

DOI 10.31718/2077-1096.21.1.172

УДК 579:616.28-071

Зачепило С.В.

СУЧАСНІ МІКРОБІОЛОГІЧНІ ТЕХНОЛОГІЇ В ДІАГНОСТИЦІ МІКОЗІВ ЛОР-ОРГАНІВ

Українська медична стоматологічна академія, м. Полтава

В огляді висвітлені новітні підходи до вирішення однієї з важливих проблем сучасної оториноларингології – діагностики опортуністичних мікозів верхніх дихальних шляхів та вуха. Опортуністичні мікози ЛОР-органів за останні десятиріччя становлять важливу проблему сучасної клінічної медицини не тільки в Україні, а і в усьому світі. За даними наукової літератури, доля грибкових уражень вуха та верхніх дихальних шляхів у структурі хронічних запалень даних біотопів становить 22,1%. Основними збудниками мікотичних уражень ЛОР-органів є умовно-патогенні гриби родів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* та дріжджоподібні гриби роду *Candida*, які характеризуються низьким рівнем патогенності, а також входять до складу резидентної мікрофлори макроорганізму. Класичні методи мікробіологічної діагностики мають певні обмеження в ідентифікації мікроміцетів. Тому застосування в клінічній практиці більш надійних, швидких та точних методів буде сприяти своєчасному та ефективному лікуванню грибкових захворювань ЛОР-органів. В даній роботі викладений аналіз сучасних мікробіологічних діагностичних технологій, таких як біохімічна детекція мікроорганізмів за допомогою ідентифікаційних планшетних тест-систем (API RapID, CrystalTM), напіваавтоматична та автоматична мікробіологічна ідентифікація за допомогою аналізаторів VITEK, VITEK 2, Walk Away. Ідентифікація збудників грибкової інфекції також може проводитися за рахунок здійснення прямого білкового профілювання з використанням методу мас-спектрометрії, полімеразної ланцюгової реакції та секвенування. Зазначені методи з найвищим рівнем достовірності дозволяють ідентифікувати збудника, а також оцінити його чутливість до хіміотерапевтичних препаратів. Застосування комплексу класичних та сучасних мікробіологічних технологій має стати етапом діагностики грибкових захворювань різних біотопів людини, зокрема верхніх дихальних шляхів та вуха.

Ключові слова: опортуністичні мікози, діагностика, молекулярно-генетичні методи, ідентифікація

Робота є фрагментом науково-дослідної роботи кафедри оториноларингології з офтальмологією «Реабілітація пацієнтів після функціональної ендоскопічної риносинусхірургії». Державний реєстраційний номер: 0120U104016.

Опортуністичні мікози ЛОР-органів за останні десятиріччя становлять важливу проблему сучасної клінічної медицини не тільки в Україні, а і в усьому світі. За даними Кунельської В.Я. (2019) натеper доля грибкових уражень вуха та верхніх дихальних шляхів (ВДШ) в структурі хронічних запалень даних біотопів становить 22,1%. Серед них частка фарингомікозів складає 50%, отомікозів – 36%, ларингомікозів – 7%, мікотичних уражень носа та навколоносових порожнин – 7%[1].

Широке та довгочасне використання лікарських засобів окремих фармакологічних груп (антибіотики, стероїдні гормони, цитостатики та ін.) призводить до зниження імунних ресурсів макроорганізму та до зростання кількості захворювань, наслідком яких є розвиток вторинної імунної недостатності (ендокринопатії, онкологічні захворювання, СНІД, патологія ШКТ, дисбіози та ін.). Впровадження інвазивних методів діагностики та лікування, а також потужний розвиток трансплантацій органів призвели до збільшення популяції імунокомпроментованих пацієнтів, у тому числі і зі зниженою активністю механізмів специфічного та неспецифічного антифунгального захисту макроорганізму та високим ризиком розвитку мікотичних уражень різних біотопів людини, зокрема ЛОР-органів [2, 3, 4]. Пригнічення активності складових компонентів колонізаційної резистентності ЛОР-органів сприяє реалізації патогенного потенціалу основних збудників міко-

зів верхніх дихальних шляхів та вуха. Домінуючими патогенами в розвитку грибкових уражень ЛОР-органів є умовно-патогенні гриби родів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* та дріжджоподібні гриби роду *Candida*, які характеризуються низьким рівнем патогенності, а також входять до складу резидентної мікрофлори макроорганізму. Міцеліальні грибкові мікроорганізми широко розповсюджені в природі, та тільки за певних умов можуть набувати патогенних властивостей і викликати захворювання органів та систем людини [5, 6].

