

<https://doi.org/10.34883/PI.2022.11.3.011>
УДК 616.992.282



Казак В.И.✉, Черновецкий М.А., Скоповец Е.Я.

Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии
и иммунологии, Минск, Беларусь

Инвазивные грибковые инфекции: эпидемиология и диагностика (обзор литературы)

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Казак В.И. – обзор литературы; Черновецкий М.А., Скоповец Е.Я. – редактирование.

Подана: 21.07.2022

Принята: 05.09.2022

Контакты: vk250998@gmail.com

Резюме

Грибковые инфекции характеризуются высоким уровнем распространенности среди людей, и их проявления могут быть от легких поверхностных поражений кожи и ногтевых пластин до опасных для жизни оппортунистических инвазивных микозов. Инвазивные грибковые инфекции (ИГИ) характеризуются высокой заболеваемостью и смертностью у пациентов с ослабленным иммунитетом. Среди ИГИ кандидоз продолжает оставаться основной причиной инвазивных грибковых инфекций кроветочка, в то время как аспергиллез и мукомикоз чаще встречаются у онкогематологических пациентов и реципиентов трансплантатов гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), а также внутренних органов. Ранняя диагностика и своевременная противогрибковая профилактика являются ключевыми факторами для предотвращения развития ИГИ. Диагностика микозов представляет собой определенную сложность, поскольку клинические и рентгенологические данные часто неспецифичны; объем образца, необходимый для обеспечения хорошей чувствительности анализа, зачастую бывает недостаточен; культуральные методы имеют ограниченную чувствительность и эффективность; забор материала для проведения гистопатологического исследования может представлять опасность для здоровья и жизни пациентов. Для повышения качества диагностики и терапии грибковых инфекций необходимо использование методов, характеризующихся высокой чувствительностью, специфичностью и не требующих длительного выполнения исследования. Число случаев ИГИ растет, поэтому появление новых высокоэффективных методов диагностики на ранних стадиях инфекции может стать одним из путей снижения уровня заболеваемости и смертности при данных видах инфекций. Цель данного обзора – осветить современные подходы и достижения, связанные с диагностикой инвазивных грибковых инфекций.

Ключевые слова: инвазивные грибковые инфекции, инвазивный кандидоз, инвазивный аспергиллез, мукомикоз, иммуносупрессия

Kazak V.✉, Tchernovetskiy M., Skapavets K.

Republican Scientific and Practical Center of Children's Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

Invasive Fungal Infections: Epidemiology and Diagnosis (Literature Review)

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Kazak V. – literature review; Tchernovetskiy M., Skapavets K. – editing.

Submitted: 21.07.2022

Accepted: 05.09.2022

Contacts: vk250998@gmail.com

Abstract

Fungal infections are highly prevalent in humans and may be manifested from mild superficial skin and nail lesions to life-threatening opportunistic invasive fungal infections. Invasive fungal infections (IFIs) are characterized by high morbidity and mortality in immunocompromised patients. Among IFIs, candidiasis continues to be the main cause of invasive fungal infections of the bloodstream, while aspergillosis and mucormycosis are more common in hematological patients and recipients of hematopoietic stem cell transplants (HSCT), as well as internal organs. Early diagnosis and timely antifungal prophylaxis are key to preventing the development of IFIs. Diagnosis of fungal infections is difficult because clinical and radiological findings are often nonspecific; the sample volume required to provide good assay sensitivity is often insufficient; cultural methods have limited sensitivity and efficiency; the collection of material for histopathological examination can be health- and life-threatening for patients. To improve the quality of diagnosis and therapy of fungal infections, it is necessary to use methods that are characterized by high sensitivity, specificity and do not require long-term study. The number of cases of IFIs is growing, so the emergence of new highly effective diagnostic methods in the early stages of infection can be one of the ways to reduce the incidence and mortality in these types of infections. The purpose of this review is to highlight modern approach and recent advances in the diagnosis of invasive fungal infections.

Keywords: invasive fungal infections, invasive candidiasis, invasive aspergillosis, mucormycosis, immunosuppression

■ ВВЕДЕНИЕ

Грибковые инфекции характеризуются высоким уровнем распространенности среди людей, и их проявления могут быть от легких поверхностных инфекций кожи и ногтей до опасных для жизни оппортунистических инвазивных инфекций [1]. Данным заболеванием страдают около одного миллиарда человек во всем мире с летальным исходом в более чем миллионе случаев [2]. Изменения в спектре грибковых инфекций, связанные с новыми факторами риска и появлением резистентных грибов, подчеркивают необходимость постоянного обновления знаний о диагностике и эпидемиологии грибковых инфекций. Инвазивные грибковые

инфекции (ИГИ) характеризуются высокой заболеваемостью, представляют большую опасность для пациентов с ослабленным иммунитетом, включая пациентов с нейтропенией, вирусом иммунодефицита человека, хронической иммуносупрессией, ожогами и сахарным диабетом, а также пациентов, принимающих антибиотики широкого спектра действия [3]. Другие факторы, влияющие на заболеваемость и смертность пациентов с ИГИ, – это отсутствие ранней диагностики, а также своевременной профилактики и адекватного противогрибкового лечения [4, 5].

