

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

На правах рукописи

Кулько Александр Борисович

**Бронхолегочные микозы у больных туберкулезом:
состав и свойства возбудителей, лабораторная диагностика**

03.02.03 – микробиология

Диссертация
на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научные консультанты:
доктор медицинских наук, профессор
Митрохин Сергей Дмитриевич
доктор биологических наук
Сафонова Светлана Григорьевна

Москва – 2020

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
Актуальность темы исследования.....	7
Степень разработанности темы исследования.....	9
Цель исследования.....	10
Задачи исследования.....	11
Научная новизна.....	11
Теоретическая и практическая значимость.....	13
Методология и методы исследования.....	16
Объекты исследования.....	17
Методы исследования.....	19
Микробиологические методы исследования.....	20
1. Методики микроскопического исследования биологического материала	20
2. Методики культурального исследования.....	21
2.1 Посев биологического материала и режим культивирования.....	21
2.2 Методики видовой идентификации дрожжевых грибов.....	24
2.3 Методики видовой идентификации мицелиальных грибов.....	29
2.4 Методики определения лекарственной чувствительности дрожжевых грибов и критерии интерпретации результатов.....	31
2.5 Методика определения лекарственной чувствительности мицелиальных грибов рода <i>Aspergillus</i> и критерии интерпретации результатов.....	36
Иммунологические методы исследования.....	39
1. Методы выявления <i>Aspergillus</i> антигенемии и антител к антигенам <i>Aspergillus</i>	39
2. Методы выявления <i>Candida</i> антигенемии и антител к антигенам <i>Candida</i>	40
3. Метод выявления <i>Cryptococcus</i> антигенемии.....	41
Молекулярно-генетические методы исследования.....	42
Методика исследования состава микромицетов в воздухе	

противотуберкулезного стационара.....	43
Статистическая обработка данных.....	43
Личное участие автора в получении результатов.....	44
Основные положения, выносимые на защиту.....	45
Степень достоверности и апробация результатов исследования.....	46
ГЛАВА 1 Обзор литературы.....	48
1.1Спектр возбудителей бронхолегочных микозов.....	48
1.1.1 Сведения по классификации, таксономии и номенклатуре грибов, вероятных возбудителей пневмомикозов. Плеоморфизм, анаморфные (митоспоровые) и телеоморфные виды возбудителей.....	49
1.1.2 Группа дрожжевых грибов, вероятных возбудителей микозов бронхов и легких.....	53
1.1.2.1 Дрожжевые грибы <i>Ascomycota</i> – возбудители бронхолегочных и диссеминированных микозов.....	55
1.1.2.2 Одноклеточные грибы рода <i>Pneumocystis</i> , <i>Ascomycota</i> – возбудители пневмоцистоза.....	61
1.1.2.3 Дрожжевые грибы <i>Basidiomycota</i> – возбудители бронхолегочных и диссеминированных микозов.....	62
1.1.3 Группа мицелиальных грибов, вероятных возбудителей микозов бронхов и легких.....	67
1.1.3.1 Мицелиальные грибы <i>Zygomycota</i> – возбудители зигомикоза легких.....	69
1.1.3.2 Мицелиальные грибы <i>Ascomycota</i> – возбудители оппортунистических бронхолегочного аспергиллеза, глубоких гистоплазмозов и феогифомикозов с поражением легких.....	73
1.1.3.3 Мицелиальные грибы <i>Basidiomycota</i> – вероятные возбудители бронхолегочных микозов.....	81
1.2 Микозы бронхов и легких у больных туберкулезом органов дыхания...	82
1.2.1 Факторы риска развития бронхолегочного микоза у больных туберкулезом.....	82

1.2.2 Значение грибов – возбудителей микозов в развитии бронхолегочной патологии у больных туберкулезом органов дыхания.....	85
1.3 Современные методологические подходы к лабораторной диагностике микозов органов дыхания.....	90
1.3.1 Принципы и методы микробиологической (микологической) диагностики микозов.....	93
1.3.2 Принципы и методы иммунологической и молекулярной диагностики микозов.....	106
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	116
ГЛАВА 2 Алгоритмы комплексной лабораторной диагностики микозов органов дыхания у больных туберкулезом легких и интерпретация результатов.....	116
2.1 Схема проведения и организация лабораторной диагностики оппортунистических микозов бронхов и легких во фтизиатрической клинике.....	120
2.2 Алгоритмы микробиологической диагностики бронхолегочных микозов, вызванных условно-патогенными дрожжевыми и мицелиальными грибами.....	138
2.3 Интерпретация результатов лабораторных исследований.....	145
ГЛАВА 3 Результаты выявления состава и таксономии вероятных возбудителей бронхолегочных и диссеминированных микозов у больных туберкулезом.....	155
3.1 Характеристики состава грибов, выделенных от больных туберкулезом при диагностике бронхолегочных и диссеминированных микозов.....	155
3.1.1 Состав, классификация, свойства обнаруженных болезнетворных грибов.....	155
3.1.2 Спектр вероятных возбудителей пневмомикозов у больных туберкулезом.....	187
3.1.3 Анализ состава грибов, выделенных из крови, спинномозговой	

жидкости, канала эндобронхиального клапана.....	198
3.1.4 Результаты сравнительного исследования молекулярно-генетических свойств ряда клинических и сапротрофных штаммов <i>Aspergillus sydowii</i>	199
ГЛАВА 4 Результаты применения алгоритмов лабораторной диагностики для верификации бронхолегочных инфекций, вызванных дрожжевыми грибами.....	206
4.1 Анализ данных лабораторной диагностики кандидоза легких и кандидемии.....	206
4.1.1 Результаты микробиологических исследований.....	206
4.1.2 Результаты иммунологических исследований.....	211
4.2 Анализ данных лабораторной диагностики криптококкоза легких и центральной нервной системы.....	213
4.2.1 Результаты микробиологических исследований.....	213
4.2.2 Результаты иммунологических исследований.....	214
4.3 Анализ данных лабораторной диагностики поражений легких, вызванных редко встречающимися дрожжевыми возбудителями.....	215
ГЛАВА 5 Результаты применения алгоритмов лабораторной диагностики для верификации бронхолегочных инфекций, вызванных мицелиальными грибами.....	218
5.1 Анализ данных лабораторной диагностики аспергиллеза.....	218
5.1.1 Результаты микробиологических исследований.....	218
5.1.2 Результаты иммунологических исследований.....	221
5.2 Анализ данных лабораторной диагностики зигомикоза.....	222
5.3 Анализ данных лабораторной диагностики гиалогифомикозов.....	223
5.4 Анализ данных лабораторной диагностики феогифомикозов.....	225
ГЛАВА 6 Результаты определения чувствительности к противогрибковым препаратам дрожжевых и мицелиальных грибов, выделенных от больных туберкулезом.....	228
6.1 Характеристика лекарственной чувствительности дрожжевых грибов...	229

6.1.1 Характеристика лекарственной чувствительности клинических штаммов 14 видов грибов рода <i>Candida</i>	229
6.1.2 Характеристика лекарственной чувствительности клинических штаммов 8 видов грибов родов <i>Cryptococcus</i> , <i>Geotrichum</i> , <i>Hanseniaspora</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Saprochaete</i>	256
6.2 Характеристика лекарственной чувствительности мицелиальных грибов рода <i>Aspergillus</i>	265
6.2.1 Совершенствование методов получения споровой суспензии чистых культур возбудителей аспергиллеза.....	265
6.2.2 Характеристика лекарственной чувствительности клинических штаммов 12 видов грибов рода <i>Aspergillus</i>	266
6.3 Доклиническое исследование противогрибковой активности новых природных антибиотиков, разрабатываемых в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе».....	281
ГЛАВА 7 Результаты мониторинга присутствия оппортунистических грибов в воздухе противотуберкулезного стационара.....	285
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	291
ВЫВОДЫ.....	308
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	311
ПЕРСПЕКТИВНЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	313
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	314
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	317
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	365

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Оппортунистические (вторичные) инфекционные заболевания бронхов и легких микотической природы (пневмомикозы: аспергиллез, кандидоз, криптококкоз, мукомикоз, фузариоз и другие гиалогифомикозы, феогифомикозы) и диссеминированные микозы с поражением легких становятся все более частыми осложнениями ряда тяжелых хронических заболеваний: злокачественных новообразований, заболеваний системы крови, болезни, вызванной вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), туберкулеза и др. Наиболее подвержены данным заболеваниям больные с иммунодефицитными состояниями, вызванными нередко современной иммуносупрессивной терапией [132, 151, 235]. 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, как в Российской Федерации, так и во всем мире [26, 71, 343, 352].

Список потенциальных 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 и при определенных условиях (снижение противомикробной защиты хозяина, массивное инфицирование) проявлять патогенные свойства [52, 82, 142, 258]; расширяется состав дрожжевых грибов, а также светлоокрашенных (гиалогифомицеты) и темноокрашенных (феогифомицеты) плесневых грибов – возбудителей глубоких инфекций, которые трудно диагностируются и поддаются лечению [16, 44, 258]. В настоящий момент группа болезнетворных грибов включает уже более 500 первично-патогенных и условно-патогенных видов из отделов *Zygomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota* [11, 128, 173, 258, 286].

Поражения микромицетами бронхов, легких и плевры относятся к вероятным инфекционным осложнениям туберкулеза, что обусловлено наличием тяжелого первичного заболевания легких (его течением и прогрессированием) и

рядом предрасполагающих факторов: формированием полостных изменений и бронхоэктазов в легких; различными иммуносупрессивными состояниями, включая случаи туберкулеза, сочетанного с ВИЧ-инфекцией; длительным применением нескольких антибактериальных препаратов широкого спектра действия; наличием распространенной колонизации нижних дыхательных путей условно-патогенными грибами; проведением инвазивных процедур и другими факторами риска, связанными с пребыванием во фтизиатрическом стационаре [99, 126]. Заселение и последующая колонизация нижних отделов дыхательных путей грибами родов *Aspergillus* или *Candida* может приводить к развитию аллергических форм заболеваний, способных осложнять течение туберкулезного процесса [7, 77, 92, 130]. У значительного числа пациентов наблюдаются два и более фактора, предрасполагающих к развитию микоза; особенно опасно их сочетание с наличием спор *Aspergillus* spp. и других мицелиальных грибов в воздухе лечебного стационара [66, 126].

С проблемой глобального распространения туберкулеза неразрывно связана эпидемиология хронического аспергиллеза легких (ХАЛ) – аспергиллемы легких, хронического некротизирующего аспергиллеза легких (ХНАЛ) и других форм заболевания [216]; согласно расчетам организации Leading International Fungal Education (LIFE), у 1,2 миллиона человек в мире данное заболевание ассоциировано с туберкулезом легких [298]. Накопленные сведения указывают на то, что большинство случаев аспергиллемы легких и других форм заболевания, вероятно, связано с предшествующим туберкулезом легких [61, 84, 92, 267, 285]. Вместе с тем, выявить и проанализировать видовой и родовой состав условно-патогенных грибов, способных вызывать микозы бронхов и легких у пациентов фтизиатрического профиля, а также сформировать списки грибов, колонизирующих нижние дыхательные пути у больных туберкулезом, к настоящему времени не удалось.

Диагностика микозов органов дыхания во фтизиатрической практике является одной из сложных клинико-лабораторных задач, поскольку клинические и радиологические признаки пневмомикозов неспецифичны и не всегда

выражены, а микоз может протекать под маской туберкулеза, абсцесса и других заболеваний легких. Определяющее значение в диагностике микозов бронхов и легких имеют данные микробиологических и иммунологических лабораторных исследований, позволяющие установить и доказать этиологию поражения и дать обоснованные рекомендации для разработки адекватной лекарственной терапии на основании свойств выделенного возбудителя [6, 47].

В последние годы изменились представления об этиологии и клинических формах глубоких оппортунистических микозов, расширился состав потенциальных возбудителей, часть из которых первично устойчивы к широко применяемым в клинике противогрибковым препаратам; стандартизованы и усовершенствованы лабораторные методы диагностики инвазивных микозов и хронических форм аспергиллеза легких и повышена их достоверность; разработаны и разрабатываются новые препараты с различным спектром действия [92, 175, 211, 214, 342]. Очевидно, что лабораторная микологическая служба в современной фтизиатрической клинике должна быть готова к решению все более усложняющихся задач диагностики вторичных бронхолегочных микозов и подбора препаратов для их лечения. 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 микотических поражений легких у пациентов противотуберкулезных учреждений были начаты и проведены в 70–90-х гг. отечественными учеными И.Р. Дорожкой и Е.П. Бахаровой [18, 47], аспергиллеза – В.М. Лещенко [79]. В новом столетии в Российской Федерации развитие методологии научно-практических исследований при диагностике пневмомикозов и глубоких микозов с поражением легких во многом определяет научная и организационно-методическая деятельность

Общероссийской общественной научной организации «Национальная академия микологии» [100]; были 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 [54, 66, 92, 125, 130, 132].

Зарубежными специалистами в областях лабораторной и клинической медицины и микологии опубликованы практические руководства по идентификации патогенных грибов, рекомендации по диагностике тяжелых микозов, затрагивающих, в том числе и легочную систему – инвазивных микозов, аспергиллеза, кандидоза, криптококкоза [158, 211, 214, 258, 336, 337, 342, 347, 365, 397]; многие основные работы были переведены на русский язык [11, 44, 84, 128].

В тоже время актуальными остаются вопросы этиологии бронхолегочных микотических инфекций, проведения и стандартизации лабораторной диагностики пневмомикозов в противотуберкулезных учреждениях, характеристики уровней природной чувствительности *in vitro* к антимикотикам у большинства возбудителей глубоких микозов, определения спектра активности *in vitro* системных лекарственных препаратов, используемых для терапии пневмомикозов. Применяемые сегодня во фтизиатрической практике лабораторные методы диагностики пневмомикозов не соответствуют современным требованиям, не позволяют выявлять и достоверно идентифицировать возбудителей микозов бронхов, легких и диссеминированных инфекций и нуждаются в стандартизации и усовершенствовании. К неопределенности в интерпретации результатов лабораторных исследований приводит отсутствие единых диагностических подходов и критериев лабораторной диагностики бронхолегочных микозов [69, 112], в том числе у больных туберкулезом [109, 110, 111, 113, 114, 115, 116, 117, 118].

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 (мукомикоз), 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 клинко-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 микроскопических 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 (микологический), 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).

Объекты исследования

В период с 2002 по 2017 гг. для решения поставленных задач были получены и проанализированы результаты микробиологических и иммунологических исследований различного биоматериала от больных туберкулезом с подозрением на пневмомикоз, которые находились на лечении и наблюдались в подразделениях ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ»: клинике №1, клинике №2, Городском клинико-диагностическом центре. Всего было обследовано 7683 пациента с различными формами туберкулеза (туберкулез внутригрудных лимфатических узлов, очаговый туберкулез легких, инфильтративный туберкулез легких, диссеминированный туберкулез легких, цирротический туберкулез легких, кавернозный туберкулез легких, фиброзно-кавернозный туберкулез легких, туберкулема легких, туберкулезная эмпиема, туберкулезный плеврит, генерализованный туберкулез), включая 61 больного туберкулезом с сопутствующей ВИЧ-инфекцией. Материал от пациентов получали при диагностических обследованиях и подозрении на развитие вторичного микоза легких.

При определении спектра возбудителей бронхолегочных микозов у больных туберкулезом проведены микробиологические исследования (прямая микроскопия, посев) 10414 образцов мокроты, 3725 образцов содержимого бронхов, полученного при ФБС, 17 образцов биоптатов бронхов, 613 образцов резецированных участков легкого и содержимого полостных образований легких (резекционный материал, пункционный биоптат, аспираты, смывы), 535 образцов содержимого плевральных полостей (аспираты, экссудаты, мазки); культуральные исследования 109 образцов отделяемого из зева, 92 образцов крови;

иммунологические исследования 318 образцов сыворотки крови (тесты на обнаружение антигенов грибов *Aspergillus* (82 теста), *Candida* (125 тестов), *Cryptococcus* (12 тестов) и антител к грибам *Aspergillus* (51 тест), *Candida* (48 тестов)).

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 сотрудниками бактериологической лаборатории клиники №2 ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ»).

В работе для различных научных исследований и практических задач (внутрилабораторный контроль качества) было использовано 9 типовых коллекционных (референтных) штаммов грибов из разных коллекций (Таблица 1).

Таблица 1 – Список коллекционных штаммов грибов, использованных в работе

Штамм	Коллекция	Цель использования
1. <i>Aspergillus flavipes</i> BKM F-739	Всероссийская коллекция микроорганизмов (BKM)	Микробиологические исследования (исследование морфологии)
2. <i>Aspergillus flavipes</i> BKM F-2990	Всероссийская коллекция микроорганизмов (BKM)	
3. <i>Aspergillus flavipes</i> BKM F-4308	Всероссийская коллекция микроорганизмов (BKM)	
4. <i>Aspergillus sydowii</i> BKM F-441	Всероссийская коллекция микроорганизмов (BKM)	Молекулярно-генетические исследования
5. <i>Aspergillus sydowii</i> BKM F-968	Всероссийская коллекция микроорганизмов (BKM)	
6. <i>Aspergillus sydowii</i> BKM F-2488	Всероссийская коллекция микроорганизмов (BKM)	
7. <i>Aspergillus sydowii</i> NRRL 254T	National Center for Agricultural Utilization Research, Agricultural Research Service Culture Collection, USDA Peoria, Illinois, USA (NRRL)	
8. <i>Aspergillus terreus</i> BKM F-2269	Всероссийская коллекция микроорганизмов (BKM)	Контроль качества микробиологических исследований
9. <i>Candida albicans</i> ATCC 2091	American Type Culture Collection (ATCC)	

У 67 обнаруженных видов оппортунистических грибов были исследованы температурные границы роста (способность к росту при 30, 35 и 37°C); у 34 видов грибов 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: амфотерицин В, анидулафунгин, вориконазол, итраконазол, каспофунгин, кетоконазол, микафунгин, позаконазол, флуконазол, флуцитозин (тест-система «Sensititre» (TREK Diagnostic Systems, США)).

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

Методы исследования

При проведении лабораторных обследований были использованы методы прямой микроскопии диагностического материала, культуральные методы, включающие посев, видовую идентификацию и определение чувствительности к антимикотикам выделенных штаммов грибов, иммунологические методы выявления антигенов возбудителей и антител к ним в сыворотке крови. Полученные результаты были проанализированы и учтены при разработке алгоритмов и критериев интерпретации диагностики пневмомикозов у больных туберкулезом.

Микробиологические методы исследования

1. Методики микроскопического исследования биологического материала

Для обнаружения элементов дрожжевых и мицелиальных грибов в биоматериале применяли ряд стандартных методик приготовления окрашенных и нативных препаратов для прямой микроскопии в микологической лаборатории [6, 44, 132]. Фиксированные препараты (над пламенем горелки, тоекратное фламбирование) из образцов мокроты (без центрифугирования) и материалов, полученных при ФБС (осадок после центрифугирования пробы при 1500 об/мин в течение 10 мин.) окрашивали по Граму и при необходимости по Романовскому – Гимзе (дополнительный метод окраски мазков для лучшего выявления элементов грибов и их морфологии) по общепринятым методикам. Препараты из аспиратов и экссудатов из полостных образований легких и плевральных полостей (жидкий материал) готовили из осадка после центрифугирования (1500 об/мин в течение 10 мин.), неокрашенными или в сочетании 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) по общепринятой методике, в соответствии с приложенной инструкцией (люминесцентная микроскопия; содержащие хитин клетки грибов видны в УФ-свете, флуоресцируя ярким яблочно-зеленым светом) или неокрашенными. Препараты микроскопировали при x400, x1000 увеличениях в световом тринокулярном микроскопе OLYMPUS BX41 (OLYMPUS, Япония) (микроскоп оборудован фотокамерой OLYMPUS SC 35 (OLYMPUS, Япония) и цифровой камерой Moticam (Motic)); при x200, x400 увеличениях в люминесцентном бинокулярном микроскопе OLYMPUS BX41 (OLYMPUS, Япония).

При микроскопии отмечали среднее количество элементов грибов в поле зрения препарата в следующих категориях: «единичные клетки/ клеточные структуры», «умеренно», «значительно», «обильно» и морфологию и размеры вегетативных и репродуктивных структур [47, 132]: одиночные дрожжевые клетки без почек; почкующиеся дрожжевые клетки; фрагменты псевдомицелия;

комбинации дрожжевых клеток, псевдогиф и/или гиф; фрагменты истинного мицелия – гифы (отмечали характер септированности гиф, наличие и характер ветвления, и какими грибами, предположительно, образованы гифы: дрожжеподобными, плесневыми зигомицетами или плесневыми гифомицетами); артроконидии; споры (конидии); структуры конидиального спороношения (конидиеносцы, конидиальные головки *Aspergillus* spp. и др.).

2. 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.

2.1 Посев биологического материала и режим культивирования

Для обнаружения и первичного выделения дрожжевых и плесневых грибов из биологического материала (мокрота, содержимое бронхов, содержимое легочных и плевральных полостей, биоптаты тканей, отделяемое из зева, кровь) были использованы специальные питательные среды: агар Сабуро с хлорамфениколом (Bio-Rad, Франция) – универсальная среда для селективного выделения грибов различных групп; селективные хромогенные среды («CandiSelect 4» (Bio-Rad, Франция) или «Brilliance Candida Agar» (Oxoid, Великобритания)) – для выявления смешанных культур дрожжевых грибов и одновременной идентификации ряда *Candida* spp.; жидкая среда Сабуро – среда накопления; картофельно-декстрозный агар (Bio-Rad, Франция) – среда для быстрой изоляции плесневых грибов с последующей идентификацией.

Посев мокроты и материала, полученного при ФБС, проводили количественным методом для последующего учета числа выросших колоний грибов определенного вида (количественный учет однотипных по морфологии дрожжевых колоний проводили через 48 ч. инкубации, учет плесневых колоний – через 2-5 суток). Мокроту перед посевом гомогенизировали встряхиванием с трипсином в течение 5-10 мин., разводили стерильным физиологическим раствором в соотношении 1:10 и сеяли из разведения 1:10, а при необходимости

также из разведений 1:100 и 1:1000 или неразведенной. Материал, полученный при ФБС, центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 мин., надосадочную жидкость сливали и осадок засеивали без разведения. При посеве использовали три чашки Петри: две чашки с посевом дозированного объема биоматериала – по 0,1 мл (среды: агар Сабуро и хромогенная среда или агар Сабуро; инкубировали при 30°C и 37°C) и контрольную чашку (среда агар Сабуро; инкубировали при 30°C). На поверхность контрольной чашки материал переносили бактериальной петлей не дозировано и помещали в три (четыре) точки (место посева отмечали на обратной стороне дна чашки Петри). Содержание клеток гриба в 1 мл материала (n) рассчитывали по количеству выросших однотипных колоний (колониеобразующие единицы (КОЕ)). Расчет количества КОЕ в 1 мл образца (КОЕ/мл) проводили по формуле: $n = a \times b \times c$, где a – среднее арифметическое от числа колоний на каждой из двух засеянных чашек $((a_1 + a_2) / 2)$; b = 10, при объеме посевного материала 0,1 мл; c – степень разведения материала (10, 100, 1000).

Рост идентичной культуры в посеве и контроле достоверно подтверждает наличие клеток гриба в исследуемом материале. При отсутствии роста культуры гриба в контрольной чашке результат исследования регистрировали как отрицательный; в случае роста плесневого микромицета в контрольной чашке и отсутствии роста идентичного гриба на чашках с посевом дозированного объема материала результат регистрировали как положительный (наличие роста) с последующей идентификацией выделенной культуры. При интерпретации содержания грибов рода *Candida* в мокроте учитывали, что в норме число колоний любого вида *Candida*, выросших из 1 мл мокроты, не должно превышать 1×10^3 КОЕ/мл [27, 47].

Посев плотного хирургического материала (биоптаты легочной ткани и резецированных участков легкого), жидкого хирургического материала (аспираты, экссудаты из полостных образований легких и плевральных полостей) и мазков (отделяемое со слизистых оболочек зева, содержимое плевральных полостей) проводили на две питательные среды – агар Сабуро с

хлорамфениколом и бульон Сабуро; при подозрении на аспергиллез или другой пневмомикоз, вызванный плесневым возбудителем, в набор питательных сред для посева хирургического материала добавляли картофельно-декстрозный агар.

Культуральное исследование биоптатов легочной ткани, резецированных участков легкого (плотный материал) проводили по следующей схеме: фрагмент материала помещали на агар Сабуро и растирали стерильным шпателем по поверхности агаризованной среды, одновременно кусочки материала помещали в пробирку с жидкой питательной средой – бульон Сабуро (среда обогащения).

Аспираты, экссудаты из полостных образований легких и плевральных полостей (жидкий материал) засекали на агар Сабуро, равномерно распределяя 2-3 капли материала по поверхности агара стерильным шпателем. Оставшуюся жидкость переносили в бульон Сабуро (среда обогащения).

Отделяемое со слизистых оболочек зева, содержащее остаточных плевральных полостей (мазки) засекали на агар Сабуро, проводя тампоном с вращением по поверхности питательной среды, затем помещали тампон в пробирку с бульоном Сабуро (среда обогащения).

Посевы хирургического материала и мазки из зева инкубировали в аэробной среде при 30°C. Просмотр посевов производили ежедневно. При наличии роста колоний грибов в первичном посеве на чашках с агаризованной средой отмечали интенсивность роста: скудный, умеренный или обильный рост. При отсутствии роста инкубацию продолжали 7-10 дней, а при необходимости до 4 недель; проводили повторный высеивание из среды обогащения на агар Сабуро и/или картофельно-декстрозный агар. В случаях использования жидкой среды обогащения результат посева регистрировали как отрицательный только после отсутствия роста высеивания из бульона на чашки с плотной питательной средой.

Образцы крови засекали в коммерческие флаконы BACTEC Myco/F-Lytic (Becton Dickinson, США) (неселективная среда для дрожжей и плесневых грибов) и инкубировали в автоматическом анализаторе Bactec 9050 (Becton Dickinson, США). Содержимое флаконов Myco/F-Lytic после выявления роста окрашивали по Граму и пересекали на питательную среду агар Сабуро для выделения

гемокультур грибов, в соответствии с приложенной инструкцией производителя. Другая используемая методика выделения грибов из крови включала первичный посев крови во флаконы двухфазной системы «HiCombi» (HIMEDIA, Индия) (комбинированная среда для аэробных и факультативно анаэробных бактерий и грибов *Candida*). Инкубацию посевов проводили при 37°C в течение 10 суток и при выявлении признаков роста выполняли высев на агар Сабуро.

Исследования СМЖ проводили по соответствующей микробиологической методике, которая включала в себя центрифугирование образца (3500 об/мин в течение 5 мин.), микроскопию осадка (окраска мазка по Граму, Цилю – Нильсену, метиленовым синим, в тушевом препарате), посев на стандартные дифференциально-диагностические бактериологические среды (кровяной агар, сывороточный агар, агар Сабуро, среда накопления в виде сердечно-мозгового бульона, среда для контроля стерильности). Засеянные чашки инкубировали при 37°C как в обычной атмосфере, так и при повышенной концентрации CO₂, пробирки со средой накопления – при 28°C в течение 10 дней. При отсутствии признаков роста на чашках первичного посева делали высев из среды накопления на плотные питательные среды.

Контроль загрязнения воздуха лаборатории зачатками плесневых грибов проводили с помощью экспонирования открытой чашки Петри с агаром Сабуро в посевном боксе во время проведения посева, с последующей инкубацией при 30°C. Исследование использовалось для одновременного контроля стерильности применяемой среды и исключало возможность лабораторного загрязнения.

2.2 Методики видовой идентификации дрожжевых грибов

При просмотре результатов первичного посева на агаризованных средах определяли принадлежность обнаруживаемых колоний микромицетов к дрожжевым или плесневым грибам по их морфологическим признакам (культуральные признаки: наличие или отсутствие воздушного мицелия, структура и характер поверхности колонии, скорость и характер роста, цвет колонии и обратной стороны (реверзума) и др.). Далее, штаммы определенного морфологического типа дрожжевых или плесневых грибов выделяли в чистой

культуре на отдельной питательной среде для проведения видовой идентификации по общепринятым методикам (специальные методики для идентификации дрожжевых или мицелиальных грибов).

Таксономическую идентификацию штаммов дрожжевых грибов проводили по выявленным специфическим биохимическим и физиологическим характеристикам (хромогенные среды, ручные коммерческие тест-системы идентификации дрожжевых грибов, тесты быстрой идентификации возбудителей кандидоза, температурные границы роста) в сочетании с характеристиками клеточной морфологии (микроскопия выделенных культур (метод вторичной микроскопии)) и макроморфологии. Для видовой идентификации использовали комбинацию современных и классических 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 и их макроморфологическим характеристикам – высокоспецифичный скрининг-тест лабораторной диагностики кандидоза (Таблица 2). Чашки с хромагаром с пересеянными культурами дрожжевых грибов инкубировали при 30°C или 35°C в аэробной атмосфере в течение 24 (48) ч.

Таблица 2 – Характеристики использованных в работе селективных хромогенных сред «CandiSelect 4», «Brilliance Candida Agar», «chromID Candida», «BBL CHROMagar Candida Medium» для прямой и предварительной идентификации видов дрожжевых грибов рода *Candida*

Хромагар	Характеристики (состав идентифицируемых видов <i>Candida</i> spp., окраска колоний, морфологические свойства)
CandiSelect 4	<i>C. albicans</i> – от розового до фиолетового; сферические колонии с четким контуром. Прямая окончательная идентификация; <i>C. glabrata</i> – бледно-бирюзовые; плоские, блестящие колонии, с четким контуром и гладким морфотипом. Предварительная идентификация; <i>C. krusei</i> – бирюзово-синие; колонии сухие, большие, с шероховатым морфотипом и нечетким контуром. Предварительная идентификация; <i>C. tropicalis</i> – интенсивно бирюзовые; равномерно окрашенные, сферические колонии с четким контуром и гладким морфотипом. Предварительная идентификация; <i>C. dubliniensis</i> – от розового до фиолетового; Другие виды <i>Candida</i> – белые (серые) колонии различной формы. Дальнейшая идентификация с помощью стандартных методов

Продолжение таблицы 2

Хромагар	Характеристики (состав идентифицируемых видов <i>Candida</i> spp., окраска колоний, морфологические свойства)
Brilliance Candida Agar	<i>C. albicans</i> – зелёные. Прямая окончательная идентификация; <i>C. krusei</i> – коричнево-розовые, сухие колонии. Прямая окончательная идентификация; <i>C. tropicalis</i> – темно-синие. Прямая окончательная идентификация; <i>C. glabrata</i> , <i>C. kefyr</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. lusitaniae</i> – различные бежевые и/или жёлтые и/или коричневые колонии, данные виды возможно ориентировочно дифференцировать по цвету и морфологии колоний (<i>C. glabrata</i> – бежевые-желтые, <i>C. parapsilosis</i> – коричневые, <i>C. kefyr</i> и <i>C. lusitaniae</i> – бежевые-жёлтые-коричневые). Предварительная идентификация; <i>C. dubliniensis</i> – зелёные
chromID Candida	<i>C. albicans</i> – синие. Прямая окончательная идентификация; <i>C. tropicalis</i> – розовые. Предварительная идентификация; <i>C. lusitaniae</i> – розовые. Предварительная идентификация; <i>C. kefyr</i> – розовые. Предварительная идентификация; <i>C. dubliniensis</i> – сине-зеленые, обычно цвет выражен менее ярко, чем у <i>C. albicans</i> и проявляется позже – после 48 ч. Предварительная идентификация; Другие дрожжевые грибы – белые. Дальнейшая идентификация с помощью стандартных методов
BBL CHROMagar Candida Medium	<i>C. albicans</i> – от светло-зеленого до умеренно зеленого. Прямая окончательная идентификация; <i>C. krusei</i> – светло-розовые с белесой каймой; колонии плоские, крупные. Прямая окончательная идентификация; <i>C. tropicalis</i> – от сине-зеленоватого до металлического синего с фиолетовыми ореолами или без них. Прямая окончательная идентификация; <i>C. dubliniensis</i> – отчетливо темно-зеленые при первичном выделении, при пересеве свойство может не сохраняться. Предварительная идентификация, для подтверждения необходимы дополнительные тесты; <i>C. glabrata</i> – от розовато-лилового до темного розовато-лилового, колонии такого цвета могут быть образованы другими видами дрожжей. Предварительная идентификация, для подтверждения необходимы дополнительные тесты; Другие дрожжевые грибы окрашиваются в цвета от бледно-розового до темного розовато-лилового (от розового до фиолетового) или принимают естественный цвет (от кремового до белого). Дальнейшая идентификация с помощью стандартных методов

Миниатюризированные ручные тест-системы «ELIchrom FUNGI» (ELITech MICROBIO, Франция); «Auxacolor 2» (Bio-Rad, Франция) – для идентификации клинически значимых дрожжевых грибов из родов *Candida*, *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Kloeckera* (*Hanseniaspora*), *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saprochaete*, *Trichosporon* по ауксонограмме, ферментативной активности и дополнительным тестам (Таблица 3). Тест-система «ELIchrom FUNGI» (ELITech MICROBIO, Франция) включает два стандартных дифференцирующих теста: тест на уреазную активность для быстрой дифференциации базидиомицетовых и

аскомицетовых дрожжей (разлагать мочевины способны базидиомицетовые дрожжи и не способны аскомицетовые дрожжи, исключение составляют некоторые штаммы *C. krusei*) и тест на чувствительность к циклогексимида для дифференциации возбудителей способных и не способных расти в присутствии циклогексимида. Были исследованы чистые культуры дрожжевых грибов, полученные после пересева первичной культуры на агар Сабуро и инкубации в течение 24 ч.

Таблица 3 – Характеристики использованных в работе тест-систем «ELIchrom FUNGI» и «Auxacolor 2» для видовой идентификации дрожжевых грибов

Тест-система	Характеристики (состав тестов, режимы инкубации, правила интерпретации)
ELIchrom FUNGI	Колориметрическая тест-система для идентификации 38 видов клинически значимых дрожжевых грибов, основанная на ферментативной активности, которую обнаруживают по трем типам реакции: гидролизу хромогенных субстратов, ассимиляции природных субстратов, окислению синтетических субстратов (тесты на ферментативную активность: α-D-глюкозаминидаза, L-пролинамидаза, устойчивость к актидиону (циклогексимида), эскулиназа, α-D-глюкопиранозидаза, фосфатаза, β-D-галактозидаза, пептидаза, глицинамидаза, уреазы, фенолоксидаза; ассимиляция углеводов: метил-альфа-D-глюкопиранозид, трегалоза, галактоза-сахароза, мальтоза, целлобиоза, раффиноза, лактоза; положительный контроль, отрицательный контроль для прочтения тестов на пептидазу и глицинамидазу); Плашки инкубировали при 30°C в течение 24 (48) ч.; Интерпретацию результатов тестирования (визуальный учет роста по изменению цвета среды в лунках) проводили по таблице кодов или с помощью идентификационной таблицы
Auxacolor 2	Колориметрическая тест-система для идентификации 31 вида клинически значимых дрожжевых грибов, основанная на способности дрожжей ассимилировать сахара (13 сахаров для определения профиля ассимиляции: глюкоза, мальтоза, сахароза, галактоза, лактоза, раффиноза, инозитол, целлобиоза, трегалоза, адонитол, мелезитоза, ксилоза, арабиноза) и ферментативной активности (3 ферментативных теста на обнаружение N-ацетилгалактозаминидазной активности, фенолоксидазной активности <i>Cryptococcus neoformans</i> и пролинариламидазной активности), имеется лунка отрицательного контроля; окончательная идентификация основана на комбинации биохимических тестов и дополнительных критериев (наличие пигментации, артроспор, капсул, мицелия и/или псевдомицелия, хламидоспор, роста при 37°C); Микроплашки инкубировали при 30°C в течение 48 ч. (до 72 ч. при необходимости); Интерпретацию результатов тестирования (визуальный учет роста по изменению цвета среды в лунках) проводили по числовому профилю или с помощью интерпретационной таблицы

Тесты быстрой идентификации возбудителей кандидоза «ELITex Bicolor dubliniensis» (ELITech MICROBIO, Франция) (*C. dubliniensis*); «ELIchrom

glabrata» (ELITech MICROBIO, Франция) (*C. glabrata*); «ELITex *krusei*» (ELITech MICROBIO, Франция) (*C. krusei*) (Таблица 4). Были исследованы свежесделанные колонии дрожжевых грибов (24-48 ч.), изолированные из первичного посева на чашках с хромагаром или полученные после пересева первичной культуры на чашки с хромагаром после инкубации в течение 24 (48) ч.

Таблица 4 – Характеристики использованных в работе тестов быстрой идентификации возбудителей кандидоза «ELITex Bicolor *dubliniensis*», «ELIchrom *glabrata*» и «ELITex *krusei*»

Тесты	Характеристики (принцип теста, прочтение)
ELITex Bicolor <i>dubliniensis</i>	Тест латекс-агглютинации (РАЛ) на стекле для ускоренной (в течение 5 мин.) идентификации <i>C. dubliniensis</i> и дифференциации с <i>C. albicans</i> (идентификация с помощью латексных частиц, сенсibilизированных специфическим моноклональным антителом против <i>C. dubliniensis</i> ; диссоциация колоний <i>C. dubliniensis</i> в реагенте приводит к агглютинации между бластоспорами и частицами латекса); образование синей агглютинации на розовом, красном или пурпурном фоне, видимой невооруженным глазом
ELIchrom <i>glabrata</i>	Тест быстрой (в течение 20 мин.) идентификации <i>C. glabrata</i> , основанный на способности <i>C. glabrata</i> в отличие от других дрожжевых возбудителей быстро гидролизовать трегалозу в глюкозу (включает трегалозный тест (появление темно-оранжевого окрашивания) и два контроля: тест на ассимиляцию мальтозы (отсутствие окрашивания) и контроль реагентов основной среды (отсутствие окрашивания))
ELITex <i>krusei</i>	Тест РАЛ на стекле для ускоренной (в течение 5 мин.) идентификации <i>C. krusei</i> (идентификация с помощью латексных частиц, сенсibilизированных специфическим моноклональным антителом против <i>C. krusei</i> ; диссоциация колоний <i>C. krusei</i> в реагенте приводит к агглютинации между бластоспорами и частицами латекса); образование красной агглютинации, видимой невооруженным глазом

Макроморфологические признаки роста на среде агар Сабуро – отмечали признаки колоний дрожжевых и дрожжеподобных грибов: цвет поверхности и синтез каротиноидов (белые, кремовые, бежевые, желтые, коричневатые, а также пигментированные красные, розовые или оранжевые колонии базидиомицетов из группы «красных дрожжей» за счет присутствия каротиноидных пигментов); консистенцию и характер роста (слизистые, пастообразные, сухие, влажные, маслянистые, кожистые, складчатые, порошащие и др.); характер поверхности (гладкие, морщинистые, плоские, выпуклые, блестящие, тусклые и др.), край колонии (ровный, волнистый, ворсинчатый); наличие или отсутствие мицелиальных структур (субстратный мицелий, короткий воздушный мицелий).

Микроморфологические признаки на среде агар Сабуро и хромогенных средах – отмечали форму (круглые, овальные, лимоновидные (апикулятные),

цилиндрические и др.) и размер дрожжевых клеток; наличие и форму клеточных структур (образование почек, псевдомицелиальных и мицелиальных структур субстратного мицелия в краевой части колонии); наличие и размеры артроспор, образующихся при распаде мицелия (диагностический признак формирующих артроконидии дрожжеподобных грибов *Geotrichum*, *Saprochaete*, *Trichosporon*); тип конидиогенеза (бластический с образованием почек или артрический с образованием артроспор); наличие и размеры капсулы (диагностический признак возбудителей криптококкоза). Микроморфологию культур изучали на 2-3(4) сутки исследования во влажных неокрашенных препаратах с добавлением дистиллированной воды, в тушевых препаратах (капсулообразование) и, при необходимости, в мазках, окрашенных по Граму. Препараты микроскопировали при $\times 400$ и $\times 1000$ увеличениях в световом микроскопе OLYMPUS BX41 (OLYMPUS, Япония).

Тесты на толерантность к повышенной температуре – исследовали способность культур к росту на среде агар Сабуро при 37°C (дифференцирующий признак для ряда видов, сходных по биохимическим и морфологическим характеристикам) и 45°C (при необходимости; дифференцирующий признак для *C. albicans* (растет при 45°C) и *C. dubliniensis* (не растет при 45°C)).

Тест на способность к ассимиляции нитратов (при необходимости) – определяли способность штаммов к росту на среде с KNO_3 в качестве единственного источника азота по стандартной рутинной методике [81], инкубацию проводили при $25-30^{\circ}\text{C}$, учёт результатов – через 2-3 и 7 суток. Положительный результат фиксировали по появлению розовой или красной окраски. Этот тест является дифференцирующим для видов *Rhodotorula glutinis* (ассимилирует нитраты) и *Rh. mucilaginosa* (не способен к ассимиляции нитратов).

2.3 Методики видовой идентификации мицелиальных грибов

Таксономическую идентификацию штаммов плесневых грибов проводили по общепринятым методикам с помощью специальных атласов-определителей

[128, 258]. Для видовой идентификации использовали комбинацию характерных морфологических и физиологических признаков.

Микроморфологические признаки – описывали морфологию бесполой стадии гриба (спорангиеносцы со спорангиями и спорангиоспорами у зигомицетов, конидиеносцы с конидиогенными структурами и конидиями у гиалогифомицетов и феогифомицетов); морфологию вегетативных структур (гифы мицелия, хламидоспоры, склероции и др.); морфологию половой стадии, в случае образования *in vitro* (признак некоторых клинически значимых зигомицетов, мицелиальных аскомицетов и базидиомицетов).

Макроморфологические признаки роста на средах агар Чапека–Докса и картофельно-декстрозном агаре – отмечали признаки колоний мицелиальных грибов: цвет поверхности; окраску реверзума (разделение штаммов на группы темноокрашенных и светлоокрашенных грибов проводили по наличию или отсутствию окраски от бурого до черного цветов); структуру (бархатистые, войлочные, зернистые, клочковатые, шерстистые, пушистые и др.), характер (плоские, приподнятые, ровные, бороздчатые, морщинистые и др.) и зональность (однородные или зональные) поверхности; наличие и окраску экссудата и пигмента; скорость и характер роста (по диаметру колонии в процессе роста).

Тесты на толерантность к повышенной температуре – исследовали способность культур к росту на среде картофельно-декстрозный агар при 37°C (дополнительный признак для дифференциации ряда видов, близких по морфологическим характеристикам).

Микроморфологию культуры плесневого гриба изучали сразу после начала споруляции (как правило, на 3 сутки исследования) во влажных неокрашенных препаратах с добавлением дистиллированной воды; культуру на предметное стекло переносили с помощью иглы (микологического крючка) и накрывали покровным стеклом. Препараты микроскопировали при x400 и x1000 увеличениях в световом микроскопе OLYMPUS BX41 (OLYMPUS, Япония).

Для образования у плесневых грибов характерных спороносных и вегетативных микроскопических структур, окраски и формирования типичного

роста использовали общепринятую методику субкультивирования на специальных идентификационных средах: агаре Чапека–Докса (HIMEDIA, Индия) и картофельно-декстрозном агаре (Bio-Rad, Франция), а при необходимости также на солодовом агаре (HIMEDIA, Индия) (видовая идентификация зигомицетов) или овсяном агаре (HIMEDIA, Индия) (видовая идентификация *Acremonium* spp., *Fusarium* spp., темноокрашенных грибов, включая группу «черных дрожжей»).

2.4 Методики определения лекарственной чувствительности дрожжевых грибов и критерии интерпретации результатов

Тестирование чувствительности изолированных штаммов дрожжевых грибов к противогрибковым препаратам проводили методом микроразведений в бульоне со средой RPMI 1640 с определением минимально подавляющих концентраций (МПК) в мкг/мл. Метод стандартизован Институтом клинических и лабораторных стандартов (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)) [200] и Европейским комитетом по определению чувствительности к антибиотикам (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)) [224], рекомендован и адаптирован для работы с патогенными дрожжами Межрегиональной ассоциацией по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии [103, 104]. В работе были использованы модификации метода микроразведений в бульоне с колориметрической оценкой результатов, разработанные на основе стандартов CLSI: тест-системы «Sensititre» (TREK Diagnostic Systems, США) (тест «YeastOne», планшеты YO8 и YO10); «FUNGIFAST AFG» (ELITech MICROBIO, Франция); «Fungitest» (Bio-Rad, Франция). Параметры планшет данных тест-систем представлены в таблице 5. Используемые методики легко выполняются и интерпретируются. Были исследованы чистые культуры дрожжевых грибов, полученные после пересева первичной культуры на агар Сабуро и инкубации в течение 24 ч.

Стандартизованная система «Sensititre» (TREK Diagnostic Systems, США) рекомендована для применения в клинических лабораториях [353]. Используемые в работе планшеты «YeastOne» (YO8 и YO10) включают

препараты группы азолов (флуконазол, итраконазол, вориконазол, позаконазол, кетоконазол), группы эхинокандинов (анидулафунгин, каспофунгин, микафунгин), амфотерицин В и флуцитозин; тестирование чувствительности проводится в 11 (7, 10) или 12 концентрациях (Таблица 5). Инокуляцию и инкубацию планшет «YeastOne», контроль плотности суспензии (пересев 10 мкл из лунки положительного контроля на чашку со средой агар Сабуро), учет результатов проводили в соответствии с рекомендациями производителя. Конечная плотность суспензии, вносимой в лунки планшета (с препаратами в определенных концентрациях и колориметрическим индикатором роста) составляла ориентировочно $1,5 - 8 \times 10^3$ КОЕ/мл; для инокуляции суспензии использовали стерильный резервуар и одноканальный дозатор.

Таблица 5 – Состав, диапазоны тестируемых концентраций (мкг/мл) и число концентраций противогрибковых препаратов в системах «Sensititre» (планшеты YO8 и YO10), «FUNGIFAST AFG» и «Fungitest»

Препарат	Диапазон тестируемых концентраций в мкг/мл; число концентраций препарата (n)		
	Sensititre (планшеты YO8, YO10)	FUNGIFAST AFG	Fungitest
Амфотерицин В	0.008–16 (12) 0.12–8 (7)	0.5-2 (3)	2-8 (2)
Флуцитозин	0.03–64 (12) 0.06–64 (11)	4-32 (4)	2-32 (2)
Миконазол	–	–	0.5-8 (2)
Кетоконазол	0.008–16 (12) –	–	0.5-4 (2)
Флуконазол	0.12–256 (12) 0.12–256 (12)	8-64 (4)	8-64 (2)
Итраконазол	0.008–16 (12) 0.015–16 (11)	0,125-1 (4)	0.5-4 (2)
Вориконазол	0.008–16 (12) 0.008–8 (11)	1-4 (3)	–
Позаконазол	0.008–8 (11) 0.008–8 (11)	–	–
Анидулафунгин	– 0.015–8 (10)	–	–
Каспофунгин	0.008–16 (12) 0.008–8 (11)	–	–
Микафунгин	– 0.008–8 (11)	–	–

Примечание: «–» – препарат в тест не включен

Планшеты инкубировали при 35°C в аэробной атмосфере в течение 24 (48) ч. или 72 ч. в зависимости от наличия роста в контрольной лунке (рост регистрировали по изменению цвета среды в лунке с голубого на красный) и рекомендаций производителя (Таблица 6).

Таблица 6 – Время инкубации планшет «YeastOne» системы «Sensititre» с различными видами дрожжевых грибов до учета результатов тестирования

Время инкубации	Виды исследованных дрожжевых грибов; число протестированных штаммов (n)
24 ч.	<i>Candida albicans</i> (101), <i>C. dubliniensis</i> (10), <i>C. famata</i> (2), <i>C. glabrata</i> (55), <i>C. kefyr</i> (13), <i>C. krusei</i> (36), <i>C. lusitaniae</i> (10), <i>C. parapsilosis</i> (20), <i>C. tropicalis</i> (31), <i>Hanseniaspora uvarum</i> (1), <i>Saprochaete capitata</i> (2)
24 или 48 ч.	<i>C. guilliermondii</i> (12), <i>C. lipolytica</i> (10), <i>C. norvegensis</i> (10), <i>C. zeylanoides</i> (10), <i>Geotrichum candidum</i> (14), <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (10)
48 ч.	<i>C. rugosa</i> (10), <i>Cryptococcus laurentii</i> (3), <i>Rhodotorula glutinis</i> (4), <i>Rh. mucilaginosa</i> (12)
72 ч.	<i>Cr. neoformans</i> (12)

Рост в лунках планшета регистрировали визуально, по изменению цвета среды; за МПК препарата для дрожжевых грибов принимали минимальную концентрацию, полностью или в значительной степени подавляющую рост исследуемой культуры: первая лунка в ряду с препаратом без изменения окраски среды или с изменением меньшей интенсивности, чем в контрольной лунке (для учета результатов азолов, эхинокандинов и флуцитозина).

Рабочие характеристики планшетов «YeastOne» системы «Sensititre» (TREK Diagnostic Systems, США) сопоставимы с характеристиками референтного метода CLSI для дрожжевых грибов [200], что позволяет проводить клиническую интерпретацию получаемых значений МПК препаратов по критериям, установленным CLSI [201, 204]. В таблице 7 приведены известные пограничные значения МПК препаратов для возбудителей кандидоза (актуальные значения CLSI), использованные в работе. При оценке уровней чувствительности к антимикотикам у грибов без установленных пограничных значений учитывались преобладающие значения МПК препарата в системе «Sensititre» (TREK Diagnostic Systems, США): виды с преобладанием низких и средних значений МПК препарата расценивались как «вероятно чувствительные», виды с преобладанием

высоких и максимально высоких значений МПК препарата – как «вероятно устойчивые» (Таблица 5).

Таблица 7 – Критерии интерпретации результатов определения чувствительности к антимикотикам у грибов рода *Candida* на основе стандартов CLSI¹

Препарат	Клинические пограничные значения МПК (мкг/мл) для <i>Candida</i>									
	<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. tropicalis</i>	
	S ≤	R ≥	S ≤	R ≥	S ≤	R ≥	S ≤	R ≥	S ≤	R ≥
Амфотерицин В ²	[1] ⁵	[4] ⁵	[1] ⁵	[4] ⁵	[1] ⁵	[4] ⁵	[1] ⁵	[4] ⁵	[1] ⁵	[4] ⁵
Флуконазол ³	2	8	– SDD ≤32 ⁶	64	– R ⁷	– R ⁷	2	8	2	8
Итраконазол ^{3,4}	0.12	1	0.12	1	0.12	1	0.12	1	0.12	1
Вориконазол ³	0.12	1	–	–	0.5	2	0.12	1	0.12	1
Позаконазол	[<1] ⁸	–	[<1] ⁸	–	[<1] ⁸	–	[<1] ⁸	–	[<1] ⁸	–
Кетоконазол	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Анидулафунгин ²	0.25	1	0.12	0.5	0.25	1	2 ⁹	8 ⁹	0.25	1
Каспофунгин ²	0.25	1	0.12	0.5	0.25	1	2 ⁹	8 ⁹	0.25	1
Микафунгин ²	0.25	1	0.06	0.25	0.25	1	2 ⁹	8 ⁹	0.25	1
Флуцитозин ^{2,4}	4	32	4	32	4	32	4	32	4	32

Примечание: МПК – минимальная подавляющая концентрация, S – чувствительные к препарату штаммы, R – устойчивые штаммы, SDD – чувствительные-дозозависимые штаммы, «–» – пограничные значения МПК препарата не установлены

¹ – По: [201, 204];

² – Интерпретация МПК в интервале между S и R значениями: I-категория (промежуточная чувствительность);

³ – Интерпретация МПК в интервале между S и R значениями: SDD-категория;

⁴ – Погораничные значения для итраконазола и флуцитозина – универсальные, установлены для всех видов *Candida*;

⁵ – Погораничные значения для амфотерицина В не установлены; штаммы *Candida* spp. с МПК ≤ 1 оценивают как вероятно чувствительные, с МПК ≥ 4 – как вероятно устойчивые;

⁶ – Все штаммы *C. glabrata* с МПК ≤ 32 относят к SDD-категории к флуконазолу;

⁷ – Штаммы *C. krusei* относят к категории устойчивых к флуконазолу без интерпретации значения МПК (тестирование не рекомендовано);

⁸ – Погораничные значения для позаконазола не установлены; штаммы *Candida* spp. с МПК < 1 оценивают как вероятно чувствительные;

⁹ – Идентичные пограничные значения эхинокандинов установлены для *C. guilliermondii*

Полученные при помощи тест-системы «Sensititre» (TREK Diagnostic Systems, США) значения МПК препаратов были использованы для исследовательских целей по определению уровней чувствительности к системным антимикотикам у грибов *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. и возбудителей редких дрожжевых микозов.

Стандартизованная тест-система «FUNGIFAST AFG» (ELITech MICROBIO, Франция) для определения чувствительности патогенных дрожжевых грибов включает препараты группы азолов (флуконазол, итраконазол, вориконазол),

амфотерицин В и флуцитозин, представленные в трех или четырех концентрациях (Таблица 5). Инокуляцию, инкубацию плашек и учет результатов проводили в соответствии с рекомендациями производителя. Стандартизацию суспензии посевного материала выполняли с помощью нефелометра. Конечная плотность суспензии, вносимой в лунки плашки, составляла ориентировочно 1×10^3 КОЕ/мл. Плашки инкубировали при 37°C в течение 24 ч., а при отсутствии роста в лунке положительного контроля (без изменения цвета среды с темно-фиолетового на розовый или бесцветный) – в течение 48 ч.; плашки с культурами *Cryptococcus neoformans* – при 30°C в течение 24 ч., 48 ч. или 72 ч. (как только цвет среды в контрольной лунке изменялся). Рост в лунках плашек регистрировали визуально, по изменению цвета среды; за МПК препарата принимали минимальную концентрацию, подавляющую рост исследуемой культуры. Результаты тестирования чувствительности штаммов дрожжей к препаратам отражали в виде МПК (мкг/мл), или (только для грибов рода *Candida*) интерпретировали в клинической классификации в категориях чувствительный, промежуточный (чувствительный-дозозависимый) или устойчивый (Таблица 8).

Таблица 8 – Критерии интерпретации результатов определения чувствительности к антимикотикам у дрожжевых грибов в системах «FUNGIFAST AFG» и «Fungitest»

Препарат	Пограничные значения МПК (мкг/мл)					
	FUNGIFAST AFG (для <i>Candida</i> spp.) ¹			Fungitest (для дрожжевых грибов) ²		
	S	SDD или I	R	S	I	R
Амфотерицин В	–	–	[>2] ³	≤ 2	4-8	>8
Флуцитозин	≤ 4	8-16 (I)	≥ 32	≤ 2	4-32	> 32
Миконазол	препарат в тест не включен			≤ 0.5	1-8	>8
Кетоконазол	препарат в тест не включен			≤ 0.5	1-4	>4
Флуконазол	≤ 8	16-32 (SDD)	≥ 64	≤ 8	16-64	>64
Итраконазол	≤ 0,125	0,25-0,5 (SDD)	≥ 1	≤ 0.5	1-4	>4
Вориконазол	≤ 1	2 (SDD)	≥ 4	препарат в тест не включен		

Примечание: МПК – минимальная подавляющая концентрация, S – чувствительные к препарату штаммы, SDD – чувствительные-дозозависимые штаммы, I – штаммы с промежуточной чувствительностью, R – устойчивые штаммы, «–» – пограничные значения МПК препарата не установлены

¹ – Клинические пограничные значения МПК для *Candida* spp. в системе «FUNGIFAST AFG» (согласно критериям CLSI для *Candida* spp. документа M27-S3 [201]);

² – Пограничные значения МПК для дифференцировки штаммов дрожжей на категории по чувствительности *in vitro* в системе «Fungitest»;

³ – Для амфотерицина В пограничные значения в системе «FUNGIFAST AFG» не установлены; МПК >2 указывает на возможную устойчивость штамма *Candida* spp.

Стандартизованная тест-система «Fungitest» (Bio-Rad, Франция) для определения чувствительности дрожжевых грибов включает препараты группы азолов (флуконазол, итраконазол, кетоконазол, миконазол), амфотерицин В и флуцитозин, представленные в двух концентрациях (Таблица 5). Инокуляцию, инкубацию плашек и учет результатов проводили в соответствии с рекомендациями производителя. Стандартизацию суспензии посевного материала выполняли с помощью нефелометра. Конечная плотность суспензии, вносимой в лунки микроплашки, составляла ориентировочно 1×10^3 КОЕ/мл. Микроплашки инкубировали при 37°C в течение 48 ч.; микроплашки с культурами *Cryptococcus neoformans* – при 30°C в течение 72 ч. Рост в лунках микроплашек регистрировали визуально, по изменению цвета среды (с голубого на розовый); чтение результатов проводили только при наличии роста в двух лунках положительного контроля. Результат тестирования чувствительности к антимикотикам интерпретировали в категориях чувствительности *in vitro*: чувствительный штамм, рост полностью подавляется антимикотиком *in vitro* (отсутствие роста в двух лунках с препаратом); промежуточный штамм (рост наблюдается только в лунке с минимальной концентрацией препарата); устойчивый штамм, рост не подавляется антимикотиком *in vitro* (рост наблюдается в двух лунках с препаратом) (Таблица 8).

2.5 Методика определения лекарственной чувствительности мицелиальных грибов рода *Aspergillus* и критерии интерпретации результатов

Тестирование чувствительности изолированных штаммов грибов рода *Aspergillus* к антимикотикам проводили методом микроразведений в бульоне со средой RPMI 1640 с определением МПК в мкг/мл с помощью системы «Sensititre» (TREK Diagnostic Systems, США) (колориметрический тест «YeastOne», планшеты YO8 и YO10 (Таблица 5)). Данная тест-система соответствует международному стандарту тестирования чувствительности мицелиальных грибов CLSI – M38-A2 [199] и адаптирована для определения лекарственной чувствительности грибов рода *Aspergillus* в микологических лабораториях (необходимое условие –

способность штамма *Aspergillus* spp. к росту *in vitro* при 35°C, что позволяет проводить инкубацию панелей «YeastOne»).

При приготовлении споровой суспензии грибов *Aspergillus* spp. была использована модифицированная нами методика, подробно описанная в разделе «Результаты собственных исследований», подглаве 6.2.1. Инокуляцию и инкубацию планшет «YeastOne», контроль плотности суспензии (пересев 10 мкл из лунки положительного контроля на чашку со средой агар Сабуро), учет результатов проводили в соответствии с рекомендациями производителя. Конечная плотность суспензии грибов *Aspergillus*, вносимой в лунки планшета составляла ориентировочно $0,5 - 5 \times 10^4$ КОЕ/мл; для инокуляции суспензии использовали стерильный резервуар и одноканальный дозатор. Планшеты инкубировали при 35°C в аэробной атмосфере в течение 48 ч. или 72 ч. в зависимости от наличия роста в контрольной лунке (рост регистрировали по изменению цвета среды в лунке с голубого на красный) (Таблица 9).

Таблица 9 – Время инкубации планшет «YeastOne» системы «Sensititre» с различными видами грибов рода *Aspergillus* до учета результатов тестирования

Время инкубации	Виды исследованных дрожжевых грибов; число протестированных штаммов (n)
48 ч.	<i>A. flavus</i> (30), <i>A. fumigatus</i> (77), <i>A. nidulans</i> (11), <i>A. niger</i> (32), <i>A. oryzae</i> (5), <i>A. terreus</i> (22)
48 или 72 ч.	<i>A. ochraceus</i> (11), <i>A. sydowii</i> (12), <i>A. ustus</i> (13), <i>A. versicolor</i> (13)
72 ч.	<i>A. flavipes</i> (5), <i>A. glaucus</i> (12)

Рост в лунках планшета регистрировали визуально, по изменению цвета среды; за МПК препарата принимали минимальную концентрацию, полностью подавляющую рост исследуемой культуры *Aspergillus*: первая лунка в ряду с препаратом без изменения окраски среды. Методика учета результатов в системе «Sensititre» «YeastOne» (TREK Diagnostic Systems, США) не позволяла оценивать показатель минимальной эффективной концентрации (МЭК), рекомендованный CLSI и EUCAST для оценки активности эхинокандинов против *Aspergillus* spp. (МЭК – наименьшая концентрация препарата, приводящая к образованию более мелких, округленных, компактных гиф по сравнению с гифами в контрольной лунке; показатель позволяет оценивать фунгистатическое действие

эхинокандинов на рост мицелия грибов *Aspergillus* spp.; определяется при сравнительной оценке роста в лунках с помощью лупы с зеркалом).

Использованные в работе критерии интерпретации значений МПК лекарственных препаратов для различных возбудителей аспергиллеза были составлены на основе имеющихся ориентировочных значений CLSI [199] и критериев клинической интерпретации EUCAST, установленных для метода микроразведений EUCAST для плесневых грибов [228] (Таблица 10).

Таблица 10 – Критерии интерпретации результатов определения чувствительности к антимикотикам у грибов рода *Aspergillus* на основе стандартов CLSI и EUCAST¹

Препарат	Клинические пограничные значения МПК (мкг/мл) для <i>Aspergillus</i>									
	<i>A. flavus</i>		<i>A. fumigatus</i>		<i>A. nidulans</i>		<i>A. niger</i>		<i>A. terreus</i>	
	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >
Амфотерицин В ^{2,3}	–	–	1	2	–	–	1	2	– R ⁶	– R ⁶
Флуконазол	– R ⁷	– R ⁷	– R ⁷	– R ⁷	– R ⁷	– R ⁷	– R ⁷	– R ⁷	– R ⁷	– R ⁷
Итраконазол ^{2,4}	1	2	1	2	1	2	–	–	1	2
Вориконазол ²	–	–	1	2	–	–	–	–	–	–
Позаконазол ²	–	–	0.125	0.25	–	–	–	–	0.125	0.25
Кетоконазол	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Анидулафунгин ⁵	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Каспофунгин ⁵	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Микафунгин ⁵	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Флуцитозин	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Примечание: МПК – минимальная подавляющая концентрация, S – чувствительные к препарату штаммы, R – устойчивые штаммы, «–» – пограничные значения МПК препарата не установлены

¹ – По: [199, 228];

² – Интерпретация МПК в интервале между S и R значениями: I-категория (промежуточная чувствительность);

³ – Штаммы *Aspergillus* spp. (кроме *A. terreus*) с МПК<2 оценивают как вероятно чувствительные к амфотерицину В, с МПК>2 – как вероятно устойчивые [199];

⁴ – Штаммы *Aspergillus* spp. (все виды) с МПК>8 оценивают как вероятно устойчивые к итраконазолу [199];

⁵ – Для оценки активности эхинокандинов против *Aspergillus* spp. используют показатель МЭК (минимальная эффективная концентрация; выявляет наличие патологического роста гиф *Aspergillus* spp.); пограничные значения МЭК для эхинокандинов не установлены, клиническая значимость определения МЭК или МПК эхинокандинов не определена;

⁶ – Штаммы *A. terreus* относят к категории устойчивых к амфотерицину В без интерпретации значения МПК (тестирование не рекомендовано);

⁷ – Штаммы грибов рода *Aspergillus* относят к категории устойчивых к флуконазолу без интерпретации значения МПК (тестирование не рекомендовано)

Референтные методики CLSI [199] и EUCAST [225] для мицелиальных грибов аналогичны друг другу и сходны с методикой «Sensititre» (TREK Diagnostic

Systems, США) (процедура тестирования, температура и время инкубации, визуальный учет результатов), что дает возможность использовать установленные EUCAST пограничные значения МПК для ориентировочной оценки данных. Учитывались также преобладающие значения МПК препарата в системе «Sensititre»: виды грибов рода *Aspergillus* с преобладанием низких и средних значений МПК препарата расценивались как «вероятно чувствительные», виды с преобладанием высоких и максимально высоких значений МПК препарата – как «вероятно устойчивые» (Таблица 5).

Контроль качества осуществляли с использованием клинических штаммов из коллекции грибов микологической лаборатории ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ»: *Candida krusei* МНПЦБТ 1447м2016 (содержимое плевральной полости), *C. parapsilosis* МНПЦБТ 1986м2016 (кровь), *Aspergillus flavus* МНПЦБТ 905м2016 (содержимое легочной полости), *A. fumigatus* МНПЦБТ 163м2016 (содержимое легочной полости) и контрольных типовых штаммов: *Aspergillus terreus* ВКМ F-2269, *Candida albicans* ATCC 2091 (Таблица 1).

Иммунологические методы исследования

В работе были использованы стандартизованные иммунологические методики экспресс-диагностики аспергиллеза, кандидоза и криптококкоза.

1. Методы выявления *Aspergillus* антигенемии и антител к антигенам *Aspergillus*

Обнаружение в сыворотке крови растворимого антигена грибов *Aspergillus* (галактоманнан) проводили методом латекс-агглютинации (РАЛ) с помощью теста «Pastorex *Aspergillus*» (Bio-Rad, Франция). Присутствие в сыворотке полисахаридного антигена приводит к реакции агглютинации с латексными частицами, сенсibilизированными моноклональными антителами к галактоманнану. Результат агглютинации виден невооруженным глазом (порог чувствительности – 15 нг/мл). Перед проведением тестирования проводили предварительную обработку сыворотки (прогревание при 100°C в течение 3 мин., с последующим центрифугированием при 10000g в течение 10 мин.), чтобы отделить циркулирующие иммунотомплексы и избежать неспецифических

реакций. Чувствительность латекса периодически контролировали при помощи положительного контроля, поставляемого с набором, специфичность – по отсутствию агглютинации латекса с глициновым буфером. Положительный результат интерпретировали как обнаружение *Aspergillus* антигенемии и признак вероятного диссеминированного аспергиллеза.

Количественное определение в сыворотке крови антител против *Aspergillus fumigatus* проводили методом непрямой гемагглютинации (РНГА) с помощью тест-системы «ELI.H.A *Aspergillus*» (ELITech MICROBIO, Франция) (обнаружение от 1/80 до 1/5120). Присутствие специфических сывороточных антител приводит к агглютинации сенсibilизированных антигеном *A. fumigatus* красных кровяных клеток (гемагглютинации). Наличие антител определяли по образованию мутного красного/коричневого преципитата, покрывающего лунку; отсутствие – по образованию кольцеобразного осадка на дне лунки. Интерпретацию результатов проводили согласно рекомендациям производителя: титр антител <1:320 – незначимая реакция; титр антител =1:320 – сомнительная реакция; титр антител $\geq$ 1:640 – достоверная реакция в пользу глубокой аспергиллезной инфекции. Реакцию проводили в микропланшете с U-образными лунками с получением результатов за 2 часа. Тест включает положительный и отрицательный контроль; чувствительность метода составляет 80%, специфичность – 98%.

2. Методы выявления *Candida* антигенемии и антител к антигенам *Candida*

Обнаружение в сыворотке крови растворимого антигена грибов *Candida* (маннан) проводили методом РАЛ с помощью теста «Pastorex *Candida*» (Bio-Rad, Франция). Присутствие в сыворотке полисахаридного антигена приводит к реакции агглютинации с латексными частицами, сенсibilизированными моноклональными антителами к маннану. Результат агглютинации виден невооруженным глазом (порог чувствительности – 2,5 нг/мл). Перед проведением тестирования проводили предварительную обработку сыворотки (прогревание при 100°C в течение 3 мин., с последующим центрифугированием при 10000g в течение 10 мин.), чтобы отделить циркулирующие иммунные комплексы и избежать

неспецифических реакций. Чувствительность латекса периодически контролировали при помощи положительного контроля сыворотки, поставляемого с набором, специфичность – по отсутствию агглютинации латекса с глициновым буфером. Согласно рекомендации производителя, для исследования отбирали 2 или 3 последовательных образцов сыворотки от одного и того же пациента для увеличения вероятности выявления антигенемии. Положительный результат интерпретировали как обнаружение *Candida* антигенемии и признак вероятного диссеминированного кандидоза.

Количественное определение в сыворотке крови антител против *Candida albicans* проводили методом РНГА с помощью тест-системы «ELI.H.A *Candida*» (ELITech MICROBIO, Франция) (обнаружение от 1/80 до 1/5120). Присутствие специфических сывороточных антител приводит к агглютинации сенсibilизированных антигеном *C. albicans* красных кровяных клеток (гемагглютинации). Наличие антител определяли по образованию мутного красного/коричневого преципитата, покрывающего лунку; отсутствие – по образованию кольцеобразного осадка на дне лунки. Интерпретацию результатов проводили согласно рекомендациям производителя: титр антител <1:160 – незначимая реакция; титр антител =1:160 – сомнительная реакция (вероятность прогрессирующего кандидоза); титр антител $\geq$ 1:320 – достоверная реакция в пользу прогрессирующего кандидоза. Реакцию проводили в микропланшете с U-образными лунками с получением результатов за 2 часа. Тест включает положительный и отрицательный контроль; чувствительность метода составляет 85,4%, специфичность – 97,9%.

3. Метод выявления *Cryptococcus* антигенемии

Обнаружение в сыворотке крови растворимого антигена *Cryptococcus neoformans* (капсульный полисахарид гликуроноксиломаннан) проводили методом РАЛ с помощью теста «Pastorex *Crypto* Plus» (Bio-Rad, Франция). В предварительно обработанной ферментом сыворотке (для исключения перекрестных реакций и повышения чувствительности определения) латекс, сенсibilизированный специфичными к гликуроноксиломаннану

моноклональными антителами, вступает в реакцию агглютинации с антигеном и образует агрегаты, видимые невооруженным глазом (порог чувствительности метода – 50 нг/мл). Для исключения риска заражения ВИЧ тестирование проводили на образцах, инаktivированных нагреванием (при 56°C в течение 30 мин.). Чувствительность латекса периодически контролировали при помощи положительного контроля, поставляемого с набором, специфичность – по отсутствию агглютинации латекса с глициновым буфером. Положительный результат интерпретировали как обнаружение *Cryptococcus* антигенемии и признак вероятного диссеминированного криптококкоза (положительные образцы титруются методом серийных разведений в растворе буфера, титр антигена указывает на стадию и диссеминацию инфекции).

Молекулярно-генетические методы исследования

Сравнительную характеристику молекулярно-генетических свойств штаммов гриба *Aspergillus sydowii* проводили по последовательности нуклеотидов части ядерной рДНК: локусы внутренних транскрибируемых спейсеров (internal transcribed spacer (ITS)) ITS1 и ITS2 (ITS регионы рДНК), ген 5.8S рРНК, вариабельные локусы D1/D2 гена 28S рРНК (D1/D2 регионы рДНК), которые используют для оценки изменчивости генотипа и в качестве критериев идентификации *Aspergillus* на разных уровнях [33, 57, 138, 163, 198], а также для молекулярной идентификации других групп *Fungi* [14, 30, 31, 32, 95, 198].

Выделение ДНК из клеток мицелия, ПЦР-анализ, секвенирование ДНК выполняли по описанной стандартной процедуре, применяемой в ГНЦ РАМН [139]. Для выделения ДНК использовали пятидневные культуры, выращенные в жидкой среде Чапека. ПЦР проводили с использованием универсальных праймеров для грибов ITS1F [238], NL4 [327]. Секвенирование ДНК выполняли с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 (Applied Biosystems, США), с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM® 3100-Avant (Applied Biosystems, США) с использованием праймеров ITS1F, ITS3, ITS4 [405], NL4.

Молекулярно-филогенетический анализ данных секвенирования локусов рДНК (ITS1-5.8S-ITS2, D1/D2 28S) проводили с использованием программ Chromas 2.3 (анализ нуклеотидных последовательностей, сборка общих контигов), ClustalX 1.83 (кладистический анализ методом Neighbor-Joining, бутстреп-анализ доверительных значений для узлов с количеством повторов 1000), TreeView 1.6.6 (визуализация кладограммы; для внешней группы при ее построении была выбрана последовательность аналогичных участков рДНК штамма *Emericella nidulans* из GenBank с кодом доступа AJ937756.1) [138]. Сравнение нуклеотидных последовательностей с базами данных последовательностей консорциума GenBank/EMBL/DDJB выполняли по алгоритму BLAST Национального центра биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information (NCBI)) [322].

Методика исследования состава микромицетов в воздухе противотуберкулезного стационара

Определение качественного 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.; посев осуществляли в трехкратной повторности). Содержание зачатков грибов исследовали в воздухе оперблока (предоперационная, операционная), бронхологического кабинета, процедурных, перевязочных и палат для больных терапевтических и хирургических отделений, и холлов стационара. Мониторинг распространения болезнетворных грибов в воздухе лечебного стационара проводили в течение 2002–2016 гг. (проведено 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 [88].

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., Чеклецовой Н.В. Статистическая обработка данных проведена совместно с сотрудником ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ» Чижовой 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. Древаль П.А., к.м.н. Дубровским А.В., к.м.н. Трусовым В.Н., Кузьминым Д.Е., к.м.н. Синицыным 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).

ГЛАВА 1 Обзор литературы

1.1 Спектр возбудителей бронхолегочных микозов

Грибы, способные вызывать у людей поражения легких, были обнаружены среди различных таксонов и морфологических групп:

- в отделах (типах) *Zygomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota* царства *Fungi* (*Mycota* или настоящие грибы); грибы остальных пяти современных отделов *Fungi* – *Chytridiomycota*, *Neocallimastigomycota*, *Blastocladiomycota*, *Glomeromycota* и *Microsporidia* не патогенны для человека [173];
- в трех морфологических полифилетических группах грибов, разделяющихся по типу таллома (вегетативного тела): неклеточный мицелий (многоядерный (ценотический) мицелий без клеточных перегородок) – его образуют мицелиальные возбудители из *Zygomycota*; клеточный мицелий (многоклеточный (септированный) мицелий, разделенный на клетки перегородками-септами с порами) – образуют мицелиальные возбудители оппортунистических микозов из *Ascomycota* и *Basidiomycota* (включая виды из группы «черных дрожжей», формирующих в одном талломе, как мицелий, так и одноклеточные структуры) и диморфные возбудители глубоких микозов порядка *Onygenales* (в сапротрофной стадии); одноклеточный таллом (состоит из одиночных почкующихся или делящихся клеток, или из их скоплений в виде нитей псевдомицелия) – образуют дрожжевые возбудители из *Ascomycota* и *Basidiomycota*, диморфные возбудители из *Onygenales* (в патогенной стадии), а также возбудитель пневмоцистоза из *Pneumocystidales* [12, 42, 258];
- в группах светлоокрашенных (гиалогифомицеты – возбудители аспергиллеза и гиалогифомикоза) и темноокрашенных видов (феогифомицеты – возбудители феогифомикоза) мицелиальных грибов, различающихся по способности к синтезу и накоплению меланоидных пигментов [6, 128].

Однако, имеющиеся в микологической литературе сведения о круге грибов, способных вызывать микозы бронхов и легких, не достаточно систематизированы, часто отрывочные или не полные. Специалисты, как правило, выделяют группу видов возбудителей «глубоких микозов», вызывающих

поражение внутренних (висцеральных) органов и глубоко лежащих тканей, упоминая при этом, что большинство возбудителей этой группы способны поражать и бронхолегочную систему [66, 131, 132, 334]. Применительно к микозу, локализованному в органах дыхательной системы, используют также термин «системный микоз», а в случаях гематогенной диссеминации инфекции в результате проникновения возбудителя в кровь – термин «диссеминированный микоз». К настоящему моменту полные списки возбудителей микозов бронхов, легких, бронхопневмонии, инвазивной пневмонии, а также списки грибов, колонизирующих нижние дыхательные пути у разных категорий больных, не сформированы. Это обусловлено, в первую очередь, недостаточной разработанностью исследовательских подходов к эффективной лабораторной диагностике пневмомикозов [175] и сложностью организации лабораторной микологической службы в практике различных МО. Реальный состав возбудителей вероятно шире, чем обозначается обычно в настоящее время, а распространенность микозов легких в России и в мире остается не полностью изученной и может значительно недооцениваться. Опубликованных исследований и точных эпидемиологических данных по большинству стран и регионов мира явно недостаточно, что затрудняет расчеты ориентировочных уровней заболеваемости тяжелыми и хроническими микозами, в том числе и бронхолегочной системы (инвазивный аспергиллез, инвазивный кандидоз, криптококкоз, мукормикоз, пневмоцистная пневмония, ХАЛ, аллергический бронхолегочный аспергиллез (АБЛА), тяжелая бронхиальная астма с микогенной сенсibilизацией) [70, 298].

1.1.1 Сведения по классификации, таксономии и номенклатуре грибов, вероятных возбудителей пневмомикозов. Плеоморфизм, анаморфные (митоспоровые) и телеоморфные виды возбудителей

Грибы – большая группа весьма разнообразных эукариотических, гетеротрофных организмов с осмотрфным способом питания, которые составляют отдельное царство живых организмов *Fungi* [123, 184, 185, 253, 305]. Более 500 видов облигатно-патогенных (первично-патогенные виды) и

факультативно-патогенных грибов (условно-патогенные или оппортунистические виды) вызывают разнообразные заболевания инфекционной природы человека и животных [175, 258]. Медицинским микологам необходимо уметь ориентироваться в современном построении классификационных схем и оперировать правилами номенклатуры для патогенных грибов [53]. Грибы – это крайне сложная для классификации и таксономии группа живых организмов, что объясняется их сложными жизненными циклами и явлением плеоморфизма у видов, имеющих две и более отличные друг от друга споровые формы; наличием значительного числа стабильных анаморфных (несовершенных) форм грибов, размножающихся только бесполым путем [12, 96, 133, 142, 243].

Жизненные циклы большинства клинически значимых видов грибов до конца не изучены. Их размножение может происходить как без смены ядерных фаз (вегетативный и бесполый тип – анаморфа или несовершенная форма целого гриба), так и со сменой ядерных фаз (половой тип – телеоморфа или совершенная форма целого гриба). В жизненном цикле отдельных грибов может преобладать телеоморфная (половая) или анаморфная (бесполая) стадия, а у группы строго бесполой грибов, к которым относится большинство возбудителей микозов, половая стадия неизвестна. Группа несовершенных грибов (*Fungi imperfecti* или *Deuteromycota*) включает мицелиальные и дрожжевые виды аскомицетов или базидиомицетов, у которых половой процесс неизвестен [148, 149, 256, 257]. По мнению специалистов, эту группу наиболее точно характеризует термин «митоспоровые грибы», что указывает на преобладание митоза над мейозом при спороношении [44, 128].

К серьезной путанице в научных публикациях приводит то, что один и тот же вид гриба нередко известен под разными наименованиями: это синонимы, а также самостоятельные названия различных стадий жизненного цикла, которые принимаются за отдельные виды с собственными названиями (они также могут иметь синонимы) [86, 101, 102]. Основные вопросы номенклатуры грибов, касающиеся ее унификации и единообразия, подробно освещены в отечественной литературе [50, 53, 101, 102]. Современные названия всех грибов, включая

болезнетворные, их синонимы, авторы и библиография приведены в доступных в Интернете базах данных по номенклатуре и таксономии грибов: Index Fungorum [269] и MycoBank [318] и базе данных Westerdijk Fungal Biodiversity Institute ((Центра биоразнообразия грибов (CBS)) [403], а также на веб-сайте Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) [41, 102].

Накопленные сведения указывают на то, что среди возбудителей пневмомикозов преобладают митоспоровые грибы, вовсе или почти не размножающиеся половым путем: мицелиальные формы сумчатых грибов, формирующие многоклеточный мицелий и размножающиеся с помощью конидий (гифомицеты – формы со свободными конидиеносцами и конидиями) и дрожжевые формы сумчатых или базидиальных грибов (вторично одноклеточные грибы, размножающиеся почкованием, многие из которых способны образовывать псевдомицелиальные структуры разной сложности, а некоторые и многоклеточный мицелий) [128, 258]. Только у части анаморфных возбудителей были обнаружены половые стадии. Такие виды разделяют на два типа: гетероталличные (большинство видов; у них половые споры образуются при скрещивании двух раздельнополых и совместимых штаммов) и гомоталличные (некоторые виды; у них к слиянию и последующему образованию половых спор *in vitro* способны клетки одного штамма) [12, 128].

Значительно меньшую часть возбудителей бронхолегочных инфекций систематики относят к совершенным грибам – это все виды отдела *Zygomycota*, а также некоторые виды *Ascomycota* или *Basidiomycota* из телеоморфных родов, у которых половые структуры регулярно образуются в культуре, а бесполовая стадия размножения в лабораторных условиях обычно не столь обильна и менее четка отделена от половых спороношений [258].

Принятая концепция «целого гриба» [152, 277] и представления о системе грибов подразумевают интеграцию митоспоровых видов среди таксонов отделов *Ascomycota* или *Basidiomycota* после обнаружения половой стадии или установления филогенетических связей с известными телеоморфами [128, 259, 262, 370]. Современная филогенетическая система грибов наиболее полно

изложена в последней десятой редакции «Словаря грибов» Дж. Эйнсворта и Х. Бисби (2008) [150].

Грибы, способные вызывать поражения бронхов и легких человека, классифицируют в трех наиболее крупных отделах царства *Fungi*: *Zygomycota* (отдел группы «низших грибов»), *Ascomycota* и *Basidiomycota* (два отдела, объединенные в общий таксон *Dikarya* или подцарство «высшие грибы») (Таблица 11) [6, 173, 258, 264].

Таблица 11 – Характеристика отделов грибов царства *Fungi*, имеющих медицинское значение

Отдел	Характеристики ¹	Возбудители микозов ²
Группа «низшие грибы»		
<i>Zygomycota</i>	Группа зигомицетов. Вегетативное тело – разветвленный неклеточный многоядерный мицелий. Бесполое размножение – эндогенными спорангиоспорами (образуются в спорангиях). Половой процесс – зигогамия с образованием зигоспоры. В клеточных стенках содержится хитин и хитозан. Запасное вещество – гликоген. Известно 1334 из предполагаемых 1350 современных видов ³	Более 30 видов (микозы человека и животных). Возбудители микозов органов дыхания: <i>Mucoromycotina</i> (<i>Mucorales</i>); <i>Entomophthoromyconina</i> (<i>Entomophthorales</i>); Incertae sedis (<i>Basidiobolales</i>)
Подцарство <i>Dikarya</i> (высшие грибы)		
<i>Ascomycota</i>	Группа аскомицетов (сумчатые грибы). Вегетативное тело – септированный гаплоидный мицелий (септа – с простой центральной порой и тельцами Воронина), состоящий из одно- или многоядерных клеток, или одиночные почкующиеся клетки (у дрожжей). Бесполое размножение – экзогенными конидиями (образуются на конидиеносцах разнообразного строения), почкованием или артроконидиями. Половой процесс – гаметангиогамия, с развитием у высших форм из оплодотворенного аскогона дикариотических аскогенных гиф (непродолжительная дикариофаза) и образованием из них аска (сумки) с гаплоидными эндогенными аскоспорами. Аск – общий орган для всех <i>Ascomycota</i> , не утративших половое размножение. Клеточная стенка – двуслойная, содержит хитин (маннан) и β-глюкан. Известно 82981 из предполагаемых 87000 современных видов ³	Более 420 видов (микозы человека и животных). Возбудители микозов органов дыхания: <i>Pezizomycotina</i> (<i>Dothideomycetes</i> , <i>Eurotiomycetes</i> , <i>Sordariomycetes</i>); <i>Saccharomycotina</i> (<i>Saccharomycetes</i>); <i>Taphrinomycotina</i> (<i>Pneumocystidomycetes</i>)

Продолжение таблицы 11

Отдел	Характеристики ¹	Возбудители микозов ²
Подцарство <i>Dikarya</i> (высшие грибы)		
<i>Basidiomycota</i>	Группа базидиомицетов. Вегетативное тело – септированный мицелий (септа долипоровая): дикариотический, как правило, с пряжками (в дикариофазе) и гаплоидный, у части видов гаплоидная фаза бывает дрожжевой. Половой процесс – соматогамия (у базидиомицетов нет дифференцированных половых органов), т.е., слияние двух вегетативных клеток гаплоидного мицелия (первичный мицелий, вырастающий из базидиоспор) с образованием дикариотического мицелия (вторичный мицелий), на котором образуются базидии различного строения (мейоспорангии) с экзогенными базидиспорами. Клеточная стенка – ламеллярная многослойная, содержит хитин и глюканы (у некоторых – маннаны). В цикле развития преобладает дикариотическая фаза, а гаплоидная фаза короткая (базидиоспоры и гаплоидный мицелий). Известно 47022 из предполагаемых 50000 современных видов ³	Более 50 видов (микозы человека и животных). Возбудители микозов органов дыхания: <i>Agaricomycotina</i> (<i>Agaricomycetes</i> , <i>Tremellomycetes</i>); <i>Pucciniomycotina</i> (<i>Microbotryomycetes</i>); <i>Ustilaginomycotina</i> (<i>Malasseziomycetes</i>)

Примечание: ¹ – По: [42, 96, 133, 258];

² – По: [173, 258];

³ – По: [183]

Отделы *Zygomycota*, *Ascomycota* и *Basidiomycota* дифференцированы по важнейшему признаку – типу полового процесса [292]. По мнению микологов Э. Мюллера и В. Леффлера (1995) [96], в таксономическом плане грибы, как совокупность организмов, объединенных общими признаками, следует рассматривать, прежде всего, на уровне самостоятельных отделов. Особенности биологии и морфологии групп зигомицетов, аскомицетов и базидиомицетов важны для понимания патогенного потенциала их болезнетворных представителей и во многом определяют спектр активных и неактивных лекарственных препаратов [124, 258, 363].

1.1.2 Группа дрожжевых грибов, вероятных возбудителей микозов бронхов и легких

В настоящее время к дрожжам относят все грибы, способные к вегетативному росту в одноклеточной форме, независимо от того, имеют ли они мицелиальную фазу в жизненном цикле и родственны аскомицетам или

базидиомицетам: «истинные дрожжи» (строго одноклеточные грибы) и «дрожжеподобные грибы» (наряду с одиночными клетками образуют и мицелий – истинный многоклеточный или ложный псевдомицелий) [12, 166].

Из более 1500 известных видов дрожжевых грибов, в современном понимании [142], к возбудителям микозов относят около 90 видов, вызывающих, как правило, оппортунистические инфекции [258]. В эту группу входят отдельные виды дрожжей, распространенных во внешней среде – сапробионты (обитают в лесных подстилках) и фитобионты (обитают на поверхности растений) [142], а также специализированные дрожжевые грибы, приспособленные к обитанию на коже и слизистых оболочках человека в составе нормобиоты [7]. Таким образом, попадание дрожжевого возбудителя в организм человека возможно не только из внешней среды, но и при контакте с носителями – другим человеком или животным. По данным G. Hoog de с соавторами (2011) [258], среди возбудителей дрожжевых микозов имеются представители 14 родов: *Candida*, *Cyniclomyces*, *Geotrichum*, *Kazachstania*, *Macrorhabdus*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Saprochaete*, *Yarrowia* (отдел *Ascomycota*); *Cryptococcus*, *Malassezia*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Trichosporon* (отдел *Basidiomycota*). Дрожжи определяются этими авторами как одноклеточные не меланизированные грибы, многие из которых формируют связанные цепочки клеток, называемые псевдомицелием. К дрожжам также отнесены грибы, продуцирующие бесполое одноклеточные артроконидии при фрагментации истинного мицелия (*Geotrichum*, *Saprochaete*, *Trichosporon*) и не образующие почкующихся клеток [258].

Среди дрожжевых грибов нет первично-патогенных паразитических видов, которые развиваются исключительно в организме-хозяине – человеке и животных (весь жизненный цикл или отдельная стадия). По уровню риска, который представляет инфекционный агент для здоровья человека, дрожжевые грибы относят к III или IV группе патогенности (классификация, принятая на территории Российской Федерации) и, соответственно, ко второй или первой группе биологического риска (Biological Safety Levels (BSL)) – BSL-2 или BSL-1 (классификация Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), принятая за

рубежом) [101, 102, 328]. Согласно действующим российским санитарно-эпидемиологическим правилам от 2008г. [20], в III группу патогенности (грибы, регулярно вызывающие оппортунистические глубокие микозы) включены четыре возбудителя кандидоза *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* [54, 130] и возбудитель криптококкоза *Cryptococcus neoformans* [205, 345]. Болезнетворные дрожжевые грибы, не попавшие в III группу, включены в IV группу патогенности (грибы, крайне редко вызывающие оппортунистические глубокие микозы и возбудители поверхностных микозов).

Некоторые дрожжевые грибы ранее были описаны в качестве возбудителей легочных микозов, хотя случаи изолированного поражения бронхов и легких дрожжами встречаются относительно редко: *Candida* spp. [249, 268, 299, 321, 351, 358, 381, 382, 411]; *Cryptococcus* spp. [177, 195, 206, 311, 320]; *Geotrichum candidum* [380]; *Saccharomyces cerevisiae* [194, 383]; *Saprochaete* spp. [338]; *Trichosporon inkin* [258]. Было показано, что дрожжевые возбудители диссеминированных микозов способны вызывать вторичные поражения бронхов и легких вследствие гематогенной диссеминации из другого источника [44, 130].

Заражение дрожжевыми грибами пациентов различных МО может происходить через поврежденную кожу, загрязненные внутрисосудистые катетеры и растворы для парентерального питания, иногда ингаляционным путем, например, зачатками *Cryptococcus* spp. [44], но чаще происходит инфицирование штаммом, который уже колонизирует в организме больного [11, 132].

По таксономической принадлежности патогенные дрожжи делятся на аскомицетовые и базидиомицетовые виды. К дрожжевым аскомицетам отнесены телеоморфные возбудители пневмоцистоза, не образующие многоклеточных структур в цикле развития (Таблица 12) [142, 233, 291, 318].

1.1.2.1 Дрожжевые грибы *Ascomycota* – возбудители бронхолегочных и диссеминированных микозов

Таксономическая классификация дрожжевых аскомицетовых грибов, вызывающих глубокие (бронхолегочные, диссеминированные) микозы, и возбудителей пневмоцистоза представлена в таблице 12. Возбудители кандидоза

и дрожжевые аскомицеты из группы редких возбудителей инвазивных инфекций классифицируются в обособленном порядке *Saccharomycetales* из подотдела *Saccharomycotina* [141, 142, 291]. G. Hoog de с соавторами [258] выделяют данных возбудителей в группу «аскомицетовые дрожжи», характеризуя их как виды близкородственные к *Saccharomyces cerevisiae*, гомо- или гетероталличные, анаморфы которых размножаются многосторонним почкованием (*Candida*) или с помощью артроконидий (дрожжеподобные грибы *Geotrichum*, *Saprochaete*).

Таблица 12 – Классификация дрожжевых грибов *Ascomycota* – вероятных возбудителей бронхолегочных и диссеминированных микозов

Подотдел	Класс	Возбудители микозов ¹ , <u>порядок</u> (род)
<i>Pezizomycotina</i>	<i>Arthoniomycetes</i>	—
	<i>Coniocybomycetes</i>	—
	<i>Dothideomycetes</i>	— II
	<i>Eurotiomycetes</i>	— II
	<i>Geoglossomycetes</i>	—
	<i>Laboulbeniomycetes</i>	—
	<i>Lecanoromycetes</i>	—
	<i>Leotiomycetes</i>	— II
	<i>Lichinomycetes</i>	—
	<i>Orbiliomycetes</i>	—
	<i>Pezizomycetes</i>	— II
	<i>Sordariomycetes</i>	— II
	<i>Xylonomycetes</i>	—
<i>Saccharomycotina</i>	<i>Saccharomycetes</i>	<u><i>Saccharomycetales</i></u> (<i>Candida</i> [*] , <i>Geotrichum</i> [*] , <i>Saccharomyces</i> , <i>Saprochaete</i> [*] , <i>Yarrowia</i>)
<i>Taphrinomycotina</i>	<i>Archaeorhizomycetes</i>	—
	<i>Neoelectomycetes</i>	—
	<i>Pneumocystidomycetes</i>	<u><i>Pneumocystidales</i></u> (<i>Pneumocystis</i>)
	<i>Schizosaccharomycetes</i>	—
	<i>Taphrinomycetes</i>	—

Примечание: ¹ – По: [173, 258];

* – анаморфные роды;

II – плесневые болезнетворные грибы *Ascomycota*

Грибы рода *Candida* остаются наиболее значимыми возбудителями микозов человека в целом [44, 130, 180, 181, 220] и самыми распространенными возбудителями инвазивных (диссеминированных и системных) микозов [66, 174, 196, 254, 315]. В список основных возбудителей кандидоза обычно включают *C. albicans* (главный возбудитель всех форм заболевания), *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* и *C. krusei*; группу частых возбудителей кандидоза дополняют видами *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* и *C. kefyr*; остальные виды

составляют группу редких возбудителей [6, 64, 130, 132, 182]. Всего известно уже более 30 видов *Candida* spp., способных вызывать инфекции человека [258].

Механизмы патогенности диплоидного гриба *C. albicans* и других видов *Candida* [48, 143, 144] включают: адгезию к клеткам хозяина и другим компонентам тканей [413]; секрецию ферментов, способствующих пенетрации через слизистые оболочки и проникновению в ткани [130, 145, 386]; способность к трансформации дрожжевой формы в инвазивные псевдомицелиальную и мицелиальную [54, 130, 171, 271]; механизм быстрого переключения фенотипов, позволяющий реализовывать имеющийся потенциал изменчивости [130, 210, 252, 396]. Феномен фенотипического переключения *Candida* spp. привлекает к себе внимание современных исследователей, разрабатывающих новые подходы к лечению кандидоза [255, 308].

Несмотря на широкую распространенность глубокого кандидоза у разных контингентов больных (иммунодефицитные и тяжелобольные пациенты), кандидоз органов дыхания и его отдельные формы (кандидозная пневмония (инвазивный кандидоз легких), кандидозный трахеобронхит (кандидоз трахеи и бронхов), кандидоз гортани, аллергический бронхолегочный кандидоз (АБЛК) и др.) выявляют относительно редко [6, 11, 44, 64, 130]. Сложилось устойчивое мнение, что грибы рода *Candida*, заселяющие слизистые оболочки ротоглотки у большинства здоровых людей (от 30 до 55% взрослых людей; различные *Candida* spp.), достаточно редко вызывают инвазивные заболевания паренхимы легких (пневмонии) [54]. Это объясняется тем, что колонизация и даже гиперколонизация слизистых оболочек как фактор развития глубокого кандидоза имеет значение только при наличии у пациента неэффективного фагоцитоза [44, 132]. Было показано, что первичный кандидоз легких (локальная бронхопневмония; источник – грибы *Candida* spp., заселяющие полость рта и глотки) возникает с заметно более низкой частотой по сравнению с вторичным кандидозом легких (диффузная бронхопневмония; проникновение *Candida* spp. в легочную ткань вследствие гематогенной диссеминации у пациентов с кандидемией). Основной возбудитель кандидоза легких – *C. albicans*, другие

известные к настоящему моменту возбудители встречаются значительно реже: *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* [130, 249, 351, 358, 382, 411]. С учетом вероятности развития вторичного кандидоза легких как следствие предшествующей диссеминации, нельзя исключать появления случаев инвазивного кандидоза легких, вызванных редкими возбудителями [15, 26, 49, 335]. Крайне важно дифференцировать характеризующийся высокой атрибутивной (инфекционной) летальностью (от 30 до 70%) инвазивный кандидоз легких от более безопасного поверхностного кандидоза трахеи и бронхов и поверхностной колонизации, часто не требующей лечения [66].

Специфической активностью *in vitro* в отношении *Candida* spp. обладают противогрибковые препараты для системного применения из различных групп лекарственных средств: полиены – амфотерицин В; азолы – кетоконазол (имидазолы), флуконазол, кроме *C. krusei*, и итраконазол (триазолы первого поколения), вориконазол и позаконазол (триазолы второго поколения); эхинокандины (ингибиторы синтеза глюкана) – каспофунгин, микафунгин, анидулафунгин; флюоропиримидины (фторпиримидины) – флуцитозин (5-фторцитозин) [7, 44, 66, 128, 130, 132, 258].

В настоящее время известно, что вызывающие кандидоз грибы обладают разной чувствительностью к антимикотикам *in vitro*. Хотя чувствительность к препаратам штаммов *Candida* spp. в пределах видов варьирует, полученные результаты дают основание утверждать об имеющейся корреляции чувствительности возбудителя кандидоза с его видовой принадлежностью [15, 39, 354, 355]; от вида возбудителя зависит выбор противогрибкового препарата [37, 45, 46]. По литературным данным, некоторые *Candida* spp. отличается сниженная природная чувствительность к антимикотикам, широко применяемым для лечения (Таблица 13). Среди таких видов выделяют два возбудителя – *C. glabrata* и *C. krusei*, для которых характерна низкая чувствительность к препаратам группы азолов, за исключением позаконазола. Хотя специалисты отмечают высокую активность амфотерицина В против грибов рода *Candida*, устойчивые к данному препарату штаммы были уже обнаружены у *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, а также

C. glabrata, *C. krusei* и *C. kefyr* [37, 44, 45, 258]. Вместе с тем, сведения о наличии у некоторых видов *Candida* природной устойчивости к амфотерицину В недостаточно обоснованы и нуждаются в проверке.