Труднощі діагностики опортуністичних мікотичних інфекцій в оториноларингології пов'язані з відсутністю абсолютної специфічності їх клінічних проявів та ознак, особливо в групі імунокомпроментованих пацієнтів [5, 7, 8]. Оскільки, основні збудники мікозів ЛОР-органів є складовими компонентами автохтонної і алохтонної нормофлори та можуть контамінувати слизові оболонки ВДШ і шкіру зовнішнього слухового проходу, наявність їх в досліджуваному матеріалі, взятому від хворого, не завжди може бути підставою для встановлення діагнозу [1, 3, 6, 9]. З огляду на це, кількісне визначення збудників розглядається як один з діагностичних критеріїв. Так, для грибів роду *Candida* основними критеріями діагностики при мікроморфологічному вивченні є наявність клітин, які активно вегетують, або їх нитчастих форм – справжнього міцелію чи псевдоміцелію, а також кількість виділених пато-

генів не менш ніж 10^4 колонієутворюючих одиниць (КУО)/мл., для міцеліальних грибів (родів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*) – наявність збудника при культуральному, цитологічному та гістологічному дослідженнях [5, 6, 10].

Вагомою особливістю запальних захворювань верхніх дихальних шляхів та вуха є зростаюча кількість уражень, викликаних декількома збудниками, що спричинюють розвиток мікст-інфекції. Мікст (змішана, сателітна, асоційована, поєднана)-інфекція є складним процесом взаємодії між двома та більше патогенними агентами, що належать до різних видів мікроорганізмів, та організмом хазяїна, в клітинних системах якого одночасно репродукуються ці збудники. Перебіг такої форми інфекції визначається чисельним співвідношенням мікробів-асоціантів, рівнем їх ферментативної активності, чутливістю до протимікробних препаратів, антагоністичними та синергічними властивостями учасників мікробних спільнот [11, 12, 13, 14, 15].

В структурі мікст-інфекцій ЛОР-органів значну роль відіграють грибово-бактеріальні асоціації, які за даними різних авторів мікробіологічно підтверджуються в 26-70% випадків в залежності від біотопу та характеру запального процесу. [16, 17, 18]. Найчастіше бактеріями-асоціантами визначаються *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* та *Pseudomonas aeruginosa*. Частота виділення грибово-грибкових асоціацій становить від 4 до 6% [17, 18].

Зважаючи на те, що клінічні прояви та ознаки мікотичних уражень та змішаних інфекцій ЛОР-органів не мають характерної специфічності та особливості, їхня діагностика базується на комплексі клініко-лабораторних обстежень, який включає в себе ретельний збір скарг хворого, даних анамнезу, об'єктивного обстеження, додаткових методів дослідження та результати мікроскопічного, мікологічного, серологічного, та гістологічного методів [1, 5]. Однак, існують певні недоліки кожного із зазначених класичних методів лабораторної діагностики, які ускладнюють своєчасну діагностику грибових уражень ЛОР-органів. Так, мікологічне дослідження характеризується в окремих випадках відносно невисокою чутливістю та специфічністю внаслідок можливої контамінації [19]. Крім того, повільний ріст мікроміцетів потребує значної кількості часу (від 7-10 днів до декількох тижнів). Імунологічний метод діагностики демонструє діагностичну цінність тільки в комплексному використанні з мікроскопічним, мікологічним та гістологічним методами дослідження. Як традиційні, так і сучасні реакції імунологічного методу в мікології мають свої недоліки: низьку чутливість та специфічність. Це пояснюється наявністю загальних для певних видів грибів антигенів, зниженням рівня антитілоутворення у окремих категорій хворих (при імунодефіцитах, цукровому діабеті, хронічних захворювань та ін.). Для підвищення інфор-

мативності серологічного методу в діагностиці мікозів верхніх дихальних шляхів та вуха рекомендують використовувати одночасно декілька реакцій. Методи імунологічної діагностики постійно вдосконалюються, що пов'язано з появою нової інформації про структуру антигенів грибів. Гістологічний метод дослідження характеризується високою чутливістю та специфічністю, але не завжди прийнятний по відношенню до певних біотопів, а також його проведення потребує багато часу. Значною складністю та обмеженням широкого застосування гістопатологічного дослідження в мікології є неможливість диференціювання виду збудника, що виключає перспективу раціонального етіотропного лікування. Таким чином, поява в клінічній практиці надійних та швидких діагностичних технологій сприяє точній верифікації грибкового захворювання та своєчасному призначенню оптимальної антимікотичної терапії.

Спрощення та прискорення процесу ідентифікації бактерій, а також грибів роду *Candida* відбулося наприкінці XX сторіччя за рахунок появи ідентифікаційних планшетних тест-систем для біохімічної детекції (API RapID, CrystalTM) [20]. Планшетні тест-системи представляють собою ємності (лунки) з ліофілізованими субстратами та індикаторами у вигляді спеціальних планшетів (панелей біохімічного диференціювання). Суспензію мікроорганізмів чистої культури вносять в кожну лунку планшета та інкубують в термостаті. Облік результатів біохімічної активності мікроорганізмів проводять після інкубації візуально за наявністю або відсутністю зміни кольору в лунці [20, 21]. Використання зазначених систем скорочує час ідентифікації до 48 годин, та надає їм суттєвої переваги. Передусім застосування цих систем є доцільним та зручним за умов зростання частоти виділення грибово-бактеріальних асоціацій.

