ДИ 0,7-1,2%): колонизация дыхательных путей феогифомикетами – у 57 из 7369 больных (0,8% ДИ 0,6-1,0%); выделение возбудителя из легочной полости (каверна, туберкулема) – у 9 из 613 больных (1,5% ДИ 0,7-2,8%); выделение возбудителя из плевральной полости – у 6 из 425 больных (1,4% ДИ 0,5-3,1%). Данными прямой микроскопии (обнаружены гифы мицелия) подтверждено 5,3% случаев выявления у пациентов колонизации феогифомикетами, в 3,5% случаев обнаружены характерные для феоидных грибов элементы (Рисунок 9).



А



Б

Рисунок 9 – Элементы феоидных грибов в мазках материала (окраска по Граму)

Примечание: А) Конидия в мазке БАЛ, x400; Б) Элементы *Aureobasidium pullulans* в мазке мокроты, x1000

Феоидные грибы выявлены только у ВИЧ-отрицательных пациентов.

К группе высокого риска развития глубокого микоза с поражением легких отнесены 2198 из 7683 пациентов (28,6% ДИ 27,6-29,6%). Критерии для включения в группу: повторное выделение возбудителя кандидоза одного вида из мокроты ($>1 \times 10^3$ КОЕ/мл); выделение гриба из содержимого бронхов; выделение гриба из бронхиального биоптата; выделение гриба из легочной или плевральной полости, или с поверхности эндобронхиального клапана; кандидемия; выделение *Cr. neoformans* из СМЖ; *Aspergillus*, *Candida* или *Cryptococcus* антигенемия.

Результаты определения чувствительности к противогрибковым препаратам дрожжевых и мицелиальных грибов, выделенных от больных туберкулезом

С целью установления уровней чувствительности к антимикотикам (азолы: флуконазол, итраконазол, вориконазол, позаконазол, кетоконазол; эхинокандины: анидулафунгин, каспофунгин, микафунгин; амфотерицин В; флуцитозин) у грибов *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., возбудителей редких дрожжевых микозов были проведены специальные скрининговые исследования 631 клинического штамма возбудителей (тест-система «Sensititre»; TREK Diagnostic Systems, США). Выявленные характеристики позволили провести оценку целесообразности тестирования чувствительности *in vitro* к широко применяемым в терапии лекарственным препаратам у возбудителей аспергиллеза, кандидоза, криптококкоза и возбудителей редких дрожжевых инфекций перед назначением лекарственной терапии (Таблицы 6-8). При оценке активности антимикотиков в отношении видов без клинических пограничных значений учитывались критерии устойчивости, установленные для других видов данного рода (*Aspergillus*, *Candida*) и преобладающие значения в диапазоне концентраций препарата в системе «Sensititre».

Характеристика лекарственной чувствительности 14 видов грибов рода *Candida*

Выявленная высокая активность 3 препаратов – анидулафунгин, микафунгин, амфотерицин В против всех 14 видов *Candida* предполагает их успешное применение для терапии кандидоза (таблица 6). Активность препарата каспофунгин была ограничена наличием устойчивости у части штаммов *C. krusei* (устойчивость *in vitro* с МПК 1 мкг/мл обнаружена у 3 из 36 штаммов *C. krusei* или 8,3%; общая доля чувствительных к каспофунгину штаммов *Candida* spp. составила 98,8%).

С помощью установленных CLSI клинических пограничных значений было обнаружено: 64 из 243 (26,3%) штаммов устойчивых к флуконазолу (*C. albicans* – 8 штаммов (7,9%), *C. glabrata* – 7 (12,7%), *C. krusei* – 36 (100%), *C. parapsilosis* – 7 (35,0%), *C. tropicalis* – 6 (19,35%)); 20 из 330 (6,0%) штаммов устойчивых к итраконазолу (*C. albicans* – 2 (2,0%), *C. glabrata* – 17 (30,9%), *C. tropicalis* – 1 (3,2%)); 3 из 188 (1,6%) штаммов устойчивых к вориконазолу (*C. albicans* – 1 (1,0%), *C. parapsilosis* – 1 (5,0%), *C. tropicalis* – 1 (3,2%)). У видов без установленных критериев вероятная устойчивость к флуконазолу (МПК $\geq$ 8 мкг/мл) была обнаружена у 44 из 87 (50,6%) штаммов (*C. dubliniensis* – 4 (40,0%), *C. guilliermondii* – 7 (58,3%), *C. lipolytica* – 10 (100,0%), *C. norvegensis* – 10 (100,0%), *C. rugosa* – 5 (50,0%), *C. zeylanoides* – 8 (80,0%)); вероятная устойчивость к вориконазолу (МПК $\geq$ 2 мкг/мл) – у 5 из 142 (3,5%) штаммов (*C. glabrata* – 5 (9,1%)). Вероятная устойчивость к позаконазолу (МПК $>$ 8 мкг/мл) обнаружена у 7 из 330 (2,1%) штаммов *Candida* spp. (*C. glabrata* – 6 (10,9%), *C. tropicalis* – 1 (3,2%)). Группа изолятов с перекрестной устойчивостью к 4 триазолам (флуконазол, итраконазол (критерии CLSI), вориконазол (критерии CLSI или вероятная устойчивость), позаконазол (вероятная устойчивость)) включала 6 штаммов (1,8%) 2 видов: *C. glabrata* (5 штаммов, из них 2 – выделенные из крови), *C. tropicalis* (1). Устойчивые к вориконазолу штаммы *C. albicans* (1) и *C. parapsilosis* (1) обладали перекрестной устойчивостью к флуконазолу.

Согласно проявляемой *in vitro* активности препарата флуконазол, к группе чувствительных к флуконазолу возбудителей были отнесены 3 из 14 видов (*C. albicans*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*); к группе возбудителей с вариативной или сниженной чувствительностью – 10 видов (*C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis*, *C. parapsilosis*, *C. rugosa*, *C. tropicalis*, *C. zeylanoides*); к устойчивым возбудителям – 1 вид с исходной резистентностью (*C. krusei*).

Таблица 6 – Оценка необходимости тестирования чувствительности *in vitro* к семи противогрибковым препаратам у основных и редких возбудителей кандидоза

