

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений и условных обозначений	4
Введение	5
Глава 1. Изменения в номенклатуре грибов	6
Глава 2. Лабораторная диагностика микозов	9
Глава 3. Микозы, вызываемые дрожжами и некоторыми дрожжеподобными грибами	19
Глава 4. Дерматофитии	58
Глава 5. Аспергиллез	93
Глава 6. Мукормикоз	109
Глава 7. Микозы, вызываемые гиалиновыми микромицетами	130
Глава 8. Микозы, вызываемые темноокрашенными гифомицетами	145
Глава 9. Подкожные грибковые инфекции.	160
Глава 10. Энтомофторомикозы.	175
Глава 11. Редкие микозы, обусловленные <i>Coelomycetes</i>	180
Глава 12. Микозы, вызываемые термодиморфными грибами	183
Глава 13. Пневмоцистоз	205
Приложение 1. Спектр клинических проявлений грибковых заболеваний и их наиболее частые возбудители	207
Приложение 2. Методы окраски и приготовления препаратов для микроскопии грибов	209
Приложение 3. Основные питательные среды, применяемые для диагностики микозов	214
Приложение 4. Диагностические признаки основных видов дерматофитов	218
Приложение 5. Основные диагностические признаки грибов рода <i>Aspergillus</i>	221
Список литературы	223
Словарь терминов	237
Предметный указатель латинских названий грибов	242

ВВЕДЕНИЕ

Микология — одна из самых динамично развивающихся отраслей биологии, так как внедрение молекулярных методов диагностики произвело революцию в номенклатуре и систематике грибов, позволило ежегодно выявлять до 2–3 тыс. новых видов, получить новые знания об эволюции микромицетов. Биоразнообразие грибов огромно. В настоящее время зарегистрировано и описано около 150 тыс. видов этих уникальных организмов, но, по разным оценкам, общее число существующих видов грибов составляет от 3 до 6 млн. Клиническая и ветеринарная микология как часть общей развиваются так же стремительно, поскольку распространение числа пациентов с иммунодефицитами приводит к постоянному пополнению и без того длинного списка потенциальных грибковых патогенов. Известно, что по крайней мере более 300 видов могут быть патогенными для человека и животных и вызывать ряд заболеваний, начиная от поверхностных кожных дерматофитий и перхоти до жизнеугрожающих инвазивных инфекций. По данным Всемирной организации здравоохранения, истинное бремя грибковых инфекций до сих пор не известно, так как для инвазивных микозов не существует методов быстрой и высокочувствительной диагностики, а имеющиеся средства не являются широкодоступными. Специалистам, работающим как с идентификацией, так и с лечением грибковых инфекций, приходится нелегко, поскольку признаки и симптомы инвазий неспецифичны, посевы крови обычно отрицательны, а многие клинически важные микромицеты служат частью нормальной микрофлоры, что приводит к трудностям при интерпретации лабораторных исследований. Кроме того, глобальные изменения в систематике привели к смене ряда названий привычных для медицинских работников патогенов на совсем непривычные и труднопроизносимые. За несколько лет после выхода предыдущего издания книги появились новые виды грибов, имеющих медицинское значение. Произошедшие изменения отражены в данном издании, которое сохранило свою прежнюю структуру. В книге представлен краткий обзор изменений номенклатуры и различных категорий грибковых инфекций, описаны методы их диагностики. В частном разделе подробно описаны основные представители патогенных грибов — возбудителей инфекционных заболеваний. Освещены принципы и способы культивирования грибов, методы микробиологической диагностики грибковых заболеваний. Часть фотографий сделана непосредственно авторами в лаборатории, много лет занимающейся культуральной диагностикой микозов. Упомянутые в книге диагностические средства конкретных производителей следует рассматривать в качестве примеров, зачастую имеющих аналоги у других фирм.

Книга может представлять интерес для врачей-бактериологов, биологов, медицинских микробиологов, работающих в микробиологических лабораториях, инфекционистов, микологов, дерматологов, студентов старших курсов медицинских вузов, слушателей системы постдипломного образования, а также для других специалистов, интересующихся данной проблемой.