Насьогодні рішення проблеми швидкої та достовірної ідентифікації грибів та визначення їх чутливості до протигрибкових препаратів забезпечується застосуванням напівавтоматичних та автоматичних мікробіологічних аналізаторів VITEK, VITEK 2, Walk Away та ін., які представлені в сучасних бактеріологічних та мікологічних лабораторіях в Україні. Використання автоматичних мікробіологічних аналізаторів підвищує точність класичної фенотипічної ідентифікації до 80% [20, 21].

Бактеріологічний аналізатор VITEK з комп'ютерним забезпеченням, що містить спеціальну програму, складається з двох блоків – пристрою для заповнення і запаювання карт, а також інкубатора і рідера. Тести проводяться в пластикових картах. Після приготування розчину із виділеної культури, мутність якого (тобто кількість мікроорганізмів в одиниці рідини) обов'язково оцінюється на нефелометрі, який входить до складу пристрою, карта заповнюється автоматично за допомогою вакууму, що до-

зволяє запобігти контамінації і нерівномірному заповненню лунок, після чого карта герметично запакується. Карти для ідентифікації збудника містять 30 лунок з ліофілізованими біохімічними субстратами і необхідними реагентами. Результат взаємодії мікроорганізму з реактивами фіксується прибором і оцінюється комп'ютерною програмою. Карти для визначення чутливості до протимікробних препаратів складаються з 45 лунок, які наповнені даними препаратами різної концентрації. Час ідентифікації і визначення чутливості до антимікробних препаратів не перевищує 4-6 годин. Більш досконалим є VITEK2, в якому основна кількість операцій автоматизована. Прилад містить до 60 карт, кожна з яких має в своєму складі 64 лунки, що дозволяє підвищити точність ідентифікації за рахунок використання більшої кількості біохімічних субстратів. В пристрої використовується флуоресцентний індикатор, а у випадку ферментативних тестів – мічений субстрат [21, 22].

Іншою системою автоматизованого мікробіологічного дослідження є сучасний автоматичний мікробіологічний аналізатор Walk Away (Siemens Healthcare Diagnostics), який дає можливість проводити ідентифікацію мікроорганізмів за 4 години та визначати їх чутливість більш, ніж до 50 антимікробних препаратів за 4-24 години. Спектр мікроорганізмів, які можна встановити за допомогою даного аналізатору, складає більше 360 видів. Даний аналізатор використовує флуоресцентний метод детекції. Ідентифікація проводиться на підставі системи біотипування мікроорганізмів за допомогою більш, ніж 30 реакцій одночасно, що дає можливість забезпечити високий рівень специфічності та точності результатів.

Однак, не зважаючи на низку перерахованих вище переваг, існують окремі недоліки автоматизованих систем ідентифікації мікроорганізмів. Так, їх застосування потребує обов'язкового попереднього виділення чистої культури, яке продовжується 18-24 години, і, у такий спосіб, збільшує тривалість дослідження. За допомогою автоматизованих систем можливо провести ідентифікацію лише тих мікроорганізмів, інформація про яких внесена до програми автоматичного аналізатора. Також при користуванні ними частота виявлення резистентних штамів може бути знижена внаслідок повільного росту стійких ізолятів. Результати досліджень в більшості даних аналізаторів реєструють шляхом порівняння росту мікроорганізмів (або його відсутності) за умов наявності антибіотиків з контролем, де є тільки мікроорганізми. Тому досить складно диференціювати клітини, які гинуть, від тих, що розмножуються повільно. Крім цього, їх широке впровадження обмежується неможливістю ідентифікації ізолятів з нетиповими біохімічними властивостями та високою вартістю обладнання та витратних матеріалів.

Насьогодні сучасна клінічна медицина має

потребу впровадження більш надійних, точних, високопродуктивних, низьковитратних і експрес-методів детекції та ідентифікації грибкових мікроорганізмів, до яких належить метод мас-спектрометрії [23]. Сутність цього фізичного методу полягає у вимірюванні співвідношення маси заряджених частинок матерії (іонів) до їх заряду. Ідентифікація збудників грибової інфекції базується на виявленні специфічних для окремого виду мікроорганізму набору константних рибосомальних білків клітини за рахунок здійснення прямого білкового профілювання. Білкове профілювання – метод прямого мас-спектрометричного аналізу білкової фракції біологічного об'єкта, який дає можливість одержувати та аналізувати унікальні для даного виду мас-спектри, так звані «фінгерпринти» (відбитки пальців) збудника – «протеомну дактилоскопію» [24, 25]. Прилади, які реалізують цей метод, називаються мас-спектрометрами (VITEK MS, MALDI-TOF MS, MALDI Biotyper). MALDI-TOF мас-спектрометр складається з трьох функціональних частин:

1) лазер, під впливом якого відбувається десорбція/іонізація;

2) аналізатор мас, який розділяє іони відповідно їхньому співвідношенню мас/заряд (m/z) за часом прольоту у вакуумі;

3) детектор – пристрій для визначення розділених іонів.

