

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Красноярский государственный медицинский
университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Кафедра кардиологии, функциональной и клинико-лабораторной
диагностики ИПО

Зав.кафедрой: профессор, д.м.н.
Матюшин Г.В. Проверил: доцент, к.м.н.
Анисимова Е.Н.

РЕФЕРАТ

Тема: Лабораторные методы диагностики микозов.

Выполнил: врач-ординатор Егоров А.А.

Специальность: Клинико-лабораторная
диагностика

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-
Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации

КАФЕДРА

Кафедра кардиологии, функциональной и клинико-лабораторной диагностики ИПО

**Рецензия <доц. КМН Кафедры кардиологии, функциональной и клинико-лабораторной
диагностики ИПО Анисимова Елена Николаевна > на реферат ординатора первого года обучения
специальности Клиническая лабораторная диагностика Егорова Алексея Андреевича> по теме:
< Лабораторные методы диагностики микозов >.**

Рецензия на реферат – это отзыв преподавателя о проведенной самостоятельной работе ординатора, который включает критическое мнение, при оценке учитываются навыки ординатора, такие как: работа с литературой, по выбранной специальности обучения, анализ степени раскрытия выбранной тематики, умение находить и интерпретировать полученную информацию, умение аргументировать основные положения и выводы и так далее. Затем преподавателю необходимо перечислить всевозможные недочеты и дать рекомендации по оценке.

Ознакомившись с рефератом, преподаватель убеждается в том, что ординатор владеет описанным материалом, умеет его анализировать и способен аргументированно защищать свою точку зрения.

Основные оценочные критерии рецензии на реферат ординатора первого года обучения специальности Клиническая лабораторная диагностика :

Оценочный критерий	Положительный/ отрицательный
1. Структурированность	+
2. Наличие орфографических ошибок	-
3. Соответствие текста реферата его теме	+
4. Владение терминологией	+
5. Полнота и глубина раскрытия основных понятий темы	+
6. Логичность доказательной базы	+
7. Умение аргументировать основные положения и выводы	+
8. Круг использования известных научных источников	+
9. Умение сделать общий вывод	+

Итоговая оценка: положительная/отрицательная

Комментарии рецензента:

Дата:

Подпись рецензента:

Подпись ординатора:




Возбудители микозов

На сегодня известно около 400 болезнетворных грибов — возбудителей зарегистрированных случаев микозов. В последнее время список болезнетворных грибов пополняется, в среднем, на 10 видов в год.

Классификация возбудителей

Существующие классификации возбудителей, как правило, отражают их таксономическое положение или особенности морфологии (например, дрожжевые, плесневые и диморфные), клинические или патологические характеристики соответствующих инфекций (например, возбудители поверхностных и глубоких микозов), или особенности эпидемиологии (например, возбудители тропических и эндемических микозов, оппортунистических инфекций). По мере накопления знаний о болезнетворных грибах классификации усложняются, а иногда и пересматриваются.

Наиболее целесообразным подходом к классификации болезнетворных грибов представляется их распределение в зависимости от уровня патогенности / биологической угрозы, которую представляет каждый болезнетворный грибок. В России возбудителей инфекционных заболеваний классифицируют по группам патогенности (I – IV по убыванию), в зависимости от опасности, которую они представляют не только для человека, но и общества. Большинство возбудителей микозов относится к IV группе патогенности (оппортунистические инфекции), возбудители эндемических микозов и криптококкоза — к III группе. За рубежом используют так называемые уровни биологической защиты (BSL – biological safety levels), характеризующие возбудителей по степени риска, который представляет контакт с ними, в частности, для сотрудников микробиологической лаборатории.

Классификация по степени риска (BSL)

Каждому уровню BSL соответствуют определенные лабораторные стандарты — меры предосторожности, предпринимаемые при работе с возбудителем. Выделяют 4 уровня, BSL 1 – 4, четвертому соответствует наибольшая биологическая опасность. Распределение микробов по уровням BSL определяется рядом характеристик. Основными являются: известные факторы патогенности (тип роста, литические ферменты, токсины); экологические особенности вида-возбудителя (естественная среда обитания и приспособленность к среде микроорганизма); механизм передачи (например, ингаляционный или гематогенный); предрасполагающие факторы, на фоне которых развивается инфекция (например, на фоне видимого здоровья или выраженного иммунодефицита), чувствительность или устойчивость к существующим методам терапии. В целом решение о внесении болезнетворного гриба в ту или иную группу BSL принимают на основе анализа известных случаев заболеваний, обусловленных этим грибом, и соотношением числа случаев контакта с грибом и случаев вызванного им заболевания. Последний критерий часто соответствует так называемому индексу исходной патогенности (IPI, intrinsic pathogenity index), который рассчитывается для условно-патогенных микроорганизмов.

Все известные возбудители микозов относятся к 1 — 3 группам BSL. Не вызывающие инфекций, чаще всего промышленные, штаммы грибов относятся к категории GRAS (generally regarded as safe, обычно рассматриваемые как безопасные).

К I группе BSL отнесены условно-патогенные грибы, вызывающие глубокие микозы случайно, как правило, только на фоне иммунодефицита или критического состояния пациента. Сюда же входят случайные возбудители недерматофитных онихомикозов. Контакт персонала лаборатории с культурой этих грибов и нарушения правил безопасности при работе с ними не сопровождаются развитием заболевания.

Ко II группе BSL относятся условно-патогенные грибы, лучше приспособленные к обитанию в среде макроорганизма. Случаи обусловленных ими глубоких микозов встречаются регулярно. Во 2 группу также входят основные возбудители подкожных микозов.