Надлежащая диагностика грибковых инфекций имеет решающее значение в связи с высокими показателями заболеваемости и смертности, а также значительным экономическим бременем, связанным с лечением этих заболеваний. Распознавание ИГИ и дифференциация от других инфекций с аналогичными клиническими проявлениями представляют определенную сложность, что может привести к диагностической ошибке, которая не только повлияет на состояние здоровья отдельных пациентов, но и повлечет за собой нерациональное использование противогрибковых препаратов и рост лекарственной устойчивости к ним. Таким образом, существует потребность в улучшении диагностического тестирования и лечения микозов [6].

■ ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

Эпидемиология грибковых инфекций постоянно меняется, что имеет большое значение для их диагностики и лечения. Число этих инфекций остается достаточно высоким, особенно у новорожденных, пациентов отделения интенсивной терапии (ОИТ), лиц с внутривенными катетерами, реципиентов трансплантатов органов и тканей, людей, получающих различные виды иммунодепрессантов или противоопухолевой химиотерапии. Возбудители ИГИ попадают в организм ингаляционным и контактно-бытовым путями, при приеме воды и пищи, а также при медицинских манипуляциях (различные виды инъекций, катетеризация сосудов и полостей организма).

Большинство грибов (микромикетов) рода *Candida* существуют в качестве сапрофитов на коже, в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) и в области гениталий; выявляются при посевах со слизистой оболочки ЖКТ у 30–50% здоровых людей и со слизистой оболочки гениталий у 20–30% здоровых женщин. Но в условиях повреждения цитостатическими препаратами колонизированные микромикетами слизистые оболочки ЖКТ и мочевыводящих путей иммунокомпрометированных пациентов могут стать источником диссеминации микрофлоры и привести к развитию тяжелой грибковой инфекции [7].

Инвазивный кандидоз (ИК) продолжает оставаться наиболее частой причиной ИГИ, но наблюдается выраженный этиологический переход от *Candida albicans* к другим видам *Candida*, таким как *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, или полирезистентным видам *Candida auris*, что обусловлено широким применением противогрибковой профилактики с использованием лекарственных препаратов группы азолов [8]. По меньшей мере 17 видов рода *Candida* вызывают заболевания человека, но более 95% инвазивных заболеваний вызываются пятью основными патогенами: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* и *C. krusei* [9].

Инвазивный аспергиллез (ИА) чаще встречается у онкогематологических пациентов и реципиентов после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) [10]. Было выявлено, что для реципиентов трансплантатов солидных органов основной причиной инфекций являются грибы рода *Candida* (53%). Удельный вес

других грибов существенно ниже: *Aspergillus* spp. – 19%, *Mucormycosis* – 2%. В то же время для реципиентов ТГСК характерно другое распределение микромицетов: *Aspergillus* spp. – 43%, *Candida* spp. – 28%, *Mucormycosis* – 8%. Частота возникновения инвазивного аспергиллеза у реципиентов аллогенной ТГСК выше, чем у реципиентов аутологичной ТГСК (15% против 2%) [11].

Большинство изолятов *Aspergillus* spp., вызывающих инвазивный аспергиллез, часто относятся к *Aspergillus fumigatus*, с уровнем выделения до 92%, за которым следуют *A. favus*, *A. niger* и *A. terreus* [12]. После *Aspergillus* spp. грибы родов *Rhizopus* и *Mucor* являются следующими наиболее распространенными возбудителями у пациентов с гематологическими злокачественными новообразованиями, реципиентов ТГСК и трансплантатов паренхиматозных органов. Кроме того, инфекции, вызванные данными патогенами, все чаще выявляются у лиц с сахарным диабетом, а также в результате перенесенных травм или ятрогенных повреждений [13]. Наиболее часто встречаемые патогены рода *Rhizopus* – *R. microsporus*, *R. stolonifer*, *R. oryzae* [14], а среди грибов рода *Mucor* преобладают *M. ramosissimus*, *M. circinelloides*, *M. indicus* [15].

Существует ряд этиологических отличий в возникновении ИГИ в учреждениях здравоохранения различных регионов мира, связанных с множеством факторов: образ жизни; вид основного заболевания; уровень диагностики и качество оказания медицинской помощи, и в частности хирургических услуг. Смертность при инвазивных микозах остается высокой и варьирует от 30% при инвазивном кандидозе до 90–100% при некоторых клинических формах мукормикоза [8].