На початковому етапі дослідження мікробіологічний зразок змішується з матрицею (α -ціано-4-гідроксикорична кислота). Суміш розміщують на металевій пластині, потім пластину з вмістом висушують. Після цього оброблений мікробіологічний зразок на металевій пластині розміщується в мас-спектрометр, де піддається впливу коротких лазерних імпульсів. Матриця перетворює лазерну енергію в енергію збудження, і сприяє десорбції та іонізації білків мікроорганізмів, переважно рибосомальних, які характеризуються високою консервативністю. Матрично-асоційована десорбція та іонізація призводять до формування іонів, які переважно мають один заряд. Десорбовані та іонізовані молекули білку прискорюються в електричному полі, а потім потрапляють до пролітної труби, де розділяються за їхнім індивідуальним співвідношенням маси/заряд. Іони з меншою масою долають відстань до детектора швидше, ніж з більшою. Час прольоту залежить від маси (m) і заряду (z) біоаналітів та пропорційний квадратному кореню m/z . При цьому на детекторі формується унікальний спектр, який несе інформацію, аналогічну «відбитку пальця» досліджуваного зразка. Вся інформація, яка необхідна для ідентифікації збудника, надається на графіку піків (мас-спектрі). Основними перевагами методу MALDI-TOF MS є швидка та надійна ідентифікація мікроорганізмів, невисокі вимоги до кваліфікації персоналу, непотрібність спеціальних витратних матеріалів, висока чутливість ($10^4 - 10^5$ мікро-

бних клітин), можливість ідентифікації мікроорганізмів різних таксономічних груп (міцеліальних та дріжджоподібних грибів, грампозитивних та грамнегативних бактерій), висока швидкість ідентифікації – 1хв/зразок, висока точність видової ідентифікації [20, 21, 22, 23, 25, 26]. Визначення чутливості ідентифікованих мікроорганізмів до антимікробних засобів (АМП) та їх МІК здійснюють завдяки гібридній апаратурі, поєднуючи за допомогою спеціальної програми два окремих аналізатори: мас-спектрометр (для ідентифікації) та автоматичний бактеріологічний аналізатор (для визначення чутливості мікроорганізму до АМП і МІК) [20, 27].

Значно спрощують та підвищують якість лабораторної діагностики мікозів, зокрема і ЛОР-органів, нові високоефективні молекулярно-генетичні методи, що не потребують попереднього виділення чистої культури. До найбільш затребуваних методів належать ПЛР та секвенування, які можна віднести до експрес-методів [28, 29, 30, 31].

Метод ПЛР використовують для виявлення інфекційного агента, якщо відома нуклеотидна послідовність гена або його фрагмента, специфічного, виключно, до даного збудника. Принцип ПЛР базується на багаточисленному копіюванні (ампліфікації) досліджуваної ДНК ферментом ДНК-полімеразою в умовах *in vitro*, що призводить до швидкого накопичення певної послідовності ДНК, яка цікавить дослідника, в достатній кількості, необхідній для детекції. Полімеразна ланцюгова реакція відбувається в три етапи. Перший етап – денатурація двониткової ДНК збудника – проходить при температурі 95°C протягом 30-40 секунд, в результаті якого утворюються два окремих ланцюга ДНК. На другому етапі (ренатурація) при температурі 50-65°C здійснюється гібридизація праймерів, тобто утворення дволанцюгових комплексів праймер-матриці, за допомогою яких відбувається ініціювання синтезу ДНК. Праймери – це синтетичні олігонуклеотиди, які комплементарні послідовностям ДНК та служать початковим пунктом її реплікації. Даний етап реакції триває 20-60 секунд. Фінальний (третій) етап цієї реакції – елонгація – характеризується подовженням комплементарних ниток ДНК за участю ензиму ДНК-полімерази. Даний етап реакції відбувається при температурі 72°C впродовж 20-40 секунд. Скопійовані ділянки ДНК підлягають ідентифікації за допомогою методу електрофорезу або інших методів [20, 21]. ПЛР має високу діагностичну чутливість та швидко виконується. Однак, саме висока чутливість цього методу може обмежувати його широке застосування в діагностиці мікозів ЛОР-органів, оскільки наявність мінімальної кількості ДНК гриба, як представника мікробіоценозів слизових оболонок та шкіри людини, обумовлює хибно (помилково) позитивний результат. Також не можна виключити можливість контамінації зразків під час підготовки та прове-

дення дослідження. Актуальним залишається питання визначення чутливості мікроорганізмів до антимікробних засобів та рівня МІК, а також оцінки життєздатності виявленого збудника.