Таблица 13 – Возбудители из группы дрожжевых грибов *Ascomycota* со сниженной чувствительностью и устойчивые к системным противогрибковым препаратам

Препарат	Виды со сниженной чувствительностью ¹	Устойчивые виды ¹ (включая вероятно устойчивые)
Амфотерицин В	<i>Candida glabrata</i> ^{2,3} , <i>C. krusei</i> ^{2,3} , <i>C. kefyr</i> ² ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ²	<i>Candida guilliermondii</i> ² , <i>C. lusitaniae</i> ² ; <i>Pneumocystis jirovecii</i>
Флуконазол	<i>Candida glabrata</i> ² ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ² ; <i>Saprochaete capitata</i> ²	<i>Candida krusei</i> ; <i>Pneumocystis jirovecii</i>
Вориконазол	<i>Candida glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. lusitaniae</i>	<i>Pneumocystis jirovecii</i>
Итраконазол	<i>Candida glabrata</i> ² , <i>C. krusei</i> ² ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ²	<i>Pneumocystis jirovecii</i>
Позаконазол	–	<i>Pneumocystis jirovecii</i>
Кетоконазол	<i>Candida glabrata</i> , <i>C. krusei</i> ; <i>Saprochaete capitata</i>	<i>Pneumocystis jirovecii</i>
Анидулафунгин	<i>Candida parapsilosis</i> ⁴ , <i>C. guilliermondii</i> ⁴	–
Каспофунгин		–
Микафунгин		–
Флуцитозин	<i>Candida krusei</i> ² ; <i>Saprochaete capitata</i> ²	–

Примечание: ¹ – По: [44, 66, 132, 258];

² – Некоторые штаммы устойчивы к препарату *in vitro*;

³ – Отмечен рост устойчивости к препарату;

⁴ – Имеют повышенные значения МПК, но не являются устойчивыми видами *in vivo*

Клинически значимые дрожжевые аскомицетовые грибы, не относящиеся к роду *Candida*, расцениваются, в целом, как низковирулентные и редко встречаемые в практике возбудители заболеваний человека. Грибы из этой группы, известные в качестве возбудителей системных и диссеминированных микозов, классифицируются в двух анаморфных родах – *Geotrichum* (*G. candidum*), *Saprochaete* (*Sapr. capitata*, *Sapr. clavata*) и одном телеоморфном – *Saccharomyces* (*Sacch. cerevisiae*) (Таблица 12). Данные микромицеты способны заселять слизистые оболочки дыхательных путей здоровых людей, а у лиц с ослабленной иммунной системой – вызывать бронхолегочные инфекции [44, 128, 194, 260, 338, 380].

Широко распространенные в природе, близкородственные грибы *Geotrichum candidum*, *Saprochaete capitata* (синонимы (syn.) *Geotrichum capitatum*, *Blastoschizomyces capitatus*) и *Sapr. clavata* (syn. *Geotrichum clavatum*) имеют также

и сходную морфологию. Эти дрожжеподобные грибы обладают многоклеточным мицелиальным ростом, а дрожжевой облик их колонии приобретают после распада мицелия на одноклеточные артроконидии [142, 258, 290]. Предположительно, входными воротами данных инфекций может являться дыхательная система. Поражения органов дыхания и других органов иногда сопровождаются фунгемией [44, 66].

Синантропный вид *Saccharomyces cerevisiae*, многочисленные расы которого используются в бродильных производствах (виноделие, пивоварение) и хлебопечении, а также при производстве биологически активных добавок (syn. *Sacch. boulardii*, *Sacch. cerevisiae* var. *boulardii* [168]), рассматривали как непатогенный микромицет (группа микроорганизмов GRAS – обычно рассматриваемые как безопасные [55]). Однако в настоящее время доказана роль *Sacch. cerevisiae* в развитии инфекций, преимущественно у больных с иммунодефицитом, включая случаи системного микоза; в отдельных случаях в инфекционный процесс вовлекается и дыхательная система (пневмония, эмпиема) [44, 194, 383]. Наиболее частая форма глубоких инфекций, вызванных *Sacch. cerevisiae* – это фунгемия [44].

Лекарственные препараты, проявляющие активность *in vitro* в отношении грибов рода *Candida*, обладают активностью и против грибов родов *Geotrichum*, *Saccharomyces*, *Saprochaete*, что обусловлено их общей принадлежностью к аскомицетовым дрожжевым грибам. Сходная клеточная стенка аскомицетового типа, содержащая маннопротеиновый и глюкановый слой и в целом богатая «дрожжевым глюканом» (молекулы полисахарида, образованные в основном β -1,3- и β -1,6-связанными остатками глюкозы [62, 96]), предполагает наличие активности антимикотиков группы эхинокандинов, прицельно подавляющих синтез 1,3- β -D-глюкана [213]. Хотя имеющиеся в литературе лабораторные сведения ограничены, проведенные ранее исследования выявили меньшую чувствительность грибов родов *Saprochaete* и *Saccharomyces* к препаратам, применяемым для лечения кандидоза [44, 222] (Таблица 13). В первую очередь это касается флуконазола, сниженная природная чувствительность к которому

характерна для *Sapr. capitata* и, вероятно, для *Sacch. cerevisiae*. Было также показано, что активность амфотерицина В может быть снижена в отношении некоторых штаммов *Sacch. cerevisiae* [44, 236, 258].

1.1.2.2 Одноклеточные грибы рода *Pneumocystis*, Ascomycota – возбудители пневмоцистоза

Возбудители пневмоцистоза легких у человека и млекопитающих, ранее считавшиеся простейшими (*Protozoa*), отнесены к одноклеточным аскомицетовым грибам, как по молекулярным данным, так и на основании сходства состава и структуры клеточных стенок [387] и классифицируются в подотделе *Taphrinomycotina* [269, 318] (Таблица 12).

Несмотря на то, что исследователи относят пневмоцистоз к оппортунистическим инфекциям, *Pneumocystis* spp. близки к облигатно-патогенным микроорганизмам. Эти распространенные повсеместно микромицеты, предположительно, не обитают во внешней среде, хотя, вероятно, и способны сохраняться в воздухе в форме цист [306], а развиваются внутри организма человека или млекопитающих; обладают тропизмом к легочной ткани, где реализуют патогенные свойства на фоне иммунодефицитных состояний [синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), врожденные иммунодефициты, применение цитостатиков, иммуносупрессоров и стероидов или др.] и передаются от человека к человеку [5, 73, 387]. Р.А. Аравийский с соавторами (2012) [5] разъясняют это противоречие тем, что возможно длительное носительство пневмоцист. Пневмоцистная пневмония поражает больных с тяжелым иммунодефицитом, являясь основной причиной пневмонии у пациентов с ВИЧ и маркерной инфекцией при развитии СПИД. К группе крайне высокого риска развития пневмоцистоза относят пациентов с содержанием $CD4^+$ Т-лимфоцитов 200 клеток в 1 мкл крови и ниже. У пациентов без ВИЧ пневмоцистоз встречается значительно реже [44].

Единственным возбудителем пневмоцистной пневмонии человека и внелегочного пневмоцистоза (наблюдается редко) является вид *Pneumocystis jirovecii* [73, 135, 242, 258, 398]. В связи с невозможностью культивирования

Pneumocystis spp. *in vitro* на рутинных лабораторных средах и из-за их высокой чувствительности к факторам внешней среды, до сих пор полностью не описаны все особенности морфологии и жизненного цикла этих грибов [5, 153, 258]. Предполагаемый жизненный цикл этих внеклеточных микроорганизмов, обитающих в альвеолах легких, включает бесполоую стадию – плеоморфные трофозоиты и половую стадию: диплоидная зигота (прециста), циста (толстостенный аск) с 2-8 гаплоидными спорозоитами (аскоспоры), выход зрелых спор из цисты и их превращение в трофозоиты [5, 44, 73, 135].

Цитоплазматическая мембрана *Pneumocystis* spp., в отличие от других грибов, не содержит эргостерол, что объясняет устойчивость возбудителей пневмоцистоза к амфотерицину В и прочим полиенам, а также ко всем препаратам группы азолов. Клеточные стенки *Pneumocystis* spp. содержат 1,3-β-D-глюкан [371], являющийся мишенью для эхинокандинов, что дает основание предположить вероятную активность у препаратов этой группы.

1.1.2.3 Дрожжевые грибы *Basidiomycota* – возбудители бронхолегочных и диссеминированных микозов

Таксономическая классификация дрожжевых базидиомицетовых грибов, вызывающих глубокие микозы человека, представлена в таблице 14. Общее число видов *Basidiomycota*, имеющих клиническое значение, относительно невелико, а наибольшее значение имеют анаморфные дрожжи: возбудители криптококкоза (*Cryptococcus neoformans*, *Cr. gattii*) [312, 346], малассезиоза (*Malassezia* spp.) [8, 9, 245], трихоспороноза (*Trichosporon* spp.) [232, 258] и глубоких редких дрожжевых инфекций (*Rhodotorula* spp., *Sporobolomyces salmonicolor*) [393, 395].

Из девяти видов *Cryptococcus* spp., описанных как клинически значимые [258], наиболее распространены два возбудителя, на долю которых приходится преобладающее число случаев криптококкоза – *Cr. neoformans* (варианты *Cr. neoformans* var. *neoformans* и *Cr. neoformans* var. *grubii*) и *Cr. gattii* [44, 105, 346]. Было выявлено и подтверждено всего несколько случаев криптококкоза, ассоциированного с *Cr. albidus* или *Cr. laurentii* [37, 177, 206].

Таблица 14 – Классификация дрожжевых грибов *Basidiomycota* – вероятных возбудителей бронхолегочных и диссеминированных микозов

Подотдел	Класс	Возбудители микозов ¹ , порядок (род или вид)
<i>Agaricomycotina</i>	<i>Agaricomycetes</i>	– II
	<i>Dacrymycetes</i>	–
	<i>Tremellomycetes</i>	<i>Tremellales</i> (<i>Cryptococcus</i> [*] , <i>Trichosporon</i> [*])
<i>Pucciniomycotina</i>	<i>Agaricostilbomycetes</i>	–
	<i>Atractiellomycetes</i>	–
	<i>Classiculomycetes</i>	–
	<i>Cryptomycocolacomycetes</i>	–
	<i>Cystobasidiomycetes</i>	–
	<i>Microbotryomycetes</i>	<i>Sporidiobolales</i> (<i>Rhodotorula</i> [*] , <i>Sporobolomyces salmonicolor</i> [*])
	<i>Mixiomycetes</i>	–
	<i>Pucciniomycetes</i>	–
	<i>Tritirachiomycetes</i>	– II
<i>Ustilaginomycotina</i>	<i>Entorrhizomycetes</i>	–
	<i>Exobasidiomycetes</i>	– II
	<i>Malasseziomycetes</i>	<i>Malasseziales</i> (<i>Malassezia</i> [*])
	<i>Ustilaginomycetes</i>	–
<i>Incertae sedis</i>	<i>Wallemiomycetes</i>	– II

Примечание: ¹ – По: [173, 258];

* – анаморфные роды (виды);

II – плесневые болезнетворные грибы *Basidiomycota*

В пределах комплекса *Cr. neoformans* выделяют пять серотипов (их различают по строению капсульных антигенов, участвующих в реакции агглютинации) и восемь молекулярных типов: серотип А – молекулярные типы VN I, VN II (*Cr. neoformans* var. *grubii*); серотипы В, С – молекулярные типы VG I, VG II, VG III, VG IV (вид *Cr. gattii*); серотип D – молекулярный тип VN IV (*Cr. neoformans* var. *neoformans*) и серотип AD – молекулярный тип VN III (*Cr. neoformans*, гибридный штамм) [44, 312]. Главный возбудитель криптококкоза гриб *Cr. neoformans* встречается повсеместно, хотя отмечают неравномерное распространение серотипов: серотип А (доминирующий серотип, на его долю приходится примерно 95% всех случаев криптококкоза) распространен наиболее широко, а серотип D – преимущественно в Европе. Ареал распространения *Cr. gattii* ограничен эндемическими районами субтропических и тропических регионов [192, 193, 258, 345]. Несмотря на наблюдаемое расширение ареала гриба *Cr. gattii* из тропиков и субтропиков в другие климатические зоны мира [250,

287], случаев криптококкоза, обусловленного *Cr. gattii*, на территории России до настоящего времени выявлено не было.

Клинические проявления поражений бронхолегочной системы при криптококкозе зависят от характера и выраженности иммунодефицита, а также от вирулентных свойств штамма возбудителя и широко варьируют от бессимптомной колонизации и субклинического течения (у многих иммунокомпетентных пациентов) до угрожающих жизни состояний. Точные сведения о распространенности легочного криптококкоза отсутствуют, что связано с частым бессимптомным или субклиническим течением и сложностью его дифференциальной диагностики с другими заболеваниями микотической природы [160, 195, 266, 320]. Следует учитывать, что на фоне СПИД легочный криптококкоз неуклонно прогрессирует, характерно быстрое развитие заболевания и крайне высокая летальность, а диагностика данной патологии остается недостаточно эффективной [132]. Криптококкоз легких может протекать с одновременным поражением центральной нервной системы (ЦНС) – у лиц с выраженным иммунодефицитом, особенно у больных с тяжелыми нарушениями клеточного иммунитета, например, у ВИЧ-инфицированных пациентов при снижении количества $CD4^+$ Т-лимфоцитов менее 100 клеток в 1 мкл крови при отсутствии или неэффективности высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ) [44, 66, 309]. Криптококкоз ЦНС остается одним из главных инфекционных заболеваний у ВИЧ-инфицированных пациентов, особенно на стадиях с развитием СПИД – СПИД-ассоциированным и СПИД-индикаторным заболеванием. Применение ВААРТ позволило снизить частоту встречаемости криптококкоза у ВИЧ-инфицированных лиц [132, 278, 339, 340].

Многочисленные исследования позволили установить факторы патогенности *Cr. neoformans* и *Cr. gattii*: образование полисахаридной капсулы (подавляет иммунный ответ хозяина, препятствуя фагоцитозу, содержит ингибиторы клеточного и гуморального иммунитета); синтез меланина (защита от окислительного разрушения свободными радикалами); способность к росту при 37°C; ферменты протеиназа и фосфолипаза (деструкция тканей); фермент уреазы

(играет роль при диссеминации инфекции из легких в мозг) [6, 35, 44, 191, 193, 301, 375].

Производные эхинокандина, специфично воздействующие на клеточную стенку аскомицетовых грибов (подавляют синтез полимеров 1,3-β-D-глюкана), не обладают необходимой фунгицидной активностью против *Cr. neoformans* и *Cr. gattii* (Таблица 15). Активность *in vitro* в отношении грибов рода *Cryptococcus* проявляют азолы (флуконазол, итраконазол, вориконазол, позаконазол) и амфотерицин В, воздействие которых направлено на клеточную мембрану (прямое или косвенное действие на эргостерин клеточной мембраны гриба). Развитие *Cryptococcus* spp. также подавляет препарат флуцитозин (нарушение синтеза дезоксирибонуклеиновой (ДНК) и рибонуклеиновой кислот (РНК)), однако было отмечено быстрое развитие вторичной резистентности [37, 44, 66, 258, 347]. Установлено, что у *Cr. neoformans* вероятно развитие вторичной устойчивости к флуконазолу и вориконазолу за счет формирования у возбудителя новых фенотипов [36].

Таблица 15 – Возбудители из группы дрожжевых грибов *Basidiomycota* со сниженной чувствительностью и устойчивые к системным противогрибковым препаратам

Препарат	Виды со сниженной чувствительностью ¹	Устойчивые виды ¹ (включая вероятно устойчивые)
Амфотерицин В	<i>Malassezia furfur</i> ² ; <i>Trichosporon</i> spp. ²	<i>Trichosporon asahii</i>
Флуконазол	<i>Malassezia furfur</i> ² ; <i>Trichosporon</i> spp. ² ; <i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	<i>Rhodotorula</i> spp.
Вориконазол	<i>Trichosporon</i> spp. ²	<i>Rhodotorula</i> spp.
Итраконазол	—	<i>Rhodotorula</i> spp.
Позаконазол	<i>Trichosporon</i> spp. ²	<i>Rhodotorula</i> spp.
Кетоконазол	—	<i>Rhodotorula</i> spp.
Анидулафунгин	—	<i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Cr. gattii</i> ; <i>Rhodotorula</i> spp.; <i>Sporobolomyces salmonicolor</i> ; <i>Trichosporon</i> spp.
Каспофунгин	—	
Микафунгин	—	
Флуцитозин	—	<i>Malassezia</i> spp.; <i>Trichosporon</i> spp.

Примечание: ¹ – По: [44, 66, 132, 258];

² – Чувствительность к препарату варьирует

В литературе появляется все больше работ, описывающих дрожжеподобные грибы *Trichosporon* в качестве возбудителей глубоких микозов, с крайне высокой летальностью при развитии инвазивных форм [232, 394]. G. Hoog de с соавторами (2011) [258] описывают 8 болезнетворных видов грибов *Trichosporon*, три из

которых способны вызывать глубокие микозы: *Tr. asahii*, а также *Tr. mucoides* и *Tr. inkin*. Дыхательную систему относят к частым входным воротам трихоспороноза; при системной инфекции чаще всего поражаются легкие (бронхопневмония, образование легочных инфильтратов), а в некоторых случаях плевра [44, 395, 410]. Лечение глубокого трихоспороноза, в том числе и бронхолегочного, может быть затруднено из-за низкой природной чувствительности возбудителей к амфотерицину В, эхинокандинам, флуцитозину и вариативной чувствительности к флуконазолу [44] (Таблица 15). Наибольшей активностью в отношении грибов *Trichosporon* spp. обладают вориконазол и позаконазол (хотя их активность может варьировать) [44].

Дрожжеподобные грибы *Malassezia* spp. – облигатные симбионты человека, обитающие на коже человека в дрожжевой стадии [7, 8, 10]. Представители рода *Malassezia* (*Mal. furfur*, *Mal. pachydermatis* и др.) способны вызывать различные по локализации микозы человека – от поверхностных до глубоких форм (фунгемия, поражения легких с возможным развитием респираторного дистресс-синдрома) [44, 66, 147, 162, 258, 391]. Грибы *Malassezia* spp. обладают природной устойчивостью к флуцитозину (Таблица 15). Возбудители малассезиоза чувствительны *in vitro* к итраконазолу и кетоконазолу, однако их следует, вероятно, характеризовать как виды с вариативной чувствительностью к другим азоловым препаратам – флуконазолу, вориконазолу, позаконазолу [7, 44, 66].

В состав редких возбудителей глубоких микозов были включены четыре сапротрофных вида из группы «красных дрожжей» порядка *Sporidiobolales* (*Rhodotorula mucilaginosa*, *Rh. glutinis*, *Rh. minuta*, *Sporobolomyces salmonicolor*), образующих каротиноидные пигменты [258]. У человека грибы *Rhodotorula* spp. могут обнаруживаться на слизистых оболочках дыхательных путей [7], но у пациентов с иммунодефицитами способны вызывать системные и диссеминированные микозы, в первую очередь фунгемии, обычно катетер-ассоциированную [44, 395]. В обзорах и отдельных публикациях, посвященных *Rhodotorula* spp., наряду со случаями фунгемии, часто обусловленных инфицированием внутрисосудистого катетера, сообщается и о случаях развития

пневмонии [230, 237, 393]. Терапия микоза, вызванного *Rh. mucilaginosa* и *Rhodotorula* spp., ограничена препаратом амфотерицин В (или его комбинацией с флуцитозином, активным *in vitro* против *Rhodotorula* spp.) из-за устойчивости возбудителей к эхинокандинам, а также низкой активности флуконазола и других препаратов группы азолов [7, 44, 66, 237, 325] (Таблица 15).

1.1.3 Группа мицелиальных грибов, вероятных возбудителей микозов бронхов и легких

Условно-патогенные плесневые грибы постоянно присутствуют во внешней среде и внутри помещений, не передаются от человека к человеку, а попадают в организм из окружающей среды, обычно при вдыхании воздуха, в котором содержатся споры возбудителя (конидии, спорангиоспоры). Попадание спор в дыхательные пути может приводить у предрасположенных лиц к развитию микоза легких в случае их проникновения в бронхиальное дерево, к поражению параназальных синусов или к аллергическим заболеваниям [11, 44]. По данным G. Hoog de с соавторами (2011) [258], патогенность грибов-оппортунистов объясняется наличием у них механизмов, предоставляющих возможность к росту и репродукции внутри млекопитающих: термотолерантность (способность к росту при 37°C – основополагающий фактор вирулентности для большинства возбудителей [286]); диаметр спор, позволяющий достигать альвеол; максимальные параметры скорости роста и спороношения [21, 294, 378]; высокий уровень присутствия в воздухе [4, 82, 83, 219, 368, 373].

В ряде работ, а также на веб-сайтах представлены сведения об обнаружении среди плесневых возбудителей значительного числа микотоксичных видов [51, 82, 136, 137, 273, 385, 388] и грибов, вызывающих аллергические проявления [1, 82, 154, 187, 297]. Развитие пневмомикоза может осложняться как токсическим (*Aspergillus* spp. (в первую очередь *A. flavus*, а также *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. terreus*, *A. versicolor* и другие *Aspergillus* spp.), *Fusarium* spp., а также *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Paecilomyces* spp.), так и аллергическим действием (*Alternaria* spp., *Aspergillus* spp. (в первую очередь *A. fumigatus*, а также *A. flavus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. versicolor*), *Aureobasidium pullulans*, *Bipolaris* spp.,

Cladosporium spp., *Curvularia* spp., *Mucor* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp.) мицелиального гриба-возбудителя, утяжеляя его течение, вплоть до клинических проявлений опасных для жизни пациента [91, 178, 300, 385, 388].

С учетом низкой природной контагиозности данных возбудителей, в III группу патогенности [20] были включены: *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. terreus* (три возбудителя инвазивного аспергиллеза) [378], *Ramichloridium mackenziei* (syn. *Rhinocladiella mackenziei*) и *Cladophialophora bantiana* (два нейротропных возбудителя феогифомикоза в форме абсцесса мозга) [362] и *Penicillium marneffe* (syn. *Talaromyces marneffe*) (диморфный гриб, вызывающий системные микозы у иммунокомпрометированных пациентов) [132, 399].

Вызывать поражения легких у людей с нормальным иммунным статусом способны первично-патогенные диморфные грибы – контагиозные возбудители глубоких эндемичных микозов: *Blastomyces dermatitidis* (вызывает бластомикоз), *Coccidioides immitis* и *Cocc. posadasii* (кокцидиоидомикоз), *Histoplasma capsulatum* (гистоплазмоз), *Paracoccidioides brasiliensis* и *Par. lutzii* (паракокцидиоидомикоз), *Penicillium marneffe* (пенициллез) [11, 132, 188, 212, 234, 258, 361, 384]. Мицелиально-дрожжевой диморфизм этих паразитических видов связан со стадией жизненного цикла: плесневая сапротрофная и дрожжевая паразитическая формы. Попадая в организм человека из воздуха, возбудители переходят в дрожжевую инвазивную форму и вызывают легочные инфекции, а в ряде случаев и внелегочные диссеминированные формы заболевания [6, 11, 44, 132]. Микозы имеют ограниченную территорию распространения в эндемических областях Северной, Центральной и Южной Америки, Африки, Юго-Восточной Азии, южных провинциях Китая (Гуангкси и Гуангдонг), Тайване, Гонконге, Северо-Восточной Индии [3, 11, 132, 169]. В России первичные респираторные микозы – завозные инфекции, необходимым условием для их развития остается посещение районов распространения этих возбудителей [3, 132].

Важно знать, что работа с культурой возбудителя контагиозного микоза в плесневой форме сопряжена с высоким уровнем риска заражения персонала лаборатории, требует специального оборудования и соблюдения необходимых

мер предосторожности [19, 132]. Смена плесневой формы на дрожжевую происходит не только в тканях инфицированного человека, но и *in vitro* при 37°C. При обследовании пациентов с подозрением на эндемичный микоз материал следует направлять в лабораторию, имеющую разрешение на работу с культурами грибов II группы патогенности (BSL-3) (облигатно-патогенные микроорганизмы; в эту группу включены возбудители гистоплазмоза, кокцидиоидомикоза, бластомикоза и паракокцидиоидомикоза) [20, 108].

Облигатно-патогенные грибы – это высоко контагиозные микроорганизмы, а условно-патогенные, по определению, – низко контагиозные [66]. Однако, парадоксальным образом, за счет возрастания числа людей с различными нарушениями функций иммунной системы, природной эврибионтности и широким ареалам распространения, именно мицелиальные грибы-оппортунисты преобладают среди возбудителей пневмомикозов: зигомицеты, представители рода *Aspergillus*, светлоокрашенные гиалогифомицеты и темноокрашенные феогифомицеты [257, 258].

1.1.3.1 Мицелиальные грибы *Zygomycota* – возбудители зигомикоза легких

Таксономическая классификация клинически значимых видов зигомицетов представлена в таблице 16. Отдел *Zygomycota* в современном понимании – полифилетическая группа низших грибов [253], объединенная общими признаками: наличием зигогамии (тип полового процесса), образованием эндогенных спорангиоспор в спорангиях (бесполое спороношение) и построением таллома из ценотического мицелия (вегетативное тело). Из описанных к настоящему времени более 1300 видов *Zygomycota* [150, 269, 318] к болезнетворным грибам относят примерно 30 видов [173, 258, 283]. Клинически значимые грибы классифицируются в двух подотделах – *Mucoromycotina* и *Entomophthoromyconina*, а гриб *Basidiobolus ranarum*, ранее относимый к энтомофторовым, согласно результатам молекулярных исследований, в группе «*incertae sedis*» – неясного систематического положения в пределах *Zygomycota* [173, 269].

Таблица 16 – Классификация грибов *Zygomycota* – вероятных возбудителей бронхолегочных микозов

Подотдел	Порядок	Возбудители микозов ¹ , род или вид
<i>Entomophthoromyconina</i>	<i>Entomophthorales</i>	<i>Conidiobolus</i> (возбудители заболеваний слизистых оболочек полости носа, в редких случаях – глубокие микозы с поражением легких)
<i>Incertae sedis</i>	<i>Basidiobolales</i>	<i>Basidiobolus ranarum</i> (возбудитель подкожного микоза, в редких случаях – глубокие микозы с поражением легких)
<i>Kickxellomycotina</i>	<i>Asellariales</i>	–
	<i>Dimargaritales</i>	–
	<i>Harpellales</i>	–
	<i>Kickxellales</i>	–
<i>Mucoromycotina</i>	<i>Endogonales</i>	–
	<i>Mortierellales</i>	–*
	<i>Mucorales</i>	<i>Absidia</i> , <i>Actinomucor</i> , <i>Apophysomyces</i> , <i>Chlamydoabsidia</i> , <i>Cokeromyces</i> , <i>Cunninghamella</i> , <i>Lichtheimia</i> , <i>Mucor</i> , <i>Rhizomucor</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Saksenaea</i> , <i>Syncephalastrum</i>
<i>Zoopagomycotina</i>	<i>Zoopagales</i>	–

Примечание: ¹ – По: [173, 258];* – Патогены теплокровных животных (*Mortierella*)

Центральный порядок *Mucorales*, подробно описанный Г.А. Кочкиной (2003) [74], включает подавляющее большинство возбудителей зигомикоза (применительно к *Mucorales*, синоним термина «зигомикоз» – «мукороз» или «мукормикоз»). Среди 12 родов *Mucorales*, имеющих клиническое значение следует выделить *Rhizopus*, представителей которого наиболее часто обнаруживают в качестве этиологических агентов зигомикоза человека: *Rh. arrhizus* (syn. *Rhizopus oryzae*) – основной возбудитель, включая инвазивный зигомикоз легких, *Rh. microsporus* – второй наиболее частый возбудитель, *Rh. azygosporus*, *Rh. homothallicus*, *Rh. schipperae*, *Rh. stolonifera* [128, 258]. Следующим по клинической значимости остается род *Mucor* (*M. circinelloides*, *M. hiemalis*, *M. indicus*, *M. irregularis*, *M. racemosus*, *M. ramosissimus*). Отмечено, что другие представители *Mucorales* распространены реже, хотя частота их обнаружения в последнее время возрастает: *Absidia*, *Actinomucor*, *Apophysomyces*, *Chlamydoabsidia*, *Cokeromyces*, *Cunninghamella*, *Lichtheimia*, *Rhizomucor*, *Saksenaea*, *Syncephalastrum* [146, 173, 258, 363]. Возбудители зигомикоза – самые обычные представители порядка *Mucorales*, быстрорастущие и широко распространенные сапротрофы, развивающиеся в виде мицелия [13, 74].

Клинические варианты зигомикоза (мукормикоза) включают риноцеребральный зигомикоз (инвазивный синусит с возможным вовлечением в процесс окружающих тканей орбиты, лица и головного мозга; развивается обычно у пациентов с сахарным диабетом, особенно с кетоацидозом), зигомикоз легких (развивается у больных лейкозами, обычно с нейтропенией; у реципиентов стволовых клеток и внутренних органов; изредка – при минимальной иммуносупрессии или ее отсутствии), диссеминированный зигомикоз, первичный зигомикоз кожи. Заражение легочным и риноцеребральным мукормикозом происходит обычно при вдыхании спорангиоспор из окружающей среды [13, 132, 146, 258].

По имеющимся сведениям, легочный зигомикоз уступает по распространенности риноцеребральному. Это связано, очевидно, с большей вероятностью проникновения спорангиоспор *Mucorales* (примерно от 4 до 10 мкм) в параназальные синусы, чем в бронхи человека. Зигомикоз легких – редкое заболевание с неспецифичной клинической симптоматикой, которое характеризуется агрессивным течением и высокой смертностью. При поражении легких происходит инвазия возбудителя в легочные сосуды; вероятны как изолированный микоз легких, так и распространение инфекции с поражением различных органов, включая головной мозг [6, 44, 296, 400, 409]. В качестве возбудителей бронхолегочных микозов были описаны *Absidia coerulea*, *Cokeromyces recurvatus*, *Cunninghamella bertholletiae*, *Mucor indicus*, *Rhizomucor pusillus*, *Rhizopus arrhizus* (основной возбудитель), *Rh. homothallicus*, *Rh. schipperae* [128, 258]. Сведения о составе возбудителей легочного зигомикоза ограничены из-за трудности выделения зигомицетов при культуральных исследованиях [6, 44].

Главным и хорошо изученным фактором патогенности грибов *Mucorales* является способность к быстрому инвазивному росту, инвазии сосудов с развитием тромбоза и некроза окружающих тканей, что способствует быстрому прогрессированию заболевания и, вероятно, нарушает поступление антимикотика к очагу инфекции, снижая его эффективность *in vivo*; у *Rhizopus arrhizus*

установлена также способность спорангиоспор и мицелия к адгезии на клетках эндотелия и повреждению их спорангиоспорами [44, 132, 146].

Значительно реже встречаются энтомофторомикозы. Эти инфекции распространены преимущественно в тропиках и обусловлены видами из двух родов – *Conidiobolus* (*C. coronatus*, *C. incongruous*, *C. lamprauges*) и *Basidiobolus* (*B. ranarum*). В отличие от болезнетворных *Mucorales*, эти возбудители крайне редко вызывают глубокие формы микозов с инвазией тканей и кровеносных сосудов; все случаи энтомофторомикозов в Европе являются, по-видимому, завозными [132, 258].

Возбудители зигомикоза первично устойчивы к эхинокандинам (клеточная стенка у *Zygomycota* состоит из хитина и хитозана, и не содержит полисахарид 1,3-β-D-глюкан). Низкая активность *in vitro* против *Zygomycota* характерна и для препаратов группы азолов, за исключением позаконазола (Таблица 17). Зигомикоз может развиваться на фоне применения флуконазола, итраконазола и вориконазола [13, 44, 258]. Было установлено, что активность амфотерицина В против возбудителей зигомикоза может варьировать – у многих *Zygomycota* периодически выявляются штаммы с высокими значениями МПК, а вид *Cunninghamella bertholletiae* характеризуется как устойчивый к данному препарату. Позаконазол проявляет активность *in vitro* и *in vivo* в отношении всех *Zygomycota* [13, 44, 67, 146, 258].

Таблица 17 – Возбудители из отдела *Zygomycota* со сниженной чувствительностью и устойчивые к системным противогрибковым препаратам

Препарат	Виды со сниженной чувствительностью ¹	Устойчивые виды ¹ (включая вероятно устойчивые)
Амфотерицин В	–	<i>Cunninghamella bertholletiae</i> ²
Флуконазол	–	<i>Mucor</i> spp, <i>Rhizopus</i> spp и другие <i>Zygomycota</i>
Вориконазол	–	<i>Mucor</i> spp, <i>Rhizopus</i> spp и другие <i>Zygomycota</i>
Итраконазол	–	<i>Mucor</i> spp, <i>Rhizopus</i> spp и другие <i>Zygomycota</i>
Позаконазол	–	–
Кетоконазол	–	<i>Mucor</i> spp, <i>Rhizopus</i> spp и другие <i>Zygomycota</i>
Анидулафунгин	–	<i>Mucor</i> spp, <i>Rhizopus</i> spp и другие <i>Zygomycota</i>
Каспофунгин	–	<i>Mucor</i> spp, <i>Rhizopus</i> spp и другие <i>Zygomycota</i>
Микафунгин	–	<i>Mucor</i> spp, <i>Rhizopus</i> spp и другие <i>Zygomycota</i>
Флуцитозин	–	<i>Mucor</i> spp, <i>Rhizopus</i> spp и другие <i>Zygomycota</i>

Примечание: ¹ – По: [44, 66, 132, 258];

² – Некоторые штаммы других *Zygomycota* также проявляют устойчивость *in vitro* к препарату

1.1.3.2 Мицелиальные грибы *Ascomycota* – возбудители оппортунистических бронхолегочного аспергиллеза, глубоких гиалогифомикозов и феогифомикозов с поражением легких

Таксономическая классификация мицелиальных аскомицетовых грибов, способных вызывать поражения легких, представлена в таблице 18.

Таблица 18 – Классификация мицелиальных грибов *Ascomycota* – вероятных возбудителей бронхолегочных микозов

Подотдел	Класс	Возбудители микозов ¹ , порядок (род)
<i>Pezizomycotina</i>	<i>Arthoniomycetes</i>	—
	<i>Coniocybomycetes</i>	—
	<i>Dothideomycetes</i>	<u>Dothideales</u> (<i>Aureobasidium pullulans</i> [*] ; T/o); <u>Capnodiales</u> <i>Cladosporium</i> [*] ; T/o); <u>Pleosporales</u> (<i>Alternaria</i> [*] ; T/o, <i>Bipolaris</i> [*] ; T/o, <i>Curvularia</i> [*] ; T/o)
	<i>Eurotiomycetes</i>	<u>Chaetothyriales</u> (<i>Exophiala</i> [*] ; T/o); <u>Eurotiales</u> (<i>Aspergillus</i> [*] , <i>Paecilomyces</i> [*] , <i>Penicillium</i> [*] , <i>Talaromyces marneffe</i> [*] ; ДМ); <u>Onygenales</u> (<i>Blastomyces dermatitidis</i> [*] ; ДМ, <i>Coccidioides</i> [*] ; ДМ, <i>Emmonsia</i> [*] ; ДМ, <i>Histoplasma capsulatum</i> [*] ; ДМ, <i>Paracoccidioides</i> [*] ; ДМ)
	<i>Geoglossomycetes</i>	—
	<i>Laboulbeniomycetes</i>	—
	<i>Lecanoromycetes</i>	—
	<i>Leotiomycetes</i>	—
	<i>Lichinomycetes</i>	—
	<i>Orbiliomycetes</i>	—
	<i>Pezizomycetes</i>	—
	<i>Sordariomycetes</i>	<u>Hypocreales</u> (<i>Acremonium</i> [*] , <i>Fusarium</i> [*] , <i>Trichoderma</i> [*]); <u>Microascales</u> (<i>Scedosporium</i> [*] , <i>Scopulariopsis</i> [*]); <u>Ophiostomatales</u> (<i>Sporothrix schenckii</i> [*] ; ДМ); <u>Sordariales</u> (<i>Chaetomium</i>)
	<i>Xylonomycetes</i>	—
<i>Saccharomycotina</i>	<i>Saccharomycetes</i>	— Д
<i>Taphrinomycotina</i>	<i>Archaeorhizomycetes</i>	—
	<i>Neoelectomycetes</i>	—
	<i>Pneumocystidomycetes</i>	— Д
	<i>Schizosaccharomycetes</i>	—
	<i>Taphrinomycetes</i>	—

Примечание: ¹ – По: [173, 258];

* – анаморфные роды;

T/o – роды, где классифицируются виды темноокрашенных феогифомицетов;

ДМ – роды, где классифицируются диморфные первично-патогенные возбудители глубоких микозов (эндемичные микозы, адиаспиромикоз, споротрихоз);

Д – дрожжевые болезнетворные грибы *Ascomycota*

Следует отметить, что к данной группе относятся не только условно-патогенные, но и первично-патогенные плесневые возбудители.

Термин «диморфные грибы», т.е. виды, изменяющие форму роста в зависимости от температуры и иных условий среды, в медицинской микологии наиболее часто соотносят с плесневыми возбудителями респираторных микозов семейства *Onygenaceae* – *Blastomyces*, *Coccidioides*, *Histoplasma* и *Paracoccidioides* [128, 258]. Как отмечается, смена плесневой формы на дрожжевую происходит не только в альвеолах инфицированного человека (почкующиеся клетки или сферулы с эндоспорами у *Coccidioides* spp.), но и *in vitro* при их культивировании на питательных средах при 37°C (дрожжевые клетки) [11, 132]. Повсеместно распространенные патогенные грибы *Emmonsia* spp. также поражают легкие (заболевание адиаспиромикоз), но при переходе из мицелиальной в инвазивную (тканевую) форму формируют толстостенные сферические адиаспоры (также и *in vitro* – при 37°C (40°C)) [6, 258]. Гриб *Talaromyces marneffe* – единственный диморфный гриб-эндемик с характерным для этой группы жизненным циклом (тканевая форма – непочкующиеся дрожжевые клетки), который не относится к порядку *Onygenales* и классифицируется в порядке *Eurotiales* [6, 11, 132] (Таблица 18). Диморфный гриб *Sporothrix schenckii*, классифицируемый в порядке *Ophiostomatales*, более известен как возбудитель подкожных микозов (споротрихоз). Однако были зарегистрированы отдельные случаи легочного микоза, вызванного этим распространенным в природе возбудителем, описаны случаи внутрилабораторного заражения персонала при вдыхании исследуемого материала [63, 128, 258].

Рассмотрим подробнее состав и свойства оппортунистических мицелиальных грибов, вызывающих поражения легких, как правило, у лиц с факторами риска их развития, включая пациентов с первичными заболеваниями бронхолегочной системы – возбудителей аспергиллеза, светлоокрашенных гиалогифомицетов и темноокрашенных феогифомицетов.

Накопленные к настоящему времени многочисленные клинико-лабораторные данные показывают, что важнейшими возбудителями

оппортунистических микозов бронхов и легких являются грибы рода *Aspergillus* [66, 92, 170], среди которых выделяют группу основных возбудителей аспергиллеза – *A. fumigatus* (главный возбудитель всех форм заболевания), *A. flavus*, *A. niger* и *A. terreus* [25, 28, 43, 56, 341].

Гриб *A. fumigatus* является наиболее значимым патогенным видом микромицетов, присутствующих в воздухе внутри помещений и во внешней среде [247]. По сведениям, изложенным в руководствах по диагностике микозов, от 60 до 90% случаев инвазивного аспергиллеза (в первую очередь это заболевания легких, а также диссеминированные инфекции из очагов в легких) приходится на долю *A. fumigatus* [6, 132], что делает его одним из главных возбудителей нозокомиальных инфекций [44, 294].

Вероятно, преимущества *A. fumigatus* над другими возбудителями микозов, попадающими в организм человека ингаляционным путем из воздуха, заключаются в совокупности его природных свойств и факторов патогенности. В литературе при описании *A. fumigatus* отмечают: широкое распространение (как в окружающей среде, так и внутри различных помещений) и высокий репродуктивный потенциал конидиального размножения [82, 378]; мелкие конидии (2,5-3 мкм в диаметре), что позволяет преодолевать альвеолярный барьер [129, 176, 258, 281]; способность к росту при 37-55°C [21, 128, 219]; наличие ингибиторов факторов защиты организма-хозяина (глиотоксин, который выделяет *A. fumigatus* в организме человека, ингибирует НАДФН-зависимую оксидазу фагоцитов, нарушает функции макрофагов и подавляет Т-клеточный иммунный ответ) [294, 377]; выраженную ангиоинвазивность (способность гиф прорастать стенки сосудов) [132]; способность образовывать яды – микотоксины (глиотоксин, а также веррукулоген, виридитоксин, гельволевая кислота, дехлоронидулин, метилсулохрин, пирипропен А, рестриктоцин, триптоквивалин А, фестуклавин, фтиоевая кислота, фумагиллин, фумигаклавины А и С, фумитреморгин А и С) и различные экзоферменты [155, 330, 376, 385]. В разной степени эти же факторы патогенности характерны и для других возбудителей аспергиллеза [44, 385].

На веб-сайте The *Aspergillus* Website – глобальном комплексном ресурсе, предоставляющем широкий спектр данных о грибах рода *Aspergillus* и вызываемых ими заболеваниях, перечислены 46 видов данного рода, имеющие медицинское значение [385]. А в Атласе «Atlas of clinical fungi» G. Hoog de с соавторами (2011) [258] представлены описания 52 видов возбудителей аспергиллеза, многие из которых способны вызывать поражения бронхов и легких. Грибы *Aspergillus* заселяют самые разнообразные органические и неорганические субстраты, включая системы распределения воды в больницах [156, 401], а их конидии (от 2 до 5 мкм в диаметре), попадая воздушным путем в дыхательную систему человека способны проникать в альвеолярные пространства и прорасти там, формируя гифы [43].

Спектр вероятных патологических процессов при поражении бронхолегочной системы грибами *Aspergillus* spp. характеризуется значительным разнообразием и включает состояния гиперчувствительности (реакция организма на антигены с развитием аллергии), сапрофитические заболевания (колонизация без инвазии слизистых оболочек или полостей легких, сформировавшихся в результате предшествующего заболевания) и инвазивные формы (как правило, у иммунокомпрометированных пациентов, часто при нейтропении) [43, 92, 132, 261]. К неинвазивным и частично инвазивным формам заболевания относят поверхностную колонизацию дыхательных путей *Aspergillus* spp., АБЛА, аспергиллезу легких, аспергиллез бронхов (обструктивный аспергиллез бронхов, трахеобронхит (псевдомембранозный и язвенный)), аспергиллез плевры (аспергиллезный плеврит), ХНАЛ. Инвазивный аспергиллез легких – угрожающая жизни инфекция, без лечения практически всегда заканчивающаяся летальным исходом. Очаги инфекции в легких могут приводить к гематогенной диссеминации с поражением различных органов в связи с ангиотропностью грибов *Aspergillus* spp., которые способны проникать в сосуды и вызывать тромбозы [66, 284]. Развитие любой формы аспергиллеза легких может осложняться токсическим действием возбудителя, особенно *A. flavus*, обладающего наиболее выраженной токсигенностью [385].

Регулярно вызывают легочный аспергиллез четыре возбудителя: *A. fumigatus* (инвазивный аспергиллез, аспергиллема легких, ХНАЛ и другие клинические формы, часто с сопутствующими аллергическими реакциями), а также *A. flavus* (инвазивный аспергиллез и другие формы, основной возбудитель АБЛА), *A. niger* (аспергиллема легких и другие формы), *A. terreus* (инвазивный аспергиллез, АБЛА и другие формы). В качестве редких возбудителей бронхолегочного аспергиллеза были описаны *A. nidulans* (инвазивный аспергиллез и ХНАЛ), а также *A. caesiellus*, *A. candidus*, *A. carneus*, *A. clavatus*, *A. flavipes*, *A. glaucus*, *A. hollandicus*, *A. ochraceus*, *A. oryzae*, *A. restrictus*, *A. ustus*, *A. versicolor* [23, 72, 128, 258, 275, 313, 323, 344].

Активностью *in vitro* в отношении грибов рода *Aspergillus* обладают амфотерицин В (фунгицидное действие, мишень – клеточная мембрана (эргостерин)); итраконазол (фунгистатическое действие, мишень – клеточная мембрана (синтез эргостерина)), вориконазол и позаконазол (фунгицидное и фунгистатическое действие, мишень – клеточная мембрана); эхинокандины (фунгистатическое действие, мишень – клеточная стенка). Было установлено, что механизм действия эхинокандинов на мицелиальные грибы *Aspergillus* spp. заключается в угнетении роста апикальных концов молодых гиф, где происходит активный синтез 1,3- β -D-глюкана (воздействие же на жизнеспособные субапикальные части мицелия – минимально) [289]. Возбудители аспергиллеза первично устойчивы к флуконазолу и флуцитозину (за исключением единичных штаммов [199]), для *Aspergillus* spp. характерна низкая чувствительность к кетоконазолу (Таблица 19). К настоящему времени установлено, что основные возбудители аспергиллеза обладают разной исходной чувствительностью *in vitro* к препарату амфотерицин В: *A. fumigatus* и *A. niger* чувствительны к препарату, *A. flavus* обладает вариативной чувствительностью, а *A. terreus* устойчив к амфотерицину В [44, 128, 132, 258]. Уровни природной чувствительности *in vitro* к амфотерицину В большинства более редких возбудителей до сих пор не охарактеризованы.

Таблица 19 – Возбудители из группы оппортунистических мицелиальных грибов *Ascomycota* со сниженной чувствительностью и устойчивые к системным противогрибковым препаратам

Препарат	Виды со сниженной чувствительностью ¹	Устойчивые виды ¹ (включая вероятно устойчивые)
Амфотерицин В	<i>Aspergillus flavus</i> ² ; <i>Paecilomyces</i> spp. ² ; <i>Acremonium</i> spp. ²	<i>Aspergillus terreus</i> , вероятно <i>A. nidulans</i> ; <i>Fusarium</i> spp. ³ ; <i>Scedosporium</i> spp.; <i>Scopulariopsis</i> spp. (<i>S. brevicaulis</i>); <i>Paecilomyces lilacinus</i> ; некоторые виды феогифомицетов
Флуконазол	Виды феогифомицетов	<i>Aspergillus</i> spp.; <i>Fusarium</i> spp. и другие виды гиалогифомицетов
Вориконазол	<i>Fusarium</i> spp. ²	<i>Scedosporium prolificans</i> ; <i>Scopulariopsis brevicaulis</i>
Итраконазол	—	<i>Fusarium</i> spp.; <i>Acremonium</i> spp.; <i>Scedosporium</i> spp.; <i>Scopulariopsis</i> spp.; <i>Paecilomyces lilacinus</i>
Позаконазол	<i>Fusarium</i> spp. ²	<i>Scedosporium prolificans</i> ; <i>Scopulariopsis brevicaulis</i>
Кетоконазол	Виды феогифомицетов	<i>Aspergillus</i> spp.; <i>Fusarium</i> spp. и другие виды гиалогифомицетов
Анидулафунгин	—	<i>Fusarium</i> spp. и другие виды гиалогифомицетов; виды феогифомицетов
Каспофунгин		
Микафунгин		
Флуцитозин	—	<i>Aspergillus</i> spp.; <i>Fusarium</i> spp. и другие виды гиалогифомицетов

Примечание: ¹ – По: [44, 66, 132, 258];

² – Чувствительность к препарату варьирует;

³ – Устойчивы некоторые виды данного рода

Клинически значимые аскомицетовые плесневые грибы традиционно и оправдано дифференцируют по наличию пигментации конидий и гиф на монилиевые (светлоокрашенные; содержат гиалин) и демациевые (темноокрашенные; образуют пигмент меланин) виды [128, 258].

Светлоокрашенные грибы в литературе обозначают как гиалиновые, монилиевые или гиалогифомицеты [2, 44, 66, 128], понимая под данной группой грибов плесневые виды с септированным мицелием, которые образуют бесцветные или светлоокрашенные колонии [128]. Гиалогифомицеты относят к редким возбудителям, которые способны, однако, вызывать инвазивные или диссеминированные гиалогифомикозы, включая пневмонию (у лиц с иммунодефицитом). Заражение гиалогифомикозом происходит путем ингаляции возбудителя (основной путь при поражении бронхолегочной системы) или в результате травмы, вероятно развитие катетер-ассоциированной фунгемии. Общепринято, что инфекции, вызванные гиалиновыми грибами рода *Aspergillus*, выделяют в отдельную нозологию.

Гиалогифомикозы с поражением легких (системные легочные и диссеминированные фузариоз, сцедоспориоз, пециломикоз, акремониоз и др.) характеризуются низкой эффективностью антифунгальной терапии и высокой летальностью, развиваясь, как правило, в условиях иммунодефицита [6, 272]. Группа возбудителей включает в себя виды из родов *Fusarium* (*F. solani*, а также *F. oxysporum*, *F. verticillioides* и др.), *Scedosporium* (*Sc. apiospermum*, *Sc. prolificans*), *Acremonium* (*Acr. strictum* и др.), *Paecilomyces* (*Paec. lilacinus*, *Paec. variotii*), *Scopulariopsis* (*Scop. brevicaulis*, *Scop. brumptii*) [2, 6, 44, 66, 208]. Теперь уже общепризнано, что грибы рода *Fusarium* (известно 12 болезнетворных видов [258]) занимают второе место среди всех плесневых возбудителей инвазивных микозов, уступая только грибам *Aspergillus*. К факторам патогенности *Fusarium* spp. относят ангиоинвазивность и токсигенность [44]. Фузариоз обычно начинается как пневмония или синусит, а при прогрессировании часто развивается фунгемия и поражение кожи вследствие диссеминации [6, 44, 324]. При инвазивных и диссеминированных формах фузариоза часто наблюдается развитие пневмонии [324].

Многие из гиалогифомицетов первично устойчивы к большинству антимикотиков: флуконазолу, итраконазолу, кетоконазолу, эхинокандинам, флуцитозину, а часть видов и к амфотерицину В (Таблица 19). Отметим, что, *Scopulariopsis brevicaulis* и *Scedosporium prolificans*, а также часть штаммов *Fusarium verticillioides*, *F. solani* и *F. oxysporum*, устойчивы ко всем существующим противогрибковым препаратам; штаммы *Paecilomyces lilacinus* могут быть чувствительны только к позаконазолу [6, 44, 66, 258]. В целом, возбудители гиалогифомикозов наиболее чувствительны к вориконазолу и позаконазолу. Их чувствительность к амфотерицину В варьирует, как у разных видов (Таблица 19), так и среди различных штаммов одного вида [44, 272, 324].

Темноокрашенные грибы – группа морфологически разнообразных пигментообразующих (меланизированных) видов, относимых к мицелиальным грибам, которые образуют колонии, окрашенные в цвета от бурого до черного, за счет содержания в их клеточных стенках меланина [12, 128]. Для их обозначения

в микологической литературе используют ряд синонимов: феогифомицеты, грибы семейства *Dematiaceae*, демациевые, темнопигментированные, меланинпродуцирующие или феонидные грибы [11, 44, 66, 128, 132]. Возбудители феогифомикозов – за редким исключением, убиквисты, населяющие почву; многие из них встречаются на растениях и являются фитопатогенами [122]. Оппортунистические виды феогифомицетов способны вызывать микозы, в том числе глубокие формы: пневмонии, диссеминированные инфекции, абсцессы мозга [16, 44, 122, 132].

G. Hoog de с соавторами (2011) [258] выделяют среди анаморфных аскомицетовых феонидных возбудителей (гифомицетов) две группы:

- *Dematiaceae* – анаморфные *Pleosporales* (плесневые меланизированные грибы с крупными конидиями (*Alternaria*, *Bipolaris*, *Botryomyces*, *Curvularia*, *Dissitimus*, *Drechslera*, *Phaeosclera*, *Ulocladium*));
- «черные дрожжи» и родственные им плесневые грибы (это собственно «черные дрожжи» – виды, образующие вместе с мицелием меланизированные почкующиеся клетки (*Aureobasidium*, *Hormonema*, *Hortaea*, *Exophiala*) и родственные грибы (*Anthopsis*, *Cladophialophora*, *Cladosporium*, *Coniosporium*, *Cyphellophora*, *Fonsecaea*, *Phialophora*, *Rhinocladiella* и др.)).

В целом, список болезнетворных темноокрашенных грибов чрезвычайно обширен и продолжает расширяться, включая по данным С.Д. Реванкара (2010) более 100 видов из 60 родов [122]. Установлено, что образование меланина – общий фактор их патогенности, защита от свободных радикалов макроорганизма [44, 122]. Вызывать поражения легких неаллергического характера и инвазивные инфекции способен широкий спектр феонидных грибов: анаморфные *Pleosporales* (*Alternaria alternata*, *Bipolaris hawaiiensis*, *Bip. spicifera*, *Curvularia lunata*, *Curv. pallescens*), виды из группы «черных дрожжей» (*Aureobasidium pullulans*, *Exophiala dermatitidis*) [44, 122, 128, 258]. Кроме того, грибы *Bipolaris* spp. и *Curvularia* spp. были выявлены в качестве этиологических агентов большинства случаев аллергического бронхолегочного микоза, сходного по клинической картине с АБЛА [44, 248].

Темноокрашенные грибы высоко чувствительны *in vitro* к препаратам итраконазол, вориконазол и позаконазол. Препараты группы эхинокандинов, кетоконазол и флуконазол обладают заметно более низкой активностью в отношении возбудителей феогифомикозов [44, 66, 258] (Таблица 19).

1.1.3.3 Мицелиальные грибы *Basidiomycota* – вероятные возбудители бронхолегочных микозов

Таксономическая классификация мицелиальных базидиомицетовых грибов, вероятных возбудителей бронхолегочных микозов, представлена в таблице 20.

Таблица 20 – Классификация мицелиальных грибов *Basidiomycota* – вероятных возбудителей бронхолегочных и диссеминированных микозов

Подотдел	Класс	Возбудители микозов ¹ , порядок (вид)
<i>Agaricomycotina</i>	<i>Agaricomycetes</i>	<i>Agaricales</i> (<i>Schizophyllum commune</i> , <i>Hormographiella aspergillata</i> [*]); <i>Polyporales</i> (<i>Irpex lacteus</i> , <i>Sporotrichum pruinosum</i> [*])
	<i>Dacrymycetes</i>	—
	<i>Tremellomycetes</i>	— Д
<i>Pucciniomycotina</i>	<i>Agaricostilbomycetes</i>	—
	<i>Atractiellomycetes</i>	—
	<i>Classiculomycetes</i>	—
	<i>Cryptomycocolacomycetes</i>	—
	<i>Cystobasidiomycetes</i>	—
	<i>Microbotryomycetes</i>	— Д
	<i>Mixiomycetes</i>	—
	<i>Pucciniomycetes</i>	—
	<i>Tritirachiomycetes</i>	—
<i>Ustilaginomycotina</i>	<i>Entorrhizomycetes</i>	—
	<i>Exobasidiomycetes</i>	<i>Microstromatales</i> (<i>Quambalaria cyaneascens</i> [*])
	<i>Malasseziomycetes</i>	— Д
	<i>Ustilaginomycetes</i>	—
Incertae sedis (не определен)	<i>Wallemiomycetes</i>	—

Примечание: ¹ – По: [173, 258];

* – анаморфные виды;

Д – дрожжевые болезнетворные грибы *Basidiomycota*

Болезнетворные плесневые базидиомицеты с мицелиальной анаморфой редко выделяются в качестве возбудителей инфекций. Наиболее частый возбудитель, вызывающий различные формы бронхолегочных микозов, — телеоморфный гриб *Schizophyllum commune*, дикариотические штаммы которого отличаются наличием пряжек у септ и способностью образовывать базидиокарпы

и базидиоспоры *in vitro* [128, 258]. К вероятным возбудителям поражений легких относят еще несколько мицелиальных базидиомицетов – *Hormographiella aspergillata* (телеоморфа *Coprinus cinereus*), *Irpex lacteus*, *Sporotrichum pruinosum* (телеоморфа *Phanerochaete chrysosporium*), *Quambalaria cyanescens*. Однако все они образуют *in vitro* только конидиальные стадии, трудноотличимые морфологически от аскомицетовых светлоокрашенных гифомицетов [258, 379]. Активностью *in vitro* в отношении мицелиальных *Basidiomycota*, вероятно, обладают амфотерицин В, итраконазол, кетоконазол, вориконазол, позаконазол; неактивны – флуконазол и флуцитозин [258].

1.2 Микозы бронхов и легких у больных туберкулезом органов дыхания

1.2.1 Факторы риска развития бронхолегочного микоза у больных туберкулезом

Пациенты противотуберкулезных учреждений, получающие лечение по поводу туберкулеза легких, подвергаются риску развития вторичных микозов бронхов и легких различной этиологии. У больных данной группы следует выделить два общих фактора, предрасполагающих к развитию внутрибольничных оппортунистических микозов, которые были описаны в литературе. Это – присутствие тяжелого сопутствующего заболевания легких (наличие первичного поражения легких бактериями *Mycobacterium tuberculosis*) и лечение антибактериальными препаратами широкого спектра действия (подавление микроорганизмов нормальной микробиоты дыхательных путей, являющихся естественными антагонистами грибов, обуславливает рост возбудителя пневмомикоза) [18, 44, 94, 223]. Общеизвестно, что наличие предшествующего заболевания легких предрасполагает к развитию внутрибольничного аспергиллеза [44, 92]. Известно также, что риск развития бронхолегочного аспергиллеза возрастает при образовании полостных изменений и бронхоэктазов в легких, возникающих в результате туберкулезного процесса, при саркоидозе, бронхоэктатической болезни и других легочных заболеваниях, особенно на фоне длительного лечения, в том числе антибиотиками [93, 294, 414]. Имеющиеся сведения указывают на то, что длительное применение комбинаций

противотуберкулезных химиопрепаратов, включающих несколько антибактериальных лекарственных средств широкого спектра действия [22, 24, 58, 59, 111], может приводить к возникновению избыточной колонизации *Candida* spp. и, при определенных условиях, к последующей инвазии с развитием эндогенного системного или диссеминированного кандидоза [44, 126, 132].

У ряда пациентов присутствуют и другие факторы риска развития внутрибольничных глубоких микозов, связанные с длительным пребыванием во фтизиатрическом стационаре: хирургические вмешательства, инвазивные процедуры, длительная искусственная вентиляция легких (ИВЛ), использование катетеров, в том числе сосудистых, парентеральное питание, воспалительные изменения слизистой оболочки бронхов, а также распространенная колонизация организма грибами, в основном *Candida* spp. [6, 44, 223].

М. Рунке (2000) [126] отмечает, что при наличии у больного нескольких факторов риска, относимых к состоянию пациента, они могут выступать синергистами, а особенно опасно их сочетание с факторами воздействия окружающей среды: наличием спор мицелиальных грибов в воздухе лечебных стационаров (при строительных и ремонтных работах, в трещинах стен); наличием плесневых грибов на комнатных растениях и в продуктах питания; присутствием *Candida* spp. и других дрожжевых грибов на недостаточно обработанных руках медицинского персонала и контаминацией дрожжевыми грибами продуктов питания. Так, вероятность развития бронхолегочного аспергиллеза значительно возрастает при массивной контаминации помещений МО конидиями *Aspergillus* spp. [66, 126].

В связи с возрастанием числа людей с пониженным иммунитетом, которые получают медицинскую помощь за пределами больниц, границы между внутрибольничными инфекциями и оппортунистическими микозами, распространяющимися вне стационаров среди предрасположенных лиц, постепенно стираются [44].

Критерии выявления иммуноскомпрометированного больного в МО разного профиля на основе типичных факторов риска развития инвазивных микозов:

первичные иммунодефициты (хроническая гранулематозная болезнь, тяжелый комбинированный иммунодефицит); СПИД; длительная нейтропения (количество нейтрофилов в периферической крови менее 500 клеток/мм³ на протяжении более 10 дней); длительное (более 3 недель) использование системных глюкокортикоидов; использование препаратов, вызывающих значительный иммуносупрессивный эффект (циклоспорин, такролимус, сиролимус и пр.); реакция «трансплантат против хозяина» у реципиентов стволовых клеток [66].

В качестве главных факторов риска развития глубоких оппортунистических микозов, как правило, обозначают снижение иммунного статуса пациента (выраженность иммуносупрессии) и иммунодефицитные состояния. В.И. Литвинов (2016) [80] описал механизмы противотуберкулезного иммунитета, особенности многофакторного взаимодействия хозяин-паразит и изменения баланса их взаимоотношений внутри макроорганизма при активной и латентной форме туберкулезной инфекции. В процессе взаимодействия макроорганизма и *M. tuberculosis* участвуют факторы как врожденного, так и приобретенного иммунитета [80, 288]. Хотя инфекционный процесс, вызванный *M. tuberculosis*, возникает, как правило, при снижении функционирования иммунной системы [80, 129, 197], доля пациентов фтизиатрических МО с серьезными иммунодефицитными состояниями не столь высока, как, например, в онкологических клиниках и клиниках трансплантологии [71, 72]. В обзорной работе Е.В. Свирцевской с соавторами (2005) [129] приводятся сведения о том, что первичный иммунодефицит у больных туберкулезом встречается крайне редко, а признаки вторичной иммунной недостаточности, напротив, обнаруживают довольно часто (до 80-90% случаев), причем вторичный иммунодефицит является как одним из факторов развития туберкулезного процесса, так и следствием болезни. Однако имеющиеся в литературе сведения не позволяют в настоящее время оценить всю совокупность факторов риска развития вторичных плесневых и дрожжевых пневмомикозов у больных различными формами туберкулеза органов дыхания.

Отмечаемое в Российской Федерации и во многих других странах мира возрастание среди населения числа случаев туберкулеза, сочетанного с ВИЧ-инфекцией [98, 239], значительно увеличивает количество больных туберкулезом с иммунодефицитом и тяжелой иммуносупрессией, связанной со снижением уровня CD4⁺ Т-лимфоцитов в крови. По имеющимся сведениям, примерно треть от общего числа ВИЧ-инфицированных людей в мире (30-35 млн.) инфицированы также и *M. tuberculosis*, причем туберкулез на фоне ВИЧ-инфекции развивается ориентировочно в 20 раз чаще, чем при ее отсутствии [80, 239]. По данным на конец 2015 года, заболеваемость туберкулезом среди больных ВИЧ-инфекцией в г. Москве превышала заболеваемость туберкулезом постоянного населения города почти в 80 раз [134]. Проанализированные многолетние статистические данные по Российской Федерации показывают, что, несмотря на уменьшение общего числа заболевших туберкулезом, наблюдается постоянный и существенный рост распространения сочетанной инфекции туберкулез-ВИЧ [97, 120]. Наиболее широко туберкулез распространен среди больных на поздних стадиях ВИЧ-инфекции (4б, 4в (стадия вторичных заболеваний) или 5 (терминальная стадия) по принятой в России классификации), что следует учитывать при оценке риска развития тяжелых микозов у данной категории пациентов.

1.2.2 Значение грибов – возбудителей микозов в развитии бронхолегочной патологии у больных туберкулезом органов дыхания

Туберкулез легких – первичное (фоновое) хроническое заболевание, наиболее часто ассоциируемое с аспергиллезом легких – оппортунистическим микозом, крайне разнообразным по клиническим проявлениям. По некоторым данным, частота ассоциации аспергиллеза и туберкулеза достигает 45-76%. Бронхолегочный аспергиллез за сходство клинической картины с туберкулезом легких ранее называли «*pseudotuberculosis aspergillina*» или «*Aspergillus pseudotuberculosis*» [61, 79, 85, 92, 129, 385]. Проблема дифференциальной диагностики туберкулеза и аспергиллеза (как инвазивного аспергиллеза легких, так и ХНАЛ, аспергиллемы и АБЛА) в различных МО по-прежнему актуальна и

нередко, особенно без специальных лабораторных (микологических и серологических) исследований, происходит ошибочная диагностика туберкулеза у больного аспергиллезом [92, 280, 333]. Необходимо учитывать, что клиническая симптоматика и рентгенологические характеристики поражений легких, вызванных первично-патогенными бактериями *M. tuberculosis* и оппортунистическими плесневыми грибами *Aspergillus* spp. – весьма сходны [18, 61, 279].

Е.В. Свирщевская с соавторами (2008) [129] и В.С. Митрофанов и Е.В. Свирщевская (2013) [92] показали, что аспергиллез и туберкулез – два хронических инфекционных заболевания легких, имеющие много общего в основе патогенеза. Было установлено, что механизмы ответа иммунной системы человека на *M. tuberculosis* и *A. fumigatus* сходные, а разница в частоте патологий легких, вызываемых этими возбудителями объясняется уровнями патогенности микроорганизмов, соответственно – высоким и низким. Предположительно, особенности патогенеза аспергиллеза и туберкулеза в определенной степени коррелируют друг с другом.

Как было отмечено ранее, туберкулез и аспергиллез возникают и развиваются, как правило, при снижении иммунной активности человека. Однако существует популяция людей, генетически более предрасположенная к этим заболеваниям [92, 129, 209]. Уже возможно констатировать, что аспергиллез легких (в первую очередь аспергиллема и ХНАЛ) развивается также у некоторых иммунокомпетентных больных. Инвазивный аспергиллез может возникать у больных в различных отделениях МО и без влияния основных факторов риска инвазивных микозов (первичные и вторичные иммунодефициты (длительная нейтропения) и др.), например, при высокой концентрации конидий *Aspergillus* spp. в воздухе лечебного стационара [66]. К. Maniwa и соавторы (2005) [303] описали случай фатального инвазивного легочного аспергиллеза у больного с посттуберкулезной полостью без иммуносупрессии (проводилось комбинированное лечение аспергиллеза препаратами микафунгин (внутривенно) и итраконазол (перорально)).

Большинство случаев хронических форм аспергиллеза легких – ХНАЛ, аспергиллема легких и другие более редкие неинвазивные или локально инвазивные варианты (хронический полостной (кавернозный) аспергиллез легких, аспергиллез культи бронха (после перенесенной пульмонэктомии или лобэктомии легкого по поводу туберкулеза), аспергиллема в просвете бронха, ограниченный аспергиллез бронхов)), очевидно, связано с предшествующим туберкулезом легких [60, 61, 84, 92, 267, 285]. Имеются сообщения о нескольких случаях инфицирования плевры грибами *Aspergillus* spp. после резекции легких по поводу туберкулеза, с развитием аспергиллезной эмпиемы плевры [18, 241].

Аспергиллема или «грибной шар» часто (от 10 до 70% наблюдений) формируется внутри ранее возникших деструктивных полостей в легких у пациентов, излечившихся от туберкулеза или, реже, с активным туберкулезом [92, 189, 276, 360, 412, 414]. Вероятность развития аспергиллемы в легочной каверне размером от 2 см и более составляет 15-20% [66]. Известно, что аспергиллема состоит из конгломерата переплетенных гиф гриба *Aspergillus*, заполняющего полость легкого или участок бронхоэктаза и покрытого фибрином, слизью и клеточными элементами [92, 93, 294, 414]. Аспергиллему относят к неинвазивной и часто бессимптомной форме заболевания (сапротрофная колонизация каверн легких), однако ее опасными осложнениями являются кровохарканье, легочное кровотечение и развитие ХНАЛ при локально инвазивном мицелиальном росте *Aspergillus* spp. [84, 93]. Виды грибов рода *Aspergillus*, выделенные ранее из таких полостных образований, включают *A. fumigatus*, а также *A. niger* и *A. caesiellus*, *A. candidus*, *A. restrictus*, *A. versicolor* [128, 258, 294, 344]. Как предполагают исследователи, росту мицелия грибов рода *Aspergillus* в полости легкого способствуют благоприятные условия: затрудненный доступ клеток иммунной системы и неадекватный дренаж [129, 414].

Вызывать формирование «грибного шара» в хронической легочной полости могут также и другие оппортунистические мицелиальные грибы – *Mucor* spp. и другие зигомицеты, *Fusarium* spp., *Scedosporium apiospermum* [92, 414]. Показана также возможность сочетанного поражения патологической легочной полости при

туберкулезном процессе, вызванного ассоциациями микроорганизмов в различных сочетаниях – грибов рода *Aspergillus*, *M. tuberculosis*, нетуберкулезных микобактерий, иных патогенных бактерий [18, 92, 412].

Другая распространенная форма хронического аспергиллеза – ХНАЛ (реже используемые названия заболевания: хронический инвазивный аспергиллез легких, полуинвазивный аспергиллез легких, аспергиллезный псевдотуберкулез), также широко ассоциируется с фоновым кавернозным или фиброзно-кавернозным туберкулезом и наличием посттуберкулезной полости [66, 90, 216, 285]. В.С. Митрофанов и Е.В. Свирщевская (2013) [92] объясняют высокую частоту ассоциации ХНАЛ и туберкулеза (50-76%) сходством патогенеза этих заболеваний, что серьезно затрудняет их дифференциальную диагностику. Было также отмечено, что задержка в постановке диагноза обычна для ХНАЛ, увеличивая тяжесть заболевания и смертность [90].

ХНАЛ – труднодиагностируемое, тяжелое, частично инвазивное заболевание легких, для которого характерен вялотекущий инфекционный процесс и локальная инвазия грибами рода *Aspergillus* (обычно *A. fumigatus*). Среди возбудителей ХНАЛ были описаны *A. fumigatus*, *A. flavipes*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans* [23, 258, 275, 313]. Установлено, что ХНАЛ достоверно чаще развивается на фоне хронических заболеваний легких (до 78%), таких, как туберкулез и хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ); возможно развитие ХНАЛ у иммунокомпетентных пациентов [23, 66, 90, 92, 280, 414]. Ю.В. Борзова и соавторы (2009) [23] проанализировали 62 случая ХНАЛ, которые были выявлены в ходе многоцентрового ретроспективного исследования в 14 многопрофильных стационарах г. Санкт-Петербурга в период с 1998 по 2009 гг. и установили, что в 3 случаях (5%) заболевание развивалось у больных туберкулезом. Также приводятся сведения о случае развития инвазивного легочного аспергиллеза на фоне туберкулеза легких.

Эпидемиология аспергиллеза легких, в первом очередь хронических форм, неразрывно связана с проблемой глобального распространения туберкулеза. По оценочным данным ВОЗ ((ВОЗ, World Health Organization (WHO)), в 2015 г. в

мире туберкулезом заболело около 10,4 млн человек, что соответствует показателю заболеваемости 142 случая на 100000 населения, причем около 11% заболевших являются также больными ВИЧ-инфекцией. На официальном сайте ВОЗ отмечено, что туберкулез остается одной из 10 ведущих причин смерти в мире и присутствует во всех регионах земного шара. Несмотря на постепенное снижение заболеваемости до среднего уровня, Российская Федерация входит в число стран с наибольшим бременем туберкулеза [34, 240, 406].

Согласно расчетам организации LIFE, ХАЛ затрагивает более трех миллионов человек в мире, а у примерно 1,2 миллиона человек это заболевание ассоциировано с туберкулезом [298].

D.W. Denning и соавторы (2011) [216] разработали и использовали формулу для предположительной оценки распространенности в регионах мира ХАЛ (аспергиллема, хронический полостной аспергиллез легких и хронический фиброзирующий аспергиллез легких как с аспергиллемой, так и без нее), обусловленных предшествующим туберкулезом. Анализ эпидемиологических показателей (заболеваемость и распространенность) выявил достаточно высокий уровень пораженности ХАЛ на фоне туберкулеза у населения 23 крупнейших стран мира с населением более 50 миллионов человек (на 2005 г.). Общее количество больных в этих странах составило 1 173 881 человек, а заболеваемость – 18,0 случаев на 100000 населения (с учетом 5-летнего периода). Наименьшая частота возникновения ХАЛ (<1 случая на 100000 населения) была установлена для Германии (0,4/100000), Италии (0,5/100000), Великобритании (0,6/100000), США (0,6/100000) и Франции (0,9/100000), а наибольшая (>30 случаев на 100000 населения) – для Филиппин (51,0/100000), Демократической Республики Конго (42,9/100000), Нигерии (42,9/100000), Индонезии (38,7/100000), Эфиопии (33,7/100000) и Бангладеш (32,1/100000). Для России данный показатель составил 16,3/100000.

Расчеты по формуле D.W. Denning и соавторов (2011) [216], проведенные по показателям 2011 г., выявили, что на территории России ХАЛ на фоне туберкулеза возникал у 13078 больных (с учетом 5-летнего периода) [70].

По программе организации LIFE, в разных странах мира был проведен расчет возможных случаев ХАЛ у лиц, страдающих фоновыми хроническими заболеваниями легких (туберкулез, саркоидоз, ХОБЛ, муковисцидоз). Полученные данные позволили определить ориентировочную заболеваемость ХАЛ, которая составила для России 126,2 случая на 100000 населения [282]. К этому значению наиболее близки были расчетные показатели заболеваемостью ХАЛ для Нигерии и Филиппин (78,0/100000) [167, 329]. Расчетная частота возникновения ХАЛ у больных с хроническими легочными заболеваниями, установленная в других странах, варьировала от 2,1 до 48,0 случаев на 100000 населения [161, 179, 190, 207, 215, 229, 244, 246, 270, 317, 331, 343, 364, 389].

В отечественной и зарубежной специальной литературе нет указаний на регулярную ассоциацию туберкулеза и вторичных легочных и диссеминированных микозов, вызванных зигомицетами, гиалогифомицетами не из рода *Aspergillus*, феогифомицетами и дрожжевыми грибами, включая *Pneumocystis jirovecii* [6, 11, 44, 66, 132, 258, 292, 380]. В изложенных же разрозненных случаях авторы акцентируют внимание на обнаружении у больных туберкулезом поражений легких (мукормикоз, инвазивный кандидоз, пенициллиоз), которые регулярно возникают только на фоне выраженного иммунодефицита [231, 296, 367, 399]. Однако описанные единичные случаи в целом подтверждают предположение о том, что вызывать вторичные поражения бронхолегочной системы у больных туберкулезом легких способны различные дрожжевые и мицелиальные виды грибов. Не следует забывать о росте в Москве, Российской Федерации и мире доли случаев туберкулеза, сочетанного с ВИЧ-инфекцией и СПИД [97, 134], что, очевидно, потенциально расширяет спектр тяжелых микотических заболеваний, которые сегодня могут ассоциироваться с туберкулезом органов дыхания [314, 359].

1.3 Современные методологические подходы к лабораторной диагностике микозов органов дыхания

Диагностика оппортунистических микозов легких — сложная клинико-лабораторная задача, для решения которой применяют комбинацию клинических,

радиологических, инструментальных инвазивных и лабораторных методов исследования. Спектр патологических состояний, вызываемых условно-патогенными грибами при воздействии на бронхолегочную систему, варьирует от колонизации слизистых оболочек бронхов и заселения образованных ранее полостей в легких и бронхоэктазов, до инвазии легочной ткани с развитием тяжелых заболеваний с высокой атрибутивной летальностью [65, 92, 214]. Для всех вариантов микозов бронхов и легких характерна значительная диагностическая неопределенность, что объясняется отсутствием у пневмомикозов патогномоничных клинических и радиологических признаков и ограничениями, имеющимися у всех лабораторных методов исследования [78, 158, 214]. К высокоинформативным инструментальным методам диагностики относят компьютерную томографию (КТ) в режиме высокого разрешения, диагностическую ФБС, трансторакальную тонкоигольную чрескожную биопсию, торакоскопию с биопсией. Данные радиологических и инструментальных исследований необходимо верифицировать специальными лабораторными методами [6, 78, 84, 214, 342].

Определяющее значение в диагностике микозов бронхов и легких имеют результаты лабораторных исследований – прямой микроскопии, культуральных и некультуральных (иммунологических и молекулярных) методов, способных выявлять возбудитель и его биологические маркеры в биосубстратах [6, 45, 47, 69, 132, 214, 342, 397]. В качестве обязательного условия эффективной диагностики глубоких микозов специалисты обозначают обнаружение возбудителя в биоматериале. Таким образом, клинические и инструментальные методы диагностики пневмомикозов являются необходимыми составляющими диагностического процесса, решающая роль в котором отводится лабораторным методикам [6, 66, 214].

Клиническая значимость результатов лабораторных исследований и рекомендации по использованию отдельных методов и методик в рутинной практике отражены в ряде общепринятых стандартов:

- стандарты диагностики инвазивных грибковых инфекций, разработанные группами по изучению микозов – Европейской организации по исследованию и лечению рака (European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group (EORTC)) и Национального института аллергии и инфекционных болезней (National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (MSG)) [158, 211]. Согласно стандартам EORTC/MSG [211], лабораторные критерии инвазивного микоза имеют два уровня достоверности: доказанный инвазивный микоз (применимы для всех категории пациентов; их наличие доказывает диагноз) и вероятный (применимы для иммунокомпрометированных пациентов, с учетом клинических признаков микоза; их наличие поддерживает или предполагает диагноз);
- рекомендации Американского общества инфекционных болезней ((Infectious Diseases Society of America (IDSA)) по диагностике и лечению аспергиллеза [84, 342, 397], кандидоза [336, 337] и криптококкоза [347, 365]. Согласно критериям IDSA, рекомендации подразделяют на категории: А – настоятельно рекомендованные для применения подходы (высокий уровень доказательности), В – рекомендованные для применения (средний уровень доказательности), С – с низким уровнем доказательности для применения. При двухуровневом разделении рекомендации дифференцируют на «сильные» или «слабые» [337, 342];
- критерии комплексной диагностики ХАЛ, установленные Европейским обществом по клинической микробиологии и инфекционным заболеваниям (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease (ESCMID)) и Европейским респираторным обществом (European Respiratory Society (ERS)) [214]. Согласно критериям ESCMID/ERS, рекомендации подразделяют на категории: А – имеются убедительные доказательства для применения подхода, В – имеются определенные доказательства, С – имеются косвенные доказательства, D – имеются доказательства против применения.

Таким образом, использование ряда прямых (культуральное, прямое микроскопическое, гистологическое и цитологическое исследования) и непрямых лабораторных методик (обнаружение антигенов *Aspergillus* и *Cryptococcus*, антител к антигенам *Aspergillus* и β -D-глюкана в биологических жидкостях) было закреплено в рекомендациях для верификации инвазивных микозов, криптококкоза, ХАЛ, АБЛА [211, 214, 342]. Некоторые подходы упоминаются как возможные к применению (методики серодиагностики кандидоза) или обозначены как перспективные для использования после их стандартизации, валидации и подтверждения клинического значения (методики молекулярной диагностики) [211, 304, 337, 342].

Анализ подходов к проведению лабораторной диагностики пневмомикозов изложен в ряде отечественных работ по диагностике и лечению микозов и работ зарубежных авторов, переведенных на русский язык [6, 11, 40, 44, 45, 54, 65, 68, 92, 125, 128, 130, 132]. Обновляемую информацию по данной тематике предоставляют научные микологические центры на Веб-сайтах: ресурсы Общероссийской общественной научной организации «Национальная академия микологии» [100]; НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина СЗГМУ им. И.И. Мечникова [89]; Центра CBS (Westerdijk Fungal Biodiversity Institute) [403]; группы по изучению микозов MSG [218]; микологической группы Университета Аделаиды [319].

1.3.1 Принципы и методы микробиологической (микологической) диагностики микозов

Микробиологическая диагностика пневмомикозов основана на прямом обнаружении возбудителя в диагностическом материале (БАЛ, мокрота, тканевые образцы и др.) с помощью методов первичной микроскопии и посева на специальные питательные среды. Культуральное исследование позволяет установить этиологию микоза и изучить свойства штамма возбудителя, включая чувствительность к антимикотикам. Прямую микроскопию материала используют для подтверждения результатов посева [44], а также в качестве самостоятельного метода экспресс-диагностики [6, 68, 76, 132, 258].

Выделение культуры гриба из посева легочной ткани доказывает развитие микоза легких (даже без обнаружения других признаков заболевания) и позволяет проводить обоснованную этиотропную терапию [38]. Диагностическая значимость и специфичность культурального исследования тканевого материала (в норме стерильного) закрепляют за ним приоритет в диагностике инвазивных форм пневмомикозов (за исключением пневмоцистоза) [44]. Оставаясь «золотым стандартом», классический культуральный метод исследования биоптата имеет ряд недостатков: длительное время до получения и идентификации культуры (от 2 суток и более); ограниченная доступность материала (посев материала, полученного не из области поражения, а из соседних локусов может приводить к ложноотрицательным результатам); невысокая чувствительность при диагностике мукормикоза, аспергиллеза и кандидоза; инвазивные диагностические процедуры, связанные с риском для пациента [68, 84, 132, 158, 265, 337]. Изоляцию из очага поражения в легочной ткани плесневого (включая «черные дрожжи») или дрожжевого гриба расценивают как критерий доказанного инвазивного микоза легких, а его этиологию определяет родовая принадлежность культуры гриба [158, 211, 342, 397].

Микроскопические находки элементов плесневых или дрожжевых грибов в аспиратах или биоптатах ткани с признаками поражения, также являются доказательством инвазивного микоза, но с диагностическими ограничениями: инвазивный плесневый микоз (находки – гифы мицелия или меланизированные дрожжеподобные формы) или инвазивный дрожжевой микоз (находки – дрожжевые клетки, включая капсулообразующие, псевдогифы или гифы дрожжевых грибов) [84, 158, 211, 214, 337]. Влажные образцы из очагов, связанных с инвазивным микозом, по стандартам EORTC/MSG рекомендовано окрашивать флуоресцентным красителем (калькофлюор, бланкофор и др.), а образцы для гистологических и цитологических исследований – метенаминовым серебряным по Гомори-Грокотт и реактивом Шиффа. Для уточнения диагноза необходимы выделение и идентификация культуры возбудителя [211]. В указаниях IDSA по диагностике и лечению аспергиллеза [342] рекомендовано

(сильные рекомендации) проводить параллельные гистопатологические/цитологические и микологические исследования биопсийного материала из легких.

В микологической лаборатории микроскопические исследования биоматериалов проводят с помощью метода прямой микроскопии, исследуя при диагностике пневмомикозов как нативные, так и окрашенные препараты. Метод применим для обнаружения грибов в плотном и жидком материале: тканевые образцы из легких, стерильные образцы жидкостей тела (СМЖ, кровь, плевральная жидкость и др.), БАЛ и мокрота.

Для приготовления и окраски препаратов возможно использовать ряд методик: неокрашенные препараты – в воде, изотоническом растворе хлорида натрия (физиологический раствор) или в просветляющих жидкостях (стандартная смесь этилового спирта, глицерина и воды; раствор Люголя; 10-30% раствор щелочи (KOH)); окраска по Граму (стандартная и в модификациях по Боголепову, по Брауну – Бренну и др.; выявляет наличие почти всех микромицетов, наиболее эффективна для обнаружения дрожжевых грибов, не образующих капсул); окраска по Романовскому – Гимзе (различные варианты, рекомендована для диагностики фузариоза и пневмоцистоза); окраска тушью (рекомендована для обнаружения в СМЖ капсул *Cryptococcus neoformans*); варианты микроскопии плотного материала со щелочью (10% раствор KOH): с окраской флюорохромным красителем калькофлюором белым (позволяет выявлять в тканях даже единичные клетки возбудителя – элементы грибов, содержащие хитин, видны в УФ-свете), другие варианты окраски (окраска тушью и др.) или неокрашенные препараты.

По мнению специалистов, стандартные рутинные методики прямой микроскопии позволяют обнаруживать элементы дрожжевых и мицелиальных грибов в респираторных биосубстратах (БАЛ и бронхиальный секрет, полученные при ФБС; мокрота), материале из очага поражения в легких (биоптаты, резекционный материал) и стерильных жидкостях (СМЖ, плевральная жидкость) [6, 44, 76, 132]. Наибольшее диагностическое значение имеют находки грибов в легочной ткани из пораженного участка (доказанный легочный микоз), СМЖ

(вероятный диссеминированный микоз, в случае обнаружения дрожжевых клеток с капсулами – диссеминированный криптококкоз) и плевральной жидкости (в норме – стерильная). Находки плесневого мицелия, элементов дрожжевых грибов в мокроте и БАЛ не имеют самостоятельного диагностического значения, исключая обнаружение элементов плесневых грибов или *Cryptococcus* spp. у больных с высоким риском развития инвазивного микоза [68, 158, 211, 214].

Важное место в диагностике пневмомикозов занимает культуральный метод исследования БАЛ и мокроты, с обязательным использованием специализированных питательных сред [6, 68, 87, 92, 132, 263]. ФБС (БАЛ) с микробиологическим исследованием полученного биоматериала (посев, микроскопия) является стандартной процедурой установления диагноза инвазивного легочного аспергиллеза и характеризуется как высокоспецифичный метод. Идентификация возбудителя позволяет дифференцировать аспергиллез легких с другими инфекциями, сходными по клинической картине, которые вызывают зигомицеты или мицелиальные аскомицетовые грибы – *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., феоидные виды [84]. Проведение посева респираторного материала при диагностике инвазивного аспергиллеза легких, ХАЛ и других форм аспергиллеза рекомендовано в документах IDSA (БАЛ, сильные рекомендации) [342] и ESCMID/ERS (БАЛ и мокрота (метод более чувствителен при использовании селективных микологических сред)), рекомендации категории А [214]. Исследования БАЛ и мокроты с целью выявления *Cryptococcus neoformans* рекомендованы при диагностике легочного и диссеминированного криптококкоза [347, 365]. В отличие от возбудителей аспергиллеза и гиалогифомикоза, плесневые грибы, вызывающие зигомикоз, не часто выделяются из БАЛ и мокроты даже при распространенном поражении легких [6, 44, 68, 363].

По критериям EORTC/MSG, обнаружение в БАЛ, мокроте или бронхиальном биоптате («защищённая» щёточная биопсия) любого плесневого гриба или *Cryptococcus neoformans* у пациента с риском развития инвазивного микоза и клиническими признаками заболевания легких следует интерпретировать как признак вероятного инвазивного микоза [158, 211].

Обнаружение гриба в БАЛ – наиболее информативный результат с вероятным уровнем достоверности по критериям EORTC/MSG [211] и имеет значение для диагностики как инвазивных, так и неинвазивных пневмомикозов [44, 92, 132, 214].

Самым доступным лабораторным подтверждением диагноза пневмомикозов является обнаружение гриба в мокроте. Выделение *Aspergillus* spp. из мокроты поддерживает диагноз ХАЛ, но требует подтверждения другими клинико-лабораторными критериями [214]. В контексте признаков инфекции легких сложно интерпретировать данные о выделении из мокроты *Candida* spp., что связано с распространенной колонизацией этими грибами слизистых оболочек верхних дыхательных путей и ротоглотки человека. В рекомендациях IDSA указано, что рост грибов *Candida* в материале из нижних отделов дыхательного тракта обычно указывает на колонизацию, а не на развитие кандидозной пневмонии и редко требует проведения терапии (сильные рекомендации) [337]. Диагностика поверхностного кандидоза бронхов (массивная колонизация бронхов грибами *Candida* spp. осложняет ряд состояний: бронхоэктазы, ХОБЛ и др.) и кандидозного трахеобронхита (не гематогенная форма глубокого кандидоза), напротив, основана на обнаружении возбудителя в респираторном материале; выделение гриба рода *Candida* из мокроты в количестве, превышающем 1×10^3 КОЕ/мл интерпретируют как признак данных состояний и критерий массивной колонизации *Candida* sp. нижних дыхательных путей [27, 40, 47, 132].

Для выявления диссеминированных форм микозов или, когда точная локализация легочной инфекции не установлена, исследуют стерильные жидкости человека: кровь (диагностика кандидоза, криптококкоза, редких дрожжевых микозов, фузариоза) и СМЖ (криптококкоз, кандидоз) [44, 132]. Критерием фунгемии является однократное выделение из посева крови дрожжевого (*Candida* spp., *Cryptococcus* spp. и др.), дрожжеподобного (*Trichosporon* spp. и др.) или плесневого гриба, за исключением *Aspergillus* spp. Хотя грибы *Aspergillus* spp. способны вызывать диссеминированные инфекции, их обнаружение в посеве крови (и других стерильных жидкостей) принято трактовать как результат

загрязнения из воздуха и не принимать в качестве доказательства инфекции [132, 158, 211]. Выделение культуры *Fusarium* spp., напротив, с высокой вероятностью свидетельствует о фунгемии и развитии висцеральной инфекции. В качестве доказательства заболевания (а не контаминации) следует рассматривать выделение из посева крови и других гиалогифомицетов – *Acremonium* spp., *Paecilomyces* spp., *Scopulariopsis* spp., *Scedosporium* spp., *Trichoderma* spp. В отличие от *Aspergillus* spp. и зигомицетов, грибы рода *Fusarium* и другие возбудители гиалогифомикоза активно образуют споры *in vivo* с выходом одноклеточной формы в кровяное русло, чем и объясняют их высокую высеваемость из крови [2, 6, 14, 66, 272].

Несмотря на ограниченную чувствительность метода посева крови, кандидемия остается ключевым маркером инвазивного кандидоза с поражением внутренних органов и может ассоциироваться с кандидозом легких. При вторичном кандидозе легких кандидемия всякий раз, очевидно, предшествует и сопутствует заболеванию. Согласно стандартам EORTC/MSG [158], не следует исключать из рассмотрения случаи, когда культура *Candida* sp. была выделена из крови пациента с установленным центральным венозным катетером. Однако результат будет более достоверным, если взятие крови проводить непосредственно из вены или через вновь установленный катетер [40, 54, 158, 336, 337].

Клинический диагноз криптококкоза подтверждается при положительном культуральном исследовании крови или СМЖ [44, 105, 346].

Вероятность обнаружения возбудителя в биоматериале зависит от качества методов, применяемых в лаборатории МО (методики приготовления образцов для прямой микроскопии, набор питательных сред, методы посева и режимы культивирования), а также соблюдения правил забора, транспортировки и времени доставки материала [44].

Культуральные исследования, имеющие определяющее значение в диагностике оппортунистических пневмомикозов, необходимы: для обнаружения в биопсийном, респираторном и другом материале возбудителя и выделения его в

чистой культуре (выявление микоза); для проведения точной видовой идентификации возбудителя и выявления количественного содержания в мокроте и материале, полученном при ФБС (установление этиологии микоза); для определения чувствительности штамма к антимикотикам по методикам, позволяющим корректировать данные *in vitro* с терапевтическим результатом (назначение адекватной лекарственной терапии) [44, 87, 132].

Основные требования, предъявляемые к питательным средам для первичного выделения – это универсальность (поддержание роста дрожжевых и мицелиальных микромицетов) и селективность (подавление роста бактерий, колонизирующих исходный биоматериал и ингибирующих развитие грибов) [44, 132]. Выбор среды или комбинации сред для изоляции и культивирования грибов, способных вызывать глубокие микозы, строго не регламентирован, может отличаться в зависимости от личных предпочтений, и определяется спектром предполагаемых возбудителей и особенностями биоматериала. Для выделения грибов из клинических субстратов рекомендованы: синтетическая среда Сабуро и ее модификации (обеспечивает рост всех грибов и стабилизирует морфофизиологические характеристики у дрожжей); картофельно-декстрозный агар и его модификации (для изоляции грибов и получения быстрого спороношения у плесневых грибов); солодовый агар (Malt agar; для изоляции грибов) и др. [44, 54, 87]. Стандартные неселективные питательные среды (сусло-агар, среда Чапека, картофельно-декстрозный агар, среда Сабуро и др.) приобретают селективные для грибов свойства при добавлении антибактериальных препаратов или при подкислении до pH 4-4,5 молочной кислотой или другими кислотами [81, 82].

В медицинских лабораториях для первичного выделения наиболее широко используют среду Сабуро (агаризованную и жидкую), которая позволяет изолировать из клинического материала грибы различных групп. Эта среда служит также для идентификации дрожжей, но не подходит для получения спороношения у плесневых грибов. Для получения селективных свойств при бактериальной контаминации в среду Сабуро рекомендуют добавлять один или

несколько антибактериальных препаратов: хлорамфеникол (40-50 мг/л), гентамицин (25-50 мг/л), пенициллин (20(100)-200 ЕД/мл), стрептомицин (40(100)-200 ЕД/мл), ципрофлоксацин (5 мг/л). При диагностике пневмомикозов, вызванных первично-патогенными возбудителями, в среды добавляют циклогексимид (актидион (500 мг/л)). Циклогексимид подавляет развитие чувствительных к нему оппортунистических грибов (чувствительны многие виды *Aspergillus* и *Fusarium*, *Candida glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans* и др.), что может приводить к ложноотрицательному результату при диагностике вторичных пневмомикозов [6, 76, 128, 132, 258].

Отсутствие стандартизированной среды для культивирования отдельных групп грибов, особенно мицелиальных, и разнообразие применяемых в медицинских лабораториях сред, как готовых, так и приготовленных на месте, может приводить к разночтениям при идентификации [128].

Оппортунистические микромицеты заметно различаются по отношению к температуре культивирования и далеко не все возбудители способны к активному развитию *in vitro* при 37°C. Так, штаммы *Cryptococcus neoformans* растут при 37°C медленнее чем при 30-32°C, что учитывают производители тест-систем для выбора режимов их инкубации. По литературным данным, у части видов *Candida*, *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Rhodotorula* наблюдается варьирование способности к росту при 37°C; ряд дрожжевых и плесневых возбудителей не растут (или слабо развиваются) *in vitro* при 37°C, а отдельные – и при 35°C. Значительная группа патогенов способна активно развиваться в диапазоне 37-40°C, а некоторые термотолерантные и термофильные грибы и при более высоких температурах – до 45-55(60)°C [128, 258, 319]. С учетом вышеизложенного, оптимальной температурой для культивирования посевов является температура 30°C; при отсутствии термостата, поддерживающего данный режим, посеvy возможно культивировать при комнатной температуре 22-25°C [44, 132]. Проведение парных посевов и их одновременная инкубация при температуре 25-30°C и 37°C необходимы при диагностике диморфных микозов, а также позволяют дифференцировать виды, растущие и неспособные к росту при 37°C [44, 132].

Р.А. Аравийский с соавторами (2012) [6] рекомендуют использовать разные температурные режимы и методики посева при диагностике микозов, вызванных дрожжевыми и плесневыми грибами: 37°C – для дрожжевых возбудителей (в посевах мокроты и БАЛ проводят количественный учет дрожжевых колоний через 48 ч. инкубации); 28-30°C и 37°C – для мицелиальных (без количественного учета, через 4-5 суток). Посевы мокроты и БАЛ следует проводить на плотные среды с добавлением антибиотиков (сусло-агар или агар Сабуро), а при посеве кусочков тканей органов и СМЖ в набор сред добавляют среду обогащения: жидкую среду Сабуро или жидкое сусло. При подозрении на фунгемию, для получения гемокультуры кровь засевают в бульон Сабуро с 2% раствором глюкозы (в среду обогащения кровь сеют в соотношении 1:5 или более для устранения бактерицидных свойств) [6]. Предпочтительней засеивать кровь во флаконы с двухфазной комбинированной средой – агар, омываемый бульоном, в который и производят посев (ручные системы для выделения аэробов или селективного выделения грибов), а также во флаконы с жидкой средой для автоматических анализаторов BD BACTEC, VersaTREK или системы непрерывного мониторинга посева крови BacT/ALERT 3D или других аналогичных систем [44, 76, 132].

При отсутствии роста инкубацию продолжают от 7-10 дней (дрожжевые и быстрорастущие плесневые грибы) до 3-4 недель (некоторые медленно растущие возбудители) или до 8 недель (диморфные возбудители глубоких микозов), регулярно просматривая посевы [44, 132, 258].

С учетом варьирования чувствительности к антимикотикам у разных видов возбудителей пневмомикозов, целесообразно проводить видовую идентификацию выделенных из посевов штаммов, используя общепринятые в медицинской микологии методы [66, 128, 132, 258].

G. Hoog de с соавторами (2011) [258] выделяют основные группы патогенных грибов, культивируемых на питательных средах: дрожжи (белые и красные базидиомицетовые), «черные дрожжи» и родственные им виды, зигомицеты, гифомицеты, целомицеты (*Coelomycetes*; митоспоровые грибы,

относящиеся к аскомицетам, которые образуют конидии внутри или на поверхности плодовых тел (конидиом)), плесневые базидиомицеты, плесневые аскомицеты, оомицеты (псевдогрибы *Oomycota*). Возбудителей дифференцируют, как правило, по вторичным искусственным характеристикам их анаморфных стадий (морфология и др.) [128, 258].

Морфологическое разделение возбудителей пневмомикозов по форме их роста *in vitro* на плотных питательных средах на группы дрожжевых (пастообразные или слизистые, компактные колонии, сходны с бактериальными; у дрожжеподобных – с ворсинчатым краем, благодаря развитию субстратного мицелия) и плесневых грибов (колонии с гифами воздушного мицелия, располагающимися над поверхностью субстрата) имеет клиническое значение и не оспаривается. Морфологическая дифференциация возбудителей используется при их идентификации, классификации и выборе лекарственных препаратов для терапии [6, 81, 132, 258, 380].

Одноклеточная организация дрожжевых грибов определяет подходы к их идентификации, подобные приемам идентификации бактерий и основанные, в большей степени, на физиологических характеристиках (способность к аэробной ассимиляции углеводов (ауксонограмма) и азота (нитратный тест); способность к ферментации углеводов (зимограмма); устойчивость к ингибиторам роста (чувствительность к циклогексимиду и др.); температурные границы роста) и биохимических признаках (образование ферментов (уреазная активность и др.), специфических метаболитов, внеклеточных продуктов) [12, 125, 258]. Идентификация дрожжей включает также исследование клеточной морфологии при микроскопии; метод позволяет быстро дифференцировать дрожжевые и дрожжеподобные грибы с артроспорами (оценивают форму и размеры клетки; наличие капсул, хламидоконидий, зародышевых трубок и гиф; строение псевдомицелия) [12, 128, 258].

Классическая методика видовой идентификации дрожжей по совокупности набора типовых признаков по определителям [165, 166, 290, 291] – надежная, но трудоемкая процедура, мало пригодная для рутинных исследований в

медицинских лабораториях. Доступные миниатюризированные ручные и автоматические коммерческие тест-системы для идентификации клинически значимых дрожжевых грибов позволяют упростить их видовую идентификацию: Auxacolor 2, API 20 C AUX», «ELIchrom FUNGI», RapID™ Yeast Plus, VITEK® 2 YST ID card, Phoenix Yeast ID. Среди методов быстрой идентификации возбудителей кандидоза распространены селективные хромогенные среды, применяемые для выделения из посева, дифференциации и прямой визуальной идентификации определенных *Candida* spp.: CHROMagar Candida, BBL CHROMagar Candida Medium, CandiSelect, chromID Candida, Brilliance Candida Agar и др. (хромагары обязательно содержат хромогенный субстрат для определения белка N-ацетил- β -D-галактозамидазы *C. albicans* и один или два антибиотика) [87, 128].

Метод идентификации по физиологическим признакам применим и для мицелиальных грибов, однако его возможности ограничены из-за неоднозначной интерпретации получаемых результатов [258]; оценивают максимальную температуру роста, устойчивость к беномилу (для селективного выделения плесневых базидиомицетов (толерантны к препарату) – на среде с беномилом развиваются в виде стерильного мицелия) [128].