		<i>Phialophora parasitica et richardsiae</i>	2
		<i>Phialophora bubackii et repens</i>	1
		<i>Phoma cruris-hominis</i> <i>et oculo-hominis</i>	2
		<i>Phoma spp.</i>	1
		<i>Ulocladium spp.</i>	1
Подкожные и глубокие	Споротрихоз	<i>Sporothrix schenckii</i>	2
Подкожные	Энтомофтороз	<i>Basidiobolus spp.</i>	2
		<i>Conidiobolus incongruus</i>	2
		<i>Conidiobolus spp.</i>	1
	Риноспородиоз	<i>Rhinosporidium seeberi</i>	2
Подкожные Глубокие	Болезнь Лобо Аспергиллез	<i>Lacazia loboi</i>	2
		<i>Aspergillus fumigatus, flavus, terreus</i> <i>прочие возбудители аспергиллеза</i>	2
			1
Глубокие	Мукороз	<i>Absidia spp.</i>	2
		<i>Apophysomyces elegans</i>	2
		<i>Cokeromyces recurvatus</i>	1
		<i>Cunninghamella bertholletiae</i>	2
		<i>Mortierella wolfii</i>	2
		<i>Mucor amphibiorum</i>	2
		<i>Mucor spp.</i>	1
		<i>Rhizomucor pusillus</i>	2
		<i>Rhizopus microsporus</i>	2
		<i>Rhizopus spp.</i>	1
		<i>Saksenaea vasiformis</i>	2
		<i>Syncephalastrum racemosum</i>	2
		Глубокие и подкожные, редко поверхностные (онихомикозы)	Гиалогифомикоз
<i>Acremonium spp.</i>	1		
<i>Fusarium oxysporum, solani et</i> <i>verticilloides</i>	2		
<i>Fusarium spp.</i>	1		
<i>Geotrichum capitatum et clavatum</i>	2		
<i>Geotrichum candidum</i>	1		
<i>Lecytophora hoffmanni</i>	1		
<i>Microascus spp.</i>	1		
<i>Phialemonium spp.</i>	2		
<i>Paecilomyces spp.</i>	1		
<i>Penicillium spp.</i>	1		
<i>Scopulariopsis spp.</i>	1		
<i>Trichoderma spp.</i>	1		
Глубокие	Феогифомикоз		
		<i>Cladophialophora spp.</i>	2
		<i>Graphium eumorphum</i>	2
		<i>Ochroconis gallopava, humicola et</i> <i>tshawytschae</i>	2
		<i>Ochroconis constricta</i>	1
		<i>Ramichloridium mackenziei</i>	3
		<i>Ramichloridium schulzeri</i>	1
		<i>Scedosporium prolificans</i>	2
Глубокие	Пневмоцитоз	<i>Pneumocystis carinii</i>	2
Глубокие и подкожные	Питиоз	<i>Pithium insidiosum</i>	2

скальпель, кюретку, или предметное стекло. Чтобы избежать порезов, применяют тупые скальпели, костные кюретки. Соскабливать лучше с выделяющегося наружного края поражения, поскольку именно здесь высока возможность содержания жизнеспособных грибов. Если имеются пузырьки, то следует удалить покрывку свежего пузырька, как правило, содержащую грибковые клетки.

После удаления соскобленных чешуек можно взять мазок с того же пораженного места, проведя по нем тампоном, смоченным в бульоне (жидкая питательная среда). Мазки берут с поражений, локализующихся в складках кожи, при мокнутии и выраженном воспалении. Используют стерильные, смоченные водой или физиологическим раствором тампоны. Если шелушение не выражено, что часто наблюдают при поражениях гладкой кожи, можно использовать липкую ленту. Ленту прижимают к пораженному месту, затем удаляют и кладут липкой стороной на предметное стекло, и так доставляют в лабораторию.

Соскобленные чешуйки направляют в лабораторию завернутыми в бумагу, в бумажных пакетиках или в сухих закрытых микропробирках. Использование бумаги дает материалу высохнуть, уменьшая риск загрязнения бактериальной флорой, способствует длительному (в течение нескольких месяцев) хранению дерматофитов. Лучше применять темную плотную бумагу.

Ногти

Перед взятием материала поверхность ногтя следует обработать тампоном с раствором 70% медицинского спирта.

Материал собирают скальпелем или лезвием бритвы. Фрагменты ногтя (срезы) можно удалить маникюрными ножницами или кусачками.

При поверхностной форме онихомикоза скальпелем или лезвием бритвы выполняют соскобы с поверхности ногтевой пластинки в пораженной области. Соскабливают до появления слоев, не пораженных грибом. Самые поверхностные слои, по возможности, не следует использовать для анализа, предпочитая им промежуточные, но не самые глубокие.

При дистально-латеральной подногтевой форме онихомикоза существует два типа материала. Первый — это фрагменты ногтевой пластинки, срезанные во всю ее толщину. Эти фрагменты можно получить скальпелем, ножницами или кусачками. При этом желательно сделать срез, как можно дальше расположенный от свободного края ногтя.

Второй тип материала — это роговые массы, образующиеся под ногтевой пластинкой из-за реактивного гиперкератоза ногтевого ложа. Роговые массы собирают путем соскоба острым концом скальпелем из-под ногтевой пластинки, стараясь захватить наиболее проксимальные и глубокие слои. Первые порции соскоба также не употребляются для анализа, поскольку они в наибольшей степени подвержены бактериальной, грибковой и прочей контаминации.

При проксимальной подногтевой форме с локализацией возбудителя под ногтевой пластинкой в проксимальной ее трети выполнить результативный соскоб, последовательно удаляя слои с поверхности, удастся не всегда. Материал собирают бормашиной, просверливая толщину ногтевой пластинки и извлекая пыль отсосом. Другими путями сбора является удаление всей ногтевой пластинки или ее проксимальной части с помощью скальпеля.

При кандидной паронихии материалом служат чешуйки с заднего и латеральных околоногтевых валиков, собранных скальпелем. Кроме того, желательно выполнить соскоб из-под заднего ногтевого валика, взяв материал с его внутренней поверхности и дорсальной поверхности ногтевой пластинки, скрытой под валиком. Материалом для исследования служит и гной, если его удастся получить, надавливая на задний околоногтевой валик.

Волосы

Выбор очага для сбора материала можно проводить с помощью лампы Вуда. Отрезать волосы, оставляя корни, нецелесообразно, поскольку очаг инфекции находится или на поверхности кожи, или под ней. Волосы берут эпиляционным пинцетом. Если возникают

инкубации 30 °С. Если исследование венозной крови не дает результата, а подозрение на глубокий микоз сохраняется, иногда берут артериальную кровь.

Если в качестве источника инфекции заподозрен катетер, то он также служит материалом для исследования. Для получения культуры наконечником катетера проводят по чашке с агаром Сабуро, или используют метод соникации — обработки катетера ультразвуком с посевом в бульон Сабуро.