Проблему кількісного визначення патогена допомагає вирішити ПЛР в режимі реального часу. Це кількісна ПЛР (англ. *real-time PCR*) – лабораторний метод, що базується на стандартній ПЛР та використовується для одночасної ампліфікації та визначення кількості даної молекули ДНК. Основна відмінність від типової ПЛР полягає в тому, що вимірюється кількість ампліфікованої ДНК в реальному часі після кожного циклу ампліфікації. Для кількісного визначення використовують флуоресцентні барвники і модифіковані олігонуклеотиди, які флуоресціюють після гібридизації з комплементарними ділянками ДНК. Для ПЛР в реальному часі випускають прилади, що оснащені флуоресцентним детектором. Процедура детекції подібна до класичної ПЛР, однак ідентифікація ПЛР-продукту відбувається в міру його накопичення. Таким чином, флуоресценція підсилюється з кожним новим циклом [32, 33, 34, 35].

Перспективним методом ідентифікації як існуючих видів мікроорганізмів, так і нових, є секвенування. Перша концепція секвенування була запропонована Сенгером (Sanger F.) в 1977 році та відома під назвою «метод обриву ланцюга». Сутність методу полягає у визначенні послідовності нуклеотидів ДНК. За розробку цього методу Сенгеру в 1980 році була присуджена Нобелівська премія. Також в 1977 році Максам та Гілберт (Maxam A.M. and Gilbert W.A.) розробили альтернативний метод, який отримав назву «метод хімічної деградації». Необхідність у масовому якісному та швидкому секвенуванні стимулювала появу численних модифікацій даних методів [35]. Розробка та впровадження ПЛР, а також автоматизація основних етапів «зчитування» ДНК спонукало до розвитку методу секвенування нового покоління (*next-generation sequencing*, NGS). Головною перевагою є можливість багаторазового «прочитання» кожної молекули ДНК, що суттєво підвищує точність ідентифікації генетичних змін. Разом з тим, даний метод дозволяє за один запуск приладу зібрати декілька геномів мікроорганізмів у випадку виділення їх ДНК з чистих культур, а також визначити видовий склад мікробіоти окремого біотопу. Процес секвенування на платформах NGS складається з декількох етапів. На першому етапі здійснюють процес підготовки «бібліотеки» ДНК, який включає фрагментування ДНК за допомогою ферментів або ультразвуку з подальшим приєднанням до цих фрагментів універсальних олігонуклеотидних адаптерів відомої послідовності і індексів за допомогою ПЛР. Адаптери необхідні для подальшої ампліфікації фрагментів. Другий етап полягає у проведенні ампліфікації кожного фрагмента ДНК методом ПЛР. Фрагмент ДНК за допомогою послідовності адаптера гібридується з одним або двома праймерами, які іммобілізо-

вані на твердій поверхні (мікрокулька або скляний чіп) та приймають участь в ПЛР. Через чіп пропускається реакційна суміш, що містить набір фрагментів для секвенування. В подальшому відбувається автоматичне покрокове зчитування кожного типу нуклеотиду і детекція результатів. Насьогодні на світовому ринку представлені різні платформи NGS виробників Roche (Швейцарія), Illumina (США), Life technologies (США), які використовують різні технологічні підходи: секвенування шляхом синтезу (Sequencing by Synthesis) секвенування шляхом лігування (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection) [20, 35, 36].

Таким чином, в діагностиці мікотичних уражень ЛОР-органів насьогодні є великий арсенал новітніх, високоточних, інформативних методів, які дозволяють проводити ідентифікацію збудника та його кількісну оцінку, визначати чутливість патогена до антимікробних препаратів та їх МК, встановлювати видовий склад мікробних асоціацій, розшифровувати геноми нових видів мікроорганізмів тощо. Впровадження в клінічну практику комплексу класичних та сучасних діагностичних технологій повинно стати еталоном діагностики грибкових захворювань не тільки верхніх дихальних шляхів та вуха, а й інших біотопів макроорганізму людини.