Колонии плесневых грибов образуют характерные структуры, различимые под световым микроскопом (хламидоспоры, цепочки конидий с конидиеносными структурами, плодовые тела с половыми спорами и др.); на их распознавании и сравнении с изложенными в определителях описаниями построена в настоящее время их идентификация (оценивают и макроморфологические признаки – характер роста на агаровых средах). Основными признаками при идентификации служат морфология вегетативных (хламидоспор, склероций, гиф мицелия) и бесполой (спорангиеносцев, спорангиев или спорангиолей со спорангиоспорами у зигомицетов; конидиеносцев и конидиогенных клеток (фиалида или аннелида) с конидиями у гифомицетов) структур. У части возбудителей (гомоталлические и совершенные виды) в лабораторных условиях также формируются и половые стадии: у зигомицетов – зигоспоры; у аскомицетов – аскокарпы (клеистотеций,

перитеций или апотеций) с сумками и эндогенными аскоспорами; у базидиомицетов – базидиокарпы с базидиями и экзогенными базидиоспорами. Препарат для исследования неразрушенных структур готовят, перенося культуру с помощью иглы, микологической лопатки (захватывают грибницу вместе с частью агаровой среды) или клейкой ленты (кусочек ленты накладывают на поверхность культуры). На предметное стекло также наносят каплю жидкости (равные части спирта, глицерина и воды; дистиллированная вода или др.) или специфического красителя – лактофенола хлопкового синего (фенол убивает клетки, а краситель окрашивает структуры гриба). Готовый препарат накрывают покровным стеклом; он может инкубироваться во влажной камере [6, 76, 128, 258].

Споруляции и образованию характерных микроскопических структур у плесневых грибов способствуют обедненные питательные среды (на растительной основе, без продуктов переработки мяса и др.), которые применяют для обязательного субкультивирования возбудителей. Для идентификации плесневых грибов применяют агар Чапека–Докса и его модификации (*Aspergillus* и *Penicillium*); картофельно-декстрозный агар и его модификации (гиалиновые грибы, группа видов «черных дрожжей»; быстрая идентификация всех мицелиальных грибов); солодовый агар (зигомицеты, *Aspergillus* и *Penicillium*, группа видов «черных дрожжей», гиалиновые грибы); овсяный агар (*Acremonium*, *Fusarium*, группа видов «черных дрожжей», меланизированные грибы, целомицеты, аскомицеты); водный агар (меланизированные грибы; стимулирует у грибов образование конидий в условиях голодания); картофельно-морковный агар (меланизированные грибы) [128, 258].

Тестирование чувствительности к лекарственным препаратам – важное исследование в практике лабораторий, диагностирующих пневмомикозы; необходимо для выявления у возбудителя устойчивости к применяемым антимикотикам и определения спектра активных препаратов. Референтной методикой признан метод последовательных макро- и микроразведений в бульоне, который обеспечивает наиболее точную детекцию чувствительности к

антимикотикам у дрожжевых и плесневых грибов. Количественный результат тестирования по методу разведений – значение МПК препарата (его наименьшая концентрация, подавляющая *in vitro* видимый рост гриба). Клиническая интерпретация тестирования (прогнозирование эффективности лечения) возможна при наличии пограничных значений МПК препаратов (устанавливаются для каждого вида возбудителя). Штаммы грибов разделяют на категории чувствительности: S – чувствительные к препарату (высокая вероятность эффективности терапии), R – устойчивые к препарату (высокая вероятность неэффективности терапии), I – штаммы с промежуточной чувствительностью (неопределенный результат лечения) или S-DD – чувствительные-дозозависимые (для эффективной терапии следует, вероятно, подбирать дозу препарата, превышающую среднюю терапевтическую) [103, 104, 204, 221, 258, 319]. Биологические (эпидемиологические) критерии (МПК «эпидемиологических точек разделения» – epidemiological cutoff values (ECOFF)) дифференцируют штаммы на группы «дикого типа» (штаммы, не имеющие приобретенных механизмов устойчивости к препарату) и «не дикого типа» (штаммы с приобретенными механизмами устойчивости) [356].

К настоящему времени организациями CLSI и EUCAST разработаны международные стандарты тестирования чувствительности дрожжевых и плесневых грибов: стандарты CLSI M27-A3 и M38-A2 [199, 200]; стандарты EUCAST EDef 7.1, EDEF 7.3.1. и E.DEF 9.1, E.DEF 9.3 [224, 225, 226, 227]. Организации EUCAST и CLSI устанавливают и рекомендуют для интерпретации МПК, полученных по стандартным и сопоставимых с ними методикам, пограничные значения МПК, основанные на фармакокинетических и фармакодинамических данных и клинических исследованиях [201, 204, 228]. Референтные методики макро- и микрометода серийных разведений в бульоне со средой RPMI 1640 отличаются высокой воспроизводимостью и обеспечивают надежные результаты, но сложны для применения на практике. Разработчики допускают использование иных, более доступных и адаптированных для практических целей и скрининговых исследований методов, при условии

получения с их помощью сопоставимых результатов: коммерческие тест-системы на основе метода микроразведений (системы «Sensititre», «FUNGIFAST AFG», «Fungitest» и аналогичные ручные тесты); диско-диффузионный метод (стандартизован CLSI для дрожжевых и плесневых грибов [202, 203]); Е-тесты, автоматизированные методы [54, 132]. Вместе с тем, клиническое значение лабораторного исследования определения чувствительности к антимикотикам у большинства возбудителей пневмомикозов остается неопределенным, такие исследования мало доступны для практических лабораторий, а получаемые результаты часто сложно интерпретировать [199, 319].

1.3.2 Принципы и методы иммунологической и молекулярной диагностики микозов

Поиск иммунологических методов диагностики глубоких микозов целенаправленно ведется многими отечественными и зарубежными исследователями. Быстрые, клинически значимые иммунологические (серологические) методики необходимы для раннего определения признаков инвазивных форм, включая пневмомикозы [106, 164]. Однако к настоящему времени стандартизованные диагностические методики разработаны только для аспергиллеза, кандидоза, криптококкоза и эндемичных глубоких микозов. Несколько чувствительных и специфичных, доступных тестов рекомендовано для рутинного использования при диагностике инвазивного аспергиллеза (кровь, БАЛ, СМЖ), ХАЛ (кровь, БАЛ) и криптококкоза (СМЖ, кровь) – методики иммуноферментного анализа (ИФА) или РАЛ.

В качестве диагностических маркеров (мишеней) были предложены антигены, нуклеиновые кислоты и продукты метаболизма грибов, проникающие в кровь и другие биологические жидкости, а также специфические антитела хозяина к антигенам возбудителя [44]. Все четыре группы тестов не лишены недостатков, сужающих область их применения, и имеют ограничения по чувствительности, специфичности и прогностической ценности положительного и отрицательного результатов [40, 332].

Наилучшие результаты были получены при использовании метода обнаружения и количественного определения высоко иммуногенных растворимых антигенов возбудителя (галактоманнан клеточной стенки грибов рода *Aspergillus*, маннан клеточной стенки грибов рода *Candida*, антиген полисахарида капсулы грибов рода *Cryptococcus* (гликуроноксиломаннан *Cr. neoformans*)) с помощью моноклональных антител. Но выявление антигенемии может быть затруднено в связи с низкой концентрацией антигенов в исследуемых жидкостях (кровь, БАЛ, плевральная жидкость, СМЖ, моча); связыванием их с антителами; кратковременностью антигенемии; развитием ложноположительных реакций (перекрестные реакции антител с антигенами других грибов и бактерий, наличие антигенов в продуктах питания, прием антибактериальных препаратов, полученных из грибов и др.) и ложноотрицательных реакций (прием противогрибковых препаратов, высокие титры антител и др.) [44, 302]. Клиническая значимость тестирования *Cryptococcus* антигенемии (СМЖ) и *Aspergillus* антигенемии (сыворотка, плазма, БАЛ или СМЖ) была закреплена в стандартах EORTC/MSG [158, 211, 392]. По мнению некоторых исследователей, определение уровней криптококкового антигена и сывороточного галактоманнана может иметь не только диагностическое, но и прогностическое значение [44, 407]. Использование же теста на маннанный антиген *Candida* существенно ограничено быстрым исчезновением маннана из крови и связыванием его с антителами [44, 332].

Сложилось мнение о нецелесообразности применения в клинической практике методов определения антител для диагностики инвазивных оппортунистических микозов [44, 92]. Это связывают в первую очередь с ослаблением синтеза антител у иммунокомпрометированных лиц, у которых преимущественно развиваются инвазивные микозы, а также неоднозначностью интерпретации получаемых данных. Так, для обнаружения антител к маннану грибов *Candida* spp. в настоящее время имеются доступные коммерческие тесты. Но к ложноположительным результатам может приводить продукция антител к грибам *Candida* при колонизации *Candida* spp., например, желудочно-кишечного

тракта [293]. Вместе с тем было показано, что комбинированное определение антигена маннана и антител к маннану (анти-маннан) в сыворотке крови повышает чувствительность и специфичность ранней серологической диагностики инвазивного кандидоза [304, 372], имеет прогностическое значение [157] и может быть использовано, вероятно, как дополнительный метод диагностики инвазивного кандидоза [40, 332]. При использовании в диагностике инвазивного аспергиллеза методов выявления антител были получены неоднозначные и в целом неудовлетворительные результаты, поскольку у преобладающего числа больных с инвазивной формой иммунный ответ недостаточно выражен [92].

Самостоятельное же значение определение уровней специфических антител к антигенам *Aspergillus* (иммуноглобулины классов G (IgG) и E (IgE) с повышенным сродством к антигенам *A. fumigatus*) приобретает при дифференциальной диагностике ХНАЛ – IgG и неинвазивных форм аспергиллеза легких: аспергиллемы легких – IgG (преобладающие антитела), IgE и АБЛА – IgE (преобладающие антитела), IgG [92, 127, 186, 217]. В 2016 г. выявление *Aspergillus*-специфических IgG антител было включено в диагностические критерии ХАЛ, установленные ESCMID/ERS [214, 366]. Было показано, что обнаружение антител к антигенам *Aspergillus* в сыворотке крови – ключевая диагностическая особенность ХАЛ.

Еще одним важным маркером ряда инвазивных микозов является циркулирующий в крови 1,3-β-D-глюкан – основной компонент клеточной стенки большинства видов грибов [84, 295, 304, 332]. Количественное определение в крови 1,3-β-D-глюкана, специфического полисахарида грибов, проводят колориметрическим анализом с помощью методик Tachypleus (коммерческий тест Fungitec G) или Limulus (коммерческий тест Fungitell) [106, 211, 408]. Выявление 1,3-β-D-глюкана в сыворотке крови включено в диагностические критерии инвазивных микозов EORTC/MSG [211]. Согласно данным стандартам, обнаружение 1,3-β-D-глюкана в крови следует интерпретировать как критерий развития вероятной инвазивной грибковой инфекции, исключая криптококкоз и

зигомикоз. Метод непригоден для диагностики зигомикоза и криптококкоза, у возбудителей которых 1,3- β -D-глюкана нет (грибы отдела *Zygomycota*) или его содержание в клеточной стенке низкое (*Cryptococcus* spp.) [293, 332, 408]. В рекомендациях IDSA тестирование 1,3- β -D-глюкана в крови упоминается как перспективная методика ранней диагностики фунгемии и инвазивных форм аспергиллеза и кандидоза [336, 397]; а Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (Food and Drug Administration (FDA)) допускает использование системы Fungitell для диагностики инвазивных микозов, включая аспергиллез, кандидоз, фузариоз и трихоспороноз [265, 307]. В некоторых работах упоминается также о повышении уровня циркулирующего 1,3- β -D-глюкана при микозах, вызванных *Acremonium* spp., *Saprochaete capitata*, *Fonsecaea* spp., *Histoplasma capsulatum*, *Phaeoacremonium* spp., *Pneumocystis jirovecii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Scedosporium prolificans* [106, 326].

К преимуществам 1,3- β -D-глюкан теста относят его способность выявлять широкий диапазон инвазивных микозов (за исключением зигомикоза и криптококкоза), высокое отрицательное прогностическое значение, достаточно высокую чувствительность и специфичность в отношении инвазивных форм грибковых инфекций и возможность тестирования пациентов на фоне противогрибковой терапии [274, 332]. С другой стороны, применение 1,3- β -D-глюкан теста в рутинных исследованиях ограничено вероятностью получения ложноположительных результатов под влиянием ряда факторов (контаминация β -глюканами; повышение уровня β -глюкана, не связанное с микозом), недостаточностью данных о критериях оценки среди различных популяций больных, неясной диагностической ценностью при дифференциальной диагностике конкретной микотической инфекции [106, 332]. К настоящему времени, ни одна из коммерческих тест-систем для определения уровня 1,3- β -D-глюкана в крови не зарегистрирована на территории Российской Федерации.

Менее распространена и изучена методика ранней диагностики кандидоза, основанная на определении D-арабинитола – продукта метаболизма грибов рода

Candida, за исключением *C. glabrata* и *C. krusei* [332]. Имеются сведения о диагностической значимости обнаружения D-арабинитола в крови при выявлении инвазивного кандидоза; чувствительность и специфичность метода может быть увеличена с помощью определения в крови или моче отношения содержания D-арабинитола/креатинина или D-арабинитола/L-арабинитола [44]. Несмотря на то, что в Японии разработан коммерческий тест на обнаружение D-арабинитола в крови (Arabinites-Auto (Marukin Diagnostics, Osaka, Japan)), данная методика не нашла широкого применения в практике из-за неопределенности диагностического значения тестирования D-арабинитола.

Наиболее перспективным и стремительно развивающимся направлением в диагностике микозов является метод прямого обнаружения в крови и другом клиническом материале нуклеиновой кислоты грибов с помощью ПЦР – метода молекулярной биологии, все чаще применяемого в медицине [310, 316, 348, 404]. Специалисты выделяют ряд преимуществ у методик на основе ПЦР и современных молекулярно-биологических методов в целом: высокую чувствительность, быстроту получения результатов, возможность использования для раннего выявления грибковых заболеваний, прогностический потенциал [44, 374, 402].

Целесообразность применения методик на основе ПЦР (ПЦР в режиме реального времени [121], другие ПЦР-методы) при диагностике аспергиллеза, кандидоза, криптококкоза была доказана, к настоящему времени, в ряде исследований [40, 159, 172, 390]. Молекулярные методы могут использоваться в ПЦР-лабораториях не только для обнаружения возбудителя микоза в диагностическом материале, но и для идентификации штаммов, выделенных при культуральном исследовании, как на уровне комплекса видов (секции близкородственных патогенных видов *Aspergillus*), так и на видовом уровне [29, 214, 258, 357]. Научные достижения последних лет связаны со стандартизацией этапов проведения ПЦР в режиме реального времени и разработкой коммерческих тест-систем, основанных на других вариантах ПЦР [404].

С другой стороны, широкого распространения в рутинной практике при диагностике глубоких микозов ПЦР-методы определения нуклеиновой кислоты грибов в клинических образцах все еще не получили, что связано, в первую очередь с их недостаточной стандартизацией. Внедрению данного подхода в клиническую практику препятствуют также риск получения ложноположительных результатов из-за контаминации материала и неспособности отличить колонизацию от инфицирования, недостаточная воспроизводимость результатов, высокая стоимость и ограниченная коммерческая доступность [44, 66]. В отличие от методик обнаружения антигенов, молекулярные методы обнаружения возбудителя микоза в клинических образцах, в том числе и ПЦР, основанные на амплификации специфичного участка генома гриба, не были включены в состав стандартов EORTC/MSG [211]. Из-за имеющихся ограничений, использование в рутинных исследованиях большинства коммерческих тест-систем для определения нуклеиновых кислот не рекомендовано также и FDA. При оценке значения биологических маркеров (критерии IDSA) для диагностики инвазивных микозов у гематологических пациентов высокого риска, также не было сформировано рекомендаций по использованию ПЦР [304]. Данный вывод основан на отсутствии клинической валидации, стандартизации и межлабораторной воспроизводимости, что связано с невозможностью использовать единый формат анализа ПЦР при наличии различных доступных платформ и технических решений (вариативны генные мишени (ген FKS, митохондриальная ДНК, 18S рРНК, 5.8S рРНК, 28S рРНК), системы обнаружения (TaqMan, FRET), праймеры (*Aspergillus fumigatus*-специфические, *Aspergillus*-специфические или специфические к грибам в целом), вид клинического материала (цельная кровь, сыворотка, БАЛ, образцы биопсии тканей), объем образца, экстракция ДНК (ручная, автоматическая) и модификации ПЦР с качественным или количественным анализом результата (нестед или гнездовая ПЦР, количественная ПЦР в режиме реального времени и др.)). Даже при разработке в будущем времени новых, стандартизованных,

коммерчески доступных тест-систем ПЦР, эти исследования все же останутся дорогостоящими и технически сложными [304].

Таким образом, существующие тест-системы на основе ПЦР не являются общепринятыми методиками диагностики глубоких микозов, включая заболевания с поражением легких, а их применение в диагностических целях должно быть ограничено до выработки более четких рекомендаций по целесообразности их использования. Кроме того, ни одна из зарегистрированных за рубежом коммерческих ПЦР-тест-систем, в настоящее время, не доступна для использования в Российской Федерации [40].

Следует также отметить, что чувствительность и диагностическое значение методов иммунологической и молекулярной диагностики и имеющихся биологических маркеров глубоких микозов (галактоманнан *Aspergillus*, маннан/анти-маннан *Candida*, гликуроноксилманнан *Cr. neoformans*, 1,3-β-D-глюкан, нуклеиновые кислоты) оценивались в вышеперечисленных исследованиях в основном для определенных групп пациентов, с высоким риском развития инвазивного микоза и не исследовались для пациентов с фоновым туберкулезом органов дыхания (за исключением неинвазивных и частично инвазивных форм ХАЛ). Применение этих методик в рутинной диагностике пневмомикозов требует, как правило, наличия специального оборудования, причем коммерческие тест-системы не всегда доступны, а необходимый опыт использования методик персоналом лаборатории часто имеется только в экспертных референс-лабораториях.

Определенным диагностическим потенциалом в клинической микологии также обладает метод времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS). Эта технология масс-спектрометрической идентификации микромицетов основана на анализе белковой фракции микробной клетки с получением уникального для каждого вида масс-спектра. В диагностике микозов данный метод начал использоваться с 2000-х годов. В настоящее время основная область его применения – это быстрая видовая идентификация дрожжевых грибов,

выделенных из посевов клинического материала. Внедрять MALDI-TOF MS систему в алгоритм исследования наиболее целесообразно в крупных многопрофильных медицинских клиниках, что связано с высокой пропускной способностью, простотой в использовании и минимальной затратой времени на идентификацию дрожжевой культуры [17, 107]. Дальнейшее развитие метода масс-спектрометрии зависит от расширения баз данных на возбудителей микозов и их актуальных обновлений. Рядом отечественных исследователей была показана возможность использования MALDI-TOF MS систем для обнаружения дрожжевых возбудителей непосредственно в клиническом материале, в качестве дополнительного метода быстрой диагностики септических состояний [119, 140].

Обобщенные сведения по возбудителям и нозологическим формам оппортунистических глубоких микозов человека с поражением легких и подходам к их лабораторной диагностике представлены в таблице 21.

Таблица 21 – Оппортунистические глубокие микозы с поражением легких: число возбудителей, клинические варианты, оценка методов лабораторной диагностики

Микоз Таксономия (отдел)	Возбудители (основные виды)	Клинические варианты ¹	Методы лабораторной диагностики ²
Аспергиллез <i>Ascomycota</i>	52 вида (4 вида)	Инвазивный аспергиллез; аспергиллема; ХНАЛ; АБЛА; аспергиллез бронхов; поверхностная колонизация дыхательных путей <i>Aspergillus</i> spp.; аспергиллез плевры	Микроскопия биоматериала + Культуральные исследования + Иммунологические исследования • антигены (инвазивные формы) + • антитела (хронические, аллергические формы) + • 1,3-β-D-глюкан (инвазивный микоз) ± Молекулярные методы ±

Продолжение таблицы 21

Микоз Таксономия (отдел)	Возбудители (основные виды)	Клинические варианты ¹	Методы лабораторной диагностики ²
Кандидоз <i>Ascomycota</i>	35 видов (5 видов)	Инвазивный кандидоз: кандидемия, острый диссеминированный кандидоз, кандидозная пневмония (первичная или вторичная); кандидозный трахеобронхит; АБЛК; поверхностный кандидоз бронхов (массивная колонизация)	Микроскопия биоматериала + Культуральные исследования + Иммунологические исследования • антигены, антитела ± • 1,3-β-D-глюкан (инвазивный микоз) ± Молекулярные методы ±
Криптококкоз <i>Basidiomycota</i>	9 видов (2 вида)	Криптококкоз легких; диссеминированный криптококкоз: криптококкоз ЦНС, с поражением кожи, органов и систем	Микроскопия биоматериала + Культуральные исследования + Иммунологические исследования • антигены + • антитела – Молекулярные методы ±
Зигомикоз <i>Zygomycota</i>	32 вида (1 вид)	Зигомикоз (мукормикоз): легочный; риноцеребральный; диссеминированный	Микроскопия биоматериала + Культуральные исследования + Иммунологические исследования – Молекулярные методы –
Гиалогифо- микоз <i>Ascomycota</i>	>20 видов?	Гиалогифомикоз легких; микоз внутренних органов; фунгемия; диссеминированный микоз	Микроскопия биоматериала + Культуральные исследования + Иммунологические исследования • антигены, антитела – • 1,3-β-D-глюкан (инвазивный микоз) ± Молекулярные методы –
Феогифо- микоз <i>Ascomycota</i> ; группа «черных дрожжей» <i>Ascomycota</i> , <i>Basidiomycota</i>	>100 видов?	Феогифомикоз легких; аллергические синусит и бронхолегочный микоз; абсцесс головного мозга; диссеминированный микоз	Микроскопия биоматериала + Культуральные исследования + Иммунологические исследования – Молекулярные методы –

Продолжение таблицы 21

Микоз Таксономия (отдел)	Возбудители (основные виды)	Клинические варианты ¹	Методы лабораторной диагностики ²
Редкие дрожжевые микозы <i>Ascomycota</i> , <i>Basidiomycota</i>	>10 видов	Инвазивный микоз: фунгемия, микоз легких, варианты системного инвазивного микоза, как проявление фунгемии	Микроскопия биоматериала + Культуральные исследования + Иммунологические исследования • антигены, антитела – • 1,3-β-D-глюкан (инвазивный микоз) ± Молекулярные методы –
Пневмоцистоз <i>Ascomycota</i>	1 вид	Пневмоцистная пневмония	Микроскопия биоматериала + Культуральные исследования – Иммунологические исследования – Молекулярные методы ±

Примечание: ¹ – микозы бронхов и легких, наиболее вероятные варианты других глубоких микозов;

² – критерии оценки: включение в диагностические критерии и рекомендованные методики диагностики (международные стандарты EORTC/MSG, IDSA, ESCMID/ERS); стандартизация; доступность; экономическая целесообразность;

«+» – стандартизованные доступные методики, рекомендованные для использования;

«±» – методики, имеющие ограничения по доступности, стандартизации, с неопределенным диагностическим значением, не рекомендованные для использования;

«–» – методики не разработаны

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 2 Алгоритмы комплексной лабораторной диагностики микозов органов дыхания у больных туберкулезом легких и интерпретация результатов

Данная глава посвящена изложению комплекса методов и методик для проведения адекватной лабораторной диагностики вторичных пневмомикозов у больных туберкулезом легких: аспергиллеза, кандидоза, криптококкоза, зигомикоза, гистоплазмоза, феогифомикоза, редких дрожжевых микозов. Пневмоцистоз не был включен в список диагностируемых микозов из-за невозможности использования для его верификации культуральных методик (посев на рутинные лабораторные среды). Подробные сведения о составе возбудителей пневмомикозов и глубоких микозов с поражением бронхолегочной системы, многообразии клинических вариантов заболеваний и подходах к их лабораторной диагностике представлены в главе 1.

Предлагаемые для внедрения во фтизиатрическую практику алгоритмы лабораторных исследований основаны на проведенном анализе значимости групп лабораторных методов (Таблица 22). Оценка целесообразности применения отдельных методов и методик в диагностике пневмомикозов проводилась на основании ключевых факторов: клиническая значимость и диагностические возможности; стандартизация; валидация; доступность использования в рутинной лабораторной практике противотуберкулезных учреждений; наличие регистрации лабораторных тестов и тест-систем в Российской Федерации; экономическая целесообразность; включение в диагностические критерии и рекомендованные методики диагностики инвазивных микозов, аспергиллеза, кандидоза, криптококкоза, ХАЛ – международные стандарты EORTC/MSG [158, 211], IDSA [84, 336, 337, 342, 347, 365, 397], ESCMID/ERS [214]; включение в списки общепринятых методик, рекомендованных ведущими отечественными и зарубежными специалистами [6, 11, 40, 44, 45, 54, 66, 68, 92, 125, 128, 130, 132, 258] и методик, апробированных и рекомендованных для использования научными микологическими центрами [89, 100, 218, 319, 403].

Таблица 22 – Оценка значимости и целесообразности использования лабораторных методов исследования при проведении диагностики микозов органов дыхания

Метод	Основные характеристики и возможности использования
Метод микроскопического исследования биологического материала	• Клинически значимый метод диагностики; • Диагностические возможности: быстрое обнаружение элементов дрожжевых и плесневых грибов в биоматериале, полученном инвазивными методами (ФБС, биопсия очагов поражения, резекция) и мокроте; верификация результатов культуральных исследований; • Диагностическое значение: обнаружение клеток гриба при микроскопии образцов легочной ткани (критерий доказанного инвазивного микоза легких)¹ Методики прямой микроскопии респираторного и хирургического материалов целесообразно использовать в диагностике пневмомикозов, как важное дополнение к культуральным исследованиям и для экспресс-диагностики микотической инфекции органов дыхания
Метод культурального исследования биологического материала	• Клинически значимый метод диагностики; • Диагностические возможности: обнаружение и верификация бронхолегочных аспергиллеза, кандидоза, криптококкоза, зигомикоза, гиадогифомикоза, феогифомикоза, редких дрожжевых микозов и определение антифунгальной активности лекарственных препаратов в отношении выделенного возбудителя; • Диагностическое значение: обнаружение гриба при посеве образцов легочной ткани (критерий доказанного инвазивного микоза легких)¹; обнаружение плесневого гриба или <i>Cryptococcus neoformans</i> при посеве мокроты, БАЛ, материала, полученного с помощью щеточной биопсии (критерий вероятного инвазивного микоза для группы предрасположенных пациентов)²; обнаружение гриба <i>Aspergillus</i> spp. при посеве содержимого легочных полостей – биопсия или резекция (критерий ХАЛ)³ Культуральные исследования имеют определяющее значение при диагностике пневмомикозов и необходимы для обнаружения возбудителя, его видовой идентификации (установление этиологии заболевания) и оценки чувствительности к лекарственным препаратам

Продолжение таблицы 22

Метод	Основные характеристики и возможности использования
Иммунологические методы исследования	• Клинически значимые методы (диагностика инвазивных микозов, криптококкоза, различных форм аспергиллеза); • Диагностические возможности: дополнительные некультуральные методики для выявления антигенемии и других признаков глубоких микозов (маркеры заболевания – антигены грибов, продукты метаболизма грибов, антитела хозяина к антигенам грибов); • Диагностическое значение: обнаружение антигена <i>Cryptococcus</i> в СМЖ (критерий доказанного диссеминированного криптококкоза для иммунокомпрометированных пациентов)¹; антигена <i>Aspergillus</i> в сыворотке, плазме, БАЛ, СМЖ (критерии вероятного инвазивного аспергиллеза для группы предрасположенных пациентов)²; 1,3-β-D-глюкана в сыворотке (критерий вероятного инвазивного микоза, кроме криптококкоза и зигомикоза, для группы предрасположенных пациентов)²; антител к антигенам <i>Aspergillus</i> в сыворотке (ключевая диагностическая характеристика ХАЛ для группы пациентов с характерными полостными образованиями в легких)³ Стандартизованные иммунологические методики целесообразно использовать при диагностике пневмомикозов в сочетании с культуральными исследованиями (инвазивные и неинвазивные формы аспергиллеза, криптококкоз, кандидоз) и для экспресс-диагностики инвазивного аспергиллеза и криптококкоза
Молекулярные методы	• Клиническое значение не определено. Не являются общепринятыми методиками; • Диагностические возможности: обнаружение специфических нуклеиновых кислот грибов в образцах биоматериалов методами на основе ПЦР; использование ПЦР-методов для родовой и видовой идентификации штаммов ряда возбудителей микозов, выделенных при культуральном исследовании. Наиболее перспективные некультуральные методы диагностики микозов Использование в повседневной практике для диагностики пневмомикозов методик на основе ПЦР и иных молекулярно-генетических методов должно быть ограничено до их окончательной стандартизации, валидации и выработки четких рекомендаций по целесообразности их применения

Примечание: ¹ – критерии применимы для всех категорий пациентов (доказывают диагноз); критерий обнаружения антигена *Cryptococcus* в СМЖ – для иммунокомпрометированных пациентов (доказывает диагноз) [158, 211];

² – критерии применимы для иммунокомпрометированных пациентов с факторами риска развития инвазивного микоза, с учетом клинических признаков микоза (поддерживают или предполагают диагноз) [158, 211];

³ – критерии применимы для пациентов с полостными образованиями в легких, с вероятным диагнозом ХАЛ (доказывают диагноз) [214]

Таким образом, к настоящему времени основным клинически значимым методом диагностики пневмомикозов остается культуральное исследование, которое позволяет выделять возбудитель из различного биоматериала: респираторного (мокрота, материалы, полученные при ФБС) и хирургического (образцы легочной ткани из очагов поражения, содержимое деструктивных легочных и плевральных полостей). Однако значительные диагностические возможности этого метода (обнаружение и выделение патогенного гриба в чистой культуре, видовая идентификация и определение чувствительности к антимикотикам) используются во фтизиатрической практике пока явно недостаточно. Также неэффективно используются диагностические возможности и других групп методов, имеющих клиническое значение: прямой микроскопии биоматериала и иммунологических исследований (обнаружение патогена, экспресс-диагностика). В противотуберкулезных учреждениях до сих пор не применяются научно обоснованные подходы к организации лабораторной диагностики пневмомикозов, с использованием стандартизованных и воспроизводимых методик микробиологических и иммунологических исследований.

Разработанные и рекомендуемые для использования методологические подходы к организации лабораторной диагностики пневмомикозов во фтизиатрической практике включают:

- схему проведения комплексных диагностических исследований с использованием клинически значимых методов лабораторной диагностики микозов органов дыхания (прямая микроскопия различного биоматериала, культуральное исследование, иммунологические методики на обнаружение антигенов грибов и антител к антигенам грибов в сыворотке крови);
- алгоритмы микробиологической диагностики микозов, 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 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. Все включенные в лабораторные алгоритмы современные и классические методики были апробированы в практической работе микологической лаборатории ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ»; рекомендованные к использованию коммерческие тесты являются стандартизованными и распространенными методиками микологической или иммунологической диагностики микозов, легко выполняются и интерпретируются.

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

Схема обследований пациентов противотуберкулезных учреждений на пневмомикоз, методы лабораторной диагностики и характеристики диагностического материала, поступающего в лабораторию при подозрении на развитие заболевания, приведены в таблице 23.

Таблица 23 – 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, дополнительно, 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. Интерпретация результата исследования зависит от видовой принадлежности и количественного содержания гриба, выделенного при посеве
<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 клинических форм бронхолегочного микоза. Выделение оппортунистического гриба из посева содержимого бронхов больного туберкулезом расценивается как признак «вероятного» бронхолегочного микоза

Продолжение таблицы 23

Материал	Методы диагностики	Характеристика материала
<u>Образцы легочной ткани</u> (биоптат из очагов поражения, резекционный материал)	Прямая микроскопия Культуральное исследование	Высокоспецифичный материал. Обнаружение гриба при микроскопии и/или в посеве имеет диагностическое значение при верификации инвазивных форм микоза легких
<u>Содержимое полостных образований легких</u> (каверны, туберкулемы, кисты и др.: резекционный материал, пункционный биоптат, аспираты, смывы)	Прямая микроскопия Культуральное исследование	Высокоспецифичный материал. Выделение гриба из посева материала имеет диагностическое значение при верификации микоза, локализованного в легочной полости (аспергиллема и другие формы ХАЛ, или др.) и сочетанных инфекций данной локализации
<u>Содержимое плевральных полостей</u> (полости эмпиемы, остаточные плевральные полости: аспираты, экссудаты, мазки)	Прямая микроскопия Культуральное исследование	Высокоспецифичный материал. Выделение гриба из посева материала имеет диагностическое значение при выявлении микотической или смешанной этиологии заболеваний плевры у больных туберкулезом
<u>Отделяемое из зева</u>	Культуральное исследование	Дополнительный материал
<u>Сыворотка крови</u>	Иммунологические исследования (стандартизованные коммерческие тесты): тесты на обнаружение в крови антигенов <i>Aspergillus</i> , <i>Candida</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> ; тесты на количественное определение в крови антител к антигенам <i>Aspergillus</i> , <i>Candida</i>	Исследования проводят при подозрении на: <u>инвазивный микоз</u> (<i>Aspergillus</i> антигенемия, <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>). Обнаружение антигена расценивается как признак «вероятного» инвазивного микоза; обнаружение антител в диагностическом титре (критерии производителя тест-системы) – как признак «вероятного» прогрессирующего глубокого микоза
<u>Кровь</u>	Культуральное исследование	Исследование проводят при подозрении на фунгемию и/или диссеминированный микоз. Диагностическое значение имеет однократное выделение дрожжевого или плесневого гриба, за исключением <i>Aspergillus</i> spp.

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 вероятного поражения бронхолегочной системы оппортунистическими грибами, состав дрожжевых и плесневых грибов, колонизирующих нижние дыхательные пути, а также выявлять 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. Неоднократные исследования мокроты позволяют оценить содержание предполагаемого возбудителя микоза в материале более точно и в динамике. Дополнительным материалом может являться мазок из зева, который исследуют методом посева.

Стандартной и наиболее значимой методикой верификации инвазивного пневмомикоза является микологическое исследование образцов легочной ткани из очагов поражения, однако доступность биопсийного материала существенно ограничена. При диагностике и лечении пациентов противотуберкулезных учреждений с деструктивными полостными образованиями в легких проводят микологические исследования хирургических материалов из образований неясной этиологии: материал, полученный при локальном воздействии на полость (пункционный биоптат, смывы, аспираты); содержимое полостей, полученное при оперативных вмешательствах. При диагностике и лечении больных туберкулезом с заболеваниями плевры исследуют материалы на микоз из плевральных полостей неясной или смешанной этиологии (аспираты, экссудаты, мазки).

Применяемые в лаборатории методики микологического исследования хирургического материала должны предоставлять возможность выявления возбудителя микоза легких или плевры как методом прямой микроскопии (необходимо дифференцировать дрожжевые и мицелиальные возбудители), так и методом посева, с обязательным проведением идентификации штамма возбудителя до уровня вида. 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. При выделении возбудителя в культуре в лаборатории исследуют его морфологию, физиологические свойства и, по возможности, тестируют чувствительность к антимикотикам.

Специальные иммунологические (серологические) методики целесообразно включать в схему лабораторных исследований при проведении дифференциальной диагностики следующих вариантов микотических поражений (положительные культуральные и/или клинические и рентгенологические данные):

- инвазивный микоз (проводится детекция в сыворотке крови антигенов *Aspergillus* и/или *Cryptococcus*; методики выявления ранних признаков инвазивного аспергиллеза и криптококкоза);
- аспергиллез легких (проводится детекция в сыворотке антигена *Aspergillus* и/или антител к антигенам *Aspergillus*);
- криптококкоз легких и ЦНС с поражением легких (проводится детекция в сыворотке антигена *Cryptococcus*);
- кандидоз легких (проводится детекция в сыворотке антигена *Candida* и/или антител к антигенам *Candida*).

Обнаружение в крови антигенов *Aspergillus* и специфических антител к ним, а также антигена *Cryptococcus* – общепринятые лабораторные признаки, поддерживающие диагноз пневмомикоза (бронхолегочный аспергиллез, криптококкоз). Хотя диагностическое значение обнаружения *Candida* антигемии и антител к грибам *Candida* при верификации кандидоза органов дыхания (и его отдельных форм) не определено, стандартизованные методики серодиагностики глубокого кандидоза характеризуются как возможные к применению и позволяют обнаруживать присутствие дополнительных лабораторных признаков глубокого кандидоза.

В повседневной практике лабораторий противотуберкулезных учреждений оправдано использовать для серодиагностики микозов стандартизованные коммерческие тест-системы, основанные на методиках реакции агглютинации – простые в применении, позволяющие получать хорошо воспроизводимые

результаты. Для проведения детекции антигенемии в работе были апробированы и использованы тест-наборы РАЛ Pastorex, Bio-Rad: тест «Pastorex *Aspergillus*» на обнаружение в сыворотке крови галактоманнана грибов *Aspergillus* (порог определения – 15 нг/мл); тест «Pastorex *Candida*» на обнаружение маннана грибов *Candida* (порог определения – 2,5 нг/мл); тест «Pastorex *Crypto Plus*» на обнаружение гликуронооксиломаннана капсулы *Cryptococcus neoformans* (порог определения – 50 нг/мл). Для количественного определения в сыворотке крови антител против грибов *Aspergillus fumigatus* и *Candida albicans* методом РНГА (обнаружение от 1/80 до 1/5120) были использованы коммерческие тест-системы ELI.H.A *Aspergillus*, ELITech MICROBIO и ELI.H.A *Candida*, ELITech MICROBIO.

Очевидно, что инвазивный вторичный пневмомикоз способен развиваться как после начального трахеобронхиального поражения, так и в случае попадания гриба в легочную ткань пациента через кровоток при фунгемии и гематогенной диссеминации. Фунгемия является маркером инвазивного кандидоза и ряда других оппортунистических глубоких микозов с вероятным поражением легких (криптококкоз, редкие дрожжевые микозы, фузариоз и др.), за исключением инвазивного аспергиллеза [337]. При подозрении на диссеминированный микоз с поражением легких и/или фунгемию у больных туберкулезом проводят специальные культуральные исследования крови с использованием современных ручных или автоматических систем, строго соблюдая необходимое соотношение объемов крови и среды при посеве во флаконы для гемокультур.

Микологическая лаборатория (самостоятельная или в составе бактериологической лаборатории) во фтизиатрической клинике должна располагаться в изолированном помещении и быть оснащена: ламинарным шкафом второго класса биологической безопасности для работы с клиническим материалом; отдельным изолированным боксом с ультрафиолетовым облучателем при работе с мицелиальными грибами для предупреждения рассеивания спор и заражения других подразделений лаборатории; современным многофункциональным микроскопом, укомплектованным объективами с увеличениями 10х, 40х, 100х для обнаружения в диагностическом материале

возбудителя микоза при первичной микроскопии и для проведения видовой идентификации культур грибов при вторичной микроскопии; отдельными термостатами, позволяющими поддерживать температуру культивирования в диапазоне от 30°C до 45°C.

Забор биоматериала на пневмомикоз (Таблица 23) необходимо проводить с соблюдением асептики до начала антифунгальной терапии; количество доставляемого в лабораторию материала должно быть достаточным для проведения микроскопического и культурального или иммунологического исследований. Материал следует доставлять в лабораторию в специальной таре (биксы, пеналы) и в максимально короткие сроки, указывая в сопроводительном документе характер исследуемого материала, дату и время его взятия, сведения о пациенте (фамилию, имя, отчество, пол и возраст больного, имеющиеся заболевания, при подозрении на микоз – локализацию очага и предполагаемый клинический диагноз), название учреждения (подразделения), фамилию и подпись врача, направившего материал. 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. Несоблюдение сроков хранения может приводить к значительным изменениям количественного содержания возбудителя микоза и грибов-контаминантов, способных попадать в образец при заборе материала (уменьшение или увеличение числа зачатков гриба в биоматериале, гибель клеток).

Необходимым условием получения достоверных результатов при лабораторной диагностике пневмомикозов является использование специальных питательных сред (как для первичного выделения грибов из посевов, так и для последующей их идентификации) и оптимальных режимов инкубации биоматериала. В таблице 24 приведен набор питательных сред и режимы инкубации для исследований респираторного и хирургического материала, а

также методики приготовления мазков для прямой микроскопии, рекомендованные для практического применения. Техника приготовления окрашенных и нативных препаратов для прямой микроскопии и этапы проведения посевов образцов различного биоматериала были подробно описаны в подразделе «Микробиологические методы исследования» раздела «Введение».

Таблица 24 – Схема проведения прямых микроскопических и культуральных исследований различного диагностического материала на пневмомикоз

Материал	Методики прямой микроскопии	Питательные среды	Режим культивирования
Мокрота; материал, полученный при ФБС	Окраска по Граму, окраска по Романовскому – Гимзе (при необходимости). Мазки мокроты приготавливают до гомогенизации материала; мазки из содержимого бронхов (ФБС) готовят из осадка после центрифугирования	<u>Для первичного выделения:</u> агар Сабуро с хлорамфениколом и селективные хромогенные среды (выявление смешанных культур дрожжей и прямая идентификация ряда <i>Candida</i> spp.). <u>Для субкультивирования плесневых грибов:</u> агар Чапека–Докса и/или картофельно-декстрозный агар ¹	При 30°С и 37°С в обычной атмосфере (парные посевы дозированного объема материала и контрольная чашка); при отсутствии роста посевы инкубируют 7-10 дней
Плотный хирургический материал (биопсийный, резекционный): легочная ткань, содержимое легочных полостей	Препараты готовят в 10% растворе КОН: с окраской калькофлюором белым или неокрашенными	<u>Для первичного выделения:</u> агар Сабуро с хлорамфениколом и бульон Сабуро (среда обогащения); картофельно-декстрозный агар (при подозрении на аспергиллез или другие плесневые микозы). <u>Для выделения из среды обогащения:</u> агар Сабуро и/или картофельно-декстрозный агар	При 30°С в обычной атмосфере; при отсутствии роста посевы инкубируют 7-10 дней (до 4 недель при необходимости)
Жидкий хирургический материал (аспираты, экссудаты): материалы из легочных, плевральных полостей	Нативные препараты и с окраской по Граму (при необходимости). Мазки готовят из осадка после центрифугирования		
Мазки: отделяемое слизистых оболочек зева; содержимое остаточных плевральных полостей			

Примечание: ¹ – при необходимости плесневые грибы пересевают на солодовый агар (для окончательной видовой идентификации отдельных штаммов зигомицетов) или овсяный агар (для окончательной видовой идентификации отдельных штаммов *Acremonium* spp., *Fusarium* spp., различных меланизированных грибов)

Использование при диагностике пневмомикозов набора стандартных рутинных микологических 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 микотических инфекций 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 (Рисунок 1); нити псевдомицелия (Рисунки 2, 3); гифы многоклеточного дрожжевого мицелия (Рисунок 4); комбинации дрожжевых клеток, псевдогиф и/или гиф (Рисунки 5, 6); артроконидии (и подобные им клетки) и их комбинации с гифами мицелия – у дрожжеподобных видов (Рисунки 7, 8).

Обнаруживаемые элементы мицелиальных грибов: гифы плесневого мицелия с септами или без них (Рисунки 9, 10); структуры конидиального спороношения – конидиеносцы, конидиальные головки *Aspergillus* spp. (Рисунки 11, 12) или другие структуры; одиночные конидии (Рисунки 13, 14); элементы феодных «черных дрожжей» (Рисунок 15).

Выявление морфологии гриба, присутствующего в биоматериале, позволяет проводить обоснованную корреляцию данных микроскопии с результатами посевов. Проиллюстрируем это на следующих примерах дрожжеподобных и плесневых возбудителей: при микроскопии мазка мокроты (окраска по Граму) больного инфильтративным туберкулезом легких с выраженными явлениями интоксикации были обнаружены (в значительном количестве) дихотомически ветвящиеся гифы мицелия (Рисунок 7) – в посеве выявлен *Geotrichum candidum* (значительный рост: количественное содержание – $5,4 \times 10^3$ КОЕ/мл) (Рисунок 16); при микроскопии образца содержимого легочной каверны (нативные препараты, окраска калькофлюором белым) больного фиброзно-кавернозным туберкулезом легких были обнаружены (в обильном количестве) ветвящиеся гифы плесневого мицелия (Рисунок 9) – в посеве выявлен обильный рост *Aspergillus fumigatus*

(Рисунок 17); при микроскопии мазка мокроты (окраска по Граму) больного диссеминированным туберкулезом легких были обнаружены (в умеренном количестве) элементы, предположительно, темноокрашенного гриба из группы «черных дрожжей» (Рисунок 15) – в посеве выявлен значительный рост диморфного феоидного гриба *Aureobasidium pullulans* (Рисунок 18). Таким образом, при микроскопии необходимо оценивать не только количественное содержание (единичные клетки, умеренно, значительно, обильно), но и характер элементов грибов в мазках.



Рисунок 1 – Почкующиеся дрожжевые клетки и дрожжевые клетки без почек в мазке мокроты больного инфильтративным туберкулезом, x1000 (окраска по Граму)

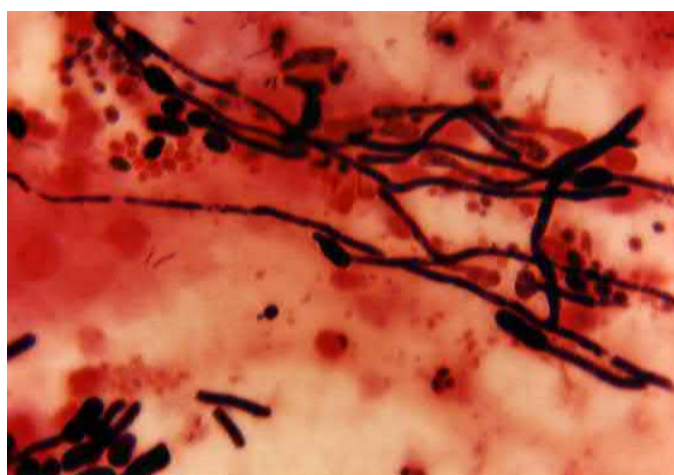


Рисунок 2 – Нити псевдомицелия в мазке БАЛ больного диссеминированным туберкулезом, x1000 (окраска по Граму)

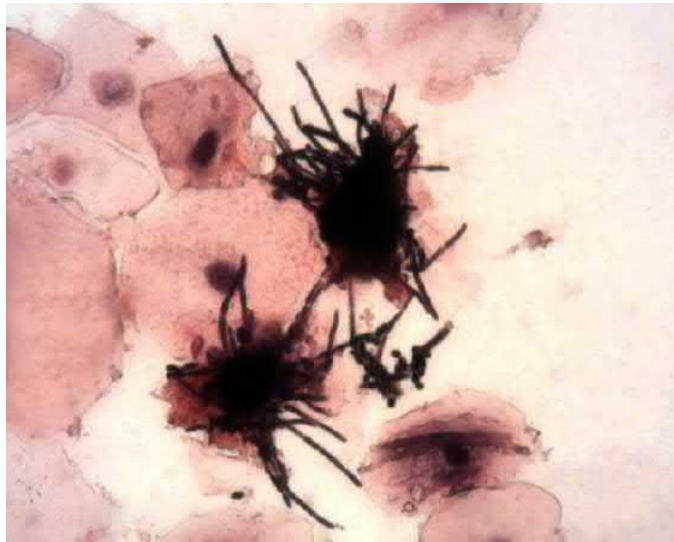


Рисунок 3 – Нити псевдомицелия (скопления) в мазке мокроты больного инфильтративным туберкулезом, х400 (окраска по Граму)

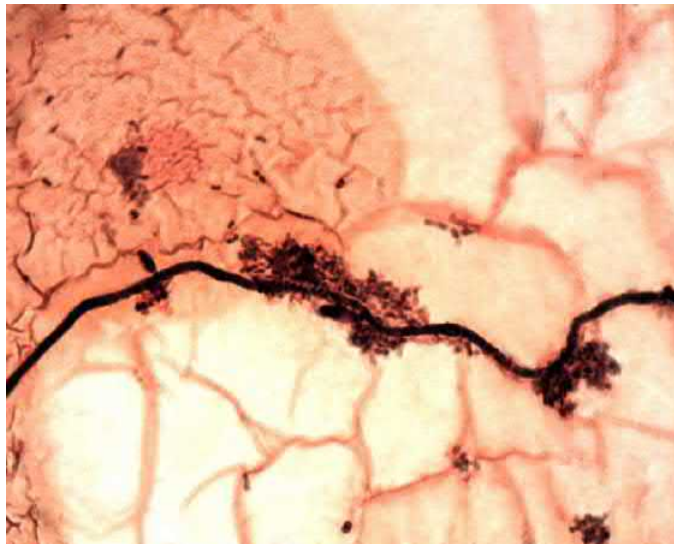


Рисунок 4 – Настоящая гифа дрожжевого гриба с боковыми blastоконидиями (предположительно *Candida albicans* – достоверно подтверждено результатом посева) в мазке мокроты больного туберкулезом внутригрудных лимфатических узлов, х1000 (окраска по Граму)

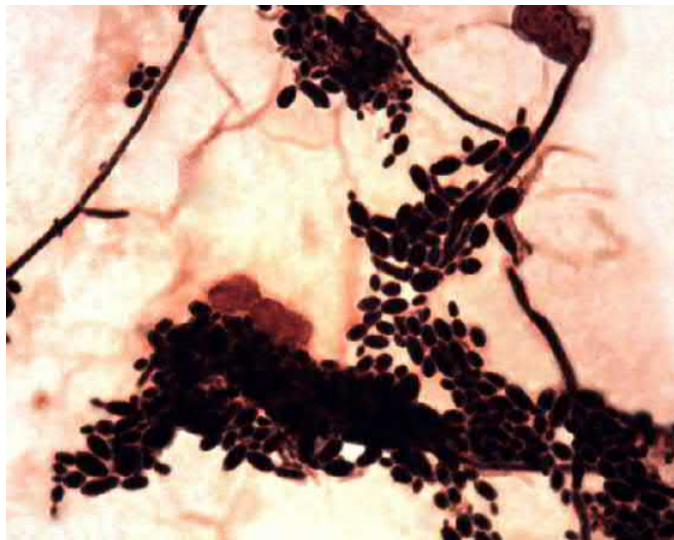


Рисунок 5 – Почкующиеся дрожжевые клетки и нити псевдомицелия в мазке мокроты больного очаговым туберкулезом, х1000 (окраска по Граму)

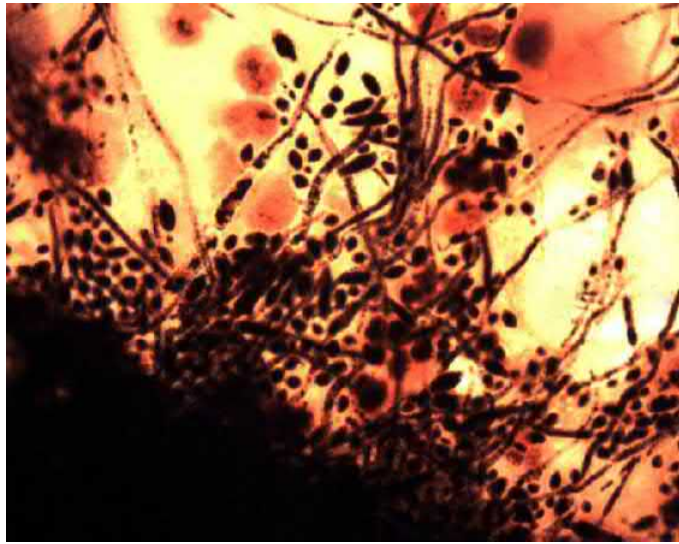


Рисунок 6 – Дрожжевые клетки и нити псевдомицелия в мазке мокроты больного инфильтративным туберкулезом, х1000 (окраска по Граму)



Рисунок 7 – Гифы мицелия дрожжеподобного гриба (предположительно *Geotrichum candidum* – достоверно подтверждено результатом посева) в мазке мокроты больного инфильтративным туберкулезом, х400 (окраска по Граму)



Рисунок 8 – Мицелиальные структуры с септами дрожжеподобного гриба (предположительно *Saprochaete capitata* – достоверно подтверждено результатом посева) в мазке мокроты больного диссеминированным туберкулезом, х1000 (окраска по Граму)



Рисунок 9 – Гифы мицелия плесневого гриба (предположительно *Aspergillus fumigatus* – достоверно подтверждено результатом посева) в мазке содержимого легочной каверны больного фиброзно-кавернозным туберкулезом, х400 (нативный препарат)



Рисунок 10 – Септированная гифа плесневого мицелия в мазке мокроты больного диссеминированным туберкулезом, осложненного аспергиллемой, х1000 (окраска по Граму)

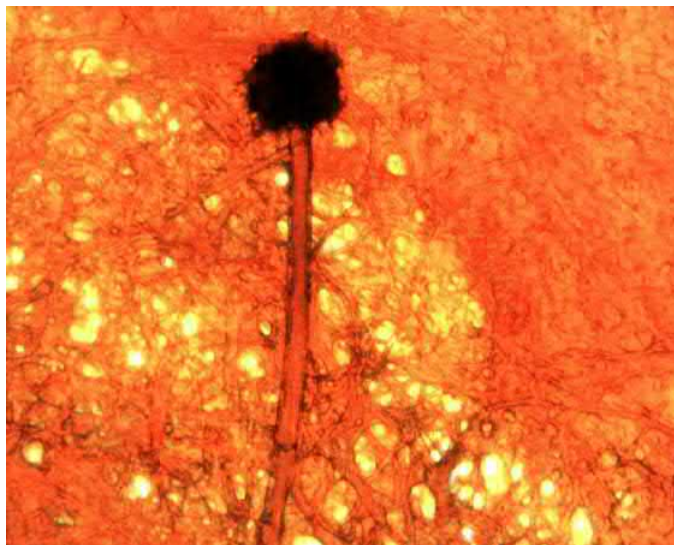


Рисунок 11 – Конидиальная головка и конидиеносец *Aspergillus* spp., скопления гиф мицелия в мазке БАЛ больного фиброзно-кавернозным туберкулезом, х400 (окраска по Граму)



Рисунок 12 – Конидиальная головка и конидиеносец *Aspergillus* spp., септированная гифа мицелия в мазке бронхиального секрета больного туберкулемой, х400 (окраска по Граму)



Рисунок 13 – Прорастающая крупная конидия в мазке БАЛ больного цирротическим туберкулезом, х400 (окраска по Граму)



Рисунок 14 – Конидии в мазке бронхиального смыва больного фиброзно-кавернозным туберкулезом, х1000 (окраска по Граму)

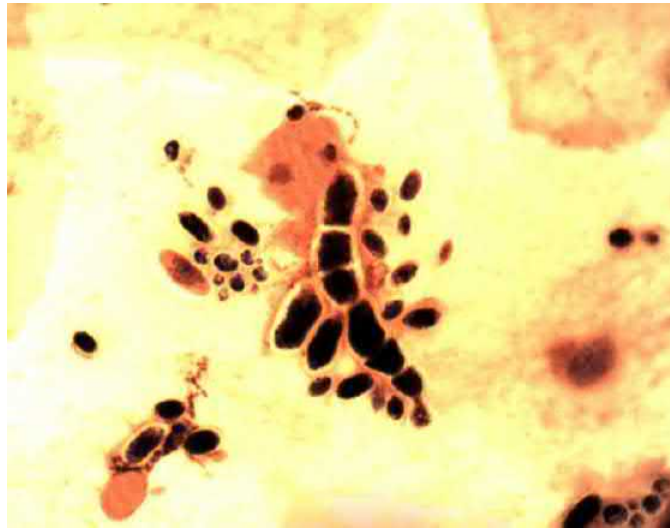


Рисунок 15 – Элементы темноокрашенного гриба (предположительно *Aureobasidium pullulans* – достоверно подтверждено результатом посева) в мазке мокроты больного диссеминированным туберкулезом, х1000 (окраска по Граму)



Рисунок 16 – Микроморфология выделенного из мокроты больного инфильтративным туберкулезом штамма *Geotrichum candidum* Link:Fr., х400 (нативный препарат)



Рисунок 17 – Микроморфология выделенного из легочной каверны больного фиброзно-кавернозным туберкулезом штамма *Aspergillus fumigatus* Fres., х400 (нативный препарат)



Рисунок 18 – Микроморфология выделенного из мокроты больного диссеминированным туберкулезом штамма *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arn., x400 (нативный препарат)
Примечание: Коричневые гифы с хламидоспорами и бесцветные конидии (вверху слева)

Внедрение в практику микологических лабораторий противотуберкулезных учреждений специального гистологического исследования биопсийного материала из легочной ткани ограничено организационными и методическими трудностями. Гистологическая диагностика тканевых форм микромицетов проводится врачом-гистологом в специализированной лаборатории с использованием определенных красителей (метенаминовый серебряный по Гомори, реактив Шиффа, гематоксилин и эозин, Фонтана – Массона и др.).

Использование для первичного посева содержимого бронхов и мокроты агаризованных селективных хромогенных сред для визуальной идентификации ряда *Candida* spp. сокращает время идентификации основных возбудителей кандидоза и значительно упрощает выявление в посевах смешанных культур различных видов *Candida*, дрожжевых аскомицетовых грибов не из рода *Candida* и базидиомицетовых дрожжей (Рисунки 19-21), а также различных дрожжевых грибов в сочетании с мицелиальными грибами (Рисунок 22).



Рисунок 19 – Рост дрожжевых грибов *Candida albicans* (колонии зеленого цвета; 1×10^4 КОЕ/мл) и *Candida glabrata* (колонии розовато-лилового цвета; $3,4 \times 10^4$ КОЕ/мл) в мокроте больного инфильтративным туберкулезом

Примечание: Количественный посев на среду Сабуру и хромогенную среду (BBL CHROMagar Candida Medium; чашка справа внизу), 30°C (чашки с агаром Сабуру) и 37°C (чашка с хромагаром), 2 суток



Рисунок 20 – Рост дрожжевых грибов *Candida albicans* (колонии фиолетового цвета; $6,1 \times 10^3$ КОЕ/мл), *Candida krusei* (колонии бирюзового цвета; $2,4 \times 10^3$ КОЕ/мл) и *Candida kefyr* (колонии белого цвета; 2×10^2 КОЕ/мл) в мокроте больного фиброзно-кавернозным туберкулезом

Примечание: Количественный посев на среду Сабуру и хромогенную среду (CandiSelect 4; чашка справа внизу), 30°C (чашки с агаром Сабуру) и 37°C (чашка с хромагаром), 2 суток



Рисунок 21 – Рост базидиомицетовых дрожжей *Cryptococcus neoformans* (колонии синего цвета; 2×10^4 КОЕ/мл) и аскомицетовых дрожжей *Candida kefyr* (колонии белого цвета; $4,6 \times 10^3$ КОЕ/мл) в бронхиальном секрете больного туберкулезным плевритом

Примечание: Количественный посев на среду Сабуро и хромогенную среду (CandiSelect 4; чашка справа внизу), 30°C (чашки с агаром Сабуро) и 37°C (чашка с хромагаром), 4 суток



Рисунок 22 – Рост плесневых грибов *Aspergillus fumigatus*, дрожжевых грибов *Candida albicans* (колонии зеленого цвета; $1,4 \times 10^4$ КОЕ/мл) и *Candida glabrata* (колонии розовато-лилового цвета; $1,2 \times 10^3$ КОЕ/мл) в мокроте больного фиброзно-кавернозным туберкулезом

Примечание: Количественный посев на среду Сабуро и хромогенную среду (BBL CHROMagar Candida Medium; чашка справа внизу), 30°C (чашки с агаром Сабуро) и 37°C (чашка с хромагаром), 3 суток

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 (Рисунки 23-25).



Рисунок 23 – Рост колонии *Cladosporium cladosporioides* из содержимого полостного образования в легких больного диссеминированным туберкулезом (жидкая среда Сабуро, 30°C, 10 суток)



Рисунок 24 – Рост колонии *Aspergillus fumigatus* из содержимого легочной каверны больной фиброзно-кавернозным туберкулезом (жидкая среда Сабуро, 30°C, 5 суток)



Рисунок 25 – Рост колонии *Acremonium strictum* из содержимого туберкулемы легких (жидкая среда Сабуро, 30°C, 10 суток)

Для сокращения времени идентификации штаммов плесневых возбудителей часть образца из проб легочного хирургического материала (резекционный материал, биоптаты от пациентов с подозрением на плесневый микоз) высевает непосредственно на среду для культивирования мицелиальных грибов (картофельно-декстрозный агар или др.) (Рисунок 26).



Рисунок 26 – Рост множественных колоний *Aspergillus ochraceus* из содержимого легочной каверны больной фиброзно-кавернозным туберкулезом (жидкая среда Сабуро и картофельно-декстрозный агар, 30°C, 5 суток)

Наиболее благоприятные условия для выделения из посевов грибов, способных вызывать пневмомикозы, создаются при поддержании в термостате температуры 30°C. Этот температурный режим оптимален для роста и развития большинства болезнетворных микромицетов (за исключением термофильных и некоторых термотолерантных видов) и позволяет обнаруживать грибы, не растущие *in vitro* при 37°C и 35°C. Проведение парных посевов мокроты и содержимого бронхов при 30°C и 37°C (два температурных режима) необходимо для быстрой дифференциации грибов, способных и не способных к росту (слабо растущих) при 37°C и для обнаружения возможного диморфизма возбудителя пневмомикоза (дрожжевая – мицелиальная формы). Посев респираторного материала при диагностике и контроле лечения пневмомикозов следует проводить количественным методом для оценки содержания в образцах колоний грибов определенного вида (Рисунки 19-22).

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

Рекомендуемый алгоритм микологического исследования при проведении диагностики пневмомикозов у пациентов фтизиатрических МО (исследования мокроты и материалов, полученных при ФБС) представлен на рисунке 27.



Рисунок 27 – 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*

Алгоритм исследования включает прямую микроскопию и посев на питательные среды отобранных проб респираторного материала, идентификацию выделенных 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 (Рисунок 27).

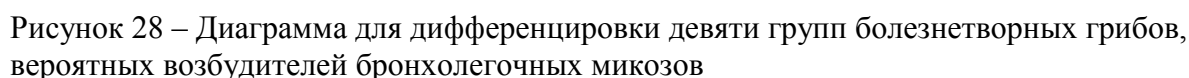
Видовая идентификация культур грибов – важнейший этап микологического исследования, необходимый для выявления этиологии пневмомикоза, интерпретации полученных результатов и подбора антимикотиков для лечения; для идентификации дрожжевых и плесневых возбудителей используют специально разработанные методики и питательные среды (Рисунок 27). Для корректной идентификации плесневых грибов по атласам-определителям 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 нативных препаратов в капле воды с помощью микологического крючка). Корректная идентификация штаммов дрожжевых грибов с помощью доступных коммерческих систем (хромагары, тест-системы для идентификации дрожжевых грибов) возможна при обязательном изучении их 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; для клинической интерпретации результатов тестирования следует руководствоваться актуальными на данный момент времени рекомендациями и действующими величинами пограничных значений МПК препаратов или диаметров зон подавления роста).

Представленный в алгоритме комплекс общеупотребимых, надежных методик для видовой идентификации и тестирования чувствительности дрожжевых и плесневых грибов-оппортунистов к лекарственным препаратам разработан для применения в практических лабораториях и позволяет получать достоверные и воспроизводимые результаты.

Приведенная ниже разработанная нами схема разделения возбудителей пневмомикозов на группы основана на использовании для их распознавания простых морфологических признаков (макро- и микроморфология) и стандартных биохимических тестов для разделения дрожжей на аскомицеты и базидиомицеты (тест на образование уреазы или другое) (Рисунок 28). Схема составлена с учетом многообразия штаммов микромицетов, которые могут быть выделены из посевов биоматериалов на пневмомикоз и позволяет доступными методами быстро дифференцировать группы возбудителей (9 групп), отличающиеся по спектру активных и неактивных препаратов: возбудители феогифомикозов из групп диморфных «черных дрожжей» (1) или мицелиальных феоидных грибов (2), возбудители зигомикоза (*Zygomycota*) (3), группа светлоокрашенных плесневых возбудителей (включает анаморфные гиалогифомицеты и телеоморфные виды *Ascomycota*, *Basidiomycota* – возбудители аспергиллеза, гиалогифомикозов) (4), базидиомицетовые дрожжи из группы «красных дрожжей» (5), аскомицетовые дрожжи (6), базидиомицетовые непигментированные дрожжи (7), аскомицетовые дрожжеподобные грибы (8), базидиомицетовые дрожжеподобные грибы (9).

Выделенные микромицеты разделяют по окраске колоний, реверзума и пигментации таллома на светлоокрашенные грибы (образуют бесцветные или светлоокрашенные, плесневые или дрожжевые колонии (у плесневых видов конидии после созревания в массе часто окрашены в яркие характерные цвета; у некоторых *Aspergillus* spp. зрелые конидии – черные)) и темноокрашенные грибы (образуют темные колонии (от серых до оливковых, коричневых или черных), с темным реверзумом и темные меланизированные гифы и конидии (от оливковых до коричневых)).



Светлоокрашенные грибы разделяют по морфологии колоний на группы плесневых грибов (распростертые или ограниченные колонии с развитым воздушным мицелием) и дрожжевых грибов (компактные слизистые или

пастообразные колонии без воздушного мицелия, у дрожжеподобных видов – с субстратным мицелием в краевой части).

Плесневые светлоокрашенные грибы разделяют по макро- и микроморфологии на группу возбудителей зигомикоза (*Zygomycota*) (3) – низшие грибы (быстрорастущие колонии с обильным воздушным шерстистым мицелием, заполняющим чашку Петри за 2-3 суток и темными крупными спорангиями (с эндогенными спорангиоспорами); гифы и спорангиеносцы широкие (от 5 до 20 мкм) несептированные или с редкими перегородками, могут присутствовать ризоиды, столоны, хламидоспоры, оидии) и группу грибов *Dikarya* – высшие грибы: гиалогифомицеты, телеоморфные *Ascomycota* или *Basidiomycota* (4) (колонии с развитым воздушным мицелием; таллом из регулярно септированных, бесцветных гиф субстратного и воздушного мицелия, образуют конидиеносцы с конидиогенными структурами и экзогенными конидиями, а гомоталлические виды анаморфных гифомицетов и телеоморфные грибы – также и половые структуры с половыми спорами).

Дрожжевые (немеланизированные) грибы разделяют по цвету колоний на группу белых дрожжевых грибов (колонии от белых до кремовых, бежевых или желто-бежевых; аскомицетовые или базидиомицетовые дрожжи) и группу красных базидиомицетовых дрожжевых грибов (5) (колонии от оранжевых до розовых или красных – за счет синтеза каротиноидных пигментов; виды родов *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*).

Группу белых дрожжей разделяют по макро- и микроморфологии на дрожжевые грибы, образующие почкующиеся клетки (типично дрожжевые колонии; таллом из одиночных почкующихся клеток и нитей псевдомицелия) и дрожжеподобные грибы, формирующие артроспоры (характерные для дрожжеподобных грибов колонии, с субстратным мицелием в краевой части; таллом из одиночных, обычно цилиндрических артроконидий и гиф многоклеточного мицелия, распадающегося по септам на артроконидии).

Непигментированные дрожжевые грибы, образующие почкующиеся клетки, разделяют по таксономической принадлежности с помощью тестирования на

аскомицетовые дрожжи (6) (из родов *Candida*, *Saccharomyces*, *Yarrowia*) и базидиомицетовые дрожжи (7) (из родов *Cryptococcus*, *Malassezia*). Аналогичным образом, дрожжеподобные грибы, формирующие артроспоры, разделяют по таксономии на аскомицетовые дрожжеподобные грибы (8) (из родов *Geotrichum*, *Saprochaete*) и базидиомицетовые дрожжеподобные грибы (9) (из рода *Trichosporon*). Аскомицетовые и базидиомицетовые грибы дифференцируют с помощью общепринятого биохимического признака – теста на образование уреазы (базидиомицеты: положительный, проводят гидролиз мочевины, аскомицеты: отрицательный, не проводят); для этой же цели возможно использовать реакцию на окрашивание колоний диазониевым синим В (DBB) (базидиомицеты: положительный, темно-красное окрашивание, аскомицеты: отрицательный, не окрашиваются).

Видовую идентификацию плесневых грибов из разных групп проводят по совокупности их микроморфологических и макроморфологических признаков (Рисунок 27) с помощью специальных атласов-определителей [128, 258]. Микроморфологию культуры плесневого гриба изучают сразу после начала споруляции на специальных идентификационных средах (агар Чапека–Докса, картофельно-декстрозный агар и при необходимости дополнительные среды) во влажных неокрашенных препаратах с добавлением дистиллированной воды. Видовая идентификация мицелиальных возбудителей методами классической морфологической микологии доступна для использования в любой медицинской лаборатории; точность идентификации зависит от опыта и квалификации исследователя, особенно при выделении редких возбудителей.

Видовую идентификацию дрожжевых грибов из разных групп проводят с помощью адаптированных для практических исследований готовых тест-систем для идентификации клинически значимых видов дрожжей и специальных хромогенных сред, с учетом полученных данных по морфологии и толерантности к температуре (Рисунок 27). При обнаружении возбудителя из группы непигментированных базидиомицетовых дрожжей необходимо подтвердить или

исключить выделение *Cryptococcus neoformans*, оценивая наличие специфических биохимических признаков и капсулообразования в тушевых препаратах.

2.3 Интерпретация результатов лабораторных исследований

Изложенные критерии интерпретации результатов лабораторной диагностики пневмомикозов у больных туберкулезом основаны на анализе собственных многолетних данных, полученных в ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ» в течение 2002-2017 гг., и имеющихся подходах к диагностике глубоких оппортунистических микозов у пациентов разных категорий, описанных в отечественной и зарубежной литературе [6, 11, 40, 44, 45, 54, 66, 68, 92, 128, 130, 132, 158, 211, 214, 258, 336, 337, 342, 347, 365, 397]. Были проанализированы три группы клинически значимых методов, используемых в практике микологических лабораторий МО для диагностики и дифференциальной диагностики пневмомикозов: прямая микроскопия биологического материала, культуральное исследование, серологический метод. Следует отметить, что как прямые микробиологические, так и непрямые иммунологические методы диагностики микозов бронхов и легких имеют ограничения по чувствительности и специфичности и в ряде случаев могут приводить к ложноотрицательным или ложноположительным результатам. Вероятность выявления у больного достоверных лабораторных признаков пневмомикоза возрастает при отборе повторных проб необходимых биоматериалов.

Диагностическая ценность положительных результатов лабораторных исследований различна, нередко вариабельна и определяется рядом показателей: методом исследования (выделение культуры гриба из посева, обнаружение элементов грибов при прямой микроскопии биоматериала, выявление антигенов грибов и антител к ним в сыворотке крови при иммунологических исследованиях); характером материала (респираторные биосубстраты (мокрота, БАЛ, бронхиальный секрет, бронхиальный смыв), образцы легочной ткани, материалы из полостных образований легких и плевральных полостей, кровь); видовой принадлежностью выделенного гриба; количественным содержанием гриба (при оценке посевов респираторного материала); повторностью

обнаружения возбудителя (при культуральных и иммунологических исследованиях). Интерпретацию значимых результатов лабораторных исследований на пневмомикоз целесообразно проводить в следующих категориях: «признак колонизации», «признак вероятного микоза», «диагностически значимый признак микоза».

Перечислим положительные результаты лабораторного обследования больных туберкулезом на пневмомикоз (также инвазивный и диссеминированный глубокий микоз), имеющие самостоятельное диагностическое значение [158, 214]:

- выделение плесневого или дрожжевого гриба из посева образца легочной ткани с признаками поражения (диагноз зависит от вида (рода) выделенного возбудителя – инвазивный легочный аспергиллез, кандидоз, криптококкоз, зигомикоз, гиалогифомикоз, феогифомикоз или редкий дрожжевой микоз, вызванный грибом не из родов *Candida* и *Cryptococcus*);
- микроскопические находки клеток и/или клеточных структур плесневых или дрожжевых грибов в образце легочной ткани с признаками поражения (диагноз – инвазивный плесневый микоз (при обнаружении элементов мицелиальных грибов) или инвазивный дрожжевой микоз (при обнаружении элементов дрожжевых грибов));
- выделение гриба из посева содержимого полостного образования легких (микоз, локализованный в легочной полости (аспергиллема и другие формы ХАЛ – при выделении гриба *Aspergillus* spp., или другое заболевание) или сочетанная инфекция данной локализации; признак также может свидетельствовать о развитии инвазивного микоза легких);
- выделение гриба из посева материала из плевральной полости (микотическое поражение плевры или заболевание плевры смешанной этиологии; признак также может свидетельствовать о развитии инвазивного микоза);
- однократное выделение из посева крови дрожжевого или плесневого гриба, за исключением *Aspergillus* spp., которое интерпретируют как контаминацию (фунгемия (при обнаружении *Candida* spp. – кандидемия); фунгемия может предшествовать и сопутствовать инвазивному кандидозу и другим

висцеральным микозам с поражением легких – криптококкозу, редким дрожжевым микозам, фузариозу и ряду других гиалогифомикозов).

Несмотря на высокую частоту развития гематогенной диссеминации при инвазивном аспергиллезе, его возбудители крайне редко выделяются из посевов крови. Согласно имеющимся рекомендациям, выделение гриба рода *Aspergillus* из крови следует интерпретировать как контаминацию образца и результат, не имеющий диагностического значения [6, 66, 132, 158, 211]. В отличие от *Aspergillus* spp. и зигомицетов, грибы рода *Fusarium* образуют *in vivo* не только мицелий, но и споры [272], что, вероятно, объясняет частую высеваемость *Fusarium* spp. из крови. Даже однократное выделение *Fusarium* spp. из посева крови больного с признаками воспалительной реакции является диагностическим признаком фунгемии. Аналогичным образом интерпретируют результат выделения из крови и некоторых других возбудителей гиалогифомикоза, у которых также часто происходит споруляция *in vivo*, направленная на выход одноклеточной формы в кровяное русло: *Acremonium* spp., *Paecilomyces* spp., *Scopulariopsis brevicaulis*, *Scedosporium* spp., *Trichoderma* spp. [2, 6, 66].

Диагностическая ценность находок грибов методом прямой микроскопии определяется характером исследуемого биоматериала. Обнаружение клеток гриба при микроскопии легочной ткани, в норме стерильной – диагностически значимый критерий инвазивного легочного микоза. Положительные результаты микроскопического исследования материала из полостных образований легких и плевральных полостей являются важным признаком микоза и показателем активности гриба в деструктивной полости; наибольшую значимость имеет обнаружение в содержимом полости клеточных структур, характерных для вида, выделенного при посеве. Обнаружение элементов микромицетов в мокроте и бронхоскопическом материале не имеет решающего диагностического значения при верификации пневмомикозов, но является надежным подтверждением выделения гриба из посева. Положительные результаты микроскопии мокроты и содержимого бронхов позволяют выявить присутствие гриба в материале и морфологию предполагаемого возбудителя в организме больного (дрожжевая или

мицелиальная форма) уже на первые сутки исследования, а также, важны для окончательной интерпретации результатов посева. В целом, при положительном результате культурального исследования диагностическая значимость положительного результата микроскопии возрастает.

Культуральное исследование респираторного и хирургического биоматериалов с предварительным проведением первичной микроскопии – основной и наиболее информативный метод лабораторной диагностики пневмомикозов. Специальное микологическое исследование позволяет не только обнаружить возбудитель в различном биоматериале, но и выделить его в чистой культуре с последующими определениями видовой принадлежности и устойчивости *in vitro* к лекарственным препаратам. Специфичное и более чувствительное по сравнению с методом прямой микроскопии культуральное исследование дает возможность дифференцировать аскомицетовые и базидиомицетовые дрожжевые грибы, виды грибов рода *Aspergillus*, возбудителей гистоплазмоза, зигомикоза и феогифомикоза. Однако следует учитывать, что чувствительность микологического исследования мокроты и биоматериалов, полученных инвазивными методами, ограничена. Получение ложноотрицательных результатов вероятно при исследованиях биоптатов легочной ткани (невысокая чувствительность при диагностике зигомикоза (мукоормикоза), аспергиллеза, кандидоза), любого респираторного и хирургического биоматериалов (зигомикоз), крови (кандидоз и другие диссеминированные микозы), при несвоевременной доставке образцов материала в лабораторию, при взятии образцов после начала лечения антифунгальными препаратами. Таким образом, не следует исключать развитие бронхолегочного микоза в случаях отсутствия роста болезнетворных грибов в диагностическом материале, особенно при однократном исследовании.

При интерпретации результатов культурального исследования респираторного материала у больных туберкулезом необходимо учитывать, что выделение гриба из материала, полученного при ФБС, или мокроты, не является доказательством микоза, а, как правило, отражает колонизацию дыхательных

путей. Вместе с тем, обнаружение гриба в посеве может свидетельствовать не только о колонизации слизистых оболочек нижних дыхательных путей, но и о вероятном развитии у пациента вторичной инфекции легких – в неинвазивной (трахеобронхиальный аспергиллез, АБЛА, ХАЛ, кандидозный трахеобронхит, АБЛК и др.) или инвазивной форме. Особого внимания клиницистов заслуживают случаи выделения из содержимого бронхов или мокроты возбудителей аспергиллеза (в первую очередь *Aspergillus fumigatus*, а также *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* и других *Aspergillus* spp.), фузариоза (*Fusarium solani*, а также *F. oxysporum*, *F. verticillioides* и других *Fusarium* spp.), плесневых грибов *Aureobasidium pullulans* и *Exophiala dermatitidis* (возбудители из группы «черных дрожжей»), *Bipolaris* spp., *Curvularia* spp., *Paecilomyces* spp. (*Paec. lilacinus*, *Paec. variotii*), *Rhizopus arrhizus* (основной возбудитель зигомикоза), *Scedosporium* spp. (*Sc. apiospermum*, *Sc. prolificans*), а также дрожжевого гриба *Cryptococcus neoformans* (основной возбудитель криптококкоза).

Микологическое исследование БАЛ (бронхиального секрета, бронхиального смыва) – основной и высокоспецифичный метод лабораторной диагностики неинвазивных и инвазивных форм пневмомикозов. Обнаружение в содержимом бронхов пациента методом посева любого условно-патогенного плесневого или дрожжевого гриба следует интерпретировать как важный признак «вероятного» бронхолегочного микоза и наиболее значимый критерий колонизации выделенным грибом нижних дыхательных путей. Предлагаемая для использования лабораторная оценка количественного содержания *Candida* sp. в содержимом бронхов у больных туберкулезом: умеренный рост – при содержании *Candida* sp. $<5 \times 10^2$ КОЕ/мл, значительный рост – при содержании от $\geq 5 \times 10^2$ КОЕ/мл до $<1 \times 10^3$ КОЕ/мл, обильный рост – при содержании $\geq 1 \times 10^3$ КОЕ/мл.

При диагностике пневмомикоза культуральные исследования мокроты менее информативны и специфичны по сравнению с исследованиями содержимого бронхов, полученного при ФБС (инвазивный метод). Это определяется тем, что мокрота значительно более подвержена контаминации

нормобиотой (микобиотой) верхних дыхательных путей; заселять слизистые оболочки верхних дыхательных путей и ротоглотки у здоровых людей без развития заболевания способны как дрожжевые грибы (различные *Candida* spp., в первую очередь *C. albicans* и группа распространенных возбудителей кандидоза, а также *Cryptococcus* spp., *Rhodotorula* spp., *Saccharomyces cerevisiae*), так и некоторые дрожжеподобные виды (*Geotrichum candidum*, *Saprochaete capitata*) [44, 128, 130]. Для подтверждения вывода о колонизации микромицетом нижних дыхательных путей и исключения контаминации материала микобиотой ротоглотки целесообразно повторное выделение гриба данного вида из образца мокроты. В целом, информативность исследования мокроты возрастает при двух- и трехкратном заборе материала; доступность материала позволяет проводить повторные диагностические и контрольные лабораторные исследования в динамике.

К признакам «вероятного» бронхолегочного микоза относят следующие результаты культурального исследования мокроты:

- обнаружение плесневого гриба (выделение вероятных возбудителей аспергиллеза, зигомикоза, гиалогифомикозов, феогифомикозов и других болезнетворных плесневых грибов; в норме мокрота не должна содержать мицелиальных грибов);
- обнаружение дрожжевого гриба из рода *Candida* в количестве $>1 \times 10^3$ КОЕ/мл (предлагаемая оценка количественного содержания гриба *Candida* sp. в мокроте у больных туберкулезом: норма – при содержании $\leq 1 \times 10^3$ КОЕ/мл, умеренный рост – при содержании от $>1 \times 10^3$ КОЕ/мл до $<5 \times 10^3$ КОЕ/мл, значительный рост – при содержании от $\geq 5 \times 10^3$ КОЕ/мл до $<1 \times 10^4$ КОЕ/мл, обильный рост – при содержании $\geq 1 \times 10^4$ КОЕ/мл. Результат обнаружения *Candida* sp. в количестве $>1 \times 10^3$ КОЕ/мл интерпретируют также как критерий массивной колонизации нижних дыхательных путей грибами *Candida*; в случае увеличения содержания грибов рода *Candida* в образцах мокроты в динамике риск развития бронхолегочного кандидоза у пациента возрастает);

- обнаружение дрожжевого гриба не из рода *Candida* (виды из родов *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Sporobolomyces*, *Malassezia*, *Yarrowia*; предлагаемая оценка количественного содержания дрожжевого гриба в мокроте у больных туберкулезом: умеренный рост – при содержании $<1 \times 10^3$ КОЕ/мл, значительный рост – при содержании $\geq 1 \times 10^3$ КОЕ/мл);
- обнаружение дрожжеподобного гриба с артроспорами (виды из родов *Geotrichum*, *Saprochaete*, *Trichosporon*; предлагаемая оценка количественного содержания дрожжеподобного гриба в мокроте у больных туберкулезом: умеренный рост – при содержании $<1 \times 10^3$ КОЕ/мл, значительный рост – при содержании $\geq 1 \times 10^3$ КОЕ/мл).

Предполагается, что присутствие в БАЛ грибов *Aspergillus fumigatus* (главный возбудитель аспергиллеза) или *Cryptococcus neoformans* (главный возбудитель криптококкоза) более характерно для инфекционного процесса, чем для колонизации [44, 66, 214]. Обнаружение в респираторном материале *Cr. neoformans*, дрожжевого гриба, не относящегося к нормобиоте слизистых оболочек человека и обладающего значительным патогенным потенциалом, с высокой долей вероятности свидетельствует об активизации роста и начале инфекционного процесса (бессимптомном течении или клинически выраженного криптококкоза). Выделение *Cr. neoformans* из мокроты или БАЛ при наличии рентгенологических или КТ-признаков микоза легких подтверждает развитие у пациента криптококкоза легких [44, 66]. По полученным в ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ» данным, к ценным и высоко значимым лабораторным признакам аспергиллезной инфекции бронхолегочной системы относится обнаружение в содержимом бронхов и/или мокроте больного туберкулезом возбудителей *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*.

Результаты культуральных исследований имеют определяющее значение в дифференциации бронхолегочных аспергиллеза, гиалогифомикозов, феогифомикозов. Важное клиническое значение приобретает точная видовая идентификация плесневых возбудителей из-за различной природной чувствительности видов к антимикотикам.

Возбудитель зигомикоза редко выявляется в БАЛ, мокроте, крови, материале из очага инфекции (особенно при измельчении образа ткани) и другом диагностическом материале. Однако все виды болезнетворных *Zygomycota* способны к активному и быстрому росту на стандартных питательных средах и легко формируют в лабораторных условиях характерные бесполое репродуктивные структуры [44, 128, 258].

При наличии пограничных значений МПК препарата для исследуемого возбудителя микоза, результат тестирования чувствительности штамма к антимикотику методом микроразведений (Рисунок 27) интерпретируют согласно официальной международной методологии в следующих клинических категориях чувствительности:

- 1) S (Ч) – чувствительный к препарату штамм;
- 2) I (П) – штамм с промежуточной чувствительностью (не определяется как чувствительный или устойчивый) или SDD (ЧДЗ) – чувствительный-дозозависимый штамм (для успешной терапии следует подбирать дозу антимикотика, превышающую среднюю терапевтическую);
- 3) R (У) – устойчивый к препарату штамм.

Некультуральные иммунологические методики (стандартизованные, доступные на территории Российской Федерации коммерческие тесты) расширяют диагностические возможности лабораторной службы в противотуберкулезных учреждениях при выявлении вторичных бронхолегочных заболеваний, вызванных грибами *Aspergillus*, *Cryptococcus* (тесты широко используют для верификации и экспресс-диагностики инвазивного аспергиллеза, ХАЛ, АБЛА и криптококкоза), а также *Candida* (тесты характеризуются как возможные к применению для верификации глубокого кандидоза). 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

иммунологического исследования возрастает при подтверждении результата методами посева и прямой микроскопии.

Диагностика бронхолегочного аспергиллеза включает иммунологические исследования крови, которые используют для верификации как инвазивных форм (определение галактоманнанового антигена *Aspergillus* в сыворотке – эффективный метод ранней диагностики инвазивного аспергиллеза), так и хронических и аллергических форм (определение специфических антител к грибам *Aspergillus*). Наличие серологических маркеров инфекции у больных туберкулезом поддерживает или предполагает диагноз бронхолегочного аспергиллеза; выявление антител к антигенам *Aspergillus* в сыворотке имеет диагностическое значение для верификации ХАЛ у пациентов с характерными полостными образованиями в легких [214].

Диагностика криптококкоза легких остается недостаточно эффективной [132], раннему выявлению тяжелых форм криптококковой инфекции с поражением легких способствует результативная иммунологическая диагностика (определение антигена *Cr. neoformans* (капсульный полисахарид гликуроноксилومانнан) в СМЖ, сыворотке крови, моче). Диагностическим признаком диссеминации криптококковой инфекции за пределы очага в легких является обнаружение у пациента криптококкового антигена в сыворотке крови. По имеющимся сведениям, при развитии изолированного (первичного) поражения легких антиген *Cr. neoformans* в крови обычно не выявляется или обнаруживается в некоторых случаях, но значительно реже по сравнению с частотой его выявления при диссеминированном криптококкозе, когда поражаются не только легкие, но и другие органы [44, 160].

Имеющиеся рекомендации не исключают использование выявления *Candida* антигенемии (маннановый антиген) и антител к антигенам *Candida* в сыворотке крови в качестве дополнительных лабораторных признаков поражения бронхов и 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 у пациентов фтизиатрических МО следует проводить по совокупности всех полученных микологических и иммунологических данных. Необходимым условием своевременной диагностики и назначения обоснованной лекарственной 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).

Таким образом, для оптимизации проведения лабораторной диагностики оппортунистических микозов бронхов, легких и плевры у пациентов фтизиатрических МО нами были разработаны и актуализированы научно обоснованные подходы к организации диагностики пневмомикозов, включающие схему проведения микробиологических исследований респираторного и хирургического материалов на пневмомикоз, а также иммунологических и культуральных исследований крови; алгоритмы микробиологической диагностики пневмомикозов, вызванных дрожжевыми и мицелиальными грибами; критерии интерпретации получаемых микробиологических и иммунологических данных.

ГЛАВА 3 Результаты выявления состава и таксономии вероятных возбудителей бронхолегочных и диссеминированных микозов у больных туберкулезом

3.1 Характеристики состава грибов, выделенных от больных туберкулезом при диагностике бронхолегочных и диссеминированных микозов

3.1.1 Состав, классификация, свойства обнаруженных болезнетворных грибов

В результате многолетних микологических исследований различного диагностического материала лабораторные признаки глубокого микоза были обнаружены у 2918 из 7683 (38,0% ДИ 36,9-39,1%) обследованных больных различными формами туберкулеза (Таблица 25).

Таблица 25 – Число больных различными формами туберкулеза, инфицированных оппортунистическими 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	–

Были использованы вышеизложенные критерии диагностики микозов: выделение из мокроты мицелиального гриба, дрожжевого гриба не из рода *Candida* или гриба рода *Candida* в количестве $>1 \times 10^3$ КОЕ/мл; выделение из содержимого бронхов (материал, полученный при ФБС), биоптата бронхов, содержимого легочной или плевральной полости, эндобронхиального клапана (удаленного из бронха) мицелиального или дрожжевого гриба; выделение из крови гриба рода *Candida*; выделение из СМЖ гриба *Cryptococcus neoformans*. Признаки микотической инфекции легких и/или плевры были обнаружены у 2903

из 7657 обследованных на пневмококк пациентов (37,9% ДИ 36,8-39,0%); фунгемия (кандидемия) – у 11 пациентов, криптококкоз ЦНС – у 7.

Следует отметить, что 6 из 11 случаев кандидемии (54,6%) и 7 из 7 случаев криптококкоза ЦНС (100%) были выявлены у ВИЧ-инфицированных пациентов. 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).

У инфицированных грибами пациентов было обнаружено от 1 до 5 видов условно-патогенных грибов (Рисунок 29). У 36% (ДИ 34,4–37,9%) пациентов с положительными результатами посева обнаружено 2 или более видов грибов, у 12% (ДИ 10,6–13,0%) – 3 или более видов, у 3% (ДИ 2,1–3,3%) – 4 или 5 видов. От ряда больных туберкулезом выделены штаммы 2 или 3 вероятных возбудителей глубоких микозов с поражением легких в различных сочетаниях: аспергиллеза, кандидоза, криптококкоза, зигомикоза, гиалогифомикоза, феогифомикоза, редких дрожжевых глубоких микозов.

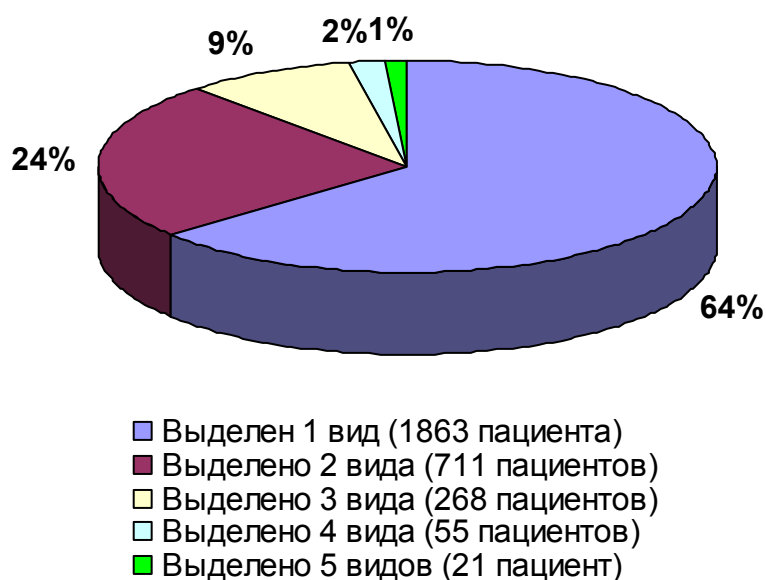


Рисунок 29 – Распределение пациентов по числу выделенных видов микромицетов (от 1 до 5 видов)

Всего при культуральных исследованиях биоматериалов было выделено 4730 штаммов грибов (Таблица 26), относящихся к 67 видам из 24 родов и 11 порядков (Таблицы 27, 28). В таблицах 26, 27 указаны современные и некоторые

традиционные синонимы видовых названий (syn.), под которыми выделенные возбудители могут упоминаться в публикациях [269, 318].

Таблица 26 – Видовой состав и количество штаммов грибов, выделенных из различного диагностического материала (респираторный материал, хирургический материал, кровь, СМЖ)

Вид	Количество штаммов в различном биоматериале, (n)								
	Респ-й материал			Хир-й материал				Биол. жидк.	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Acremonium kiliense</i> (<i>Sarocladium kiliense</i>)	3	5	–	–	–	–	–	–	–
<i>Acremonium strictum</i> (<i>Sarocladium strictum</i>)	13	18	–	2	1	–	–	–	–
<i>Alternaria alternata</i>	4	8	–	2	1	–	–	–	–
<i>Aspergillus flavipes</i>	2	11	–	–	–	–	–	–	–
<i>Aspergillus flavus</i>	20	41	–	5	4	–	1	–	–
<i>Aspergillus fumigatus</i>	71	114	–	38	13	2	–	–	–
<i>Aspergillus glaucus</i>	3	17	–	1	–	–	–	–	–
<i>Aspergillus hollandicus</i> (<i>Eurotium amstelodami</i>)	2	9	–	–	1	–	–	–	–
<i>Aspergillus nidulans</i>	11	25	–	–	3	–	–	–	–
<i>Aspergillus niger</i>	48	119	–	5	7	–	–	–	–
<i>Aspergillus ochraceus</i>	8	16	–	1	–	–	–	–	–
<i>Aspergillus oryzae</i>	1	6	–	–	–	–	–	–	–
<i>Aspergillus restrictus</i>	12	13	–	2	3	–	–	–	–
<i>Aspergillus sydowii</i>	8	26	–	–	1	–	1	–	–
<i>Aspergillus terreus</i>	6	17	–	8	3	–	–	–	–
<i>Aspergillus ustus</i>	6	19	–	–	2	–	–	–	–
<i>Aspergillus versicolor</i>	20	38	–	2	1	–	–	–	–
<i>Aureobasidium pullulans</i>	10	7	–	3	2	–	–	–	–
<i>Candida albicans</i>	1392	795	18	5	14	–	1	2	–
<i>Candida dubliniensis</i>	8	7	–	–	–	–	–	–	–
<i>Candida famata</i>	3	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Candida glabrata</i>	259	140	6	3	8	–	–	2	–
<i>Candida guilliermondii</i>	30	11	1	–	–	–	–	6	–
<i>Candida kefyr</i>	83	24	–	1	1	–	–	–	–
<i>Candida krusei</i>	154	55	1	–	6	–	–	–	–
<i>Candida lusitaniae</i>	10	5	–	–	–	–	1	–	–
<i>Candida norvegensis</i>	24	5	–	–	–	–	–	–	–
<i>Candida parapsilosis</i>	46	11	1	–	12	–	–	1	–
<i>Candida rugosa</i>	13	1	–	–	–	–	–	–	–
<i>Candida tropicalis</i>	176	75	–	1	3	–	–	–	–
<i>Candida zeylanoides</i>	7	4	–	–	–	–	–	–	–
<i>Chaetomium globosum</i>	–	1	–	–	–	–	–	–	–
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	8	11	–	2	–	–	–	–	–
<i>Cladosporium herbarum</i>	–	2	–	1	–	–	–	–	–
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	2	1	–	–	–	–	–	–	–
<i>Cryptococcus albidus</i>	3	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Cryptococcus laurentii</i>	3	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Cryptococcus neoformans</i>	4	2	–	1	1	–	–	–	7

Продолжение таблицы 26

Вид		Количество штаммов в различном биоматериале, (n)								
		Респ-й материал			Хир-й материал				Биол. жидк.	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Curvularia hawaiiensis</i> (<i>Bipolaris hawaiiensis</i>)		–	1	–	1	–	–	–	–	–
<i>Curvularia lunata</i>		–	2	–	–	2	–	–	–	–
<i>Fusarium chlamydosporum</i>		2	1	–	–	–	–	–	–	–
<i>Fusarium dimerum</i>		1	1	–	–	1	–	–	–	–
<i>Fusarium oxysporum</i>		1	6	–	1	1	–	–	–	–
<i>Geotrichum candidum</i>		24	8	1	3	1	–	–	–	–
<i>Hanseniaspora uvarum</i> (<i>Kloeckera apiculata</i>)		6	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Mucor circinelloides</i>		1	2	–	–	–	–	–	–	–
<i>Mucor hiemalis</i>		1	3	–	–	2	–	–	–	–
<i>Paecilomyces lilacinus</i> (<i>Purpureocillium lilacinum</i>)		1	1	–	1	–	–	–	–	–
<i>Paecilomyces variotii</i>		1	27	–	2	–	–	–	–	–
<i>Penicillium chrysogenum</i>		16	39	–	2	1	–	–	–	–
<i>Penicillium citrinum</i>		5	14	–	1	2	–	–	–	–
<i>Penicillium commune</i>		5	3	–	–	2	–	–	–	–
<i>Penicillium decumbens</i>		3	10	–	–	–	–	–	–	–
<i>Penicillium expansum</i>		1	5	–	–	–	–	–	–	–
<i>Penicillium spinulosum</i>		1	2	–	–	–	–	–	–	–
<i>Rhizopus arrhizus</i>		8	9	–	1	–	–	–	–	–
<i>Rhodotorula glutinis</i>		8	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>		21	3	–	–	1	–	–	–	–
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		32	7	1	–	–	–	–	–	–
<i>Saprochaete capitata</i>		6	3	–	–	–	–	–	–	–
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>		1	5	–	–	–	–	–	–	–
<i>Talaromyces purpureogenus</i> (<i>Penicillium purpurogenum</i>)		4	13	–	1	3	–	–	–	–
<i>Talaromyces rugulosus</i> (<i>Penicillium rugulosum</i>)		–	2	–	–	–	–	–	–	–
<i>Trichoderma harzianum</i>		1	1	–	–	–	–	–	–	–
<i>Trichoderma viride</i>		1	7	–	–	–	–	–	–	–
<i>Ulocladium chartarum</i>		3	–	–	–	1	–	–	–	–
<i>Yarrowia lipolytica</i> (<i>Candida lipolytica</i>)		15	1	–	–	–	–	–	–	–
Всего штаммов	абс.	2642	1835	29	96	104	2	4	11	7
	%	55,9	38,8	0,6	2,0	2,2	0,04	0,08	0,23	0,15

Примечание: 1 – мокрота, 2 – содержимое бронхов (ФБС: БАЛ, бронхиальный секрет, бронхиальный смыв), 3 – отделяемое из зева (респираторный материал 1–3); 4 – содержимое легочных полостей, 5 – содержимое плевральных полостей, 6 – биоптат бронхов, 7 – эндобронхиальный клапан (хирургический материал 4–7); 8 – кровь, 9 – СМЖ (биологические жидкости 8, 9)

К *Ascomycota* относятся 59 видов (88%) из порядков *Capnodiales* (3 возбудителя феогифомикоза), *Dothideales* (1 возбудитель феогифомикоза),

Eurotiales (24 возбудителя аспергиллеза, гиалогифомикоза), *Hypocreales* (7 возбудителей гиалогифомикоза), *Microascales* (1 возбудитель гиалогифомикоза), *Pleosporales* (4 возбудителя феогифомикоза), *Saccharomycetales* (18 возбудителей кандидоза, редких дрожжевых инфекций), *Sordariales* (1 возбудитель гиалогифомикоза). К *Basidiomycota* относятся 5 видов (7,5%) из порядков *Sporidiobolales* (2 возбудителя редких дрожжевых инфекций), *Tremellales* (3 возбудителя криптококкоза). К *Zygomycota* относятся 3 вида (4,5%) из порядка *Mucorales* (3 возбудителя зигомикоза) (Таблица 27).