Авторы книги с благодарностью примут все замечания, пожелания и советы в целях реализации их в дальнейшей работе.

Глава 2

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА МИКОЗОВ

ПРАВИЛА СБОРА И ДОСТАВКИ МАТЕРИАЛА ДЛЯ МИКОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

От правильности взятия материала во многом зависит эффективность лабораторного анализа. При отрицательном результате исследований всегда следует рассматривать вопрос о повторном взятии материала.

Основные причины ложноотрицательных результатов:

- недостаточно материала;
- неправильное взятие;
- использование накануне забора противогрибковых препаратов, мазей;
- неправильная доставка материала в лабораторию, высушенный материал.

Ликвор собирают с соблюдением всех правил асептики. Оптимальным объемом для микологического исследования считают 3–5 мл ликвора. Образцы должны быть доставлены в лабораторию как можно быстрее и обработаны в кратчайшие сроки. При невозможности немедленной доставки ликвор хранят при комнатной температуре или инкубируют при 35 °С.

Кровь собирают из локтевой вены в количестве 5–10 мл в жидкую среду Сабуро (1:5) или промышленно изготовленные среды для микологического исследования культур крови.

Мокроту собирают в стерильную банку натошак, утром, после пробуждения, предварительно почистив зубы, прополоскав рот. Доставка в лабораторию необходима в течение 2 ч. При невозможности быстрой доставки образцы хранят в холодильнике при температуре 4 °С не более 24 ч.

Мочу, среднюю утреннюю порцию, собирают в стерильную посуду после тщательного туалета наружных половых органов. Материал доставляют в лабораторию в течение 2 ч. При невозможности быстрой доставки хранят при комнатной температуре в течение 1–2 ч или в холодильнике не более 1 сут.

Отделяемое слизистых оболочек (мазки из зева, носа, конъюнктивы, влагалища и др.), ран, свищей собирают стерильным ватным тампоном.

Биопсийный материал помещают в стерильную посуду.

Пунктаты абсцессов собирают в стерильные пробирки.

Соскобы с кожи, ногтей. Материал отбирают с помощью скальпеля, пинцета в местах инфицирования, особенно на границах здоровой и пораженной кожи. При взятии соскобов кожа пациентов должна быть чистой, без присутствия мазей. У пациентов с подозрением на онихомикоз образцы собирают с помощью ножниц, тупого скальпеля, соскребая пораженную часть всех слоев ногтя. Для удобства образцы кожи и ногтей можно собирать над черной бумагой, на которой

отчетливо видно количество собранного материала и которую после запечатывания доставляют в лабораторию. При отсутствии черной бумаги материал может быть собран в чашки Петри.

Волосы и шерсть вместе с чешуйками извлекают пинцетом.

ПОСЕВ МАТЕРИАЛА

Ликвор центрифугируют в течение 5 мин со скоростью 1500 оборотов/мин, осадок используют для микроскопии и посева. Для микроскопии окрашивают тушью, по Граму, альциановым синим по Моури. Посев осуществляют на три чашки [агар Сабуро или Сабуро-декстрозный агар (СДА)], остатки переносят в жидкую среду Сабуро. Инкубируют две чашки при температуре 37 °С и одну чашку и жидкое Сабуро — при 28 °С. Посевы просматривают ежедневно. Длительность инкубации — не менее 10 дней.

Кровь. Нативную кровь засевают на агар Сабуро, СДА, в жидкую среду Сабуро (1:5) или промышленно изготовленные флаконы для исследования грибов в культурах крови. Инкубируют при температуре 28 и 37 °С. Посевы просматривают ежедневно. Длительность инкубации — не менее 10 дней.

Мокроту, бронхоальвеолярный лаваж засевают на агар Сабуро, СДА с хлорамфениколом (Левомецетином[▲]) и гентамицином. Инкубируют посевы при температуре 28 и 37 °С. Перед посевом микроскопируют нативные и окрашенные препараты.

Мочу центрифугируют в течение 15 мин со скоростью 1500 оборотов/мин, сливают надосадочную жидкость. Осадок микроскопируют в калия гидроксиде (КОН), по Граму, PAS, и засевают 0,1 мл осадка на агар Сабуро с гентамицином, хлорамфениколом, СДА. Инкубируют посевы при температуре 28 и 37 °С.

