



Черновецкий М.А.

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

Лабораторная диагностика инвазивных микозов и этиологическая структура грибковой микрофлоры, выделенной из клинически значимых видов биологического материала у детей с онкогематологической патологией

Конфликт интересов: не заявлен.

Подана: 30.03.2023

Принята: 12.09.2023

Контакты: tchernovetski@mail.ru

Резюме

Введение. Несмотря на определенные успехи в диагностике, лечении и профилактике инвазивных микозов, они продолжают оставаться одной из актуальных проблем как отечественного, так и зарубежного здравоохранения. Немаловажную роль в этом играют широкое и не всегда рациональное применение антибиотиков, цитостатических и стероидных препаратов, нарушения иммунитета, широкое внедрение инвазивных способов оказания медицинской помощи. Особое значение инвазивные микозы имеют в качестве сопутствующей инфекции у иммунокомпрометированных лиц на фоне основной онкологической и гематологической патологии. У данной группы пациентов нередко наблюдается тяжелое клиническое течение грибковых заболеваний с уровнем летальности в отдельных случаях до 75%. При проведении лабораторной диагностики инвазивных микозов используются различные диагностические подходы, включая: классический микробиологический посев различных видов биологического материала; применение автоматизированных систем индикации и идентификации грибковой микрофлоры, а также выявления ее чувствительности к противогрибковым препаратам; использование масс-спектрометрического и молекулярно-биологического анализа; определение уровней биологических маркеров; проведение патоморфологических исследований биоптатов органов и тканей.

Цель. Основанная на анализе сведений о современных технологиях микробиологического исследования оценка результатов лабораторной диагностики сопутствующих инвазивных микозов у детей с наиболее распространенными онкологическими и гематологическими заболеваниями, находившихся на лечении в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии, а также установление этиологической структуры выделенной из различного клинического материала грибковой микрофлоры.

Материалы и методы. Выделение возбудителей инвазивных микозов (микроспоров) из образцов клинически значимого биологического материала производилось



с использованием микробиологического посева в жидкие (гемафлаконы) и на твердые питательные среды с последующей родовой и видовой идентификацией в ходе применения фенотипического, биохимического, масс-спектрометрического и молекулярно-биологического методов лабораторной диагностики грибковых инфекций. В качестве клинически значимого биологического материала использовались образцы периферической венозной крови, мочи, жидкостей дыхательной системы в виде бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) и трахеобронхиального дренажа (ТБД), биоптатов легких. Биоматериал был получен от детей с сопутствующими инфекционными осложнениями на фоне основной онкогематологической патологии.

Результаты. В общей сложности в течение анализируемого периода (с 2002 по 2022 год) выделено 604 штамма микромицетов: 219 штаммов из крови, 273 штамма из дыхательной системы и 112 штаммов из мочи (с учетом выявления микромицетов в количестве ≥ 1000 КОЕ/мл и включая 22 штамма при состоянии фунгурии). Основным видом выделенной микрофлоры являлись дрожжевые грибы – от 69,23% (189 из 273 культур) в содержимом БАЛ, ТБД и биоптатах легких до 90,87% (199 из 219 культур) в периферической крови. В свою очередь, среди дрожжевых грибов преобладали представители рода *Candida* (18 идентифицированных видов микроорганизмов). При этом наиболее часто из крови выделялись *Candida parapsilosis* (22,83%, 50 из 219 культур) и *Candida guilliermondii* (21,92%, 48 из 219 культур). Основными грибковыми патогенами, выделенными из дыхательной системы и мочи, были соответственно *Candida albicans* – 30,04% (82 из 273 культур) и *Candida glabrata* – 36,36% (8 из 22 культур при состоянии фунгурии). Совокупный удельный вес мицелиальной микрофлоры колебался в диапазоне от 9,13% (20 из 219 культур) в крови (с преобладанием *Fusarium* spp. – 9 культур) до 30,77% (84 из 273 культур) в дыхательной системе (с преобладанием *Aspergillus fumigatus* – 31 культура и *Aspergillus flavus* – 14 культур). В свою очередь, основные возбудители мукормикозов (*Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Rhizomucor* spp. и *Lichtheimia* spp.) в исследуемых видах биологического материала выделялись достаточно редко – от 0,89% в моче (1 из 112 культур) до 4,40% в содержимом дыхательной системы (12 из 273 культур).

Закключение. Полученные результаты позволяют сделать вывод об имеющемся на сегодняшний день преобладании дрожжевой флоры среди микромицетов, выделенных из различных видов исследованного биологического материала. При этом заметна тенденция к вытеснению ранее преобладающей *Candida albicans* другими, так называемыми non-albicans видами кандид. Обращает на себя внимание высокий удельный вес *Candida guilliermondii*, ранее считавшейся достаточно редким патогеном с низкой частотой выявления. При выборе диагностических подходов к проведению комплексной диагностики инвазивных микозов целесообразно предварительно учитывать этиологический спектр микромицетов, циркулирующих в конкретном медицинском учреждении.