Вид n1, n2	Препарат; обнаруженные значения МПК в клинической интерпретации или диапазон МПК (мкг/мл)						
	FZ	IZ	VOR	AND	CAS	MF	AB
	(n1)	(n1)	(n1)	(n2)	(n1)	(n2)	(n1)
<i>C. albicans</i> 101, 80	(т) S/SDD/R	(т) S/SDD/R	(т) S/SDD/R	— S	— S	— S	— S/I
<i>C. dubliniensis</i> 10, 10	T 0,25-32	(т) S/SDD	— ≤0,008-0,5	— ≤0,015-0,06	— 0,03-0,12	— 0,015-0,12	— S
<i>C. famata</i> 2, 2	(т) 2-4	(т) S/SDD	— 0,03	— 0,12-0,25	— 0,25-0,5	— 0,03-0,12	— S
<i>C. glabrata</i> 55, 45	T SDD/R	T S/SDD/R	(т) 0,03-8	— S	— S	— S	— S/I
<i>C. guilliermondii</i> 12, 12	T 1->256	(т) S/SDD	— 0,03-1	— S	— S	— S	— S/I
<i>C. kefyr</i> 13, 10	— ≤0,12-2	— S	— ≤0,008-0,06	— 0,06-0,12	— 0,015-0,06	— 0,015-0,06	— S/I
<i>C. krusei</i> 36, 29	— R	(т) S/SDD	(т) S/SDD	— S	T S/R	— S	— S
<i>C. lipolytica</i> 10, 10	T 8-32	— S	— 0,03-0,25	— ≤0,015-0,06	— 0,015-0,12	— 0,015-0,03	— S
<i>C. lusitaniae</i> 10, 10	— 0,5-4	(т) S/SDD	— ≤0,008-0,06	— 0,06-0,25	— 0,12-0,5	— 0,06-0,12	— S
<i>C. norvegensis</i> 10, 10	T 8-32	(т) S/SDD	— 0,06-0,12	— ≤0,015-0,03	— 0,06-0,12	— ≤0,008-0,015	— S
<i>C. parapsilosis</i> 20, 18	T S/R	(т) S/SDD	(т) S/SDD/R	— S	— S	— S	— S
<i>C. rugosa</i> 10, 10	T 2-64	(т) S/SDD	— 0,03-0,25	— ≤0,015-0,5	— 0,06-0,5	— 0,015-0,5	— S
<i>C. tropicalis</i> 31, 22	T S/SDD/R	(т) S/SDD/R	(т) S/SDD/R	— S	— S	— S	— S
<i>C. zeylanoides</i> 10, 10	T 4-32	(т) S/SDD	— 0,015-0,25	— ≤0,015-0,03	— 0,015-2	— 0,015-0,03	— S

Примечание: FZ – флуконазол, IZ – итраконазол, VOR – вориконазол, AND – анидулафунгин, CAS – каспофунгин, MF – микафунгин, AB – амфотерицин В; n1, n2 – число протестированных штаммов; S – чувствительные к препарату штаммы, SDD – чувствительные-дозозависимые штаммы, I – штаммы с вероятной промежуточной чувствительностью, R – устойчивые штаммы

T – необходимо определять чувствительность до начала лечения;

(т) – определять чувствительность следует для распознавания чувствительных и дозозависимых к препарату штаммов или в случае клинической неэффективности терапии;

— определять чувствительность не требуется;

* – у отдельных штаммов возможно развитие вторичной устойчивости к препарату

Вторичная устойчивость к флуконазолу у *C. albicans* развивалась преимущественно (в 7 из 8 случаев; 87,5%) и достоверно чаще ($p=0,00044$ с применением точного критерия Фишера) у штаммов, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов.

Препараты вориконазол и итраконазол проявляли необходимую высокую активность против 13 из 14 видов *Candida* spp.; уровень активности препаратов снижался в отношении *C. glabrata*. Гриб *C. glabrata* обладает сниженной чувствительностью к флуконазолу и итраконазолу, а также вариативной чувствительностью к вориконазолу и позаконазолу (эффективность азольных препаратов в терапии инфекций, вызванных *C. glabrata*, может быть ограничена). При оценке различия в чувствительности штаммов *C. glabrata* (55 штаммов) и остальных штаммов *Candida* spp. (275 штаммов) к триазолам (флуконазол, итраконазол, вориконазол, позаконазол) были выявлены достоверно значимые различия для всех 4 препаратов ($p<0,01$ с использованием t-критерия Стьюдента).

Установленный диапазон МПК кетоконазола ($\leq 0,008-4$ мкг/мл) доказывает его высокую активность против грибов *Candida* spp. Доля чувствительных к флуцитозину штаммов *Candida* spp. составляла 90,9%; устойчивые к препарату штаммы обнаружены у *C. krusei* (5,6%), *C. lusitaniae* (20,0%), *C. tropicalis* (6,4%).

Перед назначением лекарственной терапии кандидоза целесообразно проводить тестирование чувствительности (Таблица 6): к флуконазолу – у *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis*, *C. parapsilosis*, *C. rugosa*, *C. tropicalis*, *C. zeylanoides* (наличие вариативной чувствительности); у штаммов *C. albicans*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов (вероятность вторичной устойчивости); к итраконазолу – у *C. glabrata* (наличие сниженной чувствительности); к вориконазолу – у штаммов *C. glabrata*, выделенных из крови (вероятность устойчивости); к позаконазолу – у *C. glabrata* (наличие вариативной чувствительности); к каспофунгину – у *C. krusei* (вероятность устойчивости).

Характеристика лекарственной чувствительности 8 видов грибов родов

Cryptococcus, Geotrichum, Hanseniaspora, Rhodotorula, Saccharomyces, Saprochaete

Изучена чувствительность к антимикотикам у 27 штаммов дрожжевых аскомицетов (*Geotrichum, Hanseniaspora, Saccharomyces, Saprochaete*) и 31 штамма дрожжевых базидиомицетов (*Cryptococcus, Rhodotorula*).

Препарат амфотерицин В был высоко активен против всех исследованных возбудителей криптококкоза (2 вида) и редких дрожжевых инфекций (6 видов) с МПК от 0,12 до 2 мкг/мл, что предполагает его использование для терапии без предварительного тестирования чувствительности *in vitro* (Таблица 7).

Флуконазол не был активен (МПК $\geq$ 256 мкг/мл – максимальные значения) против 16 из 58 (27,6%) штаммов (*Rh. glutinis* – 4 (100,0%), *Rh. mucilaginosa* – 12 (100,0%)); итраконазол не был активен (МПК $>$ 16 мкг/мл) против 5 из 58 (8,6%) штаммов (*Rh. glutinis* – 1 (25,0%), *Rh. mucilaginosa* – 4 (33,3%)); позаконазол не был активен (МПК $>$ 8 мкг/мл) против 4 из 58 (6,9%) штаммов (*Rh. mucilaginosa* – 4 (33,3%)). Низкая чувствительность к вориконазолу (МПК $\geq$ 4 мкг/мл) обнаружена у 9 из 58 (2,1%) штаммов (*Rh. glutinis* – 2 (50,0%), *Rh. mucilaginosa* – 7 (58,3%)). Согласно полученным результатам (диапазоны МПК, показатели МПК₅₀ и МПК₉₀), базидиомицетовые дрожжи *Rhodotorula* обладают устойчивостью к флуконазолу и общей низкой чувствительностью к триазолам; с помощью критерия Манна-Уитни выявлены достоверно значимые различия ($p<0,01$) в активности 4 триазолов против *Rhodotorula* (16 штаммов) и группы штаммов *Cryptococcus, Geotrichum,*

Hanseniaspora, *Saccharomyces*, *Saprochaete* (42 штамма). Препараты вориконазол, итраконазол, позаконазол проявляли активность против дрожжей *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, *Saprochaete*; активность флуконазола была ниже (варьировала), с наличием вероятно устойчивых штаммов (МПК $\geq$ 16 мкг/мл) у *Cr. neoformans* (1 из 12 штаммов; 8,3%), *Cr. laurentii* (2 из 3; 66,7%), *G. candidum* (6 из 14; 42,9%), *Sapr. capitata* (1 из 2; 50,0%). У возбудителей криптококкоза и аскомицетовых дрожжей не из рода *Candida* необходимо определять чувствительность к флуконазолу до начала лечения (Таблица 7).