Література

- Kunel'skaja VJa, Shadrin GB, Machulin AI, Krasnikova DI, Andreenkova OA. Obshhie principy klinicheskoy i mikrobiologicheskoy diagnostiki mikoza verhnih dyhatel'nyh putej i uha [General principles of clinical and microbiological diagnosis of mycosis of the upper respiratory tract and ear]. Problemy medicinskoj mikologii. 2019; 21(2)(Materialy Vseros. nauch.-prakt. konf. po med. mikrobiologii i klinicheskoy mikologii (XXII Kashkinskie chtenija): tez. dokl.):91. (Russian).
- Kunel'skaja VJa, Shadrin GB, Machulin AI, Krasnikova DI, Andreenkova OA. Jepidemiologicheskie aspekty mikoza LOR-organov [Epidemiological aspects of mycosis of ENT organs]. Problemy medicinskoj mikologii. 2016;18(2)(Materialy Vseros. nauch.-prakt. konf. po med. mikrobiologii i klinicheskoy mikologii (XIX Kashkinskie chtenija): tez. dokl.):83. (Russian).
- Bezshapochnyj SB, Zachepilo SV, Poljanskaja VP, Bobrova NA, Fedorchenko VI. Opportunisticheskie mikozy LOR-organov [Opportunistic mycoses of ENT organs]. P.1. Vestn. otorinolaringol. 2018; 83(6):67-71. <https://doi.org/10.17116/otorino20188306167> (Russian).
- Kunel'skaja VJa, Shadrin GB, Machulin AI, Krasnikova DI, Andreenkova OA. Jepidemiologija gribovyh zabolevanij LOR-organov [Epidemiology of fungal diseases of the ENT organs]. Uspehi medicinskoj mikologii. 2018; 18:404-5. (Russian).
- Bezshapochnyj SB, Zachepilo SV, Poljanskaja VP, Bobrova NA, Fedorchenko VI. Opportunisticheskie mikozy LOR-organov [Opportunistic fungal infections of ENT organs]. P.2. Vestn. otorinolaringol. 2019; 84(3):74-81. <https://doi.org/10.17116/otorino20198403174> (Russian).
- Minuhin VV, Zamazij TN, Kovalenko NI. Opportunisticheskie mikozy [Opportunistic mycoses]: metod. ukaz. Har'kov: HNMU; 2016. 56 p. (Russian).
- Kunel'skaja VJa, Shadrin GB, Machulin AI. Lechebno-diagnosticheskij algoritm pri gribovom porazhenii uha [Treatment and diagnostic algorithm for fungal infection of the ear]. Problemy medicinskoj mikologii. 2016; 18(2)(Materialy Vseros. nauch.-prakt. konf. po med. mikrobiologii i klinicheskoy mikologii (XIX Kashkinskie chtenija): tez. dokl.):84. (Russian).
- Ankiefiev IB, Kubrak DN, Balmasova IP, Shestakova IV, Jushhuk ND. Opportunisticheskie infekcii nebakterial'noj prirody kak prichina letal'nyh ishodov u vich-inficirovannyh pacientov [Opportunistic infections of non-bacterial nature as a cause of deaths in HIV-infected patients]. P. II. Mikozy. VICH-infekcija i immunosupressii. 2015; 7(4):17-27. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2015-7-4-17-27> (Russian).
- Sergeev AJu, Sergeev JuV. Gribovyje infekcii. Rukovodstvo dlja vrachej [Fungal infections. A guide for physicians]. 2th ed. Moskva: Izdatel'stvo BINOM; 2008. 480 p. (Russian).
- Kunel'skaja NL, Izotova GN, Kunel'skaja VJa, Shadrin GB, Krasnikova DI, Andreenkova OA. Faringomikoz. Diagnostika, profilaktika i lechenie [Pharyngomycosis. Diagnostics, prevention and treatment]. Medicinskij sovet. 2013; 2:42-5. (Russian).
- Shkarin VV, Kovalishena OV, Saperkin NV, Shprytkova ON. Obshhaja harakteristika i problemnye voprosy polijetiologicheskij infekcij, vyzyvaemyh uslovno patogennymi mikroorganizmami [General characteristics and issues mixed infections caused by opportunistic microorganisms]. Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunobiologii. 2017; 6:114-26. (Russian).
- Mitrofanova NN, Mel'nikov VL. Osobennosti mikrobnovyh asociacij pri gnojno-septicheskij infekcijah v otdelenii ranevoj infekcii mnogoprofil'nogo stacionara [Features of microbial associations in purulent septic infections in a wound infection department of a multidisciplinary hospital]. Izvestija vysshih uczebnyh zavedenij. Povolzhskij region. 2013; 3:154-63. (Russian).
- Brogden KA, Guthmiller JM, editors. Polymicrobial diseases. Washington: ASM Press; 2002. 446 p.
- Gutierrez E, Masia M, Rodriguez JC. Community-acquired pneumonia of mixed etiology: prevalence, clinical characteristics, and outcome. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2005; 24:377-83.
- Boichuk AV. Mikst-infektsiia y hinekolohii ta suchasni pidkhoty do yij likuvannia [Mixed infection in obstetrics and gynecology and modern approaches to its treatment]. Medicina neotlozhnyh sostojanij. 2015; 6(69):92-5. (Ukrainian).
- Gurov AV, Jushkina MA. Osobennosti mikrobnogo pejzazha i problemy antibakterial'noj terapii vospalitel'nyh zabolevanij LOR-organov u bol'nyh saharnym diabetom [The peculiar features of the microbial paysage and the problems of antibacterial therapy of the inflammatory ent diseases in the patients presenting with diabetes mellitus]. Vestn. otorinolaringol. 2018; 83(1):59-61. DOI: 10.17116/otorino201883159-61 (Russian).
- Shljaga ID, Red'ko DD, Jadcenko ES. Principy lechenija mikozy v otorinolaringologii [Principles of treatment of mycoses in otorinolaryngology]. Med. zhurn. 2014; 1:49-53. (Russian).
- Mosihin SB, Reshel' LI, Bezbrjazov AV, Pokrovskaja EM, Bajazitova LT. Mikroflora sluhovogo prohada pri naruzhnyh otitah [The microflora of the auditory canal in otitis externa]. Prakticheskaja medicina. 2016; 2(94(2)):18-23. (Russian).
- Taraskina AE, Pchelin IM, Ignat'eva SM, Spiridonova VA, Uchevatkina AE, Filippova LV, et al. Molekuljarnogeneticheskie metody opredelenija i vidovoj identifikacii gribov porjadka mucorales v sootvetstvii s global'nyimi rekomendacijami po diagnostike i terapii mukormikoza (obzor literatury) [Mucorales in accordance with the global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis (literature review)]. Problemy medicinskoj mikologii. 2020; 22(1):3-14. (Russian).
- Glushanova NA, Blinov AI, Alekseeva NB. Mass-spektrometricheskaja identifikacija mikroorganizmov [Mass spectrometric identification of microorganisms]. In: Medicina v Kuzbasse. 2015; Spec. vyp. № 2: Klinicheskie i diagnosticheskie osobennosti vedenija pacientov, odnosjashihhsja k kontingentu osobogo vnimanija. Materialy regional'noj nauch.-prakt. konf., posvjashhennoj 70-letiju Pobedy; 2015 apr. 27; Novokuzneck. Novokuzneck; 2015, p. 36-41. (Russian).
- Lagun LV. Metody mikrobiologicheskij issledovanij: uczebno-metod. posob. [Microbiological research methods: teaching method. manual]. Gomel'; 2016. 164 p. (Russian).
- Engelkirk PG, Engelkirk JD. Laboratory diagnosis of infection diseases. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2012. 754 p.
- Pripitnevich TV, Melkumjan AR. Mass-spektrometrija – novoe slovo v klinicheskoy mikrobiologii [Mass spectrometry - a new word in clinical microbiology]. Klinicheskaja laboratornaja diagnostika. 2016; 61(12):842-8. (Russian).
- Champer J, Ito JI, Clemons KV, Stevens DA, Kalkum M. Proteomic Analysis of Pathogenic Fungi Reveals Highly Expressed Conserved Cell Wall Proteins. Fungi. 2016; 2(1):4-6. DOI: 10.3390/f02010006
- Lin J, Ge M, Liu T, Chang S, Lu J. A simple method for rapid microbial identification from positive monomicrobial blood culture bottles through matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. J Microbiol Immunol Infect. 2018; 51(5):659-65. DOI: 10.1016/j.jmii.2017.03.005
- Rjabinin IA. Mass-spektrometrija v vidovoj identifikacii vzbuditelej bakterial'nyh i gribovyh infekcij. Modul' [Mass-spectrometry in the specific identification of pathogens of bacterial and fungal infections. Module]. [Internet]. Moskva: GJeOTAR-Media; 2016. Available from: <https://www.rosmedlib.ru/book/1MECH-0006.html> (Russian).
- Sung JJ, Park KG, Han K, Park DJ, Park YJ. Direct Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria From Positive Blood Culture Bottles by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry and the Vitek 2 System. Ann Lab Med. 2016; 36:117-23. DOI:10.3343/alm.2016.36.2.117
- Reiss E, Shadomy HJ, Lyon GM, Editors. Fundamental Medical Mycology. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2010. III Chapter 2. Laboratory diagnostic methods in medical mycology. Genetic identification of fungi; p. 350-1.