Ключевые слова: инвазивные микозы, микромицеты, онкогематологическая патология, дети, лабораторная диагностика

Tchernovetski M.

Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology,
Minsk, Belarus

Laboratory Diagnosis of Invasive Mycoses and the Etiological Structure of Fungal Microflora Isolated from Clinically Significant Types of Biological Material in Children with Oncohematological Pathology

Conflict of interest: nothing to declare.

Submitted: 30.03.2023

Accepted: 12.09.2023

Contacts: tchernovetski@mail.ru

Abstract

Introduction. Despite some progress in the diagnosis, treatment and prevention of invasive mycoses, they continue to be one of the urgent problems of both domestic and foreign healthcare. An important role in this problem are played by the widespread and not always rational application of antibiotics, cytostatic and steroid drugs, immune disorders, the widespread introduction of invasive methods of providing medical care. Invasive mycoses are of particular importance as a concomitant infection in immunocompromised individuals against the background of the main oncological and hematological pathology. In this group of patients, a severe clinical course of fungal diseases observed, with a mortality rate of up to 75% in some cases. When conducting laboratory diagnostics of invasive mycoses, various diagnostic approaches are used, including: classical microbiological seeding of various types of biological material; automated systems for indicating, identifying fungal microflora, as well as determining sensitivity to antifungal drugs; mass spectrometric and molecular biological analysis; determination of the levels of biological markers; pathomorphological studies of biopsy specimens of organs and tissues.

Purpose. Review of modern approaches and analysis of the results of laboratory diagnosis of concomitant invasive mycoses in children with major oncological and hematological diseases treated at the Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, as well as assessment of the etiological structure of the isolated fungal microflora.

Materials and methods. Isolation of pathogens of invasive mycoses (micromycetes) from samples of clinically significant biological material using microbiological inoculation in liquid (hemaflacons) and solid nutrient media. Followed generic and species identification in during the application of phenotypic, biochemical, mass-spectrometric and molecular biological methods of laboratory diagnosis of fungal infections. Samples of peripheral venous blood, urine, bronchoalveolar lavage (BAL) and tracheobronchial drainage (TBD) fluids, and lung biopsy specimens were used as clinically significant biological material. The biomaterial was obtained from children with concomitant infectious complications against the background of the main oncohematological pathology.



Results. In total, during the analyzed time period of time (from 2002 to 2022), 604 strains of micromycetes were isolated: 219 strains from the blood, 273 strains from the respiratory system and 112 strains from the urine (taking into account micromycetes amount ≥ 1000 /ml colony-forming units and 22 strains in the state of funguria). The main types of isolated microflora were yeast fungi – from 69.23% (189 out of 273 cultures) in the content of BAL, TBD and lung biopsy specimens to 90.87% (199 out of 219 cultures) in peripheral blood. In turn, representatives of the *Candida* spp. prevailed among yeast fungi (18 identified species of microorganisms). At the same time, *Candida parapsilosis* – 22.83% (50 out of 219 cultures) and *Candida guilliermondii* – 21.91% (48 out of 219 cultures) were most often isolated from the blood. The main fungal pathogens isolated from the respiratory system (BAL and TBD content, lung biopsy specimens) and urine were, respectively, *Candida albicans* – 30.04% (82 out of 273 cultures) and *Candida glabrata* – 36.36% (8 out of 22 from cultures in the state of funguria). The total specific gravity of the mycelial microflora ranged from 9.13% (20 out of 219 cultures) in the blood (with a prevalence of *Fusarium* spp. – 9 cultures) to 30.77% (84 out of 273 cultures) in the respiratory system (with a prevalence of *Aspergillus fumigatus* – 31 cultures and *Aspergillus flavus* – 14 cultures). In turn, the main causative agents of mucormycosis (*Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Rhizomucor* spp. and *Lichtheimia* spp.) in the studied types of biological material were isolated quite rarely – from 0.89% in the urine (1 out of 112 cultures) to 4.40% in the contents of the respiratory system (12 out of 273 cultures).

Conclusion. The results obtained allow us to conclude that the yeast flora prevails today among micromycetes isolated from various types of the studied biological material. At the same time, there is a noticeable tendency to replace the previously prevailing *Candida albicans* by other, so-called "non-albicans" *Candida* species. Attention is drawn to the high proportion of *Candida guilliermondii*, previously considered a fairly rare pathogen, with a low detection rate. When choosing diagnostic approaches for conducting a comprehensive diagnosis of invasive mycoses, one should first take into account the etiological spectrum of micromycetes circulating to a particular medical institution.