Костный мозг

Костный мозг исследуют в культуре при диагностике некоторых глубоких инфекций, например, гистоплазмоза, криптококкоза. Три-пять миллилитров аспирированного материала помещают в стерильную посуду с 0,5 мл стерильного гепарина в разведении 1:1000. Костный мозг можно сразу помещать в питательную среду.

Цереброспинальная жидкость

Три-пять миллилитров цереброспинальной жидкости собирают, делая люмбальную пункцию. Материал центрифугируют, полученный супернатант используют для серологических исследований, а осадок микроскопируют или вносят в питательную среду.

Другие жидкости

Плевральную, внутрибрюшинную или внутрисуставную жидкости, собранные путем аспирации или дренирования, собирают в стерильную посуду, добавляя стерильный гепарин в разведении 1:1000, чтобы предотвратить свертывание. Материал центрифугируют, осадок исследуют в культуре. Дренажная жидкость, взятая при перитонеальном анализе, не нуждается в добавке гепарина.

Специальные методики для исследования жидких сред

Для получения культуры из крови, ликвора и других в норме стерильных жидкостей пользуются особыми высокочувствительными методиками. К таким относят техники мембранных фильтров и лизис-центрифугирования, в которых клетки крови разрушаются химическим способом, фунгистатические факторы крови и комплемент инактивируются, а клетки возбудителя сохраняются и концентрируются для посева. Одной из известных систем лизис-центрифугирования является Isolator («du Pont & Co.» и «Wampole labs.», США), по чувствительности и скорости получения результата значительно превосходящая традиционные методики, а также некоторые автоматизированные системы. Это преимущество имеет и обратную сторону — более высокий процент ложноположительных результатов и контаминации. Для исследования требуется 10 мл крови.

Существуют специальные автоматизированные системы для выделения грибов из крови с применением селективных или обычных аэробных сред. Как правило, в этих системах используются жидкие среды, а рост колоний оценивается автоматически с помощью спектрофотометрии, по выделению углекислого газа в среду, а также с помощью флуоресцентных или радиометрических методик. Несмотря на высокую чувствительность этих систем, для них требуется не менее 2 — 3 мл крови, а при объеме до 10 мл чувствительность и скорость выделения существенно повышаются. К наиболее известным относятся системы VacTec (Beckton Dickinson, США), VacT/Alert (Organon Teknika, США), ESP (Difco labs., США), VITAL (bioMerieux, Франция). Автоматизированные системы с успехом применяются для выделения культуры из ликвора и других стерильных жидких сред организма, перитонеального диализата.

В автоматизированных системах могут использоваться разные среды, как специализированные микологические (Mycosis IC/F, VacTec Fungal Medium), так и общие для выделения анаэробных микробов (VacTec Aerobic Plus/F, VacT/Alert FAN), причем последние уступают первым по скорости культивирования. В крови содержится термостабильный фактор, препятствующий колониеобразованию *Candida*, в связи с чем в средах некоторых из

исследование взятого образца ткани, одна из самых простых и наиболее полезных процедур в лабораторной диагностике. Помимо первичной, или непосредственной (прямой) микроскопии, когда исследуется сам материал от пациента, выделяют вторичную микроскопию, когда изучают культуру возбудителя, полученного из этого материала. Прямая микроскопия позволяет быстро поставить диагноз микоза, что дает возможность сразу начать лечение; она может показать, на какие среды следует посеять полученный материал; ее положительный результат может оставаться единственным лабораторным подтверждением микоза при отрицательном ответе в культуре.

Обычной окраски по Граму, производимой во всех микробиологических лабораториях, недостаточно для диагностики микоза, хотя она позволяет обнаружить клетки дрожжей. В настоящее время применяется ряд методик прямой микроскопии, использующих как влажные неокрашенные, так и высушенные препараты с использованием различных окрасок.

Препараты с гидроксидом калия (КОН)

Добавление капли 10 — 20% раствора щелочи (КОН или NaOH) к препарату на предметном стекле позволит растворить кератин и остатки клеток эпидермиса, оставляя неповрежденными клетки гриба (этот процесс называют просветлением материала, или «мацерацией»). Препарат накрывают покровным стеклом, слегка надавливая, отжимают излишнюю жидкость и высушивают на слабом пламени горелки, микроскопируют препарат через 10 — 15 минут. Иногда для придания большей контрастности добавляют каплю лактофеноловой синьки. При использовании лактофенола подогревание препарата не требуется. Окрашивать препарат с КОН можно и чернилами. В препарате, приготовленном с КОН и ДМСО, структура мицелия может быть разрушена. Препараты, приготовленные в щелочи, не хранятся долго — их следует микроскопировать в течение двух часов с момента приготовления. Микроскопия с КОН — самый распространенный, быстрый и доступный метод. Он позволяет обнаружить в чешуйках кожи, ногтей, в волосах возбудителей дерматофитоза, разноцветного лишая, кандидоза, черной и белой пьедры, *tinea nigra*, а также многих возбудителей глубоких микозов в мокроте, образцах ткани, взятых при биопсии.

Окраска с калькофлюоровым белым

Это модификация окраски с гидроксидом калия, получившая распространение в последние годы. Калькофлюор — флюорохромный краситель, имеющий сродство к хитину и целлюлозе, при добавлении красителя к препарату с КОН он поглощается частями гриба. Под люминесцентным микроскопом можно наблюдать голубое или зеленое свечение, это зависит от применяющегося фильтра. Методика с калькофлюоровым белым чувствительна, но доступна лишь в тех лабораториях, где есть люминесцентный микроскоп с набором фильтров. Следует помнить, что свечение могут давать не только части гриба (содержащие хитин), но и другие структуры, состоящие из полисахаридов.

Окраска с тушью

Используется при исследовании цереброспинальной жидкости при подозрении на криптококкоз (поиск капсул *Cryptococcus neoformans*). К капле полученного при центрифугировании ликвора осадка добавляют каплю туши, смешивают и накрывают покровным стеклом. Под большим увеличением на темном фоне наблюдают почкующиеся клетки, окруженные широким светлым ободком. Эту картину могут имитировать лейкоциты, другие артефакты; необходимо тщательное исследование. В настоящее время в диагностике криптококкоза эта методика вытесняется высокоэффективным методом латекс-агглютинации криптококкового антигена.