29. Springer J, McCormick Smith I, Hartmann S, Winkelmann R, Wilmes D, Cornely O, et al. Identification of *Aspergillus* and *Mucorales* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples: Comparison of specific and broad-range fungal qPCR assays. *Med. Mycology*. 2019; 57:308-13. doi: 10.1093/mmy/myy041
30. Khot PD, Ko DL, Fredricks DN. Sequencing and analysis of fungal rRNA operons for development of broad-range fungal PCR assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75(6):1559-65. doi: 10.1128/AEM.02383-08
31. Hammond SP, Bialek R, Milner DA, Petschnigg EM, Baden LR, Marty FM. Molecular methods to improve diagnosis and identification of mucormycosis. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(6):2151-3. doi: 10.1128/JCM.00256-11
32. Landlinger C, Preuner S, Baskova L, van Grotel M, Hartwig NG, Dworak M, et al. Diagnosis of invasive fungal infections by a real-time panfungal PCR assay in immunocompromised pediatric patients. *Leukemia*. 2010; 24(12):2032-8. doi:10.1038/leu.2010.209
33. Millon L, Larosa F, Lepiller Q, Legrand F, Rocchi S, Daguindau E, et al. Quantitative polymerase chain reaction detection of circulating DNA in serum for early diagnosis of mucormycosis in immunocompromised patients. *Clin. Infect. Dis.* 2013; 56(10):95-101. doi: 10.1093/cid/cit094
34. Kumar CM, Mugunthan M, Kapoor CR, Pandlanghat CS. Speciation of fungi using real time PCR with molecular beacons: Can we solve the enigma of diagnosis of invasive fungal disease. *Med. J. Armed. Forces. India*. 2019; 75:41-9. doi: 10.1016/j.mjafi.2017.12.003
35. Kardymon OL, Kudryavceva AV. Molekularno-geneticheskie metody dlja issledovanija mikrobioma kishhechnika [Molecular genetic methods for intestinal microbiome investigation]. *Rossijskij zhurnal gastrojenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2016; 26(4):4-13. <https://doi.org/10.22416/1382-4376-2016-26-4-4-13> (Russian).
36. Alekseeva AE, Brusnigina NF. Vozmozhnosti i perspektivy metodov massivnogo parallel'nogo sekvenirovaniya v diagnostike i jepidemiologicheskom nadzore za infekcionnymi zabolevanijami [Possibilities and prospects of massive parallel sequencing methods in the diagnosis and epidemiological surveillance.