Keywords: invasive mycoses, micromycetes, oncohematological pathology, children, laboratory diagnostics

■ ВВЕДЕНИЕ

Проблема инвазивных микозов не теряет своей актуальности для отечественного и зарубежного здравоохранения, несмотря на определенные успехи в их диагностике и лечении на протяжении последних лет. Во многом это связано с широким и не всегда рациональным применением антибиотиков, цитостатических и стероидных препаратов, нарушениями иммунитета, активным внедрением инвазивных способов оказания медицинской помощи, общим увеличением количества пожилых и старых людей. Традиционной группой населения, наиболее подверженной развитию инвазивных микозов с высокой вероятностью летального исхода (до 75% в отдельных случаях), являются лица детского возраста с различными видами нарушения иммунитета на фоне онкогематологической патологии [1, 2].

Основным подходом к диагностике инвазивных микозов, широко используемым в микробиологических лабораториях различного профиля, является выделение

и идентификация возбудителя из биологического материала путем предварительного посева образцов биологического материала в жидкие и на твердые среды. С этой целью используется целый ряд питательных сред, включая в первую очередь базовую среду Сабуро (Sabouraud Agar) с антибиотиками и агар Чапека – Докса (Czaprek-Dox Agar). Наиболее информативным является выявление микромицетов в крови, ликворе и жидкостях, полученных из стерильных локусов [3]. С этой целью в последние годы широко используются автоматизированные системы гемокультивирования типа «BACT/ALERT» и «BACTEC», базирующиеся соответственно на колориметрической регистрации изменения окраски сенсора или уровня флуоресценции, регистрируемых при выделении углекислого газа в ходе роста микрофлоры в соответствующих стерильных емкостях (гемфлаконах типа Bact/ALERT PF Plus и BD Mycosis). В случае автоматически регистрируемого роста микроорганизмов производится их первичная идентификация (при помощи микроскопии окрашенного мазка с биоматериалом) и посев на чашки Петри с твердыми питательными средами для последующей термоинкубации с целью получения изолированных колоний так называемой чистой культуры микромицетов. К сожалению, данный процесс занимает определенный промежуток времени – от 24 часов при наличии дрожжевой микрофлоры до 14 и более суток при росте плесневых микроорганизмов. В рамках сокращения данного этапа микробиологического исследования в последние годы в ряде зарубежных лабораторий внедрены полностью автоматизированные системы посева биоматериала с последующим выделением и анализом колоний микроорганизмов (типа BD Kiestra), позволяющие существенно сократить время получения так называемой чистой культуры в количестве, достаточном для проведения дальнейшей идентификации дрожжевых грибковых патогенов [4].

Идентификация возбудителей грибковых инфекций и определение их чувствительности к противогрибковым препаратам (антимикотикам) являются одними из важнейших этапов диагностики инвазивных микозов. Современные диагностические методы включают в себя автоматизированное определение видовой принадлежности выделенных изолированных колоний дрожжевых микромицетов с использованием автоматических анализаторов типа «Vitek 2 Compact» и «Phoenix» с применением соответственно диагностической панели «Phoenix Yeast ID» и карты «Vitek 2 YST». При этом определение чувствительности выделенной дрожжевой микрофлоры к противогрибковым препаратам может осуществляться в автоматическом режиме с помощью диагностической карты «Vitek 2 AST-Y508». К сожалению, на сегодняшний день отсутствуют диагностические панели к вышеуказанным анализаторам, позволяющие проводить в автоматическом режиме идентификацию плесневых грибов (мицелиальных микромицетов) и определение их антимикотикочувствительности.

Одним из широко используемых и эффективных современных диагностических подходов к выявлению чувствительности различных видов грибковой микрофлоры к противогрибковым препаратам является применение эллипсометрического метода, основанного на использовании полосок с убывающим градиентом концентрации антимикотиков (E-test), а также применение нефелометрического анализа (в варианте диагностической системы «Sensititer») при использовании 96-луночных иммунологических планшетов с различными концентрациями противогрибковых препаратов.

Весьма перспективным направлением лабораторной диагностики является видовая идентификация выделенных микромицетов на основе использования анализа



белковых структур масс-спектрометрическим методом матрикс-ассоциированной лазерной детекции/ионизации с задержкой во времени (MALDI-TOF MS) [5]. Данный метод позволяет провести исследование в течение нескольких минут с учетом номенклатуры микроорганизмов, входящих в базу данных автоматических масс-спектрометров типа «Vitek MS (bioMerieux)» и «MALDI Biotyper (Bruker)». В целом, комбинированное использование комплекса автоматизированных систем посева, выделения и идентификации грибковых микромицетов дает реальную возможность осуществить проведение микробиологической идентификации отдельных грибов (в частности *Candida* spp.) в течение 10–16 часов, позволяя тем самым врачам клинического профиля назначить своевременное адекватное лечение грибковых инфекций [4]. При этом повышается эффективность микробиологических исследований и воспроизводимость полученных результатов [6].

На фоне технического прогресса в медицине и биологии появились и успешно применяются на протяжении многих лет так называемые дополнительные методы диагностики микозов. К ним относятся молекулярно-биологические исследования и определение уровней биологических маркеров [7–9].