■ ДИАГНОСТИКА

Ранняя диагностика и своевременная противогрибковая профилактика являются ключевыми факторами для предотвращения развития инфекций, вызванных патогенными грибами. Диагностика ИГИ является сложной, поскольку клинические и рентгенологические данные часто неспецифичны; объем образца, необходимый для обеспечения хорошей чувствительности, зачастую бывает недостаточен; культуральные методы имеют ограниченную чувствительность и эффективность; забор материала для проведения гистопатологического исследования может представлять опасность для здоровья и жизни пациентов. Недавно внедренные молекулярные и серологические методы анализа, направленные, соответственно, на выявление дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) грибов, а также на определение антигена галактоманнана (GMN) и 1,3-β-D-глюкана (BDG), позволили значительно улучшить диагностику ИГИ [16].

Микроскопия, культуральные методы

Микроскопия в сочетании с традиционными культуральными методами диагностики грибковых инфекций считается «золотым стандартом» диагностики данного вида патологии человека [17].

Микроскопия нативного и гистологически обработанного материала представляет собой быстрый, доступный и относительно экономичный метод диагностики. Прямое исследование нативного биоматериала подразумевает использование различных красителей для проведения световой, фазово-контрастной и люминесцентной микроскопии. Положительный результат прямой микроскопии дрожжевых

клеток или филаментозных структур из стерильных локусов следует считать значимым, даже если лаборатория не имеет возможности последующего культивирования грибковой микрофлоры. Чувствительность метода микроскопии невысока, и не всегда возможна видовая идентификация грибов, так как некоторые грибы имеют сходные морфологические характеристики.

Гистопатологическое исследование (ГИ) помогает дифференцировать разные виды плесени с точностью до 80% и требует микробиологического посева для их подтверждения [16]. Терапия микозов определяется чувствительностью изолятов к противогрибковым препаратам. ГИ является целесообразным в диагностике инвазивного аспергиллеза легких, но из-за риска кровотечения и других осложнений во время инвазивного метода исследования не всегда есть возможность выполнения биопсии ткани легкого [18].

Эффективность микроскопии зависит от типа биоматериала, источника и качества исследуемого образца, а также от опыта микробиолога. Следовательно, микроскопическое исследование может быть менее чувствительным, чем посев, поэтому отрицательный результат не исключает наличия грибковой инфекции.

Культуральное микробиологическое исследование представляет собой выделение культуры (штаммов) возбудителя из биоматериала. Проведение гемокультурального анализа принято считать эталоном данного метода диагностики, при этом частота выявления микромицетов в крови колеблется в диапазоне от 21 до 71% (наиболее низкие показатели – у детей и новорожденных) [16]. Требующее продолжительного времени, микробиологическое выделение штаммов грибов на питательных средах не является оптимальным для ранней диагностики инвазивных микозов. Более чем у трети пациентов с кандидозом гемокультура негативна, а в случаях наличия роста микромицетов последующая видовая идентификация не всегда возможна в течение 48–72 часов. В результате посева крови при диссеминированном кандидозе можно пропустить $\geq 50\%$ пациентов с документально подтвержденным заболеванием, что может повлечь за собой позднее назначение адекватного лечения.

На отрицательные результаты посева крови при кандидозе могут повлиять несколько факторов: низкое количество клеток *Candida* spp.; внутриклеточная абсорбция *Candida* spp. в лейкоцитах; сниженное количество крови, взятой в каждой пробе (особенно у детей младшего возраста и новорожденных); профилактическое применение антимикотиков или проведение эмпирической противогрибковой терапии. При инвазивном аспергиллезе выявление грибковых гемокультур имеет место в единичных случаях. Обнаружение таких мицелиальных грибов, как *Rhizopus* spp. и *Mucor* spp., чаще происходит при микроскопии исследуемых субстратов, реже – при посеве биоматериала. Возбудитель очень редко выделяют в посевах крови даже при диссеминированном мукормикозе.

Проведение культурального исследования биоматериала при инвазивных микозах требует определенных временных параметров – от 1–5 суток до появления роста гемокультур во флаконе с биоматериалом в случае дрожжевой микрофлоры до 4–7 и более суток при наличии плесневых микромицетов. Последующая видовая идентификация грибов занимает еще 1–2 суток при дрожжевой и около 4–7 суток – при плесневой микрофлоре. В некоторых случаях выделения так называемых медленно растущих микромицетов длительность инкубирования нативного материала может превышать 2–3 недели.

Несмотря на ограниченную чувствительность, культуральные методы диагностики грибковых инфекций остаются одними из основных методов диагностики и лечения микозов, поскольку позволяют выявить этиологию на уровне рода и вида и дают возможность определения чувствительности грибов к антимикотическим препаратам [19].