Таблица 7 – Оценка необходимости тестирования чувствительности *in vitro* к семи противогрибковым препаратам у возбудителей криптококкоза и редких дрожжевых микозов

Вид n	Препарат, обнаруженный диапазон МПК (мкг/мл) и устойчивые к препарату виды						
	FZ	IZ	VOR	AND	CAS	MF	AB
<i>Cr. laurentii</i> 3	T 2-32	(т) 0,12	(т) 0,06-0,5	T 0,5->8	T 1-16	T 0,25->8	— 0,25-1
<i>Cr. neoformans</i> 12	T 2-16	(т) 0,03-0,5	(т) 0,015-0,25	— R >8	— R 16	— R >8	— 0,25-1
<i>G. candidum</i> 14	T 2-32	(т) 0,06-0,5	(т) 0,015-0,25	(т) $\leq$ 0,015-2	T 0,06-16	(т) 0,015-0,5	— 0,25-2
<i>H. uvarum</i> 1	T 8	(т) 0,5	(т) 0,25	(т) 0,03	(т) 0,06	(т) 0,015	— 1
<i>Rh. glutinis</i> 4	— R >256	T 0,5->16	T 1-4	— R >8	— R 16	— R >8	— 0,5-1
<i>Rh. mucilaginosa</i> 12	— R 256->256	T 0,5->16	T 0,5-8	— R >8	— R 8->16	— R >8	— 0,12-0,5
<i>Sacch. cerevisiae</i> 10	T 0,5-8	(т) 0,06-1	(т) 0,015-0,25	(т) 0,12-0,25	(т) 0,06-0,5	(т) 0,06-0,25	— 0,25-1
<i>Sapr. capitata</i> 2	T 8-16	(т) 0,06-0,25	(т) 0,12-0,25	(т) 0,25-2	T 1-8	(т) 0,12-0,5	— 0,5-1

Примечание: FZ – флуконазол, IZ – итраконазол, VOR – вориконазол, AND – анидулафунгин, CAS – каспофунгин, MF – микафунгин, AB – амфотерицин В; n – число протестированных штаммов; R – виды с природной устойчивостью к препарату

T – необходимо определять чувствительность до начала лечения;

(т) – определять чувствительность следует в случае клинической неэффективности терапии;

— – определять чувствительность не требуется

Чувствительность дрожжей не из рода *Candida* к препаратам группы эхинокандинов коррелировала с принадлежностью к аскомицетовым грибам (наличие вероятной чувствительности; у *G. candidum* и *Sapr. capitata* обнаружена вариативная чувствительность к каспофунгину) или базидиомицетовым грибам (наличие природной устойчивости; анидулафунгин, каспофунгин, микафунгин не проявляли активности (МПК $\geq$ 8 мкг/мл) против 30 из 31 (96,8%) штаммов *Cryptococcus*, *Rhodotorula*). При оценке различия в чувствительности групп аскомицетовых (27 штаммов) и базидиомицетовых (31 штамм) возбудителей к эхинокандинам (анидулафунгин, каспофунгин, микафунгин) были выявлены достоверно значимые различия для всех 3 препаратов ($p<0,01$ с использованием критерия Манна-Уитни).

Активностью в отношении *Cr. neoformans* (штаммы возбудителей криптококкоза ЦНС, легких) обладали амфотерицин В, азольные препараты (вориконазол, флуконазол, итраконазол, позаконазол, кетоконазол), флуцитозин и не обладали эхинокандины (анидулафунгин, каспофунгин, микафунгин). Клинические штаммы всех 8 исследованных видов дрожжей, включая *Rhodotorula* spp., проявляли чувствительность к препаратам кетоконазол (с МПК от 0,015 до 0,5 мкг/мл) и флуцитозин (с МПК от $\leq 0,03$ до 8 мкг/мл).

Характеристика лекарственной чувствительности 12 видов мицелиальных грибов рода *Aspergillus*

Применяемые в терапии аспергиллеза триазольные препараты (вориконазол, итраконазол, позаконазол) проявляли, в целом, высокую активность против грибов рода *Aspergillus* (Таблица 8). У видов с установленными EUCAST пограничными значениями МПК не было выявлено штаммов, устойчивых к вориконазолу (*A. fumigatus*), итраконазолу (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. terreus*), позаконазолу (*A. fumigatus*, *A. terreus*). Среди протестированных *Aspergillus* 12 видов вероятная устойчивость к вориконазолу (МПК ≥ 4 мкг/мл) была обнаружена у 10 из 243 (4,1%) штаммов (*A. nidulans* – 1 (9,1%), *A. niger* – 1 (3,1%), *A. ustus* – 8 (61,5%)); вероятная устойчивость к итраконазолу (МПК ≥ 4 мкг/мл) – у 2 из 243 (0,8%) штаммов (*A. ustus* – 2 (15,4%)); вероятная устойчивость к позаконазолу (МПК ≥ 4 мкг/мл) – у 6 из 243 (2,5%) штаммов (*A. nidulans* – 1 (9,1%), *A. ustus* – 5 (38,5%)). Всего было обнаружено 11 из 243 штаммов (4,5%) с низкой чувствительностью к 1, 2 или 3 триазолам: *A. ustus* (9 штаммов (69,2%), из них 4 (30,8%) полирезистентных), *A. nidulans* (1 полирезистентный штамм (9,1%)), *A. niger* (1 штамм (3,1%)). С учетом установленных величин показателей МПК₅₀ и МПК₉₀ триазолов, гриб *A. ustus* следует расценивать как единственный (1 из 12) вид с вариативной (пониженной) чувствительностью к вориконазолу, итраконазолу и позаконазолу; с помощью критерия Манна-Уитни выявлены достоверно значимые различия ($p < 0,01$) в активности 3 триазолов против *A. ustus* (13 штаммов) и группы остальных штаммов *Aspergillus* spp. (230 штаммов).

Установлена вариабельная активность амфотерицина В против *Aspergillus* spp., зависящая от видовой принадлежности штамма: обнаружены 3 из 12 возбудителей со сниженной чувствительностью к препарату (МПК в интервале от 2 до 8 мкг/мл): *A. terreus* (природная устойчивость), *A. flavus*, *A. ochraceus* (Таблица 8). Группа устойчивых (*A. terreus*) и вероятно устойчивых (другие возбудители с МПК ≥ 4 мкг/мл) к амфотерицину В штаммов *Aspergillus* spp. составила 21,8% (53 из 243) (*A. terreus* – 22 (100%); *A. flavus* – 10 (33,3%), *A. ochraceus* – 9 (81,8%), *A. oryzae* – 1 (20,0%), *A. sydowii* – 4 (33,3%), *A. ustus* – 3 (23,1%), *A. versicolor* – 4 (30,8%)). По уровню чувствительности к амфотерицину В 12 возбудителей были разделены на 3 группы: чувствительные к препарату (*A. flavipes*, *A. fumigatus*, *A. glaucus*, *A. nidulans*, *A. niger*); с вариативной или сниженной чувствительностью (*A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. oryzae*, *A. sydowii*, *A. ustus*, *A. versicolor*); устойчивые к препарату (*A. terreus*).

Были обнаружены: отсутствие активности у флуконазола и флуцитозина в отношении всех 12 возбудителей аспергиллеза; отсутствие фунгицидной активности у эхинокандинов в отношении *Aspergillus* spp., за исключением *A. glaucus* (тестирование для рутинных исследований фунгистатического или фунгицидного действия эхинокандинов на возбудителей аспергиллеза не целесообразно, ввиду недостаточной стандартизации методики учета результатов и неопределенной клинической значимости получаемых данных); вариативная активность кетоконазола против *Aspergillus* spp. в широком интервале МПК от 0,03 до > 16 мкг/мл.

При обнаружении возбудителя аспергиллеза со сниженной чувствительностью к амфотерицину В (*A. flavus*, *A. ochraceus*) или триазольным антимикотикам (*A. ustus*, *A. nidulans* – позаконазол) выбор препарата для эффективной терапии целесообразно проводить на основании данных лабораторных исследований *in vitro* (Таблица 8).