Традиционно используются патоморфологические исследования биопсийного, операционного и секционного материала [10–12]. При этом фиксированный формалином биоматериал подвергается обезвоживанию при помощи спиртовых растворов с последующей заливкой в парафиновые блоки, изготовлением срезов толщиной 5–7 мкм, окраской гематоксилин-эозином (либо другими красителями), обзорной микроскопией с целью выявления элементов гриба. Широкое использование метода патоморфологических исследований в диагностике инвазивных микозов ограничивают определенные трудности при получении биопсийного материала у детей с онкогематологической патологией (повышенный риск возникновения внутренних кровотечений и инфекционных осложнений на фоне иммуносупрессивного состояния).

В последние годы большие надежды возлагаются на внедрение в практику работы микробиологических лабораторий молекулярно-биологических методов исследований. Использование амплификационного анализа в варианте полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволяет на сегодняшний день детектировать микромицеты как в нативном материале, так и в изолированных на питательных средах колониях. Разработанные и используемые на практике коммерческие ПЦР-тесты дают возможность в течение короткого периода времени (несколько часов) проводить родо- и видоспецифическую идентификацию как дрожжевых, так и мицелиальных микромицетов [13, 14]. Актуальной темой является разработка и применение комплексных мультипраймерных наборов для одновременного выявления наиболее часто встречаемых микромицетов. На сегодняшний день разработаны и применяются в ряде микробиологических лабораторий коммерческие диагностикумы, предназначенные для детекции участков геномов наиболее актуальных возбудителей инвазивных микозов дрожжевой (*Candida* spp.) и мицелиальной (*Aspergillus* spp.) этиологии [15]. При этом спектр циркулирующей в конкретном учреждении грибковой микрофлоры не всегда полностью совпадает с наименованиями микромицетов, доступных к выявлению при помощи производимых на сегодняшний день ПЦР-тест-систем. В связи с этим особую актуальность приобретает разработка диагностикумов, позволяющих осуществлять одномоментное выявление различных видов грибковых патогенов

Таблица 1
Основные виды микромицетов, опосредованно детектируемые при помощи определения
уровней биологических маркеров
Table 1

The main types of micromycetes, indirectly detected determining of biological markers levels

Наименование биологического маркера	Наименование детектируемых микромицетов	Наименование недетектируемых микромицетов
Галактоманнан / Galactomannan	Aspergillus spp., Penicillium spp., Geotrichium spp., Fusarium spp., Cryptococcus spp.	Saccharomyces spp., Candida spp., Mucorales
1-3-бета-D-глюкан / 1-3-β-D-glucan	Candida spp., Aspergillus spp., Fusarium spp., Trichosporon spp., Saccharomyces cerevisiae, Pneumocystis jirovecchii	Cryptococcus spp., Lichtheimia (Absidia) spp., Mucor spp., Rhizopus spp., Rhizomucor spp.

с учетом предварительного анализа этиологического спектра выявляемой в стационаре грибковой микрофлоры. С учетом достаточно длительного времени микробиологического выделения на твердых питательных средах изолированных колоний плесневой микрофлоры, амплификационный анализ клинически значимого нативного материала (кровь, трахеобронхиальный дренаж (ТБД), бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ), ликвор) в варианте ПЦР в режиме реального времени позволяет сократить до нескольких часов лабораторную диагностику инвазивных микозов, что чрезвычайно важно для своевременного назначения адекватной противогрибковой терапии.

Отдельного внимания заслуживает выявление биологических маркеров инвазивных микозов. В первую очередь речь идет об определении в биологической жидкости (сыворотка крови, содержимое БАЛ и ТБД) уровня характерных белков микромицетов в виде галактоманнана (galactomannan) и 1-3-бета-D-глюкана (1-3-β-D-glucan). Для исследований используется иммуноферментный метод диагностики в вариантах хромогенного анализа по конечной точке и кинетического измерения хода реакции гидролиза субстрата. Выявление повышенных показателей данных биологических маркеров ассоциируется с наличием у пациентов грибковых инфекций, вызываемых в основном представителями соответственно родов *Aspergillus* и *Candida*. Тесты для выявления галактоманнана и 1-3-бета-D-глюкана различаются не только по принципу проведения реакции и методике учета результатов, но и по потенциальной возможности опосредованной детекции грибковых инфекций, вызываемых различными видами микромицетов. В табл. 1 приведены виды грибковых патогенов, при наличии которых в качестве этиологического агента инвазивных микозов возможно применение диагностических наборов, предназначенных для количественного выявления уровней биологических маркеров в виде галактоманнана и 1-3-бета-D-глюкана [16, 17]. С учетом различающегося спектра данных микромицетов имеют место рекомендации по проведению одновременного исследования биологического материала (в основном в виде сыворотки крови и жидкости БАЛ) с целью выявления в них повышенных показателей названных биологических маркеров.