Серологические методы

К серологическим методам диагностики инвазивных грибковых инфекций относят определение грибковых антигенов, входящих в состав стенки гриба, а также соответствующих специфических антител, которые впоследствии используют для скрининга бессимптомных пациентов из группы высокого риска и для диагностики пациентов с симптомами. Среди грибковых антигенов выделяют:

■ 1,3-β-D-глюкан.

1,3-β-D-глюкан (BDG) является компонентом внешней клеточной стенки грибов, включая грибы родов *Candida* и *Aspergillus*, и этот компонент выделяется в кровоток при ИГИ [20]. Однако BDG отсутствует у пациентов с мукормикозом, поскольку грибы, вызывающие это заболевание, не продуцируют данный полисахарид. При клиническом применении методы измерения 1,3-β-D-глюкана дают информацию, аналогичную той, что получают с помощью других тестов на обнаружение антигена, но не позволяют различать грибы (например, *Aspergillus* или *Candida*). Дополнительные ограничения теста на уровень BDG связаны с интерференцией с β-глюканами, встречающимися в разных инфузионных жидкостях, пищевых продуктах и других биологических материалах. Исследования с использованием различных модификаций BDG показали чувствительность теста в диапазоне 55–100% при специфичности в 87–93%, положительном прогностическом значении (PPV) 40–84% и отрицательном прогностическом значении (NPV) 75–100% [21]. Из-за различий в диагностической чувствительности и специфичности, трудоемкости проведения анализа и стоимости исследования изолированное тестирование уровня BDG не является на сегодняшний день рекомендуемым исследованием для диагностики ИГИ [22]. Однако его применение может быть эффективно либо в качестве дополнения к другим диагностическим методам, либо в качестве косвенного параметра для мониторинга инвазивных грибковых инфекций [16];

■ галактоманнан.

Галактоманнан (GMN) представляет собой полисахарид, который состоит из основной цепи маннозы и различного количества боковых цепей галактофурана и составляет основную часть клеточной стенки грибов рода *Aspergillus*. Галактоманнанный тест совместно с клиническими и радиологическими исследованиями дополняет диагностику инвазивного аспергиллеза. Определение диагностически значимого уровня (индекса) галактоманнана в сыворотке крови и бронхоальвеолярном содержимом у онкогематологических пациентов свидетельствует о вероятном ИА. Концентрация циркулирующего галактоманнана коррелирует с наличием очагов в легких и смертностью. Данный показатель отражает также степень поражения органов и тканей, поэтому может использоваться для контроля эффективности противогрибковой терапии [23]. Однако GMN не является исключительно специфичным для грибов рода *Aspergillus*, так как описана перекрестная реактивность с полисахаридами других плесневых грибов, таких как, например, *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. Как следствие

этого, требуется проведение (в качестве подтверждения) выделения возбудителя с последующей родовой и при возможности видовой идентификацией. Другой причиной так называемого ложноположительного результата диагностики ИА путем выявления GMN в исследуемом биоматериале может быть присутствие в анализируемом образце экзогенно продуцируемого галактоманнана, который может попасть в организм человека в составе некоторых препаратов, например, в виде β -лактамных антибиотиков (таких как пиперацillin/тазобактам или амоксициллин/клавуланат), при производстве которых имеет место этап ферментации исходного сырья с использованием *Aspergillus niger* или *Aspergillus terreus* [24]. Измерение уровня галактоманнана можно проводить различными методами, при этом преимущественно используется иммуноферментный анализ (ИФА), характеризующийся более высокой чувствительностью по сравнению с альтернативно применяемым иммунохроматографическим методом диагностики. В отдельных исследованиях было показано, что, с учетом используемых пороговых значений и групп пациентов, чувствительность ИФА GMN может колебаться в диапазоне от 65 до 97% при варьировании специфичности от 78 до 100% [25];

- маннанный антиген (Mn) и антиманновое антитело (a-Mn).