Возбудители аспергиллеза представлены 14 видами рода *Aspergillus*; возбудители кандидоза – 14 видами из родов *Candida* и *Yarrowia*; возбудители криптококкоза – 3 видами рода *Cryptococcus*; возбудители зигомикоза – 3 видами из родов *Mucor* и *Rhizopus*; возбудители гиалогифомикоза – 19 видами из родов *Acremonium*, *Chaetomium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Talaromyces*, *Trichoderma*; возбудители феогифомикоза – 8 видами из родов *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Ulocladium*; возбудители редких дрожжевых глубоких микозов – 6 видами из родов *Geotrichum*, *Hanseniaspora*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saprochaete* (Таблица 28).

Согласно Атласу «Atlas of clinical fungi» G. Hoog de с соавторами (2011) [258], выделенные микромицеты распределяются по группам болезнетворных грибов следующим образом: *Zygomycota*, *Mucorales* – зигомицеты порядка *Mucorales* (3 вида); *Hyphomycetes* – гиалогифомицеты (32 вида); *Ascomycetes* producing fruit bodies in culture – плесневые аскомицеты, образующие плодовые тела в культуре (1 вид); *Hyphomycetes: Dematiaceae* – anamorphic *Pleosporales* – анаморфные феогифомицеты порядка *Pleosporales* (4 вида); *Hyphomycetes: black yeasts and their relatives* – феогифомицеты группы «черных дрожжей» и родственные им грибы (4 вида); *Ascomycetous yeasts* – аскомицетовые дрожжи (18 видов); *Basidiomycetous yeasts* – базидиомицетовые дрожжи (5 видов) (Таблица 28). В целом, было обнаружено 23 вида дрожжевых грибов (34%), включая 2 вида дрожжеподобных грибов, формирующих артроспоры (*Sacch.*

cerevisiae, *Sapr. capitata*) и 44 вида плесневых грибов (66%), включая 1 вид из группы «черных дрожжей» (*Aur. pullulans*).

Таблица 27 – Классификация выделенных видов грибов в царстве *Fungi*

Отдел	Таксономия	Вид
<i>Ascomycota</i>	Подотдел: <i>Pezizomycotina</i> Класс: <i>Sordariomycetes</i> Порядок: <i>Нypocreales</i> Семейства: <i>Нypocreaceae</i> , <i>Nectriaceae</i> ; <i>Incertae sedis</i>	<i>Acremonium kiliense</i> , <i>Acr. strictum</i> ; <i>Fusarium chlamydosporum</i> , <i>F. dimerum</i> , <i>F. oxysporum</i> ; <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Tr. viride</i>
	Подотдел: <i>Pezizomycotina</i> Класс: <i>Sordariomycetes</i> Порядок: <i>Sordariales</i> Семейство: <i>Chaetomiaceae</i>	<i>Chaetomium globosum</i> ^T
	Подотдел: <i>Pezizomycotina</i> Класс: <i>Sordariomycetes</i> Порядок: <i>Microascales</i> Семейство: <i>Microascaceae</i>	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>
	Подотдел: <i>Pezizomycotina</i> Класс: <i>Eurotiomycetes</i> Порядок: <i>Eurotiales</i> Семейство: <i>Aspergillaceae</i>	<i>Aspergillus flavipes</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. glaucus</i> , <i>A. hollandicus</i> (syn. <i>Eurotium</i> <i>amstelodami</i> ^T), <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> ; <i>Paecilomyces lilacinus</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> , <i>T. rugulosus</i>
	Подотдел: <i>Pezizomycotina</i> Класс: <i>Dothideomycetes</i> Порядок: <i>Dothideales</i> Семейство: <i>Sacotheciaceae</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>
	Подотдел: <i>Pezizomycotina</i> Класс: <i>Dothideomycetes</i> Порядок: <i>Capnodiales</i> Семейство: <i>Cladosporiaceae</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Cl. herbarum</i> , <i>Cl. sphaerospermum</i>
	Подотдел: <i>Pezizomycotina</i> Класс: <i>Dothideomycetes</i> Порядок: <i>Pleosporales</i> Семейство: <i>Pleosporaceae</i>	<i>Alternaria alternata</i> ; <i>Curvularia hawaiiensis</i> , <i>Curv. lunata</i> ; <i>Ulocladium chartarum</i>
	Подотдел: <i>Saccharomycotina</i> Класс: <i>Saccharomycetes</i> Порядок: <i>Saccharomycetales</i> Семейства: <i>Dipodascaceae</i> , <i>Saccharomycetaceae</i> , <i>Saccharomycodaceae</i> ; <i>Incertae sedis</i>	<i>Candida albicans</i> , <i>C. dubliniensis</i> , <i>C. famata</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. kefir</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>Geotrichum candidum</i> ; <i>Hanseniaspora uvarum</i> ^T (syn. <i>Kloeckera apiculata</i>) ^T ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ^T ; <i>Saprochaete capitata</i> ; <i>Yarrowia lipolytica</i> ^T (syn. <i>Candida lipolytica</i>)

Продолжение таблицы 27

Отдел	Таксономия	Вид
<i>Basidiomycota</i>	Подотдел: <i>Agaricomycotina</i> Класс: <i>Tremellomycetes</i> Порядок: <i>Tremellales</i> Семейство: <i>Tremellaceae</i>	<i>Cryptococcus albidus</i> , <i>Cr. laurentii</i> , <i>Cr. neoformans</i>
	Подотдел: <i>Pucciniomycotina</i> Класс: <i>Microbotryomycetes</i> Порядок: <i>Sporidiobolales</i> Семейство: <i>Sporidiobolaceae</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Rh. mucilaginosa</i>
<i>Zygomycota</i>	Подотдел: <i>Mucoromycotina</i> Класс: <i>Mucoromycetes</i> Порядок: <i>Mucorales</i> Семейства: <i>Mucoraceae</i> , <i>Rhizopodaceae</i>	<i>Mucor circinelloides</i> , <i>M. hiemalis</i> ; <i>Rhizopus arrhizus</i>

Примечание: ¹ – телеоморфа (у грибов *Ascomycota*)

Таблица 28 – 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> , <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>
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> , <i>Acr. strictum</i> ; <i>Fusarium chlamydosporum</i> , <i>F. dimerum</i> , <i>F. oxysporum</i> ; <i>Paecilomyces lilacinus</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</i> <i>purpureogenus</i> , <i>T. rugulosus</i> ; <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> ; <i>Trichoderma</i> <i>harzianum</i> , <i>Tr. viride</i>
	Аскомицеты, образующие плодовые тела в культуре	<i>Chaetomium globosum</i>

Продолжение таблицы 28

Микоз; количество видов, (п)	Группа видов ¹	Обнаруженные возбудители
Феогифомикоз (8)	Феогифомицеты порядка <i>Pleosporales</i>	<i>Alternaria alternata</i> ; <i>Curvularia hawaiiensis</i> , <i>Curv. lunata</i> ; <i>Ulocladium chartarum</i>
	Феогифомицеты «черные дрожжи» и родственные им 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> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; <i>Saprochaete capitata</i>
	Базидиомицетовые дрожжи	<i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Rh. mucilaginosa</i>

Примечание: ¹ – По: [258]

В таблице 29 представлены известные свойства обнаруженных возбудителей и изученные в работе характеристики роста их клинических штаммов (термотолерантность, особенности роста *in vitro*). Собранные сведения целесообразно использовать при диагностике пневмомикозов. К настоящему времени, только 7 из 67 видов (11%) не были описаны в качестве возбудителей глубоких микозов: *Cl. herbarum*, *Cl. sphaerospermum*, *H. uvarum* (*Kl. apiculata*), *M. hiemalis*, *P. expansum*, *T. rugulosus*, *Ul. chartarum*; 38 видов (57%) известны как возбудители различных вариантов пневмомикозов [128, 258].

Таблица 29 – Основные свойства выделенных видов грибов (собственные и литературные данные)

Вид ¹	Патогенность ²	Аллергенность ³	Токсигенность ⁴	Рост при 37°C ⁵	Телеоморфа (Анаморфа) Синонимы ⁶
<i>Acremonium kiliense</i>	BSL-2/ IV группа	–	–	+	Не обнаружена. <i>Sarocladium kiliense</i> (синоним)
<i>Acremonium strictum</i>	BSL-1/ IV группа	–	–	+	Не обнаружена. <i>Sarocladium strictum</i> (синоним)
<i>Alternaria alternata</i>	BSL-1/ IV группа	+	–	+	Не обнаружена
<i>Aspergillus flavipes</i> Sect. <i>Flavipedes</i>	BSL-1/ IV группа	–	+	+/- >50%	<i>Fennellia flavipes</i> (гомоталличная телеоморфа – образуется <i>in vitro</i> крайне редко)
<i>Aspergillus flavus</i> Sect. <i>Flavi</i>	BSL-2/ III группа	+	+	+	<i>Petromyces flavus</i> (гетероталличная телеоморфа)
<i>Aspergillus fumigatus</i> Sect. <i>Fumigati</i>	BSL-2/ III группа	+	+	+	<i>Neosartorya fumigata</i> (гетероталличная телеоморфа)

Продолжение таблицы 29

Вид ¹	Патогенность ²	Аллергенность ³	Токсигенность ⁴	Рост при 37°C ⁵	Телеоморфа (Анаморфа) Синонимы ⁶
<i>Aspergillus glaucus</i> Sect. <i>Aspergillus</i>	BSL-1/ IV группа	–	–	+/- <50%	<i>Eurotium herbariorum</i> (гомоталличная телеоморфа – образуется <i>in vitro</i> регулярно)
<i>Aspergillus hollandicus</i> Sect. <i>Aspergillus</i>	BSL-1/ IV группа	–	–	+/- <50%	<i>Eurotium amstelodami</i> (гомоталличная телеоморфа – образуется <i>in vitro</i> регулярно; синоним). <i>Aspergillus vitis</i> (синоним)
<i>Aspergillus nidulans</i> Sect. <i>Nidulantes</i>	BSL-1/ IV группа	–	+	+	<i>Emericella nidulans</i> (гомоталличная телеоморфа – образуется <i>in vitro</i> у части штаммов)
<i>Aspergillus niger</i> Sect. <i>Nigri</i>	BSL-1/ IV группа	+	+	+	Не обнаружена
<i>Aspergillus ochraceus</i> Sect. <i>Circumdati</i>	BSL-1/ IV группа	–	+	+/- <50%	Не обнаружена
<i>Aspergillus oryzae</i> Sect. <i>Flavi</i>	BSL-1/ IV группа	+	+	+/- >50%	Не обнаружена
<i>Aspergillus restrictus</i> Sect. <i>Restricti</i>	BSL-1/ IV группа	–	+	–	Не обнаружена
<i>Aspergillus sydowii</i> Sect. <i>Nidulantes</i>	BSL-1/ IV группа	–	–	+/- <10%	Не обнаружена
<i>Aspergillus terreus</i> Sect. <i>Terrei</i>	BSL-2/ III группа	–	+	+	Не обнаружена
<i>Aspergillus ustus</i> Sect. <i>Usti</i>	BSL-1/ IV группа	–	+	+/- >90%	Не обнаружена
<i>Aspergillus versicolor</i> Sect. <i>Nidulantes</i>	BSL-1/ IV группа	+	+	+/- <10%	Не обнаружена
<i>Aureobasidium pullulans</i>	BSL-1/ IV группа	–	–	+/- >50%	Не обнаружена
<i>Candida albicans</i>	BSL-2/ III группа	+	–	+	Не обнаружена
<i>Candida dubliniensis</i>	BSL-2/ IV группа	–	–	+	Не обнаружена

Продолжение таблицы 29

Вид ¹	Патогенность ²	Аллергенность ³	Токсигенность ⁴	Рост при 37°C ⁵	Телеоморфа (Анаморфа) Синонимы ⁶
<i>Candida famata</i>	BSL-1/ IV группа	—	—	+	<i>Debaryomyces hansenii</i> (гомоталличная телеоморфа; синоним); образует почкующиеся клетки и аски с аскоспорами
<i>Candida glabrata</i>	BSL-2/ III группа	—	—	+	Не обнаружена
<i>Candida guilliermondii</i>	BSL-1/ IV группа	—	—	+	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (гетероталличная телеоморфа; синоним)
<i>Candida kefyr</i>	BSL-1/ IV группа	—	—	+	<i>Kluveromyces marxianus</i> (гомоталличная телеоморфа; синоним); образует псевдомицелий и аски с аскоспорами
<i>Candida krusei</i>	BSL-2/ III группа	—	—	+	<i>Issatchenkia orientalis</i> , syn. <i>Pichia kudriavzevii</i> (гомоталличная телеоморфа; синоним); образует псевдомицелий и аски с аскоспорами
<i>Candida lusitanae</i>	BSL-2/ IV группа	—	—	+	<i>Clavispora lusitanae</i> (гетероталличная телеоморфа; синоним)
<i>Candida norvegensis</i>	BSL-1/ IV группа	—	—	+	<i>Pichia norvegensis</i> (гомоталличная телеоморфа; синоним); образует псевдомицелий и аски с аскоспорами
<i>Candida parapsilosis</i>	BSL-1/ IV группа	—	—	+	Не обнаружена
<i>Candida rugosa</i>	BSL-1/ IV группа	—	—	+	Не обнаружена
<i>Candida tropicalis</i>	BSL-2/ III группа	—	—	+	Не обнаружена
<i>Candida zeylanoides</i>	BSL-1/ IV группа	—	—	—	Не обнаружена
<i>Chaetomium globosum</i>	BSL-1/ IV группа	—	+	+	Телеоморфный вид; образует аскокарпы (перитеции) с аскоспорами
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	BSL-1/ —	+	+	+/- <50%	Не обнаружена
<i>Cladosporium herbarum</i>	BSL-1/ —	+	—	+/- >50%	<i>Mycosphaerella tassiana</i> (гетероталличная телеоморфа)

Продолжение таблицы 29

Вид ¹	Патогенность ²	Аллергенность ³	Токсигенность ⁴	Рост при 37°C ⁵	Телеоморфа (Анаморфа) Синонимы ⁶
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	BSL-1/ –	–	–	–	Не обнаружена
<i>Cryptococcus albidus</i>	BSL-1/ IV группа	–	–	+/- <50%	Не обнаружена. <i>Naganishia albida</i> (синоним)
<i>Cryptococcus laurentii</i>	BSL-1/ IV группа	–	–	+/- >50%	Не обнаружена
<i>Cryptococcus neoformans</i>	BSL-2/3/ III группа	–	–	+	<i>Filobasidiella neoformans</i> (гетероталличная телеоморфа, BSL-3). <i>Cr. neoformans</i> var. <i>grubii</i> и <i>Cr. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> (варианты)
<i>Curvularia hawaiiensis</i>	BSL-1/ IV группа	–	–	+	<i>Cochliobolus hawaiiensis</i> (гетероталличная телеоморфа). <i>Bipolaris hawaiiensis</i> (синоним)
<i>Curvularia lunata</i>	BSL-1/ IV группа	+(4)	–	+	<i>Pseudocochliobolus lunatus</i> (гетероталличная телеоморфа)
<i>Fusarium chlamydosporum</i>	BSL-1/ IV группа	–	+(1)	+/- >50%	Не обнаружена
<i>Fusarium dimerum</i>	BSL-1/ IV группа	–	–	+	Не обнаружена
<i>Fusarium oxysporum</i>	BSL-2/ IV группа	–	–	+	Не обнаружена
<i>Geotrichum candidum</i>	BSL-1/ IV группа	–	–	+/- <50%	<i>Galactomyces candidus</i> (гетероталличная телеоморфа)
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	BSL-1/ –	–	–	+/- <20%	Телеоморфный вид; образует аски с аскоспорами и клетки с биполярным почкованием. <i>Kloeckera apiculata</i> (анаморфа; синоним)
<i>Mucor circinelloides</i>	BSL-1/ IV группа	–	–	+	Гетероталличный вид; зигоспор не образует, способен к дрожжевому росту
<i>Mucor hiemalis</i>	BSL-1/ IV группа	–	–	+/- <20%	Гетероталличный вид; зигоспор не образует
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	BSL-1/ IV группа	–	+(1)	+	Не обнаружена. <i>Purpureocillium lilacinum</i> (синоним)

Продолжение таблицы 29

Вид ¹	Патогенность ²	Аллергенность ³	Токсигенность ⁴	Рост при 37°C ⁵	Телеоморфа (Анаморфа) Синонимы ⁶
<i>Paecilomyces variotii</i>	BSL-2/ IV группа	–	+	+	<i>Byssochlamys spectabilis</i> (гетероталличная телеоморфа)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	BSL-1/ IV группа	+	+	+/- <50%	Не обнаружена
<i>Penicillium citrinum</i>	BSL-1/ IV группа	+	+	+	Не обнаружена
<i>Penicillium commune</i>	BSL-1/ IV группа	–	+	–	Не обнаружена
<i>Penicillium decumbens</i>	BSL-1/ IV группа	–	–	+	Не обнаружена
<i>Penicillium expansum</i>	BSL-1/ IV группа	–	+	–	Не обнаружена
<i>Penicillium spinulosum</i>	BSL-1/ IV группа	–	+	–	Не обнаружена
<i>Rhizopus arrhizus</i>	BSL-1/ IV группа	+	–	+	Гетероталличный вид; зигоспор не образует. <i>Rhizopus oryzae</i> (синоним)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	BSL-1/ –	–	–	+/- >50%	Не обнаружена
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	BSL-1/ –	+	–	+	Не обнаружена
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GRAS/ –	–	–	+/- >50%	Телеоморфный вид; образует почкующиеся клетки и аски с аскоспорами
<i>Saprochaete capitata</i>	BSL-2/ IV группа	–	–	+	<i>Magnusiomyces capitatus</i> (гетероталличная телеоморфа)
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	BSL-2/ IV группа	–	–	+	<i>Microascus brevicaulis</i> (гетероталличная телеоморфа; синоним)
<i>Talaromyces purpureogenus</i>	BSL-1/ IV группа	–	+	+	Не обнаружена. <i>Penicillium purpurogenum</i> (синоним)
<i>Talaromyces rugulosus</i>	BSL-1/ IV группа	–	+	–	Не обнаружена. <i>Penicillium rugulosum</i> (синоним)
<i>Trichoderma harzianum</i>	BSL-1/ IV группа	–	–	+/- 50%	<i>Hypocrea lixii</i> (гетероталличная телеоморфа)
<i>Trichoderma viride</i>	BSL-1/ IV группа	–	–	+/- <50%	<i>Hypocrea rufa</i> (гетероталличная телеоморфа)
<i>Ulocladium chartarum</i>	BSL-1/ IV группа	–	–	+/- 50%	Не обнаружена

Продолжение таблицы 29

Вид ¹	Патогенность ²	Аллергенность ³	Токсигенность ⁴	Рост при 37°C ⁵	Телеоморфа (Анаморфа) Синонимы ⁶
<i>Yarrowia lipolytica</i>	BSL-1/ IV группа	—	—	+	Телеоморфный вид; образует псевдо- и истинный мицелий и аски с аскоспорами (на гифах). <i>Candida lipolytica</i> (анаморфа)

Примечание: «+» – наличие у гриба данного свойства, «–» – отсутствие у гриба данного свойства, «+/-» – по данному свойству у штаммов гриба имеются различия

¹ – у видов грибов рода *Aspergillus* указана их секция в пределах рода (Sect.);

² – уровень патогенности (группа биологического риска BSL/ группа патогенности);

³ – число аллергенов (n);

⁴ – число микотоксинов (n);

⁵ – наличие роста *in vitro* у клинических штаммов при 37°C (собственные данные), (%);

⁶ – сведения по номенклатуре и характерные особенности роста *in vitro* (собственные и литературные данные)

На рисунке 30 показано наличие у выделенных от пациентов грибов патогенности, аллергенности и токсигенности. По уровню патогенности (биологического риска – по классификации патогенности ВОЗ) 67 видов классифицируют в группах: BSL-2 – 15 видов (22%; культуры *Cr. neoformans* в диплоидной фазе, образующие базидиоспоры, относят к группе повышенного риска BSL-3), BSL-1 – 51 вид (76%), GRAS – 1 вид (2%) [102, 258]. В III группу патогенности (опасности), аналогичную BSL-2 (принятая в России классификация патогенности) внесены 8 из 67 видов (12%); в IV группу патогенности, аналогичную BSL-1 – 52 вида (78%) [20].

Среди обнаруженных грибов широко представлены виды, обладающие аллергенными (21% видов содержат значимые микоаллергены) и токсигенными (34% видов вырабатывают микотоксины) свойствами (Таблица 29, Рисунок 30). Большинство из грибов, зарегистрированных как аллергенные (12 из 14 видов или 86%) [154] и все токсигенные микромицеты (23 вида) относятся к плесневым видам. Наличие, как аллергенности, так и токсигенности характерно для 8 плесневых видов: *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. versicolor*, *Cl. cladosporioides*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*. В группе регулярных возбудителей глубоких микозов BSL-2 способность к одновременному аллергенному и

токсическому воздействию была установлена у 2 из 15 видов (13%): *A. fumigatus* и *A. flavus* (2 основных возбудителя аспергиллеза).

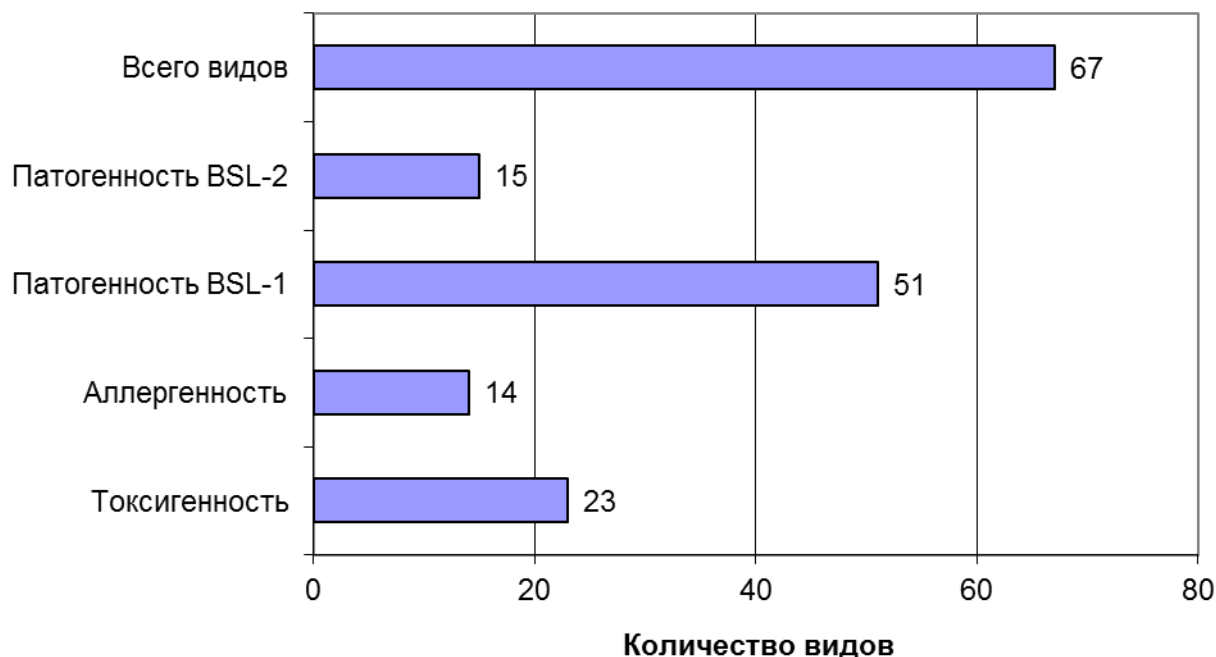


Рисунок 30 – Распространенность ряда негативных биологических свойств в группе выделенных видов грибов

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), виды с вариативным ростом штаммов (23 вида), виды с отсутствием роста у всех штаммов (7 видов) (Рисунок 31). В группу термотолерантных видов вошли 16 из 23 дрожжевых грибов (70%) и 21 из 44 мицелиальных грибов (48%). К активному развитию на питательных средах при 37°C были способны все клинические штаммы грибов уровня BSL-2 (15 видов). Как видно из данных таблицы 29, 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%). Следует отметить, что 4 из 7 видов, не растущих при 37°C, были описаны ранее в качестве возбудителей глубоких микозов (*A. restrictus*, *C. zeylanoides*, *P. commune*, *P. spinulosum*) [128, 258].



Рисунок 31 – Распределение выделенных видов грибов по способности клинических штаммов к росту *in vitro* при 37°C

Три вида мицелиальных грибов (7%) не были способны к росту на питательных средах также и при 35°C (*A. restrictus*, *P. expansum*, *P. spinulosum*). Наличие вариативного характера роста при 35°C (рост, ограниченный рост – отсутствие роста) обнаружено у штаммов грибов 7 видов (*A. glaucus*, *A. hollandicus*, *H. uvarum*, *M. hiemalis*, *P. chrysogenum*, *P. commune*, *Tal. rugulosus*).

В результате исследования термотолерантности было установлено, что виды болезнетворных грибов родов *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, *Talaromyces* отличаются по способности к росту в лабораторных условиях при 37°C (Таблица 29), а некоторые и при 35°C.

В таблице 30 обобщены данные по количеству и соотношению выявленных термотолерантных штаммов в различных группах болезнетворных грибов. Было обнаружено, что доля штаммов, способных к росту при 37°C, была выше у дрожжевых грибов по сравнению с мицелиальными грибами, а также у возбудителей распространенных оппортунистических микозов (аспергиллез, кандидоз, криптококкоз, зигомикоз) по сравнению с возбудителями более редких вариантов микозов (гиалогифомикоз, феогифомикоз, редкие дрожжевые инфекции). Общая доля штаммов, растущих при 37°C, превышала 93%.

Таблица 30 – Количество термотолерантных клинических штаммов грибов различных групп, 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 (с бесполом конидиальным спороношением или вегетативным почкованием) относят 55 выделенных видов *Ascomycota* и 5 видов *Basidiomycota* (всего 60 видов – 90%); к группе совершенных грибов – 4 телеоморфных вида *Ascomycota* и 3 вида *Zygomycota* (всего 7 видов – 10%). Половая стадия (телеоморфа – как правило, непатогенная форма) была обнаружена, к настоящему времени, у 22 из 60 несовершенных грибов (37%). У 8 из 22 видов (36%) обнаружены гомоталлические телеоморфы (половые стадии способны образовываться в культуре без предварительного скрещивания двух совместимых штаммов), у 14 видов (64%) – гетероталлические (раздельнополые) телеоморфы. Группа строго бесполой грибов без телеоморфной стадии включает 38 видов (57%). Собственные видовые названия известных телеоморф приведены в таблице 29.

Формировать половые структуры размножения *in vitro* способны 13 из 67 видов (как анаморфные, так и телеоморфные *Ascomycota* или *Basidiomycota*): 5 мицелиальных (*A. flavipes*, *A. glaucus*, *A. hollandicus*, *A. nidulans*, *Ch. globosum*) и 8

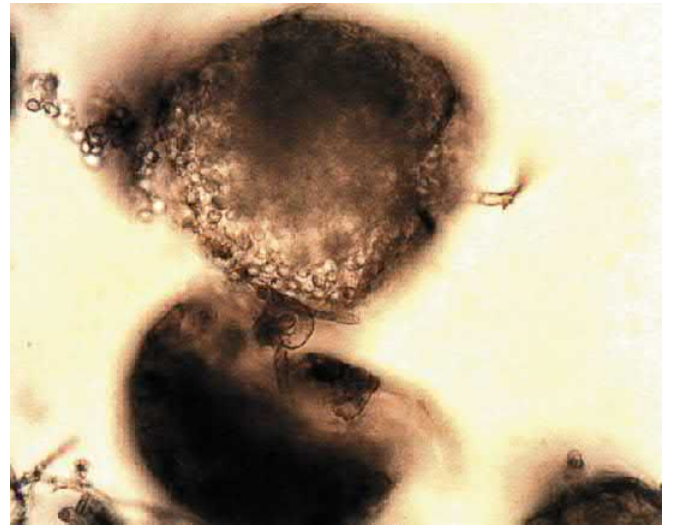
дрожжевых (*C. famata*, *C. kefir*, *C. krusei*, *C. norvegensis*, *Cr. neoformans* – штаммы в диплоидной фазе, *H. uvarum*, *Sacch. cerevisiae*, *Y. lipolytica*) [12, 128, 258].

Обнаружение половых структур (клеистотеции, перитеции) в культуре имеет значение диагностического признака при идентификации 4 видов мицелиальных грибов: 3 гифомицетов *A. glaucus*, *A. hollandicus*, *A. nidulans* и совершенного гриба *Ch. globosum*. Как было установлено, клеистотеции определенного строения (вместе с конидиогенными структурами) формировались *in vitro* у всех штаммов *A. glaucus* (Рисунок 32) и *A. hollandicus* (Рисунок 33), а также у 12 из 39 штаммов (31%) *A. nidulans* (Рисунок 34). Выделенный (из БАЛ) единственный штамм *Ch. globosum* формировал характерные перитеции с аскоспорами (Рисунок 35). На обнаружении специфичных для *Ch. globosum* плодовых тел полностью построена идентификация данного возбудителя [128, 258]. Вероятность формирования штаммами *A. flavipes* телеоморфной стадии крайне мала. Проведенные нами с использованием расширенного набора стандартных питательных сред (агар Чапека с дрожжевым экстрактом (CYA), агар Чапека с дрожжевым экстрактом и 20% сахарозы (CY20S), мальц-экстракт агар (MEA), агар Чапека–Докса (CZ)) и двух температурных режимов (25°C и 37°C) [281] сравнительные исследования морфологии 13 клинических (ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ») и 3 референтных (ВКМ) штаммов *A. flavipes* (Таблица 1) выявили их значительное сходство, включая отсутствие у всех штаммов *in vitro* половой стадии.

Специфичную для части анаморфных и телеоморфных аскомицетовых дрожжей способность формировать в культуре аскоспоры, обычно, не исследуют как признак при идентификации штаммов возбудителей. Это связано с быстрым разрушением оболочки асков (*C. kefir*, *C. norvegensis*, *Y. lipolytica*), сложностью обнаружения при микроскопии асков с аскоспорами и их дифференциации с одиночными и почкующимися дрожжевыми клетками (*C. famata*) и бластоконидиями (*Y. lipolytica*). Было установлено, что у клинических штаммов *Sacch. cerevisiae* наряду с дрожжевыми клетками регулярно формируются аски с 1-4 округлыми гладкими аскоспорами (Рисунок 36).



А



Б

Рисунок 32 – Микроморфология двух штаммов (выделены из мокроты, бронхиального секрета) *Aspergillus glaucus* (L.) Link (*Eurotium herbariorum* (F.H. Wigg.) Link), x400 (нативный препарат)
Примечание: А) Клейстотеции и конидиеносец с фиалидами; Б) Клейстотеции с разрушенными оболочками и аскоспоры

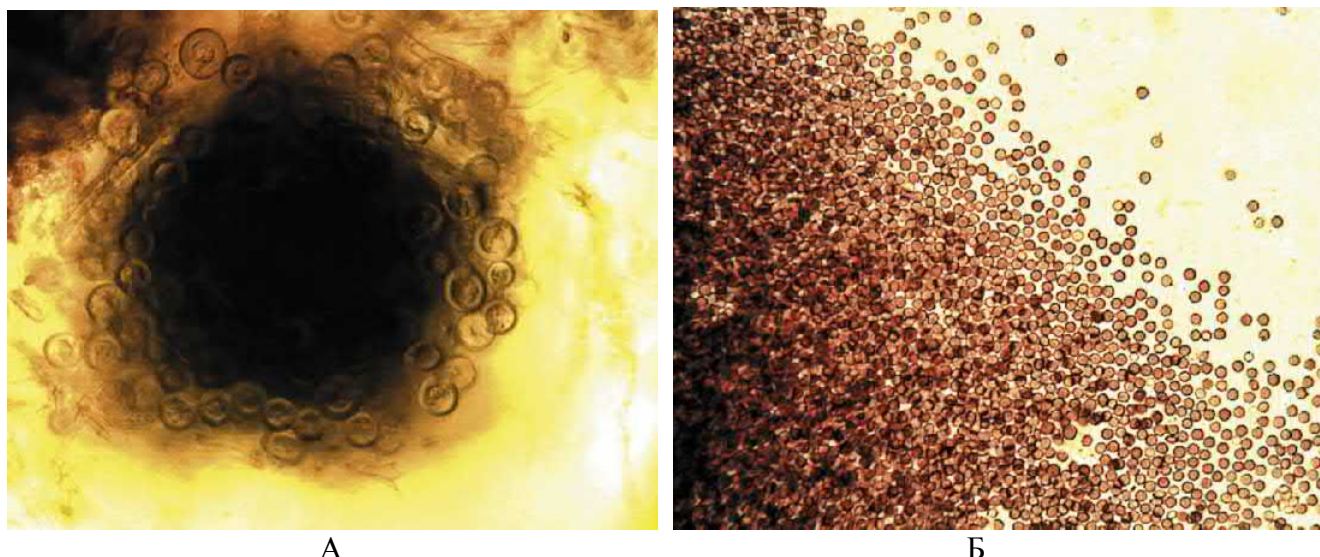


А



Б

Рисунок 33 – Микроморфология двух штаммов (выделены из бронхиального секрета, мокроты) *Aspergillus hollandicus* Samson et W. Gams (*Eurotium amstelodami* L. Mangin), x400 и x1000 (нативный препарат)
Примечание: А) Клейстотеции с сумками и конидиеносец с фиалидами, x400; Б) Клейстотеций с сумками и аскоспоры в сумке, x1000

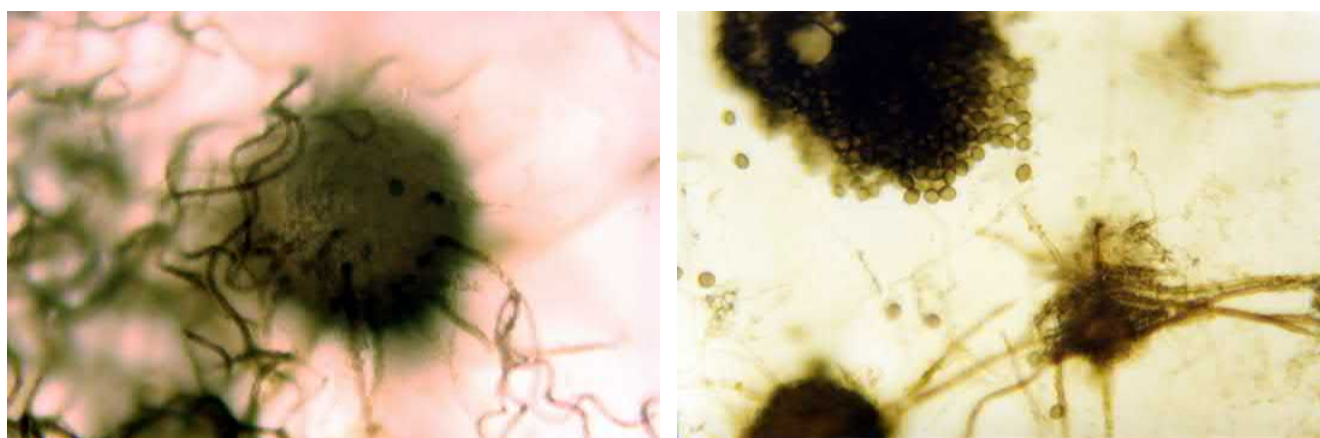


А

Б

Рисунок 34 – Микроморфология двух штаммов (выделены из полости эмпиемы, бронхиального секрета) *Aspergillus nidulans* (Eidam) G. Winter (*Emericella nidulans* (Eidam) Vuill.), x400 (нативный препарат)

Примечание: А) Клейстотеций и покровные клетки; Б) Аскоспоры



А

Б

Рисунок 35 – Микроморфология выделенного из бронхиального смыва больного инфильтративным туберкулезом штамма *Chaetomium globosum* Kunze, x400 (нативный препарат)

Примечание: А) Перитеций с искривленными щетинками; Б) Аскоспоры с разрушенным перитецием

Формирование половых базидиоспор характерно для базидиомицетовых дрожжей *Cr. neoformans*, но только для штаммов в диплоидной фазе, в которой возбудитель обычно не выделяется (гаплоидная фаза *Cr. neoformans* представлена исключительно почкующимися клетками). Предположительно, основными инфекционными зачатками криптококкоза являются не обезвоженные клетки *Cr. neoformans* (в норме у *Cr. neoformans* образуются крупные клетки, покрытые капсулой 3,5-7,5(10) мкм [258]), а меньшие в диаметре половые базидиоспоры 1-3 мкм [44, 142]. Очевидно, что образование плесневой телеоморфы *in vitro* в

культуре представляет серьезный риск инфицирования грибом персонала лаборатории при вдыхании мелких базидиоспор. Выделенные от больных туберкулезом 15 штаммов *Cr. neoformans* оставались в анаморфной дрожжевой стадии (Рисунок 21) на протяжении работы с ними (до 10 суток).

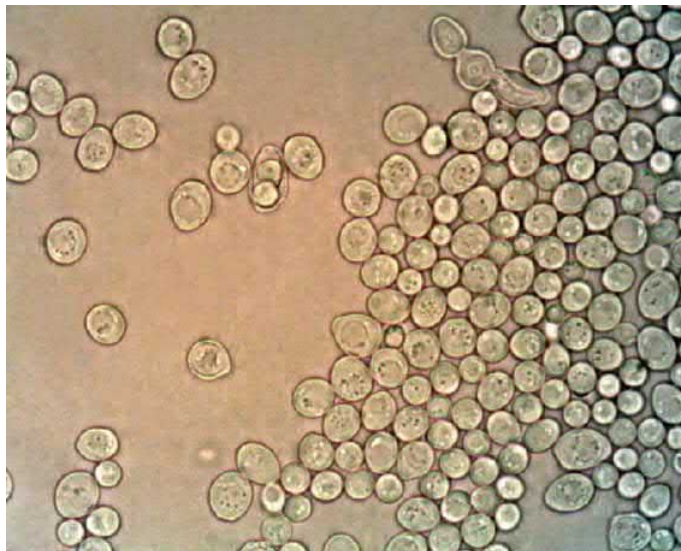


Рисунок 36 – Микроморфология выделенного из бронхиального смыва больного диссеминированным туберкулезом с ВИЧ-инфекцией штамма *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex Hansen, x1000 (нативный препарат, 12 суток)

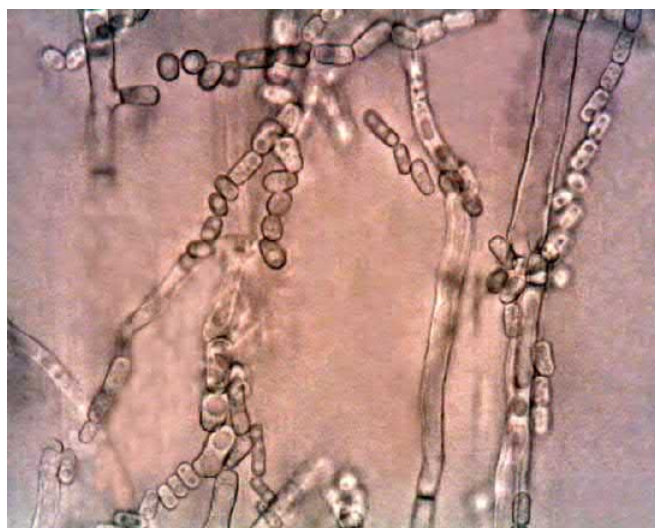
Примечание: Дрожжевые клетки (одиночные и почкующиеся) и аск с двумя аскоспорами (в центральной части)

При выделении из биоматериала штаммов дрожжевых грибов необходимо и крайне важно исследовать их морфологию одновременно с изучением биохимических и физиологических характеристик. Выявление клеточной морфологии (при микроскопии) и признаков колоний позволяет быстро дифференцировать дрожжевые возбудители на группы (Рисунок 28), избегая случайных ошибок при их идентификации: дрожжевые грибы, образующие почкующиеся клетки (Рисунки 36, 37); дрожжеподобные грибы, формирующие артроспоры (Рисунки 16, 38, 39); красные базидиомицетовые дрожжевые грибы, синтезирующие каротиноиды (Рисунок 40). За исключением *S. famata* и *S. glabrata*, обнаруженные возбудители кандидоза (12 видов – 86%) формировали на питательных средах псевдомицелиальные структуры различной морфологии с бластоспорами или без них (Рисунок 41); грибы *C. albicans* образовывали также и настоящие гифы с септами (Рисунок 42). Для 3 грибов рода *Cryptococcus*

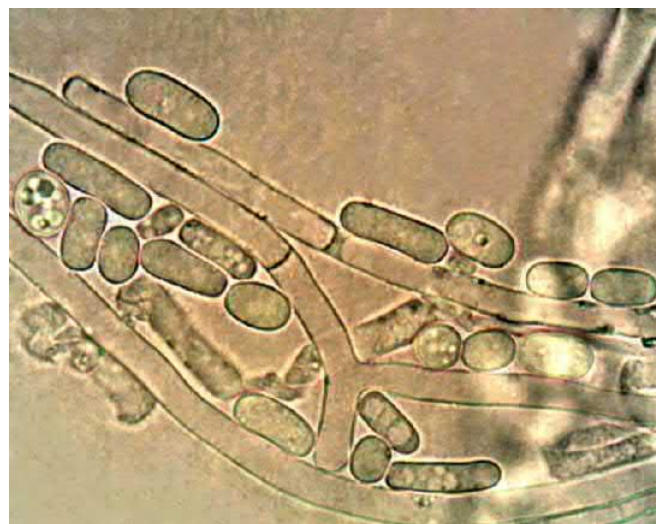
специфично образование капсулы (главный диагностический признак), отчетливо различимой в тушевых препаратах (Рисунок 43).



Рисунок 37 – Микроморфология выделенного из мокроты больного инфильтративным туберкулезом штамма *Candida krusei* (Castell.) Berkhout, x1000 (нативный препарат)
Примечание: Дрожжевые клетки



А



Б

Рисунок 38 – Микроморфология выделенного из туберкулемы штамма *Geotrichum candidum* Link:Fr., x400 и x1000 (нативный препарат)
Примечание: А) Артроконидии и гифы мицелия, x400; Б) Одноклеточные артроконидии и гифы мицелия, x1000

Все обнаруженные плесневые микромицеты (44 вида: 40 аскомицетовых гифомицетов, 1 совершенный вид *Ascomycota*, 3 вида *Zygomycota*) хорошо или удовлетворительно развивались на стандартных питательных средах – агаре Чапека–Докса и картофельно-декстрозный агаре. Морфокультуральные признаки клинических штаммов отдельных возбудителей обладали достаточным сходством и в целом соответствовали описаниям, приведенным в специализированных

медицинских атласах-определителях [128, 258]. Для надежной идентификации плесневых возбудителей микозов по имеющимся атласам-определителям следует анализировать всю совокупность характерных культуральных и микроморфологических признаков, так как у клинических штаммов грибов наблюдается вариабельность части диагностических признаков: вида колоний; строения репродуктивных или вегетативных структур; образования характерных вегетативных клеточных структур (хламидоспоры, склероции и др.). Наиболее вариабельный и нестабильный признак – морфология колоний, имеющий при идентификации культур грибов вспомогательное значение.

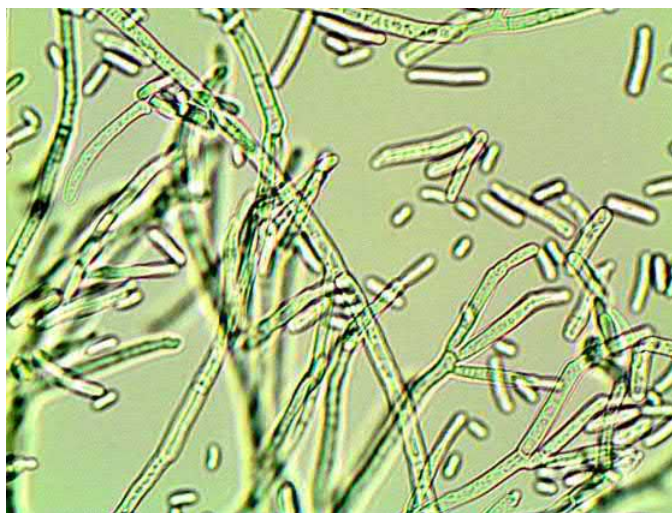
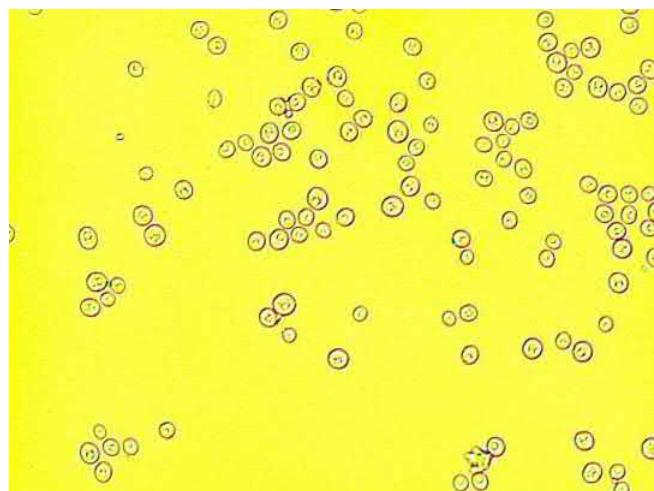


Рисунок 39 – Микроморфология выделенного из мокроты больного инфильтративным туберкулезом штамма *Saprochaete capitata* (Diddens & Lodder) de Hoog & M.T. Sm., x400 (нативный препарат)

Примечание: Конидии (артроконидии и антелоконидии) и гифы мицелия



А



Б

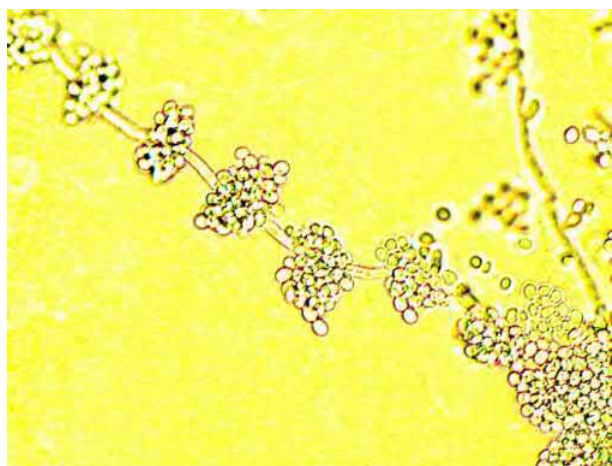
Рисунок 40 – Рост колоний (колонии оранжевого цвета) и микроморфология выделенного из мокроты больного туберкулезом внутригрудных лимфатических узлов штамма *Rhodotorula mucilaginosa* (A. Jörg.) F.C. Harrison, x400 (нативный препарат)

Примечание: А) Контрольная чашка с агаром Сабуро (3 суток); Б) Дрожжевые клетки, x400

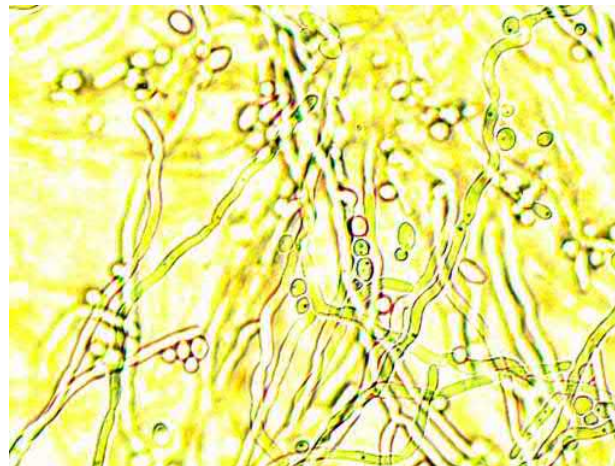


Рисунок 41 – Микроморфология выделенного из крови больного диссеминированным туберкулезом штамма *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron & Talice, x400 (нативный препарат)

Примечание: Псевдогифы с бластоспорами (агар Чапека–Докса, 11 суток)



А



Б

Рисунок 42 – Микроморфология двух штаммов (выделены из мокроты) *Candida albicans* (Robin) Berkhout, x400 (нативный препарат)

Примечание: А) Гифы с характерными пучками бластоспор (агар Чапека–Докса, 11 суток); Б) Настоящие гифы и почкующиеся дрожжевые клетки (агар Чапека–Докса, 7 суток)



А



Б

Рисунок 43 – Капсулы двух видов возбудителей криптококкоза, x1000 (тушевой препарат)

Примечание: А) Штамм *Cryptococcus albidos* (Saito) Skinner из мокроты больного туберкулезом; Б) Штамм *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuill. из мокроты больного туберкулезом

Основные дифференцирующие признаки при идентификации гифомицетов на уровнях рода и вида – морфология конидий и конидиеносных структур, выявляемые при микроскопии (Рисунки 44, 45, 46, 47).



Рисунок 44 – Микроморфология выделенного из мокроты больного инфильтративным туберкулезом штамма *Acremonium kiliense* Grütz, x400 (нативный препарат)
Примечание: Конидии, собранные в головки и гифы мицелия



А



Б

Рисунок 45 – Микроморфология двух штаммов (выделены из бронхиального смыва) *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., x400 и x1000 (нативный препарат)

Примечание: А) Цепочки темноокрашенных конидий и гифы мицелия, x400; Б) Муральная септированная шероховатая конидия с апикальным носиком, x1000

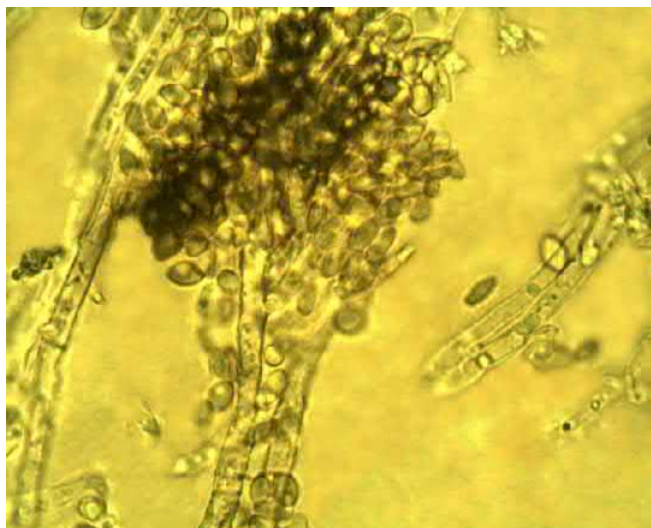
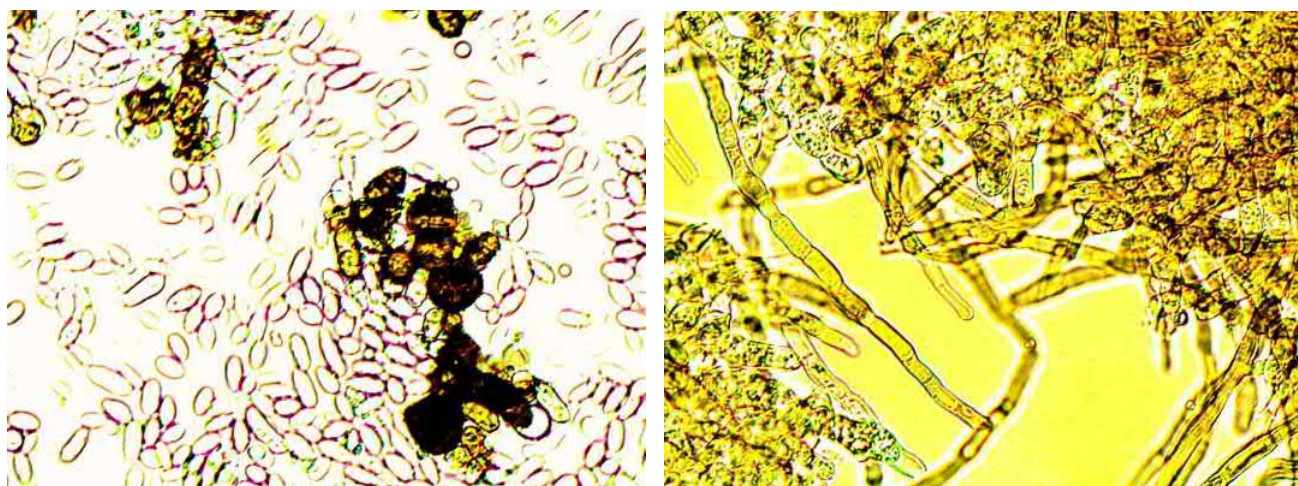


Рисунок 46 – Микроморфология выделенного из бронхиального смыва больного инфильтративным туберкулезом штамма *Paecilomyces variotii* Bain., x1000 (нативный препарат)
Примечание: Конидиеносец, конидии



Рисунок 47 – Микроморфология выделенного из плевральной полости больного туберкулезом штамма *Ulocladium chartarum* (Preuss) Simmons, x1000 (нативный препарат)
Примечание: Септированные темноокрашенные конидии и гифы мицелия

У штаммов 7 видов гифомицетов формировались терминальные или интеркалярные, одиночные, в парах, цепочках или сгруппированные вегетативные хламидоспоры (толстостенные клетки вегетативного размножения): *Aur. pullulans* (Рисунки 18, 48), *F. chlamydosporum* (Рисунок 49А), *F. dimerum* (Рисунок 49Б), *F. oxysporum*, *Paec. variotii*, *Tr. harzianum*, *Tr. viride* (Рисунок 50).

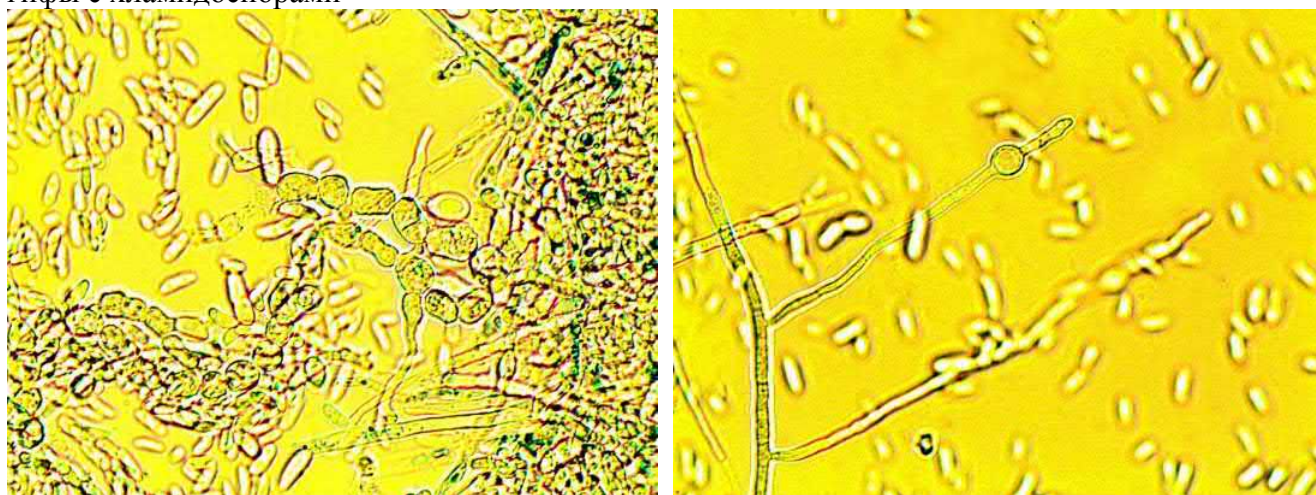


А

Б

Рисунок 48 – Микроморфология двух штаммов (выделены из мокроты) *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arn., x400 (нативный препарат)

Примечание: А) Бесцветные конидии и темноокрашенные хламидоспоры; Б) Темноокрашенные гифы с хламидоспорами



А

Б

Рисунок 49 – Хламидоспоры двух видов возбудителей фузариоза, x400 (нативный препарат)

Примечание: А) Хламидоспоры и микроконидии выделенного из БАЛ штамма *Fusarium chlamydosporum* Wollenw. & Reinking; Б) Интеркалярная хламидоспора выделенного из плевральной полости штамма *Fusarium dimerum* Penzig

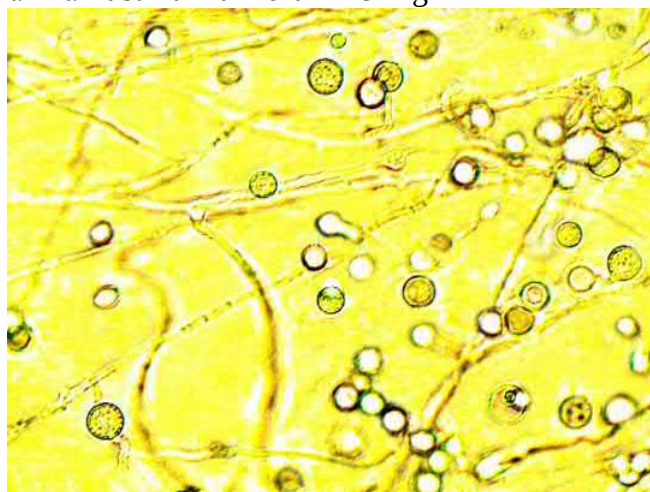


Рисунок 50 – Микроморфология выделенного из БАЛ больного диссеминированным туберкулезом штамма *Trichoderma viride* Pers., x400 (нативный препарат)

Примечание: Хламидоспоры

У клинических штаммов представителя группы «черных дрожжей» гриба *Aureobasidium pullulans* варьировало соотношение светлоокрашенных и темноокрашенных клеток и клеточных структур (Рисунок 48), что приводило к формированию колоний, заметно различающихся по внешнему виду.

Обнаруженные 3 вида гетероталлических зигомицетов (*M. circinelloides*, *M. hiemalis*, *Rhiz. arrhizus*) не образуют зигоспоры в культуре. Их идентификация была построена на распознавании бесполой репродуктивной структуры, которые штаммы грибов легко формировали в лабораторных условиях: многоспоровых спорангиев с эндогенными спорангиоспорами и спорангиеносцев (Рисунки 51, 52). При микроскопии отмечали: форму и размер спорангиев; наличие и форму колонки (стерильная часть спорангия – верхушка спорангиеносца, вдающаяся внутрь спорангия); наличие апофизы (расширение спорангиеносца под спорангием); наличие воротничка у основания колонки (остатки стенки спорангия после его разрушения); наличие ветвления спорангиеносцев; наличие столонов и ризоидов (специализированные гифы роста и прикрепления спорангиеносцев к субстрату – характерны для *Rhiz. arrhizus*); форму и размер спорангиоспор. У гриба *M. circinelloides* была подтверждена характерная способность к гифальному диморфизму – росту в виде дрожжеподобных почкующихся клеток; клинический штамм *M. circinelloides* образовывал дрожжевые клетки *in vitro* в стандартных условиях при длительном культивировании (Рисунок 52).

Проведено специальное скрининговое исследование фенотипических характеристик (морфологических и физиологических особенностей, чувствительности *in vitro* к лекарственным препаратам) клинических штаммов 14 видов грибов рода *Aspergillus*, способных вызывать поражения бронхолегочной системы у больных туберкулезом. Методология исследования включала выделение штаммов из первичного посева в чистой культуре на среде Чапека–Докса; видовую идентификацию; дальнейшее культивирование штаммов на средах агар Чапека–Докса и картофельно-декстрозном агаре при 30, 35, 37, 40, 45°C (от 7 до 21 суток); сравнительное изучение свойств и характеристик штаммов, с целью сбора максимально возможного объема данных по морфологии

и физиологии возбудителей. Таким образом, появилась уникальная возможность сравнить морфологические и физиологические свойства более 700 клинических штаммов *Aspergillus* spp. (Таблица 26) с типовыми штаммами.



Рисунок 51 – Микроморфология выделенного из бронхиального смыва больного диссеминированным туберкулезом штамма *Rhizopus arrhizus* Fischer, x400 (нативный препарат)
Примечание: Спорангиеносец с колонкой, апофизой и характерными лимоновидными спорангиоспорами

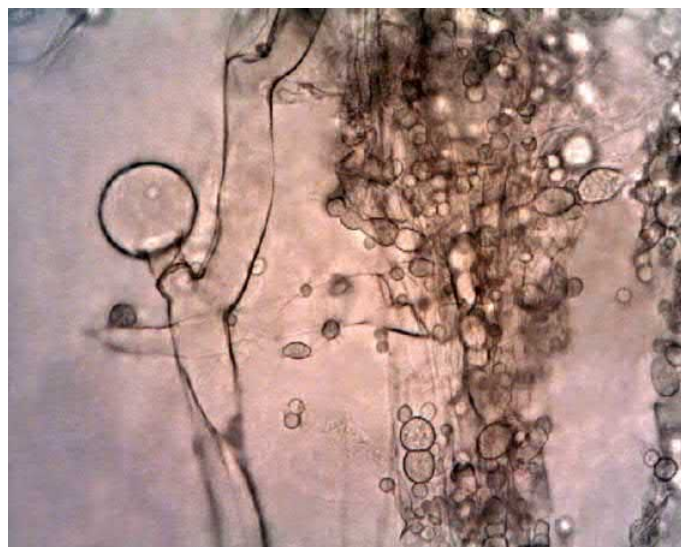


Рисунок 52 – Микроморфология выделенного из БАЛ больного цирротическим туберкулезом штамма *Mucor circinelloides* v. Tiegh., x400 (нативный препарат, 50 суток)
Примечание: Дрожжевые клетки (дрожжевая форма); короткий спорангиеносец со сферической колонкой (мицелиальная форма)

Морфологические описания всех выделенных штаммов *Aspergillus* spp. проводили по разработанной автором схеме (Приложение 1) и заносили в электронную базу данных. На основании обобщенных сведений по морфологии

клинических штаммов составлена сводная таблица, где отражены характерные отличительные признаки 14 видов возбудителей аспергиллеза (Приложение 2).

Было установлено, что наличие у клинических штаммов *A. flavipes*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. glaucus*, *A. hollandicus* (*E. amstelodami*), *A. nidulans*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. oryzae*, *A. restrictus*, *A. sydowii*, *A. terreus*, *A. ustus*, *A. versicolor* комплекса характерных микроморфологических и макроскопических признаков позволяет достоверно выявлять данные 14 видов болезнетворных грибов и дифференцировать их в пределах рода *Aspergillus*.

Для клинических штаммов исследованных возбудителей аспергиллеза была характерна определенная вариативность макроскопических признаков: цвета колоний, структуры поверхности, наличия экссудата, пигмента, окраски реверзума.

Вариабельность диагностических микроморфологических признаков конидиогенных структур, усложняющая идентификацию, была обнаружена у клинических штаммов 7 из 14 видов *Aspergillus* (50%): *A. flavipes* (Рисунок 53), *A. flavus* (Рисунок 54), *A. fumigatus* (Рисунок 55), *A. glaucus* (Рисунок 56), *A. oryzae*, *A. restrictus*, *A. versicolor*. При микроскопии у части штаммов данных видов наряду с типичными по морфологии спороносными структурами обнаруживались нетипичные или реже встречаемые конидиеносцы: пролиферирующие, разветвленные, укороченные, с редуцированными конидиогенными структурами. У группы атипичных штаммов главного возбудителя аспергиллеза *A. fumigatus* (всего менее 10% штаммов от общего числа) различия наблюдались и на макроскопическом уровне – в результате формирования непигментированных конидий или полной утрате способности к конидиогенезу, а также образования зон стерильного воздушного мицелия (Рисунок 57). Атипичные штаммы *A. fumigatus* регулярно и в значительном количестве образовывали нетипичные конидиеносцы: пролиферирующие (Рисунок 55Б) и/или дихотомически разветвленные, а также укороченные (не превышающие 100 мкм). Было обнаружено, что стерильные и скудно формирующие конидии

непигментированные штаммы *A. fumigatus* выделяются от пациентов, как правило, после проведения лекарственной терапии антимикотиками.

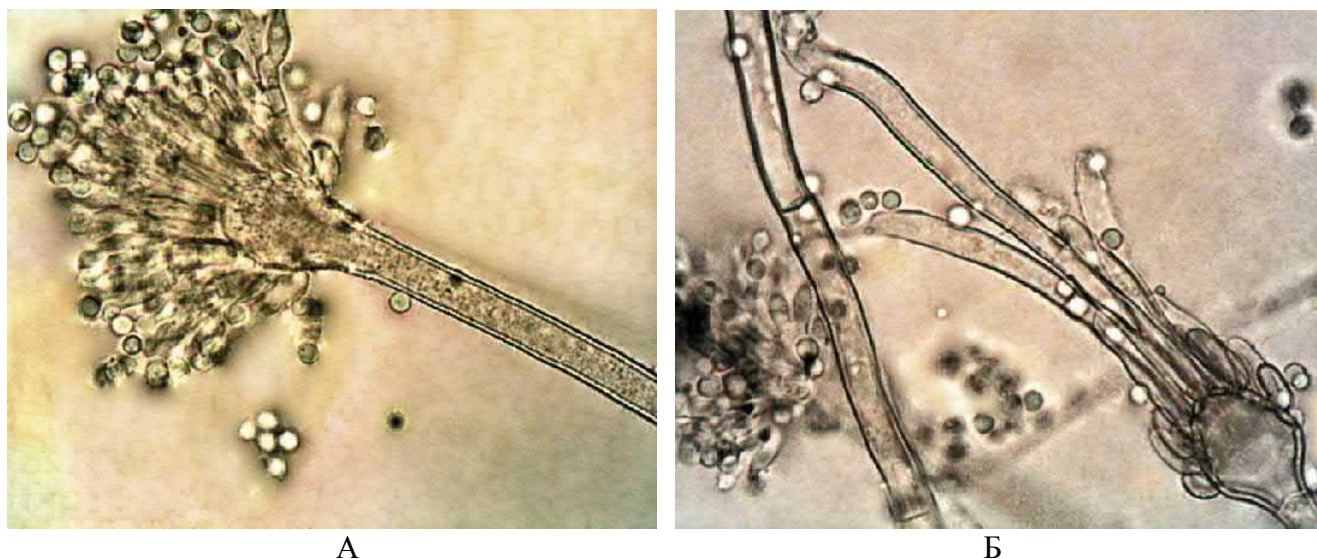


Рисунок 53 – Микроморфология двух штаммов (выделены из бронхиального смыва) *Aspergillus flavipes* (Bainier et R. Sartory) Thom et Church, x1000 (нативный препарат)

Примечание: А) Типичный конидиеносец с двухъярусными конидиогенными структурами; Б) Нетипичный пролиферирующий конидиеносец

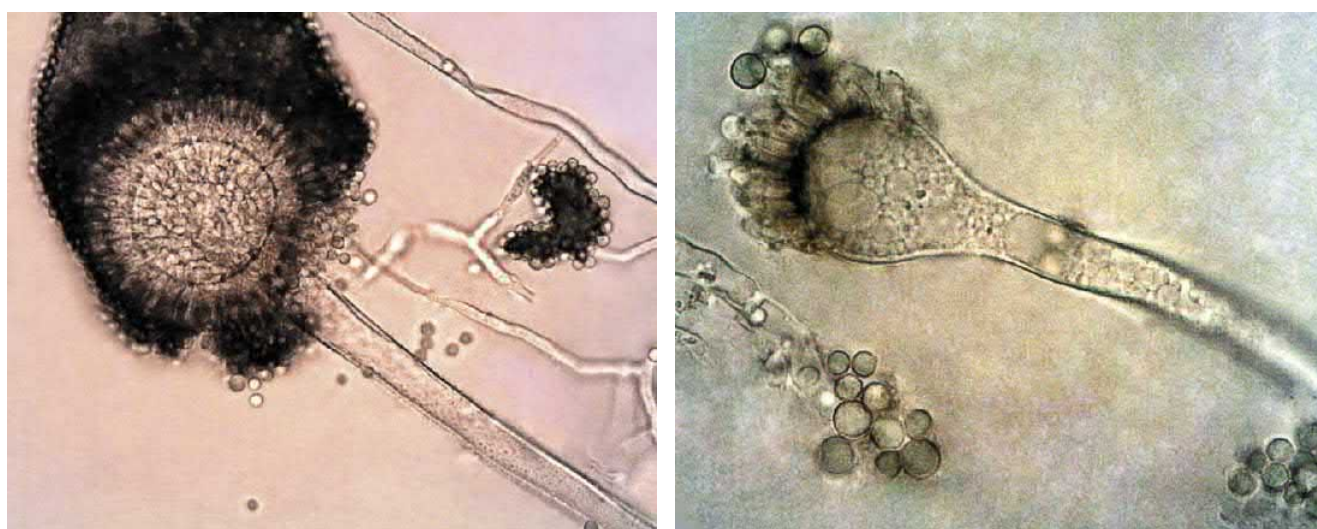
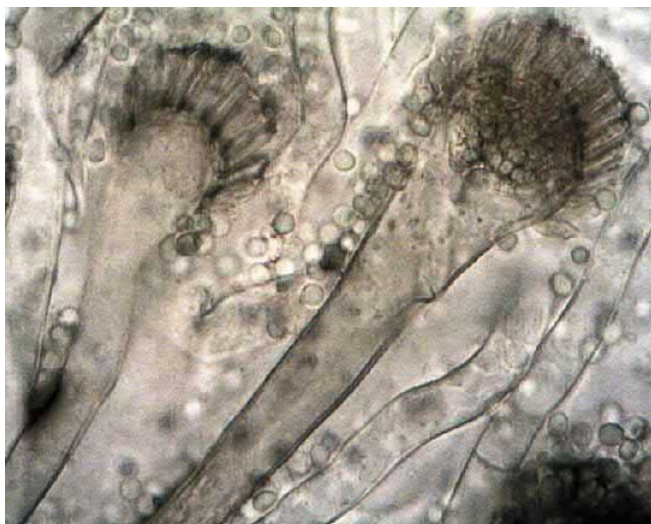
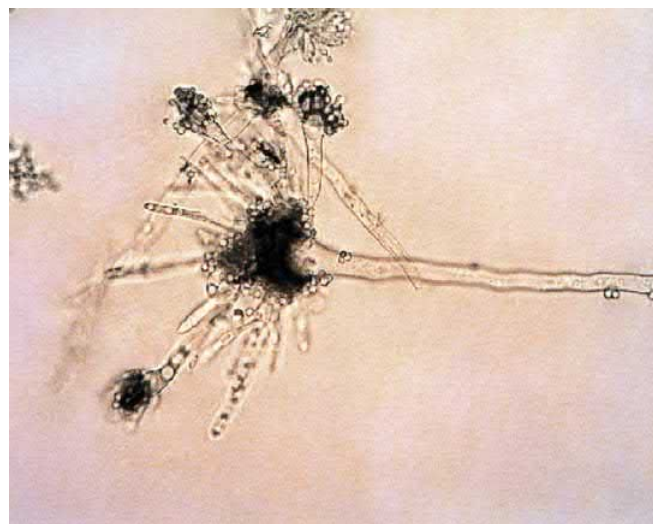


Рисунок 54 – Микроморфология двух штаммов (выделены из бронхиального смыва, бронхиального секрета) *Aspergillus flavus* Link, x400 и x1000 (нативный препарат)

Примечание: А) Типичный конидиеносец с двухъярусными конидиогенными структурами, x400; Б) Реже встречающийся конидиеносец с одноярусными конидиогенными структурами и гладкие конидии, x1000



А



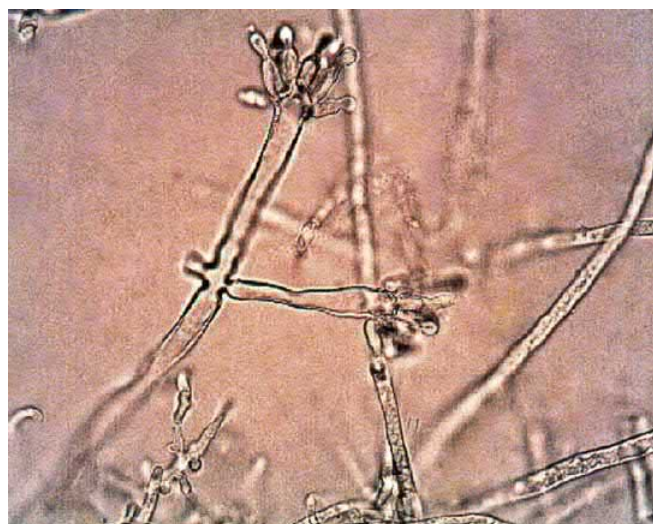
Б

Рисунок 55 – Микроморфология двух штаммов (выделены из бронхиального секрета, кисты легкого) *Aspergillus fumigatus* Fresen., x1000 и x400 (нативный препарат)

Примечание: А) Типичный конидиеносец с одноярусными конидиогенными структурами и конидии, x1000; Б) Нетипичный пролиферирующий конидиеносец, x400



А



Б

Рисунок 56 – Микроморфология двух штаммов (выделены из мокроты, бронхиального секрета) *Aspergillus glaucus* (L.) Link, x400 (нативный препарат)

Примечание: А) Типичные конидиеносцы с одноярусными конидиогенными структурами, опорная клетка конидиеносца; Б) Нетипичный разветвленный конидиеносец с фиалидами и образующимися конидиями



А



Б

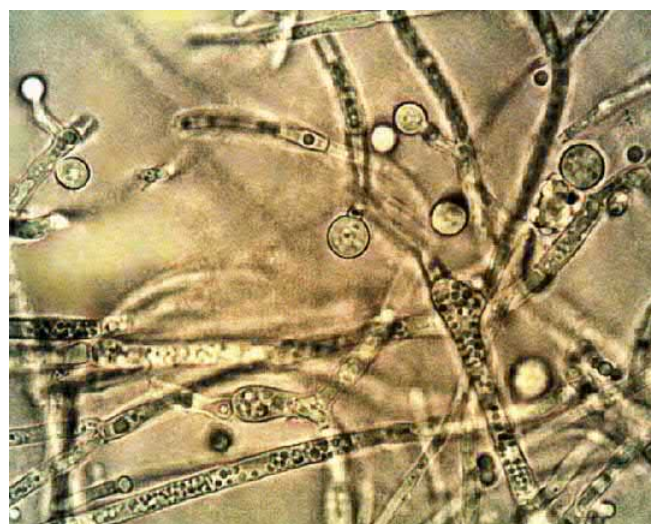
Рисунок 57 – Рост множественных колоний *Aspergillus fumigatus* из содержимого плевральной полости и легочной каверны (агар Чапека-Докса, 30⁰С)

Примечание: А) Типичные дымчатые серовато-зеленые бархатистые колонии (9 суток); Б) Нетипичные белые пушистые колонии (7 суток)

Несмотря на выявленные отличия макроскопических признаков, клинические штаммы грибов *A. hollandicus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. sydowii*, *A. terreus* (Рисунок 58А), *A. ustus* строго образовывали типичные конидиеносцы с характерными конидиальными головками (верхушечная часть конидиеносца) и конидиями. Для штаммов одного из основных возбудителей аспергиллеза гриба *A. terreus* специфично регулярное формирование алейроспор на вегетативных, погруженных в субстрат гифах (Рисунок 58Б).



А



Б

Рисунок 58 – Микроморфология выделенного из каверны больного фиброзно-кавернозным туберкулезом штамма *Aspergillus terreus* Thom, x1000 (нативный препарат)

Примечание: А) Типичный конидиеносец с двухъярусными конидиогенными структурами; Б) Алейроспоры (характерные вегетативные структуры)

Для идентификации возбудителей аспергиллеза необходимо использовать стандартную справочную среду агар Чапека–Докса и два температурных режима 30°C и 37°C. Как основные, так и более редкие клинически значимые грибы рода *Aspergillus* формировали на данной среде колонии с типичным ростом, что давало возможность проводить их достоверную идентификацию по атласам-определителям [128, 258]. Важным дополнительным дифференцирующим признаком для видов *Aspergillus* является наличие или отсутствие роста гриба при температуре 37°C [258].

При практической 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 гифомицетов и зигомицетов.

3.1.2 Спектр вероятных возбудителей пневмомикозов у больных туберкулезом

При диагностике вторичных пневмомикозов из респираторного и хирургического материалов было выделено 67 видов оппортунистических 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%) (Рисунок 59). Наибольшим числом видов были представлены возбудители гиалогифомикоза, превышая число обнаруженных возбудителей аспергиллеза и кандидоза, а наименьшим – возбудители криптококкоза и зигомикоза. Число мицелиальных микромицетов (44 вида) в 1,9 раз превышало число дрожжевых (23 вида). К грибам *Ascomycota* относились 59 видов (88%), к *Basidiomycota* – 5 видов (7,5%), к *Zygomycota* – 3 вида (4,5%).

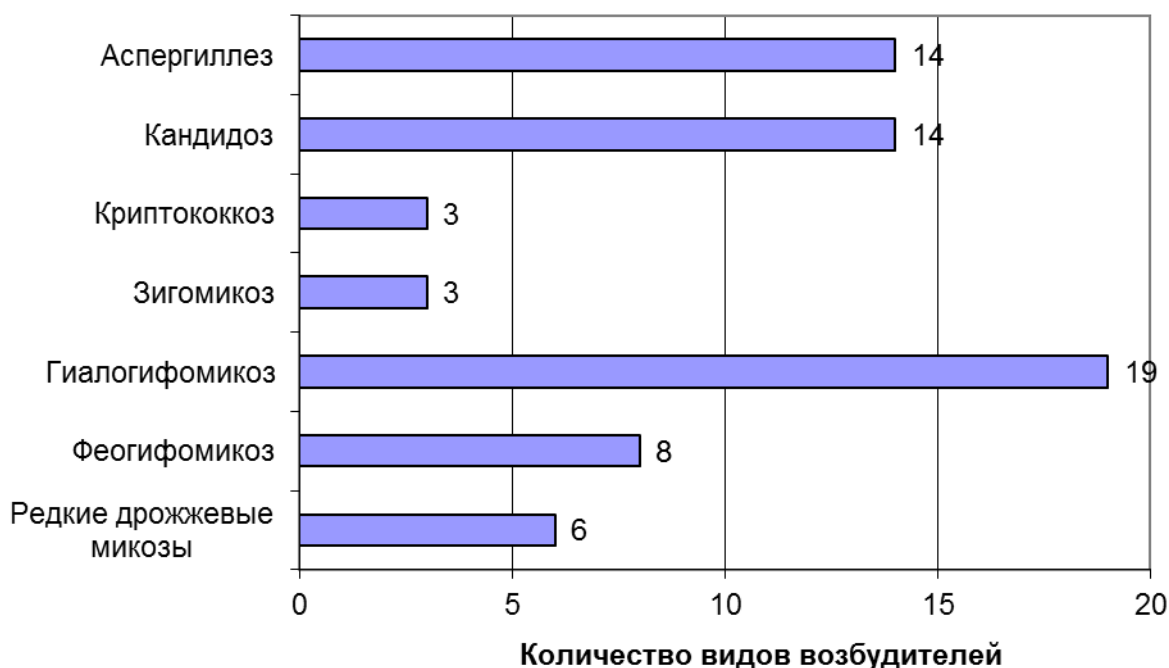


Рисунок 59 – Число видов возбудителей различных форм микотических заболеваний, выделенных при диагностике пневмомикозов

Грибы были выделены у 2903 из 7657 пациентов, обследованных на пневмомикоз (37,9% ДИ 36,8-39,0%). В таблице 31 указано 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, а также общее число пациентов (графа таблицы «Всего пациентов»), у которых грибок был обнаружен. У ряда больных грибы одного вида были выявлены как в респираторном, так и в хирургическом материале: *A. fumigatus* (10 пациентов), *Aur. pullulans* (1), *C. albicans* (6), *C. glabrata* (2), *C. kefyr* (1), *C. krusei* (1), *C. parapsilosis* (3), *C. tropicalis* (1), *Curv. hawaiiensis* (1), *P. chrysogenum* (1). В конце таблицы (строка таблицы «Общее количество пациентов») приведены сведения по общему количеству инфицированных грибами (от 1 до 5 видов) и обследованных пациентов (результаты исследования отдельного биоматериала и всех биоматериалов на пневмомикоз).

Как видно из данных таблицы 31, грибок *A. fumigatus* был выделен из всех четырех видов биоматериала. В отличие от других микромицетов, *A. fumigatus* был обнаружен в биоптате бронхов (у 2 из 17 исследованных больных).

Таблица 31 – Число случаев и частота обнаружения оппортунистических грибов, выделенных при диагностике пневмомикозов

Вид	Биоматериал (случаи обнаружения грибов)								Всего пациентов	
	Респ-й материал		Бронх. биоптат		Легочные 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	5,0	—	—	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
<i>Fusarium chlamydosporum</i>	3	0,04	—	—	—	—	—	—	3	0,04
<i>F. dimerum</i>	2	0,03	—	—	—	—	1	0,2	3	0,04

Продолжение таблицы 31

Вид		Биоматериал (случаи обнаружения грибов)								Всего пациентов	
		Респ-й материал		Бронх. биоптат		Легочные полости		Плеврал. полости			
		п	%	п	%	п	%	п	%	п	%
<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. mucilaginis</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 общего числа обследованных пациентов; Общее количество пациентов, (n): ИГ – количество инфицированных грибами (от 1 до 5 видов), Об – количество обследованных

Всего 19 из 67 видов грибов (28%) были обнаружены в респираторном материале, содержимом легочных и плевральных полостей: 6 возбудителей аспергиллеза (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. restrictus*, *A. terreus*, *A. versicolor*), 4 возбудителя кандидоза (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. tropicalis*), 1 возбудитель криптококкоза (*Cr. neoformans*), 5 возбудителей гиалогифомикоза (*Acr. strictum*, *F. oxysporum*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *T. purpureogenus*), 2 возбудителя феогифомикоза (*Alt. alternata*, *Aur. pullulans*), 1 возбудитель редких дрожжевых микозов (*G. candidum*).

Выделенные 67 возбудителей микозов были разделены на три группы по частоте обнаружения у больных туберкулезом при диагностике пневмомикозов (Таблица 31). К группе часто встречаемых возбудителей были отнесены виды с частотой обнаружения у пациентов $>1\%$. К группе среднераспространенных возбудителей отнесены виды с частотой обнаружения от 0,2% до 1%. К группе редко встречаемых возбудителей отнесены виды с частотой обнаружения $\leq 0,1\%$.

В группу часто встречаемых возбудителей (7 видов – 11%; частота обнаружения от 1,4% до 26,2%) вошли 2 возбудителя аспергиллеза (*A. fumigatus*, *A. niger*; 14%), 5 возбудителей кандидоза (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. tropicalis*; 36%).

В группу среднераспространенных возбудителей (31 вид – 46%; частота обнаружения от 0,2% до 0,9%) вошли 11 возбудителей аспергиллеза (*A. flavipes*, *A. flavus*, *A. glaucus*, *A. hollandicus*, *A. nidulans*, *A. ochraceus*, *A. restrictus*, *A. sydowii*, *A. terreus*, *A. ustus*, *A. versicolor*; 79%), 7 возбудителей кандидоза (*C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. norvegensis*, *C. parapsilosis*, *C. rugosa*, *Y. lipolytica*; 50%), 1 возбудитель зигомикоза (*Rhiz. arrhizus*; 33%), 6 возбудителей гиалогифомикоза (*Acr. strictum*, *Paec. variotii*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. decumbens*, *T. purpureogenus*; 32%), 3 возбудителя феогифомикоза (*Alt. alternata*, *Aur. pullulans*, *Cl. cladosporioides*; 37,5%), 3 возбудителя редких дрожжевых микозов (*G. candidum*, *Rhod. mucilaginosa*, *Sacch. cerevisiae*; 50%).

В группу редко встречаемых возбудителей (29 видов – 43%; частота обнаружения от 0,01% до 0,1%) вошли 1 возбудитель аспергиллеза (*A. oryzae*; 7%), 2 возбудителя кандидоза (*C. famata*, *C. zeylanoides*; 14%), 3 возбудителя криптококкоза (*Cr. albidus*, *Cr. laurentii*, *Cr. neoformans*; 100%), 2 возбудителя зигомикоза (*M. circinelloides*, *M. hiemalis*; 67%), 13 возбудителей гиалогифомикоза (*Acr. kiliense*, *Ch. globosum*, *F. chlamydosporum*, *F. dimerum*, *F. oxysporum*, *Paec. lilacinus*, *P. commune*, *P. expansum*, *P. spinulosum*, *Sc. brevicaulis*, *T. rugulosus*, *Tr. harzianum*, *Tr. viride*; 68%), 5 возбудителей феогифомикоза (*Cl. herbarum*, *Cl. sphaerospermum*, *Curv. hawaiiensis*, *Curv. lunata*, *Ul. chartarum*; 62,5%), 3 возбудителя редких дрожжевых микозов (*H. uvarum*, *Rhod. glutinis*, *Sapr. capitata*;

50%). В группу редко встречаемых болезнетворных грибов попали все обнаруженные возбудители криптококкоза и фузариоза (вариант гиалогифомикоза); большинство возбудителей зигомикоза (2 из 3 видов), гиалогифомикоза (13 из 19) и феогифомикоза (5 из 8).

Среди мицелиальных микромицетов от больных туберкулезом чаще других выделялись 4 возбудителя аспергиллеза – *A. fumigatus* (215 пациентов – 2,8% обследованных), *A. niger* (174 – 2,3%), *A. flavus* (66 – 0,9%), *A. versicolor* (60 – 0,8%). Частота выделения штаммов *A. fumigatus* (основного возбудителя оппортунистических пневмомикозов) из материалов на пневмомикоз составляла 21,0% от всех штаммов мицелиальных грибов и 30,0% от всех штаммов грибов рода *Aspergillus*. Этот гриб колонизировал нижние дыхательные пути у 6,2% (ДИ 5,4-7,2%) больных туберкулезом с носительством грибов в респираторном тракте. У 2,8% (ДИ 2,5-3,2) больных, обследованных на пневмомикоз, *A. fumigatus* был выделен из респираторного и/или хирургического материала. Частота обнаружения *A. fumigatus* в легочных полостях превышала показатели других возбудителей и составляла 39,6% от числа случаев выделения грибов из полости.

Среди дрожжевых микромицетов от пациентов чаще других выделялись 5 возбудителей кандидоза – *C. albicans* (2008 пациентов – 26,2% обследованных), *C. glabrata* (377 – 4,9%), *C. tropicalis* (241 – 3,2%), *C. krusei* (204 – 2,7%), *C. kefyr* (107 – 1,4%). Частота выделения штаммов *C. albicans* (главного возбудителя кандидоза) из материалов на пневмомикоз составляла 62,2% от всех штаммов дрожжевых грибов и 64,7% от всех штаммов грибов рода *Candida*. Колонизация *C. albicans* нижних дыхательных путей, интерпретируемая как признак микоза (выделение из мокроты в количестве $>1 \times 10^3$ КОЕ/мл; выделение из содержимого бронхов), была обнаружена у 71,4% (ДИ 61,9-76,7%) больных туберкулезом с носительством грибов в респираторном тракте. У 26,2% (ДИ 25,2-27,2) больных, обследованных на пневмомикоз, *C. albicans* был выделен из респираторного и/или хирургического материала. Частота обнаружения *C. albicans* в содержимом плевральных полостей превышала показатели других возбудителей и составляла

13,5% от числа случаев выделения грибов из полости (14 из 104 случаев у 72 пациентов) (Рисунок 60).

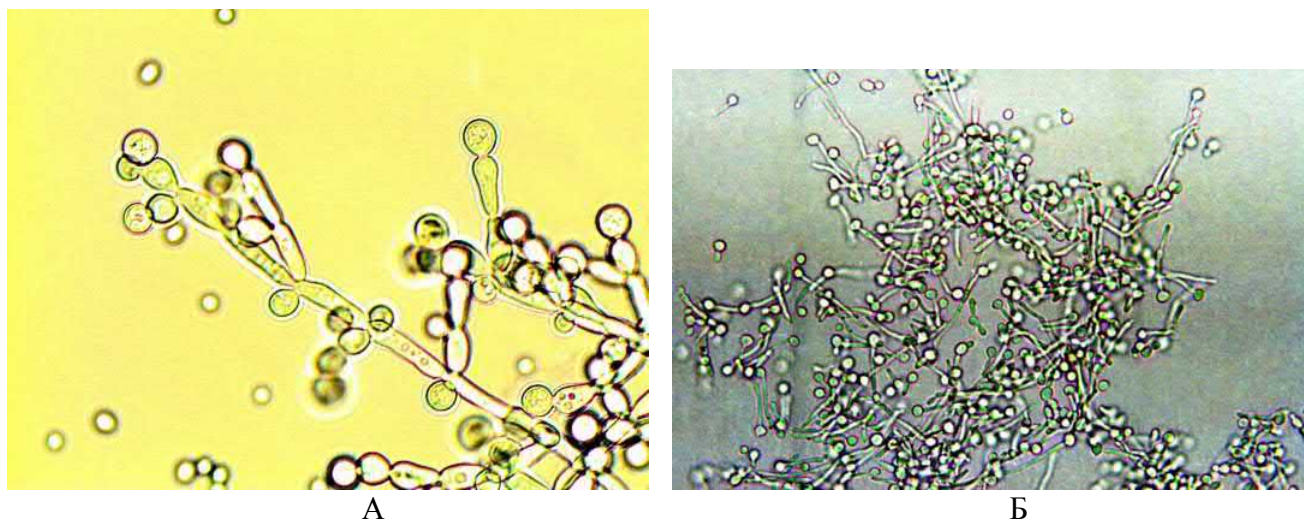


Рисунок 60 – Характерные структуры, образуемые штаммами (выделены из плевральных полостей) *Candida albicans* (Robin) Berkhout, x1000 и x400 (нативный препарат)
Примечание: А) Терминальные хламидоспоры (агар Чапека–Докса, 10 суток), x1000; Б) Ростовые трубки (сыворотка крови при 37° С, 3ч), x400

У 2794 из 7369 обследованных пациентов (37,9% ДИ 36,8-39,0%) была выявлена колонизация нижних отделов дыхательных путей одним или несколькими видами грибов (до 5 видов). Как было изложено выше, бронхолегочную колонизацию условно-патогенным грибом следует интерпретировать не только как носительство, но и как признак вероятного развития у пациента легочной инфекции. Все выделенные из посевов 67 видов грибов были способны колонизировать дыхательные пути больных туберкулезом. Более часто по сравнению с другими возбудителями из респираторного материала выделялись 11 видов, перечисленные в порядке убывания частоты обнаружения у пациентов (от 27,1% до 0,8%): *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *C. kefyr*, *A. flavus*, *A. versicolor*, *C. parapsilosis*, *P. chrysogenum* (Таблица 31). У всех дрожжевых грибов (23 вида) число штаммов, выделенных из мокроты, превышало число штаммов, выделенных из бронхологического материала. И, напротив, у большинства мицелиальных грибов (у 36 из 44 видов; 82%) число штаммов, выделенных из содержимого бронхов, превышало число штаммов, выделенных из мокроты (Таблица 26).

В легочной полости (каверна, туберкулема, киста) возбудитель микоза был обнаружен у 96 из 613 обследованных больных с деструктивными формами туберкулеза (15,7% ДИ 12,9-18,8%). Выделенные из полостей легких грибы относились к 27 видам из 14 родов: *Acremonium* (1 вид), *Alternaria* (1), *Aspergillus* (8), *Aureobasidium* (1), *Candida* (4), *Cladosporium* (2), *Cryptococcus* (1), *Curvularia* (1), *Fusarium* (1), *Geotrichum* (1), *Paecilomyces* (2), *Penicillium* (2), *Talaromyces* (1), *Rhizopus* (1).

Возбудитель аспергиллеза в полости легких был обнаружен у 62 из 96 больных (64,6%): *A. flavus* (5 пациентов), *A. fumigatus* (38) (Рисунки 17, 24), *A. glaucus* (1), *A. niger* (5), *A. ochraceus* (1) (Рисунок 26), *A. restrictus* (2), *A. terreus* (8) (Рисунок 58), *A. versicolor* (2). Возбудитель кандидоза в полости обнаружен у 10 больных (10,4%): *C. albicans* (5), *C. glabrata* (3), *C. kefyr* (1), *C. tropicalis* (1). Возбудитель гиалогифомикоза в полости обнаружен у 10 больных (10,4%): *Acr. strictum* (2) (Рисунки 25, 61), *F. oxysporum* (1) (Рисунок 62), *Paec. lilacinus* (1), *Paec. variotii* (2), *P. chrysogenum* (2), *P. citrinum* (1), *Tal. purpureogenus* (1). Возбудитель феогифомикоза в полости обнаружен у 9 больных (9,4%): *Alt. alternata* (2), *Aur. pullulans* (3), *Cl. herbarum* (1), *Cl. cladosporioides* (2) (Рисунки 23, 63), *Curv. hawaiiensis* (1) (Рисунок 64). У 3 больных (3,1%) обнаружен дрожжеподобный гриб *G. candidum* (3) (Рисунок 38). У 1 пациента (1,05%) обнаружен возбудитель зигомикоза *Rh. oryzae* (1). У 1 пациента (1,05%) обнаружен возбудитель криптококкоза *Cr. neoformans* (1).

Наиболее часто в сформировавшихся полостях в легком у больных туберкулезом развивались грибы *A. fumigatus* (38 случаев – 39,6%), *A. terreus* (8 – 8,3%), *A. flavus* (5 – 5,2%), *A. niger* (5 – 5,2%), *C. albicans* (5 – 5,2%). Из полостей был выделен 21 вид мицелиальных грибов из 11 родов и 6 видов дрожжей из 3 родов. Число случаев обнаружения гифомицетов и зигомицетов (у 82 пациентов) в 5,9 раз превышало число случаев обнаружения дрожжевых грибов (у 14 пациентов).

У 16 из 96 пациентов (16,7%) гриб, выделенный из легочной полости, был обнаружен также в другом диагностическом материале: в содержимом бронхов (7 случаев), в мокроте (11), в содержимом плевральной полости (2). Возбудители

относились к видам *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 обследованных больных (16,9% ДИ 13,5-20,9%). У 22 из 72 больных (30,6%) из полости было выделено более одного вида возбудителя: 2 вида – у 12 пациентов, 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: *Acremonium* (1 вид), *Alternaria* (1), *Aspergillus* (10), *Aureobasidium* (1), *Candida* (6), *Cryptococcus* (1), *Curvularia* (1), *Fusarium* (2), *Geotrichum* (1), *Mucor* (1), *Penicillium* (3), *Rhodotorula* (1), *Talaromyces* (1), *Ulocladium* (1).

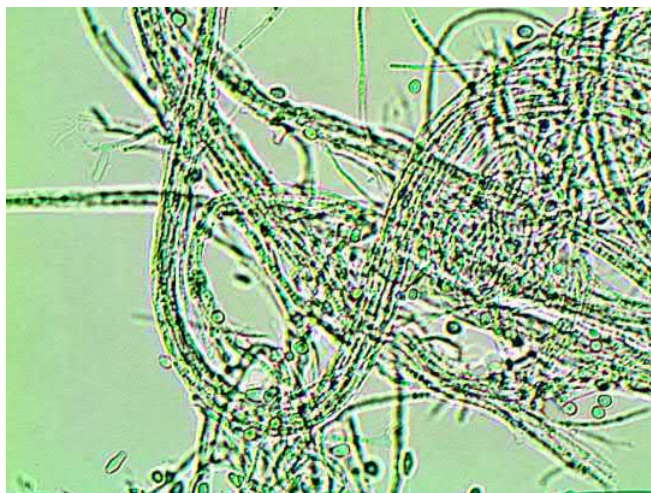


Рисунок 61 – Микроморфология выделенного из туберкулемы легких штамма *Acremonium strictum* W. Gams, x400 (нативный препарат)

Примечание: Пучки вегетативных гиф и конидии

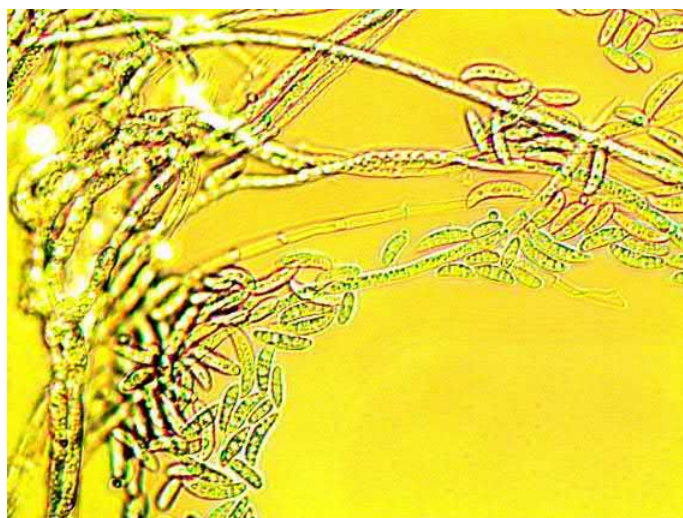


Рисунок 62 – Микроморфология выделенного из туберкулемы легких штамма *Fusarium oxysporum* Schlecht:Fr., x400 (нативный препарат)

Примечание: Макроконидии, микроконидии и гифы мицелия



Рисунок 63 – Микроморфология выделенного из полостного образования в легких больного диссеминированным туберкулезом штамма *Cladosporium cladosporioides* (Fres). de Vries, x400 (нативный препарат)

Примечание: Конидиеносцы, конидии и гифы мицелия



Рисунок 64 – Микроморфология выделенного из легочной каверны больной фиброзно-кавернозным туберкулезом штамма *Curvularia hawaiiensis* (Bugnic. ex M.B. Ellis) Manamgoda, L. Cai & K.D. Hyde, x1000 (нативный препарат)

Примечание: Конидиеносец, конидии

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* в полости обнаружены 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 обнаружен у 11 больных (15,3%) и в 11 случаях (10,6%): *Acr. strictum* (1), *F. dimerum* (1), *F. oxysporum* (1), *P. chrysogenum* (1)

(Рисунок 65), *P. citrinum* (2), *P. commune* (2), *Tal. purpureogenus* (3). Возбудитель феогифомикоза обнаружен у 6 больных (8,3%) и в 6 случаях (5,8%): *Alt. alternata* (1), *Aur. pullulans* (2), *Curv. lunata* (2) (Рисунок 66), *Ulocladium chartarum* (1) (Рисунок 47). У 2 больных (2,8%), в 2 случаях (1,9%) в полости обнаружен возбудитель редких дрожжевых инфекций: *G. candidum* (1), *Rh. mucilaginosa* (1). У 2 больных (2,8%), в 2 случаях (1,9%) обнаружен возбудитель зигомикоза *M. hiemalis* (2). У 1 пациента (1,4%), в 1 случае (1,0%) обнаружен возбудитель криптококкоза *Cr. neoformans* (1).