Отделяемое слизистых оболочек, наружного слухового прохода, ран засевают тампоном на агар Сабуро с гентамицином, хлорамфениколом (Левомецетином[▲]), вращая всей поверхностью тампона по поверхности питательной среды. Инкубируют посевы при температуре 28 и 37 °С.

Кожные и ногтевые чешуйки переносят в скошенный сусло-агар, СДА, тщательно прижимая их к агару в 2–3 точках. Инкубируют посевы при температуре 28 и 37 °С. Предварительно микроскопируют на наличие *Malassezia* и элементов других грибов. При предварительном диагнозе «отрубевидный лишай» посевы производят на среду Диксона. При подозрении на дерматофиты возможно использование агара Сабуро с циклогексимидом, подавляющим рост многих плесневых грибов, *Candida spp.*, *Cryptococcus spp.*

Кусочки тканей и органов (биопсия, аутопсия) отпечатывают на поверхность агара Сабуро, СДА в разные точки. Одновременно кусочки тканей помещают в жидкую среду Сабуро. Инкубируют посевы при температуре 28 и 37 °С.

Одной из ошибок, приводящей к ложноотрицательным результатам при микологических исследованиях, считают недостаточную длительность инкубации. Длительность инкубирования в зависимости от исследуемого материала и предполагаемого возбудителя представлена в **табл. 2.1**.

Таблица 2.1. Длительность инкубирования материала в зависимости от возбудителя

Предполагаемый возбудитель	Средняя продолжительность инкубации, сут
Дрожжи	2–5 (<10)
<i>Aspergillus</i>	7 (<10)
Мукормицеты	7
Гиалогифомицеты, феогифомицеты	10 (<21)
Дерматофиты	21
Другие	14

Идентификацию выросших грибов проводят разными методами, у каждого из которых есть преимущества и недостатки (табл. 2.2).

Таблица 2.2. Методы идентификации грибов

Метод идентификации	Преимущества	Недостатки
Культуральный по морфологическим/биохимическим признакам	Длительный, требует наличие опытного персонала	Определение до рода/вида возможно далеко не всегда
Масс-спектрометрия	Быстрый	Доступность не во всех лабораториях
		Определение до рода/вида только при наличии эталонных спектров
Молекулярная диагностика	Наиболее точный	Дорогой
		Малодоступный для большинства лабораторий

МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГРИБОВ

Микроскопия биоматериала

Для быстрого обнаружения морфологических элементов гриба полученный материал исследуют в нативных и окрашенных препаратах. Принципиально важно установить наличие дрожжевых или мицелиальных возбудителей, а среди последних — грибы с септированным (гиалогифомицеты, феогифомицеты, *Aspergillus spp.*) и несептированным мицелием (мукормицеты). Это связано с различной чувствительностью к антимикотикам дрожжевых и мицелиальных возбудителей, а также с разными подходами к лечению инфекций, вызванных возбудителями с септированным мицелием и зигомицетами.

Кожные и ногтевые чешуйки исследуют в просветляющих жидкостях: 10–30% раствор КОН или смеси КОН-диметилсульфоксид (дает более быстрое просветление препарата, чем использование КОН в одиночку). Для этого исследуемый материал помещают в каплю просветляющей жидкости, слегка нагревают над пламенем спиртовки до появления кристалликов щелочи по периферии капли,

накрывают покровным стеклом и микроскопируют сначала при малом увеличении $\times 100$, затем — при большом $\times 400$.

Волосы осматривают в хлорал-лактофеноле Аманна (смесь равных частей фенола, молочной кислоты и хлоралгидрата) после легкого нагрева.

Жидкий исследуемый материал просматривают как нативно, так и в просветляющих жидкостях: смесь этанола с глицеролом [этанол (Этиловый спирт[▲]) — 1 часть, глицерол (Глицерин[▲]) — 2 части, дистиллированная вода — 2 части)], воде или изотоническом растворе натрия хлорида. При наличии люминесцентного микроскопа для окрашивания элементов грибов к жидким образцам добавляют калькофлуор белый. Накрывают покровным стеклом, микроскопируют сначала при малом увеличении $\times 100$, затем — при большом $\times 400$.