Выделение возбудителей в культуре

Получение культуры гриба из клинического материала часто является надежным подтверждением диагноза, иногда и основанием для него.

Оптимальная температура роста для большинства патогенных грибов — 30 °С. Термостатами, необходимыми при инкубации при 30 °С, оборудованы не все лаборатории. Поэтому распространенной при инкубации большинства грибов остается комнатная температура в 22 — 25 °С.

Инкубация при 37 °С проводится в основном при подозрении на диморфные возбудители. При 37 °С хорошо растут и некоторые другие дрожжевые и плесневые грибы (*Cryptococcus neoformans*, *Candida spp.*, зигомизеты). Как правило, при получении первичной культуры без подозрения на глубокий микоз не используют одновременную инкубацию при 25 — 30 и 37 °С.

Для большинства культур грибов продолжительность инкубации не превышает 4 недель, после чего лаборатория дает отрицательный ответ. При дрожжевых поражениях влажной полости рта культуру выдерживают не больше недели.

При подозрении на диморфный микоз (и отсутствии роста) культура выдерживается в течение 8 недель, и только после этого лаборатория может дать отрицательный ответ.

У пациентов с иммунодефицитом с подозрением на грибковую инфекцию важно выделение любого гриба из клинического материала. В этих случаях при отсутствии роста грибов на питательной среде культуру выдерживают дополнительные 2 — 4 нед. Это делают, чтобы не пропустить выделения медленно растущих грибов.

Меры предосторожности при работе с культурой

В целях безопасности при работе с культурой рекомендуется производить посевы во флаконы или пробирки со скошенным агаром. Получение культуры в чашках Петри удобнее — поверхность среды в них гораздо больше, чем во флаконе, однако менее безопасно. В чашках Петри нельзя культивировать возбудителей эндемических респираторных микозов и вообще грибов категории BSL-3. Выделение последних должно производиться в специально оборудованных кабинетах.

Принципы микробиологической идентификации возбудителей

Целью всякого микробиологического исследования является установление природы микроорганизма — возбудителя заболевания, полученного из клинического или другого материала. Конечной целью микробиологического исследования является установление рода и вида (иногда и биовара) возбудителя — гриба. Возбудителей микозов человека насчитывается более 400, а количество грибов, вызывающих заболевания, часто встречающиеся на практике — гораздо меньше. Нередко бывает достаточно определения рода возбудителя.

Исследование в микробиологической (микологической) лаборатории должно дать ответ на следующие вопросы:

1 Инфекционная природа заболевания (микроорганизмы — возбудители видны при микроскопии клинического материала, или в ткани при гистопатологическом исследовании, выделены в культуре).

2 Грибковая этиология возбудителя.

3 Природа возбудителя — гриба (морфология при микроскопии, характер роста на обычных и специальных питательных средах, биохимические и другие свойства).

4 Определение чувствительности выделенного гриба к противогрибковым препаратам. Проводится не всегда.

Грибковая этиология обнаруженных в клиническом материале или полученных в культуре микроорганизмов устанавливается по характерной морфологии (нити мицелия или почкующиеся клетки) и по росту на питательных средах при 20 — 25 °С, нередко с добавками антибиотиков. После того, как грибковая этиология гриба установлена, выясняют, к какой из двух основных групп грибов он принадлежит, то есть является ли этот гриб плесневым или дрожжевым. Это определяют, проводя следующие исследования:

1 микроскопия клинического материала с КОН. Определяют наличие элементов мицелия (гифы);

условиях, обычно неразличимы под микроскопом. Для их дальнейшей идентификации нужны специальные морфологические среды, биохимические и другие тесты. Морфологические характеристики на стандартных средах важны для определения плесневых грибов.

При микроскопическом изучении полученных в культуре плесневых грибов учитывают структуру мицелия, то есть особенности строения гиф, включая их цвет, септированность (частоту расположения и упорядоченность септ) и особенности строения, характеризующие принадлежность к одному из отделов грибов (*Zygomycota*, *Ascomycota* и *Basidiomycota*). Учитывают и отдельные признаки, например, ризоиды зигомицетов.

Затем оценивают особенности строения конидиев и спор, включая размер, форму, цвет конидиев, строение их клеточной стенки и септированность, структуру (количество клеток и внутреннее строение), особенности несущих их (конидиогенных) структур и некоторые отдельные признаки.

Перечисленные процедуры — микроскопия полученной культуры, а также макроскопическое изучение колоний — считаются основными в идентификации плесневых грибов. Нередко эти процедуры завершают процесс идентификации.

Диагностически значимыми при исследовании культуры являются:

1 Выделение любого плесневого гриба, если предварительно этот гриб был обнаружен при микроскопии клинического материала.

2 Выделение любого плесневого или дрожжевого гриба, если материал был получен из стерильной в норме ткани или жидкости организма.

3 Выделение диморфного гриба.

4 Выделение *Cryptococcus neoformans*.

5 Выделение дерматофитов из кожи, волос или ногтей.

Современные особенности идентификации дрожжевых грибов

Чтобы избежать значительных материальных и временных затрат при идентификации возбудителя среди всех возможных дрожжевых грибов, в последнее время используют методы предварительной (ориентировочной) идентификации. Эти методы позволяют довольно быстро и без труда определить один или несколько наиболее частых возбудителей кандидоза или других дрожжевых грибов. Вот почему в большинстве подобных систем определяется *C. albicans*, реже — еще несколько распространенных возбудителей. Разные методики позволяют распознать эти грибы за несколько часов, а в случаях, когда предварительную идентификацию сопрягают с изучением первичной культуры (хромогенные среды), времени на собственно идентификацию вообще не тратится.

Быстрая идентификация *C. albicans* позволяет охватить 70 — 80% случаев кандидоза и вообще дрожжевых инфекций. Включение в набор тестов для 3 — 4 других видов *Candida* или *Cryptococcus neoformans* (набор «Fungiscreen») увеличивает эту цифру до 90 — 95%. В этом заключается главное преимущество быстрой и ориентировочной классификации.