Таблица 8 – Оценка необходимости тестирования чувствительности *in vitro* к четырем противогрибковым препаратам у основных и редких возбудителей аспергиллеза

Вид n	Препарат; обнаруженные значения МПК в клинической интерпретации и/или диапазон МПК (мкг/мл)			
	AB	VOR	IZ	PZ
<i>A. flavipes</i> 5	— 0,5-1	— 0,12-0,5	— 0,12-0,25	— 0,06-0,25
<i>A. flavus</i> 30	T 2-8	— 0,12-1	— S (0,06-0,5)	— 0,06-0,5
<i>A. fumigatus</i> 77	— S/I (0,5-2)	— S (0,06-1)	— S (0,03-1)	— S/I (0,015-0,25)
<i>A. glaucus</i> 12	— 0,5-1	— 0,03-0,25	— 0,015-0,12	— 0,015-0,06
<i>A. nidulans</i> 11	— 0,5-2	(т) 0,06-4	— S/I (0,06-2)	T 0,06->8
<i>A. niger</i> 32	— S/I (0,5-2)	(т) 0,25-8	— 0,25-2	— 0,12-0,5
<i>A. ochraceus</i> 11	T 2-8	— 0,06-1	— 0,12-0,5	— 0,06-0,5
<i>A. oryzae</i> 5	(т) 1-4	— 0,25-0,5	— 0,06-0,25	— 0,06-0,12
<i>A. sydowii</i> 12	(т) 1-4	— 0,25-2	— 0,25-1	— 0,06-1
<i>A. terreus</i> 22	— R (2-8)	— 0,12-1	— S (0,12-0,25)	— S/I (0,06-0,25)
<i>A. ustus</i> 13	(т) 1-4	T 0,25-8	T 0,12->16	T 0,12->8
<i>A. versicolor</i> 13	(т) 0,25-4	— 0,12-2	— 0,12-1	— 0,03-0,5

Примечание: AB – амфотерицин В, VOR – вориконазол, IZ – итраконазол, PZ – позаконазол; n – число протестированных штаммов; S – чувствительные к препарату штаммы, I – штаммы с промежуточной чувствительностью, R – устойчивые штаммы

T – необходимо определять чувствительность до начала лечения;

(т) – определять чувствительность следует в случае клинической неэффективности терапии;

— – определять чувствительность не требуется

ВЫВОДЫ

- У 67 видов грибов-оппортунистов установлена способность колонизировать нижние дыхательные пути больных туберкулезом, у 27 видов – развиваться в легочных полостях, у 31 вида – развиваться в плевральных полостях. Группа часто встречаемых возбудителей, обнаруживаемых при диагностике пневмомикозов у больных туберкулезом, включала 7 видов (2 возбудителя аспергиллеза *A. fumigatus*, *A. niger* и 5 возбудителей кандидоза *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. tropicalis*); группа среднераспространенных возбудителей – 31 вид; группа редко встречаемых возбудителей – 29 видов.

2. Наличие у больного туберкулезом полостного образования в легких является одним из существенных факторов риска, предрасполагающих к развитию оппортунистического легочного микоза; заселять сформировавшиеся полости в легких, вызывая микоз, способны возбудители аспергиллеза (8 видов), кандидоза (4 вида), криптококкоза (1 вид), зигомикоза (1 вид), гиалогифомикоза (7 видов), феогифомикоза (5 видов), редких дрожжевых микозов (1 вид). В 64,6% случаев из полостного образования в легких были выделены грибы рода *Aspergillus*.
3. Для возбудителей кандидоза (14 видов) характерна вариабельность чувствительности *in vitro* к флуконазолу (выраженная вариабельность) и итраконазолу; у некоторых видов вариативная чувствительность к флуконазолу и итраконазолу характерна и для отдельных клинических штаммов. Высокая активность в отношении возбудителей кандидоза характерна для вориконазола и позаконазола (ограничена наличием сниженной чувствительности у части штаммов *C. glabrata*), препаратов группы эхинокандинов (активность каспофунгина ограничена наличием устойчивости к препарату у части штаммов *C. krusei*), амфотерицина В.
4. Чувствительность не относящихся к роду *Candida* дрожжевых возбудителей к препаратам группы эхинокандинов коррелирует с принадлежностью к грибам *Ascomycota* (вероятная чувствительность у грибов родов *Geotrichum*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, *Saprochaete*) или *Basidiomycota* (вероятная устойчивость у грибов родов *Cryptococcus*, *Rhodotorula*); чувствительность к триазольным препаратам в значительной мере коррелирует с их видовой принадлежностью. Высокая активность в отношении дрожжевых грибов характерна для амфотерицина В, включая виды *Rhodotorula* (*Rh. mucilaginosa*, *Rh. glutinis*) с крайне низкими уровнями чувствительности к эхинокандинам и триазольным препаратам.
5. Для возбудителей аспергиллеза (12 видов) характерна вариабельность чувствительности *in vitro* к амфотерицину В. Высокая активность в отношении возбудителей аспергиллеза характерна для вориконазола (ограничена наличием сниженной чувствительности у части штаммов *A. ustus*, а также *A. nidulans*, *A. niger*); итраконазола (ограничена наличием сниженной чувствительности у части штаммов *A. ustus*); позаконазола (ограничена наличием сниженной чувствительности у части штаммов *A. ustus*, а также *A. nidulans*).
6. Необходимым условием эффективной диагностики пневмомикозов у больных туберкулезом органов дыхания является комплексное использование стандартизованных и диагностически значимых лабораторных методов (прямая микроскопия, культуральное исследование респираторного и хирургического материалов; иммунологические методики на обнаружение антигенов *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* и антител к антигенам грибов *Aspergillus*, *Candida* в крови), в рамках разработанного алгоритма. Использование молекулярно-генетических методов при идентификации грибов рода *Aspergillus* расширяет возможности проводимой лабораторной диагностики аспергиллеза и позволяет получать новые сведения о молекулярных свойствах возбудителей.
7. Интерпретацию значимых результатов лабораторной диагностики оппортунистических пневмомикозов у больных туберкулезом следует проводить в категориях «диагностически значимый признак микоза», «признак вероятного микоза», «признак колонизации», оценивая метод исследования и характер биоматериала, в котором выявлен вероятный возбудитель микоза, видовую

принадлежность, повторность и количественное содержание обнаруженного гриба.