■ **ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Основанная на анализе сведений о современных технологиях микробиологического исследования оценка результатов лабораторной диагностики сопутствующих



инвазивных микозов у детей с наиболее распространенными онкологическими и гематологическими заболеваниями, находившихся на лечении в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии, а также установление этиологической структуры выделенной из различного клинического материала грибковой микрофлоры.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С учетом актуальности проблемы сопутствующих инвазивных микозов для детей с основной онкогематологической патологией, находящихся на лечении в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии (Центр), проведен анализ этиологической структуры микромицетов, выделенных из клинически значимого биологического материала за период с 2002 по 2022 год. Начало проведения анализа выявленной в биоматериале грибковой микрофлоры с 2002 года обусловлено внедрением в этот период времени автоматизированных систем культивирования микрофлоры в гемфлаконах, а также устройств для полуавтоматической и автоматической идентификации выделенных микромицетов. С 2016 года появилась возможность применения масс-спектрометрического анализа с использованием масс-спектрометра типа «Vitek MS».

Для выделения из крови микромицетов использовались двухфазные гемакультуральные флаконы фирмы Bio Rad (США), а также аналогичная продукция компаний Becton Dickinson (BACTEC PEDS PLUS/F и BACTEC Mycosis IC/F) и bioMerieux (Bact/ALERT PF Plus). Культивирование микрофлоры осуществлялось в соответствующих автоматических гемакультураторах BACTEC 120 (Becton Dickinson, США) и Bact/ALERT 3D (bioMerieux, Франция). Длительность инкубации с целью подтверждения отсутствия роста микрофлоры составляла от 5 до 14 суток в зависимости от используемых гемафлаконов и детектируемых микромицетов. В случае автоматической фиксации гемакультураторами роста микрофлоры во флаконах производились приготовление мазка исследуемого образца крови с его окрашиванием и микроскопией, а также последующий высев на чашки Петри с различными питательными средами, включая Sabouraud Dextrose Agar (с добавлением хлорамфеникола и гентамицина сульфата), CHROMAgar Candida, а также Czapek-Dox Agar. В качестве красителей наряду со стандартной окраской по Граму применялись Calcofluor White. В зависимости от используемого красителя применялась световая или люминесцентная микроскопия со 100-кратным увеличением исследуемого образца. Инкубация посевов на Sabouraud Dextrose Agar проводилась в условиях аэробного термостатирования при температуре $+30\pm 2^\circ\text{C}$ с ежедневным визуальным учетом роста микроорганизмов на поверхностях среды в чашках Петри на протяжении до 14 суток. Для роста грибковой микрофлоры на среде CHROMAgar Candida температура инкубирования была $+35\pm 2^\circ\text{C}$.

При поражении дыхательной системы для выделения микромицетов использовался биологический материал в виде содержимого БАЛ и ТБД, а также биоптаты легких. Образцы биологического материала забирались в асептических условиях в специальные стерильные емкости с последующим приготовлением и окраской мазков (с помощью вышеуказанных красителей) и посевом на чашки Петри с упомянутыми твердыми питательными средами. Исследование нативного материала методически проводилось подобно анализу образцов крови. Инкубация чашек Петри с исследуемыми образцами из органов дыхательной системы проводилась в температурных

условиях и при временных параметрах, идентичных таковым при анализе биологического материала из гемафлаконов с признаками роста микрофлоры. Аналогичным образом проводилось и микробиологическое исследование мочи, за исключением выполнения микроскопии нативного материала. Основная цель данного этапа исследований – получение чистой культуры возбудителей микозов.

Родовая и, в отдельных случаях, видовая (например, при использовании среды CHROMAgar Candida) идентификация выросшей на твердых питательных средах чистой грибковой микрофлоры проводилась в первую очередь фенотипически путем оценки формы, консистенции, характера роста, цвета колоний микромицетов, структуры мицелия и спорных форм. В свою очередь, для последующего определения либо подтверждения видовой принадлежности выросших культур грибов использовались реагенты BBL Mycotube (Becton Dickinson, США), идентификационные планшеты Fongiscreen 4H (Sanofi Diagnostics Pasteur, Франция), диагностические планшеты API 20 Auxacolor и API ID32C для полуавтоматического оборудования miniAPI (bioMerieux, Франция) и идентификационные карты YST для автоматического микробиологического анализатора Vitek 2 Compact (bioMerieux, Франция). В качестве альтернативных подходов к идентификации грибов использовались MALDI-TOF MS и амплификационный анализ в варианте ПЦР в режиме реального времени (PCR real-time) с применением реагентов производства АО «Вектор-Бест» (Россия) и Bruker (США). В рамках применения дополнительного теста для диагностики инвазивных микозов использовалось определение уровней галактоманна в крови и БАЛ.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В целом за период с 2002 по 2022 год проведен ретроспективный анализ этиологической структуры идентифицированных микромицетов, выделенных из периферической крови, содержимого структурных элементов дыхательной системы (БАЛ, ТБД, биоптаты легких) и мочи (в том числе с учетом состояния фунгурии). Результаты обнаружения различных представителей дрожжевой и плесневой микрофлоры приведены в табл. 2.

