

Некультуральные методы диагностики грибковых кератитов

К.И. Бельская^{1,2}, А.С. Обрубов²

¹ ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва

² ГБУЗ «ГКБ им. С.П. Боткина» ДЗ Москвы, филиал № 1 «Офтальмологическая клиника», Москва

РЕЗЮМЕ

Культуральные методы диагностики грибковой инфекции являются наиболее проверенными во времени и точными, однако требуют довольно длительного периода для получения информации. Некультуральные методы диагностики являются более оперативными, в связи с чем могут использоваться для экспресс-диагностики инфекционных заболеваний роговицы. В обзоре обобщены возможности самых распространенных некультуральных методов диагностики грибковой инфекции, а именно прямая микроскопия с использованием различных красителей, оптическая когерентная томография, конфокальная микроскопия, полимеразная цепная реакция и масс-спектрометрия. Отражены преимущества и недостатки каждого из методов диагностики, обозначены материалы, используемые для исследования, а также вопросы визуальной идентификации. Дана оценка их применения в реальной клинической практике и перспектив развития. На основе данных литературы можно сделать заключение, что ни один из представленных методов не является эталонным. Для наиболее точной диагностики предпочтительнее использовать комбинации различных методик. Диагностика грибковой инфекции глаз требует дальнейших разработок.

Ключевые слова: грибковый кератит, инфекции роговицы, прямая микроскопия, конфокальная микроскопия, оптическая когерентная томография, полимеразная цепная реакция, масс-спектрометрия.

Для цитирования: Бельская К.И., Обрубов А.С. Некультуральные методы диагностики грибковых кератитов // РМЖ «Клиническая офтальмология». 2018;1:37–41.

ABSTRACT

Non-cultural diagnostic methods of fungal keratitis

Belskaia K. I.^{1,2}, Obrubov A. S.²

¹ Pirogov Russian National Research Medical University

² City Clinical Hospital named after S.P. Botkin, Branch № 1, Ophthalmological hospital, Moscow

Cultural diagnostic methods are the most accurate and time-proven, but also time-consuming. Non-cultural methods of diagnostics are more rapid and therefore can be used as express diagnostic tests for infectious diseases of cornea. In this review the possibilities of common diagnostic methods of fungal infection have been summarized such as direct microscopy using different types of dyes, optical coherent tomography, polymerase chain reaction and mass spectrometry. The review also considers the advantages and disadvantages of each of the methods, describes materials used in the investigation as well as the problems of visual identification. It evaluates the possibilities of their application in clinical experience and prospects of their further development.

Together these studies provide that none of the above-mentioned methods of diagnostics is the etalon. For more accurate diagnostics an ophthalmologist should better use a combination of diagnostic methods. The diagnostics of eye fungal infection needs further development.

Key words: fungal keratitis, corneal infections, direct microscopy, confocal microscopy, optical coherence tomography, polymerase chain reaction, mass spectrometry.

For citation: Belskaia K.I., Obrubov A.S. Non-cultural diagnostic methods of fungal keratitis // RMJ "Clinical ophthalmology". 2018;1:37–41.

Грибковая инфекция глаз представляет собой одну из непростых проблем в современной офтальмологии, может привести не только к слепоте, но и к потере глаза как органа. В последние годы частота грибковых кератитов значительно возросла [1]. На сегодняшний день описаны более 105 видов грибов, способных стать причиной развития офтальмомикозов, в т. ч. более 70 видов могут вызывать развитие грибковых кератитов [2–4]. Основными методами микробиологической диагностики в настоящее время остаются культуральные методы. Однако их недостатками являются длительность исследования, высокие требо-

вания к забору материала, повышенные требования к квалификации персонала лабораторий. В реальной клинической практике у врача, сталкивающегося с тяжелой инфекцией глаз, часто нет времени для ожидания результатов, ему требуются минимально затратные по времени методы диагностики для адекватного подбора этиотропной терапии. Бурное развитие молекулярной биологии и техники значительно расширило возможности диагностики инфекций глаз.

К основным некультуральным методам подтверждения диагноза грибкового кератита на сегодняшний день относятся прямая микроскопия образца, полученного с очага

поражения, конфокальная микроскопия роговицы, а также современные молекулярные методы исследования. Ценным дополнительным методом диагностики может быть оптическая когерентная томография переднего отрезка глаза.

Прямая микроскопия

Самым быстрым методом выявления возбудителя в образце является метод прямой микроскопии с применением различных методов окраски [5–8]. Полезными могут быть также методы окрашивания Шифф-йодной кислотой [9, 10] и акридиновым оранжевым [11], модифицированный метод окраски по Цилю — Нильсену [12] и др. [10, 13, 14].

При микроскопии образца оцениваются вид мицелия, конидии (для грибов-конидиеносцев), гифы и их взаиморасположение с оплодотворяющими органами грибов. Существует ряд трудностей, с которыми можно столкнуться при идентификации этиологического агента с помощью прямой микроскопии образца. Основными сложностями данного метода являются неверная интерпретация результатов, наличие артефактов, редкое выявление грибов рода *Candida* и других дрожжеподобных грибов [15–17]. Также метод прямой микроскопии требует обязательного предварительного окрашивания. Если в образец не были добавлены специальный контраст или красящий агент, то грибы будут визуализироваться как бесцветные структуры на окрашенном фоне, их идентификация будет затруднена [17–19].