8. Большинство присутствующих в воздухе противотуберкулезного стационара видов грибов (30 из 49 выделенных из воздуха плесневых микромицетов) были обнаружены в биоматериале на пневмомикоз у пациентов стационара; потенциально опасным для развития внутрибольничных микозов следует считать постоянное присутствие в воздухе спор грибов рода *Aspergillus*.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При диагностике пневмомикозов у больных туберкулезом рекомендуется проводить специальные микологические исследования (количественный посев с предварительным проведением первичной микроскопии) двух проб мокроты в динамике (на 1 и 2 сутки) и пробы материала, полученного при фибробронхоскопии.
2. Использование стандартизованных, доступных методик идентификации клинически значимых дрожжевых грибов по биохимическим характеристикам (хромогенные среды, ручные коммерческие тест-системы) в сочетании с исследованием клеточной морфологии и макроморфологии позволяет достоверно верифицировать дрожжевых возбудителей глубоких микозов. Для быстрой дифференциации аскомицетовых и базидиомицетовых дрожжей следует использовать биохимический тест на образование уреазы. Исследование микроморфологических признаков культуры необходимо проводить для быстрой и надежной дифференциации формирующих артроконидии дрожжеподобных грибов *Geotrichum*, *Saprochaete*, *Trichosporon* (во влажных неокрашенных препаратах с добавлением дистиллированной воды) и образующих капсулу дрожжей *Cryptococcus* (в тушевых препаратах).
3. Видовую идентификацию мицелиальных возбудителей глубоких микозов рекомендуется проводить после обязательного культивирования на специальных идентификационных средах, оценивая микроморфологические и макроморфологические признаки, а также способность культур к росту при 37°C. Для образования характерных микроскопических структур, окраски и формирования типичного роста колоний рекомендуется использовать среду агар Чапека-Докса, дополняя ее картофельно-декстрозным агаром и два температурных режима – 30°C и 37°C. Микроморфологию культуры следует изучать сразу после начала споруляции (во влажных неокрашенных препаратах с добавлением дистиллированной воды).
4. При обнаружении в качестве возбудителя бронхолегочного кандидоза *C. glabrata* (вид с вариативной чувствительностью к триазольным антимикотикам) перед назначением терапии рекомендуется проводить тестирование у штаммов чувствительности к антимикотикам с определением значений минимальных подавляющих концентраций и их последующей интерпретацией.
5. При обнаружении в качестве возбудителя бронхолегочного аспергиллеза *A. flavus*, *A. ochraceus* (виды со сниженной чувствительностью к амфотерицину В), *A. ustus* (вид с вариативной чувствительностью к триазольным антимикотикам) перед назначением терапии рекомендуется проводить тестирование у штаммов чувствительности к антимикотикам с определением значений минимальных подавляющих концентраций и их последующей интерпретацией.

ПЕРСПЕКТИВНЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Дальнейшее усовершенствование методологии лабораторной диагностики пневмомикозов во фтизиатрической клинике должно быть направлено на сокращение времени диагностики инвазивных и диссеминированных форм инфекции с включением новых перспективных диагностических иммунологических методик и адаптированием современных молекулярно-биологических методов и метода масс-спектрометрии для обнаружения и идентификации возбудителя.

Необходимо продолжить изучение уровней чувствительности возбудителей аспергиллеза, кандидоза, криптококкоза, редких дрожжевых глубоких микозов к широко применяемым и новым лекарственным препаратам в скрининговом формате; изучить возможность проведения тестирования и начать изучение уровней чувствительности к антимикотикам у возбудителей зигомикоза, гиамофимикоза, феогимфимикоза.

Видовой состав коллекции клинических штаммов грибов позволяет использовать ее для дальнейшего поиска и тестирования препаратов, обладающих антифунгальной активностью в отношении возбудителей оппортунистических глубоких микозов человека, а также для изучения механизмов резистентности и перекрестной резистентности к применяемым антимикотикам у устойчивых штаммов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Кулько, А.Б.** Инфекции нижних дыхательных путей, вызванные мицелиальными грибами у больных туберкулезом / **А.Б. Кулько, О.Е. Марфенина** // Успехи медицинской микологии. – 2003. – Т. 2. – С. 249-251.
2. **Кулько, А.Б.** Кандидозы нижних дыхательных путей у больных туберкулезом / **А.Б. Кулько, С.Д. Митрохин, Д.Е. Кузьмин** // Успехи медицинской микологии. – 2003. – Т. 2. – С. 251-252.
3. **Кулько, А.Б.** Лабораторная диагностика легочных микозов в клинике туберкулеза / **А.Б. Кулько, И.Р. Дорожкова, С.Д. Митрохин, А.М. Мороз, В.И. Литвинов** // Научно-практическая конференция по медицинской микологии (VI Кашкинские чтения). Тезисы докладов (Санкт-Петербург, 25-26 июня 2003 г.). Проблемы медицинской микологии. – 2003. – Т. 5, № 2. – С. 30.
4. **Кулько, А.Б.** Случай аспергиллеза легких, вызванного *Aspergillus terreus* / **А.Б. Кулько, А.В. Дубровский, Д.Е. Кузьмин** // Проблемы туберкулеза. – 2003. – № 12. – С. 30-32.
5. **Кулько, А.Б.** Грибковые инфекции при хронических заболеваниях плевры у больных туберкулезом / **А.Б. Кулько, В.Н. Трусов, А.А. Воробьев, Д.Е. Кузьмин** // Успехи медицинской микологии. – 2004. – Т. 4. – С. 229-230.
6. **Кулько, А.Б.** Риск развития фузариоза и других редких микозов у больных туберкулезом легких / **А.Б. Кулько, С.Д. Митрохин, Д.Е. Кузьмин, А.М. Мороз** // Успехи медицинской микологии. – 2004. – Т. 4. – С. 230-232.
7. **Кулько, А.Б.** Частота обнаружения оппортунистических грибов в бронхиальных смывах у больных туберкулезом легких / **А.Б. Кулько, Д.Е. Кузьмин, В.Н. Лавренова** // Научно-практическая конференция по медицинской микологии (VII Кашкинские чтения). Тезисы докладов (Санкт-Петербург, 23-25 июня 2004 г.). Проблемы медицинской микологии. – 2004. – Т. 6, № 2. – С. 88-89.
8. **Кулько, А.Б.** Итраконазол в суспензии в терапии инфекций дыхательных путей, вызванных грибами рода *Candida*, у больных туберкулезом легких / **А.Б. Кулько, И.И. Корниенко, О.В. Ловачева** // Успехи медицинской микологии. – 2005. – Т. 6. – С. 74-75.
9. **Кулько, А.Б.** Бронхолегочные инфекции, вызванные грибами рода *Candida*, во фтизиатрической практике / **А.Б. Кулько, С.Д. Митрохин, Д.Е. Кузьмин, В.Н. Лавренова** // Успехи медицинской микологии. – 2005. – Т. 6. – С. 75-77.
10. Ловачева, О.В. Эффективность лечения итраконазолом в суспензии поражений нижних дыхательных путей грибами рода *Candida* у больных туберкулезом легких / О.В. Ловачева, И.И. Корниенко, **А.Б. Кулько** // Проблемы туберкулеза. – 2005. – №. 3. – С. 14-16.