Расширенные тесты ориентировочной идентификации («Auxacolor», «BBL Mycotube») по специфичности и широте спектра приближаются к классическим методикам, охватывая до 99% всех видов *Candida* и других дрожжевых грибов. Они соответствуют классическим тестам и по временным затратам, поскольку основаны на исследовании ауксаногаммы, требующим 24 — 48 ч.

Классические и модифицированные современные методы расширенной идентификации позволяют охватить максимальное число видов из возможных. Благодаря этому они являются окончательными, завершающими стадиями идентификации *Candida* spp. К классическим методикам прибегают в тех случаях, когда предварительные или ориентировочные тесты не дали результата. Сами классические тесты при получении неопределенного или отрицательного результата могут быть повторены или подкреплены данными других классических методик, например — расширенная ауксаногамма подкрепляется исследованием зимограммы, микроморфологии на специальных срезах. Использование нескольких разных классических методик позволяет идентификацию более

(зимограмма) углеводов. Биохимические тесты надежны, но нередко трудоемки и требуют времени. В настоящее время разработаны автоматизированные системы идентификации, а также специальные серийно выпускаемые наборы. Внедряются системы быстрой идентификации дрожжевых грибов. Менее часто используются тесты ассимиляции азота, определения уреазной активности, активности отдельных специфических ферментов.

Выпускается несколько серийных наборов, позволяющих определить *C. albicans* в культуре за 10 — 30 минут. В средах содержатся субстраты для двух ферментов: β -галактозамидазы и L-пролин аминопептазы. Из всех патогенных дрожжевых грибов только *C. albicans* имеет оба этих фермента. Этот тест может заменять проростковую пробу для предварительного исследования первичной культуры дрожжевых грибов. Тесты непосредственного (прямого) обнаружения ферментов разработаны и для других видов *Candida*, например, тест с трегалозой для *C. glabrata*.

Методы определения чувствительности грибов к антимикотикам *in vitro*

Для определения чувствительности грибов к антимикотикам используют диско-диффузионный подход. Данный метод разработан для дрожжевых грибов и не обладает точной информативностью. В настоящее время отечественной и зарубежной промышленностью выпускаются диски с основными антифунгальными препаратами — флуконазолом, итраконазолом, нистатином, клотримазолом, эконозолом, кетоконазолом, миконазолом, амфотерицином В, 5-флюороцитозиним. Для определения чувствительности грибов к антимикотикам (флуконазолу и вориконазолу) диско-диффузионным методом Национальный комитет по клиническим лабораторным исследованиям США (NCCLS) предлагает использовать среду Мюллер-Хинтон с добавлением метиленового синего (5 мг / мл) и глюкозы (0,4 г / л). Зарубежными фирмами (Bio-Rad) выпускаются также среды для определения чувствительности грибов к антимикотикам -казитоновая среда «CASITONE» и полусинтетическая среда «SEMISYNTHETIC». В России, как правило, используется агар Сабуро.

Более информативные результаты дает использование метода серийных разведений. Чувствительность грибов к антимикотикам методом серийных разведений определяется согласно фармакопейному методу, представленному в Европейской Государственной Фармакопее (2002). Фирмой «Bio-Rad» выпускается система «FUNGITEST», разработанная в соответствии с рекомендациями NCCLS. Она представляет собой микропанель, в которой методом серийных разведений исследуется чувствительность грибов к 6 препаратам: амфотерицину В, 5-флюороцитозину, флуконазолу, интраконазолу, кетоназолу и миконазолу в удвоенных концентрациях. Используется сухая модифицированная среда — RPMI 1640, изменяющая цвет с голубого на красный. Считывание результатов проводится без прибора. Фирма BioMerieux выпускает стрипы ATB FUNGUS для определения чувствительности грибов к антимикотикам.

Показателем резистентности грибов к антимикотикам является повышение величины МПК конкретного штамма. Существуют критерии NCCLS для системных антимикотиков. Так, для амфотерицина В (при МПК ≥ 2 мг / л) говорят о резистентности к данному конкретному антимикотику, а для флуконазола эта величина может достигать и 64 мг / л.

Серологические методы

Эти методы можно считать вспомогательными, так как они выявляют лишь сенсibilизацию макроорганизма к антигенам грибов. Однако ряд тестов позволяет выявлять и антигены грибов в биосубстратах. Тест-системы фирмы Bio-Rad: «Platelia Aspergillus» для диагностики инвазивных микозов — ИФА тест-система, которая основана на выявлении галактоманнанового антигена, ее чувствительность 1 нг / мл; «Platelia Candida Ag+» для диагностики инвазивных микозов — ИФА тест-система, основанная на обнаружении маннанового антитела в сыворотке крови, порог выявления — 0,25 нг / мл.

необходимы недели.

При цитологическом исследовании анализируются как нативные, так и окрашенные препараты. Особенности подготовки проб и наиболее распространенные методики окрашивания детально изложены в соответствующих руководствах по лабораторной диагностике микозов, цитологической диагностике.

На предварительном этапе, как правило, анализируется нативный, т. е. неокрашенный препарат. Подобный способ микроскопического исследования называется методом висячей или раздавленной капли.

В клинических образцах можно обнаружить такие структуры грибов, как споры или гифы, или их сочетание. Однако в нативных препаратах за элементы гриба можно ошибочно принять эпителиальные клетки, растительные волокна, пузырьки воздуха. Так как этот метод менее чувствителен по сравнению с анализом окрашенных препаратов, для более точной диагностики мазки необходимо окрашивать специальными красителями.

Важным этапом диагностики грибковых инфекций является приготовление окрашенных препаратов. В лабораторной диагностике микозов используется как монохромное, так и полихромное окрашивание цитологических мазков. Для оценки микрофлоры применяется монохромная окраска полученного образца метиленовым синим. Использование полихромных смесей азур-эозиновых красителей по Май-Грюнвальд-Гимза, Паппенгейму и т. п. приводит к окрашиванию элементов гриба в синий цвет. Следует отметить, что как при окраске метиленовым синим, так и смесью азура и эозина, элементы гриба характеризуются метахромазией. Диагностическая чувствительность метода при окраске по Папаниколау повышается, если учитывать феномен свечения грибов под действием ультрафиолетового света. Так, чувствительность выявления грибковых инфекций в материале бронхиолоальвеолярного лаважа при изолированном применении окраски по Папаниколау или смеси азура и эозина в модификации по Diff-Quik по данным Raab S. с соавт. составляет 88%.