Для приготовления окрашенных препаратов используют различные методы окраски. Наиболее применяемые из них описаны в Приложении 2. Мазки-отпечатки, центрифугаты, гистологические срезы окрашивают минимум в трех вариантах: окраска PAS-методом или его модификациях (окраска по Гридли, по методу Гомори–Грокотт, по Граму или модификациях по Боголепову и др.), окраска по Цилю–Нельсену или модификации по Киньону.

Микроскопия дрожжеподобных культур

Для изучения микроморфологии дрожжей используют технику Дальмау. Для этого производят посев штрихами исследуемой культуры на кукурузный агар и накрывают его покровным стеклом. На одну чашку можно посеять до шести штаммов. Чашки инкубируют в перевернутом положении при температуре $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 48 ч и наблюдают особенности морфологии и тип роста непосредственно под микроскопом. Микроморфология оптимально отображается вблизи края предметного стекла.

Для наблюдения капсул у криптококков используют в качестве красителя индийскую тушь.

Микроскопия мицелиальных грибковых культур

Для изучения морфологии колоний у некоторых грибов, образующих крупные структуры (плодовые тела, клейстотеции, склероции, цепочки конидий), используют стереомикроскоп.

Световую микроскопию спороносных структур нитчатых грибов проводят с помощью скотча, который прижимают к колонии и затем помещают на каплю красителя. На скотч помещают покровное стекло. В качестве альтернативы из питательной среды микологической лопаткой вырезают небольшой кусочек колонии, аккуратно расправляя ее в монтирующих жидкостях на предметном стекле. Затем осторожно накрывают покровным стеклом, стараясь предотвратить попадание пузырьков воздуха.

Используют также метод выращивания культуры на предметном стекле, при котором возможно наблюдать тонкие спороносные структуры грибов без их повреждения. Для этого в чашку Петри на подложку ставят стерильное предметное стекло, в центр которого помещают вырезанный кусочек питательного агара

с исследуемой грибковой культурой, после чего покрывают агар стерильным покровным стеклом. Инкубируют во влажных условиях. Спорозные структуры разглядывают сначала через стереомикроскоп, затем осторожно переносят покровное стекло на каплю красителя для изучения при световой микроскопии. При удалении агара предметное стекло монтируют и изучают аналогичным образом.

В качестве монтирующих жидкостей применяют 0,9% раствор натрия хлорида, 80% раствор молочной кислоты, лактофенол с добавлением метилтиониния хлорида (Метиленового синего*) и др. (табл. 2.3).

Таблица 2.3. Рецепты некоторых монтирующих жидкостей для микроскопии грибов

Монтирующая жидкость	Состав
Смесь глицерина, метанола и воды	Глицерин 60 мл
	Метанол 90 мл
	Вода 150 мл
Молочная кислота с метилтиониния хлоридом (Метиленовым синим*)	Молочная кислота 100 мл
	Метиленовый синий 0,1 г
Лактофенол	Фенол 20 г
	Молочная кислота 16 мл
	Глицерин 31 мл
	Вода 20 мл
Лактофенол с метилтиониния хлоридом (Метиленовым синим*)	Лактофенол 10 мл
	Метиловый синий 0,05 г

КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГРИБОВ

Культуральные методы позволяют установить возбудителя до вида, изучить его свойства, определить чувствительность к антигрибковым препаратам. Для выделения и идентификации грибов используют плотные и жидкие питательные среды. Одними из самых распространенных сред для первичного выделения большинства грибов являются агар Сабуро, СДА. С целью подавления роста сопутствующей микрофлоры в среды добавляют антибиотики: хлорамфеникол, бензилпенициллин, тетрациклин. Для подавления роста рода плесневых грибов в среду добавляют циклогексимид (актидион). Для ускоренной идентификации *Candida*, дрожжеподобных грибов применяют хромогенные агары, позволяющие определить наиболее распространенных возбудителей по цвету до вида. Для стимулирования спорозения у дерматофитов и некоторых других грибов применяют картофельно-декстрозный агар, рисовую среду и ряд других. Виды рода *Malassezia* являются липофильными или липидозависимыми и поэтому выделяются на средах с оливковым маслом или твинами. Для дифференциации между наиболее частыми видами *Malassezia* также применяют хромогенный агар.