11. Маликов, В.Е. Стандартизация методов исследования в лабораторной диагностике кандидозов / В.Е. Маликов, В.Е. Колупаев, А.Б. Кулько // *Кремлевская медицина. Клинический вестник*. – 2005. – № 1. – С. 44-48.
12. Кулько, А.Б. Лабораторная диагностика грибковых инфекций легких у больных туберкулезом / А.Б. Кулько, С.Д. Митрохин // *Проблемы медицинской микологии*. – 2005. – Т. 7, № 3. – С. 25-29.
13. Кулько, А.Б. Микотическая инфекция дыхательных путей во фтизиатрической практике: видовой состав и чувствительность клинических штаммов грибов рода *Candida* к антифунгальным препаратам / А.Б. Кулько, С.Д. Митрохин, А.М. Мороз // *Антибиотики и химиотерапия*. – 2005. – Т. 50, № 4. – С. 14-17.
14. Василенко, О.В. Проблемы использования высоковариабельных локусов ITS для идентификации и генотипирования патогенных грибов на примере аспергиллов, близких к *A. versicolor* / О.В. Василенко, Г.М. Фомичева, А.Б. Кулько, Д.Е. Кузьмин, О.Е. Марфенина // *Успехи медицинской микологии*. – 2006. – Т. 8. – С. 106-107.
15. Кулько, А.Б. Лабораторная диагностика аспергиллеза легких у больных туберкулезом органов дыхания / А.Б. Кулько // *Успехи медицинской микологии*. – 2006. – Т. 8. – С. 125-126.
16. Кулько, А.Б. Мониторинг присутствия условно-патогенных грибов в воздухе противотуберкулезного стационара / А.Б. Кулько, С.К. Дядюнова // Научно-практическая конференция по медицинской микологии (IX Кашкинские чтения). Тезисы докладов (Санкт-Петербург, 20-21 июня 2006 г.). Проблемы медицинской микологии. – 2006. – Т. 8, № 2. – С. 53.
17. Кулько, А.Б. Лабораторная диагностика бронхолегочных микозов у больных туберкулезом с полостными образованиями в легких / А.Б. Кулько, П.А. Древаль, А.А. Воробьев, В.Н. Трусов // *Успехи медицинской микологии*. – 2007. – Т. 10. – С. 83-84.
18. Кулько, А.Б. Характеристика видового состава условно-патогенных грибов, выделенных от больных туберкулезом легких / А.Б. Кулько // Научные труды. К 80-летию ведущего противотуберкулезного учреждения г. Москвы, 10-летию МНПЦБТ: сб. трудов коллектива авторов МНПЦ борьбы с туберкулезом. – М.: МНПЦБТ, 2007. – С. 216-219.
19. Кулько, А.Б. Условно-патогенные грибы, выделенные от больных туберкулезом легких (характеристика видов) / А.Б. Кулько // *Проблемы туберкулеза*. – 2007. – № 10. – С. 61-62.
20. Ловачева, О.В. Лечение итраконазолом в суспензии патологической колонизации грибами дыхательных путей у больных туберкулезом легких / О.В. Ловачева, И.И. Корниенко, А.Б. Кулько, Л.В. Слогоцкая, В.И. Литвинов // *Проблемы туберкулеза*. – 2008. – № 1. – С. 42-46.
21. Кулько, А.Б. Частота обнаружения оппортунистических грибов в содержимом плевральных полостей у больных туберкулезом / А.Б. Кулько, П.А. Древаль // Научно-практическая конференция по медицинской микологии (XI Кашкинские чтения). Тезисы докладов (Санкт-Петербург, 19-20 июня 2008 г.). Проблемы медицинской микологии. – 2008. – Т. 10, № 2. – С. 57.
22. Кулько, А.Б. Лабораторная диагностика бронхолегочного аспергиллеза у больных туберкулезом с полостными образованиями в легких / А.Б. Кулько, П.А. Древаль, А.А. Воробьев, В.Н. Трусов // *Проблемы медицинской микологии*. – 2008. – Т. 10, № 4. – С. 25-28.
23. Кулько, А.Б. Исследование чувствительности к противогрибковым препаратам клинических штаммов *Candida krusei*, выделенных от больных туберкулезом легких / А.Б. Кулько // *Антибиотики и химиотерапия*. – 2008. – Т. 53, № 11-12. – С. 22-24.
24. Гренкова, Т.А. Эпидемиологическая безопасность бронхоскопических манипуляций для пациентов и персонала в диагностических центрах противотуберкулезных учреждений / Т.А. Гренкова, Е.П. Селькова, В.А. Алёшкин, А.И. Чижов, И.Р. Дорожкова, А.Б. Кулько, Д.Е. Кузьмин, Ю.Д. Исаева, А.М. Мороз // *Клиническая эндоскопия*. – 2009. – № 1(18). – С. 28-34.
25. Кулько, А.Б. Видовой состав возбудителей бронхолегочного аспергиллеза у больных туберкулезом органов дыхания / А.Б. Кулько, Е.Л. Исаева // Труды междисциплинарного микологического форума (Москва, 23-24 апреля 2009 г.). Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2009. – № 2. – С. 123-124.

26. **Кулько, А.Б.** Изменчивость клинических штаммов *Aspergillus fumigatus*, выделенных от больных туберкулезом легких / **А.Б. Кулько, О.Е. Марфенина, А.Е. Иванова** // Научно-практическая конференция по медицинской микологии (XII Кашкинские чтения). Тезисы докладов (Санкт-Петербург, 17-18 июня 2009 г.). Проблемы медицинской микологии. – 2009. – Т. 11, № 2. – С. 87-88.
27. **Марфенина, О.Е.** Сравнение молекулярных и эколого-физиологических свойств клинических и сапротрофных штаммов *Aspergillus sydowii* / **О.Е. Марфенина, Г.М. Фомичева, О.В. Василенко, А.Б. Кулько** // Научно-практическая конференция по медицинской микологии (XII Кашкинские чтения). Тезисы докладов (Санкт-Петербург, 17-18 июня 2009 г.). Проблемы медицинской микологии. – 2009. – Т. 11, № 2. – С. 96.
28. **Кулько, А.Б.** Лабораторная диагностика мукороза легких у больных туберкулезом органов дыхания / **А.Б. Кулько** // Труды II междисциплинарного микологического форума (Москва, 14-15 апреля 2010 г.). Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2010. – № 1. – С. 158.
29. **Марфенина, О.Е.** Особенности спорообразования у сапротрофных и клинических штаммов *Aspergillus sydowii* (Bain. & Sart.) Thom & Church в разных экологических условиях / **О.Е. Марфенина, Г.М. Фомичева, О.В. Василенко, Е.М. Наумова, А.Б. Кулько** // Микробиология. – 2010. – Т. 79, № 6. – С. 767-773.
30. **Кулько, А.Б.** Значение микологических исследований в современной фтизиатрической клинике / **А.Б. Кулько, И.Р. Дорожкова, Е.Л. Исаева, Д.Е. Кузьмин** // Научные труды. К 70-летию В.И. Литвинова: сб. трудов коллектива авторов МНПЦ борьбы с туберкулезом. – М.: МНПЦБТ, 2011. – С. 237-247.
31. **Кулько, А.Б.** Изменчивость клинических штаммов *Aspergillus flavus*, выделенных от больных туберкулезом легких / **А.Б. Кулько** // Научно-практическая конференция по медицинской микологии (XIV Кашкинские чтения). Тезисы докладов (Санкт-Петербург, 22-23 июня 2011 г.). Проблемы медицинской микологии. – 2011. – Т. 13, № 2. – С. 87.
32. **Кулько, А.Б.** Методические подходы к проведению микологических исследований во фтизиатрической практике / **А.Б. Кулько, И.Р. Дорожкова, Е.Л. Исаева, Д.Е. Кузьмин** // Туберкулез и болезни легких. – 2011. – № 6. – С. 56-59.
33. **Кулько, А.Б.** Изменчивость клинических штаммов *Aspergillus terreus*, выделенных от больных туберкулезом легких / **А.Б. Кулько** // Научно-практическая конференция по медицинской микологии (XV Кашкинские чтения). Тезисы докладов (Санкт-Петербург, 27-28 июня 2012 г.). Проблемы медицинской микологии. – 2012. – Т. 14, № 2. – С. 101.
34. **Дорожкова, И.Р.** Организация биобезопасных условий работы в медицинском учреждении инфекционного профиля / **И.Р. Дорожкова, Г.Е. Фрейман, Л.В. Ивушкина, С.К. Дядюнова, А.Б. Кулько, С.Е. Борисов** // Менеджер здравоохранения: ежемесячный научно-практический журнал. – 2012. – № 10. – С. 19-26.
35. **Кулько, А.Б.** Спектр возбудителей глубоких микозов человека / **А.Б. Кулько** // Онкогематология. – 2012. – № 3. – С. 55-61.
36. **Кулько, А.Б.** Изменчивость клинических штаммов *Aspergillus nidulans*, выделенных от больных туберкулезом легких / **А.Б. Кулько** // Научно-практическая конференция по медицинской микологии (XVI Кашкинские чтения). Тезисы докладов (Санкт-Петербург, 19-21 июня 2013 г.). Проблемы медицинской микологии. – 2013. – Т. 15, № 2. – С. 94.
37. **Кулько, А.Б.** Редко встречающиеся возбудители аспергиллеза: видовой состав, особенности идентификации, чувствительность к противогрибковым препаратам *in vitro* / **А.Б. Кулько, Н.Е. Иванушкина** // Успехи медицинской микологии. – 2013. – Т. 11. – С. 22-25.
38. **Кулько, А.Б.** Чувствительность к противогрибковым препаратам клинических штаммов грибов рода *Candida*, выделенных от больных туберкулезом легких / **А.Б. Кулько** // Туберкулез и социально значимые заболевания. – 2013. – № 2. – С. 35-38.
39. **Кулько, А.Б.** Грибы рода *Aspergillus* в полостных образованиях в легких у больных туберкулезом: видовой состав и чувствительность к антимикотикам / **А.Б. Кулько** // Успехи медицинской микологии. – 2014. – Т. 12. – С. 182-183.
40. **Кулько, А.Б.** Исследование чувствительности к противогрибковым препаратам клинических штаммов *Candida glabrata*, выделенных от больных туберкулезом легких / **А.Б. Кулько** // Успехи медицинской микологии. – 2014. – Т. 12. – С. 184-186.