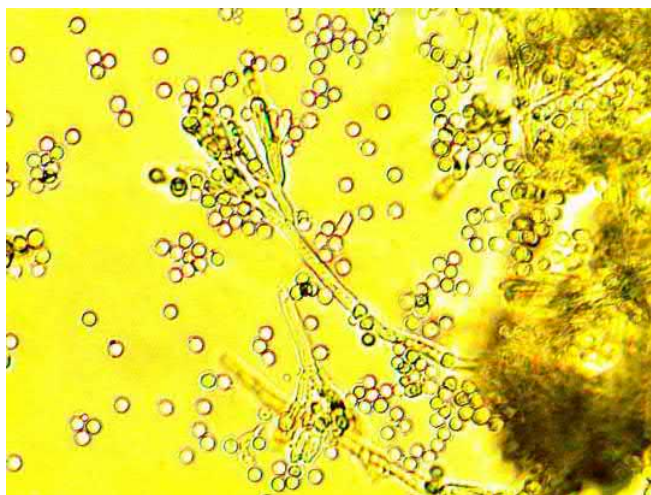


Рисунок 65 – Микроморфология выделенного из плевральной полости больного туберкулезом штамма *Penicillium chrysogenum* Thom, x400 (нативный препарат)
Примечание: Трехъярусная конидиеносная структура, конидии

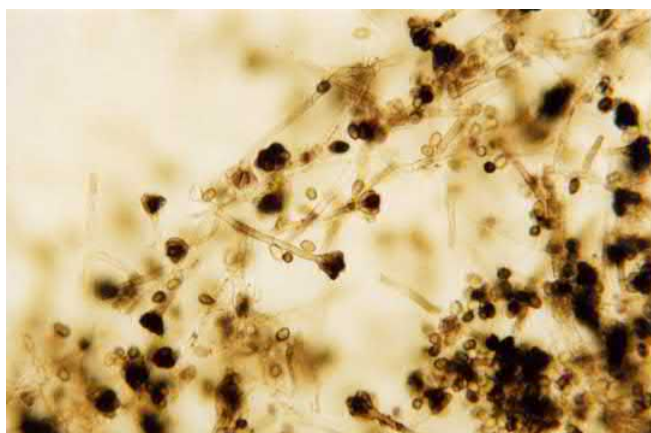


Рисунок 66 – Микроморфология выделенного из плевральной полости больного туберкулезом штамма *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn, x400 (нативный препарат)
Примечание: Конидиеносцы, конидии

Наиболее часто в плевральных полостях развивались грибы *C. albicans* (14 из 104 случаев – 13,5%), *A. fumigatus* (13 – 12,5%), *C. parapsilosis* (12 – 11,5%), *C. glabrata* (8 – 7,7%), *C. krusei* (6 – 5,8%). Из плевральных полостей было выделено

22 вида мицелиальных грибов из 10 родов и 9 видов дрожжей из 4 родов. Число случаев обнаружения в полости гифомицетов и зигомицетов (57 случаев у 54 пациентов) превышало число случаев обнаружения дрожжевых грибов (47 случаев у 32 пациентов).

У 11 из 72 пациентов (15,3%) грибы, выделенные из плевральной полости (от 1 до 3 видов), были обнаружены также в другом материале: в содержимом бронхов (у 3 пациентов), в мокроте (у 10 пациентов), в содержимом легочной полости (у 2 пациентов). Возбудители относились к видам *A. flavus* (1 случай), *A. fumigatus* (2), *C. albicans* (5), *C. glabrata* (2), *C. krusei* (1), *C. parapsilosis* (3). У одного пациента в мокроте и БАЛ были обнаружены оба возбудителя микоза, выделенные из плевральной полости; у другого пациента в мокроте – все 3 возбудителя, выделенные из полости.

Развиваться в легочных и плевральных полостях были способны 19 из 67 видов грибов (28,4%): *Acr. strictum*, *Alt. alternata*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. restrictus*, *A. terreus*, *A. versicolor*, *Aur. pullulans*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. tropicalis*, *Cr. neoformans*, *F. oxysporum*, *G. candidum*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *T. purpureogenus*. Следует отметить, что в данную группу видов вошли не только наиболее распространенные возбудители аспергиллеза (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*), криптококкоза (*Cr. neoformans*) и кандидоза (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*), но и ряд более редких оппортунистических микромицетов.

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

У 11 из 74 обследованных пациентов (14,9%) при исследовании крови была обнаружена фунгемия (кандидемия). В качестве этиологических агентов кандидемии выявлены 4 возбудителя: *C. albicans* (2 случая – 18%), *C. glabrata* (2 случая – 18%), *C. guilliermondii* (6 случаев – 55%), *C. parapsilosis* (1 случай – 9%). Таким образом, в более половины случаев из крови был выделен относительно редкий возбудитель кандидоза *C. guilliermondii*, а доля случаев обнаружения *C. albicans* составила менее 20%. В 6 из 11 случаев (55%) фунгемия была обнаружена у ВИЧ-инфицированных пациентов: *C. albicans* (1 случай), *C. glabrata*

(2), *C. guilliermondii* (3); в 5 из 11 случаев (45%) – у ВИЧ-отрицательных пациентов: *C. albicans* (1), *C. guilliermondii* (3), *C. parapsilosis* (1). У 2 больных туберкулезом возбудитель кандидемии был выделен из крови в повторных посевах (*C. guilliermondii* у ВИЧ-инфицированных пациентов); у 1 больного обнаруженный в крови грибок был выделен также из мокроты (*C. albicans* у ВИЧ-отрицательного больного инфильтративным туберкулезом).

У 7 ВИЧ-инфицированных больных туберкулезом при бактериологических исследованиях СМЖ был обнаружен криптококкоз ЦНС. Во всех случаях из посевов СМЖ был выделен *Cr. neoformans*, являющийся единственным возбудителем данной формы криптококкоза на территории России.

У 3 больных туберкулезом легких грибы-оппортунисты были выделены из канала эндобронхиального клапана, удаленного из бронха. Обнаруженные 4 штамма грибов идентифицированы как *A. flavus*, *A. sydowii*, *C. albicans*, *C. lusitaniae*; штаммы *A. sydowii* и *C. albicans* были выделены совместно, из одного эндобронхиального клапана. Было выявлено, что развиваться на поверхности установленного эндобронхиального клапана способны как дрожжевые (*Candida* spp.), так и плесневые (*Aspergillus* spp.) микромицеты.

Результаты исследования образцов крови, СМЖ и удаленного из бронха эндобронхиального клапана были учтены при оценке обобщенных результатов лабораторной диагностики глубоких микозов.

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

Для оценки перспектив использования молекулярно-генетических методов при проведении видовой идентификации и дифференциации трудно распознаваемых по морфологии возбудителей аспергиллеза были проведены сравнительные исследования переменных регионов рДНК у 3 клинических (обнаружены в образцах БАЛ при диагностике бронхолегочных микозов в ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ» или ГНЦ РАМН – С95, С96; С14) и 4 референтных из разных местообитаний (получены из коллекций – Е84, Е85, Е86; типовой штамм Е93) штаммов гриба *Aspergillus sydowii* (Таблица 32).

Таблица 32 – Исследованные молекулярно-генетическими методами штаммы *Aspergillus sydowii*

Штамм	Характеристика штамма	Коды доступа в GenBank ¹
Штаммы от пациентов, выделенные из содержимого бронхов		
1. NHRC-FC095 (C95) (МНПЦБТ 63м2004) ²	Штамм выделен из БАЛ больного диссеминированным туберкулезом в ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ»	AM883161.1 AM883162.1
2. NHRC-FC096 (C96) (МНПЦБТ 7м2005) ²	Штамм выделен из БАЛ больного инфильтративным туберкулезом в ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ»	AM883163.1
3. NHRC-FC014 (C14) (ГНЦ РАМН)	Штамм выделен из БАЛ пациента с системным микозом в ГНЦ РАМН	AJ937748.1
Штаммы, полученные из коллекций		
4. VKM F-441 (E84)	Референтный штамм из коллекции VKM; выделен из дерново-подзолистой почвы Московской области	AM883157.1
5. VKM F-968 (E85)	Референтный штамм из коллекции VKM; выделен из воды Черного моря	AM883158.1
6. VKM F-2488 (E86)	Референтный штамм из коллекции VKM; выделен из льда Антарктики	AM883159.1
7. NRRL 254T (Type strain) (E93)	Типовой штамм из коллекции NRRL; клинический изолят	AM883160.1

Примечание: Значение префиксов в номерах штаммов: NHRC – клинические штаммы, выделенные в ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ» или ГНЦ РАМН и исследованные молекулярными методами в ГНЦ РАМН; VKM – штаммы Всероссийской коллекции микроорганизмов; NRRL – штамм Национального центра сельскохозяйственных исследований, Сельскохозяйственной исследовательской службы коллекций культур, Пеория, Иллинойс, США (National Center for Agricultural Utilization Research, Agricultural Research Service Culture Collection, USDA Peoria, Illinois, USA)

¹ – GenBank: база генетических данных (ДНК, РНК, домены белков) Национального центра биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information (NCBI)) с доступом к данным базы Европейской молекулярно-биологической лаборатории (European Molecular Biology Laboratory (EMBL)) и японской базы данных ДНК (DNA Data Bank of Japan (DDBJ));

² – номер штамма в коллекции культур грибов ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ»

Грибы *A. sydowii* – сложные для идентификации редкие возбудители аспергиллеза, относимые по современной молекулярно-биологической классификационной схеме рода *Aspergillus* к подроду *Nidulantes*, секции *Nidulantes* [57, 349, 350, 369]. В секцию *Nidulantes* также входят выделенные в ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ» редко встречающиеся болезнетворные грибы *A. nidulans* (телеоморфа *Emericella nidulans*) и *A. versicolor* (сходный по морфологическим признакам с *A. sydowii* возбудитель) [128, 258]. Нами были определены и охарактеризованы стандартные фенотипические культурально-морфологические признаки, по которым возможно различать

клинические штаммы *A. sydowii* и *A. versicolor* (Приложение 2), однако идентификация и дифференциация этих видов грибов в медицинских лабораториях может быть затруднена из-за отсутствия необходимого опыта работы с данными возбудителями. Использование не требующих специальной микологической подготовки молекулярных методов для распознавания видов *Aspergillus* облегчает идентификацию и позволяет получать наиболее достоверные и объективные результаты. Для внедрения молекулярных методов в практику медицинских микологических лабораторий безусловный интерес представляют сведения о варьировании высоко значимых генотипических признаков у штаммов патогенных грибов рода *Aspergillus* – последовательности участков ITS1-ген 5.8S рРНК-ITS2 (ITS фрагменты – более вариабельные участки ДНК), D1/D2 гена 28S рРНК (D1/D2 регионы – более консервативные участки ДНК) рДНК [29, 33, 57, 198, 357].

У больных туберкулезом грибы *A. sydowii* были выделены из мокроты, содержимого бронхов (БАЛ, бронхиальный секрет, бронхиальный смыв), содержимого плевральной полости с общей частотой обнаружения у обследованных на пневмомикоз пациентов 0,5%, а также из канала эндобронхиального клапана, удаленного из бронха (Таблицы 26, 31).

Первоначальная идентификация 7 изучаемых штаммов по стандартным культурально-морфологическим признакам выявила их принадлежность к виду *A. sydowii* [138].

Два обнаруженных в лаборатории ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ» и включенных в молекулярное исследование клинических штамма *A. sydowii* подробно охарактеризованы по разработанной нами схеме описания видов грибов рода *Aspergillus* (Приложение 1). Как видно из характеристик, приведенных в таблице 33, штаммы *A. sydowii* С95 и С96 различались по ряду диагностических фенотипических признаков (наличие экссудата, окраска реверзума, ширина конидиеносца, диаметр вздутия, формирование нетипичных для вида конидиогенных структур, диаметр конидий), наиболее значимым и ценным из которых представляется способность у штамма С96 к образованию

нетипичных по морфологии конидиеносцев с упрощенным (микроциклическим) спорогенезом (Таблица 33).

Таблица 33 – Фенотипические признаки выделенных от больных туберкулезом штаммов *Aspergillus sydowii*

Признак	NHRC-FC095 (C95) (МНПЦБТ 63м2004) ¹	NHRC-FC096 (C96) (МНПЦБТ 7м2005) ¹
Макроскопические признаки (агар Чапека–Докса, 30°C)		
Характеристика колоний	Колонии голубовато-зеленые; бархатистые; ровные; <u>экссудат обильный, красновато-коричневый; обратная сторона колоний окрашенная – красновато-коричневая</u> ; колонии с умеренной скоростью роста, несколько ограниченные	Колонии голубовато-зеленые; бархатистые; ровные; <u>экссудат не образуется; обратная сторона колоний окрашенная – красноватая</u> ; колонии с умеренной скоростью роста, несколько ограниченные
Микроморфологические признаки		
Конидиеносцы	Гладкостенные; со сравнительно утолщенными оболочками; бесцветные; до 500 мкм длиной, <u>5-8 мкм шириной</u>	Гладкостенные; со сравнительно утолщенными оболочками; бесцветные; до 500 мкм длиной, <u>3-8 мкм шириной</u>
Вздутия	От шаровидных до булавовидных; <u>12-16 мкм в диаметре</u>	От шаровидных до булавовидных; <u>7-15 мкм в диаметре</u>
Конидиальные головки	Радиальные	Радиальные
Конидиогенные структуры	Двухъярусные	Двухъярусные; <u>наряду с типичными структурами спорадически образуются редуцированные конидиогенные структуры (одно- или двухъярусные, формирующиеся на укороченных конидиеносцах с мелкими, часто, слабовыраженными вздутиями)</u>
Конидии	Шаровидные; шиповатые; в массе зеленые; <u>3-4 мкм в диаметре</u>	Шаровидные; шиповатые; в массе зеленые; <u>2,5-3,5 мкм в диаметре</u>
Покровные клетки	Не образуются	Не образуются
Гифы вегетативного мицелия	Септированные; бесцветные; разветвленные	Септированные; бесцветные; разветвленные
Физиологические особенности		
Отношение к температуре культивирования	Наличие ограниченного роста и спорообразования на питательных средах при 37°C	Наличие ограниченного роста и спорообразования на питательных средах при 37°C

Примечание: ¹ – номер штамма в коллекции культур грибов ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ»

Для исследования вариативности генотипических признаков штаммов *A. sydowii* было проведено ДНК секвенирование по участкам рДНК ITS1-5.8S-ITS2

(ITS/5.8S регион) и D1/D2 28S. Результаты молекулярной идентификации подтвердили, что все изучаемые клинические и сапротрофные штаммы относятся к виду *A. sydowii*. Вместе с тем, были выявлены различия между геномами отдельных штаммов, которые наблюдались как на более вариабельных локусах ITS, так и на более консервативных локусах D1/D2 28S. Всего были обнаружены две гомогенные группы штаммов *A. sydowii* (Рисунок 67) с полностью идентичными последовательностями на исследованных участках рДНК, которые различались на 3 нуклеотида по локусам ITS и на 1 нуклеотид по локусам D1/D2.

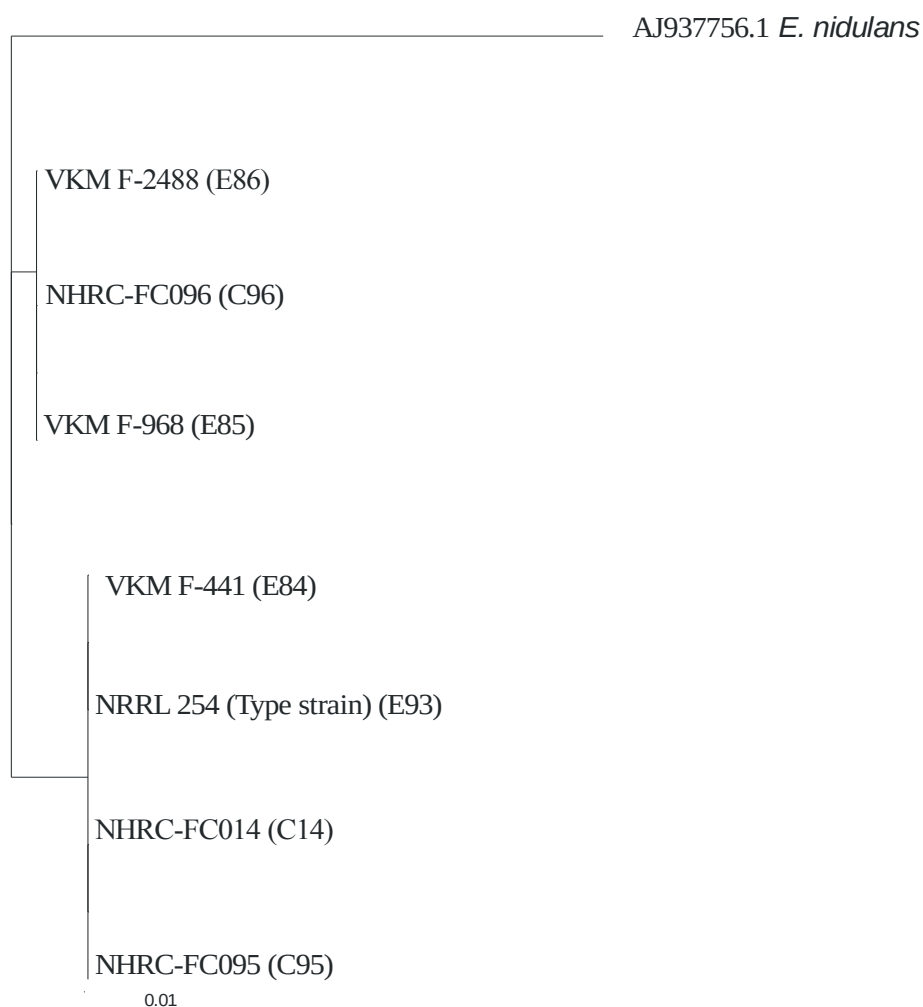


Рисунок 67 – Кладограмма, построенная на основе последовательностей ITS1-5.8S-ITS2 рДНК обнаруженных клинических (NHRC) и референтных (VKM, NRRL) штаммов *Aspergillus sydowii*
Примечание: Шкала соответствует 10 нуклеотидным заменам на 1000 нуклеотидных позиций

По результатам секвенирования к разным группам вида *A. sydowii* были отнесены отличные по фенотипу клинические штаммы C95 и C96, выделенные от больных туберкулезом. На кладограмме, представленной на рисунке 67, видно,

что генетически сходными между собой оказались клинические и сапротрофные штаммы из разных местообитаний. Единую по молекулярно-генетическим признакам группу составляли клинические штаммы С95 (типичный по морфологии штамм ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ»), С14, типовой штамм Е93 и сапротрофный штамм Е84 (почва Подмосковья). Другую монофилетичную кладу с совпадающими последовательностями участков ITS и D1/D2 составляли клинический штамм С96 (нетипичный по морфологии штамм ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ») и сапротрофные штаммы Е85 (вода Черного моря) и Е86 (лед Антарктики).

Таким образом, ни клинические, ни сапротрофные штаммы *A. sydowii* не составляли единой клады, образуя смешанные группы по данным секвенирования ITS/5.8S и D1/D2 регионов рДНК.

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 обнаруженных групп штаммов по ITS региону составляет 99,4%.

Выделенные нами две клады штаммов *A. sydowii* не являются уникальными и поддерживаются штаммами из баз данных GenBank/EMBL/DDJB с идентичным геномом по участкам ITS. Было установлено, что центральную по числу штаммов кладу вида *A. sydowii* образует группа штаммов, сходных с типовым штаммом Е93 и типичным по морфологии клиническим штаммом С95 [138].

Полученные последовательности рДНК клинических штаммов *A. sydowii*, выделенных от больных туберкулезом, были помещены в международные базы данных нуклеотидных последовательностей консорциума GenBank/EMBL/DDJB под номерами доступа AM883161.1 (D1/D2 регионы гена 28S рРНК длиной 490 пар нуклеотидов (п.н.) – штамм NHRC-FC095), AM883162.1 (ген 5.8S рРНК, ITS1 и ITS2 регионы длиной 457 п.н. – штамм NHRC-FC095), AM883163.1 (часть гена 18S рРНК, ген 5.8S рРНК, ITS1 и ITS2 регионы, D1/D2 регионы гена 28S рРНК длиной 1102 п.н. – штамм NHRC-FC096 [322].

В совместных исследованиях, проведенных на кафедре биологии почв МГУ им. М.В. Ломоносова и ГНЦ РАМН (О.В. Василенко, Г.М. Фомичева, О.Е. Марфенина), было также показано, что штаммы *A. sydowii* (8 штаммов, включая изученные и описанные нами в работе 7 изолятов С95, С96, С14, Е84, Е85, Е86, Е93), четко отличаются по нуклеотидным последовательностям регионов ITS1-5.8S-ITS2, D1/D2 28S рДНК от близких им по морфологии штаммов *A. versicolor* (11 штаммов – сапротрофные штаммы из разных местообитаний, в том числе 2 референтных изолята из коллекций ВКМ и NRRL). Сходство видов *A. sydowii* и *A. versicolor* по ITS региону составляет 97,7–98,6% [138], что позволяет успешно применять ДНК секвенирование для дифференциации данных возбудителей аспергиллеза.

Таким образом, применение разработанного комплекса лабораторных методов позволило выявить видовой состав и таксономическую принадлежность вероятных возбудителей бронхолегочных и диссеминированных микозов у больных туберкулезом. Установлено, что у пациентов фтизиатрического профиля вероятно развитие оппортунистических пневмомикозов различной локализации и этиологии: аспергиллеза (обнаружено 14 видов потенциальных возбудителей заболевания), кандидоза (14 видов из 2 родов), криптококкоза (3 вида одного рода), зигомикоза (3 вида из 2 родов), гиалогифомикоза (19 видов из 8 родов), феогифомикоза (8 видов из 5 родов), редких дрожжевых глубоких микозов с поражением легких (6 видов из 5 родов). У группы больных туберкулезом с ВИЧ-инфекцией наиболее вероятно развитие диссеминированных форм глубокого микоза – кандидемии (в целом у пациентов выявлено 4 вида возбудителей), криптококкоза ЦНС (обнаруженный возбудитель – *Cryptococcus neoformans*).

Подробно изучены основные свойства и диагностические признаки клинических штаммов 67 видов грибов-оппортунистов, характеризующие особенности их морфологии и физиологии (способность к росту *in vitro* при 35°C и 37°C), вариативность признаков и плеоморфизм (у видов с анаморфной и телеоморфной стадиями), молекулярно-генетические свойства (сравнительное исследование клинических и сапротрофных штаммов *Aspergillus sydowii*).

ГЛАВА 4 Результаты применения алгоритмов лабораторной диагностики для верификации бронхолегочных инфекций, вызванных дрожжевыми грибами

4.1 Анализ данных лабораторной диагностики кандидоза легких и кандидемии

4.1.1 Результаты микробиологических исследований

По результатам культуральных исследований респираторного и хирургического материалов лабораторные признаки бронхолегочного кандидоза были обнаружены у 2313 из 7657 обследованных больных туберкулезом (30,2% ДИ 29,2-31,3%). Признаки кандидозной инфекции легких были выявлены у 2278 ВИЧ-отрицательных (29,9% от числа обследованных) и 35 ВИЧ-инфицированных (89,7%) пациентов. Всего было обнаружено 14 видов возбудителей кандидоза из родов *Candida* (13 видов) и *Yarrowia* (1 вид с несовершенной формой рода *Candida*). У пациентов были выделены от 1 до 5 возбудителей кандидоза: 1 вид – у 1654 (71,5%), 2 – у 504 (21,8%), 3 – у 137 (5,9%), 4 – у 14 (0,6%), 5 – у 4 больных (0,2%). Более одного возбудителя обнаружено у 28,5% (ДИ 26,7-30,4%) пациентов, инфицированных грибами *Candida* и у 8,6% (ДИ 8,0-9,3%) обследованных на пневмомикоз (у 659 из 7657 пациентов). В группе ВИЧ-инфицированных пациентов 2 и более вида грибов *Candida* были выделены у 46,2% (ДИ 30,1-62,8%) обследованных на пневмомикоз (у 18 из 39 пациентов). Присутствие двух и более видов *Candida* наблюдалось достоверно чаще у больных туберкулезом с ВИЧ-инфекцией, чем у ВИЧ-отрицательных пациентов ($p < 0,00001$ с использованием критерия χ^2 Пирсона).

У части больных с признаками бронхолегочного кандидоза из посевов респираторного и/или хирургического материалов были выделены возбудители микозов других нозологических форм: аспергиллеза (282 пациента; 12,2%), криптококкоза (9 пациентов; 0,4%), зигомикоза (14 пациентов; 0,6%), гиалогифомикоза (90 пациентов; 3,9%), феогифомикоза (32 пациента; 1,4%), редких дрожжевых глубоких микозов (90 пациентов; 3,9%). Наиболее часто совместно с грибами *Candida* от пациентов выделялись грибы *Aspergillus*.

Колонизация дыхательных путей грибами *Candida*, интерпретируемая как признак микоза (массивная или паталогическая колонизация: выделение *Candida* sp. из мокроты в количестве $>1 \times 10^3$ КОЕ/мл и/или из содержимого бронхов в любом количестве), была обнаружена у 2289 из 7369 обследованных (31,1% ДИ 30,0-32,1%). В группе ВИЧ-инфицированных пациентов доля больных с патологической колонизацией респираторного тракта *Candida* spp. достигала крайне высокого уровня 92,1% (ДИ 78,6-98,3%) (35 из 38 обследованных). Сравнение групп пациентов с наличием ВИЧ и без ВИЧ, проведенное с помощью критерия χ^2 Пирсона, выявило достоверно значимое различие $p < 0,00001$.

На слизистых оболочках бронхов больных туберкулезом с разной частотой развивались все 14 выделенных возбудителей кандидоза. Более одного возбудителя было обнаружено у 29% пациентов с носительством грибов *Candida*; в группе ВИЧ-инфицированных больных доля таких пациентов была выше, достигая 51%.

Частота обнаружения штаммов *C. albicans* в респираторном материале составляла 64,2% от общего числа случаев обнаружения грибов возбудителей кандидоза у пациентов (всего 3106 случаев); доля случаев обнаружения *C. albicans* в респираторном материале уменьшалась в группе ВИЧ-инфицированных больных туберкулезом и составляла 42,1% от общего числа случаев обнаружения *Candida* spp. (всего 57 случаев). Выявлено достоверно значимое различие при сравнении групп пациентов с наличием ВИЧ и без ВИЧ с применением критерия χ^2 Пирсона $p = 0,0004$.

Элементы дрожжевых грибов различной морфологии при прямой микроскопии мазков респираторного материала были обнаружены в 89,1% случаев выявления у пациентов патологической колонизации *Candida* spp. при посеве. Положительные результаты прямой микроскопии подтверждали результаты посева образцов мокроты или содержимого бронхов всякий раз, когда количественное содержание гриба *Candida* sp. в образце составляло $\geq 1 \times 10^4$ КОЕ/мл. Было обнаружено, что возбудители кандидоза, способные образовывать псевдомицелиальные структуры развиваются *in vivo* как в форме

почкующихся клеток, так и в форме псевдомицелия (Рисунки 2, 3, 5, 6), а *C. albicans* также формирует и характерный истинный мицелий с грамположительным окрашиванием (Рисунок 4). Было установлено, что главный возбудитель кандидоза диморфный гриб *C. albicans* способен развиваться в организме больного в трех вегетирующих формах: в виде почкующихся дрожжевых клеток, псевдомицелия и многоклеточного септированного мицелия (оценивались случаи обнаружения в посеве *C. albicans* в монокультуре). Следует учитывать, что при развитии на слизистых оболочках грибов *C. glabrata* и *C. famata* в мазках материала могут обнаруживаться только одиночные и почкующиеся дрожжевые клетки.

Как правило, кандидозные вторичные инфекции у больных туберкулезом протекали в форме бессимптомной поверхностной колонизации или реже поверхностного кандидоза бронхов, однако значительно осложняли течение туберкулезного процесса, снижая эффективность проводимой терапии. Приведем редкий клинический случай легочного кандидоза, развившегося у больной туберкулезом легких. Больная 45 лет, в течение более 1,5 лет страдающая фиброзно-кавернозным туберкулёзом с бактериовыделением, поступила в ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ» с обострением туберкулезного процесса на фоне массивной противотуберкулезной терапии. Проведенное комплексное лабораторное обследование выявило признаки кандидозной инфекции дыхательных путей: повторные выделения (обильный рост) *C. albicans* и *C. glabrata* из содержимого бронхов (бронхиальный смыв) и мокроты, подтвержденные результатами прямой микроскопии; массивная колонизация слизистых оболочек зева *C. glabrata*; присутствие в крови антигена грибов *Candida*. С учетом данных тестирования чувствительности выделенных штаммов к антимикотикам (наличие устойчивости к флуконазолу у штамма *C. glabrata*) и клинической картины была назначена терапия амфотерицином В внутривенно в течение 7 дней, в результате которой отмечен значительный положительный клинико-микробиологический эффект. Контрольные микологические исследования образцов бронхиального смыва и мокроты выявили эрадикацию

грибов *C. albicans* и *C. glabrata*. Рентгенологически спустя 2 месяца прослеживалось уменьшение полости распада в верхней доле левого лёгкого на фоне рассасывания очагово-инфильтративных изменений, а через 6 месяцев отмечено закрытие полости распада.

Заселять легочные и/или плевральные полости у больных туберкулезом, вызывая в полости развитие кандидоза, были способны 6 из 14 возбудителей (43%): *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*.

Грибы рода *Candida* были обнаружены в содержимом легочной полости (каверна, туберкулема, киста) у 10 из 613 обследованных больных с деструктивными формами туберкулеза (1,6% ДИ 0,8-3,0%). У 5 пациентов был обнаружен грибок *C. albicans*, у 3 – *C. glabrata*, у 1 – *C. kefyr*, у 1 – *C. tropicalis*. В двух случаях выделение из полости возбудителя (*C. albicans*) было подтверждено данными прямой микроскопии (обнаружены дрожжевые клетки). У 3 из 10 больных (30,0%) возбудитель кандидоза, выделенный из легочной полости, был обнаружен также и в мокроте (*C. albicans*, *C. kefyr*, *C. tropicalis*).

Грибы рода *Candida* (1, 2 или 3 вида) были обнаружены в содержимом плевральной полости у 29 из 425 обследованных больных с заболеваниями плевры (6,8% ДИ 4,6-9,7%). Более одного вида возбудителя кандидоза из полости было выделено у 13 больных (3,1%): 2 вида у 11 пациентов (2,6%) и 3 вида у 2 пациентов (0,5%). Всего было выделено 44 штамма грибов рода *Candida*, относящихся к 6 видам: *C. albicans* (14), *C. glabrata* (8), *C. kefyr* (1), *C. krusei* (6), *C. parapsilosis* (12), *C. tropicalis* (3). У 9 из 29 больных (31,0%) возбудитель кандидоза, выделенный из плевральной полости (1 или 2 вида), был обнаружен также в мокроте и/или в содержимом бронхов (*C. albicans* – 5 случаев, *C. glabrata* – 2, *C. krusei* – 1, *C. parapsilosis* – 3). Следует отметить высокую частоту обнаружения в плевральных полостях штаммов гриба *C. parapsilosis* (12 из 44 случаев – 27,3%) – возбудителя, сопряженного с высокой вероятностью экзогенного заражения. Опишем клинический случай кандидоза плевры, вызванного *C. parapsilosis*. У пациента реанимационного отделения ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ» (состояние после операции по поводу

буллезной эмфиземы легких с присоединением туберкулезной инфекции; находился на вспомогательной постоянной вентиляции легких через трахеостому) был проведен посев материала из полости эмпиемы (смыв по дренажной трубке). Из полости выделена культура *C. parapsilosis*; впоследствии штаммы *C. parapsilosis* были выделены от пациента неоднократно: из полости эмпиемы (повторно), содержимого трахеи, мокроты.

По частоте обнаружения у больных туберкулезом при диагностике пневмомикозов 14 видов возбудителей кандидоза были отнесены к трем группам: группе часто встречаемых возбудителей (частота выявления $>1\%$): 5 видов – *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefyr*; группе среднераспространенных возбудителей (частота выявления от 0,2% до 1%): 7 видов – *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. norvegensis*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*, *C. rugosa*, *Y. lipolytica*; группе редко встречаемых возбудителей (частота выявления $\leq 0,1\%$): 2 вида – *C. zeylanoides*, *C. famata* (Таблица 31). Доли штаммов дрожжей из трех групп возбудителей кандидоза, выделенных из разных биоматериалов на пневмомикоз, составляли (Таблица 26): в мокроте 93,0% часто встречаемых, 6,55% среднераспространенных, 0,45% редко встречаемых; в содержимом бронхов 96,0% часто встречаемых, 3,6% среднераспространенных, 0,4% редко встречаемых; в легочной полости 100% часто встречаемых; в плевральной полости 72,7% часто встречаемых, 27,3% среднераспространенных. Доля штаммов главного возбудителя *C. albicans* от общего числа выделенных штаммов возбудителей кандидоза составляла: в мокроте – 62,7%, в содержимом бронхов – 70,1%, в полости легких – 50,0%, в плевральной полости – 31,8%.

Кроме того, у 11 из 74 обследованных пациентов (14,9%) грибы рода *Candida* были выделены из крови: *C. albicans* (у 2 больных), *C. glabrata* (у 2 больных), *C. guilliermondii* (у 6 больных), *C. parapsilosis* (у 1 больного). Кандидемия выявлялась чаще в группе больных туберкулезом с ВИЧ-инфекцией – у 6 из 17 обследованных (35,3%): *C. albicans* (у 1 пациента), *C. glabrata* (у 2 пациентов), *C. guilliermondii* (у 3 пациентов). В группе больных без ВИЧ-инфекции кандидемия обнаружена у 5 из 57 обследованных (8,8%): *C. albicans* (у

1 пациента), *C. guilliermondii* (у 3 пациентов), *C. parapsilosis* (у 1 пациента). У 2 из 11 пациентов с кандидемией проводили исследования образцов мокроты на пневмомикоз. Грибы *Candida* были обнаружены в мокроте обоих пациентов; у одного больного в посевах мокроты обнаружен возбудитель кандидемии (*C. albicans* у ВИЧ-отрицательного больного инфильтративным туберкулезом). Следует отметить, что среди возбудителей кандидемии преобладал гриб *C. guilliermondii* (55%), не вошедший в группу часто обнаруживаемых видов при диагностике пневмомикозов и отнесенный к среднераспространенным возбудителям с частотой выявления у пациентов 0,5% (Таблица 31). Общая доля гемокультур, не относящихся к *C. albicans*, превышала 81%. Полученные данные дают основание предполагать наличие ятрогенного механизма заражения кандидемией – попадание возбудителя в кровяное русло пациентов из внешнего источника (из систем для внутривенных вливаний, медицинского инструментария).

К лабораторным признакам глубокого кандидоза были отнесены 2 случая выделения возбудителя кандидоза из канала эндобронхиального клапана, удаленного из бронха: *C. albicans* – у больного диссеминированным туберкулезом, *C. lusitaniae* – у больного инфильтративным туберкулезом. В мокроте обоих пациентов был обнаружен гриб *C. albicans*, в количестве, интерпретируемом как признак микоза.

В целом, группа больных с признаками кандидоза составила 2322 пациента или 30,2% (ДИ 29,2-31,3%) от общего числа обследованных на глубокий микоз.

4.1.2 Результаты иммунологических исследований

Определение антигена *Candida* spp. в сыворотке крови было проведено у 59 больных туберкулезом органов дыхания из группы риска развития бронхолегочного кандидоза (положительные результаты микологических исследований и/или клинические и рентгенологические данные). От всех пациентов на микологическое исследование поступали образцы мокроты. У 13 из 59 пациентов (22,0%) было обнаружено присутствие в крови антигена *Candida*. По результатам исследований мокроты у 11 из 13 пациентов с *Candida*

антигенемией (84,6%) была выявлена массивная колонизация дыхательных путей грибами *Candida* (1 или 2 видами). У 2 из 13 пациентов (15,4%) содержание *Candida* sp. в мокроте не превышало диагностического показателя 1×10^3 КОЕ/мл, и было расценено как нормальное значение. Полученные результаты не позволяют интерпретировать наличие *Candida* антигенемии у больных туберкулезом однозначно как признак развития инвазивного кандидоза. Присутствие антигена *Candida* spp. в сыворотке крови может, вероятно, отражать как развитие инфекции (массивную колонизацию), так и колонизацию слизистых оболочек грибами *Candida* в пределах нормы, не требующую терапии. Вместе с тем, обнаружение в сыворотке крови циркулирующих маннанных антигенов остается одним из эффективных методов ранней диагностики инвазивного кандидоза, что было подтверждено вышеописанным клиническим случаем.

Количественное определение в сыворотке крови антител против *C. albicans* было проведено у 48 больных туберкулезом из группы риска развития пневмомикоза, включая одного пациента с ВИЧ-инфекцией. У 29 из 48 пациентов (60,4%) было обнаружено присутствие специфических сывороточных антител к *C. albicans* в количестве, которое интерпретируется как достоверная реакция в пользу развития глубокого кандидоза (в интервале от 1:320 до 1:2560). У всех 29 больных с положительными результатами серодиагностики были обнаружены микробиологические признаки вероятного бронхолегочного кандидоза при исследованиях мокроты и/или содержимого бронхов (массивная колонизация дыхательных путей одним или более видом возбудителей кандидоза; *C. albicans* был выделен у 24 из 29 пациентов – 82,8%). Антитела к *C. albicans* в диагностическом титре (1:320) были обнаружены у ВИЧ-инфицированного пациента (4В стадия ВИЧ-инфекции, фаза прогрессирования на фоне ВААРТ) с массивной колонизацией дыхательных путей *C. albicans*, *C. glabrata* и *C. krusei*; у других пациентов с ВИЧ-инфекцией иммунологические исследования на антитела против *C. albicans* не проводились. С учетом полученных результатов, тестирование сывороточных антител против *C. albicans* методом РНГА возможно

рекомендовать для использования в качестве дополнительного теста при диагностике бронхолегочного кандидоза у больных туберкулезом.

По результатам лабораторных исследований респираторного, хирургического материалов и крови была сформирована группа больных туберкулезом с высоким риском развития глубокого кандидоза. Критериями для включения пациентов в группу являлись: повторное выделение возбудителя кандидоза одного вида из мокроты в количестве $>1 \times 10^3$ КОЕ/мл; выделение возбудителя из содержимого бронхов (ФБС); выделение возбудителя из легочной полости; выделение возбудителя из плевральной полости; выделение возбудителя с поверхности эндобронхиального клапана, удаленного из бронха; кандидемия; *Candida* антигенемия. Данная группа, включающая 1405 пациентов, составила 18,3% (ДИ 17,4-19,2%) от числа обследованных на глубокий микоз.

4.2 Анализ данных лабораторной диагностики криптококкоза легких и центральной нервной системы

4.2.1 Результаты микробиологических исследований

По результатам культуральных исследований респираторного и хирургического материалов лабораторные признаки криптококкоза легких были обнаружены у 14 из 7657 обследованных больных туберкулезом (0,2% ДИ 0,1-0,3%). Всего было выделено 3 вида возбудителей криптококкоза: главный возбудитель заболевания *Cr. neoformans* (у 8 пациентов), а также *Cr. albidus* (у 3 пациентов) и *Cr. laurentii* (у 3 пациентов). Вероятный криптококкоз легких был обнаружен у 13 ВИЧ-отрицательных (0,2% от числа обследованных) и одного ВИЧ-инфицированного (2,6%) пациентов.

У части больных с признаками легочного криптококкоза из посевов респираторного материала были выделены возбудители микозов других нозологических форм: кандидоза (8 пациентов; 57,1%), феогифомикоза (1 пациент; 7,1%), редких дрожжевых глубоких микозов (1 пациент; 7,1%). Наиболее часто совместно с грибами *Cryptococcus* от пациентов выделялись грибы *Candida*.

Колонизация дыхательных путей грибами *Cryptococcus* была обнаружена у 12 из 7369 обследованных (0,2% ДИ 0,1-0,3%). Гриб *Cr. neoformans* был выделен

как из содержимого бронхов, так и из мокроты; грибы *Cr. albidus* и *Cr. laurentii* – только из мокроты. Частота обнаружения *Cr. neoformans* в респираторном материале составляла 50,0% от общего числа случаев обнаружения грибов возбудителей криптококкоза у пациентов (всего 12 случаев; таблица 31).

Одиночные и почкующиеся дрожжевые клетки при прямой микроскопии мазков респираторного материала были обнаружены в 75,0% случаев выявления у пациентов *Cryptococcus* spp.; однако в 8 из 9 таких случаев у пациента обнаруживались также дрожжевые грибы рода *Candida*, а в одном случае и дрожжевые грибы *Sacch. cerevisiae*.

Возбудитель *Cr. neoformans* был выделен как из легочной (у 1 из 613 обследованных; 0,2% ДИ 0,004-0,9%), так и из плевральной (у 1 из 425 обследованных; 0,2% ДИ 0,005-1,3%) полости: из легочной каверны у больной фиброзно-кавернозным туберкулезом; из полости эмпиемы у ВИЧ-инфицированной больной цирротическим туберкулезом с эмпиемой плевры.

По частоте обнаружения у больных туберкулезом при диагностике пневмомикозов 3 вида возбудителей криптококкоза были отнесены к группе редко встречаемых возбудителей (частота выявления $\leq 0,1\%$) (Таблица 31).

Кроме того, у 7 ВИЧ-инфицированных больных туберкулезом грибок *Cr. neoformans* был обнаружен в СМЖ. У 1 из 7 данных пациентов с выявленным криптококкозом ЦНС на микологическое исследование поступали образцы мокроты, из которых были выделены дрожжи *C. albicans* (массивная колонизация). Иммунологические исследования на детекцию *Cryptococcus* антигенемии у больных криптококкозом ЦНС не проводились.

С учетом результатов диагностики криптококкоза ЦНС, общее число выявленных больных с признаками криптококкоза составило 21 человек (0,3% ДИ 0,2-0,4% от числа пациентов, обследованных на глубокий микоз): 13 ВИЧ-отрицательных (61,9%) и 8 ВИЧ-инфицированных (38,1%) пациентов.

4.2.2 Результаты иммунологических исследований

Определение антигена *Cr. neoformans* в сыворотке крови было проведено у 12 больных туберкулезом из группы риска развития пневмомикоза, включая двух

пациентов с ВИЧ-инфекцией. Ни у одного из протестированных пациентов *Cryptococcus* антигенемии обнаружено не было; при культуральных исследованиях респираторного материала возбудители криптококкоза у данных больных также не были обнаружены (у 9 из 12 больных из посевов выделены грибы рода *Candida*, у 2 из 12 – грибы рода *Aspergillus*). Полученные данные не позволяют сделать какой-либо вывод об эффективности использования иммунологических исследований на детекцию в сыворотке антигена *Cr. neoformans* при проведении лабораторной диагностики криптококкоза легких у больных туберкулезом.

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

По результатам культуральных исследований респираторного и хирургического материалов лабораторные признаки инфекции, вызванной редкими дрожжевыми возбудителями, были обнаружены у 119 из 7657 обследованных на пневмомикоз больных туберкулезом (1,6% ДИ 1,3-1,9%). Всего было обнаружено 6 видов возбудителей из родов *Geotrichum* (1 вид), *Hanseniaspora* (1 вид), *Rhodotorula* (2 вида), *Saccharomyces* (1 вид), *Saprochaete* (1 вид). От больных туберкулезом были выделены как дрожжевые грибы, образующие почкующиеся клетки (4 из 6 видов: *H. uvarum*, *Rh. glutinis*, *Rh. mucilaginosa*, *Sacch. cerevisiae*), так и дрожжеподобные грибы, формирующие артроспоры и гифы мицелия (2 из 6 видов: *G. candidum*, *Sapr. capitata*). Аскомицетовые дрожжи представлены 4 видами родов *Geotrichum*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, *Saprochaete*, базидиомицетовые дрожжи – 2 видами «красных дрожжей» рода *Rhodotorula*. У пациентов были выделены от 1 до 2 видов возбудителей: 1 микромицет – у 115 (96,6%), 2 – у 4 больных (3,4%). Редко встречающиеся дрожжевые грибы, способные вызывать развитие микоза с поражением легких, были выявлены у 118 ВИЧ-отрицательных (1,6% от числа обследованных) и одного ВИЧ-инфицированного (2,6%) пациента – *Sacch. cerevisiae* из содержимого бронхов.

У части больных с признаками развития редких дрожжевых инфекций из посевов респираторного и/или хирургического материалов были выделены возбудители микозов других нозологических форм: аспергиллеза (16 пациентов; 13,5%), кандидоза (90 пациентов; 75,6%), криптококкоза (1 пациент; 0,8%), зигомикоза (1 пациент; 0,8%), гиалогифомикоза (3 пациента; 2,5%), феогифомикоза (2 пациента; 1,7%). Наиболее часто совместно с редкими дрожжевыми возбудителями от пациентов выделялись грибы рода *Candida*.

Колонизация дыхательных путей возбудителями редких дрожжевых микозов была выявлена у 114 из 7369 обследованных (1,6% ДИ 1,3-1,9%). Все 6 обнаруженных видов дрожжевых грибов были способны колонизировать дыхательные пути больных туберкулезом. У 4 пациентов (3,5%) с носительством дрожжевых грибов данной группы было обнаружено 2 вида возбудителей.

При выявлении в респираторном материале дрожжей *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Hanseniaspora* корреляция результатов прямой микроскопии с данными посевов была затруднена из-за развития у большинства пациентов (более 75% случаев) дрожжевых грибов рода *Candida*. При выявлении у пациентов дрожжеподобных грибов *G. candidum* (33 пациента), *Sapr. capitata* (9) ясно различимые, характерные клеточные структуры (артроконидии и подобные клетки в комбинации с гифами мицелия) были обнаружены в мазках респираторного материала в 7 из 42 случаев (16,7%) (Рисунки 7, 8).

Развиваться в легочной и/или плевральной полости были способны грибы *G. candidum* и *Rh. mucilaginosa*. Дрожжеподобный гриб *G. candidum* был обнаружен у 3 больных в легочной полости (каверна, туберкулема) и у 1 больного в плевральной полости. В одном случае из плевральной полости был выделен дрожжевой гриб *Rh. mucilaginosa*. Таким образом, возбудитель редкого дрожжевого микоза в легочной полости был обнаружен у 3 из 613 больных (0,5% ДИ 0,1-1,4%); в плевральной полости – у 2 из 425 больных (0,5% ДИ 0,06-1,7%).

По частоте обнаружения у больных туберкулезом при диагностике пневмомикозов 6 возбудителей редких дрожжевых микозов были отнесены к двум группам: группе среднераспространенных возбудителей (частота выявления

от 0,2% до 1%): 3 вида – *G. candidum*, *Sacch. cerevisiae*, *Rh. mucilaginosa* и группе редко встречаемых возбудителей (частота выявления $\leq 0,1\%$): 3 вида – *Rh. glutinis*, *Sapr. capitata*, *H. uvarum* (Таблица 31).

Доля больных с признаками редких дрожжевых инфекций (119 пациентов) от общего числа обследованных на глубокий микоз пациентов составила 1,6% (ДИ 1,3-1,9%).

ГЛАВА 5 Результаты применения алгоритмов лабораторной диагностики для верификации бронхолегочных инфекций, вызванных мицелиальными грибами

5.1 Анализ данных лабораторной диагностики аспергиллеза

5.1.1 Результаты микробиологических исследований

По результатам культуральных исследований респираторного и хирургического материалов лабораторные признаки бронхолегочного аспергиллеза были обнаружены у 675 из 7657 обследованных больных туберкулезом (8,8% ДИ 8,2-9,5%). Всего было обнаружено 14 видов возбудителей аспергиллеза. У пациентов были выделены от 1 до 4 видов грибов рода *Aspergillus*: 1 вид – у 600 (88,9%), 2 – у 68 (10,1%), 3 – у 6 (0,9%), 4 – у одного больного (0,1%). Более одного возбудителя обнаружено у 11,1% (ДИ 8,8-13,7%) пациентов, инфицированных грибами *Aspergillus* и у 1,0% (ДИ 0,8-1,2%) обследованных на пневмомикоз. Грибы, вызывающие развитие аспергиллеза, были выявлены только у ВИЧ-отрицательных пациентов.

У части больных с признаками бронхолегочного аспергиллеза из посевов респираторного и/или хирургического материалов были выделены возбудители микозов других нозологических форм: кандидоза (282 пациента; 41,8%), зигомикоза (1 пациент; 0,2%), гиалогифомикоза (47 пациентов; 7,0%), феогифомикоза (6 пациентов; 0,9%), редких дрожжевых глубоких микозов (16 пациентов; 2,4%). Наиболее часто совместно с грибами *Aspergillus* от пациентов выделялись грибы *Candida*.

Колонизация дыхательных путей грибами *Aspergillus* была выявлена у 596 из 7369 обследованных (8,1% ДИ 7,5-8,7%). Все 14 обнаруженных видов возбудителей аспергиллеза были способны колонизировать дыхательные пути больных туберкулезом. Более одного возбудителя (от 2 до 4) обнаружено у 11% пациентов с носительством в респираторном тракте грибов *Aspergillus*.

Характерные для гиалогифомицетов, включая *Aspergillus* spp., клеточные структуры – фрагменты плесневого септированного гиалинового мицелия (Рисунок 10), одиночные конидии (Рисунок 14) при прямой микроскопии мазков

респираторного материала были обнаружены в 10,9% случаев выявления у пациентов колонизации грибами *Aspergillus*. В редких случаях (1,2%) у больных в мазках обнаруживались конидиальные головки *Aspergillus* spp. (Рисунки 11, 12).

У 2 из 17 обследованных больных туберкулезом (11,8%) из посева биоптата бронхов был выделен главный возбудитель аспергиллеза гриб *A. fumigatus*.

Заселять легочные и/или плевральные полости у больных туберкулезом, вызывая в полостном образовании развитие аспергиллеза, были способны 12 из 14 возбудителей (86%): *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. glaucus*, *A. hollandicus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. restrictus*, *A. sydowii*, *A. terreus*, *A. ustus*, *A. versicolor*.

Грибы рода *Aspergillus* были обнаружены в содержимом легочной полости (каверна, туберкулема, киста) у 62 из 613 обследованных больных с деструктивными формами туберкулеза (10,1% ДИ 7,8-12,8%). У 38 пациентов был обнаружен гриб *A. fumigatus*, у 8 – *A. terreus*, у 5 – *A. flavus*, у 5 – *A. niger*, у 2 – *A. restrictus*, у 2 – *A. versicolor*, у 1 – *A. glaucus*, у 1 – *A. ochraceus*. В 17 случаях выделение гриба из полости (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger* или *A. terreus*) было подтверждено данными прямой микроскопии (находки гиф мицелия плесневого гриба) (Рисунок 9). У 10 из 62 больных (16,1%) возбудитель аспергиллеза, выделенный из полости легких, был обнаружен также в другом диагностическом материале: в 9 случаях *A. fumigatus* (мокрота, содержимое бронхов, плевральная полость); в 1 – *A. flavus* (плевральная полость). У больного фиброзно-кавернозным туберкулезом гриб *A. fumigatus* был обнаружен в полости легких, плевральной полости и мокроте.

Приведем один из клинических случаев развития аспергиллеза легких. У пациентки 39 лет с фиброзно-кавернозным туберкулезом на фоне комплексной противотуберкулезной терапии с применением антибиотиков широкого спектра действия была отмечена отрицательная клиническая динамика с появлением кровохарканья. Рентгенологически обнаружено появление образования (1,5x1,5 см) в одной из полостей верхней доли левого легкого, предположительно аспергиллемы. При проведении комплексной лабораторной диагностики пневмомикоза у больной были выявлены признаки развития аспергиллеза:

обнаружение грибов рода *Aspergillus* в содержимом бронхов (БАЛ) и мокроте (*A. flavus*, *A. fumigatus*), подтвержденное результатами прямой микроскопии (выявлены скопления гиф септированного мицелия и конидий); присутствие антигена *Aspergillus* в сыворотке крови. Больной был проведен курс лечения итраконазолом (орунгал) в дозе 400 мг в сутки в течение 30 дней, что сопровождалось уменьшением симптомов интоксикации, стойким купированием кровохарканья, положительной рентгенологической динамикой в виде уменьшения размеров и заполнения полостей распада. Контрольные микологические исследования образцов БАЛ и мокроты выявили эрадикацию грибов *Aspergillus* spp. со слизистых оболочек дыхательных путей. Больная выписана из стационара ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ» в удовлетворительном состоянии.

Грибы рода *Aspergillus* (1 или 2 вида) были обнаружены в содержимом плевральной полости у 35 из 425 обследованных больных с заболеваниями плевры (8,2% ДИ 5,8-11,3%). Два вида возбудителя аспергиллеза из полости были выделены у 3 больных (0,7%). Всего было выделено 38 штаммов грибов *Aspergillus*, относящихся к 10 видам: *A. fumigatus* (13), *A. niger* (7), *A. flavus* (4), *A. nidulans* (3), *A. restrictus* (3), *A. terreus* (3), *A. ustus* (2), *A. hollandicus* (1), *A. sydowii* (1), *A. versicolor* (1). У 2 из 35 больных (5,7%) возбудитель аспергиллеза, выделенный из плевральной полости, был обнаружен также в мокроте (*A. flavus*, *A. fumigatus*).

Кроме того, у 2 пациентов с инфильтративным туберкулезом грибы рода *Aspergillus* были выделены из канала эндобронхиального клапана, удаленного из бронха: *A. flavus* (штамм *A. flavus* был обнаружен также и в мокроте) и *A. sydowii*.

По частоте обнаружения у больных туберкулезом при диагностике пневмомикозов 14 видов возбудителей аспергиллеза были отнесены к трем группам: группе часто встречаемых возбудителей (частота выявления >1%): 2 вида – *A. fumigatus*, *A. niger*; группе среднераспространенных возбудителей (частота выявления от 0,2% до 1%): 11 видов – *A. flavus*, *A. versicolor*, *A. nidulans*, *A. sydowii*, *A. restrictus*, *A. terreus*, *A. glaucus*, *A. ochraceus*, *A. ustus*, *A. flavipes*, *A.*

hollandicus; группе редко встречаемых возбудителей (частота выявления $\leq 0,1\%$): 1 вид – *A. oryzae* (Таблица 31).

5.1.2 Результаты иммунологических исследований

Определение антигена *Aspergillus* spp. в сыворотке крови было проведено у 82 больных туберкулезом из группы риска развития бронхолегочного аспергиллеза (положительные результаты микологических исследований и/или клинические и рентгенологические данные). У 8 из 82 пациентов (9,8%) было обнаружено присутствие в крови антигена *Aspergillus*. У 7 из 8 больных с *Aspergillus* антигенемией (87,5%) при посеве диагностического материала (содержимое легочной полости, содержимое бронхов, мокрота) были обнаружены грибы рода *Aspergillus* (от 1 до 3 видов; грибы *A. fumigatus* были выделены у всех 7 пациентов, у части пациентов выделены также грибы *A. flavus*, *A. nidulans*). У больного фиброзно-кавернозным туберкулезом, осложненным аспергиллемой, обнаружение *Aspergillus* антигенемии не подтверждалось обнаружением возбудителя аспергиллеза при культуральных исследованиях. С учетом полученных результатов, тестирование *Aspergillus* антигенемии возможно рекомендовать для использования в качестве дополнительного теста при диагностике бронхолегочного аспергиллеза у больных туберкулезом.

Количественное определение в сыворотке крови антител против *A. fumigatus* было проведено у 51 больного туберкулезом из группы риска развития пневмомикоза, включая одного пациента с ВИЧ-инфекцией. У 3 из 51 пациента (5,9%) было обнаружено присутствие специфических сывороточных антител к *A. fumigatus* в количестве, которое интерпретируется как достоверная реакция в пользу развития глубокого аспергиллеза (в титре 1:640). У всех 3 больных с положительными результатами серодиагностики при посеве биоматериала были обнаружены грибы *A. fumigatus*: у 2 пациентов в мокроте, а у больного фиброзно-кавернозным туберкулезом в легочной полости, БАЛ и мокроте. У пациента с цирротическим туберкулезом в сыворотке крови были обнаружены антитела к *A. fumigatus* и *C. albicans*. С учетом полученных результатов, тестирование сывороточных антител против *A. fumigatus* методом РНГА следует рекомендовать

для использования в качестве важного дополнительного теста при диагностике неинвазивных форм бронхолегочного аспергиллеза у больных туберкулезом.

По результатам микологических и иммунологических исследований признаки развития аспергиллеза были обнаружены у 677 из 7683 обследованных на глубокий микоз больных туберкулезом (8,8% ДИ 8,2-9,5%).

5.2 Анализ данных лабораторной диагностики зигомикоза

По результатам культуральных исследований респираторного и хирургического материалов лабораторные признаки зигомикоза (мукормикоза) легких были обнаружены у 27 из 7657 обследованных больных туберкулезом (0,4% ДИ 0,2-0,5%). Всего было обнаружено 3 вида возбудителей мукормикоза из родов *Rhizopus* (1 вид) и *Mucor* (2 вида). У 18 пациентов (66,7%) был обнаружен главный возбудитель заболевания *Rh. arrhizus*, у 3 (11,1%) – *M. circinelloides*, у 6 (22,2%) – *M. hiemalis*. Грибы, вызывающие развитие зигомикоза, были выявлены только у ВИЧ-отрицательных пациентов.

У части больных с признаками зигомикоза из посевов респираторного материала были выделены возбудители микозов других нозологических форм: аспергиллеза (1 пациент; 3,7%), кандидоза (14 пациентов; 51,9%), редких дрожжевых глубоких микозов (1 пациент; 3,7%). Наиболее часто совместно с возбудителями зигомикоза от пациентов выделялись грибы *Candida*.

Колонизация дыхательных путей болезнетворными грибами *Zygomycota* порядка *Mucorales* была выявлена у 24 из 7369 обследованных (0,3% ДИ 0,2-0,5%). Грибы *Rh. arrhizus*, *M. circinelloides*, *M. hiemalis* были выделены как из содержимого бронхов, так и из мокроты. Частота обнаружения *Rh. arrhizus* в респираторном материале составляла 70,8% от общего числа случаев обнаружения зигомицетов у пациентов (17 из 24 случаев; таблица 31).

При прямой микроскопии мазков респираторного материала характерные для зигомицетов мицелиальные структуры (широкие (от 10 до 20 мкм) несептированные гифы) были обнаружены в 12,5% случаев выявления у пациентов возбудителя зигомикоза.

Зигомицеты были выделены также из легочной (у 1 из 613 обследованных) и плевральной (у 2 из 425 обследованных) полости у больных туберкулезом. Главный и наиболее опасный возбудитель зигомикоза *Rh. arrhizus* был обнаружен в легочной каверне у больного фиброзно-кавернозным туберкулезом (0,2% ДИ 0,004-0,9%). У 2 больных из плевральной полости был выделен грибок *M. hiemalis* (0,5% ДИ 0,06-1,7%).

По частоте обнаружения у больных туберкулезом при диагностике пневмомикозов грибок *Rh. arrhizus* был отнесен к группе среднераспространенных возбудителей (частота выявления от 0,2% до 1%); грибки *M. hiemalis*, *M. circinelloides* к группе редко встречаемых возбудителей (частота выявления $\leq 0,1\%$) (Таблица 31).

Доля больных с признаками зигомикоза (27 пациентов) от общего числа обследованных на глубокий микоз пациентов составила 0,4% (ДИ 0,2-0,5%).

5.3 Анализ данных лабораторной диагностики гиалогифомикозов

По результатам культуральных исследований респираторного и хирургического материалов лабораторные признаки гиалогифомикоза легких были обнаружены у 238 из 7657 обследованных больных туберкулезом (3,1% ДИ 2,7-3,5%). Всего было обнаружено 19 видов возбудителей из родов *Acremonium* (2 вида), *Chaetomium* (1 вид), *Fusarium* (3 вида), *Paecilomyces* (2 вида), *Penicillium* (6 видов), *Scopulariopsis* (1 вид), *Talaromyces* (2 вида), *Trichoderma* (2 вида). У пациентов были выделены от 1 до 2 видов возбудителей: 1 микромицет – у 234 (98,3%), 2 – у 4 больных (1,7%). Грибы, вызывающие развитие гиалогифомикоза, были выявлены у 237 ВИЧ-отрицательных (3,1% от числа обследованных) и одного ВИЧ-инфицированного (2,6%) пациента – *P. citrinum* из мокроты.

У части больных с признаками гиалогифомикоза из посевов респираторного и/или хирургического материалов были выделены возбудители микозов других нозологических форм: аспергиллеза (47 пациентов; 19,8%), кандидоза (90 пациентов; 37,8%), феогифомикоза (3 пациента; 1,3%), редких дрожжевых глубоких микозов (3 пациента; 1,3%). Наиболее часто совместно с возбудителями гиалогифомикоза, от пациентов выделялись грибки *Candida*, а также *Aspergillus*.

Колонизация дыхательных путей возбудителями гиалогифомикоза была выявлена у 218 из 7369 обследованных (3,0% ДИ 2,6-3,4%). Все обнаруженные виды возбудителей гиалогифомикоза были способны колонизировать дыхательные пути больных туберкулезом. У 4 пациентов (1,8%) с носительством гиалогифомицетов было обнаружено 2 вида возбудителей.

Характерные для гиалогифомицетов клеточные структуры – фрагменты плесневого септированного мицелия (Рисунок 10) при прямой микроскопии мазков респираторного материала были обнаружены в 6,4% случаев выявления у пациентов колонизации при посеве (в 6 из 14 случаев у пациента выделялись также грибы *Aspergillus*, образующие идентичные структуры).

Заселять легочные и/или плевральные полости у больных туберкулезом, вызывая в полостном образовании развитие гиалогифомикоза, были способны 9 из 19 возбудителей (47%): *Acr. strictum*, *F. dimerum*, *F. oxysporum*, *Paec. lilacinus*, *Paec. variotii*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. commune*, *T. purpureogenus*.

Грибы, вызывающие гиалогифомикоз, были обнаружены в содержимом легочной полости (каверна, туберкулема, киста) у 10 из 613 обследованных больных с деструктивными формами туберкулеза (1,6% ДИ 0,8-3,0%). У 2 пациентов был обнаружен гриб *Acr. strictum*, у 2 – *Paec. variotii*, у 2 – *P. chrysogenum*, у 1 – *F. oxysporum*, у 1 – *Paec. lilacinus*, у 1 – *P. citrinum*, у 1 – *T. purpureogenus*. В одном случае (10,0%) гриб *P. chrysogenum*, выделенный из легочной каверны, был обнаружен также в содержимом бронхов.

Грибы, вызывающие гиалогифомикоз, были обнаружены в содержимом плевральной полости у 11 из 425 обследованных больных с заболеваниями плевры (2,6% ДИ 1,3-4,6%). У 3 пациентов был обнаружен гриб *T. purpureogenus*, у 2 – *P. citrinum*, у 2 – *P. commune*, у 1 – *Acr. strictum*, у 1 – *F. dimerum*, у 1 – *F. oxysporum*, у 1 – *P. chrysogenum*.

По частоте обнаружения у больных туберкулезом при диагностике пневмомикозов 19 возбудителей гиалогифомикоза были отнесены к двум группам: группе среднераспространенных возбудителей (частота выявления от 0,2% до 1%): 6 видов – *P. chrysogenum*, *Acr. strictum*, *Paec. variotii*, *P. citrinum*, *T.*

purpureogenus, *P. decumbens* и группе редко встречаемых возбудителей (частота выявления $\leq 0,1\%$): 13 видов – *Acr. kiliense*, *F. oxysporum*, *P. commune*, *Tr. viride*, *P. expansum*, *Sc. brevicaulis*, *F. chlamydosporum*, *F. dimerum*, *Paec. lilacinus*, *P. spinulosum*, *T. rugulosus*, *Tr. harzianum*, *Ch. globosum* (Таблица 31).

Доля больных с признаками гиалогифомикоза (238 пациентов) от общего числа обследованных на глубокий микоз пациентов составила 3,1% (ДИ 2,7-3,5%).

5.4 Анализ данных лабораторной диагностики феогифомикозов

По результатам культуральных исследований респираторного и хирургического материалов лабораторные признаки феогифомикоза легких были обнаружены у 70 из 7657 обследованных больных туберкулезом (0,9% ДИ 0,7-1,2%). Всего было обнаружено 8 видов возбудителей из родов *Alternaria* (1 вид), *Aureobasidium* (1 вид), *Cladosporium* (3 вида), *Curvularia* (2 вида), *Ulocladium* (1 вид). У пациентов были выделены от одного до 2 видов возбудителей: 1 микромицет – у 69 (98,6%), 2 – у 1 больного (1,4%). Грибы, вызывающие развитие феогифомикоза, были выявлены только у ВИЧ-отрицательных пациентов.

У части больных с признаками феогифомикоза из посевов респираторного и/или хирургического материалов были выделены возбудители микозов других нозологических форм: аспергиллеза (6 пациентов; 8,6%), кандидоза (32 пациента; 45,7%), криптококкоза (1 пациент; 1,4%), гиалогифомикоза (3 пациента; 4,3%), редких дрожжевых глубоких микозов (2 пациента; 2,9%). Наиболее часто совместно с возбудителями феогифомикоза от пациентов выделялись грибы *Candida*.

Колонизация дыхательных путей феогифомицетами была выявлена у 57 из 7369 обследованных (0,8% ДИ 0,6-1,0%). Все обнаруженные виды возбудителей феогифомикоза были способны колонизировать дыхательные пути больных туберкулезом. У одного пациента (1,8%) с носительством феогифомицетов было обнаружено 2 вида возбудителя.

Характерные для всех гифомицетов элементы (гифы плесневого септированного мицелия) при прямой микроскопии мазков респираторного

материала были обнаружены в 5,3% случаев выявления у пациентов колонизации феогифомикетом при посеве. В одном случае у пациента с колонизацией феоидным грибом *Alt. alternata* в мазке содержимого бронхов были обнаружены характерные для возбудителя крупные (до 40 мкм длиной) конидии (Рисунок 13); в другом случае колонизация феоидным грибом *Aur. pullulans* была подтверждена обнаружением в мазке мокроты элементов грибов, специфичных для гифомикетов из группы «черных дрожжей» (Рисунок 15).

Заселять легочные и/или плевральные полости у больных туберкулезом, вызывая в полостном образовании развитие феогифомикоза, были способны 7 из 8 возбудителей (88%): *Alt. alternata*, *Aur. pullulans*, *Cl. cladosporioides*, *Cl. herbarum*, *Curv. hawaiiensis*, *Curv. lunata*, *Ul. chartarum*.

Грибы, вызывающие феогифомикоз, были обнаружены в содержимом легочной полости (каверна, туберкулема) у 9 из 613 обследованных больных с деструктивными формами туберкулеза (1,5% ДИ 0,7-2,8%). У 3 пациентов был обнаружен гриб *Aur. pullulans*, у 2 – *Alt. alternata*, у 2 – *Cl. cladosporioides*, у 1 – *Cl. herbarum*, у 1 – *Curv. hawaiiensis*. У 2 из 9 больных (22,2%) возбудитель феогифомикоза, выделенный из полости легких, был обнаружен также в другом диагностическом материале. В одном случае гриб *Aur. pullulans*, выделенный из туберкулемы, был обнаружен также в мокроте. В другом случае гриб *Curv. hawaiiensis*, выделенный из каверны у пациентки с фиброзно-кавернозным туберкулезом, был обнаружен ранее в содержимом бронхов.

Грибы, вызывающие феогифомикоз, были обнаружены в содержимом плевральной полости у 6 из 425 обследованных больных с заболеваниями плевры (1,4% ДИ 0,5-3,1%). У 2 пациентов был выделен гриб *Aur. pullulans*, у 2 – *Curv. lunata*, у 1 – *Alt. alternata*, у 1 – *Ul. chartarum*.

По частоте обнаружения у больных туберкулезом при диагностике пневмомикозов 8 возбудителей феогифомикоза были отнесены к двум группам: группе среднераспространенных возбудителей (частота выявления от 0,2% до 1%): 3 вида – *Aur. pullulans*, *Cl. cladosporioides*, *Alt. alternata* и группе редко

встречаемых возбудителей (частота выявления $\leq 0,1\%$): 5 видов – *Curv. lunata*, *Ul. chartarum*, *Cl. herbarum*, *Cl. sphaerospermum*, *Curv. hawaiiensis* (Таблица 31).

Доля больных с признаками феогифомикоза (70 пациентов) от общего числа обследованных на глубокий микоз пациентов составила 0,9% (ДИ 0,7-1,2%).

В целом, по результатам микробиологических и иммунологических исследований к группе высокого риска развития оппортунистического глубокого микоза с поражением легких были отнесены 2198 из 7683 обследованных на глубокий микоз пациентов (28,6% ДИ 27,6-29,6%). Условием для включения больного туберкулезом в данную группу было выявление одного или более из перечисленных лабораторных признаков микоза: повторное выделение гриба рода *Candida* одного вида из мокроты в количестве $>1 \times 10^3$ КОЕ/мл; выделение мицелиального гриба или дрожжевого гриба не из рода *Candida* из мокроты; выделение гриба из содержимого бронхов (ФБС); выделение гриба из легочной ткани (бронхиальный биоптат); выделение гриба из легочной полости; выделение гриба из плевральной полости; выделение гриба с поверхности удаленного из бронхов эндобронхиального клапана; выделение дрожжевого гриба из посева крови; выделение дрожжевого гриба из СМЖ; обнаружение антигенемии (присутствие в крови антигена *Aspergillus*, *Candida* или *Cr. neoformans*).

ГЛАВА 6 Результаты определения чувствительности к противогрибковым препаратам дрожжевых и мицелиальных грибов, выделенных от больных туберкулезом

В данной главе проанализированы результаты исследования чувствительности выделенных от больных туберкулезом клинических штаммов дрожжевых (388 штаммов из 22 видов) и мицелиальных (243 штамма из 12 видов) грибов к 10 современным противогрибковым препаратам: пяти препаратам группы азолов (флуконазол, итраконазол, вориконазол, позаконазол, кетоконазол), трем препаратам группы эхинокандинов (анидулафунгин, каспофунгин, микафунгин), амфотерицину В, флуцитозину.

Для исследовательских целей по определению уровней чувствительности к системным антимикотикам у 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) использованы значения МПК препаратов, полученные при помощи тест-системы «Sensititre».

При оценке уровней чувствительности к антимикотикам у протестированных видов грибов были использованы:

- пограничные значения МПК препаратов CLSI для видов *Candida* spp. [201, 204] (Таблица 7);
- пограничные значения МПК препаратов EUCAST [228] и ориентировочные значения МПК CLSI для видов *Aspergillus* spp. [199] (Таблица 10);
- биологические (эпидемиологические) критерии (МПК ECOFF), дифференцирующие штаммы видов *Candida* spp. на группы «дикого типа» и «не дикого типа» [353, 356];
- преобладающие значения диапазона МПК препарата в системе «Sensititre»: виды с преимущественно низкими и средними значениями МПК препарата расценивались как вероятно чувствительные к антимикотику, виды с преимущественно высокими и максимально высокими значениями – как вероятно устойчивые, виды с широким разбросом значений МПК – как вариативные (Таблица 5).

6.1 Характеристика лекарственной чувствительности дрожжевых грибов

Уровни чувствительности к 10 современных противогрибковым препаратам была проанализированы у обнаруженных возбудителей кандидоза (14 видов), возбудителей криптококкоза (2 вида), возбудителей редких глубоких дрожжевых инфекций из *Ascomycota* (4 вида) и *Basidiomycota* (2 вида).

6.1.1 Характеристика лекарственной чувствительности клинических штаммов 14 видов грибов рода *Candida*

В таблице 34 представлены сведения о числе клинических штаммов 14 видов грибов рода *Candida*, протестированных системой «Sensititre» YeastOne на чувствительность к антифунгальным препаратам.

Таблица 34 – Число штаммов 14 видов грибов рода *Candida*, протестированных системой Sensititre на чувствительность к 10 противогрибковым препаратам

Вид	Препараты, n		
	FZ, IZ, VOR, PZ, CAS, AB, 5FC	AND, MF	KZ
<i>C. albicans</i>	101	80	35
<i>C. dubliniensis</i>	10	10	6
<i>C. famata</i>	2	2	2
<i>C. glabrata</i>	55	45	19
<i>C. guilliermondii</i>	12	12	8
<i>C. kefyr</i>	13	10	7
<i>C. krusei</i>	36	29	14
<i>C. lipolytica</i> (<i>Y. lipolytica</i>)	10	10	5
<i>C. lusitaniae</i>	10	10	4
<i>C. norvegensis</i>	10	10	7
<i>C. parapsilosis</i>	20	18	11
<i>C. rugosa</i>	10	10	6
<i>C. tropicalis</i>	31	22	13
<i>C. zeylanoides</i>	10	10	4
<i>Candida</i> spp.	330	278	141

Примечание: FZ – флуконазол, IZ – итраконазол, VOR – вориконазол, PZ – позаконазол, CAS – каспофунгин, AB – амфотерицин В, 5-FC – флуцитозин, AND – анидулафунгин, MF – микафунгин, KZ – кетоконазол; n – число протестированных штаммов

Исследованные штаммы были выделены из крови (11 штаммов: *C. albicans* (2), *C. glabrata* (2), *C. guilliermondii* (6), *C. parapsilosis* (1)), содержимого легочной полости (4 штамма: *C. albicans* (1), *C. glabrata* (1), *C. kefyr* (1), *C. tropicalis* (1)), содержимого плевральной полости (5 штаммов: *C. albicans* (1), *C. parapsilosis* (3), *C. krusei* (1)), смыва из плевральной полости по дренажной трубке (*C. parapsilosis*

(1)), БАЛ (74), бронхиального смыва (101), бронхиального секрета (8), мокроты (120), отделяемого из зева (6).

В таблицах 35 и 36 обобщены результаты исследования активности препаратов группы азолов – флуконазола, итраконазола, вориконазола, позаконазола, кетоконазола в отношении клинических штаммов *Candida* spp.

Из приведенных в таблицах 35 и 36 данных следует, что из трех триазольных препаратов, широко применяемых для лечения кандидоза – флуконазола, итраконазола и вориконазола наиболее активен против штаммов *Candida* spp. был вориконазол. Среди штаммов видов *Candida*, с установленными клиническими пограничными значениями МПК вориконазола (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* и *C. tropicalis* (188 штаммов)) заметно преобладали чувствительные к препарату (87,2%), а доля устойчивых штаммов составляла менее 2% (Таблица 36). Следует отметить высокую активность вориконазола против *C. krusei* с долей чувствительных штаммов более 91% и отсутствием устойчивых штаммов. Всего было обнаружено три штамма, устойчивых к вориконазолу: *C. albicans* с МПК препарата 1 мкг/мл (выделен из мокроты от ВИЧ-инфицированного пациента), *C. parapsilosis* с МПК 1 мкг/мл (выделен из мокроты) и *C. tropicalis* с МПК 4 мкг/мл (выделен из мокроты). Все три резистентных к вориконазолу штамма обладали перекрестной устойчивостью к препарату флуконазол, а штамм *C. tropicalis* был также устойчив к итраконазолу и, вероятно, к позаконазолу (с МПК > 8 мкг/мл, максимально высокое значение препарата в системе «Sensititre»).

Применив для обнаружения вероятно устойчивых к вориконазолу штаммов остальных 10 видов *Candida* spp. показатель МПК ≥ 2 мкг/мл (наиболее высокое значение показателя устойчивости, установленное CLSI для *C. krusei*) получаем, что в данную группу изолятов попадали пять штаммов *C. glabrata* со значениями МПК 2 мкг/мл (3 штамма; выделены из крови, бронхиального смыва и мокроты), 4 мкг/мл (1 штамм; выделен из крови) и 8 мкг/мл (1 штамм; выделен из мокроты). Обнаруженные у двух штаммов *C. glabrata* значения МПК вориконазола 4 и 8 мкг/мл следует интерпретировать как высокие. Все пять штаммов *C. glabrata* со

сниженной чувствительностью к вориконазолу (включая штаммы – возбудители кандидемии) или 9,1% от общего числа протестированных штаммов проявляли устойчивость и к другим триазольным препаратам: флуконазолу, итраконазолу и, вероятно, позаконазолу (МПК > 8 мкг/мл). Отметим, что штаммы с МПК вориконазола ≥ 2 мкг/мл были обнаружены только у двух видов: *C. glabrata* (5 штаммов) и *C. tropicalis* (1 штамм), а наибольшим среди 330 значений МПК вориконазола для *Candida* spp было значение 8 мкг/мл (штамм *C. glabrata*).

В целом, полученные данные указывают на активность вориконазола против грибов рода *Candida* и, соответственно, высокую вероятность эффективности терапии глубокого кандидоза препаратом вориконазол. Все обнаруженные устойчивые (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*) и вероятно устойчивые (*C. glabrata*) к вориконазолу штаммы обладали перекрестной резистентностью к флуконазолу и сниженной чувствительностью к другим триазолам – итраконазолу (устойчивость (*C. glabrata*, *C. tropicalis*) или дозозависимая чувствительность) и позаконазолу (вероятная устойчивость (*C. glabrata*, *C. tropicalis*) или сниженная чувствительность).

Виды грибов рода *Candida* существенно отличались друг от друга по чувствительности к препарату флуконазол, широко используемого в лечении и профилактике кандидоза. Активность флуконазола в отношении различных видов возбудителей кандидоза имела отличия по диапазонам МПК, значениям МПК₅₀, МПК₉₀, а для видов с установленными пограничными значениями (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*) также и по соотношению чувствительных, дозозависимых и устойчивых штаммов. Для двух возбудителей с низкой чувствительностью к флуконазолу установлены особые правила интерпретации результатов тестирования чувствительности *in vitro*: *C. krusei* – все штаммы вида рассматривают как устойчивые к флуконазолу без интерпретации значения МПК препарата; *C. glabrata* – штаммы вида с МПК ≤ 32 мкг/мл классифицируют как дозозависимые, штаммы с МПК ≥ 64 мкг/мл – как устойчивые ([204]; таблица 7).

Таблица 35 – Сравнительная активность препаратов группы азолов в отношении клинических штаммов 14 видов грибов рода *Candida* (система Sensititre)

Вид n1, n2	Значения МПК	Препарат, МПК (мкг/мл)				
		FZ	IZ	VOR	PZ	KZ
		(n1)	(n1)	(n1)	(n1)	(n2)
<i>C. albicans</i> 101, 35	Диапазон	≤0,12-256	0,015-16	≤0,008-1	≤0,008-0,5	≤0,008-4
	МПК ₅₀	0,5	0,03	≤0,008	0,015	≤0,008
	МПК ₉₀	2	0,25	0,06	0,12	0,5
<i>C. dubliniensis</i> 10, 6	Диапазон	0,25-32	0,015-0,5	≤0,008-0,5	≤0,008-2	≤0,008-0,5
	МПК ₅₀	0,5	0,06	0,03	0,03	0,03
	МПК ₉₀	16	0,5	0,5	1	—
<i>C. famata</i> 2, 2	Диапазон	2-4	0,12-0,25	0,03	0,12-0,25	0,03-0,12
	МПК ₅₀	2	0,12	0,03	0,12	0,03
	МПК ₉₀	—	—	—	—	—
<i>C. glabrata</i> 55, 19	Диапазон	1->256	0,12->16	0,03-8	0,12->8	0,06-4
	МПК ₅₀	16	0,5	0,25	1	0,5
	МПК ₉₀	64	>16	1	>8	4
<i>C. guilliermondii</i> 12, 8	Диапазон	1->256	0,06-0,5	0,03-1	0,06-0,25	0,03-0,25
	МПК ₅₀	8	0,25	0,06	0,12	0,03
	МПК ₉₀	>256	0,25	1	0,25	—
<i>C. kefyr</i> 13, 7	Диапазон	≤0,12-2	0,015-0,12	≤0,008-0,06	≤0,008-0,25	≤0,008-0,06
	МПК ₅₀	0,25	0,03	≤0,008	0,03	≤0,008
	МПК ₉₀	2	0,12	0,06	0,25	—
<i>C. krusei</i> 36, 14	Диапазон	16-64	0,06-0,5	0,06-1	0,06-0,5	0,12-0,5
	МПК ₅₀	64	0,25	0,25	0,25	0,25
	МПК ₉₀	64	0,5	0,5	0,25	0,5
<i>C. lipolytica</i> 10, 5	Диапазон	8-32	0,015-0,12	0,03-0,25	0,015-0,12	0,03-0,25
	МПК ₅₀	16	0,12	0,12	0,06	0,12
	МПК ₉₀	32	0,12	0,12	0,12	—
<i>C. lusitaniae</i> 10, 4	Диапазон	0,5-4	0,06-0,25	≤0,008-0,06	0,015-0,25	≤0,008-0,06
	МПК ₅₀	1	0,06	≤0,008	0,06	0,015
	МПК ₉₀	2	0,12	0,06	0,12	—
<i>C. norvegensis</i> 10, 7	Диапазон	8-32	0,06-0,25	0,06-0,12	0,06-0,12	0,06-0,25
	МПК ₅₀	16	0,12	0,12	0,12	0,12
	МПК ₉₀	32	0,25	0,12	0,12	—
<i>C. parapsilosis</i> 20, 11	Диапазон	0,25-128	0,015-0,5	≤0,008-1	≤0,008-1	≤0,008-0,5
	МПК ₅₀	1	0,03	0,015	0,03	0,015
	МПК ₉₀	16	0,25	0,25	0,25	0,5
<i>C. rugosa</i> 10, 6	Диапазон	2-64	0,03-0,25	0,03-0,25	0,03-1	0,03-0,25
	МПК ₅₀	4	0,12	0,06	0,12	0,12
	МПК ₉₀	16	0,25	0,25	0,25	—
<i>C. tropicalis</i> 31, 13	Диапазон	0,25-64	0,03->16	≤0,008-4	0,015->8	≤0,008-0,5
	МПК ₅₀	2	0,25	0,12	0,25	0,06
	МПК ₉₀	16	0,5	0,5	1	0,25
<i>C. zeylanoides</i> 10, 4	Диапазон	4-32	0,015-0,25	0,015-0,25	0,03-0,25	0,12-0,5
	МПК ₅₀	8	0,12	0,12	0,12	0,25
	МПК ₉₀	16	0,25	0,25	0,25	—

Примечание: FZ – флуконазол, IZ – итраконазол, VOR – вориконазол, PZ – позаконазол, KZ – кетоконазол; n1, n2 – число протестированных штаммов; МПК – минимальная подавляющая концентрация, МПК₅₀ и МПК₉₀ – минимальные значения МПК, необходимые для подавления роста 50% и 90% штаммов

Таблица 36 – Интерпретация значений минимальных подавляющих концентраций флуконазола, итраконазола, вориконазола для клинических штаммов 14 видов грибов рода *Candida* (система Sensititre)¹

Вид n	Препарат; диапазон МПК (мкг/мл); клиническая интерпретация, %								
	FZ			IZ			VOR		
	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R
<i>C. albicans</i> 101	≤0,12-256			0,015-16			≤0,008-1		
	90,1	2,0	7,9	87,1	10,9	2,0	94,1	4,9	1,0
<i>C. dubliniensis</i> 10	0,25-32			0,015-0,5			≤0,008-0,5		
	—	—	—	80,0	20,0	0,0	—	—	—
<i>C. famata</i> 2	2-4			0,12-0,25			0,03		
	—	—	—	50,0	50,0	0,0	—	—	—
<i>C. glabrata</i> 55	1->256			0,12->16			0,03-8		
	—	87,3	12,7	1,8	67,3	30,9	—	—	—
<i>C. guilliermondii</i> 12	1->256			0,06-0,5			0,03-1		
	—	—	—	25,0	75,0	0,0	—	—	—
<i>C. kefyr</i> 13	≤0,12-2			0,015-0,12			≤0,008-0,06		
	—	—	—	100	0,0	0,0	—	—	—
<i>C. krusei</i> 36	16-64			0,06-0,5			0,06-1		
	—	—	100	27,8	72,2	0,0	91,7	8,3	0,0
<i>C. lipolytica</i> 10	8-32			0,015-0,12			0,03-0,25		
	—	—	—	100	0,0	0,0	—	—	—
<i>C. lusitaniae</i> 10	0,5-4			0,06-0,25			≤0,008-0,06		
	—	—	—	90,0	10,0	0,0	—	—	—
<i>C. norvegensis</i> 10	8-32			0,06-0,25			0,06-0,12		
	—	—	—	70,0	30,0	0,0	—	—	—
<i>C. parapsilosis</i> 20	0,25-128			0,015-0,5			≤0,008-1		
	65,0	0,0	35,0	75,0	25,0	0,0	80,0	15,0	5,0
<i>C. rugosa</i> 10	2-64			0,03-0,25			0,03-0,25		
	—	—	—	60,0	40,0	0,0	—	—	—
<i>C. tropicalis</i> 31	0,25-64			0,03->16			≤0,008-4		
	61,3	19,35	19,35	35,5	61,3	3,2	64,5	32,3	3,2
<i>C. zeylanoides</i> 10	4-32			0,015-0,25			0,015-0,25		
	—	—	—	80,0	20,0	0,0	—	—	—
<i>Candida</i> spp. 330	50,6 n=123	23,1 n=56	26,3 n=64	57,6 n=190	36,4 n=120	6,0 n=20	87,2 n=164	11,2 n=21	1,6 n=3

Примечание: FZ – флуконазол, IZ – итраконазол, VOR – вориконазол; n – число протестированных штаммов; МПК – минимальная подавляющая концентрация; S – чувствительные к препарату штаммы (%), SDD – чувствительные-дозозависимые штаммы (%), R – устойчивые штаммы (%)

¹ – По: [201, 204]; пограничные значения МПК препаратов – в таблице 7

Полученные результаты подтверждают в целом низкую чувствительность *C. krusei* (диапазон МПК от 16 до 64 мкг/мл, МПК₅₀ и МПК₉₀ равны 64 мкг/мл) и *C. glabrata* (диапазон МПК от 1 до >256 мкг/мл, МПК₅₀=16 мкг/мл, МПК₉₀=64 мкг/мл) к данному препарату. Вместе с тем, доля штаммов *C. glabrata* с

дозозависимой чувствительностью в 6,9 раз превышала долю устойчивых к флуконазолу штаммов, составляя более 87% от общего.

Устойчивые к флуконазолу клинические штаммы ($\text{МПК} \geq 8$) были обнаружены не только у видов *C. parapsilosis* (35,0%) и *C. tropicalis* (19,4%), но и у высоко чувствительного к препарату возбудителя *C. albicans* (7,9%); доля чувствительных штаммов ($\text{МПК} \leq 2$) у *C. parapsilosis* и *C. tropicalis* превышала 60%, у *C. albicans* – 90%. Перекрестной устойчивостью к флуконазолу и вориконазолу обладали: 1 штамм (1,0%) *C. albicans*, 1 штамм (5,0%) *C. parapsilosis*, 1 штамм (3,2%) *C. tropicalis*. Перекрестная устойчивость к флуконазолу и итраконазолу была выявлена у 1 штамма (3,2%) *C. tropicalis* (описанный ранее полирезистентный к триазольным препаратам штамм, выделенный из мокроты) и у 6 штаммов (10,9%) *C. glabrata* (5 из 6 данных штаммов *C. glabrata* были также определены как вероятно устойчивые к позаконазолу ($\text{МПК} > 8$ мкг/мл) и вориконазолу ($\text{МПК} \geq 2$ мкг/мл)).

Проанализируем выявленный уровень резистентности к флуконазолу клинических штаммов *C. albicans* – вида, обладающего, по литературным сведениям, высокой природной чувствительностью к данному препарату. Около 8% протестированных штаммов гриба были определены как устойчивые к флуконазолу в интервале МПК от 8 до 256 мкг/мл. Следует, однако, учитывать, что 7 из 8 (87,5%) резистентных к флуконазолу штаммов *C. albicans* были выделены от ВИЧ-инфицированных пациентов и только 1 (12,5%) – от пациента без ВИЧ-инфекции (с МПК 8 мкг/мл). Таким образом, доля устойчивых к флуконазолу штаммов *C. albicans*, выделенных от ВИЧ-инфицированных больных, составила 30,4%, а аналогичный показатель для штаммов от ВИЧ-отрицательных пациентов – 1,3% (Таблица 37, Рисунок 68). Отличались также и показатели МПК флуконазола для двух групп изолятов *C. albicans* – границы диапазонов и величины МПК_{50} и МПК_{90} (показатель МПК_{90} для штаммов от больных с ВИЧ-инфекцией, попадал в интервал МПК устойчивых к флуконазолу штаммов *C. albicans*). Сравнение доли устойчивых к флуконазолу штаммов *C. albicans*, выделенных от больных с ВИЧ-инфекцией и без ВИЧ-инфекции, с

применением точного критерия Фишера показало наличие достоверного различия $p=0,00044$. Верхняя граница интервала МПК флуконазола, установленного для штаммов *C. albicans* «дикого типа», имеет низкое значение ($\text{МПК} \leq 0,5$ мкг/мл) [353]; появление у больных туберкулезом отдельных устойчивых к препарату изолятов объясняется, вероятно, развитием вторичной (приобретенной) устойчивости к препарату. Наблюдаемый нетипично высокий уровень резистентности к флуконазолу у штаммов *C. albicans* от больных туберкулезом с ВИЧ-инфекцией связан с широким применением препарата для профилактики и лечения кандидоза у данной группы пациентов и должен учитываться при выборе антифунгальной терапии (следует тестировать чувствительность к флуконазолу штаммов *C. albicans*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов). Наиболее точно природный уровень чувствительности *C. albicans* к флуконазолу отражает величина чувствительных к препарату клинических штаммов, выделенных от ВИЧ-отрицательных пациентов, составившая более 96% (Таблица 37, Рисунок 68).

Таблица 37 – Показатели минимальных подавляющих концентраций препарата флуконазол в отношении штаммов *Candida albicans*, выделенных от ВИЧ-инфицированных и ВИЧ-отрицательных больных туберкулезом (система Sensititre) и их интерпретация¹

Группа штаммов <i>Candida albicans</i>	n	Значения МПК флуконазола (мкг/мл)			Интерпретация					
		Диапазон МПК	МПК ₅₀	МПК ₉₀	S≤2		SDD=4		R≥8	
					абс.	%	абс.	%	абс.	%
Штаммы от ВИЧ-инфицированных пациентов	23	0,25-256	1	128	16	69,6	0	0,0	7	30,4
Штаммы от ВИЧ-отрицательных пациентов	78	≤0,12-8	0,5	2	75	96,1	2	2,6	1	1,3

Примечание: n – число протестированных штаммов; МПК – минимальная подавляющая концентрация, МПК₅₀ и МПК₉₀ – минимальные значения МПК, необходимые для подавления роста 50% и 90% штаммов; S – чувствительные к препарату штаммы (% (n)), SDD – чувствительные-дозозависимые штаммы (% (n)), R – устойчивые штаммы (% (n))

¹ – По: [204]

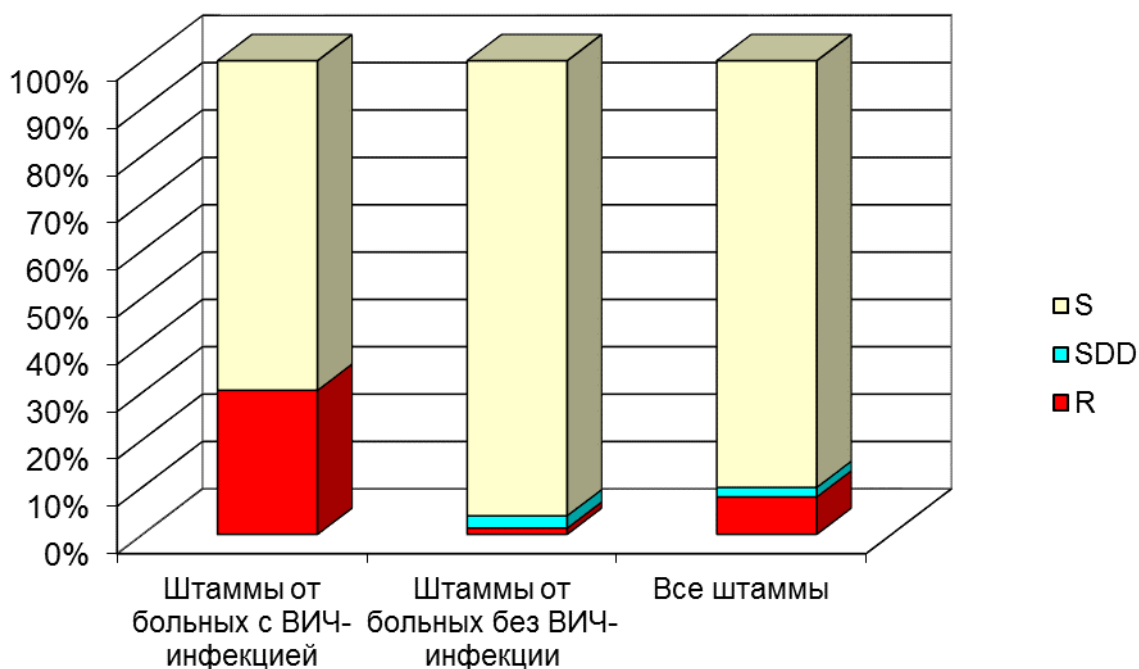


Рисунок 68 – Чувствительность к флуконазолу штаммов *Candida albicans* (%), выделенных от пациентов с ВИЧ-инфекцией и ВИЧ-отрицательных пациентов (штаммы от больных с ВИЧ-инфекцией: n=23; штаммы от больных без ВИЧ-инфекции: n=78; все штаммы: n=101)

Примечание: S — чувствительные к флуконазолу штаммы; SDD — чувствительные-дозозависимые к флуконазолу штаммы; R — устойчивые к флуконазолу штаммы

Для выделения вероятно устойчивых к флуконазолу штаммов и ориентировочной оценки уровня чувствительности к препарату видов *Candida*, не имеющих специфичных пограничных значений, был использован показатель МПК $\geq$ 8 мкг/мл, установленный CLSI для устойчивых к флуконазолу штаммов *C. albicans*, *C. parapsilosis* и *C. tropicalis* [204]. Как видно из таблиц 35 и 36, только у трех из 9 возбудителей с неустановленными клиническими значениями флуконазола верхняя граница диапазона МПК препарата не превышала выбранный для оценки показатель: *C. famata*, *C. kefir* и *C. lusitaniae*. Напротив, у видов *C. lipolytica* и *C. norvegensis* все обнаруженные значения МПК флуконазола попадали в интервал МПК $\geq$ 8 мкг/мл. Более широкие значения диапазонов с вероятно чувствительными и вероятно устойчивыми к флуконазолу штаммами были характерны для видов *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. rugosa* и *C. zeylanoides*.

Штаммы с высокими значениями МПК флуконазола в интервале МПК $\geq$ 64 мкг/мл (установлен для устойчивых к флуконазолу штаммов *C. glabrata*) были

обнаружены у видов *C. guilliermondii* (6 штаммов гемокультур с МПК флуконазола 256 или ≥ 256 мкг/мл; 50,0%) и *C. rugosa* (1 штамм с МПК 64 мкг/мл; 10,0%). Штаммы *Candida* spp. с МПК флуконазола ≥ 64 мкг/мл были обнаружены также у *C. albicans* (4 штамма; 4,0%), *C. glabrata* (7 штаммов; 12,7%), *C. krusei* (20 штаммов; 55,6%), *C. parapsilosis* (1 штамм; 5,0%) и *C. tropicalis* (1 штамм; 3,2%), а общая доля таких изолятов составила 12,1%. Отметим, что все 6 штаммов *C. guilliermondii*, выделенных из крови, обладали крайне низкой чувствительностью к препарату флуконазол с МПК 256 мкг/мл (2 штамма) или ≥ 256 мкг/мл (4 штамма), тогда как чувствительность к флуконазолу у остальных 6 протестированных штаммов *C. guilliermondii* варьировала от 1 до 8 мкг/мл.

На основании полученных данных и с учетом имеющихся в литературе дополнительных сведений, протестированные 14 видов грибов рода *Candida* были разделены на 3 группы по уровню исходной чувствительности к препарату флуконазол (Таблица 38).