Комбинацию тестирования на наличие маннанового антигена и антиманновых антител (Mn/a-Mn) принято считать перспективным подходом в части диагностики инвазивных инфекций, вызванных преимущественно грибами *Candida albicans* [26]. К настоящему времени имеются соответствующие коммерческие тест-системы на основе реакции непрямой иммунофлуоресценции. Данный тест является одним из применяемых методов диагностики инвазивного кандидоза у реципиентов ТГСК, трансплантации внутренних органов и тканей, а также пациентов отделений интенсивной терапии. У пациентов с ИГИ, обусловленными другими видами грибов рода *Candida* (*C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii* и *C. krusei*), результаты могут быть также положительными, хотя диагностическое значение индекса оптической плотности ниже, чем при кандидозе, вызванном *C. albicans*. Данный метод может применяться для мониторинга течения инфекции у пациентов с соответствующим инвазивным кандидозом, вызванным отдельными видами кандид, так как индексы оптической плотности имеют тенденцию к снижению на фоне адекватной противогрибковой терапии. Обнаружение маннанового антигена может быть эффективно в сыворотке крови при гепатолиенальном кандидозе и кандидозном менингите, при которых гемокультура редко бывает положительной [27]. Диагностическая чувствительность и специфичность теста определения комбинации Mn/a-Mn составляют 83% и 86% соответственно. Диагностическая чувствительность зависит от видоспецифичности *Candida* spp. Например, данный показатель составляет 100% при *Candida albicans*, 50% при *Candida krusei* и лишь 40% при *Candida parapsilosis* [28]. В настоящее время применение этого анализа ограничено из-за ряда недостатков, таких как кратковременное содержание *Candida* Mn в сыворотке крови и наличие ложноположительных результатов в части диагностики инвазивных кандидозов, обусловленных частой колонизацией кандидами различных локусов организма человека [29].

Молекулярно-генетические методы идентификации ИГИ

Общеизвестно, что традиционные методы диагностики инвазивных грибковых заболеваний являются затратными по времени. В связи с этим значительно сокращенный временной параметр выдачи результата исследования, достигаемый

с помощью молекулярных методов исследований, имеет существенное значение, особенно в условиях оказания неотложной медицинской помощи. В отличие от преимущественно субъективных по своей сути классических микробиологических методов диагностики (включая микроскопию нативного, культурально выделенного, а также гистологически обработанного биологического материала), молекулярно-генетические исследования являются объективными, высокочувствительными и эффективными, а также требуют меньшего количества исследуемого материала и времени. На сегодняшний день уже доступны для использования ряд специфических диагностикумов, предназначенных для обнаружения одного или нескольких грибковых патогенов методом амплификационного анализа в варианте полимеразной цепной реакции (ПЦР) [30].

ПЦР является центральным компонентом многих молекулярных методов исследования в качестве основного диагностического подхода либо в качестве одного из предварительных этапов анализа. Данный метод позволяет идентифицировать ДНК патогенов, вызывающих ИГИ, из крови, сыворотки, плазмы, мочи, кала, мокроты и других биологических жидкостей человека. Специфический характер реакции ПЦР позволяет использовать ее непосредственно на клинических образцах, содержащих большое количество нуклеиновой кислоты хозяина, без получения чистых культур грибов *in vitro*. Ограничением использования метода ПЦР для диагностики ИГИ является обычно низкое количество грибковой ДНК в клинических образцах по сравнению с вирусной или бактериальной нагрузкой. Более чувствительным методом определения ИГИ является количественная ПЦР в режиме реального времени, где приборы графически отображают результат в режиме реального времени по мере прохождения циклов амплификации. Выход обычно обнаруживается с помощью детекции флуоресценции ДНК патогенов, которая может быть достигнута благодаря добавлению в реакцию зонда, специфичного для целевой последовательности ДНК в ампликоне. Для создания мультиплексных реакций, с помощью которых возможно детектировать одновременно несколько патогенов, необходимо использовать несколько зондов [31].

Использование видо- или родоспецифичной ПЦР-реакции направлено на определение узкого спектра патогенов и может применяться только в случае присутствия доказательств наличия инфекции, вызванной определенным патогеном или их группой. В свою очередь, использование пангрибковой ПЦР в режиме реального времени позволяет неспецифически обнаруживать и количественно определять всю ДНК грибов, присутствующую в клиническом образце. Благодаря широкому спектру праймеров и зондов анализ позволяет обнаруживать все грибковые патогены. Этот подход позволяет идентифицировать редко встречающиеся патогены и обнаруживать некультивируемые или даже неизвестные возбудители грибкового происхождения. Для выявления патогенов, не включенных в набор специфических тестов, или в случаях, когда клинические данные не помогают сузить число возможных патогенов, пангрибковая ПЦР используется для постановки верифицированного диагноза [32].