41. Кулько, А.Б. Микозы у ВИЧ-инфицированных больных туберкулезом: видовой состав дрожжевых грибов и чувствительность к противогрибковым препаратам / А.Б. Кулько // Успехи медицинской микологии. – 2015. – Т. 14. – С. 135-138.
42. Кулько, А.Б. Активность *in vitro* анидулафунгина в отношении дрожжевых грибов – возбудителей системных и диссеминированных микозов / А.Б. Кулько // Онкогематология. – 2015. – Т. 10, № 3. – С. 51-55.
43. Кулько, А.Б. Активность *in vitro* противогрибковых препаратов в отношении дрожжевых грибов – возбудителей оппортунистических микозов / А.Б. Кулько, Н.И. Федорова // Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова. – 2015. – Т. 10, № 4. – С. 62-64.
44. Федорова, Н.И. Исследование чувствительности к противогрибковым препаратам клинических штаммов *Candida parapsilosis*, выделенных в стационарах разного профиля / Н.И. Федорова, А.Б. Кулько // Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова. – 2015. – Т. 10, № 4. – С. 69-71.
45. Кулько, А.Б. Видовой состав и чувствительность к противогрибковым препаратам штаммов дрожжевых грибов, выделенных от больных с коинфекцией ВИЧ/туберкулез / А.Б. Кулько, Т.Л. Тарасенко // Туберкулез и социально значимые заболевания. – 2015. – № 4. – С. 34-37.
46. Кулько, А.Б. Риск развития криптококкоза у больных туберкулезом органов дыхания / А.Б. Кулько, И.А. Максимова // Успехи медицинской микологии. – 2016. – Т. 16. – С. 24-27.
47. Кулько, А.Б. Лабораторная диагностика легочного аспергиллеза у больных туберкулезом органов дыхания: алгоритм исследований и критерии интерпретации получаемых результатов / А.Б. Кулько // Туберкулез и социально значимые заболевания. – 2016. – № 2. – С. 49-53.
48. Кулько, А.Б. Исследование тионинов семян черного тмина (*Nigella sativa*), обладающих цитотоксической, регуляторной и антифунгальной активностью / А.Б. Кулько, О.В. Кисиль, В.С. Садыкова, В.Ф. Михайлов, И.М. Васильева, Л.В. Шуленина, Г.Д. Засухина, Е.А. Рогожин // Антибиотики и химиотерапия. – 2016. – Т. 61, № 9-10. – С. 8-16.
49. Кулько, А.Б. Активность *in vitro* амфотерицина В, вориконазола, итраконазола и позаконазола в отношении основных и редко встречающихся возбудителей аспергиллеза / А.Б. Кулько // Успехи медицинской микологии. – 2017. – Т. 17. – С. 333-336.
50. Кулько, А.Б. Критерии интерпретации результатов лабораторных исследований при диагностике оппортунистических бронхолегочных микозов различной этиологии / А.Б. Кулько, Н.И. Федорова, А.О. Жерносенко // Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова. – 2017. – Т. 12, № 2. – С. 117-120.
51. Кулько, А.Б. Изучение чувствительности к противогрибковым препаратам грибов рода *Aspergillus* – возбудителей бронхолегочных инфекций у больных туберкулезом / А.Б. Кулько // Туберкулез и болезни легких. – 2017. – Т. 95, № 7. – С. 54-60.
52. Кулько, А.Б. Исследование свойств клинических штаммов дрожжевого гриба *Hanseniaspora uvarum* (*Kloeckera apiculata*), способного колонизировать дыхательные пути у больных туберкулезом органов дыхания / А.Б. Кулько, И.А. Максимова // Успехи медицинской микологии. – Т. 18. – 2018. – С. 395-398.
53. Садыкова, В.С. Экстремофильные грибы – продуценты антимикробных пептидов / В.С. Садыкова, А.А. Баранова, Е.А. Рогожин, М.Л. Георгиева, В.А. Алферова, Р.А. Габрия, Е.Н. Биланенко, А.Б. Кулько // Успехи медицинской микологии. – Т. 19. – 2018. – С. 211-214.
54. Кулько, А.Б. Сравнительная активность *in vitro* противогрибковых препаратов в отношении возбудителей бронхолегочного аспергиллеза / А.Б. Кулько, Н.И. Федорова // Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова. – 2018. – Т. 13, № 4. – С. 75-79.
55. Кулько, А.Б. Характеристика лекарственной чувствительности клинических штаммов 14 видов грибов рода *Candida*, выделенных от больных туберкулезом при диагностике бронхолегочных и диссеминированных микозов / А.Б. Кулько, С.Г. Сафонова // Туберкулез и социально значимые заболевания. – 2018. – № 4. – С. 28-34.
56. Баранова, А.А. Антимикробные пептиды алкалофильных грибов *Emericellopsis alkalina*: биосинтез и биологическая активность в отношении патогенных грибов с множественной