Наиболее распространенные среды и их назначение представлены в Приложении 3.

Идентификацию дрожжеподобных грибов осуществляют на основании морфологических признаков ферментативной и ассимиляционной способности культур. Наиболее удобны для рутинных исследований готовые коммерческие тест-системы для идентификации Auxocolor (Bio-Rad), Fungifast (ELITech Microbio) и др. Идентификацию дрожжей можно осуществлять и в бактериологических анализаторах, масс-спектрометрах. Быстро определить до вида *Candida spp.* возможно с помощью латекс-агглютинации на стекле непосредственно с изолированной колонией тестами Elitech (ELITech Microbio).

Идентификацию мицелиальных грибов проводят на основании комплекса культуральных, морфологических признаков, данных микроморфологии мицелия и гиф, наличия и характера репродуктивных органов, тестов на ассимиляцию уреазы, перфорацию волос, потребности в дополнительных веществах, способности роста при различных температурах и др. Для оценки усвоения различных источников углерода как для дрожжевых, так и для нитчатых грибов возможно использовать API 20C AUX (bioMerieux).

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГРИБОВ С ПОМОЩЬЮ MALDI-TOF MS

Внедрение MALDI-TOF MS в медицинских микробиологических лабораториях произвело революцию, значительно сократив время выполнения процессов идентификации. В лабораториях, имеющих MALDI-TOF MS, данное оборудование используют в качестве первоочередного для идентификации обычных дрожжей и нитчатых грибов. В 2021 г. Институт клинических и лабораторных стандартов (Clinical and Laboratory Standards Institute — CLSI) разработал рекомендации по микробиологической идентификации с помощью MALDI-TOF MS. Масс-спектрометрия позволяет идентифицировать виды непосредственно из колониеобразующей единицы (КОЕ), хотя в ряде случаев требуется стадия предварительной экстракции и/или субкультивирования. В дополнение к скорости другим основным преимуществам MALDI-TOF MS служит точность. Например, идентификация данным методом позволяет различать виды среди комплексов *Candida*, таких как *C. parapsilosis complex* (*C. parapsilosis stricto sensu*, *C. metapsilosis* и *C. orthopsilosis*), или комплекс *C. haemulonii* (*C. haemulonii*, *C. pseudohaemulonii*) и новый вид — *C. auris*. Неверная идентификация или ее отсутствие наиболее распространенных дрожжеподобных грибов встречается редко. В основном это связано с отсутствием конкретного вида в базе данных, низким качеством спектров или загрязненной культурой.

Идентификация **нитчатых грибов** сильно зависит от качества баз данных (количество видов, спектров для каждого вида и др.), качества подготовки образцов. Необходимо отметить, что редкие, нечасто встречаемые плесневые грибы по-прежнему трудно идентифицировать этим методом из-за нескольких ограничивающих факторов.

Во-первых, в ряде случаев плесневые грибы может быть сложно отобрать с твердых сред, на которых их традиционно выращивают, из-за их высокой адге-

зии. Для правильного отбора проб без агара, который может загрязнить спектры, необходимы время и обученный персонал. Во-вторых, хотя библиотеки производителей регулярно обновляются, учитывая огромное разнообразие, с которым можно столкнуться при патологии человека и животных, они по-прежнему страдают от неполноты, что приводит к неправильной идентификации или ее отсутствию. Кроме того, не решен вопрос по видовой идентификации ряда нитчатых грибов внутри секций, или комплексов видов. Например, по данным ряда авторов, внутри рода *Aspergillus* имеющиеся коммерческие базы неверно определяли виды внутри секций *Fumigati*, *Nidulantes*, *Nigri*, для которых чувствительность к противогрибковым препаратам различается.