Методы определения ДНК с помощью пангрибковой ПЦР обычно предполагают использование в качестве мишени рибосомальной ДНК (рДНК) грибов. Гены рРНК грибов организованы как повторяющаяся единица, структурно состоят из последовательности, кодирующей 18S рРНК (для малой субъединицы рибосомы),



Последовательность ДНК, кодирующая рибосомальные РНК грибов
DNA sequence encoding fungal ribosomal RNA

внутреннего транскрибируемого спейсера 1 (ITS1), последовательности, кодирующей 5.8S рРНК, внутреннего транскрибируемого спейсера 2 (ITS2), последовательности, кодирующей 28S рРНК (для большой субъединицы рибосомы), межгенной последовательности 1 (IGS1), последовательности, кодирующей 5S рРНК, и межгенной последовательности 2 (IGS2). Последовательности 18S, ITS1, 5.8S, ITS2 и 28S транскрибируются как одна РНК, которая затем подвергается сплайсингу для удаления областей ITS1 и ITS2 для сборки с 5S рРНК в полную рибосому, состоящую из 18S, 5.8S, 28S, 5S и различных белков. Области ITS1 и ITS2 составляют последовательность ITS, длина которой обычно составляет ~600 пар нуклеотидов (п. н.). Область D1/D2 имеет одинаковую длину. Сайты прайминга для ПЦР показаны черными стрелками и могут использоваться в различных комбинациях. Последовательность 5S транскрибируется отдельно и окружена двумя участками IGS, которые могут быть очень информативными, однако они сильно различаются по размеру, что затрудняет амплификацию с помощью ПЦР (см. рисунок) [33].

Использование видоспецифичной ПЦР позволяет быстро обнаруживать патогены и провести их количественную оценку, «пангрибковые» методы могут обнаруживать широкий спектр видов грибов, но данные методы трудоемки (результаты обычно доступны в течение 2–3 дней) и требуют пост-ПЦР-анализа, обычно секвенирования и анализа последовательностей *in silico* для точной идентификации. К тому же использование «пангрибковых» методов ограничено ложноположительными результатами из-за загрязнения ДНК грибов (в окружающей среде или в лаборатории). Загрязнение образца может происходить во время его сбора или во время обработки образца на этапе предварительного секвенирования [34].

Секвенирование

Идентификация грибов на основе секвенирования ДНК – это еще один метод молекулярной идентификации грибковых патогенов. Данный диагностический подход широко используется в настоящее время благодаря большому количеству необходимой общедоступной информации о последовательностях рДНК грибов, содержащейся в ряде баз данных, таких как GenBank, UNITE и Bold. Полученная в результате проведения молекулярно-генетических исследований информация обрабатывается с применением штрихкодирования и меташтрихкодирования.

Молекулярные данные ITS-региона последовательности ДНК грибов являются основным генетическим маркером; более 1 000 000 полноразмерных последовательностей ДНК ITS-регионов грибов, полученных по Сэнгеру, доступны для справки в базах данных последовательностей ДНК [35].

Хотя секвенирование представляет собой точный метод идентификации ИГИ, всегда существует вероятность получения ложных результатов вследствие непреднамеренных ошибок на преаналитических и аналитических этапах. В частности, загрязнение исследуемого образца биоматериала комменсальными грибами на стадии отбора может привести к получению ложноположительного результата. Следует избегать тестирования образцов из нестерильных источников, а результаты секвенирования грибковой ПЦР всегда должны коррелировать с клиническими и гистопатологическими данными. При выявлении необычных или менее распространенных патогенов ИГИ следует повторить весь анализ с новой ДНК, чтобы обеспечить воспроизводимость результатов. Точность идентификации патогена с помощью секвенирования также зависит от наличия доступа к базе данных последовательностей, которая содержит точные и полные образцы таксономии грибов. Общедоступные базы данных могут содержать ошибочные записи или неполную выборку таксонов грибов, вызывающих заболевания, что приводит к неправильной идентификации редких грибов. Наконец, такие области, как, например, ITS2 и D2, не позволяют идентифицировать все грибы на уровне видов. Таким образом, для точной идентификации определенных грибов необходим анализ последовательности альтернативных генов [36].

Быстро развивающейся альтернативой секвенированию рДНК является полногеномное секвенирование (WGS). Ценность WGS не ограничивается простой идентификацией. WGS может предоставить эпидемиологическую информацию о каждом штамме и потенциальной лекарственной устойчивости [37–39]. На сегодняшний день данная технология продолжает оставаться финансово затратной, требует длительного времени для своего проведения и не является целесообразной для рутинного использования в большинстве клинических микробиологических лабораторий.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Этиология и эпидемиология инвазивных грибковых инфекций у лиц, особенно с ослабленным иммунитетом, изменились за последние несколько десятилетий. Преимущественно это связано с более широким и не всегда рациональным применением антибиотиков при лечении бактериальных инфекций, а также профилактическим использованием антимикотических препаратов для предотвращения инвазивных микозов. При этом основные факторы риска грибковых инфекций в основном остались неизменными и включают в себя длительную нейтропению, иммуносупрессию, онкогематологическую патологию, трансплантацию органов и тканей, проведение хирургических манипуляций (включая оперативные вмешательства и катетеризацию сосудов и полостей).