Таблица 38 – Распределение 14 видов грибов рода *Candida* по уровню чувствительности к флуконазолу

Группы видов рода <i>Candida</i> ; обнаруженные значения МПК в клинической интерпретации или диапазон МПК (мкг/мл)		
Чувствительные к флуконазолу виды	Виды с вариативной или сниженной чувствительностью	Устойчивые к флуконазолу виды
<i>C. albicans</i> ¹ (S/SDD/R ¹)	<i>C. dubliniensis</i> (0,25-32)	<i>C. krusei</i> (R)
<i>C. kefyr</i> ($\leq 0,12$ -2)	<i>C. famata</i> (2-4)	
<i>C. lusitaniae</i> (0,5-4)	<i>C. glabrata</i> ² (SDD/R)	
	<i>C. guilliermondii</i> (1->256)	
	<i>C. lipolytica</i> (8-32)	
	<i>C. norvegensis</i> (8-32)	
	<i>C. parapsilosis</i> (S/R)	
	<i>C. rugosa</i> (2-64)	
	<i>C. tropicalis</i> (S/SDD/R)	
	<i>C. zeylanoides</i> (4-32)	

Примечание: S – чувствительные к препарату штаммы, SDD – чувствительные-дозозависимые штаммы, R – устойчивые штаммы

¹ – у некоторых штаммов *C. albicans* вероятно развитие вторичной устойчивости к флуконазолу (как правило, у штаммов, выделенных от больных с ВИЧ-инфекцией);

² – вид со сниженной чувствительностью к флуконазолу

Таким образом, при выделении возбудителя глубокого кандидоза целесообразно определять его чувствительность к флуконазолу до начала проведения терапии; результат тестирования крайне важен при обнаружении

гриба из группы видов с вариативной или сниженной чувствительностью к препарату (Таблица 38). Вероятность неэффективности терапии флуконазолом высока в случаях выявления возбудителя с низкой чувствительностью к флуконазолу: *C. krusei* (природная резистентность), *C. glabrata* (сниженная чувствительность), а также штаммов *Candida* spp. с чувствительностью к препарату в диапазоне МПК $\geq$ 64 мкг/мл.

В сравнении с флуконазолом, активность *in vitro* итраконазола в отношении грибов рода *Candida* была выше (Таблицы 35, 36). Общая доля чувствительных и чувствительных-дозозависимых к итраконазолу штаммов *Candida* spp. из 14 видов составила 94,0%. Обращает на себя внимание высокий уровень дозозависимых к препарату штаммов, как у ряда отдельных видов (*C. famata* (50,0%), *C. glabrata* (67,3%), *C. guilliermondii* (75,0%), *C. krusei* (72,2%), *C. rugosa* (40,0%), *C. tropicalis* (61,3)), так и в целом у протестированных 330 штаммов *Candida* (36,4%). Большинство штаммов трех распространенных возбудителей кандидоза *C. glabrata*, *C. krusei* и *C. tropicalis* попадали в категорию штаммов с зависимостью от дозы препарата чувствительностью, что для успешной терапии итраконазолом предполагает использование дозы препарата, превышающую среднюю терапевтическую. Устойчивые к итраконазолу штаммы (с МПК $\geq$ 1 мкг/мл) были обнаружены только у 3 из 14 видов: *C. albicans* (2 штамма с, предположительно, вторичной устойчивостью к препарату; МПК итраконазола 1 и 16 мкг/мл), *C. glabrata* (17 штаммов; МПК от 1 до >16 мкг/мл – 6 штаммов с предельно высокими значениями препарата), *C. tropicalis* (1 штамм; МПК>16 мкг/мл).

Высоко активный в отношении различных грибов *Candida* spp. препарат итраконазол был менее активен против *C. glabrata*: только 1 из 55 (1,8%) протестированных штаммов *C. glabrata* обладал чувствительностью к итраконазолу, а доля устойчивых штаммов превышала 30%. Установленные для *C. glabrata* показатели МПК превосходили аналогичные показатели для других возбудителей: значение МПК₉₀ (>16 мкг/мл) попадало в интервал для устойчивых к итраконазолу штаммов *Candida* spp., а значение МПК₅₀ (0,5 мкг/мл) – в интервал штаммов с дозозависимой чувствительностью (Таблицы 35, 36).

Обнаруженное у клинического штамма *C. albicans* значение МПК итраконазола равное 16 мкг/мл, более чем в 100 раз превышало значение верхнего предела МПК итраконазола для штаммов *C. albicans* «дикого типа» ($\text{МПК} \leq 0,12$ мкг/мл) [353]. С учетом распределения величин МПК для остальных 100 протестированных штаммов *C. albicans*, варьирующих от 0,015 до 1 мкг/мл, невысоких величин МПК_{50} (0,03 мкг/мл) и МПК_{90} (0,25 мкг/мл) (Таблицы 35, 36), закономерно предположить развитие у *C. albicans* вторичной устойчивости к итраконазолу. Отметим, что данный штамм был выделен из мокроты ВИЧ-отрицательного больного туберкулезом легких после проведения повторных курсов лечения итраконазолом (вторичная инфекция бронхов, вызванная *Aspergillus niger*). Обладающий широким спектром активности против плесневых и дрожжевых грибов препарат итраконазол назначают пациентам ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ» для лечения и профилактики вторичных бронхолегочных микозов, главным образом аспергиллеза и кандидоза.

Согласно полученным результатам, в группу видов с вариативной или сниженной чувствительностью к итраконазолу был включен только вид *C. glabrata*, а остальные 13 болезнетворных видов *Candida* – в группу чувствительных к препарату (Таблица 39).

Клинические пограничные значения МПК позаконазола для возбудителей кандидоза не установлены; доля штаммов *Candida* spp. с $\text{МПК} < 1$ мкг/мл, которые оценивают как вероятно чувствительные (Таблица 7), достигала 84,2%. Активность позаконазола в отношении 323 из 330 (97,9%) протестированных штаммов *Candida* spp. была высокой с МПК от $\leq 0,008$ до 2 мкг/мл. Исключение составляли 7 штаммов (2,1%) с максимальными для системы «Sensititre» значениями препарата ($\text{МПК} > 8$ мкг/мл): 6 штаммов *C. glabrata* (10,9%) и 1 штамм *C. tropicalis* (3,2%). Таким образом, даже без установленных к настоящему времени пограничных значений препарата для *Candida* spp., предположительно, были обнаружены штаммы *C. glabrata* и *C. tropicalis*, обладающие устойчивостью к позаконазолу *in vitro*. Выявленные для *C. glabrata* характеристики активности позаконазола значительно отличались от аналогичных показателей для других 13

исследованных видов: наличие у 10,9% штаммов вероятной устойчивости (МПК>8 мкг/мл); преобладание штаммов в интервале МПК от 1 до 2 мкг/мл (40 из 55 изолятов или 72,7%); высокие значения МПК₅₀ (1 мкг/мл) и МПК₉₀ (>8 мкг/мл).

Таблица 39 – Распределение 14 видов грибов рода *Candida* по уровню чувствительности к итраконазолу

Группы видов рода <i>Candida</i> ; обнаруженные значения МПК в клинической интерпретации		
Чувствительные к итраконазолу виды	Виды с вариативной или сниженной чувствительностью	Устойчивые к итраконазолу виды
<i>C. albicans</i> ¹ (S/SDD/R ¹)	<i>C. glabrata</i> ² (S/SDD/R)	—
<i>C. dubliniensis</i> (S/SDD)		
<i>C. famata</i> (S/SDD)		
<i>C. guilliermondii</i> (S/SDD)		
<i>C. kefyr</i> (S)		
<i>C. krusei</i> (S/SDD)		
<i>C. lipolytica</i> (S)		
<i>C. lusitaniae</i> (S/SDD)		
<i>C. norvegensis</i> (S/SDD)		
<i>C. parapsilosis</i> (S/SDD)		
<i>C. rugosa</i> (S/SDD)		
<i>C. tropicalis</i> ¹ (S/SDD/R ¹)		
<i>C. zeylanoides</i> (S/SDD)		

Примечание: S – чувствительные к препарату штаммы, SDD – чувствительные-дозозависимые штаммы, R – устойчивые штаммы

¹ – у отдельных штаммов *C. albicans* и *C. tropicalis* вероятно развитие вторичной устойчивости к итраконазолу;

² – вид со сниженной чувствительностью к итраконазолу

Диапазон МПК кетоконазола для протестированного 141 штамма *Candida* spp. составил ≤0,008-4 мкг/мл, что доказывает его высокую активность *in vitro* против грибов данного рода. У трех из четырех штаммов с наибольшими значениями МПК кетоконазола (4 мкг/мл) была обнаружена устойчивость к флуконазолу: *C. glabrata* (2 штамма гемокультур), *C. albicans* (1).

Таким образом, из 14 возбудителей кандидоза выделялся грибок *C. glabrata*, клинические штаммы которого обладали характерно более низкими уровнями чувствительности к препаратам группы азолов. Выявленные у *C. glabrata* значения показателей МПК₅₀ и МПК₉₀ вориконазола, итраконазола, позаконазола и кетоконазола превышали аналогичные значения для остальных 13 протестированных видов. Согласно полученным результатам, этот распространенный возбудитель кандидоза следует характеризовать как вид со

сниженной чувствительностью к флуконазолу и итраконазолу, и как вид с вариативной чувствительностью к вориконазолу и позаконазолу. Для оценки различия в лекарственной чувствительности штаммов *C. glabrata* (55 штаммов) и группы штаммов *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lipolytica*, *C. lusitaniae*, *C. norvegensis*, *C. parapsilosis*, *C. rugosa*, *C. tropicalis*, *C. zeylanoides* (275 штаммов) к триазолам (флуконазол, итраконазол, вориконазол, позаконазол) использован t-критерий Стьюдента. Выявлены достоверно значимые различия для всех четырех препаратов ($p < 0,01$). Эффективность азольных препаратов в терапии вызванного *C. glabrata* диссеминированного кандидоза может быть весьма ограничена и зависит от индивидуальной чувствительности штамма. У выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов двух гемокультур *C. glabrata* был обнаружен низкий или крайне низкий уровень чувствительности одновременно ко всем азолам: устойчивость к флуконазолу (МПК 128 мкг/мл) и итраконазолу (МПК > 16 мкг/мл), предельно высокие значения МПК позаконазола (> 8 мкг/мл, вероятная устойчивость), высокие значения МПК вориконазола (2 и 4 мкг/мл, вероятная устойчивость) и кетоконазола (4 мкг/мл, максимальное из установленных значений МПК препарата).

Исходно устойчивые к флуконазолу клинические штаммы *C. krusei* проявляли чувствительность к другим триазольным препаратам, применяемым в терапии глубокого кандидоза – вориконазолу, итраконазолу, позаконазолу. Среди изолятов *C. krusei* не было выявлено штаммов, устойчивых к вориконазолу или итраконазолу, или вероятно устойчивых к позаконазолу.

Помимо гриба *C. krusei*, сниженной чувствительностью к флуконазолу обладали и некоторые другие возбудители кандидоза – *C. glabrata* и, вероятно, *C. lipolytica* и *C. norvegensis* (с МПК ≥ 8 мкг/мл), а у большинства исследованных видов была обнаружена вариативная чувствительность к препарату.

Триазольные препараты проявляли активность против частых возбудителей кандидоза грибов *C. albicans*, *C. parapsilosis* и *C. tropicalis*. Однако среди клинических штаммов этих трех видов были обнаружены устойчивые к триазолам

изоляты, что обусловлено развитием вторичной резистентности (часто перекрестной).

Клинические штаммы главного возбудителя кандидоза *C. albicans* сохраняли высокую чувствительность ко всем системным противогрибковым препаратам группы азолов (вориконазолу, итраконазолу, флуконазолу и позаконазолу), с наибольшей долей чувствительных штаммов среди всех видов с установленными пограничными значениями МПК. Высокой чувствительностью к антимикотикам различных групп отличались штаммы *C. albicans*, выделенные из крови (в отличие от возбудителей кандидемии других видов). Вместе с тем, было отмечено накопление у больных туберкулезом с ВИЧ-инфекцией штаммов *C. albicans*, резистентных к флуконазолу.

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 четырем триазольным препаратам (флуконазол (критерии CLSI), итраконазол (критерии CLSI), вориконазол (критерии CLSI или вероятная устойчивость), позаконазол (вероятная устойчивость)) включала 6 штаммов из двух 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.

В таблицах 40–42 обобщены результаты исследования активности препаратов группы эхинокандинов (анидулафунгин, каспофунгин, микафунгин), амфотерицина В и флуцитозина в отношении штаммов грибов рода *Candida*.

Как видно из представленных данных, активность препаратов группы эхинокандинов (анидулафунгин, каспофунгин, микафунгин) против грибов рода *Candida* превышала активность препаратов группы азолов. Не было обнаружено ни одного штамма, устойчивого к анидулафунгину и микафунгину (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*) или штамма с высоким значением МПК, предполагающим наличие устойчивости (остальные *Candida* spp., без установленных клинических критериев интерпретации тестирования). Для выделения вероятно устойчивых к анидулафунгину, каспофунгину и микафунгину штаммов из видов *Candida*, не имеющих специфичных пограничных значений, был использован показатель $\text{МПК} \geq 1$ мкг/мл, установленный для устойчивых к эхинокандинам штаммов *C. albicans*, *C. krusei* и *C. tropicalis* [204].

Фунгицидная активность каспофунгина в отношении штаммов *Candida* spp. была ниже, хотя доля чувствительных штаммов у видов с установленными пограничными значениями МПК (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*) достигала почти 99% от общего. Всего было обнаружено 3 устойчивых к каспофунгину штамма *C. krusei* с МПК 1 мкг/мл (минимальные значения интервала для устойчивых штаммов *C. krusei*), а также 1 штамм *C. zeylanoides* с относительно высоким МПК, равным 2 мкг/мл (для *C. zeylanoides* пограничные значения МПК каспофунгина не установлены).

Таблица 40 – Сравнительная активность препаратов группы эхинокандинов, амфотерицина В и флуцитозина в отношении 14 видов грибов рода *Candida* (система Sensititre)

Вид n1, n2	Значения МПК	Препарат, МПК (мкг/мл)				
		AND	CAS	MF	AB	5FC
		(n1)	(n2)	(n1)	(n2)	(n2)
<i>C. albicans</i> 80, 101	Диапазон	≤0,015-0,12	0,03-0,12	≤0,008-0,06	0,12-2	≤0,03-0,5
	МПК ₅₀	0,03	0,06	≤0,008	0,5	0,06
	МПК ₉₀	0,12	0,12	0,03	0,5	0,12
<i>C. dubliniensis</i> 10, 10	Диапазон	≤0,015-0,06	0,03-0,12	0,015-0,12	0,25-1	≤0,03-8
	МПК ₅₀	0,03	0,06	0,015	0,5	0,06
	МПК ₉₀	0,06	0,12	0,03	0,5	0,12
<i>C. famata</i> 2, 2	Диапазон	0,12-0,25	0,25-0,5	0,03-0,12	0,5	0,06-0,5
	МПК ₅₀	0,12	0,25	0,03	0,5	0,06
	МПК ₉₀	—	—	—	—	—
<i>C. glabrata</i> 45, 55	Диапазон	≤0,015-0,12	0,03-0,12	≤0,008-0,03	0,25-2	≤0,03-0,06
	МПК ₅₀	0,03	0,06	0,015	0,5	0,06
	МПК ₉₀	0,06	0,12	0,015	1	0,06
<i>C. guilliermondii</i> 12, 12	Диапазон	0,12-2	0,06-1	0,06-1	0,12-2	≤0,03-0,12
	МПК ₅₀	0,12	0,12	0,06	1	0,12
	МПК ₉₀	2	0,5	1	2	0,12
<i>C. kefyr</i> 10, 13	Диапазон	0,06-0,12	0,015-0,06	0,015-0,06	0,25-2	0,06-4
	МПК ₅₀	0,12	0,03	0,06	1	1
	МПК ₉₀	0,12	0,06	0,06	1	2
<i>C. krusei</i> 29, 36	Диапазон	≤0,015-0,06	0,06-1	0,06-0,12	0,12-1	2-32
	МПК ₅₀	0,03	0,25	0,12	0,5	8
	МПК ₉₀	0,06	0,25	0,12	1	16
<i>C. lipolytica</i> 10, 10	Диапазон	≤0,015-0,06	0,015-0,12	0,015-0,03	0,12-0,5	≤0,03-4
	МПК ₅₀	≤0,015	0,06	0,015	0,25	0,25
	МПК ₉₀	0,06	0,12	0,03	0,5	2
<i>C. lusitaniae</i> 10, 10	Диапазон	0,06-0,25	0,12-0,5	0,06-0,12	0,25-1	0,06-32
	МПК ₅₀	0,12	0,25	0,06	0,5	0,25
	МПК ₉₀	0,25	0,5	0,12	1	32
<i>C. norvegensis</i> 10, 10	Диапазон	≤0,015-0,03	0,06-0,12	≤0,008-0,015	0,12-0,5	0,5-4
	МПК ₅₀	≤0,015	0,06	0,015	0,25	2
	МПК ₉₀	0,03	0,12	0,015	0,5	4
<i>C. parapsilosis</i> 18, 20	Диапазон	0,12-2	0,25-1	0,25-2	0,12-1	≤0,03-0,5
	МПК ₅₀	1	0,5	1	0,25	0,06
	МПК ₉₀	2	1	2	0,5	0,12
<i>C. rugosa</i> 10, 10	Диапазон	≤0,015-0,5	0,06-0,5	0,015-0,5	0,25-1	0,06-8
	МПК ₅₀	0,03	0,12	0,03	1	0,5
	МПК ₉₀	0,06	0,12	0,06	1	4
<i>C. tropicalis</i> 22, 31	Диапазон	≤0,015-0,25	0,015-0,25	0,015-0,06	0,12-1	≤0,03->64
	МПК ₅₀	0,12	0,06	0,03	0,5	0,06
	МПК ₉₀	0,12	0,12	0,03	1	0,12
<i>C. zeylanoides</i> 10, 10	Диапазон	≤0,015-0,03	0,015-2	0,015-0,03	0,12-0,5	≤0,03-1
	МПК ₅₀	≤0,015	0,06	0,015	0,25	0,25
	МПК ₉₀	0,03	0,12	0,03	0,5	1

Примечание: AND – анидулафунгин, CAS – каспофунгин, MF – микафунгин, AB – амфотерицин В, 5-FC – флуцитозин; n1, n2 – число протестированных штаммов; МПК – минимальная подавляющая концентрация, МПК₅₀ и МПК₉₀ – минимальные значения МПК, необходимые для подавления роста 50% и 90% штаммов

Таблица 41 – Интерпретация значений минимальных подавляющих концентраций анидулафунгина, каспофунгина и микафунгина для клинических штаммов 14 видов грибов рода *Candida* (система Sensititre)¹

Вид n1, n2	Препарат; диапазон МПК (мкг/мл); клиническая интерпретация, %								
	AND			CAS			MF		
	(n1)			(n2)			(n1)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
<i>C. albicans</i> 80, 101	≤0,015-0,12			0,03-0,12			≤0,008-0,06		
	100	0,0	0,0	100	0,0	0,0	100	0,0	0,0
<i>C. dubliniensis</i> 10, 10	≤0,015-0,06			0,03-0,12			0,015-0,12		
	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>C. famata</i> 2, 2	0,12-0,25			0,25-0,5			0,03-0,12		
	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>C. glabrata</i> 45, 55	≤0,015-0,12			0,03-0,12			≤0,008-0,03		
	100	0,0	0,0	100	0,0	0,0	100	0,0	0,0
<i>C. guilliermondii</i> 12, 12	0,12-2			0,06-1			0,06-1		
	100	0,0	0,0	100	0,0	0,0	100	0,0	0,0
<i>C. kefyr</i> 10, 13	0,06-0,12			0,015-0,06			0,015-0,06		
	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>C. krusei</i> 29, 36	≤0,015-0,06			0,06-1			0,06-0,12		
	100	0,0	0,0	91,7	0,0	8,3	100	0,0	0,0
<i>C. lipolytica</i> 10, 10	≤0,015-0,06			0,015-0,12			0,015-0,03		
	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>C. lusitaniae</i> 10, 10	0,06-0,25			0,12-0,5			0,06-0,12		
	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>C. norvegensis</i> 10, 10	≤0,015-0,03			0,06-0,12			≤0,008-0,015		
	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>C. parapsilosis</i> 18, 20	0,12-2			0,25-1			0,25-2		
	100	0,0	0,0	100	0,0	0,0	100	0,0	0,0
<i>C. rugosa</i> 10	≤0,015-0,5			0,06-0,5			0,015-0,5		
	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>C. tropicalis</i> 22, 31	≤0,015-0,25			0,015-0,25			0,015-0,06		
	100	0,0	0,0	100	0,0	0,0	100	0,0	0,0
<i>C. zeylanoides</i> 10, 10	≤0,015-0,03			0,015-2			0,015-0,03		
	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Candida</i> spp. 278, 330	100 n=206	0,0 n=0	0,0 n=0	98,8 n=252	0,0 n=0	1,2 n=3	100 n=206	0,0 n=0	0,0 n=0

Примечание: AND – анидулафунгин, CAS – каспофунгин, MF – микафунгин; n1, n2 – число протестированных штаммов; МПК – минимальная подавляющая концентрация; S – чувствительные к препарату штаммы (%), I – штаммы с промежуточной чувствительностью (%), R – устойчивые штаммы (%)

¹ – По: [204]; пограничные значения МПК препаратов – в таблице 7

Таблица 42 – Интерпретация значений минимальных подавляющих концентраций амфотерицина В и флуцитозина для клинических штаммов 14 видов грибов рода *Candida* (система Sensititre)¹

Вид n1, n2	Препарат; диапазон МПК (мкг/мл); клиническая интерпретация, %					
	AB			5FC		
	S	I	R	S	I	R
<i>C. albicans</i> 101	0,12-2			≤0,03-0,5		
	99,0	1,0	0,0	100	0,0	0,0
<i>C. dubliniensis</i> 10	0,25-1			≤0,03-8		
	100	0,0	0,0	90,0	10,0	0,0
<i>C. famata</i> 2	0,5			0,06-0,5		
	100	0,0	0,0	100	0,0	0,0
<i>C. glabrata</i> 55	0,25-2			≤0,03-0,06		
	98,2	1,8	0,0	100	0,0	0,0
<i>C. guilliermondii</i> 12	0,12-2			≤0,03-0,12		
	50,0	50,0	0,0	100	0,0	0,0
<i>C. kefyr</i> 13	0,25-2			0,06-4		
	92,3	7,7	0,0	100	0,0	0,0
<i>C. krusei</i> 36	0,12-1			2-32		
	100	0,0	0,0	33,3	61,1	5,6
<i>C. lipolytica</i> 10	0,12-0,5			≤0,03-4		
	100	0,0	0,0	100	0,0	0,0
<i>C. lusitaniae</i> 10	0,25-1			0,06-32		
	100	0,0	0,0	80,0	0,0	20,0
<i>C. norvegensis</i> 10	0,12-0,5			0,5-4		
	100	0,0	0,0	100	0,0	0,0
<i>C. parapsilosis</i> 20	0,12-1			≤0,03-0,5		
	100	0,0	0,0	100	0,0	0,0
<i>C. rugosa</i> 10	0,25-1			0,06-8		
	100	0,0	0,0	90,0	10,0	0,0
<i>C. tropicalis</i> 31	0,12-1			≤0,03->64		
	100	0,0	0,0	93,6	0,0	6,4
<i>C. zeylanoides</i> 10	0,12-0,5			≤0,03-1		
	100	0,0	0,0	100	0,0	0,0
<i>Candida</i> spp. 330	97,3 n=321	2,7 n=9	0,0 n=0	90,9 n=300	7,3 n=24	1,8 n=6

Примечание: AB – амфотерицин В, 5-FC – флуцитозин; n – число протестированных штаммов; МПК – минимальная подавляющая концентрация; S – чувствительные к препарату штаммы (%), I – штаммы с промежуточной чувствительностью (%), R – устойчивые штаммы (%)

¹ – По: [201]; пограничные значения МПК препаратов – в таблице 7

Чувствительность к эхинокандинам проявляли все 11 выделенных из крови штаммов возбудителей кандидемии (*C. albicans* (2 штамма), *C. glabrata* (2), *C. guilliermondii* (6), *C. parapsilosis* (1)), тогда как активность препаратов группы азолов в отношении них была снижена: флуконазол был активен против 2 из 11 штаммов гемокультур (*C. albicans* (2)), итраконазол, вориконазол и позаконазол – против 9 из 11 (*C. albicans* (2), *C. guilliermondii* (6), *C. parapsilosis* (1)).

Клинические штаммы видов *C. guilliermondii* и *C. parapsilosis*, имеющих повышенные природные показатели МПК эхинокандинов [6, 204, 258], были классифицированы как чувствительные к анидулафунгину, каспофунгину и микафунгину с МПК препаратов до 1 мкг/мл или до 2 мкг/мл. Согласно полученным результатам, к группе возбудителей с относительно высокими природными величинами МПК эхинокандинов ориентировочно могут быть отнесены виды *C. famata* и *C. lusitaniae* (Таблицы 40, 41).

Среди 330 протестированных штаммов рода *Candida* не было выявлено ни одного штамма, предположительно устойчивого к препарату амфотерицин В (МПК $\geq$ 4 мкг/мл), включая виды с относительно более низкой чувствительностью к данному препарату – *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*. Перечислим группу видов, у которых верхнее значение интервала МПК амфотерицина В составляло 2 мкг/мл (промежуточное значение между диапазонами вероятно чувствительных и вероятно устойчивых штаммов *Candida* spp.): *C. albicans* (обнаружен 1 штамм с МПК 2 мкг/мл; 1,0%), *C. glabrata* (1 штамм; 1,8%), *C. guilliermondii* (6 штаммов гемокультур; 50,0%), *C. kefyr* (1 штамм; 7,7%) (Таблицы 40, 42). У *C. guilliermondii* были обнаружены наиболее высокие значения показателей МПК₉₀ (2 мкг/мл) и МПК₅₀ (1 мкг/мл – вместе с *C. kefyr* и *C. rugosa*), что позволяет охарактеризовать его как возбудитель кандидоза с наиболее низкой чувствительностью к амфотерицину В. Отметим также, что у всех 6 гемокультур *C. guilliermondii* с повышенными значениями МПК амфотерицина В (2 мкг/мл) была обнаружена вероятная резистентность к препарату флуконазол.

В сравнении с амфотерицином В, фунгицидная активность флуцитозина была ниже – общая доля чувствительных штаммов *Candida* spp. составляла около 91%. Устойчивые к препарату штаммы были обнаружены у трех видов: *C. krusei* (5,6%; вид со сниженной природной чувствительностью к флуцитозину, с долей клинических штаммов с промежуточной чувствительностью более 61%), *C. lusitaniae* (20,0%), *C. tropicalis* (6,4%) (Таблицы 40, 42).

Для 9 наиболее распространенных возбудителей кандидоза (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*) была проведена микробиологическая интерпретация результатов тестирования чувствительности к флуконазолу, итраконазолу, вориконазолу, позаконазолу, анидулафунгину, каспофунгину, микафунгину, амфотерицину В, флуцитозину. Распределение клинических штаммов каждого вида на группы «дикого типа» (не имеющие приобретенных механизмов устойчивости к препарату) и «не дикого типа» (с приобретенными механизмами устойчивости) проводили с помощью биологических критериев (МПК ECOFF [353, 356]). Результаты оценки значений МПК 9 антимикотиков, полученных с помощью микробиологических (эпидемиологических) критериев, представлены в таблицах 43 и 44.

Как видно из таблицы 43, общая доля штаммов *Candida* spp. «дикого типа» по чувствительности к триазольным препаратам превышала 75%, составляя от 77,4% (по флуконазолу) до 92,0% (по итраконазолу). Штаммы «не дикого типа» по чувствительности к флуконазолу были обнаружены у 8 из 9 видов: *C. albicans* (25%), *C. dubliniensis* (50%), *C. glabrata* (13%), *C. guilliermondii* (50%), *C. kefyr* (15%), *C. lusitaniae* (10%), *C. parapsilosis* (35%) и *C. tropicalis* (39%). Штаммы «не дикого типа» по чувствительности к итраконазолу были обнаружены у 4 из 8 видов (для *C. kefyr* разделяющее значение ECOFF не установлено): *C. albicans* (13%), *C. dubliniensis* (20%), *C. glabrata* (11%) и *C. tropicalis* (3%). Штаммы «не дикого типа» по чувствительности к вориконазолу были обнаружены у всех 9 видов: *C. albicans* (12%), *C. dubliniensis* (50%), *C. glabrata* (15%), *C. guilliermondii* (50%), *C. kefyr* (15%), *C. krusei* (8%), *C. lusitaniae* (20%), *C. parapsilosis* (20%), *C. tropicalis* (55%). Штаммы «не дикого типа» по чувствительности к позаконазолу были обнаружены у 6 из 9 видов: *C. albicans* (13%), *C. dubliniensis* (20%), *C. glabrata* (11%), *C. lusitaniae* (10%), *C. parapsilosis* (5%) и *C. tropicalis* (52%). Среди 9 проанализированных видов выделялись 2: *C. tropicalis* со значительным числом штаммов «не дикого типа» (составляли до 55% – по вориконазолу) и *C. krusei* с доминированием штаммов «дикого типа» (составляли от 92 до 100%).

Таблица 43 – Распределение штаммов «дикого типа» и «не дикого типа» грибов рода *Candida* по чувствительности к флуконазолу, итраконазолу, вориконазолу, позаконазолу (система Sensititre)¹

Вид n	Препарат, микробиологическая интерпретация по показателям МПК, % (n)							
	FZ		IZ		VOR		PZ	
	ДТ	Не ДТ	ДТ	Не ДТ	ДТ	Не ДТ	ДТ	Не ДТ
<i>C. albicans</i> 101	≤0,5	>0,5	≤0,12	>0,12	≤0,03	>0,03	≤0,06	>0,06
	75,25 (76)	24,75 (25)	87,1 (88)	12,9 (13)	88,1 (89)	11,9 (12)	87,1 (88)	12,9 (13)
<i>C. dubliniensis</i> 10	≤0,5	>0,5	≤0,25	>0,25	≤0,03	>0,03	≤0,12	>0,12
	50,0 (5)	50,0 (5)	80,0 (8)	20,0 (2)	50,0 (5)	50,0 (5)	80,0 (8)	20,0 (2)
<i>C. glabrata</i> 55	≤32	>32	≤2	>2	≤0,5	>0,5	≤2	>2
	87,3 (48)	12,7 (7)	89,1 (49)	10,9 (6)	85,45 (47)	14,55 (8)	89,1 (49)	10,9 (6)
<i>C. guilliermondii</i> 12	≤8	>8	≤1	>1	≤0,25	>0,25	≤0,5	>0,5
	50,0 (6)	50,0 (6)	100 (12)	0,0 (0)	50,0 (6)	50,0 (6)	100 (12)	0,0 (0)
<i>C. kefyr</i> 13	≤1	>1	—	—	≤0,015	>0,015	≤0,25	>0,25
	84,6 (11)	15,4 (2)	—	—	84,6 (11)	15,4 (2)	100 (13)	0,0 (0)
<i>C. krusei</i> 36	≤64	>64	≤1	>1	≤0,5	>0,5	≤0,5	>0,5
	100 (36)	0,0 (0)	100 (36)	0,0 (0)	91,7 (33)	8,3 (3)	100 (36)	0,0 (0)
<i>C. lusitaniae</i> 10	≤2	>2	≤0,5	>0,5	≤0,03	>0,03	≤0,12	>0,12
	90,0 (9)	10,0 (1)	100 (10)	0,0 (0)	80,0 (8)	20,0 (2)	90,0 (9)	10,0 (1)
<i>C. parapsilosis</i> 20	≤2	>2	≤0,5	>0,5	≤0,12	>0,12	≤0,25	>0,25
	65,0 (13)	35,0 (7)	100 (20)	0,0 (0)	80,0 (16)	20,0 (4)	95,0 (19)	5,0 (1)
<i>C. tropicalis</i> 31	≤2	>2	≤0,5	>0,5	≤0,06	>0,06	≤0,12	>0,12
	61,3 (19)	38,7 (12)	96,8 (30)	3,2 (1)	45,2 (14)	54,8 (17)	48,4 (15)	51,6 (16)
<i>Candida</i> spp.	77,4 (223)	22,6 (65)	92,0 (253)	8,0 (22)	79,5 (229)	20,5 (59)	86,5 (249)	13,5 (39)

Примечание: FZ – флуконазол, IZ – итраконазол, VOR – вориконазол, PZ – позаконазол; n – число протестированных штаммов; МПК – минимальная подавляющая концентрация; ДТ – штаммы «дикого типа», Не ДТ – штаммы «не дикого типа»

¹ – По: [353, 356]

В сравнении с азолами, доля штаммов *Candida* spp. «дикого типа» по чувствительности к эхинокандинам была заметно выше – от 97,6% (по каспофунгину) до 99,6% (по анидулафунгину и микафунгину) (Таблица 44). Штаммы «не дикого типа» по чувствительности к каспофунгину были обнаружены у 3 из 9 видов: *C. kefyr* (15%), *C. krusei* (8%) и *C. tropicalis* (7%). К штаммам «не дикого типа» по чувствительности к анидулафунгину относился 1

изолят *C. tropicalis* (5%); к штаммам «не дикого типа» по чувствительности к микафунгину – 1 изолят *C. albicans* (1%).

Таблица 44 – Распределение штаммов «дикого типа» и «не дикого типа» грибов рода *Candida* по чувствительности к эхинокандинам, амфотерицину В, флуцитозину (система Sensititre)¹

Вид n1, n2	Препарат, микробиологическая интерпретация по показателям МПК, % (n)									
	AND		CAS		MF		AB		5FC	
	(n1)		(n2)		(n1)		(n2)		(n2)	
	ДТ	He ДТ	ДТ	He ДТ	ДТ	He ДТ	ДТ	He ДТ	ДТ	He ДТ
<i>C. albicans</i> 80, 101	≤0,12	>0,12	≤0,12	>0,12	≤0,03	>0,03	≤2	>2	≤0,5	>0,5
	100 (80)	0,0 (0)	100 (101)	0,0 (0)	98,75 (79)	1,25 (1)	100 (101)	0,0 (0)	100 (101)	0,0 (0)
<i>C. dubliniensis</i> 10, 10	≤0,12	>0,12	≤0,12	>0,12	≤0,12	>0,12	≤2	>2	≤0,5	>0,5
	100 (10)	0,0 (0)	100 (10)	0,0 (0)	100 (10)	0,0 (0)	100 (10)	0,0 (0)	90,0 (9)	10,0 (1)
<i>C. glabrata</i> 45, 55	≤0,25	>0,25	≤0,12	>0,12	≤0,03	>0,03	≤2	>2	≤0,5	>0,5
	100 (45)	0,0 (0)	100 (55)	0,0 (0)	100 (45)	0,0 (0)	100 (55)	0,0 (0)	100 (55)	0,0 (0)
<i>C. guilliermondii</i> 12, 12	≤4	>4	≤2	>2	≤2	>2	≤2	>2	≤1	>1
	100 (12)	0,0 (0)	100 (12)	0,0 (0)	100 (12)	0,0 (0)	100 (12)	0,0 (0)	100 (12)	0,0 (0)
<i>C. kefyr</i> 10, 13	≤0,25	>0,25	≤0,03	>0,03	≤0,12	>0,12	—	—	—	—
	100 (10)	0,0 (0)	84,6 (11)	15,4 (2)	100 (10)	0,0 (0)	—	—	—	—
<i>C. krusei</i> 29, 36	≤0,12	>0,12	≤0,25	>0,25	≤0,12	>0,12	≤2	>2	≤32	>32
	29 (100)	0 (0,0)	33 (91,7)	3 (8,3)	29 (100)	0 (0,0)	36 (100)	0 (0,0)	36 (100)	0 (0,0)
<i>C. lusitaniae</i> 10, 10	≤2	>2	≤1	>1	≤0,5	>0,5	≤2	>2	≤0,5	>0,5
	100 (10)	0,0 (0)	100 (10)	0,0 (0)	100 (10)	0,0 (0)	100 (10)	0,0 (0)	60,0 (6)	40,0 (4)
<i>C. parapsilosis</i> 18, 20	≤4	>4	≤1	>1	≤4	>4	≤2	>2	≤0,5	>0,5
	100 (18)	0,0 (0)	100 (20)	0,0 (0)	100 (18)	0,0 (0)	100 (20)	0,0 (0)	100 (20)	0,0 (0)
<i>C. tropicalis</i> 22, 31	≤0,12	>0,12	≤0,12	>0,12	≤0,12	>0,12	≤2	>2	≤0,5	>0,5
	95,45 (21)	4,55 (1)	93,55 (29)	6,45 (2)	100 (22)	0,0 (0)	100 (31)	0,0 (0)	93,55 (29)	6,45 (2)
<i>Candida</i> spp.	99,6 (235)	0,4 (1)	97,6 (281)	2,4 (7)	99,6 (235)	0,4 (1)	100 (275)	0,0 (0)	97,45 (268)	2,55 (7)

Примечание: AND – анидулафунгин, CAS – каспофунгин, MF – микафунгин, AB – амфотерицин В, 5-FC – флуцитозин; n1, n2 – число протестированных штаммов; МПК – минимальная подавляющая концентрация; ДТ – штаммы «дикого типа», He ДТ – штаммы «не дикого типа»

¹ – По: [353, 356]

Как видно из таблицы 44, не было выявлено ни одного штамма *Candida* spp., относящегося к штаммам «не дикого типа» по чувствительности к

амфотерицину В. Обнаруженные изоляты с промежуточным пограничным значением МПК 2 мкг/мл попадали в группу штаммов «дикого типа».

Доля штаммов *Candida* spp. «дикого типа» по чувствительности к флуцитозину составила почти 98%. Штаммы «не дикого типа» были выделены у 3 из 8 видов (для *C. kefyr* значение ECOFF не установлено): *C. dubliniensis* (10%), *C. lusitaniae* (40%) и *C. tropicalis* (7%).

Таким образом, было установлено, что среди клинических штаммов грибов рода *Candida* преобладали штаммы «дикого типа» по чувствительности ко всем 9 распространенным системным противогрибковым препаратам, что, в целом, свидетельствует о высоком потенциале их эффективного применения при терапии глубокого кандидоза.

В заключение, изложим основанные на обобщенных результатах исследования рекомендации по целесообразности проведения тестирования чувствительности *in vitro* к лекарственным препаратам у основных и редких возбудителей глубокого кандидоза.

Для определения чувствительности грибов *Candida* и других возбудителей оппортунистических глубоких микозов к антимикотикам в лаборатории следует использовать адаптированную для практических задач стандартизованную и воспроизводимую методику, соответствующую международным стандартам, установленным CLSI [199, 200] или EUCAST [224, 225, 226, 227]. Применение стандартизованных методик позволяет проводить клиническую интерпретацию получаемых значений МПК препаратов, а также дифференцировать штаммы возбудителей по чувствительности к антимикотикам *in vitro* на штаммы «дикого типа» и «не дикого типа».

Использованная в работе для исследования спектров чувствительности *Candida* spp. и других болезнетворных дрожжевых грибов система «Sensititre» (колориметрический тест «YeastOne»), TREK Diagnostic Systems соответствует международному стандарту тестирования чувствительности дрожжевых грибов CLSI [200] и рекомендована для применения в практических микологических лабораториях медицинских клиник [353]. При отсутствии пограничных значений

МПК препарата ориентировочную оценку уровня чувствительности грибов проводят в категориях «вероятно чувствительные к препарату» и «вероятно устойчивые к препарату»; для дифференциации вероятно устойчивых штаммов целесообразно использовать критерии клинической устойчивости для сходных по свойствам возбудителей и уровень значения МПК в диапазоне концентраций препарата в системе «Sensititre» (вероятной устойчивости к препарату соответствуют высокие и максимально высокие значения МПК в системе «Sensititre» (Таблица 5)).

Для диагностических и скрининговых исследований допустимо также использование более доступной и простой в использовании коммерческой тест-системы FUNGIFAST AFG», Elitech MICROBIO с высоким уровнем сходимости результатов с системой «Sensititre» (значения МПК флуконазола, вориконазола, амфотерицина В, флуцитозина для штаммов грибов рода *Candida*). При интерпретации получаемых для *Candida* spp. значений МПК препаратов необходимо использовать установленные CLSI актуальные значения пограничных концентраций антимикотиков. Следует учитывать вероятность ошибки учета результатов при изменениях цвета среды с итраконазолом из-за развития остаточного роста, особенно при тестировании *Candida albicans* (остаточный рост (или затухающий рост) возможен в лунке с МПК итраконазола и в соседних лунках с более высокими концентрациями).

Таким образом, при выборе флуконазола для терапии кандидоза необходимо учитывать:

- наличие природной устойчивости к препарату у вида *C. krusei* – определять чувствительность не требуется (вероятность неэффективности применения флуконазола крайне высока);
- наличие устойчивости у части штаммов *C. glabrata* (возбудитель со сниженной чувствительностью), *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, а также вероятной резистентности у части штаммов ряда редких возбудителей (*C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis*, *C. rugosa*, *C. zeylanoides*) – необходимо определять чувствительность до начала лечения;

- вероятность развития вторичной устойчивости у некоторых штаммов *C. albicans* – целесообразно определять чувствительность у штаммов *C. albicans*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов.

При выборе итраконазола для терапии кандидоза необходимо учитывать:

- наличие устойчивости у значительной части штаммов *C. glabrata* (возбудитель со сниженной чувствительностью) – необходимо определять чувствительность до начала лечения;
- вероятность развития вторичной устойчивости у некоторых штаммов *C. albicans* и *C. tropicalis* – определять чувствительность следует при клинической неэффективности терапии, так как случаи возникновения резистентности крайне редки;
- наличие дозозависимой чувствительности у части штаммов *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, а также у части штаммов ряда редких возбудителей (*C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. norvegensis*, *C. rugosa*, *C. zeylanoides*) – определять чувствительность следует для распознавания чувствительных и дозозависимых к препарату штаммов (дозозависимые штаммы преобладают у *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* и *C. tropicalis*).

При выборе вориконазола для терапии кандидоза необходимо учитывать:

- наличие сниженной чувствительности у части штаммов *C. glabrata* (возбудитель с вариативной чувствительностью) – определять чувствительность следует при клинической неэффективности терапии (в случае кандидемии, вызванной *C. glabrata*, целесообразно определять чувствительность к вориконазолу до начала лечения);
- вероятность развития вторичной устойчивости у некоторых штаммов *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* – определять чувствительность следует при клинической неэффективности терапии, так как случаи возникновения резистентности крайне редки;

- наличие дозозависимой чувствительности у части штаммов *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* – определять чувствительность следует для распознавания чувствительных и дозозависимых к препарату штаммов.

При выборе позаконазола для терапии кандидоза необходимо учитывать:

- вероятность наличия устойчивости к препарату у части штаммов *C. glabrata* (возбудитель с вариативной чувствительностью) – необходимо определять чувствительность до начала лечения.

Высокий уровень фунгицидной активности анидулафунгина и микафунгина в отношении клинических штаммов *Candida* spp. предполагает успешное использование препаратов для эмпирической терапии тяжелых форм кандидоза, в том числе в отделениях реанимации и интенсивной терапии клиник туберкулеза. Проводить определение чувствительности возбудителя кандидоза к анидулафунгину и микафунгину до начала лечения не требуется.

При выборе каспофунгина для терапии кандидоза необходимо учитывать:

- вероятность устойчивости у части штаммов *C. krusei* – необходимо определять чувствительность до начала лечения.

Препарат амфотерицин В высоко активен в отношении клинических штаммов *Candida* spp. и проводить определение чувствительности к данному препарату следует только в случае клинической неэффективности терапии.

Рекомендации по целесообразности проведения тестирования чувствительности *in vitro* к широко применяемым триазольным препаратам (флуконазол, итраконазол, вориконазол), эхинокандинам (анидулафунгин, каспофунгин, микафунгин) и амфотерицину В у различных болезнетворных грибов рода *Candida* перед назначением лекарственной терапии обобщены в таблице 45.

Таблица 45 – Оценка необходимости тестирования чувствительности *in vitro* к семи противогрибковым препаратам у основных и редких возбудителей кандидоза

Вид	Препарат; обнаруженные значения МПК в клинической интерпретации ¹ или диапазон МПК (мкг/мл)						
	FZ	IZ	VOR	AND	CAS	MF	AB
<i>C. albicans</i>	(т) ² S/SDD/R	(т) ² S/SDD/R	(т) ² S/SDD/R	— S	— S	— S	— S/I
<i>C. dubliniensis</i>	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>	(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>	T SDD/R	T S/SDD/R	(т) 0,03-8	— S	— S	— S	— S/I
<i>C. guilliermondii</i>	T 1->256	(т) S/SDD	— 0,03-1	— S	— S	— S	— S/I
<i>C. kefyr</i>	— ≤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>	— R	(т) S/SDD	(т) S/SDD	— S	T S/R	— S	— S
<i>C. lipolytica</i>	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>	— 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>	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>	T S/R	(т) S/SDD	(т) ² S/SDD/R	— S	— S	— S	— S
<i>C. rugosa</i>	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>	T S/SDD/R	(т) ² S/SDD/R	(т) ² S/SDD/R	— S	— S	— S	— S
<i>C. zeylanoides</i>	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; S – чувствительные к препарату штаммы, I – штаммы с вероятной промежуточной чувствительностью (для амфотерицина В), SDD – чувствительные-дозозависимые штаммы, 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;

¹ – По: [201, 204];

² – у отдельных штаммов возможно развитие вторичной устойчивости к препарату

6.1.2 Характеристика лекарственной чувствительности клинических штаммов 8 видов грибов родов *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Hanseniaspora*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saprochaete*

В таблице 46 представлены сведения о числе клинических штаммов дрожжевых грибов родов *Cryptococcus* (2 вида), *Geotrichum* (1 вид), *Hanseniaspora* (1 вид), *Rhodotorula* (2 вида), *Saccharomyces* (1 вид), *Saprochaete* (1 вид), протестированных системой «Sensititre» YeastOne на чувствительность к антифунгальным препаратам. Была изучена чувствительность к антимикотикам у 27 штаммов дрожжевых аскомицетовых грибов (роды *Geotrichum*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, *Saprochaete*) и у 31 штамма дрожжевых базидиомицетовых грибов (роды *Cryptococcus*, *Rhodotorula*).

Таблица 46 – Число штаммов восьми видов грибов из родов *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Hanseniaspora*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saprochaete*, протестированных системой Sensititre на чувствительность к 10 противогрибковым препаратам

Вид	Препараты, n	
	FZ, IZ, VOR, PZ, AND, CAS, MF, AB, 5FC	KZ
<i>Cryptococcus laurentii</i>	3	3
<i>Cr. neoformans</i>	12	12
<i>Geotrichum candidum</i>	14	12
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	1	1
<i>Rhodotorula glutinis</i>	4	4
<i>Rh. mucilaginosa</i>	12	10
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10	6
<i>Saprochaete capitata</i>	2	2
Всего	58	50

Примечание: FZ – флуконазол, IZ – итраконазол, VOR – вориконазол, PZ – позаконазол, AND – анидулафунгин, CAS – каспофунгин, MF – микафунгин, AB – амфотерицин В, 5-FC – флуцитозин, KZ – кетоконазол; n – число протестированных штаммов

Исследованные штаммы были выделены из СМЖ (7 штаммов: *Cr. neoformans*), содержимого легочной полости (3 штамма: *Cr. neoformans* (1), *G. candidum* (2)), содержимого плевральной полости (2 штамма: *G. candidum* (1), *Rh. mucilaginosa* (1)), бронхиального смыва (4 штамма: *Rh. mucilaginosa* (3), *Sacch. cerevisiae* (1)), мокроты (42).

Полученные экспериментальные данные *in vitro* представлены в сводных таблицах 47-49. К настоящему времени критерии клинической интерпретации результатов определения чувствительности дрожжевых грибов *Cryptococcus* spp.,

Geotrichum spp., *Hanseniaspora* spp., *Rhodotorula* spp., *Saccharomyces* spp., *Saprochaete* spp. к антимикотикам не установлены. Согласно рекомендациям по диагностике и лечению криптококкоза IDSA, к устойчивым к флуконазолу возбудителям относят выявленные штаммы *Cryptococcus* с МПК препарата ≥ 16 мкг/мл, к устойчивым флуцитозину возбудителям – штаммы *Cryptococcus* с МПК препарата ≥ 32 мкг/мл [347]. При интерпретации полученных результатов, как вероятно устойчивые к эхинокандинам (анидулафунгин, каспофунгин, микафунгин) расценивались штаммы протестированных видов дрожжей с МПК препарата ≥ 8 мкг/мл.

Таблица 47 – Сравнительная активность препаратов группы азолов в отношении клинических штаммов восьми видов грибов из родов *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Hanseniaspora*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saprochaete* (система Sensititre)

Вид n1, n2	Значения МПК	Препарат, МПК (мкг/мл)				
		FZ	IZ	VOR	PZ	KZ
		(n1)	(n1)	(n1)	(n1)	(n2)
<i>Cr. laurentii</i> 3, 3	Диапазон	2-32	0,12	0,06-0,5	0,12-1	0,03-0,12
	МПК ₅₀	16	0,12	0,12	0,25	0,12
	МПК ₉₀	—	—	—	—	—
<i>Cr. neoformans</i> 12, 12	Диапазон	2-16	0,03-0,5	0,015-0,25	0,03-0,25	0,015-0,06
	МПК ₅₀	4	0,06	0,03	0,12	0,06
	МПК ₉₀	8	0,12	0,06	0,12	0,06
<i>G. candidum</i> 14, 12	Диапазон	2-32	0,06-0,5	0,015-0,25	0,03-1	0,03-0,5
	МПК ₅₀	8	0,25	0,12	0,25	0,12
	МПК ₉₀	32	0,5	0,25	1	0,5
<i>H. uvarum</i> 1, 1	Диапазон	8	0,5	0,25	1	0,25
	МПК ₅₀	—	—	—	—	—
	МПК ₉₀	—	—	—	—	—
<i>Rh. glutinis</i> 4, 4	Диапазон	>256	0,5->16	1-4	1-4	0,12-0,25
	МПК ₅₀	>256	1	2	1	0,12
	МПК ₉₀	—	—	—	—	—
<i>Rh. mucilaginosa</i> 12, 10	Диапазон	256->256	0,5->16	0,5-8	1->8	0,12-0,5
	МПК ₅₀	>256	1	4	2	0,25
	МПК ₉₀	>256	>16	8	>8	0,5
<i>Sacch. cerevisiae</i> 10, 6	Диапазон	0,5-8	0,06-1	0,015-0,25	0,06-1	0,015-0,25
	МПК ₅₀	4	0,25	0,06	0,5	0,06
	МПК ₉₀	8	0,5	0,12	1	—
<i>Sapr. capitata</i> 2, 2	Диапазон	8-16	0,06-0,25	0,12-0,25	0,25-0,5	0,25-0,5
	МПК ₅₀	8	0,06	0,12	0,25	0,25
	МПК ₉₀	—	—	—	—	—

Примечание: FZ – флуконазол, IZ – итраконазол, VOR – вориконазол, PZ – позаконазол, KZ – кетоконазол; n1, n2 – число протестированных штаммов; МПК – минимальная подавляющая концентрация, МПК₅₀ и МПК₉₀ – минимальные значения МПК, необходимые для подавления роста 50% и 90% штаммов

Таблица 48 – Сравнительная активность препаратов группы эхинокандинов, амфотерицина В и флуцитозина в отношении клинических штаммов восьми видов грибов из родов *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Hanseniaspora*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saprochaete* (система Sensititre)

Вид n	Значения МПК	Препарат, МПК (мкг/мл)				
		AND	CAS	MF	AB	5FC
<i>Cr. laurentii</i> 3	Диапазон	0,5->8	1-16	0,25->8	0,25-1	0,12-4
	МПК ₅₀	>8	8	>8	1	2
	МПК ₉₀	—	—	—	—	—
<i>Cr. neoformans</i> 12	Диапазон	>8	16	>8	0,25-1	2-8
	МПК ₅₀	>8	16	>8	0,5	4
	МПК ₉₀	>8	16	>8	1	8
<i>G. candidum</i> 14	Диапазон	≤0,015-2	0,06-16	0,015-0,5	0,25-2	0,06-2
	МПК ₅₀	0,06	0,25	0,03	0,5	0,12
	МПК ₉₀	0,5	2	0,5	1	2
<i>H. uvarum</i> 1	Диапазон	0,03	0,06	0,015	1	≤0,03
	МПК ₅₀	—	—	—	—	—
	МПК ₉₀	—	—	—	—	—
<i>Rh. glutinis</i> 4	Диапазон	>8	16	>8	0,5-1	≤0,03-0,5
	МПК ₅₀	>8	16	>8	0,5	≤0,03
	МПК ₉₀	—	—	—	—	—
<i>Rh. mucilaginosa</i> 12	Диапазон	>8	8->16	>8	0,12-0,5	≤0,03-0,12
	МПК ₅₀	>8	16	>8	0,25	0,06
	МПК ₉₀	>8	16	>8	0,5	0,12
<i>Sacch. cerevisiae</i> 10	Диапазон	0,12-0,25	0,06-0,5	0,06-0,25	0,25-1	0,06-8
	МПК ₅₀	0,12	0,25	0,12	0,5	0,06
	МПК ₉₀	0,25	0,5	0,12	1	8
<i>Sapr. capitata</i> 2	Диапазон	0,25-2	1-8	0,12-0,5	0,5-1	0,12-1
	МПК ₅₀	0,25	1	0,12	0,5	0,12
	МПК ₉₀	—	—	—	—	—

Примечание: AND – анидулафунгин, CAS – каспофунгин, MF – микафунгин, AB – амфотерицин В, 5-FC – флуцитозин; n – число протестированных штаммов; МПК – минимальная подавляющая концентрация, МПК₅₀ и МПК₉₀ – минимальные значения МПК, необходимые для подавления роста 50% и 90% штаммов

Таблица 49 – Сравнительная активность препаратов группы эхинокандинов в отношении клинических штаммов четырех аскомицетовых (из родов *Geotrichum*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, *Saprochaete*) и четырех базидиомицетовых (из родов *Cryptococcus*, *Rhodotorula*) видов грибов (система Sensititre)

Группа штаммов n	Значения МПК	Препарат, МПК (мкг/мл)		
		AND	CAS	MF
Штаммы аскомицетовых грибов 27	Диапазон	≤0,015-2	0,06-16	0,015-1
	МПК ₅₀	0,12	0,25	0,12
	МПК ₉₀	0,5	2	0,5
Штаммы базидиомицетовых грибов 31	Диапазон	0,5->8	1->16	0,25->8
	МПК ₅₀	>8	16	>8
	МПК ₉₀	>8	16	>8

Примечание: AND – анидулафунгин, CAS – каспофунгин, MF – микафунгин; n – число протестированных штаммов; МПК – минимальная подавляющая концентрация, МПК₅₀ и МПК₉₀ – минимальные значения МПК, необходимые для подавления роста 50% и 90% штаммов

Было установлено, что из системных антимикотиков, широко применяемых для лечения глубоких микозов, наибольшую активность против исследованных возбудителей криптококкоза (2 вида) и редких дрожжевых инфекций (6 видов) проявляли амфотерицин В и вориконазол (среди 4 триазольных препаратов).

Препарат амфотерицин В был высоко активен против всех 8 видов дрожжевых грибов со значениями МПК от 0,12 до 2 мкг/мл (обнаружен только 1 из 58 (1,7%) штаммов с относительно высоким значением МПК препарата 2 мкг/мл – *G. candidum* (7,1%)), что предполагает его использование для терапии микозов, обусловленных данными возбудителями, без предварительного тестирования чувствительности *in vitro*. Следует отметить, что наиболее низкие значения показателей МПК₅₀ и МПК₉₀ полиенового препарата амфотерицин В были установлены для вида *Rh. mucilaginosa* (Таблица 48), возбудителя не проявляющего достаточной чувствительности к препаратам других химических групп – эхинокандинам и триазолам.

Штаммы с относительно высокими значениями МПК вориконазола (с МПК $\geq$ 2 мкг/мл) были обнаружены только у грибов *Rhodotorula*: *Rh. glutinis* (3 из 4 штаммов (75,0%), с МПК от 2 до 4 мкг/мл) и *Rh. mucilaginosa* (11 из 12 штаммов (91,7%), с МПК от 2 до 8 мкг/мл). Доля вероятно устойчивых штаммов с МПК вориконазола в диапазоне $\geq$ 4 мкг/мл для *Rh. glutinis* составляла 50%, для *Rh. mucilaginosa* – более 58%. Клинических штаммов из родов *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, *Saprochaete* с вероятной устойчивостью к вориконазолу обнаружено не было (МПК $\leq$ 0,5 мкг/мл).

Как видно из данных таблицы 47, уровни чувствительности к итраконазолу и позаконазолу варьировали у разных видов от относительно высокой (*Cr. neoformans* (высоко чувствительный вид), *Cr. laurentii*, *G. candidum*, *H. uvarum*, *Sacch. cerevisiae*, *Sapr. capitata*) до вариативной и в целом низкой (*Rh. glutinis*, *Rh. mucilaginosa*). Вероятная устойчивость к итраконазолу (с МПК $>$ 16 мкг/мл, максимально высокое значение в системе «Sensititre») была выявлена у 4 штаммов *Rh. mucilaginosa* (33,3%) и одного штамма *Rh. glutinis* (25,0%). Вероятная устойчивость к позаконазолу (с МПК $>$ 8 мкг/мл, максимально высокое

значение в системе «Sensititre») была выявлена у 4 штаммов *Rh. mucilaginosa* (33,3%). Доля штаммов со сниженной чувствительностью к итраконазолу (с МПК $\geq$ 1 мкг/мл) составляла у *Rh. mucilaginosa* 83,3%, у *Rh. glutinis* – 75,0%. Доля штаммов со сниженной чувствительностью к позаконазолу (с МПК $\geq$ 2 мкг/мл) составляла у *Rh. mucilaginosa* 75,0%, у *Rh. glutinis* – 50,0%. Установленные для видов не из рода *Rhodotorula* верхние границы интервалов МПК итраконазола и позаконазола не превышали значения 1 мкг/мл (был обнаружен единственный штамм *Sacch. cerevisiae* с МПК итраконазола 1 мкг/мл).

Чувствительность к флуконазолу исследованных дрожжевых возбудителей была в целом ниже по сравнению с чувствительностью к другим триазольным препаратам – вориконазолу, итраконазолу и позаконазолу (Таблица 47). Было установлено, что флуконазол не активен против штаммов *Rh. glutinis* (МПК $>$ 256 мкг/мл) и *Rh. mucilaginosa* (МПК от 256 до $>$ 256 мкг/мл). С учетом имеющихся в литературе сходных данных [44, 128, 258], красные базидиомицетовые дрожжи *Rh. mucilaginosa* и *Rh. glutinis* следует обозначать как устойчивые к флуконазолу виды, а препарат – как не эффективный при терапии инфекций, вызванных дрожжами *Rhodotorula*. Полученные результаты позволяют также предположить о наличии перекрестной устойчивости *in vitro* к флуконазолу, итраконазолу, вориконазолу и позаконазолу у части штаммов *Rh. mucilaginosa* и *Rh. glutinis*. Было обнаружено 5 полирезистентных к триазолам штаммов *Rhodotorula* spp. (31,3%): 4 штамма *R. mucilaginosa* (33,3%) с МПК флуконазола $>$ 256 мкг/мл, итраконазола $>$ 16 мкг/мл, позаконазола $>$ 8 мкг/мл, вориконазола 8 мкг/мл (3 штамма) и 4 мкг/мл (1 штамм) и 1 штамм *Rh. glutinis* (25,0%) с МПК флуконазола $>$ 256 мкг/мл, итраконазола $>$ 16 мкг/мл, вориконазола и позаконазола 4 мкг/мл.

Чувствительность к флуконазолу базидиомицетовых дрожжей из рода *Cryptococcus* была заметна выше. В интервал МПК $\geq$ 16 мкг/мл, установленный для вероятно устойчивых к флуконазолу штаммов возбудителей криптококкоза [347], попадал 1 из 12 (8,3%) штаммов *Cr. neoformans* (с МПК 16 мкг/мл) и 2 из 3 (66,7%) штаммов *Cr. laurentii* (с МПК 16 и 32 мкг/мл).

Активность флуконазола против штаммов группы аскомицетовых видов (*G. candidum*, *H. uvarum*, *Sacch. cerevisiae*, *Sapr. capitata*) следует оценивать, как несколько сниженную (средние значения МПК препарата в системе «Sensititre»), с преобладанием вероятно чувствительных штаммов. Штаммы с относительно высокими значениями МПК флуконазола в диапазоне 16-32 мкг/мл были обнаружены у *G. candidum* (6 штаммов; 42,9%) и *Sapr. capitata* (1 штамм; 50,0%).

В целом, флуконазол не был активен (МПК $\geq$ 256 мкг/мл – максимальные значения) против 16 из 58 (27,6%) клинических штаммов дрожжей (*Rh. glutinis* – 4 (100,0%), *Rh. mucilaginosa* – 12 (100,0%)); итраконазол не был активен (МПК $>$ 16 мкг/мл – максимальное значение) 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 – максимальное значение) 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%)).

Клинические штаммы всех исследованных видов дрожжей, включая *Rhodotorula* spp., обладали высокой чувствительностью к имидазольному препарату кетоконазол с МПК в интервале от 0,015 до 0,5 мкг/мл.

Согласно полученным данным (установленные диапазоны МПК, показатели МПК₅₀ и МПК₉₀), препараты группы азолов проявляли наибольшую активность против клинических штаммов главного возбудителя криптококкоза, базидиомицетового гриба *Cr. neoformans*. Красные базидиомицетовые дрожжи *Rh. mucilaginosa* и *Rh. glutinis*, напротив, обладали характерно низкой чувствительностью к азольным препаратам, за исключением кетоконазола (возбудители с общей низкой чувствительностью к триазолам). Для штаммов аскомицетовых видов дрожжей и гриба *Cr. laurentii* была характерна относительно высокая чувствительность к вориконазолу, итраконазолу и позаконазолу, и вариативная чувствительность к флуконазолу. Для оценки различия в лекарственной чувствительности группы штаммов рода *Rhodotorula* (16 штаммов из 2 видов) и группы штаммов родов *Cryptococcus*, *Geotrichum*,

Hanseniaspora, *Saccharomyces*, *Saprochaete* (42 штамма из 6 видов) к триазолам (флуконазол, вориконазол, итраконазол, позаконазол) применен критерий Манна-Уитни. Выявлены достоверно значимые различия для всех четырех препаратов ($p < 0,01$).

Как видно из данных таблиц 48 и 49, аскомицетовые и базидиомицетовые дрожжевые грибы имели выраженные отличия по чувствительности к препаратам группы эхинокандинов. Активность эхинокандинов была ограничена только аскомицетовыми дрожжами (*Geotrichum*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, *Saprochaete*), а для базидиомицетовых дрожжей (*Cryptococcus*, *Rhodotorula*) были характерны крайне низкие уровни чувствительности к препаратам данной группы. Высокие или максимально высокие значения МПК анидулафунгина, каспофунгина и микафунгина, предполагающие наличие устойчивости ($\text{МПК} \geq 8$ мкг/мл), были обнаружены для 30 из 31 (96,8%) штаммов базидиомицетов: для всех штаммов *Cr. neoformans*, *Rh. mucilaginosa*, *Rh. glutinis* и 2 из 3 штаммов *Cr. laurentii*. Общие показатели МПК_{50} и МПК_{90} анидулафунгина, каспофунгина и микафунгина, установленные для группы штаммов базидиомицетовых дрожжей превышали значение 8 мкг/мл, что характерно для устойчивых к эхинокандинам возбудителей (Таблица 49). Полученные данные подтверждают имеющиеся в литературе сведения о том, что клеточная стенка дрожжевых базидиомицетов, отличная от клеточной стенки дрожжевых аскомицетов по строению и составу (основные полимеры клеточной стенки, моносахаридный состав), является, предположительно, плохой мишенью для препаратов группы эхинокандинов [44, 142, 213, 251]. Фунгицидное действие эхинокандинов заметно проявлялось на исследованных штаммах аскомицетовых видов дрожжей (Таблица 49). Установленные для *G. candidum*, *H. uvarum*, *Sacch. cerevisiae*, *Sapr. capitata* значения МПК анидулафунгина и микафунгина не предполагают наличие устойчивости и, вероятно, могут отражать их природную чувствительность *in vitro* (у двух (7,4%) штаммов выявлена более низкая чувствительность к анидулафунгину с МПК 2 мкг/мл (*G. candidum*, *Sapr. capitata*)). Были обнаружены 2 из 27 (7,4%) штаммов аскомицетов с вероятной устойчивостью к каспофунгину:

1 штамм *G. candidum* (7,1%) с МПК 16 мкг/мл и 1 штамм *Sapr. capitata* (50,0%) с МПК 8 мкг/мл. Установленную активность каспофунгина против штаммов *G. candidum* и *Sapr. capitata* следует оценивать, как вариативную; уровень активности каспофунгина был выше против штаммов *H. uvarum* и *Sacch. cerevisiae*. Для оценки различия в лекарственной чувствительности групп штаммов аскомицетовых (27 штаммов из 4 видов) и базидиомицетовых (31 штамм из 4 видов) возбудителей дрожжевых микозов к эхинокандинам (анидулафунгин, каспофунгин, микафунгин) применен критерий Манна-Уитни. Выявлены достоверно значимые различия для всех трех препаратов ($p < 0,01$).

Препарат флуцитозин проявлял активность как против аскомицетовых, так и против базидиомицетовых видов дрожжевых грибов с МПК в интервале от $\leq 0,03$ до 8 мкг/мл; наименьший уровень активности препарата (показатели МПК₅₀ и МПК₉₀) был установлен для штаммов *Cr. neoformans* (Таблица 48).

Таким образом, возбудители криптококкоза и редких глубоких дрожжевых инфекций заметно отличались от возбудителей кандидоза по уровням чувствительности к эхинокандинам и триазолам. Чувствительность клинических штаммов дрожжей не из рода *Candida* к триазольным препаратам в значительной мере коррелировала с видовой принадлежностью, а к препаратам группы эхинокандинов — с принадлежностью к аскомицетовым (наличие вероятной чувствительности) или базидиомицетовым (наличие природной устойчивости) грибам. Было установлено, что активностью *in vitro* в отношении выделенных штаммов *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). Штаммы видов *Rh. glutinis* и *Rh. mucilaginosa* отличала природная устойчивость ко всем эхинокандинам, низкая чувствительность ко всем триазольным препаратам (устойчивость к флуконазолу) и наличие чувствительности *in vitro* к амфотерицину В, флуцитозину и кетоконазолу.

На основании вышеизложенного, в таблице 50 приведены рекомендации по целесообразности проведения тестирования чувствительности к 7 распространенным лекарственным препаратам у оппортунистических грибов *Cr. laurentii*, *Cr. neoformans*, *G. candidum*, *H. uvarum*, *Rh. glutinis*, *Rh. mucilaginosa*, *Sacch. cerevisiae*, *Sapr. capitata*. Препарат флуконазол для лечения криптококкоза (*Cr. laurentii*, *Cr. neoformans*) и глубоких микозов, вызванных аскомицетовыми дрожжевыми грибами не из рода *Candida*, целесообразно использовать после определения у возбудителя чувствительности к данному антимикотику *in vitro*.

Таблица 50 – Оценка необходимости тестирования чувствительности *in vitro* к семи противогрибковым препаратам у возбудителей криптококкоза и редких дрожжевых микозов

Вид	Препарат, обнаруженный диапазон МПК (мкг/мл) и первично устойчивые к препарату виды						
	FZ	IZ	VOR	AND	CAS	MF	AB
<i>Cr. laurentii</i>	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>	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>	T 2-32	(т) 0,06-0,5	(т) 0,015-0,25	(т) ≤0,015-2	T 0,06-16	(т) 0,015-0,5	— 0,25-2
<i>H. uvarum</i>	T 8	(т) 0,5	(т) 0,25	(т) 0,03	(т) 0,06	(т) 0,015	— 1
<i>Rh. glutinis</i>	— R >256	T 0,5->16	T 1-4	— R >8	— R 16	— R >8	— 0,5-1
<i>R. mucilaginosa</i>	— R 256->256	T 0,5->16	T 0,5-8	— R >8	— R 8->16	— R >8	— 0,12-0,5
<i>S. cerevisiae</i>	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>	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; 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

6.2 Характеристика лекарственной чувствительности мицелиальных грибов рода *Aspergillus*

6.2.1 Совершенствование методов получения споровой суспензии чистых культур возбудителей аспергиллеза

Получение споровой суспензии выделенной чистой культуры возбудителя аспергиллеза и других плесневых микозов (зигомикоза, гиалогифомикозов, феогифомикозов) – важный этап тестирования чувствительности к лекарственным препаратам, влияющий на достоверность результатов исследования. Споровая суспензия штаммов *Aspergillus* spp. и иных мицелиальных грибов, исследуемых на чувствительность *in vitro* к антимикотикам, не должна содержать обрывков мицелия (это может приводить к неверным результатам из-за более интенсивного роста внесенных зачатков культуры).

В работе была использована модифицированная нами методика приготовления споровой суспензии грибов *Aspergillus* spp. для инокуляции в планшеты «Sensititre», повышающая достоверность получаемых результатов (надежное удаление обрывков мицелия из споровой суспензии с помощью фильтрования) и безопасность проведения тестирования чувствительности для персонала лаборатории (использование для пересева штаммов возбудителей аспергиллеза пробирок со скошенным агаром вместо чашек Петри). Тестируемый штамм рода *Aspergillus* пересевали в пробирку со скошенным агаром, со средой картофельно-декстрозный агар или агар Чапека–Докса и инкубировали в течение 5-7 суток при 35°C (проводился визуальный контроль развития спороношения культуры и интенсивности конидиогенеза; для получения более быстрого спороношения предпочтительно использование картофельно-декстрозного агара); перед инокуляцией планшета: в пробирку с культурой стерильной пипеткой добавляли 5 мл стерильного физиологического раствора с 0,05% Твин 20 и легко встряхивали на миксере типа Вортекс в течение 1-3 мин., полученную споровую суспензию фильтровали через стерильный фильтр с диаметром пор 10-11 мкм [199] (при невозможности использовать стерильные фильтры их заменяли на стерильную марлю, сложенную в два слоя) и далее полученный фильтрат

доводили до необходимой плотности споровой суспензии с помощью физиологического раствора, определяя ее по методике «Sensititre» на нефелометре (до 0,5 ед. по МакФарланду). Перед инокуляцией споровой суспензии в пробирку с бульоном для грибов «Sensititre», в случае необходимости, проводили контрольное микроскопическое исследование с помощью камеры Горяева, для определения в суспензии концентрации конидий (КОЕ/мл) и подтверждения отсутствия фрагментов мицелия.

Данную модифицированную методику приготовления споровой суспензии мы рекомендуем применять при определении уровней чувствительности к антимикотикам у возбудителей аспергиллеза как с помощью метода микроразведений, так и диско-диффузионного метода (см. подглаву 6.3). При использовании методики для тестирования возбудителей зигомикоза (наиболее быстрорастущие виды), гиалогифомикозов и феогифомикозов следует скорректировать время инкубации штаммов в пробирке со скошенным агаром – в зависимости от развития спороношения культуры (визуальный контроль, при необходимости микроскопическое исследование).

6.2.2 Характеристика лекарственной чувствительности клинических штаммов 12 видов грибов рода *Aspergillus*

В таблице 51 представлены сведения о числе клинических штаммов 12 видов грибов рода *Aspergillus*, протестированных системой «Sensititre» YeastOne на чувствительность к антифунгальным препаратам.

Исследованные штаммы были выделены из содержимого легочной полости (59 штаммов: *A. flavus* (5), *A. fumigatus* (37), *A. glaucus* (1), *A. niger* (5), *A. ochraceus* (1), *A. terreus* (8), *A. versicolor* (2)), содержимого плевральной полости (19 штаммов: *A. flavus* (3), *A. fumigatus* (3), *A. glaucus* (1), *A. nidulans* (3), *A. niger* (2), *A. sydowii* (1), *A. terreus* (3), *A. ustus* (2), *A. versicolor* (1)), БАЛ (16), бронхиального смыва (77), бронхиального секрета (11), мокроты (61).

Таблица 51 – Число штаммов 12 видов грибов рода *Aspergillus*, протестированных системой Sensititre на чувствительность к 10 противогрибковым препаратам

Вид	Препараты, n	
	VOR, IZ, PZ, KZ, FZ, CAS, AB, 5FC	AND, MF
<i>A. flavipes</i>	5	2
<i>A. flavus</i>	30	14
<i>A. fumigatus</i>	77	15
<i>A. glaucus</i>	12	10
<i>A. nidulans</i>	11	4
<i>A. niger</i>	32	12
<i>A. ochraceus</i>	11	4
<i>A. oryzae</i>	5	2
<i>A. sydowii</i>	12	5
<i>A. terreus</i>	22	11
<i>A. ustus</i>	13	7
<i>A. versicolor</i>	13	9
<i>Aspergillus</i> spp.	243	95

Примечание: VOR – вориконазол, IZ – итраконазол, PZ – позаконазол, KZ – кетоконазол, FZ – флуконазол, CAS – каспофунгин, AB – амфотерицин В, 5-FC – флуцитозин, AND – анидулафунгин, MF – микафунгин; n – число протестированных штаммов

К настоящему времени критерии клинической интерпретации результатов определения чувствительности *in vitro* грибов рода *Aspergillus* к антимикотикам организацией CLSI не установлены. Как вероятно чувствительные к амфотерицину В расценивают штаммы *Aspergillus* spp. с МПК < 2 мкг/мл, как вероятно устойчивые – штаммы с МПК > 2 мкг/мл; как вероятно устойчивые к итраконазолу оценивают штаммы с МПК > 8 мкг/мл [199]. Для клинической интерпретации результатов определения чувствительности были использованы критерии EUCAST: пограничные значения МПК амфотерицина В (установлены для *A. fumigatus*, *A. niger*: S ≤ 1, I = 2, R > 2 мкг/мл; все штаммы исходно резистентного гриба *A. terreus* обозначают как устойчивые к препарату); пограничные значения МПК вориконазола (установлены для *A. fumigatus*: S ≤ 1, I = 2, R > 2 мкг/мл); пограничные значения МПК итраконазола (установлены для *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. terreus*: S ≤ 1, I = 2, R > 2 мкг/мл); пограничные значения МПК позаконазола (установлены для *A. fumigatus*, *A. terreus*: S ≤ 0,12, I = 0,25, R > 0,25 мкг/мл) [228]. При интерпретации полученных результатов, как вероятно устойчивые к амфотерицину В и триазолам (вориконазол, итраконазол, позаконазол) расценивались штаммы *Aspergillus* spp. с МПК препарата ≥ 4 мкг/мл.

По результатам тестирования, выраженная активность против клинических штаммов *Aspergillus* spp. была выявлена у пяти препаратов: вориконазола, итраконазола, позаконазола, кетоконазола (менее активен, чем остальные препараты группы азолов) и амфотерицина В (Таблицы 52-55).

Было установлено, что применяемые в терапии аспергиллеза триазольные препараты (вориконазол, итраконазол, позаконазол) проявляли, в целом, высокую активность против клинических штаммов грибов рода *Aspergillus*. Как видно из данных таблицы 53, ни у одного вида, с установленными пограничными значениями МПК (Таблица 10), не выявлено штаммов, устойчивых к вориконазолу, итраконазолу или позаконазолу.

Доля высокочувствительных к вориконазолу клинических штаммов *Aspergillus* spp. (с $\text{МПК} \leq 1$ мкг/мл) составила 94,2% (229 из 243 штаммов). К данной группе относились все штаммы *A. flavipes*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. glaucus*, *A. ochraceus*, *A. oryzae*, *A. terreus* (у 7 из 12 возбудителей) (Таблицы 52, 53). Высокие значения МПК вориконазола ≥ 4 мкг/мл (вероятная устойчивость) были выявлены у 10 (4,1%) штаммов *Aspergillus* spp. из 3 видов: с МПК 4 мкг/мл – у *A. ustus* (4 штамма), *A. nidulans* (1 штамм); с МПК 8 мкг/мл – у *A. ustus* (4 штамма), *A. niger* (1 штамм). В отсутствие установленных для *A. nidulans*, *A. niger*, *A. ustus* критериев клинической интерпретации сложно провести корреляцию данных *in vitro* с ожидаемыми результатами *in vivo*, однако отметим сниженную чувствительность вида *A. ustus* к препарату вориконазол. У *A. ustus* обнаружены высокие значения МПК_{50} и МПК_{90} (Таблица 52), заметно превосходящие аналогичные значения у других видов, а доля вероятно устойчивых к вориконазолу штаммов с $\text{МПК} \geq 4$ мкг/мл составила 61,5%.

Таблица 52 – Сравнительная активность препаратов группы азолов в отношении клинических штаммов 12 видов грибов рода *Aspergillus* (система Sensititre)

Вид n	Значения МПК	Препарат, МПК (мкг/мл)				
		VOR	IZ	PZ	KZ	FZ
<i>A. flavipes</i> 5	Диапазон	0,12-0,5	0,12-0,25	0,06-0,25	0,25-0,5	64-128
	МПК ₅₀	0,25	0,25	0,12	0,25	128
	МПК ₉₀	—	—	—	—	—
<i>A. flavus</i> 30	Диапазон	0,12-1	0,06-0,5	0,06-0,5	0,25-4	128->256
	МПК ₅₀	0,5	0,25	0,25	2	>256
	МПК ₉₀	0,5	0,5	0,25	4	>256
<i>A. fumigatus</i> 77	Диапазон	0,06-1	0,03-1	0,015-0,25	1-16	256->256
	МПК ₅₀	0,25	0,25	0,12	4	>256
	МПК ₉₀	0,5	0,5	0,25	8	>256
<i>A. glaucus</i> 12	Диапазон	0,03-0,25	0,015-0,12	0,015-0,06	0,03-1	32->256
	МПК ₅₀	0,12	0,06	0,03	0,25	>256
	МПК ₉₀	0,25	0,06	0,06	0,5	>256
<i>A. nidulans</i> 11	Диапазон	0,06-4	0,06-2	0,06->8	0,25-8	128->256
	МПК ₅₀	0,12	0,12	0,25	1	>256
	МПК ₉₀	0,25	0,25	0,5	2	>256
<i>A. niger</i> 32	Диапазон	0,25-8	0,25-2	0,12-0,5	4->16	>256
	МПК ₅₀	0,5	0,5	0,25	8	>256
	МПК ₉₀	1	1	0,5	16	>256
<i>A. ochraceus</i> 11	Диапазон	0,06-1	0,12-0,5	0,06-0,5	1-16	>256
	МПК ₅₀	0,25	0,5	0,25	8	>256
	МПК ₉₀	0,5	0,5	0,5	16	>256
<i>A. oryzae</i> 5	Диапазон	0,25-0,5	0,06-0,25	0,06-0,12	1-4	256->256
	МПК ₅₀	0,5	0,12	0,12	2	256
	МПК ₉₀	—	—	—	—	—
<i>A. sydowii</i> 12	Диапазон	0,25-2	0,25-1	0,06-1	0,5-8	>256
	МПК ₅₀	0,5	0,5	0,25	2	>256
	МПК ₉₀	1	1	0,5	4	>256
<i>A. terreus</i> 22	Диапазон	0,12-1	0,12-0,25	0,06-0,25	1-16	256->256
	МПК ₅₀	0,25	0,25	0,12	2	>256
	МПК ₉₀	0,5	0,25	0,25	8	>256
<i>A. ustus</i> 13	Диапазон	0,25-8	0,12->16	0,12->8	0,25->16	>256
	МПК ₅₀	4	1	0,5	2	>256
	МПК ₉₀	8	>16	>8	16	>256
<i>A. versicolor</i> 13	Диапазон	0,12-2	0,12-1	0,03-0,5	0,25-4	256->256
	МПК ₅₀	0,25	0,5	0,25	1	>256
	МПК ₉₀	1	0,5	0,5	2	>256

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

Таблица 53 – Интерпретация значений минимальных подавляющих концентраций вориконазола, итраконазола, позаконазола для клинических штаммов 12 видов грибов рода *Aspergillus* (система Sensititre)¹

Вид n	Препарат; диапазон МПК (мкг/мл); клиническая интерпретация, %								
	VOR			IZ			PZ		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
<i>A. flavipes</i> 5	0,12-0,5			0,12-0,25			0,06-0,25		
	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>A. flavus</i> 30	0,12-1			0,06-0,5			0,06-0,5		
	—	—	—	100	0,0	0,0	—	—	—
<i>A. fumigatus</i> 77	0,06-1			0,03-1			0,015-0,25		
	100	0,0	0,0	100	0,0	0,0	89,6	10,4	0,0
<i>A. glaucus</i> 12	0,03-0,25			0,015-0,12			0,015-0,06		
	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>A. nidulans</i> 11	0,06-4			0,06-2			0,06->8		
	—	—	—	90,9	9,1	0,0	—	—	—
<i>A. niger</i> 32	0,25-8			0,25-2			0,12-0,5		
	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>A. ochraceus</i> 11	0,06-1			0,12-0,5			0,06-0,5		
	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>A. oryzae</i> 5	0,25-0,5			0,06-0,25			0,06-0,12		
	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>A. sydowii</i> 12	0,25-2			0,25-1			0,06-1		
	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>A. terreus</i> 22	0,12-1			0,12-0,25			0,06-0,25		
	—	—	—	100	0,0	0,0	77,3	22,7	0,0
<i>A. ustus</i> 13	0,25-8			0,12->16			0,12->8		
	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>A. versicolor</i> 13	0,12-2			0,12-1			0,03-0,5		
	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Aspergillus</i> spp. 243	100 n=77	0,0 n=0	0,0 n=0	99,3 n=139	0,7 n=1	0,0 n=0	86,9 n=86	13,1 n=13	0,0 n=0

Примечание: VOR – вориконазол, IZ – итраконазол, PZ – позаконазол; n – число протестированных штаммов; МПК – минимальная подавляющая концентрация; S – чувствительные к препарату штаммы (%), I – штаммы с промежуточной чувствительностью (%), R – устойчивые штаммы (%)

¹ – По: [228]; пограничные значения МПК препаратов – в таблице 10

Таблица 54 – Сравнительная активность амфотерицина В, флуцитозина и препаратов группы эхинокандинов в отношении клинических штаммов 12 видов грибов рода *Aspergillus* (система Sensititre)

Вид n1, n2	Значения МПК	Препарат, МПК (мкг/мл)				
		AB	5FC	AND	CAS	MF
		(n1)	(n1)	(n2)	(n1)	(n2)
<i>A. flavipes</i> 5, 2	Диапазон	0,5-1	1->64	>8	>16	>8
	МПК ₅₀	1	>64	>8	>16	>8
	МПК ₉₀	–	–	–	–	–
<i>A. flavus</i> 30, 14	Диапазон	2-8	32->64	>8	>16	>8
	МПК ₅₀	2	>64	>8	>16	>8
	МПК ₉₀	4	>64	>8	>16	>8
<i>A. fumigatus</i> 77, 15	Диапазон	0,5-2	32->64	>8	8->16	>8
	МПК ₅₀	1	>64	>8	>16	>8
	МПК ₉₀	2	>64	>8	>16	>8
<i>A. glaucus</i> 12, 10	Диапазон	0,5-1	4-64	≤0,015	0,015->16	≤0,008
	МПК ₅₀	0,5	8	≤0,015	0,03	≤0,008
	МПК ₉₀	1	32	≤0,015	0,06	≤0,008
<i>A. nidulans</i> 11, 4	Диапазон	0,5-2	64->64	>8	>16	>8
	МПК ₅₀	1	>64	>8	>16	>8
	МПК ₉₀	2	>64	–	>16	–
<i>A. niger</i> 32, 12	Диапазон	0,5-2	8->64	>8	>16	>8
	МПК ₅₀	1	64	>8	>16	>8
	МПК ₉₀	2	>64	>8	>16	>8
<i>A. ochraceus</i> 11, 4	Диапазон	2-8	4->64	>8	>16	>8
	МПК ₅₀	4	32	>8	>16	>8
	МПК ₉₀	8	>64	–	>16	–
<i>A. oryzae</i> 5, 2	Диапазон	1-4	>64	>8	>16	>8
	МПК ₅₀	2	>64	>8	>16	>8
	МПК ₉₀	–	–	–	–	–
<i>A. sydowii</i> 12, 5	Диапазон	1-4	8->64	>8	8->16	>8
	МПК ₅₀	2	32	>8	>16	>8
	МПК ₉₀	4	>64	>8	>16	>8
<i>A. terreus</i> 22, 11	Диапазон	2-8	64->64	>8	4->16	>8
	МПК ₅₀	4	>64	>8	>16	>8
	МПК ₉₀	4	>64	–	>16	–
<i>A. ustus</i> 13, 7	Диапазон	1-4	32->64	>8	16->16	>8
	МПК ₅₀	2	64	>8	>16	>8
	МПК ₉₀	4	>64	–	>16	–
<i>A. versicolor</i> 13, 9	Диапазон	0,25-4	16-64	>8	8->16	>8
	МПК ₅₀	2	16	>8	>16	>8
	МПК ₉₀	4	64	–	>16	–

Примечание: AB – амфотерицин В, 5-FC – флуцитозин, AND – анидулафунгин, CAS – каспофунгин, MF – микафунгин; n1, n2 – число протестированных штаммов; МПК – минимальная подавляющая концентрация, МПК₅₀ и МПК₉₀ – минимальные значения МПК, необходимые для подавления роста 50% и 90% штаммов

Таблица 55 – Интерпретация значений минимальных подавляющих концентраций амфотерицина В для клинических штаммов 12 видов грибов рода *Aspergillus* (система Sensititre)¹

Вид n	Диапазон МПК (мкг/мл); клиническая интерпретация, %		
	S	I	R
<i>A. flavipes</i> 5	0,5-1		
	—	—	—
<i>A. flavus</i> 30	2-8		
	—	—	—
<i>A. fumigatus</i> 77	0,5-2		
	66,2	33,8	0,0
<i>A. glaucus</i> 12	0,5-1		
	—	—	—
<i>A. nidulans</i> 11	0,5-2		
	—	—	—
<i>A. niger</i> 32	0,5-2		
	71,9	28,1	0,0
<i>A. ochraceus</i> 11	2-8		
	—	—	—
<i>A. oryzae</i> 5	1-4		
	—	—	—
<i>A. sydowii</i> 12	1-4		
	—	—	—
<i>A. terreus</i> 22	2-8		
	0,0	0,0	100
<i>A. ustus</i> 13	1-4		
	—	—	—
<i>A. versicolor</i> 13	0,25-4		
	—	—	—
<i>Aspergillus</i> spp. 243	56,5 n=74	26,7 n=35	16,8 n=22

Примечание: n – число протестированных штаммов; МПК – минимальная подавляющая концентрация; S – чувствительные к препарату штаммы (%), I – штаммы с промежуточной чувствительностью (%), R – устойчивые штаммы (%)

¹ – По: [228]; пограничные значения МПК – в таблице 10

Доля высокочувствительных к итраконазолу штаммов *Aspergillus* spp. (с МПК ≤ 1 мкг/мл) составила 96,7% (235 из 243 штаммов). В данную группу попадали все штаммы *A. flavipes*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. glaucus*, *A. ochraceus*, *A. oryzae*, *A. sydowii*, *A. terreus*, *A. versicolor* (у 9 из 12 возбудителей) (Таблицы 52, 53). Устойчивость *in vitro* к итраконазолу была выявлена у 2 штаммов *A. ustus* (0,8%) с максимальным значением МПК препарата >16 мкг/мл (величина МПК итраконазола >8 мкг/мл ассоциируется с вероятной клинической устойчивостью возбудителей аспергиллеза [199]). Других штаммов *Aspergillus* spp. с высокими

значениями МПК итраконазола ≥ 4 мкг/мл (вероятная устойчивость) обнаружено не было. Значение МПК₉₀ итраконазола для *A. ustus* превосходили аналогичные показатели для других *Aspergillus* spp. (Таблица 52); доля устойчивых штаммов *A. ustus* составила 15,4%.

Доля высокочувствительных к позаконазолу штаммов *Aspergillus* spp. (с МПК $\leq 0,12$ мкг/мл) составляла 54,7% (133 из 243 штаммов); в интервал с относительно низкими величинами МПК препарата (МПК $\leq 0,5$ мкг/мл) попадали значения для 235 из 243 штаммов (96,7%): все штаммы *A. flavipes*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. glaucus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. oryzae*, *A. terreus*, *A. versicolor* (у 9 из 12 возбудителей). Были обнаружены 5 штаммов с максимально высокими значениями МПК позаконазола > 8 мкг/мл: у *A. ustus* (4 штамма), *A. nidulans* (1 штамм); также обнаружен 1 штамм *A. ustus* с высоким значением МПК препарата 4 мкг/мл. Общая доля вероятно устойчивых к позаконазолу штаммов *Aspergillus* spp. в диапазоне МПК ≥ 4 мкг/мл составила 2,5% (6 штаммов из 2 видов). Также как в случаях с вориконазолом и итраконазолом, величины МПК₅₀ и МПК₉₀ позаконазола для *A. ustus* превосходили аналогичные показатели для других *Aspergillus* spp. (Таблица 52).

Таким образом, среди *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%)). Только у 3 из 12 возбудителей аспергиллеза были обнаружены штаммы с низкой чувствительностью (вероятно устойчивые) к одному или нескольким триазольным препаратам: у *A. ustus* (вориконазол, итраконазол, позаконазол), *A. nidulans* (вориконазол, позаконазол), *A. niger* (вориконазол). Всего было обнаружено 11 штаммов из данной группы (4,5%), которые относились к *A. ustus* (9 штаммов), *A. nidulans* (1 штамм), *A. niger* (1 штамм). С учетом установленных величин показателей МПК₅₀ и МПК₉₀ триазолов, гриб *A. ustus* следует расценивать

как вид с вариативной и в целом с пониженной чувствительностью к вориконазолу, итраконазолу и позаконазолу. Для оценки различия в лекарственной чувствительности штаммов *A. ustus* (13 штаммов) и группы штаммов *A. flavipes*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. glaucus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. oryzae*, *A. sydowii*, *A. terreus*, *A. versicolor* (230 штаммов) к триазолам (вориконазол, итраконазол, позаконазол) применен критерий Манна-Уитни. Выявлены достоверно значимые различия для всех трех препаратов ($p < 0,01$).

Активность кетоконазола против *Aspergillus* spp. уступала активности триазолов. Штаммы *Aspergillus* spp. с высокой чувствительностью к кетоконазолу (с МПК ≤ 4 мкг/мл) составляли 68,7% (167 из 243 штаммов). Штаммы с вероятной устойчивостью к препарату (с МПК ≥ 16 мкг/мл [128]) составляли 6,6% (16 штаммов). Среди 4 азольных препаратов для кетоконазола наиболее четко проявлялись видовые различия возбудителей по диапазонам МПК и показателям МПК₅₀ и МПК₉₀ (Таблица 52). К группе видов с вариативной чувствительностью к кетоконазолу (верхняя граница МПК – от 16 до >16 мкг/мл) относились *A. niger* (возбудитель с наиболее низким уровнем чувствительности), *A. fumigatus*, *A. ochraceus*, *A. terreus*, *A. ustus*. К группе наиболее чувствительных к кетоконазолу видов (верхняя граница МПК ≤ 4 мкг/мл) относились *A. flavipes*, *A. flavus*, *A. glaucus*, *A. oryzae*, *A. versicolor*. Вместе с тем, отсутствие пограничных значений для кетоконазола и *Aspergillus* spp. не позволяет провести клиническую интерпретацию полученных результатов.

Характерной особенностью для некоторых штаммов грибов *A. ustus* (4 штамма) и *A. nidulans* (1 штамм) была низкая чувствительность (вероятная устойчивость) одновременно к нескольким препаратам группы азолов (от 2 до 4):

- у штамма *A. ustus* (бронхиальный смыв): к вориконазолу (МПК 8 мкг/мл), итраконазолу (МПК >16 мкг/мл), позаконазолу (МПК >8 мкг/мл), кетоконазолу (МПК 16 мкг/мл);
- у штамма *A. ustus* (мокрота): к вориконазолу (МПК 8 мкг/мл), итраконазолу (МПК >16 мкг/мл), позаконазолу (МПК 4 мкг/мл), кетоконазолу (МПК >16 мкг/мл);

- у штамма *A. ustus* (бронхиальный смыв): к вориконазолу (МПК 4 мкг/мл), позаконазолу (МПК>8 мкг/мл);
- у штамма *A. ustus* (БАЛ): к вориконазолу (МПК 4 мкг/мл), позаконазолу (МПК>8 мкг/мл);
- у штамма *A. nidulans* (БАЛ): к вориконазолу (МПК 4 мкг/мл), позаконазолу (МПК>8 мкг/мл).

Напротив, для штаммов главного возбудителя аспергиллеза *A. fumigatus*, а также *A. terreus* была характерна высокая чувствительность к вориконазолу, итраконазолу и позаконазолу; штаммы *A. flavus* отличала высокая чувствительность к вориконазолу и итраконазолу. Несколько меньшую активность показали триазольные препараты против штаммов еще одного вида из группы основных возбудителей аспергиллеза – гриба *A. niger* (Таблицы 52, 53).

Полученные данные подтверждают наличие природной устойчивости грибов рода *Aspergillus* к флуконазолу (Таблица 52). Наименьшее из обнаруженных значений МПК флуконазола составило 32 мкг/мл (у одного из штаммов *A. glaucus*), а 97,5% значений МПК были высокими или максимально высокими (в интервале МПК от 128 до >256 мкг/мл).

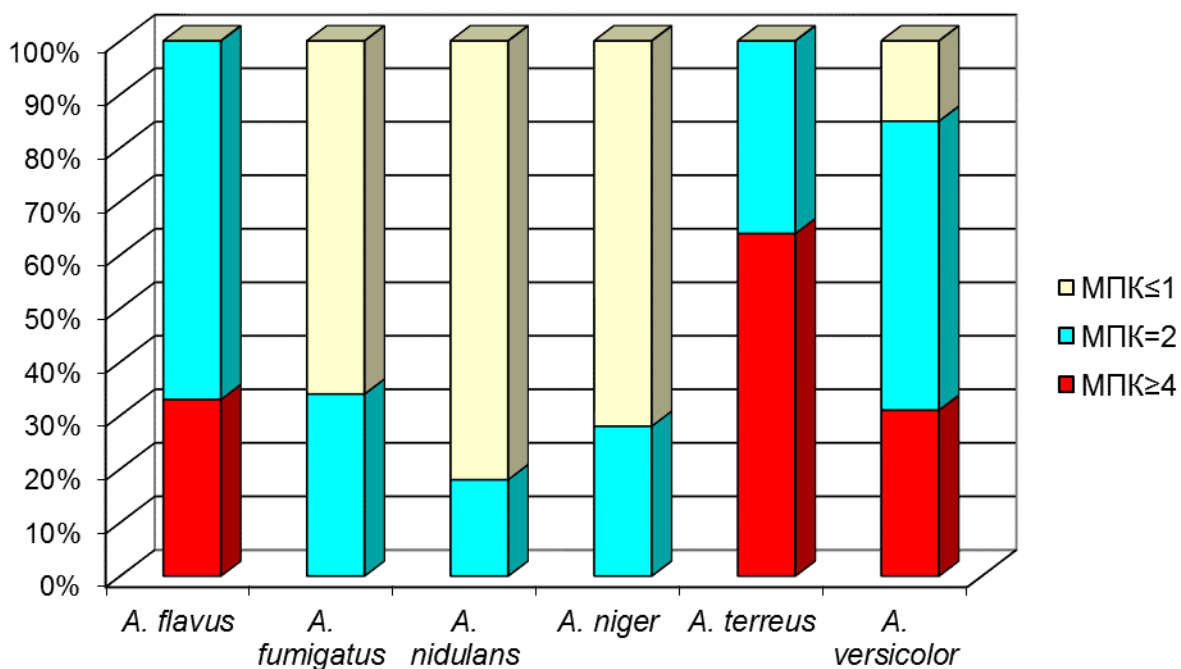
Природная устойчивость к амфотерицину В среди видов возбудителей аспергиллеза ранее была описана у гриба *A. terreus* [6, 44, 199]. Согласно рекомендациям EUCAST [228], клинические штаммы *A. terreus* обозначаются как устойчивые к амфотерицину В без интерпретации установленного значения МПК. Полученные данные (Таблицы 54, 55; рисунок 69А) подтверждают сведения о низкой активности амфотерицина В против данного возбудителя: интервал МПК препарата для штаммов *A. terreus* составил 2-8 мкг/мл, значения МПК₅₀ и МПК₉₀ – 4 мкг/мл.