Очевидно, в ближайшее время недостатки, существующие при идентификации грибов с помощью масс-спектрометрии, будут решены. Помимо идентификации, совершенствуются инновационные приложения и протоколы по прямому обнаружению грибковых патогенов в крови. Кроме того, разрабатывают методы по выявлению с помощью MALDI-TOF MS новых маркеров ранней инвазивной грибковой инфекции в крови, а также протоколы по тестированию на чувствительность к противогрибковым препаратам. Инновационные приложения, основанные на MALDI-TOF, вероятно, появятся и в будущем.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ МИКОЗОВ

Обнаружение микозов в биологических образцах с помощью полимеразной цепной реакции без выделения культур

Для идентификации ряда грибковых инфекций разработаны методы полимеразной цепной реакции (ПЦР) к разным возбудителям микозов. Их преимущества — быстрота, высокая чувствительность. К недостаткам относят неспособность отличить живые грибковые клетки от мертвых, возможность контаминации образца с высокой частотой ложноположительных результатов, ограниченность наборов праймеров видов диагностируемых грибов. В настоящее время тест-системы на основе ПЦР не являются общепринятыми методиками диагностики инвазивных микозов, и их применение все еще ограничено до выработки более четких рекомендаций по целесообразности их использования. Наиболее распространены в настоящее время ПЦР-наборы для обнаружения дрожжеподобных грибов, дерматофитов.

Молекулярная видовая идентификация грибов

Применяют как для идентификации и классификации грибов, так и для эпидемиологических исследований, филогенетического анализа. **Бар-кодирование** — использование коротких стандартизированных последовательностей в геноме для идентификации видов. Для этого проводят амплификацию с последующим секвенированием таксономически информативных для анализируемой группы грибов локусов дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). При этом геномный

локус, предлагаемый в качестве бар-кода, должен быть вариабелен в пределах вида лишь в малой степени, но достаточно вариабелен между видами. Для рутинной идентификации грибов наиболее часто применяют внутреннюю транскрибируемую спейсерную область (Internal transcribed spacer — ITS), расположенную между генами малой и большой субъединиц рибосомальной рибонуклеиновой кислоты. Последовательность ITS имеет статус первичного, стандартного маркера для идентификации грибов и позволяет легко отличать близкородственные организмы. Маркер продемонстрировал довольно высокую способность правильной идентификации большого количества грибов, кроме некоторых родов *Ascomycota*, включая *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*. В ряде случаев анализ ITS не обеспечивает точного разделения видов внутри видовых комплексов. Именно поэтому для многих видов грибов включают в анализ дополнительные нуклеотидные последовательности, такие как участки генов β -тубулина (TUB), фактора элонгации трансляции 1- α (TEF), фрагмента гена, ответственного за синтез фермента ДНК-лиазы (*apn2*); область большой субъединицы рибосомы — рибосомную ДНК (LSU) и др. Рекомендуемые последовательности для идентификации грибов представлены в открытом доступе в нескольких базах данных. После секвенирования проводят молекулярно-филогенетический анализ, сравнивая генетическое сходство исследуемой грибковой культуры с другими грибами.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ГРИБОВ К АНТИМИКОТИКАМ

Чувствительность грибов к противогрибковым препаратам определяют в случаях тяжелых инфекций, когда есть риск резистентности (например, *A. flavus*, *C. lusitaniae* к амфотерицину В и др.), в случае неэффективности эмпирической терапии, для эпидемиологических исследований, контроля уровня резистентности. Для определения чувствительности грибов к антимикотикам существует ряд методов (табл. 2.4).

Таблица 2.4. Методы определения чувствительности грибов к антимикотикам

Для дрожжеподобных грибов	Для мицелиальных грибов
Метод микроразведений в бульоне [Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing — EUCAST), CLSI]	Метод микроразведений в бульоне (EUCAST, CLSI)
Диско-диффузионный метод (CLSI)	Е-тесты, полоски минимальной ингибирующей концентрации (МИК-полоски)
Е-тесты, МИК-полоски	Коммерческие тест-системы (Sensititre YeastOne, VIPcheck™ и др.)
Коммерческие тест-системы (Sensititre YeastOne, SensiQuattro Candida EU, Fungitest, VITEK2 AST YST и др.)	