Ранняя диагностика и адекватная терапия достоверно улучшают показатели выживаемости пациентов с инвазивными грибковыми инфекциями. Улучшения в диагностике и терапии грибковых инфекций требуют как более быстрых, чувствительных и специфичных подходов в диагностике, так и повышенного внимания к применению противогрибковой терапии. Профилактическое и лечебное применение антимикотиков в определенной мере сопряжено с риском развития резистентности грибковой микрофлоры, повышением уровня токсичности и неблагоприятными лекарственными взаимодействиями, увеличением соответствующих финансовых затрат.

С учетом тенденции к постоянному росту числа грибковых инфекций, совершенствование и внедрение комплексного диагностического подхода на ранних стадиях развития заболевания является одним из путей уменьшения последствий заболеваемости и снижения смертности при инвазивных микозах.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Pathakumaria B., Lianga G., Liua W. Immune defense to invasive fungal infections: A comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020;130(165):110550. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110550>
2. Lass-Flörl C., Samardzic E., Knoll M. Serology anno 2021 – fungal infections: from invasive to chronic. *Clinical Microbiology and Infection*. 2021;27(9). Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.02.005>
3. Sanguinetti M., Posteraro B., Beigelman-Aubry C. Diagnosis and treatment of invasive fungal infections: looking ahead. *J Antimicrob Chemother*. 2019;74(2):27–37. doi: 10.1093/jac/dkz041
4. Jenks J.D., Cornely A.O. Breakthrough invasive fungal infections: Who is at risk? *Mycoses*. 2020;63(10):1021–1032. doi: 10.1111/myc.13148
5. Palash S., Singh N. Complications of invasive mycoses in organ transplant recipients. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2016;14(12). doi: 10.1080/14787210.2016.1242412
6. Terrero-Salcedo D., Powers-Fletcher M.V. Updates in Laboratory Diagnostics for Invasive Fungal Infections. *J Clin Microbiol*. 2020;58(6):e01487–19. doi: 10.1128/JCM.01487-19
7. Hsu L.Y., Lee D.G., Yeh S.P. Epidemiology of invasive fungal diseases among patients with haematological disorders in the Asia-Pacific: a prospective observational study. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(6):594.e7–11. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.02.019>
8. Quindós G. Epidemiology of invasive mycoses: A landscape in continuous change. *Rev Iberoam Micol*. 2018;35(4):171–178. doi: 10.1016/j.riam.2018.07.002
9. Gonzalez-Lara M.F., Ostrosky-Zeichner L. Invasive Candidiasis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2020;41(1):3–12. doi: 10.1055/s-0040-1701215
10. Schmiedel Y., Zimmerli S. Common invasive fungal diseases: an overview of invasive candidiasis, aspergillosis, cryptococcosis, and Pneumocystis pneumonia. *Swiss Med Wkly*. 2016;146:w14281. doi: 10.4414/smw.2016.14281
11. Brown G.D., Denning D.W. Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med*. 2012;4(165):165rv13.
12. Enoch A.D., Yang H., Aliyu S.H. The Changing Epidemiology of Invasive Fungal Infections. *Methods in molecular biology*. 2017;1508:17–65. doi: 10.1007/978-1-4939-6515-1_2
13. Jeong W., Keighley C., Wolfe R. The epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis: a systematic review and meta-analysis of case reports. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(1):26–34. doi: 10.1016/j.cmi.2018.07.011
14. Gryganskyi A.P., Golan J., Dolatabadi S. Phylogenetic and Phylogenomic Definition of *Rhizopus* Species. *G3 (Bethesda)*. 2018;8(6):2007–2018. doi: 10.1534/g3.118.200235
15. Li E., Rodriguez A., Luong A.U. The immune response to airway mycosis. *Curr Opin Microbiol*. 2021;62:45–50. doi: 10.1016/j.mib.2021.04.009
16. Seth R., Xess I., Jana M. Diagnosis of Invasive Fungal Infections in Children. *Indian Pediatr*. 2019;56(3):229–236.
17. Otašević S., Momčilović S., Stojanović N.M. Non-culture based assays for the detection of fungal pathogens. *J Mycol Med*. 2018;28(2):236–248. doi: 10.1016/j.jmycmed.2018.03.001
18. Prattes J., Flick H., Prüller F. Novel Tests for Diagnosis of Invasive Aspergillosis in Patients with Underlying Respiratory Diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2014;190(8):922–929.
19. Zhu A., Zembower T., Qi C. Molecular detection, not extended culture incubation, contributes to diagnosis of fungal infection. *BMC Infect Dis*. 2021;21(1):1159. doi: 10.1186/s12879-021-06838-6
20. Shabaana A.E., Elbaz L.M., El-Emshatcy W.M. Role of serum 1,3β-d-glucan assay in early diagnosis of invasive fungal infections in a neonatal intensive care unit. *J Pediatr (Rio J)*. 2018;94(5):559–565. doi: 10.1016/j.jped.2017.07.020
21. Ruhnke M., Behre G., Buchheidt D. Diagnosis of invasive fungal diseases in haematology and oncology: 2018 update of the recommendations of the infectious diseases working party of the German society for hematology and medical oncology (AGIHO). *Mycoses*. 2018;61(11):796–813. doi: 10.1111/myc.12838
22. Vehreschild J.J., Koehler P., Lamoth F. Future challenges and chances in the diagnosis and management of invasive mould infections in cancer patients. *Med Mycol*. 2021;59(1):93–101. doi: 10.1093/mmy/myaa079
23. Chong G.M., Maertens J.A. Diagnostic Performance of Galactomannan Antigen Testing in Cerebrospinal Fluid. *J Clin Microbiol*. 2016;54(2):428–31. doi: 10.1128/JCM.02913-15
24. Mercier T., Castagnola E., Marr K.A. Defining Galactomannan Positivity in the Updated EORTC/MSGERC Consensus Definitions of Invasive Fungal Diseases. *Clin Infect Dis*. 2021;72(2):89–94. doi: 10.1093/cid/ciaa1786
25. Melancon C.C., Lindsey J., Russell G.B. The role of galactomannan Aspergillus antigen in diagnosing acute invasive fungal sinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2019;9(1):60–66. doi: 10.1002/alr.22225
26. Duettmann W., Koidl C., Krause R. Specificity of mannan antigen and anti-mannan antibody screening in patients with haematological malignancies at risk for fungal infection. *Mycoses*. 2016;59(6):374–8. doi: 10.1111/myc.12482
27. Kumar J., Singh A., Seth R. Prevalence and predictors of invasive fungal infections in children with persistent febrile neutropenia treated for acute leukemia – A prospective study. *Indian J Pediatr*. 2018;85(12):1090–1095. doi: 10.1007/s12098-018-2722-0
28. Warris A., Lehrnbeher T. Progress in the Diagnosis of Invasive Fungal disease in Children. *Curr Fungal Infect Rep*. 2017;11(2):35–44. doi: 10.1007/s12281-017-0274-9
29. Wang K., Luo Y., Zhang W. Diagnostic value of Candida mannan antigen and anti-mannan IgG and IgM antibodies for Candida infection. *Mycoses*. 2020;63(2):181–188. doi: 10.1111/myc.13035
30. Rath P.M., Steinmann J. Overview of Commercially Available PCR Assays for the Detection of Aspergillus spp. DNA in Patient Samples. *Front Microbiol*. 2018;9:740. doi: 10.3389/fmicb.2018.00740
31. Douglas A.P., Chen S.C., Slavin M.A. Emerging infections caused by non-Aspergillus filamentous fungi. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22(8):670–80. doi: 10.1016/j.cmi.2016.01.011