Остальные болезнетворные грибы *Aspergillus* spp. обычно характеризуются как чувствительные к амфотерицину В, что, однако, не вполне согласуется с данными исследования *in vitro*. На рисунке 69 штаммы 12 исследованных видов распределены на 3 группы по диапазонам МПК амфотерицина В: 1) с МПК≤1 мкг/мл (вероятная чувствительность), 2) с МПК 2 мкг/мл (промежуточное

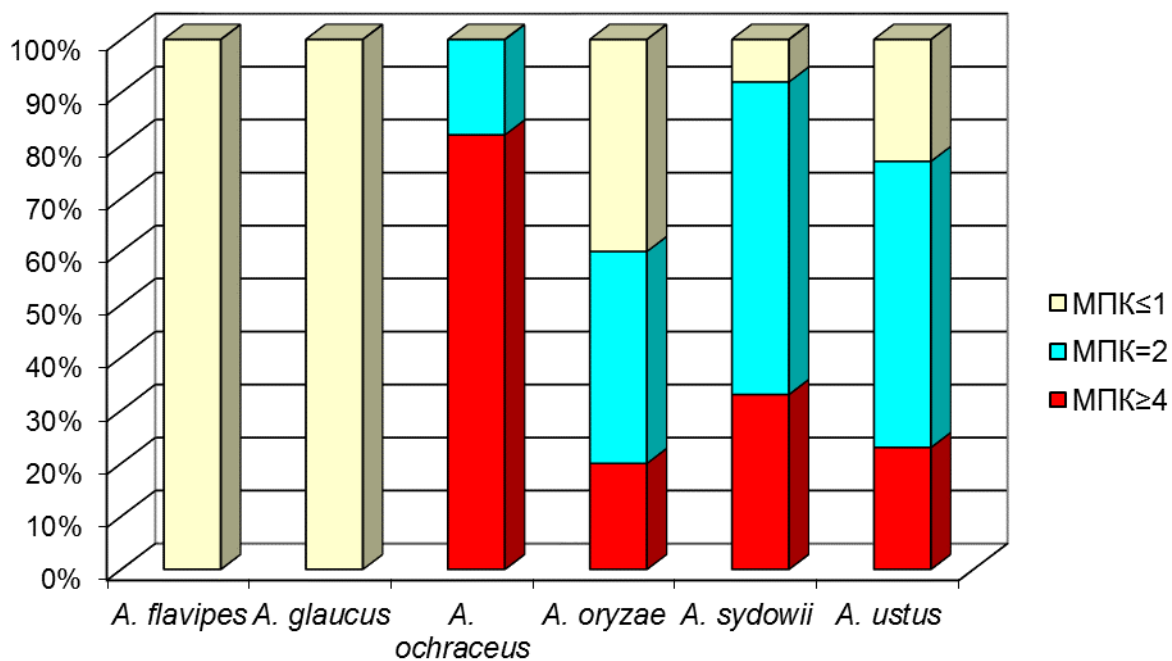
значение), 3) с МПК $\geq$ 4 мкг/мл (вероятная устойчивость). На рисунке 69А объединены 6 более частых возбудителей аспергиллеза (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. versicolor*), на рисунке 69Б – 6 более редких возбудителей (*A. flavipes*, *A. glaucus*, *A. ochraceus*, *A. oryzae*, *A. sydowii*, *A. ustus*). Только у 5 из 12 видов (*A. flavipes*, *A. fumigatus*, *A. glaucus*, *A. nidulans*, *A. niger*) не было обнаружено штаммов вероятно устойчивых к амфотерицину В с МПК $>$ 2 мкг/мл [199]; для *A. fumigatus* и *A. niger* диапазон МПК $>$ 2 мкг/мл утвержден EUCAST как критерий устойчивости к амфотерицину В [228]. У остальных 7 видов *Aspergillus* были выделены вероятно устойчивые к амфотерицину В штаммы (с МПК 4 или 8 мкг/мл), а доля этих штаммов составляла от 20% (*A. oryzae*) до более 80% (*A. ochraceus*).

В целом, группа устойчивых (*A. terreus*) и вероятно устойчивых (другие возбудители с МПК $\geq$ 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%)).

Высокие границы интервала значений МПК амфотерицина В (от 2 до 8 мкг/мл), предполагающие сниженную чувствительность гриба к препарату, были обнаружены у 3 видов: *A. flavus* (возбудитель с описанной вариативной чувствительностью к препарату [44, 258]), *A. terreus* (возбудитель с описанной природной устойчивостью к препарату [44, 199]) и *A. ochraceus* (редкий возбудитель с неустановленным уровнем природной чувствительности к препарату). Как видно из представленных данных (Таблица 54; рисунок 69А, 69Б), обнаруженные для *A. ochraceus* значение МПК₉₀ (8 мкг/мл) и доля штаммов с МПК препарата в интервале 4-8 мкг/мл (81,8%) превышали аналогичные показатели для *A. terreus* (63,6%) и *A. flavus* (33,3%).



А



Б

Рисунок 69 – Распределение штаммов 12 видов грибов рода *Aspergillus* на группы по диапазонам МПК амфотерицина В (%): МПК≤1 (вероятно чувствительные к препарату штаммы), МПК=2 (штаммы с промежуточной чувствительностью), МПК≥4 (вероятно устойчивые к препарату штаммы)

Примечание: А) Распределение штаммов *A. flavus* (n=30), *A. fumigatus* (n=77), *A. nidulans* (n=11), *A. niger* (n=32), *A. terreus* (n=22), *A. versicolor* (n=13) по чувствительности к амфотерицину В (%); Б) Распределение штаммов *A. flavipes* (n=5), *A. glaucus* (n=12), *A. ochraceus* (n=11), *A. oryzae* (n=5), *A. sydowii* (n=12), *A. ustus* (n=13) по чувствительности к амфотерицину В (%); МПК – минимальная подавляющая концентрация

Установленные отличия активности амфотерицина В против различных видов *Aspergillus* spp. и имеющиеся в литературе сведения дали основание для разделения 12 исследованных возбудителей аспергиллеза на три группы: чувствительные к препарату виды; виды с вариативной или сниженной чувствительностью; устойчивые к препарату виды (Таблицы 56).

Таблица 56 – Распределение 12 видов грибов рода *Aspergillus* по уровню чувствительности к амфотерицину В

Группы видов рода <i>Aspergillus</i> ; обнаруженные значения МПК в клинической интерпретации или диапазон МПК (мкг/мл)		
Чувствительные к амфотерицину В виды	Виды с вариативной или сниженной чувствительностью	Устойчивые к амфотерицину В виды
<i>A. flavipes</i> (0,5-1)	<i>A. flavus</i> ¹ (2-8)	<i>A. terreus</i> (R)
<i>A. fumigatus</i> (S/I)	<i>A. ochraceus</i> ¹ (2-8)	
<i>A. glaucus</i> (0,5-1)	<i>A. oryzae</i> (1-4)	
<i>A. nidulans</i> (0,5-2)	<i>A. sydowii</i> (1-4)	
<i>A. niger</i> (S/I)	<i>A. ustus</i> (1-4)	
	<i>A. versicolor</i> (0,25-4)	

Примечание: S – чувствительные к препарату штаммы, I – штаммы с промежуточной чувствительностью, R – устойчивые штаммы

¹ – виды со сниженной чувствительностью к амфотерицину В

Обнаруженные значения МПК препаратов группы эхинокандинов (48 ч. инкубации) не предполагают наличие фунгицидной активности *in vitro* против 11 из 12 видов грибов рода *Aspergillus* (Таблица 54). Среди клинических штаммов *Aspergillus* spp. преобладали изоляты с максимально высокими значениями МПК эхинокандинов: для анидулафунгина и микафунгина (>8 мкг/мл) – 95,9%, для каспофунгина (>16 мкг/мл) – 92,2%. Доля штаммов с высокими МПК каспофунгина в интервале ≥ 8 мкг/мл составила 95,1%. Активность эхинокандинов *in vitro* была установлена только в отношении штаммов *A. glaucus* (наиболее медленно растущего из исследованных видов) с МПК анидулафунгина $\leq 0,015$ мкг/мл (10 штаммов; 100%), с МПК каспофунгина от 0,015 до 0,06 мкг/мл (11 из 12 штаммов; 91,7%), с МПК микафунгина $\leq 0,008$ мкг/мл (10 штаммов, 100%). Был обнаружен 1 штамм *A. terreus* с МПК каспофунгина 4 мкг/мл. Полученные результаты подтверждают сведения об отсутствии у эхинокандинов фунгицидной активности против *Aspergillus* spp. [44]. Однако их клиническая активность определяется фунгистатическим действием на рост мицелия возбудителей аспергиллеза, возможность оценки которого *in vitro* системой «Sensititre» с

колориметрическим индикатором роста ограничена и не предусмотрена производителем.

Обнаруженные высокие и максимально высокие значения МПК флуцитозина в интервале 32->64 мкг/мл для более 86% штаммов *Aspergillus* spp. (209 из 243 штаммов; все штаммы *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. terreus*, *A. ustus*) указывают на низкую активность препарата флуцитозин против возбудителей аспергиллеза (Таблица 54). Клинические штаммы *Aspergillus* spp. с вероятной чувствительностью к препарату (с МПК ≤ 4 мкг/мл) были обнаружены у *A. flavipes* (1 штамм с МПК 1 мкг/мл), *A. glaucus* (2 штамма с МПК 4 мкг/мл) и *A. ochraceus* (1 штамм с МПК 4 мкг/мл); их доля составила 1,7% от общего числа.

В результате проведенных исследований выявлено отсутствие выраженных отличий по чувствительности к 10 антимикотикам (диапазоны МПК, показатели МПК₅₀ и МПК₉₀) у групп нетипичных (15 штаммов) и типичных для вида (62 штамма) клинических штаммов *A. fumigatus*.

Таким образом, были выявлены:

- высокая активность вориконазола, итраконазола и позаконазола в отношении основных и редких возбудителей аспергиллеза, за исключением *A. ustus* (возбудитель с вариативной чувствительностью ко всем триазольным препаратам), отдельных штаммов *A. nidulans* (вориконазол, позаконазол), *A. niger* (вориконазол); для части клинических штаммов *A. ustus*, *A. nidulans* характерна низкая чувствительность к двум или более антимикотикам группы азолов, что может осложнять подбор препарата для лечения заболеваний, вызванных этими грибами;
- вариабельная активность амфотерицина В против *Aspergillus* spp., зависящая от видовой принадлежности штамма (обнаружены 3 возбудителя аспергиллеза со сниженной чувствительностью к препарату: *A. terreus* (природная устойчивость), *A. flavus* и *A. ochraceus*);
- отсутствие активности у флуконазола и флуцитозина в отношении 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).

Рекомендации по целесообразности проведения тестирования чувствительности *in vitro* к амфотерицину В и триазольным препаратам у различных болезнетворных грибов рода *Aspergillus* изложены в таблице 57.

Таблица 57 – Оценка необходимости тестирования чувствительности *in vitro* к четырем противогрибковым препаратам у основных и редких возбудителей аспергиллеза

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

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

T – необходимо определять чувствительность до начала лечения;

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

— – определять чувствительность не требуется

¹ – По: [228]

При обнаружении в качестве возбудителя бронхолегочного аспергиллеза гриба со сниженной чувствительностью к амфотерицину В (*A. flavus*, *A. ochraceus*) или триазольным антимикотикам (*A. ustus*, *A. nidulans* – позаконазол) выбор лекарственного препарата для эффективной терапии целесообразно проводить на основании данных лабораторных исследований *in vitro*. Для определения чувствительности к антимикотикам штаммов возбудителей аспергиллеза с последующей интерпретацией значений МПК препаратов необходимо использовать стандартизованную для плесневых грибов методику.

6.3 Доклиническое исследование противогрибковой активности новых природных антибиотиков, разрабатываемых в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»

В 2015–2018 гг. на базе коллекции клинических штаммов условно-патогенных грибов ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ» проведены доклинические исследования противогрибковой активности новых природных антибиотиков, выделенных и идентифицированных в ФГБНУ НИИНА. Список протестированных новых антибиотиков с ранее обнаруженной антифунгальной активностью и их характеристики приведены в таблице 58.

Таблица 58 – Список протестированных новых природных антибиотиков ФГБНУ НИИНА

Название препарата	Молекулярная масса, Да	Молекулярная формула
Антибиотики – нафтохиноны		
Астолид А	1578.87	$C_{82}H_{130}O_{29}$
Астолид В	1594.86	$C_{82}H_{130}O_{30}$
Антимикробные пептиды		
Полипептид – тионин NsW1	–	–
Полипептид – тионин NsW2	–	–
Полипептид – тионин NsW4	–	–
Пептаибол №28	1109.76	Не установлена
Пептаибол №29	1569.82	Не установлена
Пептаибол №30	1675.92	Не установлена
Пептаибол №32	1760.86	Не установлена
Эмерициллипсин А	1049.76	$C_{54}H_{99}N_9O_{11}$

Исследование наличия и спектра фунгицидной активности препаратов проводили на клинических штаммах дрожжевых (*Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus laurentii*, *Saccharomyces cerevisiae*) и

мицелиальных (*Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. terreus*, *Curvularia hawaiiensis*) грибов, выделенных из различных биоматериалов при диагностике пневмомикозов (Таблица 59).

Таблица 59 – Список штаммов грибов родов *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Curvularia*, *Saccharomyces*, исследованных на чувствительность к новым препаратам ФГБНУ НИИНА

Штамм	Биоматериал	Протестированные препараты
1. <i>Aspergillus flavus</i> МНПЦБТ 905м2016	Содержимое легочной полости	Астолиды А, В; Полипептиды – тионины NsW1, NsW2, NsW4; Эмерициллипсин А
2. <i>Aspergillus fumigatus</i> МНПЦБТ 397м2015	Содержимое легочной полости	Пептаиболы №28, №29, №30, №32
3. <i>Aspergillus fumigatus</i> МНПЦБТ 163м2016	Содержимое легочной полости	Астолиды А, В; Полипептиды – тионины NsW1, NsW2, NsW4; Эмерициллипсин А
4. <i>Aspergillus niger</i> МНПЦБТ 646м2015	Мокрота	Пептаиболы №28, №29, №30, №32
5. <i>Aspergillus niger</i> МНПЦБТ 219_2016	Мокрота	Астолиды А, В; Полипептиды – тионины NsW1, NsW2, NsW4; Эмерициллипсин А
6. <i>Aspergillus ochraceus</i> МНПЦБТ 497м2015	БАЛ	Астолиды А, В; Полипептиды – тионины NsW1, NsW2, NsW4; Пептаиболы №28, №29, №30, №32; Эмерициллипсин А
7. <i>Aspergillus terreus</i> МНПЦБТ 1133м2011	Мокрота	Астолиды А, В; Полипептиды – тионины NsW1, NsW2, NsW4; Пептаиболы №28, №29, №30, №32; Эмерициллипсин А
8. <i>Candida albicans</i> МНПЦБТ 1582м2016	Бронхиальный секрет	Астолиды А, В; Эмерициллипсин А
9. <i>Candida glabrata</i> МНПЦБТ 1402м2016	Мокрота	Астолиды А, В; Эмерициллипсин А
10. <i>Candida krusei</i> МНПЦБТ 1447м 2016	Содержимое плевральной полости	Астолиды А, В; Эмерициллипсин А
11. <i>Candida tropicalis</i> МНПЦБТ 1402м2016	Мокрота	Астолиды А, В; Эмерициллипсин А
12. <i>Cryptococcus laurentii</i> МНПЦБТ 801м2017	Мокрота	Эмерициллипсин А
13. <i>Curvularia hawaiiensis</i> МНПЦБТ 988м2015	Содержимое легочной каверны	Эмерициллипсин А
14. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> МНПЦБТ 775м 2017	Мокрота	Эмерициллипсин А

У включенных в исследование 14 штаммов грибов была изучена чувствительность к лекарственным препаратам с помощью тест-системы «Sensititre» (TREK Diagnostic Systems, США). Устойчивость или вероятная устойчивость к амфотерицину В была обнаружена у 4 штаммов (*A. flavus* (МПК 4 мкг/мл), *A. ochraceus* (МПК 4 мкг/мл), *A. terreus* (МПК 4 мкг/мл), *Curv. hawaiiensis* (МПК 8 мкг/мл)); устойчивость или вероятная устойчивость (низкая чувствительность) к флуконазолу была обнаружена у всех 14 штаммов (7 штаммов *Aspergillus* spp. (МПК $\geq$ 256 мкг/мл), *C. albicans* (МПК 64 мкг/мл), *C. glabrata* (МПК $>$ 256 мкг/мл), *C. krusei* (МПК 32 мкг/мл), *C. tropicalis* (МПК 16 мкг/мл), *Cr. laurentii* (МПК 32 мкг/мл), *Curv. hawaiiensis* (МПК 32 мкг/мл), *Sacch. cerevisiae* (МПК 8 мкг/мл)).

Активность природных соединений в отношении клинических штаммов грибов оценивали: диско-диффузионным методом с определением диаметра зоны подавления роста (мм) (стандартизованная методика: питательная среда – картофельно-декстрозный агар, исследуемые концентрации очищенных соединений – 40 мкг/диск; контролем чувствительности служили стандартные диски с амфотерицином В («НИИ Пастера», 40 мкг/диск) и флуконазолом («НИИ Пастера», 10 мкг/диск) [75]); методом серийных разведений по стандартной методике CLSI с определением МПК [200].

Проведенные исследования выявили наличие у природных антибиотиков антифунгальной активности в отношении ряда клинических штаммов, сопоставимой с уровнем установленной активности *in vitro* препарата амфотерицин В или превосходящий этот уровень:

- у новых соединений нафтохиноновых антибиотиков – астолидов А и В, выделенных из почвенного актиномицета *Streptomyces hygroscopicus* штамм ВКПМ Ас-2079, обнаружена активность против 3 из 5 штаммов рода *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*), 4 штаммов рода *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*), включая штамм *A. flavus* с низкой чувствительностью к амфотерицину В и устойчивые к флуконазолу штаммы

возбудителей кандидоза *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* (тест-система «Sensititre»);

- у антимикробного пептида тионина NsW2, выделенного из семян чёрного тмина (*Nigella sativa* L.), обнаружена активность против 2 из 5 штаммов рода *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. ochraceus*), включая вероятно устойчивый к амфотерицину В штамм возбудителя аспергиллеза *A. ochraceus* (тест-система «Sensititre»);
- у нового пептаибола, выделенного из микромицета *Trichoderma citrinoviride* штамм ВКПМ F–1228 (соединение № 28), обнаружена активность против всех 4 штаммов рода *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. terreus*) [75], включая устойчивые к амфотерицину В штаммы возбудителей аспергиллеза *A. ochraceus*, *A. terreus* (тест-система «Sensititre»);
- у нового липопептаибола эмерицеллипсина А, изолированного из алкалофильного гриба *Emericellopsis alkalina* штамм ВКПМ F–1428, обнаружена активность против 4 из 5 штаммов рода *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus*), 2 из 4 штаммов рода *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*), штаммов *Cryptococcus laurentii*, *Curvularia hawaiiensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, включая устойчивые к амфотерицину В штаммы *A. terreus*, *Curv. hawaiiensis* и устойчивые к флуконазолу штаммы *C. albicans*, *C. tropicalis*, *Cr. laurentii* (тест-система «Sensititre»).

Полученные результаты указывают на способность у обнаруженных природных антибиотиков подавлять рост оппортунистических дрожжевых и плесневых грибов – возбудителей бронхолегочных микозов (аспергиллеза, кандидоза, криптококкоза, феогифомикоза, редких дрожжевых инфекций), в том числе у штаммов с низкой чувствительностью к широко применяемым антимикотикам амфотерицину В и флуконазолу. С учетом низкой токсичности и широкого спектра активности *in vitro* на патогенные микромицеты, исследованные природные антибиотики следует расценивать как перспективные антифунгальные соединения для возможной разработки принципиально новых лекарственных препаратов.

ГЛАВА 7 Результаты мониторинга присутствия оппортунистических грибов в воздухе противотуберкулезного стационара

Данные по составу видов грибов, выделенных из воздуха лечебного стационара ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ», и частоте их обнаружения приведены в таблице 60. Всего в течение 2002-2016 гг. было проведено 20 серий отбора проб воздуха методом седиментации в различных помещениях медицинского назначения и холлах. Эти исследования проводили в зимний (5 серий), весенний (5), летний (5) и осенний (5) периоды. В отдельных сериях исследований было обнаружено от 11 до 23 видов мицелиальных грибов; за периоды года – от 21 до 38 видов. В целом из воздуха выделено 49 видов плесневых грибов из 18 родов. Группу преобладающих по частоте обнаружения видов ($\geq 50\%$ из 20 серий исследований) составили 8 микромицетов из 5 родов: *P. chrysogenum* (90%), *A. niger* (70%), *Cl. cladosporioides* (65%), *A. versicolor* (60%), *Acr. strictum* (55%), *A. fumigatus* (55%), *P. spinulosum* (55%), *Alt. alternata* (50%).

Таблица 60 – Видовой состав и частота обнаружения мицелиальных грибов в воздухе противотуберкулезного стационара (20 серий исследований; 2002-2016 гг.)

Вид	Зимний период n=5		Весенний период n=5		Летний период n=5		Осенний период n=5		Всего n=20	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>Acremonium kiliense</i>	–	–	1	20	–	–	1	20	2	10
<i>Acr. spinosum</i>	–	–	–	–	1	20	1	20	2	10
<i>Acr. strictum</i>	2	40	3	60	3	60	3	60	11	55
<i>Alternaria alternata</i>	1	20	3	60	2	40	4	80	10	50
<i>Aspergillus candidus</i>	–	–	–	–	2	40	–	–	2	10
<i>A. flavus</i>	–	–	2	40	2	40	1	20	5	25
<i>A. fumigatus</i>	3	60	2	40	3	60	3	60	11	55
<i>A. glaucus</i>	–	–	1	20	1	20	1	20	3	15
<i>A. nidulans</i>	1	20	1	20	–	–	–	–	2	10
<i>A. niger</i>	2	40	4	80	4	80	4	80	14	70
<i>A. ochraceus</i>	1	20	–	–	–	–	1	20	2	10
<i>A. restrictus</i>	–	–	1	20	–	–	1	20	2	10
<i>A. repens</i>	–	–	1	20	1	20	–	–	2	10
<i>A. sydowii</i>	–	–	–	–	2	40	–	–	2	10
<i>A. terreus</i>	1	20	1	20	1	20	–	–	3	15
<i>A. ustus</i>	–	–	–	–	2	40	1	20	3	15
<i>A. versicolor</i>	3	60	3	60	3	60	3	60	12	60
<i>Aureobasidium pullulans</i>	–	–	2	40	–	–	3	60	5	25
<i>Chaetomium globosum</i>	–	–	–	–	2	40	–	–	2	10
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	–	–	4	80	4	80	5	100	13	65

Продолжение таблицы 60

Вид	Зимний период n=5		Весенний период n=5		Летний период n=5		Осенний период n=5		Всего n=20	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>Fusarium dimerum</i>	–	–	1	20	1	20	1	20	3	15
<i>F. oxysporum</i>	–	–	2	40	3	60	3	60	8	40
<i>F. sporotrichioides</i>	–	–	–	–	–	–	1	20	1	5
<i>F. verticillioides</i>	–	–	–	–	–	–	1	20	1	5
<i>Mucor hiemalis</i>	1	20	1	20	1	20	1	20	4	20
<i>M. plumbeus</i>	–	–	2	40	–	–	1	20	3	15
<i>Paecilomyces variotii</i>	1	20	2	40	2	40	1	20	6	30
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	1	20	–	–	2	40	1	20	4	20
<i>P. brevicompactum</i>	1	20	1	20	1	20	2	40	5	25
<i>P. chrysogenum</i>	5	100	4	80	5	100	4	80	18	90
<i>P. citrinum</i>	1	20	1	20	2	40	–	–	4	20
<i>P. commune</i>	–	–	2	40	–	–	1	20	3	15
<i>P. decumbens</i>	–	–	1	20	1	20	1	20	3	15
<i>P. glabrum</i>	–	–	1	20	–	–	1	20	2	10
<i>P. expansum</i>	1	20	1	20	3	60	1	20	6	30
<i>P. janczewskii</i>	1	20	2	40	–	–	2	40	5	25
<i>P. simplicissimum</i>	–	–	–	–	1	20	–	–	1	5
<i>P. spinulosum</i>	2	40	3	60	4	80	2	40	11	55
<i>P. vulpinum</i>	–	–	1	20	–	–	1	20	2	10
<i>Phoma</i> sp.	–	–	–	–	1	20	2	40	3	15
<i>Rhizopus arrhizus</i>	1	20	1	20	–	–	1	20	3	15
<i>Rh. stolonifer</i>	–	–	–	–	1	20	1	20	2	10
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	–	–	–	–	–	–	2	40	2	10
<i>Stemphylium</i> sp.	–	–	–	–	–	–	1	20	1	5
<i>Talaromyces funiculosus</i>	2	40	–	–	2	40	–	–	4	20
<i>T. purpureogenus</i>	–	–	1	20	2	40	–	–	3	15
<i>Trichoderma koningii</i>	1	20	1	20	1	20	–	–	3	15
<i>Ulocladium botrytis</i>	–	–	–	–	–	–	3	60	3	15
<i>Verticillium</i> sp.	1	20	2	40	–	–	2	40	5	25
Всего видов	21		33		32		38		49	

Примечание: n – число случаев обнаружения гриба в различные сезоны года (от 1 до 5) и за все время исследований (от 1 до 20), % – доля случаев обнаружения от общего числа исследований

В воздухе противотуберкулезного стационара были обнаружены представители всех основных групп мицелиальных грибов-оппортунистов: зигомицеты порядка *Mucorales* (4 вида; 8% от общего числа), грибы рода *Aspergillus* (13 видов; 27%), гиалогифомицеты не из рода *Aspergillus* (26 видов; 53%), феогифомицеты, включая представителя «черных дрожжей» *Aur. pullulans* (6 видов; 12%).

Было установлено, что в воздухе стационара постоянно присутствуют жизнеспособные зачатки разнообразных оппортунистических мицелиальных грибов, способных вызывать поражения легких: светлоокрашенные аскомицеты родов *Aspergillus*, *Fusarium*, *Paecilomyces*; темноокрашенные аскомицеты родов *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*; зигомицеты порядка *Mucorales* родов *Mucor*, *Rhizopus*.

Как неблагоприятную ситуацию и значимый фактор риска развития аспергиллеза следует расценивать высокую частоту обнаружения в воздухе помещений медицинского назначения и холлах спор грибов *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. versicolor* во всех сезонах года, а также наличие в составе «аэропланктона» *A. glaucus*, *A. nidulans*, *A. ochraceus*, *A. restrictus*, *A. sydowii*, *A. terreus*, *A. ustus*. Особого внимания заслуживает обнаружение среди доминирующих в госпитальной среде микромицетов важнейшего возбудителя бронхолегочных микозов *A. fumigatus* с частотой выявления 55% (Таблица 60).

Возрастание присутствия в воздухе исследованных помещений в осенние месяцы было отмечено у темноокрашенных феогифомицетов (*Alt. alternata*, *Aur. pullulans*, *Cl. cladosporioides*, *Phoma* sp., *Stemphylium* sp., *Ul. botrytis*) и большинства грибов рода *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. sporotrichioides*, *F. verticillioides*). Накопление зачатков этих микроорганизмов в воздухе противотуберкулезного стационара, вероятно, связано с активным развитием во внешней среде фитопатогенных грибов и является дополнительным фактором риска развития в осенний период редких и труднодиагностируемых бронхолегочных фузариоза и феогифомикоза у предрасположенных пациентов.

Споры грибов *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. и мукоральных грибов *Mucor* spp., *Rhizopus* spp. регулярно обнаруживались в госпитальной среде без выраженной сезонной динамики.

Наименьшее число микромицетов было выявлено в воздухе в зимний период (21 вид или 43% от общего числа); видовое разнообразие грибов в составе аэропланктона возрастало весной (33 вида – 67%), летом (32 вида – 65%) и особенно осенью (38 видов – 78%).

Вероятно, одной из причин высокой концентрации спор оппортунистических грибов и в первую очередь *Aspergillus* spp. в воздухе стационара является занос их с частицами пыли при проведении реконструкции части помещений ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ».

Следует отметить, что 43 из 49 обнаруженных в воздухе стационара плесневых грибов (88%) известны как возбудители микозов различной локализации [128, 258]; 10 из 49 видов (20%) зарегистрированы как аллергенные [154]; 23 из 49 видов (47%) обладают токсигенностью.

Как видно из данных таблицы 61, в воздухе стационара присутствовало большинство обнаруженных у больных туберкулезом возбудителей аспергиллеза (79%), зигомикоза (67%) и гиалогифомикоза (74%), а также плесневых грибов, колонизирующих у пациентов респираторный тракт (68%) и развивающихся в легочных (86%) и плевральных (82%) полостях. В воздухе больничных помещений содержались споры части видов возбудителей феогифомикоза (38%), выделенных от пациентов при диагностике пневмомикозов. В целом, в воздухе лечебного стационара присутствовало 30 из 44 видов (68%) возбудителей плесневых микозов, обнаруженных у пациентов.

Таблица 61 – Соотношение состава групп мицелиальных грибов, обнаруженных в биоматериале на пневмомикоз, с составом грибов воздуха лечебного стационара

Группа грибов (биоматериал)	Число обнаруженных у пациентов видов грибов, п	Из них присутствовало в воздухе стационара	
		абс.	%*
Возбудители аспергиллеза	14	11	78,6
Возбудители зигомикоза	3	2	66,7
Возбудители гиалогифомикоза	19	14	73,7
Возбудители феогифомикоза	8	3	37,5
Плесневые грибы (легочные полости)	21	18	85,7
Плесневые грибы (плевральные полости)	22	18	81,8
Плесневые грибы (респираторный материал)	44	30	68,2
Плесневые грибы (все материалы)	44	30	68,2

Примечание: п – число обнаруженных видов мицелиальных грибов

* – доля присутствующих в воздухе стационара видов от общего числа видов, обнаруженных у пациентов

Таким образом, значительное число присутствующих в воздухе грибов (30 из 49 видов или 61%) развивалось в дыхательных путях пациентов стационара.

В респираторном материале (мокрота, содержимое бронхов) было обнаружено 61,2% плесневых грибов, выделенных из воздуха стационара (30 из 49 видов); в легочных полостях – 36,7% грибов из воздуха (18 из 49 видов); в плевральных полостях – 38,8% грибов из воздуха (19 из 49 видов). Число общих видов грибов, выделенных из трех типов биоматериалов и воздуха составило 13 плесневых микромицетов, из них – 6 возбудителей аспергиллеза (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. restrictus*, *A. terreus*, *A. versicolor*), 5 возбудителей гиалогифомикоза (*Acr. strictum*, *F. oxysporum*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *T. purpureogenus*), 2 возбудителя феогифомикоза (*Alt. alternata*, *Aur. pullulans*). Для сравнения микобиоты воздуха стационара ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ» с тремя группами мицелиальных грибов из биоматериалов на пневмомикоз (респираторный материал, содержимое легочных полостей, содержимое плевральных полостей) по частоте обнаружения отдельных видов был применен критерий Крускала-Уоллиса. Выявлено, что по процентному содержанию грибов воздух стационара достоверно отличается ($p < 0,00001$) от всех типов биоматериалов. Несмотря на определенное сходство общего видового состава грибного «аэропланктона» и грибов, развивающихся у пациентов (в дыхательных путях, в легочных и плевральных полостях), группы грибов в воздухе и биоматериалах имели значимые отличия по показателю встречаемости видов. С помощью критерия Крускала-Уоллиса установлено также, что по показателю встречаемости группа грибов из респираторного материала достоверно отличается от группы грибов из легочных полостей ($p = 0,00500319$) и группы грибов из плевральных полостей ($p = 0,0214556$). Сравнение групп грибов из содержимого легочных полостей и содержимого плевральных полостей не показало значимых различий ($p = 0,698224$).

С помощью кластерного анализа (объединение кластеров методом одиночной связи; параметр сравнения – частота обнаружения выделяемых видов грибов) построена дендрограмма сходства структуры групп мицелиальных грибов

воздуха стационара ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ» и диагностических материалов от пациентов (респираторный материал, содержимое легочных полостей, содержимое плевральных полостей). На дендрограмме, представленной на рисунке 70, видно, что анализируемые группы отчетливо разделяются на два кластера, в одном из которых объединены 3 группы грибов из биоматериалов, а в другом – грибной «аэропланктон» воздуха стационара. Наиболее выраженные отличия у группы грибов воздушной среды прослеживаются с группой грибов из плевральных полостей, менее выраженные – с группой грибов из респираторного материала. В свою очередь, совокупность групп грибов из биоматериалов разделялась на два кластера, в которых отдельно представлены респираторный материал и хирургические материалы (легочные и плевральные полости). Таким образом с помощью критерия Крускала-Уоллиса и кластерного анализа было показано, что микобиота воздуха лечебного стационара обладает особыми свойствами и значительно отличается от микобиоты, развивающейся у пациентов данного противотуберкулезного учреждения.

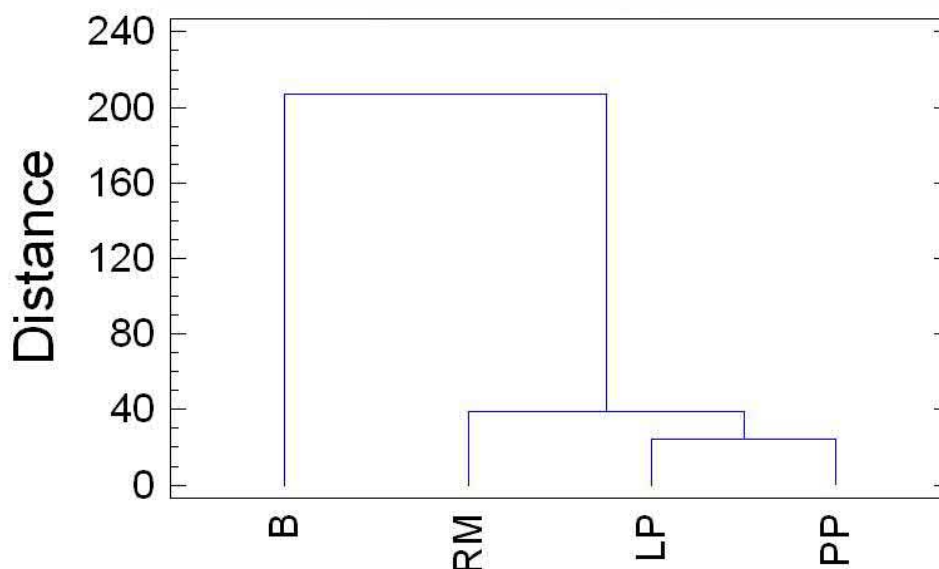


Рисунок 70 – Дендрограмма сходства групп мицелиальных грибов в воздухе стационара и диагностическом материале на пневмомикоз

Примечание: В – воздух противотуберкулезного стационара; RM – респираторный материал (мокрота, содержимое бронхов); LP – содержимое легочных полостей; PP – содержимое плевральных полостей

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Своевременная лабораторная диагностика внутрибольничных оппортунистических микозов бронхов, легких и плевры – одно из необходимых направлений работы лабораторной службы современной клиники туберкулеза, особенно с учетом все более широкого распространения опасных форм пневмомикозов среди предрасположенных групп пациентов. Новые сведения, накопленные в последние годы отечественными и зарубежными специалистами, обширны и расширяют знания о круге дрожжевых и плесневых возбудителей глубоких микозов человека; их классификации, таксономии и номенклатуре; подходах к диагностике и выбору медикаментозной терапии [11, 40, 44, 45, 54, 66, 68, 92, 125, 130, 132, 211, 214, 258, 337, 342, 347].

В представленной работе впервые систематизированы данные литературы по общему составу грибов-оппортунистов, описанных к настоящему времени в качестве возбудителей бронхолегочных микозов и глубоких микозов с поражением легких. Обобщенные сведения по особенностям биологии и морфологии вероятных возбудителей, новые данные по таксономии, систематике и номенклатуре представляют ценность для дальнейшего углубленного изучения. Выявленный ранее широкий круг условно-патогенных грибов, поражающих бронхолегочную систему человека, включает: грибы отделов *Zygomycota* (плесневые возбудители), *Ascomycota* (дрожжевые, плесневые возбудители) и *Basidiomycota* (дрожжевые, плесневые возбудители); анаморфные (с описанной гомоталличной или гетероталличной телеоморфной стадией, или без нее) и телеоморфные виды грибов; светлоокрашенные (гиалогифомицеты) и темноокрашенные (феогифомицеты) плесневые формы; дрожжевые (*Ascomycota*, *Basidiomycota*), дрожжеподобные (*Ascomycota*, *Basidiomycota*) и плесневые (*Zygomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota*) грибы, включая виды из обособленной группы «черных дрожжей» (*Ascomycota*); представителей групп белых (*Ascomycota*, *Basidiomycota*) и красных (*Basidiomycota*) дрожжевых грибов. Такое таксономическое и морфологическое многообразие вероятных возбудителей пневмомикозов должно вызывать проблемы при их идентификации; достаточный

объем специальных микологических сведений изложен в разделах диссертации. Для диагностической и научно-исследовательской работы в исследуемой нами области микробиологии клинически значимые оппортунистические грибы удобно разделять на группы по нозологическим формам заболеваний легких, которые они вызывают: возбудители аспергиллеза, кандидоза, криптококкоза, зигомикоза, гиалогифомикоза, феогифомикоза, редких дрожжевых глубоких микозов и пневмоцистоза (для диагностики пневмоцистоза, как известно, неприменим культуральный метод исследования).

В работе проведен подробный анализ имеющихся в литературе сведений по уровням чувствительности возбудителей пневмомикозов и глубоких микозов с поражением легких к распространенным системным лекарственным препаратам и группам лекарственных средств: полиены, азолы (имидазолы, триазолы первого и второго поколения), эхинокандины, флюоропиримидины. Несмотря на достаточно широкий круг антимикотических препаратов с разными механизмами противогрибковой активности, лекарственная терапия пневмомикозов ограничена различной природной чувствительностью возбудителей к антимикотикам; отдельные возбудители обладают устойчивостью к большинству существующих препаратов. Полные списки грибов со сниженной чувствительностью или устойчивостью *in vitro* к применяемым для лечения антимикотикам приведены в конце описания каждой из групп возбудителей. Эти сведения позволяют оценить распространенность резистентных к антимикотикам микромицетов среди грибов способных поражать бронхолегочную систему.

После многофакторной оценки был сделан вывод о том, что верификацию пневмомикозов различной этиологии и локализации в условиях рутинных исследований целесообразно проводить на основе комплекса клинически значимых культуральных, микроскопических и иммунологических методов, диагностический потенциал которых используется во фтизиатрических клиниках не в полной мере. Определяющее значение при диагностике пневмомикозов имеют культуральные исследования, которые необходимы для обнаружения возбудителя, его видовой идентификации и оценки чувствительности к

лекарственным препаратам. Использование стандартных микологических методик прямой микроскопии респираторных и хирургических биоматериалов и стандартизованных иммунологических методик для диагностики глубоких микозов существенно расширяет возможности лабораторной службы и повышает достоверность получаемых результатов. Прямую микроскопию и серологический метод целесообразно использовать как в сочетании с посевом доступного биоматериала, так и для экспресс-диагностики инвазивных форм пневмомикозов. Наиболее перспективные для выявления глубоких микозов методики на основе ПЦР и иные молекулярно-генетические методы являются дорогостоящими и технически сложными; их использование в повседневной практике для обнаружения грибов в биоматериале и верификации пневмомикозов ограничено недостаточной стандартизацией, валидацией и отсутствием четких рекомендаций по целесообразности их применения.

Исходя из поставленных задач нашего исследования, были впервые разработаны научно обоснованные подходы к организации лабораторной диагностики пневмомикозов в клинике туберкулеза, которые включают: 1) схему проведения комплексных диагностических исследований с использованием клинически значимых методов лабораторной диагностики (прямая микроскопия и культуральное исследование респираторного, хирургического материалов на пневмомикоз; иммунологические исследования крови на обнаружение *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* антигенемии и антител к антигенам грибов *Aspergillus*, *Candida*; культуральное исследование крови); 2) алгоритмы микробиологической диагностики микозов, вызванных дрожжевыми и мицелиальными грибами (различия методик идентификации и определения чувствительности дрожжевых и мицелиальных возбудителей определяют необходимость организации в микологической лаборатории двух групп культуральных исследований); 3) критерии интерпретации получаемых данных (критерии основаны на оценке метода исследования, характера материала, видовой принадлежности выделенного гриба, количественного содержания гриба в респираторном материале, повторности обнаружения возбудителя).

Разработанный комплекс лабораторных методов позволяет осуществлять 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 больных туберкулезом органов дыхания, а также собирать сведения о свойствах различных возбудителей и распространенности вызываемых ими заболеваний.

Предпочтительный формат лабораторного обследования пациентов на пневмомикоз, позволяющий достоверно выявлять признаки вероятного поражения бронхолегочной системы оппортунистическими грибами, а также выявлять количественное содержание грибов в различном респираторном материале включает специальные микологические исследования (прямая микроскопия, посев) двух или более проб мокроты в динамике и пробы содержимого бронхов, полученного при ФБС. Наибольшую диагностическую ценность представляет исследование образцов легочной ткани из очагов поражения (доступность материала ограничена), а у пациентов с полостными образованиями в легких и поражениями плевры – материалов из полостей. Обнаружение в хирургическом материале грибов при посеве или методом прямой микроскопии имеет самостоятельное диагностическое значение и должно сопровождаться, как правило, незамедлительной терапией и проведением у пациента дальнейших комплексных лабораторных исследований.

При выделении штаммов оппортунистических грибов из биоматериала на пневмомикоз следует проводить их видовую идентификацию (по общепринятым методикам, подробно изложенным в работе, с исследованием морфологии, физиологических свойств – важно определять наличие роста штаммов при 37°C), и, по возможности, тестирование чувствительности к антимикотикам (по стандартизованным методикам с последующей корреляцией результатов определения чувствительности *in vitro* с результатами лечения). Описанный в работе протокол исследования при работе с культурами дрожжевых,

дрожжеподобных и мицелиальных грибов позволяет получать достоверные и воспроизводимые результаты при их идентификации и определении чувствительности к антимикотикам. Проведение при диагностике пневмомикозов точной видовой идентификации культур грибов высоко значимо и необходимо для выявления этиологии заболевания, корректной интерпретации полученных результатов и подбора антифунгальных препаратов для лечения, в связи с разной исходной чувствительностью к антимикотикам отдельных возбудителей.

Отсутствие практической микологической подготовки у сотрудников микробиологических лабораторий фтизиатрических клиник затрудняет проведение точной видовой и родовой идентификации возбудителей микозов. Нами была впервые разработана и адаптирована для использования в рутинной лабораторной практике схема разделения возбудителей пневмомикозов на группы, основанная на использовании для их распознавания простых морфологических признаков (легко обнаруживаемые макро- и микроморфологические дифференцирующие признаки для распознавания групп дрожжевых и мицелиальных возбудителей) и стандартных биохимических тестов (дифференцирующие тесты для распознавания аскомицетовых и базидиомицетовых видов дрожжевых грибов). Данная схема была составлена с учетом всего многообразия потенциальных возбудителей микотических инфекций бронхолегочной системы. Схема позволяет быстро дифференцировать микромицеты на 9 групп, отличающиеся по природной лекарственной чувствительности к антимикотикам: аскомицетовые дрожжи; базидиомицетовые дрожжи из группы «красных дрожжей»; базидиомицетовые непигментированные дрожжи; аскомицетовые дрожжеподобные грибы; базидиомицетовые дрожжеподобные грибы; возбудители зигомикоза; возбудители феогифомикозов из группы диморфных «черных дрожжей»; возбудители феогифомикозов из группы мицелиальных феоидных видов; светлоокрашенные плесневые возбудители аспергиллеза, гиалогифомикозов. Для дальнейшей точной видовой идентификации дрожжевых и плесневых возбудителей пневмомикозов были предложены подробно описанные, надежные и доступные общеупотребимые

комбинации методик, которые основаны на изучении макро- и микроморфологии культуры, температурного диапазона роста, а для дрожжевых грибов также и на исследовании специфических биохимических и физиологических характеристик.

Несмотря на полученные обнадеживающие данные о наличии фенотипических отличий у клинических штаммов разных видов грибов рода *Aspergillus*, доказывающих пригодность классических методов для их обнаружения и распознавания, точность проведения фенотипической идентификации возбудителей аспергиллеза по атласам-определителям зависит от опыта исследователя и обязательного использования необходимой методологии (питательные среды, режимы инкубации, приготовление препаратов для микроскопии). Было выявлено многообразие потенциальных возбудителей аспергиллеза легких у больных туберкулезом, со значительным числом редких возбудителей, идентификация которых может вызывать серьезные затруднения. Всего нами было обнаружено 14 болезнетворных видов *Aspergillus*, относящихся по современной классификации к 5 подродам (*Aspergillus*, *Circumdati*, *Fumigati*, *Nidulantes*, *Terrei*) и 10 секциям (*Aspergillus*, *Circumdati*, *Flavi*, *Flavipedes*, *Fumigati*, *Nidulantes*, *Nigri*, *Restricti*, *Terrei*, *Usti*) [57, 349, 350, 369]. На примере редко встречаемого возбудителя *A. sydowii* установлено, что высоко информативным и объективным методом исследования для распознавания возбудителей аспергиллеза является анализ нуклеотидных последовательностей регионов ITS1-5.8S-ITS2, D1/D2 28S рДНК.

Использование в практических исследованиях разработанных алгоритмов комплексной лабораторной диагностики пневмомикозов позволило подтвердить имеющиеся данные о высокой частоте ассоциации туберкулеза легких и различных форм вторичного бронхолегочного аспергиллеза (аспергиллема и другие формы заболевания, обусловленные колонизацией полостей легких, сформировавшихся в результате предшествующего туберкулеза; аспергиллез плевры; колонизация дыхательных путей *Aspergillus* spp.) и обнаружить новые сведения о распространенности более редких нозологических форм микозов легких и диссеминированных микозов у пациентов фтизиатрического профиля,

определить состав возбудителей и их уровни чувствительности к противогрибковым препаратам.

Было установлено, что 39 возбудителей из 7 групп глубоких микозов заселяли легочные и/или плевральные полости у больных туберкулезом, вызывая развитие заболевания: аспергиллеза (12 видов: *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. glaucus*, *A. hollandicus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. restrictus*, *A. sydowii*, *A. terreus*, *A. ustus*, *A. versicolor*), кандидоза (6 видов: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*), криптококкоза (1 вид: *Cr. neoformans*), зигомикоза (2 вида: *Rh. arrhizus*, *M. hiemalis*), гиалогифомикоза (9 видов: *Acr. strictum*, *F. dimerum*, *F. oxysporum*, *Paec. lilacinus*, *Paec. variotii*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. commune*, *T. purpureogenus*), феогифомикоза (7 видов: *Alt. alternata*, *Aur. pullulans*, *Cl. cladosporioides*, *Cl. herbarum*, *Curv. hawaiiensis*, *Curv. lunata*, *Ul. chartarum*), редких дрожжевых микозов (2 вида; *G. candidum*, *Rh. mucilaginosa*).

В легочных полостях (каверна, туберкулема, киста) были обнаружены 27 видов оппортунистических грибов: возбудители аспергиллеза (8 видов: *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. glaucus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. restrictus*, *A. terreus*, *A. versicolor*), кандидоза (4 вида: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. tropicalis*), криптококкоза (1 вид: *Cr. neoformans*), зигомикоза (1 вид: *Rh. oryzae*), гиалогифомикоза (7 видов: *Acr. strictum*, *F. oxysporum*, *Paec. lilacinus*, *Paec. variotii*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *Tal. purpureogenus*), феогифомикоза (5 видов: *Alt. alternata*, *Aur. pullulans*, *Cl. herbarum*, *Cl. cladosporioides*, *Curv. hawaiiensis*), редких дрожжевых микозов (1 вид: *G. candidum*). В 16,7% случаев грибок, выделенный из легочной полости, был обнаружен у пациента в другом диагностическом (респираторном и/или хирургическом) материале на пневмомикоз (грибы *A. flavus*, *A. fumigatus*, *Aur. pullulans*, *C. albicans*, *C. kefyr*, *C. tropicalis*, *Curv. hawaiiensis*, *P. chrysogenum*). Наиболее часто в легочных полостях у больных туберкулезом развивались 5 возбудителей: *A. fumigatus* (39,6% случаев), *A. terreus* (8,3%), *A. flavus* (5,2%), *A. niger* (5,2%), *C. albicans* (5,2%).

В плевральных полостях (полость эмпиемы, остаточная плевральная полость) был обнаружен 31 вид оппортунистических грибов (от 1 до 3 видов у

разных пациентов): возбудители аспергиллеза (10 видов: *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. hollandicus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. restrictus*, *A. sydowii*, *A. terreus*, *A. ustus*, *A. versicolor*), кандидоза (6 видов: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*), криптококкоза (1 вид: *Cr. neoformans*), зигомикоза (1 вид: *M. hiemalis*), гиалогифомикоза (7 видов: *Acr. strictum*, *F. dimerum*, *F. oxysporum*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. commune*, *Tal. purpureogenus*), феогифомикоза (4 вида: *Alt. alternata*, *Aur. pullulans*, *Curv. lunata*, *Ul. chartarum*), редких дрожжевых микозов (2 вида: *G. candidum*, *Rh. mucilaginosa*). В 15,3% случаев грибы, выделенные из плевральной полости (от 1 до 3 видов) были обнаружены у пациента в другом диагностическом (респираторном и/или хирургическом) материале на пневмомикоз (грибы *A. flavus*, *A. fumigatus*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*). Наиболее часто в плевральных полостях у больных туберкулезом с заболеваниями плевры развивались 5 возбудителей: *C. albicans* (13,5%), *A. fumigatus* (12,5% случаев), *C. parapsilosis* (11,5%), *C. glabrata* (7,7%), *C. krusei* (5,8%).

Всего из диагностических материалов на пневмомикоз (респираторных, хирургических) выделено 67 видов оппортунистических грибов: 14 возбудителей аспергиллеза, 14 возбудителей кандидоза, 3 возбудителя криптококкоза, 3 возбудителя зигомикоза, 19 возбудителей гиалогифомикоза, 8 возбудителей феогифомикоза, 6 возбудителей редких дрожжевых глубоких микозов. Все 67 обнаруженных видов грибов (дрожжевых – 21, дрожжеподобных с артроспорами – 2, мицелиальных – 44) были способны колонизировать с разной частотой дыхательные пути больных туберкулезом.

При проведении микробиологической диагностики лабораторные признаки микотической инфекции легких и/или плевры были обнаружены у 37,9% обследованных на пневмомикоз больных туберкулезом. Признаки бронхолегочного кандидоза обнаружены у 30,2% обследованных пациентов; признаки бронхолегочного аспергиллеза – у 8,8%; признаки гиалогифомикоза легких – у 3,1%; признаки инфекции, вызванной дрожжевыми возбудителями не из родов *Candida* или *Cryptococcus* – у 1,6%; признаки феогифомикоза легких – у

0,9%; признаки зигомикоза (мукомикоза) легких – у 0,4%; признаки криптококкоза легких – у 0,2%. У значительной части пациентов были обнаружены признаки развития более одного микотического заболевания органов дыхания (от двух до трех), наиболее часто выявлялось сочетание аспергиллеза и кандидоза. Наши многолетние данные свидетельствуют об очевидно широкой распространенности неинвазивных форм бронхолегочного аспергиллеза и кандидоза среди пациентов фтизиатрического профиля и о вероятности развития у некоторой части из них легочных гистоплазмозов, зигомикоза, феогифомикоза, криптококкоза и редких дрожжевых глубоких микозов с поражением легких.

Группа больных туберкулезом с обнаруженными признаками развития бронхолегочного аспергиллеза (выделение возбудителя из биоптата бронхов; выделение возбудителя из легочной или плевральной полости; колонизация дыхательных путей) составляла немногим менее 9%. У 11,1% пациентов с вероятным аспергиллезом легких было обнаружено более одного возбудителя (от 2 до 4 видов). Грибы, способные вызывать развитие аспергиллеза, колонизировали дыхательные пути у 8,1% обследованных больных туберкулезом. Доля случаев выделения возбудителя из легочной полости составляла 10,1% от числа обследованных и 64,6% от числа случаев обнаружения грибов в полости; из плевральной полости – 8,2% от числа обследованных и 36,5% от числа случаев обнаружения грибов в полости. Среди выявленных 14 возбудителей заболевания по частоте обнаружения у больных туберкулезом и по числу выделенных штаммов преобладали грибы *A. fumigatus* (доминирующий вид, обнаруженный во всех видах респираторного и хирургического материалов; 30,0% штаммов) *A. niger* (доминирующий вид; 22,6% штаммов), *A. flavus* (9,0% штаммов), *A. versicolor* (7,7% штаммов). Гриб *A. terreus*, относящийся наряду с *A. fumigatus*, *A. flavus* и *A. niger* к группе основных возбудителей аспергиллеза [25, 28, 43, 341], обнаруживался реже (4,3% штаммов), однако вызывал значительное число случаев микозов легочной полости, уступая лишь *A. fumigatus* (8,3% от общего числа случаев обнаружения грибов в полости). Доля штаммов *A. nidulans*

составляла 4,9%, а штаммов *A. ustus*, обладающего пониженной чувствительностью к триазолам, – 3,4%. Развиваться в легочных, плевральных полостях и дыхательных путях у больных туберкулезом были способны 6 из 14 возбудителей аспергиллеза: *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. restrictus*, *A. terreus*, *A. versicolor*.

Группа больных туберкулезом с обнаруженными признаками развития бронхолегочного кандидоза превышала 30% (выделение возбудителя из легочной или плевральной полости; массивная колонизация дыхательных путей). У 28,5% пациентов с вероятным кандидозом легких было обнаружено более одного возбудителя (от 2 до 5). Массивная колонизация дыхательных путей грибами *Candida* была обнаружена у 31,1% обследованных больных туберкулезом. Доля случаев выделения возбудителя из легочной полости составляла 1,6% от числа обследованных и 10,4% от числа случаев обнаружения грибов в полости; из плевральной полости – 6,8% от числа обследованных и 42,3% от числа случаев обнаружения грибов в полости. Среди выявленных при диагностике пневмомикозов 14 возбудителей заболевания по частоте обнаружения у больных туберкулезом и по числу выделенных штаммов преобладали грибы *C. albicans* (доминирующий вид; 64,7% штаммов), *C. glabrata* (доминирующий вид; 12,1% штаммов), *C. tropicalis* (7,4% штаммов), *C. krusei* (6,3% штаммов), *C. kefyr* (3,2% штаммов). Доля штаммов распространенного возбудителя *C. parapsilosis* [6, 130, 132, 182], обнаруживавшегося реже, составляла 2,0%. Развиваться в легочных, плевральных полостях и дыхательных путях у больных туберкулезом были способны 4 из 14 возбудителей кандидоза: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. tropicalis*.

Группа больных туберкулезом с обнаруженными признаками развития криптококкоза легких (выделение возбудителя из легочной или плевральной полости; колонизация дыхательных путей) составляла 0,2%. Грибы, способные вызывать развитие криптококкоза, колонизировали дыхательные пути у 0,2% обследованных больных туберкулезом. Доля случаев выделения возбудителя из легочной полости составляла 0,2% от числа обследованных и 1,0% от числа

случаев обнаружения грибов в полости; из плевральной полости – 0,2% от числа обследованных и 1,0% от числа случаев обнаружения грибов в полости. По результатам диагностики пневмомикозов, *Cr. neoformans* доминировал среди выявленных 3 возбудителей заболевания как по числу выделенных штаммов (57,2%), так и по частоте обнаружения у пациентов. Развиваться в легочных, плевральных полостях и дыхательных путях у больных туберкулезом был способен 1 из 3 возбудителей криптококкоза – основной возбудитель заболевания *Cr. neoformans*.

Группа больных туберкулезом с обнаруженными признаками развития зигомикоза легких (выделение возбудителя из легочной или плевральной полости; колонизация дыхательных путей) составляла 0,4%. Грибы, способные вызывать развитие зигомикоза, колонизировали дыхательные пути у 0,3% обследованных больных туберкулезом. Доля случаев выделения возбудителя из легочной полости составляла 0,2% от числа обследованных и 1,0% от числа случаев обнаружения грибов в полости; из плевральной полости – 0,5% от числа обследованных и 1,9% от числа случаев обнаружения грибов в полости. Установлено что, основной возбудитель зигомикоза *Rh. arrhizus* доминировал среди выявленных 3 возбудителей заболевания как по числу выделенных штаммов (66,7%), так и по частоте обнаружения у пациентов.

Группа больных туберкулезом с обнаруженными признаками развития гиалогифомикоза легких (выделение возбудителя из легочной или плевральной полости; колонизация дыхательных путей) составляла более 3%. У 1,7% пациентов с вероятным гиалогифомикозом легких было обнаружено более одного возбудителя (2 вида). Грибы, способные вызывать развитие гиалогифомикоза, колонизировали дыхательные пути у 3,0% обследованных больных туберкулезом. Доля случаев выделения возбудителя из легочной полости составляла 1,6% от числа обследованных и 10,4% от числа случаев обнаружения грибов в полости; из плевральной полости – 2,6% от числа обследованных и 10,6% от числа случаев обнаружения грибов в полости. Среди выявленных 19 возбудителей заболевания по частоте обнаружения у больных туберкулезом и по числу выделенных

штаммов преобладали грибы *P. chrysogenum* (24,0% штаммов), *Acr. strictum* (14,1% штаммов), *Paec. variotii* (12,4% штаммов), *P. citrinum* (9,1% штаммов), *Tal. purpureogenus* (8,7% штаммов), *P. decumbens* (5,4% штаммов). Частота обнаружения всех трех возбудителей фузариоза была ниже: доля штаммов *F. oxysporum* составляла 3,7%, *F. chlamydosporum* – 1,2%, *F. dimerum* – 1,2%. Вместе с тем наиболее часто обнаруживаемый нами возбудитель фузариоза *F. oxysporum* был выделен из легочной и плевральной полости, а *F. dimerum* – из плевральной полости. Развиваться в легочных, плевральных полостях и дыхательных путях у больных туберкулезом были способны 5 из 19 возбудителей гиадогифомикоза: *Acr. strictum*, *F. oxysporum*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *T. purpureogenus*.

Группа больных туберкулезом с обнаруженными признаками развития феогифомикоза легких (выделение возбудителя из легочной или плевральной полости; колонизация дыхательных путей) составляла около 1%. У 1,4% пациентов с вероятным феогифомикозом легких было обнаружено более одного возбудителя (2 вида). Грибы, способные вызывать развитие феогифомикоза, колонизировали дыхательные пути у 0,8% обследованных больных туберкулезом. Доля случаев выделения возбудителя из легочной полости составляла 1,5% от числа обследованных и 9,4% от числа случаев обнаружения грибов в полости; из плевральной полости – 1,4% от числа обследованных и 5,8% от числа случаев обнаружения грибов в полости. Среди выявленных 8 возбудителей заболевания по частоте обнаружения у больных туберкулезом и по числу выделенных штаммов преобладали грибы *Aur. pullulans* (29,7% штаммов), *Cl. cladosporioides* (28,4% штаммов), *Alt. alternata* (20,3% штаммов). Наиболее часто среди феоидных грибов обнаруживался гриб из группы «черных дрожжей» *Aur. pullulans*, выделенный как из легочной, так и из плевральной полости. Развиваться в легочных, плевральных полостях и дыхательных путях у больных туберкулезом были способны 2 из 8 возбудителей феогифомикоза: *Alt. alternata*, *Aur. pullulans*.

Группа больных туберкулезом с обнаруженными признаками развития легочной инфекции, вызванной редкими дрожжевыми возбудителями (выделение возбудителя из легочной или плевральной полости; колонизация дыхательных

путей) составляла около 2%. У 3,4% пациентов с вероятным развитием дрожжевого микоза было обнаружено более одного возбудителя (2 вида). Грибы, способные вызывать развитие инфекций данной группы, колонизировали дыхательные пути у 1,6% обследованных больных туберкулезом. Доля случаев выделения возбудителя из легочной полости составляла 0,5% от числа обследованных и 3,1% от числа случаев обнаружения грибов в полости; из плевральной полости – 0,5% от числа обследованных и 1,9% от числа случаев обнаружения грибов в полости. Среди выявленных 6 возбудителей заболевания по частоте обнаружения у больных туберкулезом и по числу выделенных штаммов преобладали грибы *Sacch. cerevisiae* (32,0% штаммов), *G. candidum* (29,6% штаммов), *Rh. mucilaginosa* (20,0% штаммов). Было обнаружено, что среди выявленных дрожжеподобных грибов, формирующих артроспоры, возбудитель *Sapr. capitata* заметно уступает по частоте обнаружения возбудителю *G. candidum*; среди видов базидиомицетовых «красных дрожжей» преобладает *Rh. mucilaginosa*. Развиваться в легочных, плевральных полостях и дыхательных путях у больных туберкулезом был способен 1 из 6 возбудителей редких дрожжевых глубоких микозов – дрожжеподобный гриб *G. candidum*.

Полученные за 5 лет исследований данные по диагностике кандидемии у больных туберкулезом позволили нам сделать ряд важных выводов о видовом составе возбудителей и вероятности развития диссеминированного кандидоза у пациентов фтизиатрических МО. Обнаружено, что кандидемия развивалась у 14,9% обследованных пациентов. Установленный спектр возбудителей кандидемии включал 4 вида грибов *Candida* (*C. albicans* – 18% случаев, *C. glabrata* – 18%, *C. guilliermondii* – 55%, *C. parapsilosis* – 9%) с доминированием не относящихся к *C. albicans* видов, доля которых превышала 81%. Оказалось, что в составе возбудителей кандидемии у больных туберкулезом преобладал гриб *C. guilliermondii* (более половины случаев), относительно редко выделявшийся из диагностических материалов на пневмомикоз (с частотой выявления 0,5% от общего числа обследованных). По числу случаев обнаружения и распространенности среди групп пациентов без ВИЧ-инфекции и с ВИЧ-

инфекцией, кандидемия развивалась достоверно чаще у ВИЧ-инфицированных больных, что следует учитывать при диагностике и дифференциальной диагностике диссеминированных форм кандидоза.

Анализ случаев обнаружения легочного и диссеминированного криптококкоза (всего 21 случай) подтвердил, что вероятность развития заболевания (главным образом, криптококкоза ЦНС) существенно возрастает у больных туберкулезом с ВИЧ-инфекцией. На долю ВИЧ-инфицированных пациентов приходилось 8 из 21 случаев (38,1%) криптококкоза (все 7 случаев выявленного криптококкоза ЦНС – *Cr. neoformans* и 1 случай поражения плевры *Cr. neoformans*). В 13 случаях (61,9%) лабораторные признаки криптококкоза легких (*Cr. neoformans*, *Cr. albidus*, *Cr. laurentii*) были выявлены у ВИЧ-отрицательных пациентов, включая случай развития *Cr. neoformans* в легочной каверне у больного фиброзно-кавернозным туберкулезом.

Кроме того, нами был выявлен ряд достоверно значимых различий при сравнении групп пациентов с ВИЧ-инфекцией и без ВИЧ-инфекции у больных с признаками кандидозной инфекции легких. Доля пациентов с обнаруженными признаками кандидоза была выше в группе больных с ВИЧ-инфекцией (89,7% обследованных), чем в группе ВИЧ-отрицательных больных (29,9%). В группе ВИЧ-инфицированных пациентов достоверно чаще наблюдалось присутствие более одного возбудителя кандидоза (46,2%; у ВИЧ-отрицательных – 8,4%); значимо выше была доля больных с массивной колонизацией респираторного тракта *Candida* spp. (92,1%; у ВИЧ-отрицательных – 30,8%); снижалась частота обнаружения штаммов главного возбудителя *C. albicans* от общего числа случаев обнаружения *Candida* spp. в респираторном материале (42,1%; у ВИЧ-отрицательных – 64,6%).

Данные скринингового исследования уровней чувствительности к антимикотикам клинических штаммов грибов *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., возбудителей редких дрожжевых микозов (аскомицетов родов *Geotrichum*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, *Saprochaete*; базидиомицетов рода *Rhodotorula*) легли в основу наших рекомендаций по выбору лекарственных

препаратов для лечения бронхолегочных микозов и кандидемии у больных туберкулезом и целесообразности проведения у различных возбудителей тестирования чувствительности *in vitro*.

Установлено, что полиеновый препарат амфотерицин В проявляет высокую активность против всех протестированных возбудителей кандидоза, криптококкоза, редких дрожжевых инфекций; вариативную активность против возбудителей аспергиллеза, зависящую от видовой принадлежности. Доля обнаруженных устойчивых (*A. terreus*) и вероятно устойчивых (другие возбудители) к амфотерицину В клинических штаммов *Aspergillus* spp. составляла 21,8% (*A. flavus* – 33,3%, *A. ochraceus* – 81,8%, *A. oryzae* – 20,0%, *A. sydowii* – 33,3%, *A. terreus* – 100%, *A. ustus* – 23,1, *A. versicolor* – 30,8%).

Чувствительность протестированных возбудителей глубоких микозов к азольным препаратам и эхинокандинам имела значимые различия и зависела от их видовой, родовой принадлежности или принадлежности к отделам *Ascomycota* и *Basidiomycota*.

Установлено, что триазольные препараты вориконазол, итраконазол и позаконазол проявляют высокую активность против возбудителей аспергиллеза, кандидоза, криптококкоза, большинства возбудителей редких дрожжевых инфекций, за исключением *Rhodotorula* spp. Доля обнаруженных устойчивых и вероятно устойчивых к вориконазолу клинических штаммов составляла: для возбудителей аспергиллеза – 4,1% (*A. nidulans* – 9,1%, *A. niger* – 3,1%, *A. ustus* – 61,5%); для возбудителей кандидоза – 2,4% (*C. albicans* – 1,0%, *C. glabrata* – 9,1%, *C. parapsilosis* – 5,0%, *C. tropicalis* – 3,2%); для возбудителей криптококкоза и редких дрожжевых инфекций – 15,5% (*Rh. glutinis* – 50,0%, *Rh. mucilaginosa* – 58,3%). Доля обнаруженных устойчивых и вероятно устойчивых к итраконазолу клинических штаммов составляла: для возбудителей аспергиллеза – 0,8% (*A. ustus* – 15,4%); для возбудителей кандидоза – 6,0% (*C. albicans* – 2,0%, *C. glabrata* – 30,9%, *C. tropicalis* – 3,2%); для возбудителей криптококкоза и редких дрожжевых инфекций – 8,6% (*Rh. glutinis* – 25,0%, *Rh. mucilaginosa* – 33,3%). Доля обнаруженных устойчивых и вероятно устойчивых к позаконазолу клинических

штаммов составляла: для возбудителей аспергиллеза – 2,5% (*A. nidulans* – 9,1%, *A. ustus* – 38,5%); для возбудителей кандидоза – 2,1% (*C. glabrata* – 10,9%, *C. tropicalis* – 3,2%); для возбудителей криптококкоза и редких дрожжевых инфекций – 6,9% (*Rh. mucilaginosa* – 33,3%).

Установлено, что триазольный препарат флуконазол проявляет вариативную активность против возбудителей кандидоза, зависящую от видовой принадлежности; вариативную активность против возбудителей криптококкоза и аскомицетовых возбудителей редких дрожжевых инфекций; не обладает активностью против возбудителей аспергиллеза, а также возбудителей редких дрожжевых инфекций *Rhodotorula* spp. Доля обнаруженных устойчивых и вероятно устойчивых к флуконазолу клинических штаммов составляла: для возбудителей кандидоза – 32,7% (*C. albicans* – 7,9%, *C. dubliniensis* – 40,0%, *C. glabrata* – 12,7%, *C. guilliermondii* – 58,3%, *C. krusei* – 100%, *C. lipolytica* – 100,0%, *C. norvegensis* – 100,0%, *C. parapsilosis* – 35,0%, *C. rugosa* – 50,0%, *C. tropicalis* – 19,35%, *C. zeylanoides* – 80,0%); для возбудителей криптококкоза и редких дрожжевых инфекций – 44,8% (*Cr. neoformans* – 8,3%, *Cr. laurentii* – 66,7%, *G. candidum* – 42,9%, *Rh. glutinis* – 100,0%, *Rh. mucilaginosa* – 100,0%, *Sapr. capitata* – 50,0%).

Установлено, что препараты группы эхинокандинов анидулафунгин, каспофунгин, микафунгин проявляют высокую активность против возбудителей кандидоза, вариативную активность против аскомицетовых возбудителей редких дрожжевых инфекций; не обладают активностью против возбудителей криптококкоза и базидиомицетовых возбудителей редких дрожжевых инфекций; не проявляют фунгицидной активности против возбудителей аспергиллеза, за исключением *A. glaucus*. Доля обнаруженных устойчивых и вероятно устойчивых к каспофунгину клинических штаммов возбудителей кандидоза составляла 1,2% (*C. krusei* – 8,3% устойчивых штаммов, *C. zeylanoides* – 10,0% вероятно устойчивых штаммов).

Ряд важных практических результатов получен при использовании клинических штаммов возбудителей пневмомикозов в доклинических

исследованиях по определению противогрибковой активности новых природных антибиотиков, выделенных в ФГБНУ НИИНА. При проведении экспериментов была использована модифицированная нами методика приготовления споровой суспензии чистых культур *Aspergillus* spp., пригодная для работы не только с возбудителями аспергиллеза, но и других групп плесневых микозов – зигомикоза, гиалогифомикозов, феогифомикозов.

Проведенные в разные сезоны года повторные исследования состава микобиоты воздушной среды противотуберкулезного стационара показали, что в воздухе стационара постоянно присутствуют жизнеспособные зачатки мицелиальных грибов – возбудителей микозов легких: аспергиллеза (*A. niger*, *A. versicolor*, *A. fumigatus* – доминирующие виды, *A. flavus*, *A. glaucus*, *A. terreus*, *A. ustus*, другие болезнетворные *Aspergillus* spp.), зигомикоза (родов *Mucor*, *Rhizopus*), гиалогифомикоза (родов *Fusarium*, *Paecilomyces*), феогифомикоза (родов *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*). Значительное число присутствующих в воздухе плесневых грибов было обнаружено у пациентов стационара в дыхательных путях (61,2%), в легочных полостях (36,7%), в плевральных полостях (38,8%). Вместе с тем с помощью критерия Крускала-Уоллиса и кластерного анализа было показано, что микобиота воздуха лечебного стационара обладает особыми свойствами и значительно отличается от микобиоты, развивающейся у пациентов в дыхательных путях, в легочных и плевральных полостях.

ВЫВОДЫ

1. 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), гистоплазмоза (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.

ПЕРСПЕКТИВЫ 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, гиалогифомикоза, феогифомикоза.

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 СОКРАЩЕНИЙ

АБЛА	– Аллергический бронхолегочный аспергиллез
АБЛК	– Аллергический бронхолегочный кандидоз
БАЛ	– Жидкость бронхоальвеолярного лаважа
ВААРТ	– Высокоактивная антиретровирусная терапия
ВИЧ	– Вирус иммунодефицита человека
ВКМ	– Всероссийская коллекция микроорганизмов
ВОЗ	– Всемирная организация здравоохранения
ГНЦ РАМН	– Государственное учреждение Гематологический научный центр Российской академии медицинских наук
ДИ	– Доверительный интервал
ДНК	– Дезоксирибонуклеиновая кислота
ИВЛ	– Искусственная вентиляция легких
ИФА	– Иммуноферментный анализ
КОЕ	– Колониеобразующие единицы
КТ	– Компьютерная томография
МПК	– Минимальная подавляющая концентрация
МЭК	– Минимальная эффективная концентрация
ПЦР	– Полимеразная цепная реакция
п.н.	– Пара нуклеотидов
РАЛ	– Реакция агглютинации латекса
рДНК	– Рибосомальная ДНК
РНГА	– Реакция непрямой гемагглютинации
РНК	– Рибонуклеиновая кислота
СМЖ	– Спинномозговая жидкость
СПИД	– Синдром приобретенного иммунодефицита
ФБС	– Фибробронхоскопия
ФГБНУ НИИНА	– Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»
ХАЛ	– Хронический аспергиллез легких
ХНАЛ	– Хронический некротизирующий аспергиллез легких
ХОБЛ	– Хроническая обструктивная болезнь легких
ЦНС	– Центральная нервная система
АТСС	– American Type Culture Collection, Американская коллекция типовых культур
BSL	– Biological Safety Levels, Группы биологического риска микроорганизмов по классификации патогенности ВОЗ
CBS	– Centraalbureau voor Schimmelcultures, переименован в Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Центр биоразнообразия грибов
CLSI	– Clinical and Laboratory Standards Institute, Институт клинических и лабораторных стандартов
DBB	– Диазониевый синий В (тест на окрашивание дрожжевых колоний)

DDBJ	– DNA Data Bank of Japan, Японская база данных ДНК
ECOFF	– Epidemiological cutoff values, Эпидемиологические точки разделения
EMBL	– European Molecular Biology Laboratory, Европейская молекулярно-биологическая лаборатория
EORTC	– European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group, Группа по изучению микозов Европейской организации по исследованию и лечению рака
ERS	– European Respiratory Society, Европейское респираторное общество
ESCMID	– European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease, Европейское общество по клинической микробиологии и инфекционным заболеваниям
EUCAST	– European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Европейский комитет по определению чувствительности к антибиотикам
FDA	– Food and Drug Administration, Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов США
GRAS	– Группа микроорганизмов, рассматриваемые как безопасные
IDSA	– Infectious Diseases Society of America, Американское общество инфекционных болезней
IgG	– Иммуноглобулин класса G
IgE	– Иммуноглобулин класса E
ITS	– Internal transcribed spacer, Внутренний транскрибируемый спейсер ДНК
LIFE	– Организация Leading International Fungal Education
MALDI-TOF MS	– Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, Времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией
MSG	– National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group, Группа по изучению микозов Национального института аллергии и инфекционных болезней
NCBI	– National Center for Biotechnology Information, Национальный центр биотехнологической информации
NRRL	– National Center for Agricultural Utilization Research, Agricultural Research Service Culture Collection, USDA Peoria, Illinois, USA, Национальный центр сельскохозяйственных исследований, Сельскохозяйственной исследовательской службы коллекций культур, Пеория, Иллинойс, США

- Sect. – Секция у видов грибов рода *Aspergillus*
syn. – Синоним видового названия гриба (лат. synonymum)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аак, О.В. Аллергены грибов. Особенности микогенной сенсibilизации (обзор) / О.В. Аак // Проблемы медицинской микологии. – 2005. – Т. 7, № 2. – С. 12-16.
2. Александер, Б.Д. Гиалогифомикоз / Б.Д. Александер, В.А. Щелл // В кн.: Атлас грибковых заболеваний / под ред. К.А. Кауфман, Д.Л. Манделла; пер. с англ. под ред. Ю.В. Сергеева. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – С. 221-233.
3. Антонов, В.В. Особо опасные микозы / В.В. Антонов, А.В. Липницкий, В.С. Лессовой, М.А. Гришина, Г.А. Ткаченко, В.В. Малеев; под ред. В.В. Малеева. – Волгоград: Волга-Паблишер, 2013. – 193 с.
4. Антропова, А.Б. Аэромикота жилых помещений г. Москвы / А.Б. Антропова, В.Л. Мокеева, Е.Н. Биланенко, Л.Н. Чекунова, Т.М. Желтикова, А.Д. Петрова-Никитина // Микология и фитопатология. – 2003. – Т. 37. Вып.6. – С. 1-11.
5. Аравийский, Р.А. Пневмоцистоз. Учебное пособие / Р.А. Аравийский, Н.В. Васильева, Т.С. Богомоллова, С.М. Игнатьева. – СПб.: Изд-во СЗГМУ, 2012. – 24 с.
6. Аравийский, Р.А. Диагностика микозов / Р.А. Аравийский, Н.Н. Климко, Н.В. Васильева – СПб.: СПб МАПО, 2004. – 186 с.
7. Арзуманян, В.Г. Дрожжевая микрофлора кожи и респираторного тракта человека при аллергических заболеваниях: автореф. дис. ... докт. биол. наук: 03.00.07 / Арзуманян Вера Георгиевна. – Москва – 2002. – 54 с.
8. Арзуманян, В.Г. Дрожжи рода *Malassezia*: таксономия, идентификация, значение в экологии и патологии человека / В.Г. Арзуманян // В сб.: Новое в систематике и номенклатуре грибов / под ред. Ю.Т. Дьякова, Ю.В. Сергеева. – М.: Национальная академия микологии. Медицина для всех, 2003. – С. 458-492.
9. Арзуманян, В.Г. Дрожжеподобные грибы *Malassezia (Pityrosporum)* / В.Г. Арзуманян, М.А. Мокроносова, В.Б. Гервазиева // Вестник РАМН. – 1998. – № 5. – С. 44-47.

10. Арзуманян, В.Г. Антагонистическая активность *Malassezia* spp. к другим клинически значимым родам дрожжей / В.Г. Арзуманян, А.Ю. Сергеев, О.В. Шелемех, И.М. Ожован, О.А. Сердюк // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – Т. 148, № 9. – Р. 298-303.
11. Атлас грибковых заболеваний. Под ред. К.А. Кауфман, Д.Л. Манделла; пер. с англ. под ред. Ю.В. Сергеева. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 240 с.
12. Бабьева, И.П. Биология дрожжей. Учебное пособие для университетов / И.П. Бабьева, И.Ю. Чернов – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2004. – 221 с.
13. Багирова, Н.С. Инвазивный зигомикоз: эпидемиология и клинические особенности (обзор литературы) / Н.С. Багирова // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2016. – Т. 9, № 1. – С. 84-89.
14. Багирова, Н.С. Редкие микозы у онкогематологических больных: описание двух клинических случаев, культуральная характеристика и молекулярная идентификация возбудителей / Н.С. Багирова, О.В. Василенко, О.А. Коломейцев, И.В. Пылова // Успехи медицинской микологии. – 2004. – Т. 4. – С. 202-205.
15. Багирова, Н.С. Кандидемия у онкологических больных: таксономическая структура и резистентность к флуконазолу и вориконазолу *in vitro* / Н.С. Багирова, Н.В. Дмитриева // Лабораторная служба. – 2017. – Т. 6, № 3. – С. 182-189.
16. Багирова, Н.С. Инвазивный микоз, обусловленный *Aureobasidium pullulans*, у ребенка с острым миелобластным лейкозом (собственное клиническое наблюдение) / Н.С. Багирова, А.В. Попа, Т.С. Богомолова, Н.А. Батманова, Н.В. Дмитриева, И.Н. Петухова, З.В. Григорьевская, Е.Н. Соколова // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2018. – Т. 11, № 3. – С. 259-264.

17. Баранцевич, Е.П. Применение MALDI-TOF масс-спектрометрии в клинической микробиологии / Е.П. Баранцевич, Н.Е. Баранцевич // Трансляционная медицина. – 2014. – Т. 3. – С. 23-28.
18. Бахарова, Е.П. Лабораторная диагностика бронхолегочного аспергиллеза (Клин.-эксперим. исслед.): автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / Бахарова Елена Петровна. – Москва. – 1978. – 19 с.
19. Безопасность работы с микроорганизмами I – II групп патогенности (опасности): санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.1285-03: утверждены Главным государственным санитарным врачом РФ 12.03.2003. – Минздрав России – 2003. – 78 с.
20. Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней: санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322-08 (в ред. Дополнений и изменений N 1, утверждены Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 02.06.2009 N 42, N 2, утверждены Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29.06.2011 N 86). – М.: Госкомсанэпиднадзор РФ, 2008. – 57 с.
21. Билай, В.И. Аспергиллы / В.И. Билай, Э.З. Коваль – Киев: Наукова думка, 1988. – 204 с.
22. Богородская, Е.М. Модификация стандартных режимов химиотерапии у впервые выявленных больных туберкулезом: распространение, причины назначения, исходы / Е.М. Богородская, М.Н. Чернов, А.С. Стерликов, С.В. Смердин // Туберкулез и болезни легких. – 2012. – № 4. – С. 9-17.
23. Борзова, Ю.В. Хронический инвазивный аспергиллез легких у больных в Санкт-Петербурге / Ю.В. Борзова, Е.А. Десятик, С.Н. Хостелиди, М.О. Попова, Р.М. Чернопятава, Т.С. Богомолова, С.М. Игнатьева, О.А. Шурпицкая, А.С. Колбин, И.С. Зюзгин, Н.И. Зубаровская, А.В. Климович, Н.В. Васильева, Н.Н. Климко // Проблемы медицинской микологии. – 2009. – Т. 11, № 3. – С. 20-25.

- 24.Борисов, С.Е. Эффективность и безопасность включающих бедаквилин шестимесечных режимов химиотерапии у больных туберкулезом органов дыхания / С.Е. Борисов, Т.Н. Иванушкина, Д.А. Иванова, А.В. Филиппов, Н.В. Литвинова, О.В. Родина, Ю.Ю. Гармаш, С.Г. Сафонова, Е.М. Богородская // Туберкулез и социально значимые заболевания. – 2015. – № 3. – С. 30-49.
- 25.Бурова, С.А. Опыт лечения амфотрипидом больных системными микозами / С.А. Бурова // Успехи медицинской микологии. – 2007. – Т. 10. – С. 214-216.
- 26.Бурова, С.А. Инвазивные микозы в отделениях интенсивной терапии: обзор литературы (сообщение 1) / С.А. Бурова // Инфекции в хирургии. – 2014. – № 2. – С. 12-16.
- 27.Бурова, С.А. Грибковые заболевания / С.А. Бурова, Г.Н. Буслаева, И.Я. Шахмейстер // Приложение к журналу «Здоровье». – 1999. – № 6. – 60 с.
- 28.Бурова, С.А. Системные микозы – возрастающая проблема / С.А. Бурова, И.В. Курбатова // Успехи медицинской микологии. – 2006. – Т. 8 – С. 112-113.
- 29.Василенко, О.В. Молекулярная филогенетика грибов и медицинская микология – что они дают друг другу? / О.В. Василенко // Успехи медицинской микологии. – 2004. – Т. 3. – С. 12-13.
- 30.Василенко, О.В. Филогенетический анализ и позиционирование внутри рода *Amanita* наиболее ядовитых его представителей (*A. phalloides*, *A. virosa*, *A. verna*, *A. bisporigera*) по последовательности ДНК, включающей внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1, ITS2 и ген 5,8S-субъединицы рибосом / О.В. Василенко, Н.В. Безмельницын, А.И. Ртищева // Успехи медицинской микологии. – 2003. – Т. 1. – С. 183-184.
- 31.Василенко, О.В. *Chaetomium* sp. INBI 2-26(-) – потенциальный патоген, выделенный из вьетнамских почв / О.В. Василенко, Л.Г. Васильченко, К.Н. Карапетян, В.В. Хромоныгина, Е.О. Ландесман, Е.В. Степанова, О.В. Королева, М.Л. Рабинович // Успехи медицинской микологии. – 2004. – Т. 3. – С. 15-16.

- 32.Василенко, О.В. *Fomitopsis pinicola* (Fr.) Karst (Трутовик окаймленный) возможно является эмергентным патогеном человека. Выделение из мокроты культуры мицелия и определение методом прямого секвенирования ПЦР-продукта, включающего ITS1, ITS2 и часть гена 28S-субъединицы рибосом / О.В. Василенко, Н.А. Петрова, Н.В. Безмельницын, Г.А. Клясова // Успехи медицинской микологии. – 2003. – Т. 2. – С. 282-283.
- 33.Василенко, О.В. Сравнительные молекулярно-морфологические исследования штаммов вида *Aspergillus versicolor* / О.В. Василенко, Г.М. Фомичева, О.Е. Марфенина // Успехи медицинской микологии. – 2004. – Т. 3. – С. 11-12.
- 34.Васильева, И.А. Заболеваемость, смертность и распространенность как показатели бремени туберкулеза в регионах ВОЗ, странах мира и в Российской Федерации. Часть 1. Заболеваемость и распространенность туберкулеза / И.А. Васильева, Е.М. Белиловский, С.Е. Борисов, С.А. Стерликов // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2017. – Т. 95, № 6. – С. 9-21.
- 35.Васильева, Н.В. Криптококки и криптококкоз на современном этапе / Н.В. Васильева // Проблемы медицинской микологии. – 2002. – Т. 4, № 2. – С. 45-46.
- 36.Васильева, Н.В. Факторы патогенности *Cryptococcus neoformans* и их роль в патогенезе криптококкоза: автореф. дис. ... докт. биол. наук: 03.00.24 / Васильева Наталья Всеволодовна. – Санкт-Петербург – 2005. – 42 с.
- 37.Васильева, Н.В. Диагностика и лечение микозов: современные рекомендации / Н.В. Васильева, Н.Н. Климко, В.А. Цинзерлинг // Вестник Санкт-Петербургской медицинской академии последипломного образования. – 2010. – Т. 2, № 4. – С. 5-18.
- 38.Веселов, А.В. Эмпирическая, превентивная и профилактическая терапия инвазивных микозов: современное состояние / А.В. Веселов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2009. – Т. 11, № 4. – С. 286-304.

- 39.Веселов, А.В. *In vitro* активность флуконазола и вориконазола в отношении более чем 10 000 штаммов дрожжей: результаты 5-летнего проспективного исследования ARTEMIS Disk в России / А.В. Веселов, Н.Н. Климко, О.И. Кречикова, Г.А. Клясова, Е.Д. Агапова, И.Г. Мултых, С.М. Розанова, Л.Е. Крайнова, Н.В. Дмитриева, Р.С. Козлов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2008. – Т. 10, № 4. – С. 345-354.
- 40.Веселов, А.В. Инвазивный кандидоз: современные аспекты эпидемиологии, диагностики, терапии и профилактики у различных категорий пациентов (в вопросах и ответах) / А.В. Веселов, Р.С. Козлов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2016. – № 18(2). – С. 1-104.
- 41.Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ), Открытый каталожный фонд. – URL: <http://www.vkm.ru/rus/Catalogue.htm/>
- 42.Гарибова, Л.В. Основы микологии: Морфология и систематика грибов и грибovidных организмов. Учебное пособие / Л.В. Гарибова, С.Н. Лекомцева – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2005. – 220 с.
- 43.Гролл, А.Х. Аспергиллез / А.Х. Гролл, Т.Д. Уолш // В кн.: Атлас грибковых заболеваний / под ред. К.А. Кауфман, Д.Л. Манделла; пер. с англ. под ред. Ю.В. Сергеева. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – С. 133-159.
- 44.Диагностика и лечение микозов. Под ред. Д.Р. Хоспентала, М.Дж. Риналди; пер. с англ. под ред. Ю.В. Сергеева. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 448 с.
- 45.Диагностика и лечение микозов в отделениях реанимации и интенсивной терапии: Российские рекомендации / Отв. ред. Н.Н. Климко. – М.: Боргес, 2010. – 92 с.
- 46.Диагностика и лечение микозов в отделениях реанимации и интенсивной терапии: Российские рекомендации / Отв. ред. Н.Н. Климко. – 2-е изд., доп. и перераб. – М.: Фармтек, 2015. – 96 с.
- 47.Дорожкова, И.Р. Методы комплексной лабораторной диагностики воспалительных и аллергических грибковых поражений легких. Пособие для врачей / И.Р. Дорожкова. – М. – 1997. – 17 с.

- 48.Елинов, Н.П. Химическая микробиология / Н.П. Елинов. – М.: Высшая школа, 1989. – С. 349-365.
- 49.Елинов, Н.П. *Candida species* и кандидемия. Состояние проблемы. (Обзор) / Н.П. Елинов // Проблемы медицинской микологии. – 2001. – Т. 3, № 1. – С. 4-15.
- 50.Елинов, Н.П. Микологическая терминология, ее использование на практике / Н.П. Елинов // Проблемы медицинской микологии. – 2001. – Т. 3, № 3. – С. 4-11.
- 51.Елинов, Н.П. Токсигенные грибы в патологии человека / Н.П. Елинов // Проблемы медицинской микологии. – 2002. – Т. 4, № 4. – С. 37.
- 52.Елинов, Н.П. Краткий микологический словарь (для врачей и биологов) Издание второе, исправленное и дополненное / Н.П. Елинов. – СПб.: МГК, 2009. – 190 с.
- 53.Елинов, Н.П. Патогенные и условно-патогенные макро- и микромицеты как объект царства грибов (Fungi), их характеристика с учетом требований международного кодекса ботанической номенклатуры. Учебное пособие. Выпуск 1 / под ред. Елинова Н.П. / Н.П. Елинов, Н.В. Васильева, А.А. Маметьева, Н.В. Николенко, С.М. Озерская – СПб.: Коста, 2011. – 64 с.
- 54.Елинов, Н.П. *Candida*. Кандидозы. Лабораторная диагностика / под ред. Елинова Н.П. / Н.П. Елинов, Н.В. Васильева, А.А. Степанова, Г.А. Чилина – СПб.: Коста, 2010. – 224 с.
- 55.Заид, А. Словарь терминов по биотехнологии для производства продовольствия и ведения сельского хозяйства ФАО, Продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединенных Наций. – Сер. 9 Научно-исследовательский и технический документ ФАО / А. Заид, Х.Г. Хьюз, Э. Порчедду, Ф. Николас; пер. Г. Камарова, Т. Гавриленко, И. Анисимова, О. Кузнецова, С. Харитонов. – Рим: Продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединенных Наций. – 2008. – 395 с.
- 56.Иванушкина, Н.Е. Род *Aspergillus*: номенклатура, классификация, распространение / Н.Е. Иванушкина // В сб.: Новое в систематике и

- номенклатуре грибов / под ред. Ю.Т. Дьякова, Ю.В. Сергеева. – М.: Национальная академия микологии. Медицина для всех, 2003. – С. 136-163.
- 57.Иванушкина, Н.Е. Новое в систематике рода *Aspergillus* / Н.Е. Иванушкина // Современная микология в России: материалы 3-го Съезда микологов России. – 2012. – Т. 3. – С. 49.
- 58.Иванушкина, Т.Н. Эффективность и безопасность включающих шестимесячных режимов химиотерапии у больных туберкулезом органов дыхания / Т.Н. Иванушкина, С.Е. Борисов // Туберкулез и социально значимые заболевания. – 2015. – № 2. – С. 74-76.
- 59.Иванушкина, Т.Н. Линезолид в интенсивной фазе химиотерапии больных туберкулёзом органов дыхания с множественной и широкой лекарственной устойчивостью микобактерий / Т.Н. Иванушкина, С.Е. Борисов, Н.В. Литвинова, Ю.Ю. Гармаш // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2011. – № 3. – С. 34-41.
- 60.Ивченко, В.И. Ограниченный аспергиллез бронхов / В.И. Ивченко, В.М. Мельник, Я.М. Волошин, К.А. Галихин // Проблемы туберкулеза. – 1986. – № 3. – С. 39-41.
- 61.Казарова, Т.А. Значение грибов рода *Aspergillus* в развитии бронхолегочной патологии (обзор литературы) / Т.А. Казарова // Проблемы туберкулеза. – 1998. – № 1. – С. 57-61.
- 62.Калебина, Т.С. Роль белков в структуре клеточной стенки дрожжей / Т.С. Калебина, И.С. Кулаев // Успехи биологической химии. – 2001. – Т. 41. – С. 105-130.
- 63.Кауфман, К.А. Споротрихоз / К.А. Кауфман // В кн.: Атлас грибковых заболеваний / под ред. К.А. Кауфман, Д.Л. Манделла; пер. с англ. под ред. Ю.В. Сергеева. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – С. 70-81.
- 64.Кауфман, К.А. Системный кандидоз / К.А. Кауфман, Л.Э. Чу, С.Д. Филлер // В кн.: Атлас грибковых заболеваний / под ред. К.А. Кауфман, Д.Л. Манделла; пер. с англ. под ред. Ю.В. Сергеева. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – С. 96-114.

- 65.Климко, Н.Н. Микозы легких. Пособие для врачей / Н.Н. Климко – М.: Премьер МТ, 2005. – 96 с.
- 66.Климко, Н.Н. Микозы: диагностика и лечение. Руководство для врачей. 2-е изд. перераб. и доп. / Н.Н. Климко. – М.: Ви Джи Групп, 2008. – 336 с.
- 67.Климко, Н.Н. Позаконазол – новый азольный антимикотик широкого спектра для профилактики и лечения инвазивных микозов / Н.Н. Климко // Фарматека. – 2008. – № 5. – С. 11-19.
- 68.Климко, Н.Н. Микозы легких / Н.Н. Климко, Н.В. Васильева // В кн.: Пульмонология: Национальное руководство / под ред. А. Г. Чучалина. – Москва: ГЭОТАР-Media, 2016. – С. 236-249.
- 69.Климко, Н.Н. Перечень основных методов и критериев диагностики микозов / Н.Н. Климко, Н.В. Васильева, Н.П. Елинов, В.Б. Антонов, К.И. Разнатовский, А.Н. Родионов, Р.А. Аравийский, М.А. Шевяков, А.К. Мирзабалаева, З.К. Колб. – СПб.: СПб МАПО, 2001. – 24 с.
- 70.Климко, Н.Н. Распространенность тяжелых и хронических микотических заболеваний в Российской Федерации по модели LIFE program / Н.Н. Климко, Я.И. Козлова, С.Н. Хостелиди, О.В. Шадринова, Ю.В. Борзова, Н.В. Васильева // Проблемы медицинской микологии. – 2014. – Т. 16, № 1. – С. 3-8.
- 71.Клясова, Г.А. Микозы при гемобластозах / Г.А. Клясова // В кн.: Клиническая онкогематология / под ред. Волковой М.А. – М.: Медицина, 2007. – С. 1044-1066.
- 72.Клясова, Г.А. Инвазивный аспергиллез легких / Г.А. Клясова, Н.А. Петрова, Е.Н. Паровичникова, Л.Н. Гетман, В.Г. Исаев, Е.А. Михайлова, Е.Н. Устинова, Н.Д. Хорошко, Е.С. Вишневская, А.М. Кременецкая, С.К. Кравченко, И.В. Капланская, А.А. Кохно, С.А. Птицин, Л.С. Любимова, Л.П. Менделеева, Н.Е. Митин, Г.М. Галстян, В.В. Рыжко, А.В. Точенов, В.Г. Савченко // Терапевтический архив. – 2005. – № 7. – С. 65-71.

- 73.Клясова, Г.А. Пневмоцистоз / Г.А. Клясова, А.Ю. Сергеев, Ю.В. Сергеев // В кн.: Грибковые инфекции. Руководство для врачей. 2 изд. А.Ю. Сергеев, Ю.В. Сергеев. – М.: Изд-во Бином, 2008. – С. 420-430.
- 74.Кочкина, Г.А. *Mucorales*: таксономия, проблемы идентификации, патогенность / Г.А. Кочкина // В сб.: Новое в систематике и номенклатуре грибов / под ред. Ю.Т. Дьякова, Ю.В. Сергеева. – М.: Национальная академия микологии. Медицина для всех, 2003. – С. 106-135.
- 75.Кувари́на, А.Е. Микромицеты (отдел *Ascomycota* порядки *Eurotiales* и *Hypocreales*) с антигрибной активностью и отбор продуцента антибиотиков-пептаиболов: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.01.06, 03.02.12 / Кувари́на Анастасия Евгеньевна – Москва. – 2016. – 26 с.
- 76.Курбатова, И.В. Лабораторная диагностика оппортунистических микозов / И.В. Курбатова // В кн.: Руководство по медицинской микробиологии. Книга III, Том 1. Оппортунистические инфекции: возбудители и этиологическая диагностика / под ред. А.С. Лабинской, Н.Н. Костюковой. – М.: Изд-во Бином, 2013. – С. 622-637.
- 77.Лебедева, Т.Н. Патогенез аллергии к *Candida species* (обзор) / Т.Н. Лебедева // Проблемы медицинской микологии. – 2004. – Т. 6, № 1. – С. 3-8.
- 78.Лепехин, Д.Н. Компьютерная томография в диагностике и дифференциации грибковых поражений легких / Д.Н. Лепехин, Н.М. Лепехин // В кн.: Грибковые инфекции. Руководство для врачей. 2 изд. А.Ю. Сергеев, Ю.В. Сергеев. – М.: Изд-во Бином, 2008. – С. 71-88.
- 79.Лещенко, В.М. Аспергиллез / В.М. Лещенко – М.: Медицина, 1973. – 191 с.
- 80.Литвинов, В.И. Латентная туберкулезная инфекция: свойства возбудителя; реакции макроорганизма; эпидемиология и диагностика (IGRA-тесты, ДИАСКИНТЕСТ® и другие подходы), лечение / В.И. Литвинов – М.: МНПЦБТ, 2016. – 196 с.
- 81.Максимова, И.А. Руководство к практическим занятиям по биологии дрожжей / И.А. Максимова, И.Ю. Чернов. – Тула: Гриф и К, 2006. – 96 с.

- 82.Марфенина, О.Е. Антропогенная экология почвенных грибов / О.Е. Марфенина – М.: Медицина для всех, 2005. – 196 с.
- 83.Марфенина, О.Е. Потенциально патогенные мицелиальные грибы в среде обитания человека. Современные тенденции / О.Е. Марфенина, Г.М. Фомичева // В кн.: Микология сегодня / под ред. Ю.Т. Дьякова, Ю.В. Сергеева. Т. 1. – М.: Национальная академия микологии, 2007. – С. 235-266.
- 84.Масчан, А.А. Обзор рекомендаций американского общества по инфекционным болезням по лечению аспергиллеза / А.А. Масчан, Г.А. Клясова, А.В. Веселов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2008. – Т. 10, № 2. – С. 96-143.
- 85.Медицинская микология и грибковые заболевания / Э. Фейер, Д. Олах, Ш. Сатмари, Л. Содораи, Й Ури; пер. с переработ. оригинала Й. Шебештьен, В.И. Ландсман, М. Сиза; под ред. Л.Н. Машкиллейсона, А.Л. Машкиллейсона. – Будапешт: Изд-во Акад. наук Венгрии, 1966. – 982 с.
- 86.Международный Кодекс ботанической номенклатуры (Венский Кодекс) 2006, International Association for Plant Taxonomy (Europe) (IAPT) / Пер. с англ. Т.В. Егоровой, Д.В. Гельтмана, И.В. Соколовой, И.В. Татанова. – Товарищество научных изданий КМК Москва-СПб., 2009. – 282 с.
- 87.Методические рекомендации «Микологические культуральные исследования» / Н.В. Васильева, Н.П. Елинов, Т.С. Богомоллова, Г.А. Чилина, И.А. Босак, Т.В. Богданова, О.Н. Пинегина, Е.Р. Рауш, И.А. Рябинин, А.Н. Мамошин. – СПб.: СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2013. – 50 с.
- 88.Методология и организация доказательных научно-медицинских исследований во фтизиатрии / С.Е. Борисов, Е.М. Белиловский, Н.В. Долгушина, Д.А. Воронов; под ред. И.А. Васильевой. – М.: Нью Терра, 2017. – 175 с.
- 89.Микология веб-сайт НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина СЗГМУ им. И.И. Мечникова – URL: <http://www.rusmedserv.com/mycology/index.html>

90. Митрофанов, В.С. Хронический некротический легочный аспергиллез / В.С. Митрофанов // Проблемы медицинской микологии. – 1999. – Т. 1, № 3. – С. 26-32.
91. Митрофанов, В.С. Аллергический бронхолегочный аспергиллез / В.С. Митрофанов // Проблемы медицинской микологии. – 2000. – Т. 2, № 1. – С. 31-40.
92. Митрофанов, В.С. Аспергиллез легких. / В.С. Митрофанов, Е.В. Свирщевская. – 2-е изд., перераб. и доп. – СПб.: Изд-во Фолиант, 2013. – 184 с.
93. Митрофанов, В.С. Аспергиллемы легких / В.С. Митрофанов, Р.М. Чернопятова // Проблемы медицинской микологии. – 2000. – Т. 2, № 4. – С. 13-20.
94. Митрохин, С.Д. Антимикробная химиотерапия внутрибольничных инфекций в онкологическом стационаре: Учебное пособие / С.Д. Митрохин, А.Ю. Миронов, Г.Г. Харсеева. – Ростов-н/Д.: ГОУ ВПО РостГМУ, 2011. – 84 с.
95. Михайлова, Ю.В. Молекулярная идентификация представителей *Zygomycetes* из российской коллекции патогенных грибов по нуклеотидным последовательностям рДНК / Ю.В. Михайлова, А.Г. Полищук // Проблемы медицинской микологии. – 2012. – Т. 14, № 3. – С. 59-63.
96. Мюллер, Э. Микология / Э. Мюллер, В. Леффлер; пер. с нем. К.Л. Тарасова. – М.: Мир, 1995. – 343 с.
97. Нечаева, О.Б. Эпидемическая ситуация по туберкулезу среди лиц с ВИЧ-инфекцией в Российской Федерации / О.Б. Нечаева // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2017. – Т. 95, № 3. – С. 13-19.
98. Нечаева, О.Б. Туберкулез, сочетанный с ВИЧ-инфекцией, в Российской Федерации / О.Б. Нечаева, Е.М. Белиловский, З.М. Загдын, И.В. Щукина // В кн.: Туберкулез в Российской Федерации, 2012/2013/2014 гг. Аналитический обзор показателей, используемых в Российской Федерации и в мире. – М., 2015. – С. 177-195.