Применимы также классические микробиологические окраски, адаптированные в зависимости от характера исследуемого материала: PAS-реакция. Окраска уротропином серебра по методу Гомори-Грокотта, муцикармином, по Циллю-Нильсену, по Граму.

При цитологической диагностике микозов наиболее распространены следующие виды окраски.

1. Окраска по Граму. В мазках из клинического материала грибы представлены грамположительными клетками. Следует помнить, что клетки *Cryptococcus neoformans* плохо воспринимают красители, что можно использовать как дифференциальный признак.

2. Обработка 10% едким калием (КОН). Метод используется в первую очередь для визуализации структур возбудителей во фрагментах кожи и ее придатков (ногти, волосы), отделяемом влагалища, в некротических массах из очагов поражения. В указанных образцах содержится большое количество эпителиальных клеток и роговых масс. КОН лизирует кератин и разрушает сопутствующие клеточные элементы, оставляя неизменными клетки грибов. Данная методика пригодна для диагностики поверхностных микозов.

Метод основан на просветлении диагностического материала в растворах 10 — 20% КОН (NaOH).

В материале из волос обычно очень четко видна мантия из окружающих волос спор (эктотрикс) или лежащие внутри волоса (эндотрикс) элементы гриба. Характер поражения волос, как и размеры спор, специфичны для различных видов дерматофитов. Необходима также дифференциальная диагностика между структурами гриба и артефактами.

Возможными источниками ложноположительных результатов являются липоидные капли, пузырьки воздуха, волокна текстиля и так называемый «мозаичный гриб». Липоидные капли могут быть похожи на дрожжевые клетки — такие находки наиболее часты в плохо просветленном материале. Волокна текстиля обычно лежат отдельно от материала эпидермиса, волос или ногтя. Они крупнее, чем гифы гриба, равномерной толщины и не содержат септ. «Мозаичный гриб» - это артефакт, полученный в процессе кристаллизации КОН при чрезмерном нагревании препаратов. В отличие от грибов, в нем не определяется

микобактериями туберкулеза, для обнаружения возбудителей проказы, нокардий и спорообразующих дрожжей.

Преимуществами цитологического метода являются возможность забора материала непосредственно из места поражения, атравматичность при заборе материала, быстрота приготовления стеклопрепаратов, пригодных для анализа. Однако следует помнить, что обнаружение условно патогенных грибов на коже, в ротовой полости, слюне, фекалиях, влагалище, гное, мокроте, промывных водах бронхов не является неоспоримым доказательством микотического процесса. Цитологическое исследование не позволяет выявить взаимодействие возбудителя с тканями, т. е. инвазивность поражения.

Возможность изучения тканевых реакций наряду с обнаружением грибов определяет значимость гистологического исследования в диагностике микозов. Вместе с тем, гистологический метод как способ выявления возбудителя значительно уступает культуральному, особенно если исследованию подлежит биопсийный материал, малый объем которого и низкая концентрация грибов в тканях затрудняют обнаружение последних. Кроме того, не все грибы имеют одинаковое строение в культурах и при своем паразитировании в организме человека или животного. Таким образом, гистологический метод в диагностике микозов не должен подменять культуральный, а дополнять его.

Итак, задачами гистологического исследования являются идентификация возбудителя и определение его взаимоотношений с окружающими тканями (инвазивность поражения). При этом следует помнить, что типы тканевых реакций при микотических поражениях весьма разнообразны и не имеют каких-либо характерных особенностей. Единственной отличительной чертой гистологических изменений при микозах является присутствие самих паразитирующих грибов. На их выявление в тканевых средах и направлено применение специальных методов гистологического исследования. Само исследование осуществляется как в материале биоптатов, так и по операционному и секционному материалу.

Лучше всего окрашиваются срезы ткани, залитой в парафин. Можно изготавливать среды и с нефиксированного материала, используя замораживающий микротом, однако из тонких замороженных срезов клетки грибов могут выпасть. Кроме того, в подобных срезах происходит деформация клеток гриба и ухудшение их красящих свойств. Поэтому исследование замороженных срезов следует проводить лишь в крайних случаях.

Патогенные грибы чаще всего находятся в свежих очагах поражения, в экссудате и очагах некроза, в грануляционной ткани они обнаруживаются значительно реже, а в рубцовой ткани практически не встречаются. Это обстоятельство следует учитывать при вырезке кусочков для гистологического исследования.

При фиксации в проводке тканей слизистых оболочек необходимо сохранить рыхлые наложения на поверхности эпителия, в которых часто встречаются элементы гриба. Фиксация проводится в растворе 10 — 15% нейтрального формалина. Можно использовать и другие фиксирующие жидкости, например, смеси Ценкера и Грама. После соответствующей проводки кусочки заключаются в парафиновые блоки. Затем изготавливаются тонкие (3 — 5 мкм) срезы, которые депарафинируют и окрашивают растворами красителей.

Традиционно на начальном этапе исследования изучаются препараты, окрашенные гематоксилином и эозином. Преимуществом метода является возможность оценки тканевой реакции и распространенности грибковой инфекции, возможность диагностики сопутствующих инфекций.

Элементы грибов, воспринимающие гематоксилин (*Candida*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Penicillium marneffeii*, *Torulopsis glabrata*, *Rhinosporidium seeberi*), становятся синего цвета различной интенсивности. Хорошо окрашиваются плесневые грибы, особенно их массивные скопления. Однако небольшие скопления грибов и единичные клетки окрашиваются плохо, их практически невозможно отличить от тканевых элементов. Псевдогифы *Candida*, гифы *Aspergillus* и *Mucor*, клетки *Cryptococcus neoformans* также часто слабо окрашены, что затрудняет их идентификацию при данной окраске. Изолированное использование гематоксилина и эозина не позволяет

альдегид под воздействием хромовой или периодной кислоты. Соединения альдегидных групп с фуксинсернистой кислотой (PAS-реакция) окрашены в красно-лиловый цвет.