Таблица 2
Этиологическая структура выделенных грибов
Table 2
Etiological structure of isolated fungi

№ п/п	Наименование микромицетов	Наименование биоматериала за период с 01.2002 по 12.2022							
		Кровь		БАЛ, ТБД, биоптат легких		Моча ≥1000 КОЕ/мл		Моча ≥1000 КОЕ/мл при фунгурии	
		К-во	%	К-во	%	К-во	%	К-во	%
1	C. albicans	30	13,70	82	30,03	24	21,43	3	13,63
2	C. parapsilosis	50	22,83	16	5,86	7	6,25	1	4,55
3	C. guilliermondii	48	21,91	10	3,66	17	15,18	5	22,73
4	C. krusei	16	7,30	17	6,23	8	7,14	–	0,0
5	C. pelliculosa	10	4,56	–	0,0	–	0,0	–	0,0
6	C. glabrata	8	3,65	21	7,69	27	24,11	8	36,36



Окончание таблицы 2

№ п/п	Наименование микромикетов	Наименование биоматериала за период с 01.2002 по 12.2022							
		Кровь		БАЛ, ТБД, биоптат легких		Моча ≥1000 КОЕ/мл		Моча ≥1000 КОЕ/мл при фунгурии	
		К-во	%	К-во	%	К-во	%	К-во	%
7	<i>C. famata</i>	5	2,28	5	1,83	1	0,89	–	0,0
8	<i>C. tropicalis</i>	4	1,83	3	1,10	1	0,89	–	0,0
9	<i>C. lusitaniae</i>	4	1,83	9	3,29	1	0,89	–	0,0
10	<i>C. haemulonii</i>	–	0,0	–	0,0	1	0,89	1	4,55
11	<i>C. magnoliae</i>	2	0,91	–	0,0	–	0,0	–	0,0
12	<i>C. pseudotropicalis</i>	1	0,46	1	0,37	–	0,0	–	0,0
13	<i>C. lyopolitica</i>	1	0,46	–	0,0	–	0,0	–	0,0
14	<i>C. caliculosa</i>	1	0,46	–	0,0	–	0,0	–	0,0
15	<i>C. kefur</i>	–	0,0	5	1,83	–	0,0	–	0,0
16	<i>C. norvengensis</i>	–	0,0	1	0,37	–	0,0	–	0,0
17	<i>C. orthopsilosis</i>	–	0,0	1	0,37	–	0,0	–	0,0
18	<i>C. inconspicua</i>	–	0,0	2	0,73	–	0,0	–	0,0
19	<i>C. spp.</i>	–	0,0	10	3,66	9	8,04	–	0,0
20	<i>Cryptococcus spp.</i>	4	1,83	–	0,0	–	0,0	–	0,0
21	<i>Trichosporon spp.</i>	6	2,74	–	0,0	2	1,79	1	4,55
22	<i>Saccharomyc. cerevis.</i>	6	2,74	6	2,20	1	0,89	–	0,0
23	<i>Rhodotorula mucilag.</i>	1	0,46	–	0,0	–	0,0	–	0,0
24	<i>Malassezia furfur</i>	2	0,91	–	0,0	–	0,0	–	0,0
25	<i>A. fumigatus</i>	–	0,0	31	11,35	–	0,0	–	0,0
26	<i>A. flavus</i>	–	0,0	14	5,13	–	0,0	–	0,0
27	<i>A. niger</i>	–	0,0	6	2,20	–	0,0	–	0,0
28	<i>A. ochraceus</i>	–	0,0	1	0,37	–	0,0	–	0,0
29	<i>A. sydowii</i>	–	0,0	2	0,73	–	0,0	–	0,0
30	<i>A. nidulans</i>	–	0,0	1	0,37	–	0,0	–	0,0
31	<i>A. spp.</i>	–	0,0	4	1,46	–	0,0	–	0,0
32	<i>Fusarium spp.</i>	9	4,11	–	0,0	10	8,93	3	13,63
33	<i>Penicillium spp.</i>	–	0,0	5	1,83	2	1,79	–	0,0
34	<i>Mucor spp.</i>	1	0,46	6	2,20	1	0,89	–	0,0
35	<i>Rhizopus spp.</i>	1	0,46	4	1,46	–	0,0	–	0,0
36	<i>Rhizomucor pusillus</i>	–	0,0	1	0,37	–	0,0	–	0,0
37	<i>Epidermophyton spp.</i>	1	0,46	–	0,0	–	0,0	–	0,0
38	<i>Geotrichum capit.</i>	2	0,91	–	0,0	–	0,0	–	0,0
39	<i>Trichophyton spp.</i>	–	0,0	1	0,37	–	0,0	–	0,0
40	<i>Lichtheimia corymbif.</i>	–	0,0	1	0,37	–	0,0	–	0,0
41	<i>Paecilomyces. variotii</i>	–	0,0	2	0,73	–	0,0	–	0,0
42	<i>Purpureocillium lilaci.</i>	–	0,0	1	0,37	–	0,0	–	0,0
43	<i>Scedosporium apiosp.</i>	–	0,0	1	0,37	–	0,0	–	0,0
44	Недифференц. плесень	6	2,74	3	1,10	–	0,0	–	0,0
ВСЕГО		219	100%	273	100%	112	100%	22	100%