99. Нозокомиальная пневмония у взрослых: Российские национальные рекомендации / под ред. Б.Р. Гельфанда. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Мед. информ. агентство (МИА), 2016. – 176 с.
100. Общероссийская общественная научная организация «Национальная академия микологии» – URL: <http://mycology.ru/>
101. Озерская, С.М. Патогенные грибы: категоризация биологического риска и разнообразие / С.М. Озерская, Н.Е. Иванушкина, Г.А. Кочкина // В кн.: Микология сегодня / под ред. Ю.Т. Дьякова, Ю.В. Сергеева. Т. 1. – М.: Национальная академия микологии, 2007. – С. 268-282.
102. Озерская, С.М. Микроскопические грибы в связи с проблемами биологической безопасности (обзор) / С.М. Озерская, Н.Е. Иванушкина, Г.А. Кочкина // Проблемы медицинской микологии. – 2011. – Т. 13, № 3. – С. 3-12.
103. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии. Клинические рекомендации. Версия-2015-02. – М. – 2015. – 162 с. – URL: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/clinical-recommendations/>
104. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии. Клинические рекомендации. Версия-2018-03. – М. – 2018. – 206 с. – URL: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/clinical-recommendations/>
105. Пёфект, Д.Р. Криптококкоз / Д.Р. Пёфект // В кн.: Атлас грибковых заболеваний / под ред. К.А. Кауфман, Д.Л. Манделла; пер. с англ. под ред. Ю.В. Сергеева. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – С. 82-95.
106. Пирумова, В.П. Клиническое значение определения циркулирующего (1→3)-β-D-глюкана в крови пациентов при подозрении на инвазивную грибковую инфекцию / В.П. Пирумова, М.С. Гельфанд // Онкогематология. – 2012. – № 7(3). – С. 43-48.

107. Полищук, А.Г. MALDI-TOF масс-спектрометрическая идентификация медицински значимых микроицетов (обзор) / А.Г. Полищук // Проблемы медицинской микологии. – 2011. – Т. 13, № 4. – С. 8-11.
108. Порядок выдачи санитарно-эпидемиологического заключения о возможности проведения работ с возбудителями инфекционных заболеваний человека I-IV групп патогенности (опасности), генно-инженерно-модифицированными микроорганизмами, ядами биологического происхождения и гельминтами: санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.1318-03: утверждены Главным государственным санитарным врачом РФ 24.04.2003. – Минздрав России – 2003. – 78 с.
109. Приказ Главного медицинского управления г. Москвы от 04.01.1992 г. № 8 «Об оказании пульмонологической помощи больным в противотуберкулёзных учреждениях».
110. Приказ Минздрава РФ от 21 марта 2003 года № 109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации».
111. Приказ Минздрава РФ от 29 декабря 2014 г. № 951 «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания».
112. Приказ Минздрава СССР от 22 апреля 1985 г. № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений».
113. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 11 августа 2005 г. № 509 «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным фиброзно-кавернозным туберкулезом легких».
114. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 11 августа 2005 г. № 511 «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным цирротическим туберкулезом легких».

115. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 11 августа 2005 г. № 512 «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным туберкулезом легких».
116. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 11 августа 2005 г. № 513 «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным эмпиемой легких».
117. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 11 августа 2005 г. № 514 «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным казеозной пневмонией».
118. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 11 августа 2005 г. № 515 «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным кавернозным туберкулезом легких».
119. Припутневич, Т.В. Использование методов MALDI-TOF масс-спектрометрии и количественной ПЦР для быстрой диагностики септических состояний / Т.В. Припутневич, А.Р. Мелкумян, О.В. Бурменская, О.С. Непша, И.В. Никитина, Л.А. Любасовская, О.В. Ионов, Е.Н. Ильина, Д.Ю. Трофимов, С.Д. Митрохин // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2014. – Т. 16(1). – С. 4-9.
120. Противотуберкулезная работа в городе Москве. Аналитический обзор статистических показателей по туберкулезу, 2013 г. / под ред. Е.М. Богородской и В.И. Литвинова. – М.: МНПЦБТ, 2014. – 170 с.
121. ПЦР в реальном времени / Д.В. Ребриков, Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов, П.А. Семёнов, А.М. Савилова, И.А. Кофиади, Д.Д. Абрамов; под ред. Д.В. Ребрикова. – 6-е изд. – М. БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015. – 223 с.
122. Реванкар, С.Д. Феогифомикоз / С.Д. Реванкар // В кн.: Атлас грибковых заболеваний / под ред. К.А. Кауфман, Д.Л. Манделла; пер. с англ. под ред. Ю.В. Сергеева. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – С. 212-220.
123. Рейвн, П. Современная ботаника: В 2-х т.; пер. с англ. / П. Рейвн, Р. Эверт, С. Айкхорн. – М.: Мир, 1990. – Т. 1. – 348 с.

124. Роль патогенных и условно-патогенных грибов в жизни человека: учебное пособие / А.Д. Юцковский, Н.В. Васильева, Л.М. Кулагина; под ред. Н.П. Елинова. – СПб.: Политехника-сервис, 2014. – 206 с.
125. Руководство по медицинской микробиологии. Книга III, Том 1. Оппортунистические инфекции: возбудители и этиологическая диагностика / под ред. А.С. Лабинской, Н.Н. Костюковой. – М.: Изд-во Бином, 2013. – 752 с.
126. Рунке, М. Грибковые инфекции у иммунокомпрометированных пациентов (эпидемиология, диагностика, терапия, профилактика) / М. Рунке // Проблемы медицинской микологии. – 2000. – Т. 2, № 1. – С. 4-16.
127. Савостеева, И.С. Хронический некротизирующий аспергиллез легких как осложнение саркоидоза легких. Описание клинического случая и обзор литературы / И.С. Савостеева, Е.А. Десятик, Р.М. Чернопятава, О.В. Шадривова, Т.С. Одинцова, Т.С. Богомоллова, С.М. Игнатьева, Н.В. Васильева, Н.Н. Климко // Проблемы медицинской микологии. – 2013. – Т. 15, № 4. – С. 25-30.
128. Саттон, Д. Определитель патогенных и условно патогенных грибов / Д. Саттон, А. Фотергилл, М. Ринальди; пер. с англ. К.Л. Тарасова, Ю.Н. Ковалева; под ред. И.Р. Дорожковой – М.: Мир, 2001. – 468 с.
129. Свирщевская, Е.В. Иммунитет при туберкулезе и аспергиллезе (обзор) / Е.В. Свирщевская, В.С. Митрофанов, Р.И. Шендерова, Н.М. Чужова // Проблемы медицинской микологии. – 2005. – Т. 7, № 1. – С. 3-13.
130. Сергеев, А.Ю. Кандидоз: природа инфекции, механизмы агрессии и защиты, диагностика и лечение / А.Ю. Сергеев, Ю.В. Сергеев. – М.: Изд-во Триада-Х, 2001. – 472 с.
131. Сергеев, А.Ю. Грибковые инфекции. Руководство для врачей / А.Ю. Сергеев, Ю.В. Сергеев. – М.: «Бином–пресс», 2003. – 440 с.
132. Сергеев, А.Ю. Грибковые инфекции. Руководство для врачей / А.Ю. Сергеев, Ю.В. Сергеев. – 2-е изд. – М.: Изд-во Бином, 2008. – 480 с.

133. Сидорова, И.И. Макросистема грибов: методология и изменения последнего десятилетия / И.И. Сидорова // В сб.: Новое в систематике и номенклатуре грибов / под ред. Ю.Т. Дьякова, Ю.В. Сергеева. – М.: Национальная академия микологии. Медицина для всех, 2003. – С.7-70.
134. Сеницын, М.В. Распространение туберкулеза, сочетанного с ВИЧ-инфекцией в городе Москве / М.В. Сеницын, Е.М. Белиловский, Л.Н. Рыбка, Е.А. Котова // В кн.: Противотуберкулезная работа в городе Москве. Аналитический обзор статистических показателей по туберкулезу, 2015 г. / под ред. Е.М. Богородской, В.И. Литвинова, Е.М. Белиловского. – М., 2016. – С.115-133.
135. Смулиан, А.Д. Пневмоцистная инфекция / А.Д. Смулиан, П.Д. Волзер // В кн.: Атлас грибковых заболеваний / под ред. К.А. Кауфман, Д.Л. Манделла; пер. с англ. под ред. Ю.В. Сергеева. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – С. 201-211.
136. Тутельян, В.А. Микотоксины (Медицинские и биологические аспекты) / В.А. Тутельян, Л.В. Кравченко. – М.: Медицина, 1985. – 320 с.
137. Тутельян, В.А. Микотоксины / В.А. Тутельян, Л.В. Кравченко, А.Ю. Сергеев // В кн.: Микология сегодня / под ред. Ю.Т. Дьякова, Ю.В. Сергеева. Т.1. – М.: Национальная академия микологии, 2007. – С. 283-304.
138. Фомичева, Г.М. Экофизиологические и молекулярно-генетические свойства микроскопических грибов представителей группы *Aspergillus versicolor*, выделенных из разных местообитаний: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / Фомичева Галина Михайловна – Москва. – 2007. – 25 с.
139. Фомичева, Г.М. Сравнительные эколого-морфологические и молекулярные исследования штаммов микроскопического гриба *Aspergillus versicolor* (Vuill) Tiraboschi, выделенных из разных местообитаний / Г.М. Фомичева, О.В. Василенко, О.Е. Марфенина // Микробиология. – 2006. – Т. 75, № 2. – С. 228-234.

140. Чеботарь, И.В. Использование MALDI-TOF для идентификации возбудителей септических состояний в педиатрической практике / И.В. Чеботарь, О.А. Пономаренко, А.В. Лазарева, О.В. Карасева, А.Л. Горелик, Ю.А. Бочарова, Р.Ф. Тепаев. О.А. Пономаренко, А.В. Лазарева, О.В. Карасева, А.Л. Горелик, Ю.А. Бочарова, Р.Ф. Тепаев // Современные технологии в медицине. – 2015. – Т. 7, № 2. – С. 68-74.
141. Чернов, И.Ю. Род *Candida* Berkhout / И.Ю. Чернов // В сб.: Новое в систематике и номенклатуре грибов / под ред. Ю.Т. Дьякова, Ю.В. Сергеева. – М.: Национальная академия микологии. Медицина для всех, 2003. – С. 342-356.
142. Чернов, И.Ю. Дрожжи в природе / И.Ю. Чернов. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2013. – 336 с.
143. Шевяков, М.А. Кандидоз слизистых оболочек пищеварительного тракта (лекция) / М.А. Шевяков // Проблемы медицинской микологии. – 2000. – Т. 2, № 2. – С. 6-10.
144. Шевяков, М.А. Кандидоз слизистых оболочек пищеварительного тракта: клиническое значение и современные методы лечения / М.А. Шевяков // Фарматека. – 2010. – № 2. – С. 83-87.
145. Шевяков, М.А. Грибы рода *Candida* в кишечнике: клинические аспекты (обзор) / М.А. Шевяков, Е.Б. Авалуева, Н.В. Барышникова // Проблемы медицинской микологии. – 2007. – Т. 9, № 4. – С. 4-11.
146. Шуга, А.М. Зигомикоз (мукоормикозы и энтомофтормикозы) / А.М. Шуга // В кн.: Атлас грибковых заболеваний / под ред. К.А. Кауфман, Д.Л. Манделла; пер. с англ. под ред. Ю.В. Сергеева. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – С. 160-168.
147. Aguirre, C. Fungemia and interstitial lung compromise caused by *Malassezia sympodialis* in a pediatric patient / C. Aguirre, C. Euliarte, J. Finquelievich, L. Sosa Mde, G. Giusiano // Rev Iberoam Micol. – 2015. – Vol. 32(2). – P. 118-121.

148. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi, 8th Edition / Eds. D.L. Hawksworth, P.M. Kirk, B.C. Sutton, D.M. Pegler. – Wallingford, UK: CAB International, 1995. – 616 p.
149. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi, 9th Edition / Eds. P.M. Kirk, P.F. Cannon, J.C. David, J.A. Stalpers. – CABI Bioscience, 2001. – 624 p.
150. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi, 10th Edition / Eds. P.M. Kirk, P.F. Cannon, D.W. Minter, J.A. Stalpers. – Wallingford, UK: CAB International, 2008. – 771 p.
151. Alangaden, G.J. Nosocomial fungal infections: epidemiology, infection control, and prevention / G.J. Alangaden // Infect Dis Clin North Am. – 2011. – Vol. 25. – P. 201-225.
152. Alexopoulos, C.J. Introductory Mycology / C.J. Alexopoulos, C.W. Mims, M. Blackwell – 4th ed. – New York: Wiley, 1996. – 868 p.
153. Aliouat-Denis, C.M. The Pneumocystis life cycle / C.M. Aliouat-Denis, A. Martinez, M. Aliouat, M. Pottier, N. Gantois, E. Dei-Cas // Mem Inst Oswaldo Cruz. – 2009. – Vol. 104(3). – P. 419-426.
154. ALLERGEN NOMENCLATURE IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee. – URL: <http://www.allergen.org/index.php>
155. Alonso, V. Ecophysiology of environmental *Aspergillus fumigatus* and comparison with clinical strains on gliotoxin production and elastase activity / V. Alonso, C. Aminahuel, L. Díaz Vergara, C. Pereyra, V. Poloni, A. Dalcero, L. Cavaglieri // Lett Appl Microbiol. – 2016. – Vol. 62(2). – P. 160-168.
156. Anaissie, E.J. Pathogenic molds (including *Aspergillus* species) in hospital water distribution systems: a 3-year prospective study and clinical implications for patients with hematologic malignancies / E.J. Anaissie, S.L. Stratton, M.C. Dignani, C.K. Lee, R.C. Summerbell, J.H. Rex, T.P. Monson, T.J. Walsh // Blood. – 2003. – Vol. 101(7). – P. 2542-2546.
157. Arendrup, M.C. Detection of candidaemia in patients with and without underlying aematological disease / M.C. Arendrup, O.J. Bergmann, L. Larsson,

- H.V. Nielsen, J.O. Jarlov, B. Christensson // Clin Microbiol Infect. – 2010. – Vol. 16. – P. 855-862.
158. Ascioglu, S. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus / S. Ascioglu, J.H. Rex, B. de Pauw, J.E. Bennett, J. Bille, F. Crokaert, D.W. Denning, J.P. Donnelly, J.E. Edwards, Z. Erjavec, D. Fiere, O. Lortholary, J. Maertens, J.F. Meis, T.F. Patterson, J. Ritter, D. Selleslag, P.M. Shah, D.A. Stevens, T.J. Walsh // Clin Infect Dis. – 2002. – Vol. 34. – P. 7-14.
 159. Avni, T. PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis / T. Avni, L. Leibovici, M. Paul // J Clin Microbiol. – 2011. – Vol. 49(2). – P. 665-670.
 160. Baddley, J.W. Pulmonary cryptococcosis in patients without HIV infection: factors associated with disseminated disease / J.W. Baddley, J.R. Perfect, R.A. Oster, R.A. Larsen, G.A. Pankey, H. Henderson, D.W. Haas, C.A. Kauffman, R. Patel, A.K. Zaas, P.G. Pappas // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. – 2008. – Vol. 27(10). – P. 937-943.
 161. Badiane, A.S. Burden of fungal infections in Senegal / A.S. Badiane, D. Ndiaye, D.W. Denning // Mycoses. – 2015. – Vol. 58(5). – P. 63-69.
 162. Baker, R.M. Malassezia pneumonia: a rare complication of parenteral nutrition therapy / R.M. Baker, R.J. Stegink, J.J. Manaloor, B.H. Schmitt, J.C. Stevens, J.C. Christenson // JPEN J Parenter Enteral Nutr. – 2016. – Vol. 40(8). – P. 1194-1196.
 163. Balajee, S.A. Molecular identification of *Aspergillus* species collected for the Transplant-Associated Infection Surveillance Network / S.A. Balajee, R. Kano, J.W. Baddley, S.A. Moser, K.A. Marr, B.D. Alexander, D. Andes, D.P. Kontoyiannis, G. Perrone, S. Peterson, M.E. Brandt, P.G. Pappas, T. Chiller // J Clin Microbiol. – 2009. – Vol. 47(10). – P. 3138-3141.
 164. Barnes, R.A. Prevention and diagnosis of invasive fungal disease in high-risk patients within an integrative care pathway / R.A. Barnes, K. Stocking, S.

- Bowden, M.H. Poynton, P.L. White // J Infect. – 2013. – Vol. 67(3). – P. 206-214.
165. Barnett, J.A. Yeasts: characteristics and identification / J.A. Barnett, R.W. Payne, D. Yarrow. – 2nd ed. – Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1990. – 1002 p.
166. Barnett, J.A. Yeasts: characteristics and identification / J.A. Barnett, R.W. Payne, D. Yarrow. – 3rd ed. – Cambridge Univ. Press, Cambridge, 2000. – 1150 p.
167. Batac, M.C.R. Serious fungal infections in the Philippines / M.C.R. Batac, D. Denning // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. – 2017. – Vol. 36(6). – P. 937-941.
168. Batista, T.M. Draft genome Sequence of the probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* strain ATCC MYA-796 / T.M. Batista, E.T. Marques, G.R. Franco, B. Douradinha // Genome Announc. – 2014. – Vol. 2. – P. 1-2.
169. Benedict, K. Mycotic infections acquired outside areas of known endemicity, United States / K. Benedict, G.R. Thompson, S. Deresinski, T. Chiller // Emerg Infect Dis. – 2015. – Vol. 21(11). – P. 1935-1941.
170. Bennett, J.W. An overview of the genus *Aspergillus* / J.W. Bennett // In: *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics* / Eds. M. Machida, K. Gomi. – Caister Academic Press, 2010. – P. 1-17.
171. Berman, J. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast / J. Berman, P.E. Sudbery // Nat Rev Genet. – 2002. – Vol. 3. – P. 918-930.
172. Bialek, R. Detection of *Cryptococcus neoformans* DNA in tissue samples by nested and real-time PCR assays / R. Bialek, M. Weiss, K. Bekure-Nemariam, L.K. Najvar, M.B. Alberdi, J.R. Graybill, U. Reischl // Clin Diagn Lab Immunol. – 2002. – Vol. 9(2). – P. 461-469.

173. Boekhout, T. Fungal taxonomy: New development in medically important fungi / T. Boekhout, C. Gueidan, S. Hoog de, R. Samson, J. Varga, G. Walther // *Current Fungal Infection Reports*. – 2009. – Vol. 3. – P. 170-178.
174. Bougnoux, M.E. Candidemia and candiduria in critically ill patents admitted to intensive care units in France: incidence molecular diversity, management and outcome / M.E. Bougnoux, G. Kac, P. Aegerter, C. d'Enfert, J.Y. Fagon // *Intensive Care Med*. – 2008. – Vol. 34(2). – P. 292-299.
175. Brown, G.D. Hidden killers: human fungal infections / G.D. Brown, D.W. Denning, N.A.R. Gow, S.M. Levitz, M.G. Netea, T.C. White // *Sci Transl Med*. – 2012. – Vol. 4(165). – P. 1-9.
176. Brummer, E. Regulation by granulocytemacrophage colony-stimulating factor and/or steroids given in vivo of proinflammatory cytokine and chemokine production by bronchoalveolar macrophages in response to *Aspergillus fumigatus* / E. Brummer, M. Kamberi, D.A. Stevens // *J Infect Dis*. – 2003. – Vol. 187. – P. 705-709.
177. Burnik, C. Acute respiratory distress syndrome due to *Cryptococcus albidus* pneumonia: case report and review of the literature / C. Burnik, N.D. Altintas, G. Ozkaya, T. Serter, Z.T. Selçuk, P. Firat, S. Arikan, M. Cuenca-Estrella, A. Topeli // *Med Mycol*. – 2007. – Vol. 45(5). – P. 469-473.
178. Bush, R.K. *Alternaria*-induced asthma / R.K. Bush, J.J. Prochnau // *J Allergy Clin Immunol*. – 2004. – Vol. 113. – P. 227-234.
179. Bustamante, B. Serious fungal infections in Peru / B. Bustamante, D.W. Denning, P.E. Campos // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. – 2017. – Vol. 36(6). – P. 943-948.
180. Calderone, R.A. *Candida* and Candidiasis / R.A. Calderone – ASM Press, Washington, DC, 2002. – 472 p.
181. Calderone, R.A. *Candida* and Candidiasis / R.A. Calderone, C.J. Clancy. – 2nd ed. – ASM Press, Washington, DC, 2012. – 536 p.
182. Candidiasis: pathogenesis, diagnosis, and treatment / Ed. G. P. Bodey. – New York: Raven Press, 1993. – 432 p.

183. Catalogue of Life. – URL: <http://www.catalogueoflife.org>
184. Cavalier-Smith, T. A revised six-kingdom system of life / T. Cavalier-Smith // Biol Rev Camb Philos Soc. – 1998. – Vol. 73(3). – P. 203-266.
185. Cavalier-Smith, T. Only six kingdoms of life / T. Cavalier-Smith // Proc Biol Sci. – 2004. – Vol. 271(1545). – P. 1251-1262.
186. Chan, C. Detection of antibodies specific to an antigenic cell wall galactomannoprotein for serodiagnosis of *Aspergillus fumigatus* aspergillosis / C. Chan, P.C.Y. Woo, A.S.P. Leung, S.K.P. Lau, X. Che, L. Cao, K. Yuen // J Clin Microbiol. – 2002 – Vol. 40(6). – P. 2041-2045.
187. Chapman, M.D. Allergen nomenclature / M.D. Chapman / In: Allergens and allergen immunotherapy / Eds. R.F. Lockey, D.K. Ledford. – 4th ed. – Informa Healthcare, New York, 2008. – P. 47-58.
188. Chapman, S.W. *Blastomyces dermatitidis* / S.W. Chapman, D.C. Sullivan // In: Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases / Eds. G.L. Mandell, J.E. Bennett, R. Dolin. – 7th ed. – Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2010. – P. 3319-3332.
189. Chatzimichalis, A. Bronchopulmonary aspergilloma: a reappraisal / A. Chatzimichalis, G. Massard, R. Kessler, P. Barsotti, B. Claudon, J. Ojard-Chillet, J.M. Wihlm // Ann Thorac Surg. – 1998. – Vol. 65(4). – P. 927-929.
190. Chayakulkeeree, M. Serious fungal infections in Thailand / M. Chayakulkeeree, D.W. Denning // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. – 2017. – Vol. 36(6). – P. 931-935.
191. Chayakulkeeree, M. SEC14 is a specific requirement for secretion of phospholipase B1 and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* / M. Chayakulkeeree, S.A. Johnston, J.B. Oei, S. Lev, P.R. Williamson, C.F. Wilson, X. Zuo, A.L. Leal, M.H. Vainstein, W. Meyer, T.C. Sorrell, J.T. Djordjevic // Mol Microbiol. – 2011. – Vol. 80. – P. 1088-1101.
192. Chen, S. Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group / S. Chen, T. Sorrell, G. Nimmo, B.

- Speed, B. Currie, D. Ellis, D. Marriott, T. Pfeiffer, D. Parr, K. Byth // Clin Infect Dis. – 2000. – Vol. 31(2). – P. 499-508.
193. Chen, S.C. *Cryptococcus gattii* infections / S.C. Chen, W. Meyer, T.C. Sorrell // Clin Microbiol Rev. – 2014. – Vol. 27(4). – P. 980-1024.
 194. Chertow, G.M. *Saccharomyces cerevisiae* empyema in a patient with esophagopleural fistula complicating variceal sclerotherapy / G.M. Chertow, E.R. Marcantonio, R.G. Wells // Chest. – 1991. – Vol. 99. – P. 1518-1519.
 195. Cicora, F. A rare case of *Cryptococcus gattii* pneumonia in a renal transplant patient / F. Cicora, J. Petroni, P. Formosa, J. Roberti // Transpl Infect Dis. – 2015. – Vol. 17(3). – P. 463-466.
 196. Clancy, C.J. Finding the “missing 50%” of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care / C.J. Clancy, M.H. Nguyen // Clin Infect Dis. – 2013. – Vol. 56. – P. 284-292.
 197. Cliff, J.M. The human immune response to tuberculosis and its treatment: a view from the blood / J.M. Cliff, S.H.E. Kaufmann, H. McShane, P. van Helden, A. O'Garra // Immunol Rev. – 2015. – Vol. 264(1). – P. 88-102.
 198. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing; approved guideline. CLSI document MM14-A. CLSI: Wayne, PA., 2008. – 76 p.
 199. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard – Second edition. CLSI document M38-A2. CLSI: Wayne, PA., 2008. – 35 p.
 200. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard – Third edition. CLSI document M27-A3, 2008. – 25 p.
 201. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; third informational

- supplement. CLSI document M27-S3. CLSI: Wayne, PA., 2008. – URL: <https://mycology.adelaide.edu.au/docs/afst-yeasts.pdf>
202. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved guideline – Second Edition. CLSI document M44-A2. CLSI: Wayne, PA., 2009. – 23 p.
 203. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of nondermatophyte filamentous fungi; approved guideline. CLSI document M51-A. CLSI: Wayne, PA., 2010. – 35 p.
 204. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; fourth informational supplement. CLSI document M27-S4. CLSI: Wayne, PA., 2010. – 29 p.
 205. Cogliati, M. Multilocus sequence typing analysis reveals that *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* is a recombinant population / M. Cogliati, A. Zani, V. Rickerts, I. McCormick, M. Desnos-Ollivier, A. Velegraki, P. Escandon, T. Ichikawa, R. Ikeda, A.L. Bienvenue, K. Tintelnot, O. Tore, S. Akcaglar, S. Lockhart, A.M. Tortorano, A. Varma // Fungal Genet Biol. – 2016. – Vol. 6 (87). – P. 22-29.
 206. Conti, F. Acute longitudinal myelitis following *Cryptococcus laurentii* pneumonia in a patient with systemic lupus erythematosus / F. Conti, F.R. Spinelli, S. Colafrancesco, S. Truglia, F. Ceccarelli, F. Fattapposta, M. Sorice, A. Capozzi, G. Ferretti, R. Priori, F. Martinelli, C. Pirone, C. Alessandri, G. Valesini // Lupus. – 2015. – Vol. 24(1). – P. 94-97.
 207. Corzo-León, D.E. Burden of serious fungal infections in Mexico / D.E. Corzo-León, D. Armstrong-James, DW. Denning // Mycoses. – 2015. – Vol. 58(5). – P. 34-44.
 208. Costa, S.F. Non-Aspergillus fungal pneumonia in transplant recipients / S.F. Costa, B.D. Alexander // Clin Chest Med. – 2005. – Vol. 26. – P. 217-230.
 209. Crosdale, D.J. Mannose-binding lectin gene polymorphisms as a susceptibility factor for chronic necrotizing pulmonary aspergillosis / D.J.

- Crosdale, K.V. Poulton, W.E. Ollier, W. Thomson, D.W. Denning // J Infect Dis. – 2001. – Vol. 184. – P. 653-665.
210. Davis, D.A. How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence / D.A. Davis // Curr Opin Microbiol. – 2009. – Vol. 12. – P. 365-370.
 211. De Pauw, B. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group / B. De Pauw, T.J. Walsh, J.P. Donnelly, D.A. Stevens, J.E. Edwards, T. Calandra, P.G. Pappas, J. Maertens, O. Lortholary, C.A. Kauffman, D.W. Denning, T.F. Patterson, G. Maschmeyer, J. Bille, W.E. Dismukes, R. Herbrecht, W.W. Hope, C.C. Kibbler, B.J. Kullberg, K.A. Marr, P. Muñoz, F.C. Odds, J.R. Perfect, A. Restrepo, M. Ruhnke, B.H. Segal, J.D. Sobel, T.C. Sorrell, C. Viscoli, J.R. Wingard, T. Zaoutis, J.E. Bennett // Clin Infect Dis. – 2008. – Vol. 46(12). – P. 1813-1821.
 212. Deepe, G.S. *Histoplasma capsulatum* / G.S. Deepe // In: Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases / Eds. G.L. Mandell, J.E. Bennett, R. Dolin. – 7th ed. – Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2010. – P. 3305-3318.
 213. Denning, D.W. Echinocandin antifungal drugs / D.W. Denning // Lancet. – 2003. – Vol. 362. – P. 1142-1151.
 214. Denning, D.W. Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management / D.W. Denning, J. Cadranel, C. Beigelman-Aubry, F. Ader, A. Chakrabarti, S. Blot, A.J. Ullmann, G. Dimopoulos, C. Lange // Eur Respir J. – 2016. – Vol. 47. – P. 45-68.
 215. Denning, D.W. Burden of serious fungal infections in Trinidad and Tobago / D.W. Denning, H.C. Gugnani // Mycoses. – 2015. – Vol. 58(5). – P. 80-84.
 216. Denning, D.W. Global burden of chronic pulmonary aspergillosis as a sequel to pulmonary tuberculosis / D.W. Denning, A. Pleuvry, D.C. Cole // Bull World Health Organ. – 2011. – Vol. 1, № 89(12). – P. 864-872.

217. Denning, D.W. Global burden of chronic pulmonary aspergillosis complicating sarcoidosis / D.W. Denning, A. Pleuvry, D.C. Cole // *Eur Respir.* – 2013. – Vol. 41(3). – P. 621-626.
218. Doctor Fungus. The Official Website of the Mycoses Study Group. – URL: <http://mycosesstudygroup.org/>
219. Domsch, K.H. Compendium of soil fungi / K.H. Domsch, W. Gams, T.-H. Anderson. – 2nd ed. revised by W. Gams. – IFW Verlag Eching, 2007. – 672 p.
220. Edwards, J.E. *Candida* species / J.E. Edwards // In: Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases / Eds. G.L. Mandell, J.E. Bennett, R. Dolin. – 7th ed. – Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2010. – P. 3225-3240.
221. Electronic version of EUCAST MIC breakpoint tables. – URL: <http://clincalc.com/eucast/>
222. Enache-Angoulvant, A. Invasive *Saccharomyces* infection: a comprehensive review / A. Enache-Angoulvant, C. Hennequin // *Clin Infect Dis.* – 2005. – Vol. 41(11). – P. 1559-1568.
223. Enoch, D.A. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options / D.A. Enoch, H.A. Ludlam, N.M. Brown // *J Med Microbiol.* – 2006. – Vol. 55. – P. 809-818.
224. EUCAST Definitive Document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) // *Clin Microbiol Infect.* – 2008. – Vol. 14. – P. 398-405.
225. EUCAST Definitive Document E.DEF 9.1: Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), 2008. – 13 p.

226. EUCAST Definitive Document E.DEF 9.3. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds, 2015. – 23 p.
227. EUCAST Definitive Document EDEF 7.3.1. Method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts, 2017. – 21 p.
228. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antifungal Agents Breakpoint tables for interpretation of MICs. Version 9.0, valid from 2018-02-12, 2018.
229. Faini, D. Burden of serious fungal infections in Tanzania / D. Faini, W. Maokola, H. Furrer, C. Hatz, M. Battegay, M. Tanner, D.W. Denning, E. Letang // *Mycoses*. – 2015. – Vol. 58(5). – P. 70-79.
230. Fischer, J. *Rhodotorula mucilaginosa* as a cause of recurrent pulmonary infection and liver infiltration in a patient with CLL / J. Fischer, L. Hamacher, J. Fries, M. Hallek, O.A. Cornely, M. Kochanek, B. Boell // *Ann Hematol*. – 2016. – Vol. 95(9). – P. 1569-1570.
231. Fontalvo, D.M. Tuberculosis and pulmonary candidiasis co-infection present in a previously healthy patient / D.M. Fontalvo, G. Jiménez Borré, D. Gómez Camargo, N. Chalavé Jiménez, J. Bellido Rodríguez, B. Cuadrado Cano, S. Navarro Gómez // *Colomb Med (Cali)*. – 2016. – Vol. 47(2). – P. 105-108.
232. Foster, C.E. Trichosporonosis in pediatric patients with a hematologic disorder / C.E. Foster, M.S. Edwards, J. Brackett, D.A. Schady, C.M. Healy, C.J. Baker // *J Pediatric Infect Dis Soc*. – 2018 – Vol. 7(3). – P. 199-204.
233. Frenkel, J.K. Pneumocystis pneumonia, an immunodeficiency-dependent disease (IDD): a critical historical overview / J.K. Frenkel // *J Eukaryot Microbiol*. – 1999. – Vol. 46(5). – P. 89S-92S.
234. Galgiani, J.N. *Coccidioides* species / J.N. Galgiani // In: Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases / Eds. G.L. Mandell, J.E. Bennett, R. Dolin. – 7th ed. – Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2010. – P. 3333-3344.

235. Garbee, D.D. Opportunistic fungal infections in critical care units / D.D. Garbee, S.S. Pierce, J. Manning // *Crit Care Nurs Clin North Am.* – 2017. – Vol. 29(1). – P. 67-79.
236. García-Ruiz, J.C. Invasive infections caused by *Saprochaete capitata* in patients with haematological malignancies: report of five cases and review of the antifungal therapy / J.C. García-Ruiz, L. López-Soria, I. Olazábal, E. Amutio, I. Arrieta-Aguirre, V. Velasco-Benito, J. Pontón, M.D. Moragues // *Rev Iberoam Micol.* – 2013. – Vol. 30(4). – P. 248-255.
237. García-Suárez, J. Epidemiology and outcome of *Rhodotorula* infection in haematological patients / J. García-Suárez, P. Gómez-Herruz, J.A. Cuadros, C. Burgaleta // *Mycoses.* – 2011. – Vol. 54(4). – P. 318-324.
238. Gardes, M. ITS primers with enhanced specificity for *Basidiomycetes* – application to the identification of mycorrhizae and rusts / M. Gardes, T.D. Bruns // *Mol Ecol.* – 1993. – Vol. 2(2). – P. 113-118.
239. Global tuberculosis report 2015, 20th ed. World Health Organization. – URL: <http://www.who.int/iris/handle/10665/191102>
240. Global tuberculosis report 2016. World Health Organization. – URL: <http://www.who.int/iris/handle/10665/250441>
241. Golebiowski, A.K. Pleural aspergillosis following resection for pulmonary tuberculosis / A.K. Golebiowski // *Tubercle.* – 1958. – Vol. 39(2). – P. 111-112.
242. Goto, N. Management of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in kidney transplantation to prevent further outbreak / N. Goto, K. Futamura, M. Okada, T. Yamamoto, M. Tsujita, T. Hiramitsu, S. Narumi, Y. Watarai // *Clin Med Insights Circ Respir Pulm Med.* – 2015. – Vol. 9(1). – P. 81-90.
243. Guarro, J. Developments in fungal taxonomy / J. Guarro, J. Gené, A.M. Stchigel // *Clin Microbiol Rev.* – 1999. – Vol. 12(3). – P. 454-500.
244. Gugnani, H.C. Burden of serious fungal infections in Bangladesh / H.C. Gugnani, D.W. Denning, R. Rahim, A. Sadat, M. Belal, M.S. Mahbub // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* – 2017. – Vol. 36(6). – P. 993-997.

245. Gupta, A.K. Skin diseases associated with *Malassezia* species / A.K. Gupta, R. Batra, R. Bluhm, T. Boekhout, T.L. Dawson // J Am Acad Dermatol. – 2004. – Vol. 51(5). – P. 785-798.
246. Guto, J.A. Estimated burden of fungal infections in Kenya / J.A. Guto, C.C. Bii, D.W. Denning // J Infect Dev Ctries. – 2016. – Vol. 10(8). – P. 777-784.
247. Hajjeh, R.A. Counterpoint: invasive aspergillosis and the environment rethinking our approach to prevention / R.A. Hajjeh, D.W. Warnock // Clin Infect Dis. – 2001. – Vol. 33. – P. 1549-1552.
248. Hamilton, B.G. Allergic bronchopulmonary disease secondary to *Bipolaris spicifera*: case report / B.G. Hamilton, C.W. Humphreys, W.C. Corner, D.R. Hospenhol // J. Bronchol. – 2006. – Vol. 13. – P. 77-79.
249. Haron, E. Primary *Candida* pneumonia. Experience at a large cancer center and review of the literature / E. Haron, S. Vartivarian, E. Anaissie, R. Dekmezian, G.P. Bodey // Medicine (Baltimore). – 1993. – Vol. 72(3). – P. 137-142.
250. Harris, J.R. *Cryptococcus gattii* in the United States: Clinical aspects of infection with an emerging pathogen / J.R. Harris, S.R. Lockhart, E. Debess, N. Marsden-Haug, M. Goldoft, R. Wohrle, S. Lee, C. Smelser, B. Park, T. Chiller // Clin Infect Dis. – 2011. – Vol. 53. – P. 1188-1195.
251. Hector, R.F. Compounds active against cell walls of medically important fungi / R.F. Hector // Clin Microbiol Rev. – 1993. – Vol. 6. – P 1-21.
252. Hernandez, R. Human epithelial model systems for the study of *Candida* infections in vitro: Part II. Histologic methods for studying fungal invasion / R. Hernandez, S. Rupp // Methods Mol Biol (Clifton, NJ). – 2009. – Vol. 470. – P. 105-123.
253. Hibbett, D.S. A higher-level phylogenetic classification on the fungi / D.S. Hibbett, M. Binder, J. F. Bischoff, M. Blackwell, P.F. Cannon // Mycol Res. – 2007. – Vol. 111. – P. 509-547.
254. Hidron, A.I. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease

- Control and Prevention, 2006-2007 / A.I. Hidron, J.R. Edwards, J. Patel, T.C. Horan, D.M. Sievert, D.A. Pollock, S.K. Fridkin // *Infect Control Hosp Epidemiol.* – 2008. – Vol. 29. – P. 996-1011.
255. Hiller, E. Adaptation, adhesion and invasion during interaction of *Candida albicans* with the host – Focus on the function of cell wall proteins / E. Hiller, M. Zavrel, N. Hauser, K. Sohn, A. Burger-Kentischer, K. Lemuth, S. Rupp // *Int J Med Microbiol.* – 2011. – Vol. 301. – P. 384-389.
256. Hoog de, G.S. Atlas of clinical fungi / G.S. Hoog de, J. Guarro – CBS: Reus, 1996. – 720 p.
257. Hoog de, G.S. Atlas of clinical fungi / G.S. Hoog de, J. Guarro, J. Gene, M.J. Figueras. – 2nd ed. – CBS: Reus, 2000. – 1126 p.
258. Hoog de, G.S. Atlas of clinical fungi. Electronic Version 3.1 / G.S. Hoog de, J. Guarro, J. Gene, M.J. Figueras. – CBS: Reus, 2011. – URL: <http://www.clinicalfungi.org/>
259. Hoog de, G.S. Ribosomal gene phylogeny and species delimitation in *Geotrichum* and its teleomorphs / G.S. Hoog de, M.Th. Smith // *Stud Mycol.* – 2004. – Vol. 50(2). – P. 489- 515.
260. Hoog de, G.S. A revision of the genus *Geotrichum* and its teleomorphs / G.S. Hoog de, M.Th. Smith, E. Guého. // *Stud Mycol.* – 1986. – Vol. 29. – P. 1-131.
261. Hope, W.W. The invasive and saprophytic syndrome due to *Aspergillus* spp. / W.W. Hope, T.J. Walsh, D.W. Denning // *Med Mycol.* – 2005. – Vol. 43(1). – P. 207-238.
262. Horn, B.W. Sexual reproduction in *Aspergillus flavus* / B.W. Horn, G.G. Moore, I. Carbone // *Mycologia.* – 2009. – Vol. 101(3). – P. 423-429.
263. Horvath, J.A. The use of respiratory-tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis / J.A. Horvath, S. Dummer // *Am J Med.* – 1996. – Vol. 100(2). – P.171-178.

264. Howard, D.H. An instruction to the taxonomy of zoopathogenic fungi / D.H. Howard // In: Pathogenic fungi in humans and animals / Ed. D.H. Howard. – 2nd ed. – New York: Marcel Dekker, 2003. – P. 1-16.
265. Hsu, J.L. Diagnosing invasive fungal disease in critically ill patients / J.L. Hsu, S.J. Ruoss, N.D. Bower, M. Lin, M. Holodniy, D.A. Stevens // Crit Rev Microbiol. – 2011. – Vol. 37(4). – P. 277-312.
266. Hughes, M. Disseminated cryptococcal disease with diffuse pulmonary Infiltrates in a non-HIV host / M. Hughes, K. Trivedi, M. Rudrappa // J La State Med Soc. – 2017. – Vol. 169(2). – P. 57.
267. Ikeda, M. Resection of bronchial stricture and destroyed lung after pulmonary tuberculosis / M. Ikeda, M. Sonobe, H. Date // Interact Cardiovasc Thorac Surg. – 2012. – Vol. 14(5). – P. 652-654.
268. Imtiaz, T. *Candida krusei* bronchopneumonia with nodular infiltrates in a patient with chronic renal failure on haemodialysis – case report and review of literature / T. Imtiaz, F. Thomson, A. Innes, F.C. du Toit, A.M. Bal // Mycoses. – 2011. – Vol. 54(5). – P. e611-e614.
269. Index Fungorum. – URL: <http://www.indexfungorum.org/>
270. Jabeen, K. Serious fungal infections in Pakistan / K. Jabeen, J. Farooqi, S. Mirza, D. Denning, D. Zafar // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. – 2017. – Vol. 36(6). – P. 949-956.
271. Jacobsen, I.D. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target / I.D. Jacobsen, D. Wilson, B. Wächtler, S. Brunke, J.R. Naglik, B. Hube // Expert Rev Anti Infect Ther. – 2012. – Vol. 10. – P. 85-93.
272. Kadri, S.S. Role of granulocyte transfusions in invasive fusariosis: systematic review and single-center experience / S.S. Kadri, K.E. Remy, J.R. Strich, J. Gea-Banacloche, S.F. Leitman // Transfusion. – 2015. – Vol. 55 (9). – P. 2076-2085.
273. Kamei, K. *Aspergillus* mycotoxins and their effect on the host / K. Kamei, A. Watanabe // Med Mycol. – 2005. – Vol. 43(1). – P. 95-99.

274. Karageorgopoulos, D.E. β -D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis / D.E. Karageorgopoulos, E.K. Vouloumanou, F. Ntziora, A. Michalopoulos, P.I. Rafailidis, M.E. Falagas // Clin Infect Dis. – 2011. – Vol. 52(6). – P. 750-770.
275. Katou, K. A case of chronic necrotizing pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus flavipes* associated with pulmonary fibrosis / K. Katou, K. Nanjou, M. Kawakami // Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi. – 1999. – Vol. 37(11). – P. 938-942.
276. Kawamura, S. Clinical evaluation of 61 patients with pulmonary aspergilloma / S. Kawamura, S. Maesaki, K. Tomono, T. Tashiro, S. Kohno // Intern Med. – 2000. – Vol. 39. – P. 209-212.
277. Kendrick, B. The Fifth Kingdom / B. Kendrick – 3rd ed. – Mycologue Publications, 2001. – 400 p.
278. Kidd, S.E. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada) / S.E. Kidd, F. Hagen, R.L. Tschärke, M. Huynh, K.H. Bartlett, M. Fyfe, L. Macdougall, T. Boekhout, K.J. Kwon-Chung, W. Meyer // Proc Natl Acad Sci U.S.A. – 2004. – Vol. 101(49). – P. 17258-17263.
279. Kim, S.H. Invasive pulmonary aspergillosis-mimicking tuberculosis / S.H. Kim, M.Y. Kim, S.I. Hong, J. Jung, H.J. Lee, S.C. Yun, S.O. Lee, S.H. Choi, Y.S. Kim, J.H. Woo // Clin Infect Dis. – 2015. – Vol. 61(1). – P. 9-17.
280. Kimura, H. Progress in management of severe tuberculosis or tuberculosis with severe complication / H. Kimura, K. Imaizumi // Kekkaku. – 2014. – Vol. 89(5). – P. 571-582.
281. Klich M.A. Identification of common *Aspergillus* species / M.A. Klich – Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, 2002. – 116 p.
282. Klimko, N. The burden of serious fungal diseases in Russia / N. Klimko, Y. Kozlova, S. Khostelidi, O. Shadrivova, Y. Borzova, E. Burygina, N. Vasilieva, D.W. Denning // Mycoses. – 2015. – Vol. 58(5). – P. 58-62.

283. Kontoyiannis, D.P. Agents of mucormycosis and entomophthoromycosis / D.P. Kontoyiannis, R.E. Lewis // In: Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases / Eds. G.L. Mandell, J.E. Bennett, R. Dolin. – 7th ed. – Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2010. – P. 3257-3270.
284. Kousha, M. Pulmonary aspergillosis: a clinical review / M. Kousha, R. Tadi, A.O. Soubani // Eur Respir Rev. – 2011. – Vol. 20(121). – P. 156-174.
285. Koyama, K. Evaluation of clinical characteristics and prognosis of chronic pulmonary aspergillosis depending on the underlying lung diseases: Emphysema vs prior tuberculosis / K. Koyama, N. Ohshima, J. Suzuki, M. Kawashima, K. Okuda, R. Sato, M. Suzukawa, H. Nagai, H. Matsui, K. Ohta // J Infect Chemother. – 2015. – Vol. 21(11). – P. 795-801.
286. Köhler, J.R. The spectrum of fungi that infects humans / J.R. Köhler, A. Casadevall, J. Perfect // Cold Spring Harb Perspect Med. – 2014. – Vol. 5(1). – P. 1-22.
287. Kronstad, J.W. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box / J.W. Kronstad, R. Attarian, B. Cadieux, J. Choi, C.A. D'Souza, E.J. Griffiths, J.M. Geddes, G. Hu, W.H. Jung, M. Kretschmer, S. Saikia, J. Wang // Nat Rev Microbiol. – 2011. – Vol. 9. – P. 193-203.
288. Kunnath-Velayudhan, S. Immunodiagnosis of tuberculosis: a dynamic view of biomarker discovery / S. Kunnath-Velayudhan, M.L. Gennaro // Clin Microbiol Rev. – 2011. – Vol. 24(4). – P. 792-805.
289. Kurtz, M.B. Morphological effects of lipopeptides against *Aspergillus fumigatus* correlate with activities against (1,3)- β -D-glucan synthase / M.B. Kurtz, I.B. Heath, J. Marrinan, S. Dreikorn // Antimicrob Agents Chemother. – 1994. – Vol. 38. – P. 1480-1489.
290. Kurtzman, C.P. The yeasts, a taxonomic study / C.P. Kurtzman, J.W. Fell. – 4th ed. – Elsevier, Amsterdam, 1998. – 1055 p.
291. Kurtzman, C.P. The yeast, a taxonomic study / C.P. Kurtzman, J.W. Fell, T. Boekhout. – 5th ed. – Elsevier, Amsterdam, 2011. – 2080 p.

292. Kwon-Chung, K.J. Medical mycology / K.J. Kwon-Chung, J.E. Bennett. – Philadelphia: Lea and Febiger, 1992. – 866 p.
293. Lain, A. Contribution of serum biomarkers to the diagnosis of invasive candidiasis / A. Lain, N. Elguezabal, M.D. Moragues, J.C. Garcia-Ruiz, A. del Palacio, J. Ponton // Expert Rev Mol Diagn. – 2008. – Vol. 8. – P. 315-325.
294. Latgé, J.P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis / J.P. Latgé // Clin Microbiol Rev. – 1999. – Vol. 12(2). – P. 310-350.
295. Latgé, J.P. The cell wall: A carbohydrate armour for the fungal cell / J.P. Latgé // Mol Microbiol. – 2007. – Vol. 66(2). – P. 279-290.
296. Lee, J.S. A case of isolated pulmonary mucormycosis in an immunocompetent host / J.S. Lee, H.C. Kim, S.W. Park, H.S. So, C.Y. Woo, J.H. Choi, S.H. Kim, S.J. Kim, Y-M. Oh // Tuberc Respir Dis (Seoul). – 2013. – Vol. 74. – P. 269-73.
297. Levetin, E. Taxonomy of allergenic fungi / E. Levetin, W.E. Horner, J.A. Scott // J Allergy Clin Immunol Pract. – 2016. – Vol. 4(3). – P. 375-385.
298. LIFE (Leading International Fungal Education). – URL: <http://www.life-worldwide.org/>
299. Lopes, J.O. Mixed invasive *Candida kefyr* and *Aspergillus flavus* pulmonary infection in a leukemia patient / J.O. Lopes, E.S. Mello, B. de Villalba, S.H. Alves, C. Klock // Rev Iberoam Micol. – 1996. – Vol. 13. – P. 3-5.
300. Lowes, D. Development of chronic pulmonary aspergillosis in adult asthmatics with ABPA / D. Lowes, L. Chishimba, M. Greaves, D.W. Denning // Respir Med. – 2015. – Vol. 109(12). – P. 1509-1515.
301. Ma, H. Virulence in *Cryptococcus* species / H. Ma, R.C. May // Adv Appl Microbiol. – 2009. – Vol. 67. – P. 131-190.
302. Maertens, J.A. Optimization of the cutoff value for the *Aspergillus* double-sandwich enzyme immunoassay / J.A. Maertens, R. Klont, C. Masson, K. Theunissen, W. Meersseman, K. Lagrou // Clin Infect Dis. – 2007. – Vol. 44. – P. 1329-1336.

303. Maniwa, K. Autopsy case of pulmonary aspergillosis soon after convalescence from pulmonary tuberculosis / K. Maniwa, E. Tanaka, T. Inoue, M. Sakuramoto, M. Minakuchi, Y. Maeda, K. Tanizawa, T. Takeda, M. Komatsu, M. Okamoto, Y. Taguchi // *Kansenshogaku Zasshi*. – 2005. – Vol. 79(12). – P. 957-963.
304. Marchetti, O. ECIL recommendations for the use of biological markers for the diagnosis of invasive fungal diseases in leukemic patients and hematopoietic SCT recipients / O. Marchetti, F. Lamoth, M. Mikulska, C. Viscoli, P. Verweij, S. Bretagne // *Bone Marrow Transplant*. – 2012. – Vol. 47. – P. 846-854.
305. Margulis, L. Five Kingdoms. An illustrated guide to the Phyla of life on earth / L. Margulis, K.V. Schwartz – 3rd ed. – N.Y.: W.H. Freeman and Co, 1998. – 520 p.
306. Martinez, A. Growth and airborne transmission of cell-sorted life cycle stages of *Pneumocystis carinii* / A. Martinez, M.C. Halliez, M. Aliouat el, M. Chabé, A. Standaert-Vitse, E.F. Gantois, M. Pottier, A. Pinon, E. Dei-Cas, C-M. Aliouat-Denis // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8(11). – P. 1–8. – e79958.
307. Marty, F.M. Reactivity of (1-3)-beta-Dglucan assay with commonly used intravenous antimicrobials / F.M. Marty, C.M. Lowry, S.J. Lempitski, D.W. Kubiak, M.A. Finkelman, L.R. Baden // *Antimicrob Agents Chemother*. – 2006. – Vol. 50(10). – P. 3450-3453.
308. Mayer, F.L. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms / F.L. Mayer, D. Wilson, B. Hube // *Virulence*. – 2013. – Vol. 4(2). – P. 119-128.
309. Maziarz, E.K. Cryptococcosis / E.K. Maziarz, J.R. Perfect // *Infect Dis Clin North Am*. – 2016. – Vol. 30(1). – P. 179-206.
310. Mengoli, C. Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis / C. Mengoli, M. Cruciani, R.A. Barnes, J. Loeffler, J.P. Donnelly // *Lancet Infect Dis*. – 2009. – Vol. 9(2). – P. 89-96.
311. Meyohas, M.C. Pulmonary cryptococcosis: localized and disseminated infections in 27 patients with AIDS / M.C. Meyohas, P. Roux, D. Bollens, C.

- Chouaid, W. Rozenbaum, J.L. Meynard, J.L. Poirot, J. Frottier, C. Mayaud // Clin Infect Dis. – 1995. – Vol. 21(3). – P. 628-633.
312. Mitchell, T.G. Cryptococcosis in the era of AIDS: 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans* / T.G. Mitchell, J.R. Perfect // Clin Microbiol Rev. – 1995. – Vol. 8(4). – P. 515-548.
313. Mizuki, M. A case of chronic necrotizing pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus nidulans* / M. Mizuki, K. Chikuba, K. Tanaka // Mycopathologia. – 1994. – Vol. 128(2). – P. 75-79.
314. Moreira, J. The burden of mucormycosis in HIV-infected patients: A systematic review / J. Moreira, A. Varon, M.C. Galhardo, F. Santos, M. Lyra, R. Castro, R. Oliveira, C.C. Lamas // J Infect. – 2016. – Vol. 73(3). – P. 181-188.
315. Morgan, J. Global trends in candidemia: review of reports from 1995-2005 / J. Morgan // Curr Infect Dis Rep. – 2005. – Vol.7. – P. 429-439.
316. Morrissey, C.O. Galactomannan and PCR versus culture and histology for directing use of antifungal treatment for invasive aspergillosis in high-risk haematology patients: a randomised controlled trial / C.O. Morrissey, S.C. Chen, T.C. Sorrell, S. Milliken, P.G. Bardy, K.F. Bradstock, J. Szer, C.L. Halliday, N.M. Gilroy, J. Moore, A.P. Schwarzer, S. Guy, A. Bajel, A.R. Tramontana, T. Spelman, M.A. Slavin // Lancet Infect Dis. – 2013. – Vol. 13(6). – P. 519-528.
317. Mortensen, K.L. The burden of fungal disease in Denmark / K.L. Mortensen, D.W. Denning, M.C. Arendrup // Mycoses. – 2015. – Vol. 58(5). – P. 15-21.
318. MycoBank, the fungal website. – URL: <http://www.mycobank.org/>
319. Mycology Online. The University of Adelaide. – URL: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/>
320. Nakabayashi, A. Rapidly progressive pneumonia caused by *Cryptococcus neoformans* in the patient of granulomatosis with polyangiitis / A. Nakabayashi, M. Seki, T. Hirano, H. Hirata, K. Tomono, A. Kumanogoh // Respir Med Case Rep. – 2014. – Vol. 13. – P. 13-15.

321. Nakagawa, Y. Saprophytic pleuritis with *Candida parapsilosis* (Article in Japanese) / Y. Nakagawa, Y. Fukushima, T. Sakata, M. Suga, M. Ando // Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi. – 1996. – Vol. 34(3). – P. 341-344.
322. NCBI, website. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
323. Novey, H.S. Allergic bronchopulmonary aspergillosis caused by *Aspergillus ochraceus* / H.S. Novey, I.D. Wells // Am J Clin Pathol. – 1978. – Vol. 70(5). – P. 840-843.
324. Nucci, M. *Fusarium* infections in immunocompromised patients / M. Nucci, E. Anaissie // Clin Microbiol Rev. – 2007. – Vol. 20(4). – P. 695-704.
325. Nunes, J.M. Molecular identification, antifungal susceptibility profile, and biofilm formation of clinical and environmental *Rhodotorula* species isolates / J.M. Nunes, F.C. Bizerra, R.C. Ferreira, A.L. Colombo // Antimicrob Agents Chemother. – 2013. – Vol. 57(1). – P. 382-389.
326. Odabasi, Z. Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: Validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome / Z. Odabasi, G. Mattiuzzi, E. Estey, H. Kantarjian, F. Saeki, R.J. Ridge, P.A. Ketchum, M.A. Finkelman, J.H. Rex, L. Ostrosky-Zeichner // Clin Infect Dis. – 2004. – Vol. 39(2). – P. 199-205.
327. O'Donnell, K. *Fusarium* and its near relatives / K. O'Donnell // In: The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics / Eds. D.R. Reynolds, J.W. Taylor. – Wallingford: CAB International, 1993. – P. 225-233.
328. OECD best practice guidelines for biological resource centres. Best practice guidelines on biosecurity for the microorganism domain. – OECD, 2007. – P. 58-68.
329. Oladele, R.O. Burden of serious fungal infection in Nigeria / R.O. Oladele, D.W. Denning // West Afr J Med. – 2014. – Vol. 33(2). – P. 107-114.
330. Orciuolo, E. Effects of *Aspergillus fumigatus* gliotoxin and methylprednisolone on human neutrophils: implications for the pathogenesis of

- invasive aspergillosis / E. Orciuolo, M. Stanzani, M. Canestraro, S. Galimberti, G. Carulli, R. Lewis, M. Petrini, K.V. Komanduri // J Leukoc Biol. – 2007. – Vol. 82(4). – P. 839-848.
331. Osmanov, A. Burden of serious fungal infections in Ukraine / A. Osmanov, D.W. Denning // Mycoses. – 2015. – Vol. 58(5). – P. 94-100.
332. Ostrosky-Zeichner, L. Invasive mycoses: diagnostic challenges / L. Ostrosky-Zeichner // Am J Med. – 2012. – Vol. 125(1). – P. 14-24.
333. Out, A.A. If not pulmonary tuberculosis, what else could it be? / A.A. Out, E. Ochang, R. Oladele, D.W. Denning // African Journal of Respiratory Medicine. – 2015. – Vol. 11 (1). – P. 19-21.
334. Pappas, P.G. Opportunistic fungi: a view to the future / P.G. Pappas // Am J Med Sci. – 2010. – Vol. 340(3). – P. 253-257.
335. Pappas, P.G. Guidelines for treatment of candidiasis / P.G. Pappas, J.H. Rex, J.D. Sobel // Clin Infect Dis. – 2004. – Vol. 38. – P. 161-189.
336. Pappas, P.G. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America / P.G. Pappas, C.A. Kauffman, D. Andes, D.K. Benjamin, T.F. Calandra, J.E. Edwards, S.G. Filler, J.F. Fisher, B.J. Kullberg, L. Ostrosky-Zeichner, A.C. Reboli, J.H. Rex, T.J. Walsh, J.D. Sobel // Clin Infect Dis. – 2009. – Vol. 48. – P. 503-535.
337. Pappas, P.G. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America / P.G. Pappas, C.A. Kauffman, D.R. Andes, C.J. Clancy, K.A. Marr, L. Ostrosky-Zeichner, A.C. Reboli, M.G. Schuster, J.A. Vazquez, T.J. Walsh, T.E. Zaoutis, J.D. Sobel // Clin Infect Dis. 2016. – Vol. 62(4) – e1-50. Epub 2015 Dec 16.
338. Parahym, A.M. Invasive infection due to *Saprochaete capitata* in a young patient with hematological malignancies / A.M. Parahym, P.J. Rolim Neto, C.M. da Silva, Ide.F. Domingos, S.S. Gonçalves, E.P. Leite, V.L. de Moraes, D.P. Macêdo, R.G. de Lima Neto, R.P. Neves // Braz J Microbiol. – 2015. – Vol. 46(2). – P. 527-530.

339. Park, B.J. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS / B.J. Park, K.A. Wannemuehler, B.J. Marston, N. Govender, P.G. Pappas, T.M. Chiller // AIDS. – 2009. – Vol. 23(4). – P. 525-530.
340. Parkes-Ratanshi, R. Cryptococcal disease and the burden of other fungal diseases in Uganda; Where are the knowledge gaps and how can we fill them? / R. Parkes-Ratanshi, B. Achan, R. Kwizera, A. Kambugu, D. Meya, D.W. Denning // Mycoses. – 2015. – Vol. 58(5). – P. 85-93.
341. Patterson, T.F. *Aspergillus* species / T.F. Patterson // In: Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases / Eds. G.L. Mandell, J.E. Bennett, R. Dolin. – 7th ed. – Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2010. – P. 3241-3256.
342. Patterson, T.F. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America / T.F. Patterson, G.R. Thompson, D.W. Denning, J.A. Fishman, S. Hadley, R. Herbrecht, D.P. Kontoyiannis, K.A. Marr, V.A. Morrison, M.H. Nguyen, B.H. Segal, W.J. Steinbach, D.A. Stevens, T.J. Walsh, J.R. Wingard // Clin Infect Dis. – 2016. – Vol. 63(4). – P. 433-442.
343. Pegorie, M. Estimating the burden of invasive and serious fungal disease in the United Kingdom / M. Pegorie, D.W. Denning, W. Welfare // J Infect. – 2017. – Vol. 74(1). – P. 60-71.
344. Pepeljnjak, S. The ability of fungal isolates from human lung aspergilloma to produce mycotoxins / S. Pepeljnjak, Z. Slobodnjak, M. Segvić, M. Peraica, M. Pavlović // Hum Exp Toxicol. – 2004. – Vol. 23(1). – P. 15-19.
345. Perfect, J.R. *Cryptococcus neoformans* / J.R. Perfect // In: Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases / Eds. G.L. Mandell, J.E. Bennett, R. Dolin. – 7th ed. – Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2010. – P. 3287-3304.
346. Perfect, J.R. Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now / J.R. Perfect, T. Bicanic // Fungal Genet Biol. – 2015. – Vol. 78. – P. 49-54.

347. Perfect, J.R. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America / J.R. Perfect, W.E. Dismukes, F. Dromer, D.L. Goldman, J.R. Graybill, R.J. Hamill, T.S. Harrison, R.A. Larsen, O. Lortholary, M.H. Nguyen, P.G. Pappas, W.G. Powderly, N. Singh, J.D. Sobel, T.C. Sorrell // Clin Infect Dis. – 2010. – Vol. 50(3). – P. 291-322.
348. Perlin, D.S. Antifungal drug resistance: do molecular methods provide a way forward? / D.S. Perlin // Curr Opin Infect Dis. – 2009. – Vol. 22(6). – P.568-573.
349. Peterson, S.W. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci / S.W. Peterson // Mycologia. – 2008. – Vol. 100(2). – P. 205-226.
350. Peterson, S.W. Phylogeny and subgeneric taxonomy of *Aspergillus* / S.W. Peterson, J. Varga, J.C. Frisvad, R.A. Samson // In: *Aspergillus* in the genomic era / Eds. J. Varga, R.A. Samson. – Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2008. – P. 33-56.
351. Petty, L.A. *Candida dubliniensis* pneumonia: a case report and review of literature / L.A. Petty, A.J. Gallan, J.A. Detrick, J.P. Ridgway, J. Mueller, J. Pisano // Mycopathologia. – 2016. – Vol. 181(9-10). – P. 765-768.
352. Pfaller, M.A. Epidemiology of invasive mycoses in North America / M.A. Pfaller, D.J. Diekema // Crit Rev Microbiol. – 2010. – Vol. 36(1). – P. 1-53.
353. Pfaller, M.A. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012 / M.A. Pfaller, D.J. Diekema // J Clin Microbiol. – 2012. – Vol. 50(9). – P. 2846-2856.
354. Pfaller, M.A. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing / M.A. Pfaller, D.J. Diekema, D.L. Gibbs, V.A. Newell, J.F. Meis, I.M. Gould, W. Fu, A.L.

- Colombo, E. Rodriguez-Noriega // J Clin Microbiol. – 2007. – Vol. 45(6). – P. 1735-1745.
355. Pfaller, M.A. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion / M.A. Pfaller, D.J. Diekema, D.L. Gibbs, V.A. Newell, D. Ellis, V. Tullio, A. Rodloff, W. Fu, T.A. Ling // J. Clin Microbiol. – 2010. – Vol. 48(4). – P. 1366-1377.
356. Pfaller, M.A. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for clinical opportunistic yeast and mold isolates collected from 2010 to 2011: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of geographic and temporal trends of antifungal resistance / M.A. Pfaller, S.A. Messer, L.N. Woosley, R.N. Jones, M. Castanheira // J Clin Microbiol. – 2013. – Vol. 51(8). – P. 2571-2581.
357. Powers-Fletcher, M.V. Molecular diagnostic testing for *Aspergillus* / M.V. Powers-Fletcher, K.E. Hanson // J Clin Microbiol. – 2016. – Vol. 54(11). – P. 2655-2660.
358. Prats, E. Pulmonary mycetoma-like lesion caused by *Candida tropicalis* / E. Prats, J. Sans, J. Valldeperas, J.E. Ferres, F. Manresa // Respir Med. – 1995. – Vol. 89. – P. 303-304.
359. Rali, P. Opportunistic pulmonary infections in immunocompromised hosts / P. Rali, M. Veer, N. Gupta, A.C. Singh, N. Bhanot // Crit Care Nurs Q. – 2016. – Vol. 39(2). – P. 161-175.
360. Regnard, J.F. Aspergilloma: a series of 89 surgical cases / J.F. Regnard, P. Icard, M. Nicolosi, L. Spaggiari, P. Magdeleinat, B. Jauffret, P. Levasseur // Ann Thorac Surg. – 2000. – Vol. 69. – P. 898-903.
361. Restrepo, A. *Paracoccidioides brasiliensis* / A. Restrepo, A.M. Tobón // In: Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases / Eds. G.L. Mandell, J.E. Bennett, R. Dolin. – 7th ed. – Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2010. – P. 3357-3364.

362. Revankar, S.G. Primary central nervous system phaeohyphomycosis: a review of 101 cases / S.G. Revankar, D.A. Sutton, M.G. Rinaldi // Clin Infect Dis. – 2004. – Vol. 38 (2). – P. 206-216.
363. Roden, M.M. Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases / M.M. Roden, T.E. Zaoutis, W.L. Buchanan // Clin Infect Dis. – 2005. – Vol. 41. – P. 634-653.
364. Ruhnke, M. Estimated burden of fungal infections in Germany / M. Ruhnke, A.H. Groll, P. Mayser, A.J. Ullmann, W. Mendling, H. Hof, D.W. Denning // Mycoses. – 2015. – Vol. 58(5). – P. 22-28.
365. Saag, M.S. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. Infectious Diseases Society of America / M.S. Saag, R.J. Graybill, R.A. Larsen, P.G. Pappas, J.R. Perfect, W.G. Powderly, J.D. Sobel, W.E. Dismukes // Clin Infect Dis. – 2000. – Vol. 30(4). – P. 710-718.
366. Salzer, H.J.F Awareness of predictors of mortality may help improve outcome in chronic pulmonary aspergillosis / H.J.F. Salzer, O.A. Cornely // Eur Respir J. – 2017. – Vol. 49. – pii: 1602520.
367. Samarei, R. Evaluation of 30 cases of mucormycosis at a university hospital in Iran / R. Samarei, N. Gharebaghi, S. Zayer // Mycoses. – 2017. – P. 1-7.
368. Samson, R.A. Introduction to food- and airborne fungi / R.A. Samson, E.S. Hoekstra, J.C. Frisvad. – 7th ed. – Utrecht, Netherlands, CBS, 2004. – 389 p.
369. Samson, R.A. Molecular systematics of *Aspergillus* and its teleomorphs / R.A. Samson, J. Varga // In: *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics* / Eds. M. Machida, K. Gomi. – Caister Academic Press, 2010. – P. 19-40.
370. Samson, R.A. Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium* / R.A. Samson, N. Yilmaz, J. Houbraken, H. Spierenburg, K.A. Seifert, S.W. Peterson, J. Varga, J.C. Frisvad // Stud Mycol. – 2011. – Vol. 70. – P. 159-183.
371. Sax, P.E. Blood (1->3)-beta-D-glucan as a diagnostic test for HIV-related *Pneumocystis jirovecii* pneumonia / P.E. Sax, L. Komarow, M.A. Finkelman,

- P.M. Grant, J. Andersen, E. Scully, W.G. Powderly, A.R. Zolopa // Clin Infect Dis. – 2011. – Vol. 53(2). – P. 197-202.
372. Sendid, B. Combined detection of mannanaemia and antimannan antibodies as a strategy for the diagnosis of systemic infection caused by pathogenic *Candida* species / B. Sendid, J.L. Poirot, M. Tabouret, A. Bonnin, D. Caillot, D. Camus, D. Poulain // J Med Microbiol. – 2002. – Vol. 51(5). – P. 433-442.
373. Sharpe, R.A. Identifying risk factors for exposure to culturable allergenic moulds in energy efficient homes by using highly specific monoclonal antibodies / R.A. Sharpe, K.L. Cocq, V. Nikolaou, N.J. Osborne, C.R. Thornton // Environ Res. – 2016. – Vol. 144 (Pt A). – P. 32-42.
374. Sherif, R. Pulmonary aspergillosis: clinical presentation, diagnostic tests, management and complications / R. Sherif, B.H. Segal // Curr Opin Pulm Med. – 2010. – Vol. 16(3). – P. 242-250.
375. Shi, M. Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain / M. Shi, S.S. Li, C. Zheng, G.J. Jones, K.S. Kim, H. Zhou, P. Kubes, C.H. Mody // J Clin Invest. – 2010. – Vol. 120(5). – P. 1683-1693.
376. Spikes, S. Gliotoxin production in *Aspergillus fumigatus* contributes to host-specific differences in virulence / S. Spikes, R. Xu, C.K. Nguyen, G. Chamilos, D.P. Kontoyiannis, R.H. Jacobson, D.E. Ejzykowicz, L.Y. Chiang, S.G. Filler, G.S. May // J Infect Dis. – 2008. – Vol. 197(3). – P. 479-486.
377. Stanzani, M. *Aspergillus fumigatus* suppresses the human cellular immune response via gliotoxin-mediated apoptosis of monocytes / M. Stanzani, E. Orciuolo, R. Lewis, D.P. Kontoyiannis, S.L. Martins, L.S. St John, K.V. Komanduri // Blood. – 2005. – Vol. 105(6). – P. 2258-2265.
378. Sugui, J.A. *Aspergillus fumigatus* and related species / J.A. Sugui, K.J. Kwon-Chung, P.R. Juvvadi, J.P. Latgé, W.J. Steinbach // Cold Spring Harb Perspect Med. – 2014. – Vol. 5(2). – a019786.

379. Surmont, I. A pulmonary infection caused by *Coprinus cinereus* (*Hormographiella aspergillata*) diagnosed after a neutropenic episode / I. Surmont, F. Aelst Van, J. Verbanck, G.S. Hoog De // Med Mycol. – 2002. – Vol. 40(2). – P. 217-219.
380. Sutton, D.A. Guide to clinically significant fungi / D.A. Sutton, A.W. Fothergill, M.G. Rinaldi – Williams & Wilkins, Baltimore, 1998. – 471 p.
381. Tamai, K. Fatal community-acquired primary *Candida* pneumonia in an alcoholic patient / K. Tamai, R. Tachikawa, K. Tomii, Y. Imai // Intern Med. – 2012. – Vol. 51(22). – P. 3159-3161.
382. Tan, M. Severe pneumonia due to infection with *Candida krusei* in a case of suspected Middle East respiratory syndrome: A case report and literature review / M. Tan, J. Wang, P. Hu, B. Wang, W. Xu, J. Chen // Exp Ther Med. – 2016. – Vol. 12(6). – P. 4085-4088.
383. Tawfik, O.W. *Saccharomyces cerevisiae* pneumonia in a patient with acquired immune deficiency syndrome / O.W. Tawfik, C.J. Papasian, A.Y. Dixon, L.M. Potter // J Clin Microbiol. – 1989. – Vol. 27(7). – P. 1689-1691.
384. Teixeira, M.M. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications / M.M. Teixeira, R.C. Theodoro, F.F. Oliveira, G.C. Machado, R.C. Hahn, E. Bagagli, G. San-Blas, M.S. Soares Felipe // Med Mycol. – 2014. – Vol. 52(1). – P. 19-28.
385. The *Aspergillus* Website (Aspergillus & Aspergillosis Website). – URL: <http://www.aspergillus.org.uk/>
386. Theiss, S. Inactivation of the phospholipase B gene *PLB5* in wild-type *Candida albicans* reduces cell-associated phospholipase A2 activity and attenuates virulence / S. Theiss, G. Ishdorj, A. Brenot, M. Kretschmar, C.Y. Lan, T. Nichterlein // Int J Med Microbiol. – 2006. – Vol. 296. – P. 405-420.
387. Thomas, C.F. Pneumocystis pneumonia / C.F. Thomas, A.H. Limper // N Engl J Med. – 2004. – Vol. 350(24). – P. 2487-2498.
388. Thornton, C.R. Immunodetection of fungal and oomycete pathogens: established and emerging threats to human health, animal welfare and global food

- security / C.R. Thornton, O.E. Wills // Crit Rev Microbiol. – 2015. – Vol. 41(1). – P. 27-51.
389. Tilavberdiev, S.A. Serious fungal diseases in the Republic of Uzbekistan / S.A. Tilavberdiev, D.W. Denning, N.N. Klimko // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. – 2017. – Vol. 36(6). – P. 925-929.
390. Torelli, R. Diagnosis of invasive aspergillosis by a commercial real-time PCR assay for *Aspergillus* DNA in bronchoalveolar lavage fluid samples from high-risk patients compared to a galactomannan enzyme immunoassay / R. Torelli, M. Sanguinetti, A. Moody, L. Pagano, M. Caira, E. De Carolis, L. Fuso, G. De Pascale, G. Bello, M. Antonelli, G. Fadda, B. Posteraro // J Clin Microbiol. – 2011. – Vol. 49(12). – P. 4273-4278.
391. Tragiannidis, A. Minireview: *Malassezia* infections in immunocompromised patients / A. Tragiannidis, G. Bisping, G. Koehler, A.H. Groll // Mycoses. – 2010. – Vol. 53(3). – P. 187-195.
392. Tsitsikas, D.A. Impact of the revised (2008) EORTC/MSG definitions for invasive fungal disease on the rates of diagnosis of invasive aspergillosis / D.A. Tsitsikas, A. Morin, S. Araf, B. Murtagh, G. Johnson, S. Vinnicombe, S. Ellis, T. Suaris, M. Wilks, S. Doffman, S.G. Agrawal // Med Mycol. – 2012. – Vol. 50(5). – P. 538-542.
393. Tuon, F.F. *Rhodotorula* infection. A systematic review of 128 cases from literature / F.F. Tuon, S.F. Costa // Rev Iberoam Micol. – 2008. – Vol. 25(3). – P. 135-140.
394. Vashishtha, V.M. A fatal outbreak of *Trichosporon asahii* sepsis in a neonatal intensive care unit / V.M. Vashishtha, A. Mittal, A. Garg // Indian Pediatrics. – 2012. – Vol. 49(9). – P. 745-747.
395. Vazquez, J.A. *Rhodotorula*, *Malassezia*, *Trichosporon*, and other yeast-like fungi / J.A. Vazquez // In: Clinical Mycology / Eds. W.E. Dismukes, P.G. Pappas, J.D. Sobel. – New York: Oxford University press, 2003. – P. 206-217.
396. Vylkova, S. The fungal pathogen *Candida albicans* autoinduces hyphal morphogenesis by raising extracellular pH / S. Vylkova, A.J. Carman, H.A.

- Danhof, J.R. Collette, H. Zhou, M.C. Lorenz // MBio. – 2011. – Vol. 2(3). – e00055-11.
397. Walsh, T.J. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America / T.J. Walsh, E.J. Anaissie, D.W. Denning, R. Herbrecht, D.P. Kontoyiannis, K.A. Marr, V.A. Morrison, B.H. Segal, W.J. Steinbach, D.A. Stevens, J.A. van Burik, J.R. Wingard, T.F. Patterson // Clin Infect Dis. – 2008. – Vol. 46(3). – P. 327-360.
 398. Walzer, P.D. *Pneumocystis* species / P.D. Walzer, A.G. Smulian // In: Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases / Eds. G.L. Mandell, J.E. Bennett, R. Dolin. – 7th ed. – Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2010. – P. 3377-3390.
 399. Wang, P.H. Disseminated *Penicillium marneffei* mimicking paradoxical response and relapse in a non-HIV patient with pulmonary tuberculosis / P.H. Wang, H.C. Wang, C.H. Liao // J Chin Med Assoc. – 2015. – Vol. 78 (4). – P. 258-260.
 400. Wang, X.M. Pulmonary mucormycosis: A case report and review of the literature / X.M. Wang, L.C. Guo, S.L. Xue, Y.B. Chen // Oncol Lett. – 2016. – Vol. 11(5). – P. 3049-3053.
 401. Warris, A. Clinical implications of environmental sources for *Aspergillus* / A. Warris, P.E. Verweij // Med Mycol. – 2005. – Vol. 43 (1). – P. 59-65.
 402. Wengenack, N.L. Fungal molecular diagnostics / N.L. Wengenack, M.J. Binnicker // Clin Chest Med. – 2009. – Vol. 30(2). – P. 391-408.
 403. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (Centraalbureau voor Schimmelcultures). – URL: <http://www.westerdijkinstitute.nl/>
 404. White, P.L. Evaluation of a commercially developed semiautomated PCR-surface-enhanced raman scattering assay for diagnosis of invasive fungal disease / P.L. White, S.J. Hibbitts, M.D. Perry, J. Green, E. Stirling, L. Woodford, G. McNay, R. Stevenson, R.A. Barnes // J Clin Microbiol. – 2014. – Vol. 52(10). – P. 3536-3543.

405. White, T.J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics / T.J. White, T. Bruns, S. Lee, J.W. Taylor // In: PCR Protocols: a guide to methods and applications / Eds. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White – New York: Academic Press, 1990. – P. 315-322.
406. WHO Туберкулез. Информационный бюллетень, Март 2017г. – URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/ru/>
407. Woods, G. Serum *Aspergillus* galactomannan antigen values strongly correlate with outcome of invasive aspergillosis: a study of 56 patients with hematologic cancer / G. Woods, M.H. Miceli, M.L. Grazziutti, W. Zhao, B. Barlogie, E. Anaissie // Cancer. – 2007. – Vol. 110(4). – P. 830-834.
408. Wright, W.F. (1–3)- β -D-Glucan assay: a review of its laboratory and clinical application / W.F. Wright, S.B. Overman, J.A. Ribes // Lab Med. – 2011. – Vol. 42(11). – P. 679-685.
409. Yamin, H.S. Pulmonary mucormycosis over 130 years: A Case report and literature review / H.S. Yamin, A.Y. Alastal, I. Bakri // Turk Thorac J. – 2017. – Vol. 18(1). – P. 1-5.
410. Yang, M.F. A fatal case of *Trichosporon asahii* fungemia and pneumonia in a kidney transplant recipient during caspofungin treatment / M.F. Yang, H.N. Gao, L.J. Li // Ther Clin Risk Manag. – 2014. – Vol. 10. – P. 759-762.
411. Yazici, O. *Candida glabrata* pneumonia in a patient with chronic obstructive pulmonary disease / O. Yazici, M. Cortuk, H. Casim, E. Cetinkaya, A. Mert, A.R. Benli // Case Rep Infect Dis. – 2016. – Vol. 2016. – Article ID 4737321, 4 pages. – URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4737321>
412. Zendah, I. Coexistence of active tuberculosis, cancer and aspergilloma of the lung / I. Zendah, A. Ayadi-Kaddour, H. Gharsalli, A. Khattab, H. Ghedira // Tunis Med. – 2011. – Vol. 89(4). – P. 407.
413. Zhu, W. Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells / W. Zhu, S.G. Filler // Cell Microbiol. – 2010. – Vol. 12(3). – P. 273-282.
414. Zmeili, O.S. Pulmonary aspergillosis: a clinical update / O.S. Zmeili, A.O. Soubani // Q J Med. – 2007. – Vol. 100(6). – P. 317-334.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1.

Схема описания клинических штаммов грибов рода *Aspergillus*, рекомендуемая для использования при проведении видовой идентификации возбудителей аспергиллеза (макроскопические признаки; микроморфологические признаки)

1) Макроскопические признаки – характеристика колоний при культивировании штаммов на агаре Чапека–Докса при 30°C.

- Цвет колоний.
- Структура поверхности колоний: бархатистые, войлочные, зернистые, клочковатые, шерстистые или пушистые.
- Характер поверхности колоний: плоские, приподнятые (местами) или другое; ровные, бороздчатые, морщинистые или другое.
- Зональность поверхности колоний: однородные или зональные (отмечают наличие выделяющихся на поверхности колонии зон образования конидиальных головок, вегетативного воздушного мицелия, клейстотециев, склероциев и других структур, и их чередование).
- Наличие и окраска экссудата (капли жидкости, образующиеся на поверхности культуры).
- Наличие и окраска растворимого в среде пигмента (окраска субстрата).
- Окраска обратной стороны колоний (реверзум): бесцветная или окрашенная.
- Скорость и характер роста колоний (признаки определяют по диаметру колонии в процессе роста в течение одной недели): по скорости роста виды рода *Aspergillus* условно подразделяются на медленно растущие, с умеренной скоростью роста и быстро растущие, по характеру роста – на виды с ограниченным ростом и распростертые.
- Интенсивность спороношения колоний: отмечают виды рода *Aspergillus* со скудным конидиогенезом или обильно образующие конидии.

2) Микроморфологические признаки – особенности морфологии конидиеносных структур и конидий (1); вегетативных структур (2); структур полового спороношения и аскоспор, в случае их образования *in vitro* (3).

Признаки конидиеносных структур и конидий (1): конидиеносцев; вздутий; конидиальных головок; конидиогенных структур (метул (профиалид), фиалид); конидий.

Конидиеносцы (специализированные гифы, несущие конидии; ответвляются от толстостенных, характерных для *Aspergillus* spp. опорных клеток субстратного или воздушного мицелия)

- Структура поверхности оболочки: гладкие (гладкостенные), шероховатые (различной степени выраженности) или гранулированные.
- Цвет: бесцветные или окрашенные – интенсивность окраски конидиеносцев может варьировать на различных участках.
- Размеры: длина, ширина (мкм) – у некоторых видов ширина конидиеносцев характерно изменяется от основания к вершине.

- Характер септирования: без септ (одноклеточные) или септированные – отмечают наличие септ у конидиеносцев.
- Характер роста: прямые, изогнутые или извилистые – отмечают образование изогнутых и извилистых конидиеносцев.
- Характер ветвления: неразветвленные (простые) или ветвящиеся – отмечают образование разветвленных конидиеносцев.
- Другие отличительные признаки: с относительно тонкой или утолщенной оболочкой, с зернистой оболочкой (при неравномерной пигментации конидиеносца) или другие особенности.

Вздутия (расширенные вершины конидиеносцев, несущие конидиогенные клетки фиалиды; характерны для *Aspergillus* spp.)

- Форма: шаровидные, почти шаровидные, полушаровидные (в виде полусферы), эллиптические, булабовидные, колбовидные или другой формы.
- Цвет: бесцветные или окрашенные.
- Размер: диаметр (мкм).

Конидиальные головки (верхушечная часть конидиеносца, состоящая из вздутия, конидиогенных клеток и цепочек конидий)

- Форма: колонковидные, рыхлоколонковидные или радиальные.

Конидиогенные структуры (метулы (профиалиды), фиалиды)

- Число ярусов: одноярусные или двухъярусные.
- Расположение на поверхности вздутия: строго на определенной части вздутия или на всей поверхности вздутия.
- Размеры: длина, ширина (мкм).

Конидии

- Форма: шаровидные, почти шаровидные, эллиптические, яйцевидные, цилиндрические или другой формы.
- Структура поверхности оболочки: гладкие, шероховатые (различной степени выраженности), шиповатые или морщинистые.
- Цвет: бесцветные или окрашенные.
- Размер: диаметр (мкм).

Признаки вегетативных структур (2): покровных клеток (при образовании); склероций (при образовании); алейроспор (при образовании); гиф вегетативного мицелия.

Покровные клетки (толстостенные клетки, образующиеся в скоплениях, чаще в ассоциациях с клейстотециями)

- Форма: шаровидные, почти шаровидные, эллиптические, удлиненные или другой формы.
- Цвет: бесцветные или светлоокрашенные.
- Размер: диаметр или длина, ширина (мкм).

Склероции (вегетативные структуры, состоящие из видоизмененных плотно переплетенных гиф мицелия; склероции как правило, не удается раздавить покровным стеклом)

- Форма: шаровидные, почти шаровидные, эллиптические, яйцевидные или другой формы.
- Цвет: бесцветные или окрашенные.
- Размер: диаметр (мкм).

Алейроспоры (экзогенные одиночные споры на субстратных гифах вегетативного мицелия; характерны для вида *Aspergillus terreus*)

- Форма: шаровидные, почти шаровидные или эллиптические.
- Цвет: бесцветные.
- Размер: диаметр (мкм).

Гифы вегетативного мицелия (разветвленные, септированные гифы субстратного и воздушного мицелия)

- Характер септирования: септированные.
- Цвет: бесцветные или окрашенные.
- Характер ветвления: разветвленные.

Признаки структур полового спороношения и аскоспор – у гомоталлических видов (3): клейстотеций; сумок (асков); аскоспор.

Клейстотеции (тип аскокарпа у ряда *Ascomycota*; замкнутое плодовое тело шаровидной формы без выводного отверстия с плотной, оболочкой перидием, в котором беспорядочно располагаются сумки с аскоспорами)

- Наличие и морфология вегетативных структур, окружающих клейстотеции: покровные клетки, гифы воздушного мицелия и другие структуры.
- Строение оболочки (перидия).
- Форма: шаровидные или почти шаровидные.
- Цвет: окрашенные.
- Размер: диаметр (мкм).

Сумки (аски) (особые клетки с тонкой оболочкой, внутри которой образуются аскоспоры)

- Число аскоспор: 8, реже 4.
- Форма: шаровидные, почти шаровидные или грушевидные.
- Размер: диаметр (мкм).

Аскоспоры (эндогенные споры полового размножения у *Ascomycota*)

- Структура поверхности оболочки: гладкие, шероховатые или бугорчатые, часто с различными характерными образованиями – гребнями, бороздками, кольцами, придатками и другой орнаментацией.
- Форма: шаровидные, чечевицеобразные, яйцевидные или другой формы.
- Цвет: бесцветные или окрашенные.
- Размер: диаметр (мкм).

Приложение 2.

Основные диагностические признаки выделенных 14 болезнетворных видов грибов рода *Aspergillus*

Вид	Диагностические признаки						
	Цвет колоний, экссудат (агар Чапека–Докса, 30°C)	Конидиеносцы	Вздутия	Конидиальные головки	Конидиогенные структуры	Конидии	Клейстотеции (покровные клетки, склероции, алейроспоры)
<i>Aspergillus flavipes</i>	Кремовый, желтоватый до темно-желтого, коричневатый; <u>экссудат</u> (если образуется) желтый, обильный	Гладкие или мелко шероховатые; относительно толстостенные; окрашенные: желтые до светло-коричневых	Почти шаровидные до вертикально продолговатых; светлоокрашенные; 8-25 мкм в диаметре	От рыхлоколонковидных до радиальных	Двухъярусные; метулы покрывают от $\frac{1}{3}$ до $\frac{2}{3}$ поверхности вздутия или всю его поверхность	Шаровидные до почти шаровидных; гладкие; бесцветные или кремовые; 2-3 мкм	<u>Клейстотеции</u> образуются крайне редко; желтоватые; 70-120 (600-800) мкм в диаметре <u>Покровные клетки</u> окружают клейстотеции; обильные
<i>Aspergillus flavus</i>	Желтовато-зеленый, зелено-желтый, оливковый; <u>экссудат</u> (если образуется) прозрачный до красно-коричневого (обволакивает склероции)	Грубо-шероховатые; относительно толстостенные; бесцветные	Шаровидные или почти шаровидные; 25-45 мкм в диаметре, реже от 10 мкм	Радиальные, с возрастом распадаются на несколько рыхлых колонок	Одноярусные или двухъярусные; метулы почти одинаковой длины с фиалидами	Шаровидные или почти шаровидные; мелко шероховатые или реже гладкие; 3,5-4 (3-6) мкм	<u>Склероции</u> образуются у части штаммов; бесцветные, при созревании темно-красно-коричневые до почти черных; 400-800 мкм в диаметре; обильные

Продолжение приложения 2

Вид	Диагностические признаки						
	Цвет колоний, экссудат (агар Чапека–Докса, 30°C)	Конидиеносцы	Вздутия	Конидиальные головки	Конидиогенные структуры	Конидии	Клейстотеции (покровные клетки, склероции, алейроспоры)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Дымчатый серовато-зеленый, дымчатый голубовато-зеленый, серовато-голубовато-зеленый, серо-зеленый	Гладкие; бесцветные или светло-зеленые в верхней части; прямые или извилистые; короткие (до 300 мкм)	Булавовидные; светло-зеленые; 20-30 мкм в диаметре	Колонковидные; компактные	Одноярусные; фиалиды скученные, покрывают верхнюю часть вздутия, направлены вверх вдоль конидиеносца	Шаровидные до почти шаровидных; мелко шероховатые; в массе зеленые; 2,5-3 мкм	Не образуются
<i>Aspergillus glaucus</i>	Тускло зеленый, серовато-зеленый, желто-зеленый	Гладкие; бесцветные или бледно-коричневые; расширяющиеся к вершине	Шаровидные или почти шаровидные; 15-40 мкм в диаметре	Радиальные или рыхлоколонковидные	Одноярусные	Яйцевидные, почти шаровидные или шаровидные; мелко шероховатые или шиповатые; 3,5-7,5 мкм	<u>Клейстотеции</u> образуются регулярно; окружены сплетениями красных гиф; желтые; 75-125 мкм в диаметре
<i>Aspergillus hollandicus</i>	Желтый, тусклый желто-серый, коричневатожелтый	Гладкие; бесцветные	Шаровидные или почти шаровидные; 18-25 мкм в диаметре	Радиальные или рыхлоколонковидные	Одноярусные; фиалиды покрывают $\frac{2}{3}$ поверхности вздутия или всю его поверхность	Шаровидные или почти шаровидные; мелко шероховатые до отчетливо шиповатых; 3-5 мкм	<u>Клейстотеции</u> образуются регулярно; ярко желтые; 120-160 мкм в диаметре; скученные

Продолжение приложения 2

Вид	Диагностические признаки						
	Цвет колоний, экссудат (агар Чапека–Докса, 30°C)	Конидиеносцы	Вздутия	Конидиальные головки	Конидиогенные структуры	Конидии	Клейстотеции (покровные клетки, склероции, алейроспоры)
<i>Aspergillus nidulans</i>	Темно-зеленый, кремово-желто-коричневый, медово-желтый, желто-зеленый; <u>экссудат</u> (если образуется) пурпурно-красный, коричневый; реверзум пурпурный	Гладкие; окрашенные: светло-коричневые; короткие (60-150 мкм); расширяющиеся к вершине; изогнутые	Полушаровидные; мелкие: 8-10 мкм в диаметре	Колонковидные	Двухъярусные; метулы покрывают верхнюю часть вздутия	Шаровидные; мелко шероховатые или слабо морщинистые; в массе зеленые; 3-4 мкм	<u>Клейстотеции</u> образуются у части штаммов; окружены слоем желтоватых или светло-коричневых гиф; красновато-коричневые; 100-200 мкм в диаметре <u>Покровные клетки</u> окружают клейстотеции; обильные
<i>Aspergillus niger</i>	Черный (после образования конидиальных головок); <u>экссудат</u> (если образуется) прозрачный	Гладкие; относительно толстостенные; бесцветные или светло-коричневые в верхней части	Шаровидные; 50-75 (30-80) мкм в диаметре	Радиальные, при созревании распадаются на рыхлые колонки	Двухъярусные; метулы плотные, покрывают всю поверхность вздутия	Шаровидные; грубо шероховатые или отчетливо шиповатые; коричневые; 4-5 мкм	Не образуются

Продолжение приложения 2

Вид	Диагностические признаки						
	Цвет колоний, экссудат (агар Чапека–Докса, 30°C)	Конидиеносцы	Вздутия	Конидиальные головки	Конидиогенные структуры	Конидии	Клейстотеции (покровные клетки, склероции, алейроспоры)
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Желто-оранжевый, желто-коричневый, желто-охристый, охристый	Шероховатые; относительно толстостенные; окрашенные: коричневатые или тускло-желтые	Шаровидные; бесцветные; с тонкими оболочками; 35-50 мкм в диаметре	Радиальные, с возрастом распадаются на несколько колонок	Двухъярусные; метулы покрывают всю поверхность вздутия	Шаровидные до почти шаровидных; гладкие до мелко шероховатых; 2,5-3,5 мкм	<u>Склероции</u> образуются у части штаммов; розовые до винно-пурпурных; до 1 мм в диаметре
<i>Aspergillus oryzae</i>	Зеленовато-желтый, оливково-желтый, желто-коричневый, зеленый (различных оттенков), с возрастом коричневатые	Шероховатые, у некоторых штаммов почти гладкие; с относительно тонкими оболочками; бесцветные; длинные (до 4-4,5 мм)	Почти шаровидные; 40-50 (75) мкм в диаметре	От радиальных до рыхло-колонковидных	Одноярусные (обычно) или двухъярусные; метулы (фиалиды) покрывают всю поверхность вздутия или только $\frac{3}{4}$ его поверхности	Эллиптические или яйцевидные, при созревании шаровидные до почти шаровидных; гладкие до шероховатых; зеленоватые до коричневатых; крупные: 4,5-8(10)x4,5-7 мкм	<u>Склероции</u> образуются крайне редко; темноокрашенные

Продолжение приложения 2

Вид	Диагностические признаки						
	Цвет колоний, экссудат (агар Чапека–Докса, 30°C)	Конидиеносцы	Вздутия	Конидиальные головки	Конидиогенные структуры	Конидии	Клейстотеции (покровные клетки, склероции, алейроспоры)
<i>Aspergillus restrictus</i>	Зеленый (различных оттенков): серовато-оливковый, тускло зеленый, коричневатозеленый	Гладкие или реже мелко шероховатые; с тонкой оболочкой; бесцветные; короткие (50-200 мкм); извилистые и/или изогнутые	Колбовидные до полушаровидных; 6-12 мкм в диаметре	Колонковидные	Одноярусные; фиалиды покрывают верхнюю часть вздутия, относительно немногочисленные, скученные	Цилиндрические, при созревании эллиптические до почти шаровидных или грушевидные; шероховатые; в массе темно-зеленые; 4-7х3-4 мкм	Не образуются
<i>Aspergillus sydowii</i>	Голубоватозеленый; <u>экссудат</u> (образуется часто) красноватокоричневый, обильный; реверзум красноватый, красноватокоричневый	Гладкие; относительно толстостенные; бесцветные	Шаровидные до булабовидных; 7-16 мкм в диаметре	Радиальные	Двухъярусные	Шаровидные; шиповатые; в массе зеленые; 2,5-4 мкм	<u>Покровные клетки</u> образуются у части штаммов; обильные

Продолжение приложения 2

Вид	Диагностические признаки						
	Цвет колоний, экссудат (агар Чапека–Докса, 30°C)	Конидиеносцы	Вздутия	Конидиальные головки	Конидиогенные структуры	Конидии	Клейстотеции (покровные клетки, склероции, алейроспоры)
<i>Aspergillus terreus</i>	Коричневато-желтый, желтовато-коричневый, ореховый, бежевый, желтый (различных оттенков); <u>экссудат</u> (если образуется) ярко-желтый	Гладкие; бесцветные; извилистые; короткие (100-300 мкм)	Полушаровидные, почти шаровидные или реже более продолговатой формы; 10-20 мкм в диаметре	Колонковидные; компактные	Двухъярусные; метулы плотные, равной длины с фиалидами	Шаровидные или широко эллипсоидальные; гладкие; бесцветные; мелкие: 1,5-2,5 мкм	<u>Алейроспоры</u> : образуются регулярно на субстратных гифах; одиночные; бесцветные; прозрачные; 5-7 мкм в диаметре
<i>Aspergillus ustus</i>	Белый, кремовый, сероватый, с возрастом оливково-серый или тускло-коричневый; <u>экссудат</u> (если образуется) бесцветный, желтый или пурпурно-коричневый	Гладкие; коричневые (различных оттенков); часто изогнутые	Полушаровидные до почти шаровидных; одноцветные с конидиеносцем; 7-15 мкм в диаметре	Радиальные или рыхлоколонковидные	Двухъярусные; метулы покрывают от ½ до ¾ поверхности вздутия	Шаровидные; грубо шероховатые; темно-желто-коричневые; 3-4,5 мкм	<u>Покровные клетки</u> образуются редко; обильные

Продолжение приложения 2

Вид	Диагностические признаки						
	Цвет колоний, экссудат (агар Чапека–Докса, 30°C)	Конидиеносцы	Вздутия	Конидиальные головки	Конидиогенные структуры	Конидии	Клейстотеции (покровные клетки, склероции, алейроспоры)
<i>Aspergillus versicolor</i>	Оранжево-желтый, желто-зеленый, розовато-зеленоватый, с оттенками красного или коричневого; <u>экссудат</u> (если образуется) розовый до винно-красного, обильный	Гладкие; относительно толстостенные; бесцветные или желтоватые	Различной формы: почти шаровидные, полу-шаровидные или эллиптические; 9-16 мкм в диаметре	Радиальные	Двухъярусные	Шаровидные; тонко шиповатые до отчетливо шиповатых; 2-3 (3,5) мкм	<u>Покровные клетки</u> образуются у части штаммов