Впервые йодную кислоту для окисления муцинов и мукополисахаридов предложил в 1946 г. MacManus, а в 1948 г. Hotschkiss с успехом применил эту окраску для выявления грибов. После проверочных исследований Lillie методика получила наименование «окраска по Хочкисс — МакМанусу».

Существенным недостатком окраски по Хочкисс — МакМанусу является использование йодной кислоты, которая является очень нестойким соединением и быстро подвергается разложению. Поэтому в нашей стране более распространена окраска на мукополисахариды по А.Л. Шабашу, в которой йодная кислота заменена периодатом калия. Для выявления грибов в срезах тканей эту окраску впервые использовал в 1960 г. А.В. Цинзерлинг. Ее широкое применение значительно улучшило гистологическую диагностику микозов.

Препараты, окрашенные по этой методике, напоминают окрашенные гематоксилином и эозином: ядра клеток темного сине-серого цвета, цитоплазма — бледно-фиолетовая. Грибы рода кандиды, пневмоцисты, токсоплазмы, а также слизь окрашиваются в фиолетово-пурпурный цвет, плесневые грибы и бактерии окрашиваются гематоксилином в сине-серый цвет.

По наблюдениям А.В. Цинзерлинга (1960), достоинством метода является полное выявление грибов рода *Candida*, как живых, так и мертвых (последние окрашиваются немного бледнее) и почти полное отсутствие артефактов при правильно выполненной окраске. Однако по этой методике окрашиваются грибы не всех родов. Недостатком метода является также интенсивное окрашивание тканевых элементов, особенно в очагах некроза. Кроме того, при некотором переокрашивании фуксином, патогенные грибы могут сливаться с основным фоном ткани, который становится красновато-розового цвета.

Более контрастное выявление грибов на фоне окружающих тканей может быть получено при окраске по Гридли.

В результате окраски по Гридли нити грибов, в том числе и грамтрицательных, окрашиваются в темно-голубой цвет, споры — от темно-розового до пурпурного, общий фон препарата — желтый. Лучше всего окрашивается псевдомицелий и стенки эндоспор. Однако по препаратам, окрашенным по методам А.Л. Шабашу и Гридли, нельзя судить о взаимоотношении возбудителя с окружающими тканями, оценивать природную пигментацию гриба.

Следует учитывать, что одновременно с грибами окрашиваются и богатые мукополисахаридами тканевые элементы, а также некоторые бактерии. Поэтому, при использовании этих методик для выявления микозов, необходимо параллельно окрашивать срезы гематоксилином и эозином, чтобы дифференцировать грибы от тканевых элементов.

Для выявления молодых форм грибов, которые не всегда обнаруживаются при PAS-реакции, можно использовать реакцию сульфатирования срезов ткани с последующим окрашиванием толудиновым синим. В основе метода лежит свойство толудинового синего к метахромазии, т.е. его способность окрашивать основное вещество хряща, муции и гранулы тучных клеток в более яркие фиолетовые или красные тона, чем ядра. Оболочки грибов также окрашиваются в красный цвет.

Особенно полезно применение этой окраски при диагностике кокцидиоидоза.

Патогенные грибы в гистологических срезах можно выявить и при импрегнации серебром. Сущность метода заключается в окислении нейтральных мукополисахаридов трехокисью хрома с образованием альдегидных групп и последующей окраской продуктов окисления нитратами серебра в щелочном растворе уротропина. Метод разработан в 1946 г. Gomori и предложен для окраски грибов Grocott. При окраске по Гомори-Гроккоту серебро, выпадая в осадок в месте расположения альдегидов, окрашивает стенки клеток гриба в черно-коричневый цвет. Окружающие ткани окрашиваются слабо.

Считается, что метод Гомори-Грокотта является лучшим для выявления патогенных

		актиномицетов
Окраска по Гомори с доокрашиванием гематоксилином и эозином	Позволяет изучить тканевые реакции и отлично выявляет большинство грибов, в том числе нити актиномицетов. Является безальтернативной, если имеется только один стеклопрепарат, пригодный для исследования. Идеальна для цветного микрофотографирования.	Не позволяют определять природный цвет феоидного гриба
Муциновые красители. Муцикармин. Альциановый голубой	Окрашивают мукополисахариды, содержащиеся в оболочках <i>Cryptococcus neoformans</i> . Используется для отличия <i>Cryptococcus neoformans</i> от других грибов подобного размера и формы	Неспецифична для <i>Cryptococcus neoformans</i> , может окрашивать <i>Rhinosporidium seeberi</i> и некоторые клетки <i>Blastomyces dermatitidis</i>
Модификации окраски по Граму: по Брауну-Брени, по Браун-Хопсу, по МакКоллюму-Гудпастуру	Демонстрируют грамположительные нити <i>Actinomyces</i> spp., <i>Nocardia</i> spp. и других актиномицетов. Используются для выявления сопутствующей бактериальной инфекции. Демонстрируют грамположительные и грамотрицательные бактерии ботриомикозов	Не являются селективной окраской для большинства видов грибов, хотя некоторые из них грамположительны
Модификации окраски по Циль-Нильсену	Используется для выявления <i>Nocardia asteroides</i> , <i>N. brasiliensis</i> и <i>N. otitidiscaviarum</i> . Наибольшее значение имеет для диагностики <i>Mycobacterium tuberculosis</i> и др. микобактерий	<i>Nocardia</i> spp. В тканевых срезах характеризуется слабой кислотоустойчивостью и не спирторезистентны. Стенки клеток грибов и элементы актиномицетов не кислотоустойчивы
Окраска на меланин: модификация окраски по Фонтана-Массону	Окрашивает стенки <i>Cryptococcus neoformans</i> и других <i>Cryptococcus</i> spp. Выявляет меланин и меланиноподобные вещества в слабо пигментированных элементах феогифомикозов	Может окрашивать клеточные стенки <i>Sporothrix schenckii</i> и имитировать сферулы <i>Coccidioides immitis</i>
Отбеливающие вещества	Красят клеточные стенки большинства грибов	Требуют использования люминисцентного микроскопа. Неравномерно окрашивают элементы гриба. Не окрашивают нежизнеспособные дегенеративные элементы гриба