Реферат

СОВРЕМЕННЫЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ В ДИАГНОСТИКЕ МИКОЗОВ ЛОР-ОРГАНОВ.

Зачевило С.В.

Ключевые слова: оппортунистические микозы, диагностика, молекулярно-генетические методы, идентификация

В обзоре освещены новейшие подходы к решению одной из важных проблем современной оториноларингологии - диагностики оппортунистических микозов верхних дыхательных путей и уха. Оппортунистические микозы ЛОР-органов в последние десятилетия являются важной проблемой современной клинической медицины не только в Украине, но и во всем мире. По данным научной литературы, доля грибковых поражений уха и верхних дыхательных путей в структуре хронических воспалительных заболеваний данных биотопов составляет 22,1%. Основными возбудителями микотических поражений ЛОР-органов являются условно-патогенные грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* и дрожжеподобные грибы рода *Candida*, которые характеризуются низким уровнем патогенности, а также входят в состав резидентной микрофлоры макроорганизма. Классические методы микробиологической диагностики имеют определенные ограничения в идентификации микромицетов. Поэтому применение в клинической практике более надежных, быстрых и точных методов будет способствовать своевременному и эффективному лечению грибковых заболеваний ЛОР-органов. В данной работе изложен анализ современных микробиологических диагностических технологий, таких как биохимическая детекция микроорганизмов с помощью идентификационных планшетных тест-систем (API RapID, CrystalTM), полуавтоматическая и автоматическая микробиологическая идентификация с помощью анализаторов VITEK, VITEK 2, Walk Away. Идентификация возбудителей грибковой инфекции также может проводиться за счет осуществления прямого белкового профилирования с использованием метода масс-спектрометрии, полимеразной цепной реакции и секвенирования. Указанные методы с высоким уровнем достоверности позволяют идентифицировать возбудителя, а также оценить его чувствительность к химиотерапевтическим препаратам. Применение комплекса классических и современных микробиологических технологий должно стать эталоном диагностики грибковых заболеваний различных биотопов человека, в том числе верхних дыхательных путей и уха.

Summary

MODERN MICROBIOLOGICAL TECHNOLOGIES IN DIAGNOSIS OF MYCOSES IN OTORHINOLARYNGOLOGICAL PRACTICE

Zachepilo S.V.

Key words: opportunistic mycoses, diagnostics, molecular genetic methods, identification

The review article highlights the latest approaches to solve one of the important problems of modern otorhinolaryngology, the diagnosis of opportunistic mycoses of the upper respiratory tract and ear. Opportunistic mycoses of the ENT organs in recent decades have posed a significant challenge for modern clinical medicine not only in Ukraine but also throughout the world. According to the scientific literature, the share of fungal lesions of the ear and upper respiratory tract in the structure of chronic inflammation of these organs makes up 22.1%. The main causative agents of mycotic lesions of the ENT organs are opportunistic fungi of the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* and yeast-like fungi of the genus *Candida*, which are characterized by a low level of pathogenicity and are a part of the resident microflora of the macroorganism. Classical methods of microbiological diagnosis have certain limitations in the identification of micromycetes. Therefore, the use of more reliable, fast and accurate methods in clinical practice will contribute to the timely and effective treatment of fungal diseases of the ENT organs. This review presents an analysis of modern microbiological diagnostic technologies, such as biochemical detection of microorganisms using identification plate test systems (API RapID, CrystalTM), semi-automatic and automatic microbiological identification using analyzers VITEK, VITEK 2, Walk Away. Identification of fungal pathogens can also be performed by performing direct protein profiling using mass spectrometry, polymerase chain reaction and sequencing. These methods with the highest level of reliability enable to identify the pathogen, as well as to assess its sensitivity to chemotherapeutic drugs. The combination of classical and modern microbiological technologies should become a standard for the diagnosis of fungal diseases, including the upper respiratory tract and ear.