При анализе приведенных в табл. 2 данных обращает на себя внимание превалирование дрожжевой микрофлоры среди микромицетов, выделенных из различных видов биологического материала, – от 69,23% (189 из 273 культур) в содержимом БАЛ и ТБД до 90,87% (199 из 219 культур) в периферической крови. Следует отметить широкий спектр выделенных грибов рода *Candida* – 18 видов без учета *Candida* spp. При этом отмечено уменьшение удельного веса широко распространенной *C. albicans* за счет возрастания этиологической роли так называемых non-*Candida* в виде *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. krusei*. Наиболее наглядное снижение этиологической роли *Candida albicans* в развитии сопутствующих грибковых осложнений наблюдается при анализе спектра дрожжевых культур, выделенных из крови и мочи. Целесообразно обратить внимание на случаи выделения в исследуемых видах биологического материала (преимущественно из крови и из содержимого дыхательной системы) *Saccharomyces cerevisiae*, так называемых «пекарских дрожжей», широко используемых при приготовлении хлебобулочной продукции. В целом, на долю лишь двух представителей рода *Candida* в виде *Candida parapsilosis* и *Candida guilliermondii* приходится около половины всех случаев фунгемий. Одной из выявленных особенностей выделения кандид из образцов крови пациентов Центра является высокий удельный вес *C. guilliermondii* (21,92%, 48 из 219 культур), традиционно считающейся в большинстве стационаров редким возбудителем инвазивных микозов с частотой выявления в кровяном русле, не превышающей обычно несколько процентов. На фоне выраженного превалирования выделения дрожжевых микромицетов из крови и мочи спектр грибковой флоры в дыхательной системе имеет существенные отличия за счет достаточно высокого удельного веса плесневой микрофлоры (30,77%, 84 из 273 культур), основным представителем которой являются аспергиллы, с ожидаемым преобладанием *A. fumigatus* (31 из 59 культур) и *A. flavus* (14 из 59 культур). Среди общего количества выделенных из клинического материала представителей мицелиальной (филаментозной) микрофлоры обращают на себя внимание возбудители рода *Fusarium*, преобладающие среди филаментозной флоры, обнаруженной в моче (10 из 13 культур) и в крови (9 из 20 культур). Имеет определенное своеобразие и этиологический профиль грибковой микрофлоры, выделенной из мочи (в количестве, равном или превышающем 1000 КОЕ/мл), где наиболее часто встречаемым видом грибковой микрофлоры была *Candida glabrata* (24,11%, 27 из 112 микромицетов). С учетом имеющейся вероятности контаминации образцов мочи при их заборе и с целью повышения достоверности этиологической значимости детекции грибковой микрофлоры в образцах мочи был проведен дополнительный анализ грибковых патогенов при состоянии фунгурии, подтвердивший ранее выявленный удельный вес *Candida glabrata* (36,36%, 8 из 22 культур). Принимая во внимание появившиеся в последние годы данные о росте числа заболеваний, вызываемых так называемыми муковровыми грибами (относятся к порядку *Mucorales*), определенный интерес представляют частота и спектр обнаружения данного вида микрофлоры у детей с онкогематологической патологией. За весь период анализа данных общее количество обнаруженных муковровых грибов составило 15 культур, включая представителей родов *Rhizopus* (5 штаммов), *Mucor* (8 штаммов), а также единичные культуры *Rhizomucor pusillus* и *Lichtheimia corymbifera*. В целом следует отметить незначительный уровень обнаружения в биологическом



материале возбудителей мукормикозов – 0,89% (1 из 112 культур) в моче, 0,91% (2 из 219 культур) в крови и 4,40% (12 из 273 культур) в дыхательной системе.