Во избежание ошибок и для проведения успешной дифференциальной диагностики необходимо проводить окраску несколькими способами. Только такой подход позволяет свести до минимума ошибочные заключения. Лучший результат дает параллельное применение следующих четырех методов: окраска гематоксилином и эозином, по Грам-Вейгерту, на полисахариды и по Гомори-Грокотту (в оригинальных прописях или модификациях). Сравнительная характеристика чувствительности этих основных методов выявления грибов

Феогифомикозы и хромомикоз	Гематоксилин и эозин
Первично-патогенные микозы	Методы выявления
Кокцидиомикоз	PAS-реакция + гематоксилин
Гистоплазмоз	Импрегнация по Гомори-Грокотту, окраска по методу Бауэра, окраска по методу Романовского-Гимзы
Североамериканский бластомикоз	PAS-реакция, импрегнация по Гомори-Грокотту
Паракокцидиоидоз	PAS-реакция, импрегнация по Гомори-Грокотту
Адиаспиромикоз	Гематоксилин и эозин, PAS-реакция
Псевдомикозы:	Методы выявления
Актиномикозы	Гематоксилин и эозин, окраска по методу Грам-Вейгерта
Нокардиоз	Окраска по методу Циль-Нильсена, по методу Киньона, по методу Грама

В настоящее время широкое применение получило использование современных платформ для автоматического окрашивания (DakoCytomation, Дания, Ventana Medical Systems Inc., США и т. п.). Они основаны на модифицированных гистохимических методиках, в которых минимизированы необходимые этапы и время пробоподготовки.

Специфическая идентификация возбудителя в материале парафиновых блоков возможна также методом прямой иммунофлюоресценции. Собственная люминисценция грибов невелика, поэтому для их выявления этим методом требуется применение специальных красителей флюорохромов. Обычно применяют акридиновый желтый или акридиновый оранжевый.

Актиномицеты светятся красно-желтым цветом, аспергиллы — зеленым, кандиды — желто-зеленым, криптококки — красным, бластомицеты — желто-зеленым, гистоплазма — красно-желтым, *Coccidioides immitis* — желто-зеленым, возбудитель риноспориоза — красным. Возбудитель нокардиоза не выявляется.

Более специфичными для выявления грибов следует считать флюорохромирование акридиновым оранжевым в сочетании с PAS-реакцией или сульфатированием.

В настоящее время используются и другие флюорохромы. Так, Ruchel R. и др. (2004) проводят модификацию окраски с красителем Blankophor для гистологических препаратов.

При срочном гистологическом исследовании криостатных срезов ориентировочно можно применять окраску 0,1% растворами отбеливающих агентов (Tinopal 5, Hiltamine arctic white, Calcufluor white и др.) с доокрашиванием синькой Эванса и исследованием флуоресценции препаратов на люминесцентном микроскопе (длина волны 500 нм).

В специализированных лабораториях осуществляется иммуногистохимическая идентификация грибов иммунопероксидазным методом на парафиновых средах с использованием моноклональных антител. Разработан ряд коммерческих антител, взаимодействующих с антигенными эпитопами исследуемых грибов и устойчивых к формалиновой фиксации, парафиновой заливке, действию ксилола и этанола. Так, успешно используются антитела к *Cryptococcus neoformans* (Novocastra Laboratories Ltd, Великобритания), *Aspergillus* (DakoCytomation, Дания) и другие.

Список литературы

1. Лисовская С.А. Лабораторная модель для определения адгезивных свойств дрожжеподобных грибов / С.А. Лисовская, Н.И. Глушко, Е.В. Халдеева // Проблемы медицинской микологии. 2006. - Т.8, №3 - С.36-39.
2. Кубанова А.А. Руководство по практической микологии / А.А. Кубанова, Н.С. Потекаев, Н.Н. Потекаев М., 2001.- 144 с.
3. Иммунный статус у больных рубромикозом ногтей /Е.В. Свирщевская и др.// Российский журнал кожных и венерических болезней. 2008. - №2. - С. 43-48.
4. Кабишев К.Э. Фитопрепараты в отечественной дерматологической практике /К.Э. Кабишев// Вестник ВГУ. Серия: Химия, Биология, Фармация 2005. -№.1 - С. 189-204.
5. Капулер О.М. Trichophyton rubrum как возбудитель микозов и онихомикозов стоп: этиологические и клинико-иммунологические особенности: автореф. дис. . мед. наук/ О.М. Капулер Уфа., 2002. - 23с.
6. Кашкин ГТ.Н. Дерматомикозы. Этиология, лабораторная диагностика и эпидемиология / П.Н. Кашкин Л., Медгиз, 1950. - 71с.
7. Клинико-иммунологические корреляции у больных онихомикозом. Сообщение 2 / В.Ю. Васенова и др.// Российский журнал кожных и венерических болезней. 2007. - №6. - С. 51-54.
8. Клинический опыт применения Ирунина в терапии онихомикозов /Новикова Л.А. и др.//Российский журнал кожных и венерических болезней.1 -2005.-№3.-С. 46-47.
9. Короткий Н.Г. Современная наружная терапия дерматозов (с элементами физиотерапии) / Н.Г. Короткий, А.В. Таганов, А.А. Тихомиров/ Под ред. Н.Г. Короткого. — Тверь: «Губернская медицина», 2001. — 528 с.
10. Корсун В.Ф. Фитотерапия кожных болезней / В.Ф. Корсун, А.Е. Ситкевич, Ю.А. Захаров Мн.: Беларусь, 2001. - 446 с.
11. Котрехова Л.П. Сахарный диабет и онихомикоз стоп: этиология, клиника, лечение / Л.П. Котрехова // Клиническая дерматология и венерология. — 2008. -№5.-С.81-85.
12. Крем «Залаин» в терапии микотических поражений кожи / Иванов О.Л. и др. //Российский журнал кожных и венерических болезней. 2005. - №6. - С. 45-57.
13. Кубанов А.А. Результаты многоцентрового скринингового исследования этиологической структуры возбудителей онихомикоза в Российской Федерации /А.А. Кубанов, Н.В. Фриго// Вестник дерматологии и венерологии. 2007. - № 4. - С. 6 - 11.
14. Кубанова А.А. Концепция определения качества жизни в дерматовенерологии /А.А. Кубанова, А.А. Мартынов// Вестник дерматологии и венерологии. 2004. - №4. - С. 16 - 19.