- резистентностью / А.А. Баранова, Е.А. Рогожин, М.Л. Георгиева, Е.Н. Биланенко, **А.Б. Кулько**, А.В. Якушев, В.А. Алферова, В.С. Садыкова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2019. – Т. 55, № 2. – С. 151-157.
57. **Кулько, А.Б.** Исследование видового состава и чувствительности к антимикотикам возбудителей кандидемии у больных туберкулезом / **А.Б. Кулько** // Успехи медицинской микологии. – Т. 20. – 2019. – С. 265-270.
 58. **Кулько, А.Б.** Характеристика лекарственной чувствительности клинических штаммов грибов – возбудителей криптококкоза и редких дрожжевых инфекций, выделенных во фтизиатрической клинике / **А.Б. Кулько, С.Г. Сафонова** // **Туберкулез и социально значимые заболевания.** – 2019. – № 1. – С. 32-36.
 59. Щелканова, А.И. Медико-социальная характеристика больных туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией, на этапе оказания специализированной стационарной помощи / А.И. Щелканова, М.В. Синицын, Н.И. Чистякова, Е.А. Долгова, **А.Б. Кулько**, А.В. Кравченко // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2019. – Т. 8, № 1. – С. 40-46.
 60. **Kulko, A.B.** Mycoflora of the lower respiratory tract in patients with a pulmonary tuberculosis / **A.B. Kulko, D.E. Kuzmin, V.N. Lavrenova, S.D. Mitrokhin, A.M. Moroz** // Abstract book 3rd Congress of European Region International Union against Tuberculosis and Lung Diseases; Russian Respiratory Society 14th National Congress on Lung Diseases (Moscow, Russia, 22-26 June 2004). Pulmonology. – 2004. – P. 126.
 61. **Kulko, A.** Species distribution and antimycotic susceptibility of *Candida* strains isolated from pulmonary tuberculosis patients / **A. Kulko, S. Mitrokhin** // Abstracts 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Copenhagen, Denmark, 2-5 April 2005). Clinical Microbiology and Infection. – 2005. – Vol. 11 (2). – P. 714-715.
 62. **Kulko, A.** Laboratory diagnosis of pulmonary aspergillosis in tuberculosis patients / **A. Kulko, I. Doroshkova** // Abstracts and Posters on CD-ROM 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Nice, France, 1-4 April 2006). Clinical Microbiology and Infection. – 2006. – Vol. 12 (4).
 63. **Kulko, A.** Yeasts and mycelial fungi in lung cavities of tuberculosis patients / **A. Kulko, P. Dreval** // Abstracts on CD-ROM 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Vienna, Austria, 10-13 April 2010). Clinical Microbiology and Infection. – 2010. – Vol. 16 (2).
 64. **Kulko, A.** The fungi of the genus *Aspergillus* in lung cavities of tuberculosis patients: a species spectrum and susceptibility to antimycotics / **A. Kulko** // Abstract book 6th Advances Against Aspergillosis conference (Madrid, Spain, 27 February - 1 March 2014). – 2014. – P. 87.
 65. **Alferova, V.A.** Astolides A and B, antifungal and cytotoxic naphthoquinone-derived polyol macrolactones from *Streptomyces hygroscopicus* / **V.A. Alferova, R.A. Novikov, O.P. Bychkova, E.A. Rogozhin, M.V. Shuvalov, I.A. Prokhorenko, V.S. Sadykova, A.B. Kulko, L.G. Dezhenkova, E.A. Stepashkina, M.A. Efremov, O.N. Sineva, G.K. Kudryakova, A.S. Peregudov, P.N. Sol'yev, Y.V. Tkachev, G.B. Fedorova, L.P. Terekhova, A.P. Tyurin, A.S. Trenin, V.A. Korshun** // Tetrahedron. – 2018. – Vol. 74. – P. 7442-7449.
 66. **Rogozhin, E.A.** A novel lipopeptaibol emericellipsin a with antimicrobial and antitumor activity produced by the extremophilic fungus *Emericellopsis alkalina* / **E.A. Rogozhin, V.S. Sadykova, A.A. Baranova, A.S. Vasilchenko, V.A. Lushpa, K.S. Mineev, M.L. Georgieva, A.B. Kul'ko, M.E. Krashenninnikov, A.V. Lyundup, A.V. Vasilchenko, Y.A. Andreev** // Molecules. – 2018. – Vol. 23(11), 2785. – P. 1-12.
 67. **Baranova, A.A.** Antimicrobial peptides produced by alkaliphilic fungi *Emericellopsis alkalina*: biosynthesis and biological activity against pathogenic multidrug-resistant fungi / **A.A. Baranova, E.A. Rogozhin, M.L. Georgieva, E.N. Bilanenko, A.B. Kul'ko, A.V. Yakushev, V.A. Alferova, V.S. Sadykova** // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2019. – Vol. 55(2). – P. 145-151.

Коллективные монографии:

68. **Кулько, А.Б.** Лабораторная диагностика микозов при туберкулезе / **А.Б. Кулько** // Лабораторная диагностика туберкулеза: монография / под ред. В.И. Литвинова и А.М. Мороза. – М.: МНПЦБТ: Изд-во «Медицина и жизнь», 2001. – Глава 3. – С. 59-66.
69. **Кулько, А.Б.** Лабораторная диагностика бронхолегочных микозов при туберкулезе легких / **А.Б. Кулько** // Лабораторные исследования при туберкулезе: монография / под ред. В.И. Литвинова и А.М. Мороза – М.: МНПЦБТ: Изд-во «Информационные технологии в медицине», 2013. – Глава 16. – С. 321-343.

Монография:

70. **Кулько, А. Б.** Атлас условно-патогенных грибов рода *Aspergillus* – возбудителей бронхолегочных инфекций / **А.Б. Кулько** – М.: МНПЦБТ: Изд-во Типография «Новости», 2012. – 160 с.

Методические рекомендации:

71. Лечение итраконазолом в суспензии патологической колонизации грибами дыхательных путей у больных туберкулезом легких. Методические рекомендации №8 / О.В. Ловачева, И.И. Корниенко, **А.Б. Кулько**, Л.В. Слогодкая, В.И. Литвинов – М., 2007. – 18 с. (Утверждено Департаментом здравоохранения города Москвы, 10.04.2007 г.).
72. Лабораторная диагностика бронхолегочных микозов у больных туберкулезом. Методические рекомендации №9 / **А.Б. Кулько**, И.Р. Дорожкова – М., 2007. – 28 с. (Утверждено Департаментом здравоохранения города Москвы, 07.05.2007 г.).
73. Лабораторная диагностика легочных микозов во фтизиатрической клинике. Методические рекомендации №24 / **А.Б. Кулько**, С.Г. Сафонова, Т.Н. Иванушкина, Е.В. Ермачкова. – М., 2019. – 28 с. (Рекомендовано Департаментом здравоохранения города Москвы, 17.04.2019 г.).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БАЛ	– Жидкость бронхоальвеолярного лаважа
ВИЧ	– Вирус иммунодефицита человека
ВКМ	– Всероссийская коллекция микроорганизмов
ГНЦ РАМН	– Государственное учреждение Гематологический научный центр Российской академии медицинских наук
ДИ	– Доверительный интервал
КОЕ	– Колониеобразующие единицы
МПК	– Минимальная подавляющая концентрация
ПЦР	– Полимеразная цепная реакция
РАЛ	– Реакция агглютинации латекса
рДНК	– рибосомальная ДНК
СМЖ	– Спинномозговая жидкость
ФБС	– Фибробронхоскопия
ФГБНУ НИИНА	– ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»
ХАЛ	– Хронический аспергиллез легких
ATCC	– American Type Culture Collection, Американская коллекция типовых культур
BSL	– Biological Safety Levels, Группы биологического риска микроорганизмов по классификации патогенности ВОЗ
CLSI	– Clinical and Laboratory Standards Institute, Институт клинических и лабораторных стандартов
EUCAST	– European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Европейский комитет по определению чувствительности к антибиотикам
GRAS	– Группа микроорганизмов, рассматриваемые как безопасные
ITS	– Internal transcribed spacer, Внутренний транскрибируемый спейсер ДНК
NRRL	– National Center for Agricultural Utilization Research, Agricultural Research Service Culture Collection, USDA Peoria, Национальный центр сельскохозяйственных исследований, Сельскохозяйственной исследовательской службы коллекций культур, Пеория
syn.	– Синоним видового названия гриба (лат. synonymum)