Весьма показательными были результаты анализа ежегодной частоты выявления микромицетов. За рассматриваемый период времени данный показатель варьировал от 27 фунгемий в 2009 году до 3 случаев обнаружения в крови микромицетов в 2022 году. При средней частоте выявления микромицетов в крови за наблюдаемый период времени в количестве 10,43 случая в год за последние 3 года обнаружено лишь 11 случаев фунгемий (включая по 4 эпизода в 2020 и 2021 годах). Одной из причин такого снижения является внедрение в 2017 году в работу Центра программы борьбы с инфекционными осложнениями, предусматривающей введение видеоконтроля за соблюдением противоэпидемических мероприятий при оказании медицинской помощи (в частности при проведении мероприятий, связанных с нарушением целостности кожных покровов и уходом за центральными венозными и периферическими катетерами), а также профилактическое назначение противогрибковых препаратов пациентам из групп риска по развитию инвазивных микозов.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сопутствующие инфекционные осложнения, вызываемые различными видами дрожжевой и плесневой микрофлоры, продолжают оставаться одной из проблем в лечении детей с основной онкогематологической патологией. Имеет место вытеснение наиболее изученной и распространенной *Candida albicans* другими видами дрожжевых микромицетов, отличающихся, как правило, большей агрессивностью в плане развития клинических проявлений инвазивных микозов и устойчивостью к применению противогрибковых препаратов. Внедрение и комплексное использование современных диагностических подходов в виде масс-спектрометрического анализа, ПЦР-диагностики и определения уровней биологических маркеров позволит повысить эффективность специфической диагностики грибковых инфекций. Принимая во внимание родовое и видовое разнообразие выявляемых в биологическом материале микромицетов, комплексную лабораторную диагностику инвазивных микозов целесообразно проводить с учетом этиологической структуры грибковой микрофлоры, циркулирующей в конкретном медицинском учреждении. Этиологический состав микрофлоры, выделенной у пациентов с онкогематологической патологией (включая *Candida* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon* spp., *Geotrichum* spp., *Cryptococcus* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp.), позволяет предположить повышение эффективности диагностики грибковых поражений за счет одномоментного определения уровней биологических маркеров в виде галактоманнана и 1-3-бета-D-глюкана. Спектр циркулирующих в медицинском учреждении микромицетов рационально учитывать также при выборе соответствующих коммерческих либо при разработке отечественных ПЦР-тест-систем в режиме реального времени.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Von Lilienfeld-Toal M., Wagener J., Einsele H. Invasive fungal infection. *Deutsches Arzteblatt International*. 2019;116:271–278.
2. Supatharawanich S., Narkbunnam N., Vathana N. Invasive Fungal Diseases in Children with Acute Leukemia and Severe Aplastic Anemia. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*. 2021;13(1):39–47.
3. Clancy C.J., Nguyen M.N. Diagnosis Invasive Candidiasis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2018;56(5):1909–1917.
4. Muters N.N., Hodiament C.J., de Jong M.D. Performance of Kiestra Total Laboratory Automation Combined with MS in Clinical Microbiology Practice. *Annals of Laboratory Medicine*. 2014;34:111–117.
5. Honsig C., Selitsch B., Hollenstein M. Identification of Filamentous Fungi by MALDI-TOF Mass Spectrometry: Evaluation of Three Different Sample Preparation Methods and Validation of an In-House Species Cutoff. *Journal of Fungi*. 2022;8:383–393.
6. Jacot D., Sarton-Loheac G., Coste A.T. Performance evaluation of the Becton Dickinson Kiestra IdentifA/SusceptA. *Clinical Microbiology and Infection*. 2021;27:1167.e9–1167.e17.
7. Lass-Flörl C., Samardzic E., Knoll M. Serology anno 2021 – fungal infections: from invasive to chronic. *Clinical Microbiology and Infection*. 2021;27:1230–1241.
8. Kord M., Salehi M., Khodovaisy S. Epidemiology of yeast species causing bloodstream infection in Tehran, Iran (2015–2017); superiority of 21-plex PCR over Vitek 2 system for yeast identification. *Journal of Medical Microbiology*. 2020;69:712–720.
9. Paterson T.F., Donnelly J.P. New concept in diagnostics for invasive Mycoses: non-culture-based methodologies. *Journal of Fungi*. 2019;5(is. 9):9–18.
10. Roden C., Schuetz A.N. Histopathology of fungal diseases of the lung. *Seminars in Diagnostic Pathology*. 2017;34(6):530–549.
11. Roy P., Das S., Sharma S. Revisiting the utility of histopathological examination of biopsy: a necessity in microbiology. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2017;11(5):DC16–DC18.
12. Zhang D., Li X., Zhang J. Characteristics of Invasive Pulmonary Fungal Diseases Diagnosed by Pathological Examination. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. 2021, art. ID 5944518.
13. Seo H., Kim J.Y., Son H.-J. Diagnostic performance of real-time polymerase chain reaction assay in blood for invasive aspergillosis and mucormycosis. *Mycoses*. 2021;64(is. 12):1554–1562.
14. White P.L., Price J.S., Cordey A., Backx M. Molecular Diagnosis of Yeast Infections. *Current Fungal Infections Reports*. 2021;15:67–80.
15. Carvalho-Pereira J., Fernandes F., Araujo R. Multiplex PCR Based Strategy for Detection of Fungal Pathogen DNA in Patients with Suspected Invasive Fungal Infections. *Journal of Fungi*. 2020;6:308.
16. Mercier T., Castagnola E., Marr K.A. Defining Galactomannan Positivity in Updated EORTS/MSGERC Consensus Definitions of Invasive Diseases. *Clinical Infectious Diseases*. 2021;72(suppl. 2):89–94.
17. Lamothe F., Akan H., Cruciani D. Assessment of the role of 1,3- β -D-Glucan Testing for the Diagnosis of Fungal Infections in Adults. *Clinical Infectious Diseases*. 2021;72(suppl. 2):89–94.