- **Метод разведений** — количественное определение минимальных подавляющих концентраций противогрибковых препаратов. Ввиду трудоемкости применяют в основном для эпидемиологических исследований и сравнения *in vitro* активности новых и используемых препаратов. В настоящее время разработаны два стандарта — Институтом клинических и лабораторных стандартов США CLSI и Европейским комитетом по определению чувствительности к антимикробным препаратам EUCAST. Методы отличаются друг от друга по составу среды, плотности инокулюма, способу считывания (визуальное или с помощью спектрофотометра). В России на основе стандарта EUCAST в настоящее время утверждены клинические рекомендации по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам, где подробно описана постановка метода последовательных разведений для определения чувствительности дрожжей.
- **Диско-диффузионный метод** (стандарт CLSI) — более простой и доступный метод для определения чувствительности изолятов *Candida* в рутинных исследованиях. В основе теста — диффузия противомикробного препарата в агар. Метод валидирован для флуконазола, вориконазола и каспофунгина.
- **Е-тесты** — пластиковые полоски со стабильным градиентом из 15 концентраций антимикробного препарата. В основе теста — диффузия антибиотика в агар. Позволяет быстро определить минимальную ингибирующую концентрацию патогенных микроорганизмов.
- **Коммерческие тест-системы** основаны на методе микроразведений, очень удобны в использовании. Существуют как ручные (Fungitest, Sensititre YeastOne, VIPcheck™ и др.), так и автоматизированные тесты (VITEK 2 AST-YS01 и др.).

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ МИКОЗОВ

Использование и разработка серологических методов диагностики грибковых инфекций имеют ряд сложностей, так как определение специфических антител затруднено из-за их недостаточной выработки у иммунокомпрометированных больных, а методы выявления антигенов не всегда характеризуются высокой чувствительностью и специфичностью. Тем не менее при разумном подходе и интерпретации значений (особенно у тестов с низкой чувствительностью/специфичностью) иммунологическая диагностика обоснована в комплексном совокупном подходе диагностики микологических инфекций.

В настоящее время среди иммунологических методов применяют метод флюоресцирующих антител (МФА), реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА), реакцию иммунодиффузии (РИД), реакцию связывания комплемента (РСК), иммуноферментный анализ (ИФА), реакцию непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ). Наиболее применяемые иммунологические тесты, используемые для диагностики микозов, приведены в **табл. 2.5**.

Таблица 2.5. Иммунологические тесты, применяемые для диагностики микозов

Заблевание	Тест	Определяемый параметр	Образец	Чувствительность, %	Специфичность, %
Гистоплазмоз	РИА*	100 кДа (ГПА)	Моча	96,7	100
	ИФА*	Галактоманнан	Сыворотка БАЛ*	92,3 93,5	99 97,8
Бластомикоз	ИФА	Галактоманнан	Сыворотка	76–90	НД*
			Моча	52–82	НД
Кокцидиоидомикоз	ИФА	Хитиназа-1	Сыворотка	87	97
Паракокцидиоидомикоз	ИФА	Гликопротеин gP43	Сыворотка	95,1	97,5
	ЛА*	<i>T. marneffei</i>	Моча	76,5	100
Таларомикоз	ИФА	Цитоплазматический дрожжевой антиген <i>T. marneffei</i>	Сыворотка	100	100
Криптококкоз	ЛА	Криптококковый капсульный антиген	Сыворотка, ликвор	94–100	86–97
	ИФА	Криптококковый капсульный антиген	Сыворотка, ликвор	99	97
Аспергиллез	ИФА	Галактоманнан	БАЛ, сыворотка	67–100	86–100
	ИФА	Содержание антител IgG, IgE <i>Aspergillus fumigatus</i> ИФА	Сыворотка	58	93
Инвазивный кандидоз	ИФА	Маннанный антиген	Сыворотка	40–58	93
	ИФА	Антитела к зародышевым трубкам <i>S. albicans</i>	Сыворотка	42–96	54–100
	ИФА	1,3-β-d-глюкан	Сыворотка, ликвор	75–80	65–85

* РИА — радиоиммунологический анализ; ИФА — иммуноферментный анализ; ЛА — латексная агглютинация; НД — нет данных; БАЛ — бронхоальвеолярный лаваж.