32. Camp I., Manhart G., Schabereiter-Gurtner C. Clinical evaluation of an in-house panfungal real-time PCR assay for the detection of fungal pathogens. *Infection*. 2020;48(3):345–355. doi: 10.1007/s15010-020-01395-7
33. Meason-Smith C., Edwards E.E., Older C.E. Panfungal Polymerase Chain Reaction for Identification of Fungal Pathogens in Formalin-Fixed Animal Tissues. *Vet Pathol*. 2017;54(4):640–648. doi: 10.1177/0300985817698207
34. Ricna D., Lengerova M., Bezdicek M. Detection and identification of fungi in bronchoalveolar lavage fluid from immunocompromised patients using panfungal PCR. *Folia Microbiol (Praha)*. 2019;64(3):421–428. doi: 10.1007/s12223-018-00669-w
35. Nilsson R.H., Larsson K.-H., Taylor F.S. The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D259–D264. doi: 10.1093/nar/gky1022
36. Gomez C.A., Budvytiene I., Zemek A.J. Performance of Targeted Fungal Sequencing for Culture-Independent Diagnosis of Invasive Fungal Disease. *Clin Infect Dis*. 2017;65(12):2035–2041. doi: 10.1093/cid/cix728
37. Mohanta T.K., Bae H. The diversity of fungal genome. *Biol Proced Online*. 2015;17:8. doi: 10.1186/s12575-015-0020-z
38. Ostrosky-Zeichner L. Invasive mycoses: diagnostic challenges. *Am J Med*. 2012;125(1):14–24. doi: 10.1016/j.amjmed.2011.10.008
39. Kim S.H., Choi J.K., Cho S.Y. Risk factors and clinical outcomes of breakthrough yeast bloodstream infections in patients with hematological malignancies in the era of newer antifungal agents. *Medical Mycology*. 2018;56:197–206. doi: 10.1093/mmy/myx038