Основными материалами, служащими источником для прямой микроскопии, являются:

- стерильный материал на ватном тампоне или мазок, собранный посредством оттиска кальциевой альгинатной массой, с конъюнктивы и век обоих глаз [20];
- соскоб с роговицы, собранный с помощью шпателя Kimura, лезвием Bard — Parker, стерильным бритвенным лезвием, хирургическими лезвием или шпателем. Манипуляции проводятся под местной анестезией [20, 21]. Материал для микроскопии собирают с основания и краев язвы;
- контактные линзы, контейнеры для линз и многофункциональный раствор для линз [22];
- материал роговицы, полученный при выполнении сквозной или послойной кератопластики [1, 15];
- биоптат роговицы [23, 24].

Биопсия роговицы может быть эффективнее соскобов при глубоком расположении инфильтрата в строме роговицы и отсутствии обширного эпителиального дефекта [23, 24].

Чувствительность и специфичность метода прямой микроскопии достигают 90% [25, 26].

Рассмотрим подробнее основные методы окрашивания для исследования методом прямой микроскопии.

ФИКСАЦИЯ РАСТВОРОМ ГИДРОКСИДА КАЛИЯ

По данным разных авторов, чувствительность метода составляет 71% [27], 81% [8, 15], 90–91% [5]. Специфичность микроскопии с фиксацией гидроксидом калия — 83,8% [8]. Данный метод является экономичным, требующим всего одного-двух этапов подготовки. К преимуществам использования гидроксида калия относится прокрашивание даже толстых образцов роговицы, что обеспечивает контрастность грибковой структуры относительно фона [17]. Метод фиксации раствором гидроксида калия с последующей микроскопией позволяет получить результат уже через 10–15 мин от момента взятия образца материала [16].

К недостаткам метода относится достаточно большая частота выявления артефактов [27]. Клетки толстого образца роговицы могут быть недостаточно прозрачными для точной микроскопии. Окрашивающийся гидроксидом калия препарат имеет короткий срок годности. Оптимальным временем для исследования является период в пределах 12–18 ч с момента взятия образца [17].

Грибы-филаменты визуализируются как отражающие свет гифы, с перегородками или без них. Гифы могут быть одинарными или разветвленными. Для феоидных грибов характерен коричневый цвет филаментов, появляющийся вследствие накопления меланина в клеточной стенке. Дрожжи и дрожжеподобные грибы имеют овальную или круглую форму, часто обесцвечены. Возможно образование псевдогифов, которые необходимо дифференцировать с клетками эпителия [28].

МЕТОД ОКРАСКИ ПО ГРАМУ

По данным различных авторов, чувствительность метода окраски по Граму колеблется от 36 до 73% [2, 6, 21, 26]. Специфичность метода составляет 84,9% [26]. Окрашивание по Граму позволяет хорошо визуализировать как клетки дрожжеподобных грибов, так и гифы грибов-филаментов. В случае микст-инфекции бактерии также могут быть идентифицированы в материале. Для получения результата требуется от 15 до 30 мин [16].

К недостаткам метода относится неравномерная окраска цитоплазмы гифов грибов. Метод неэффективен при окрашивании толстых образцов взятого материала. Возможно наличие ложноположительных результатов вследствие возникновения артефактов. Кроме того, преципитаты краски могут привести к неправильной интерпретации результатов [17].

Грибы-филаменты подразделяются на грамположительные и грамотрицательные. Грамположительные нитчатые грибы представляются фиолетовыми (синими), грамотрицательные — розовыми. Все дрожжеподобные грибы являются грамположительными, имеют овальную или округлую форму [28].

МЕТОД ОКРАСКИ ПО ГИМЗЕ

Чувствительность метода оценивается от 39,7% [15] до 66% [29].

При окрашивании по Гимзе приобретает цвет только цитоплазма клетки, клеточная стенка остается интактной. Споры выглядят более мелкими, чем при окрашивании другими методами.

ОКРАШИВАНИЕ ЛАКТОФЕНОЛОМ ХЛОПКОВЫМ ГОЛУБЫМ

Чувствительность метода составляет 77–82% [6, 8]. Окрашивание лактофенолом хлопковым голубым является быстрым (приготовление препарата занимает 5 мин [6]), простым, недорогим, одноступенчатым методом окраски, который позволяет выявить все основные виды грибов [17]. Окрашивание лактофенолом позволяет также обнаружить наличие цист *Acanthamoeba* [30]. Метод коммерчески выгоден: краситель имеет длительный срок хранения и может храниться годами [17].

Однако лактофенол хлопковый голубой плохо проникает в ткани, что приводит к затруднению в использовании на толстых образцах взятого материала. Контраст между прокрашенным грибом и фоном может быть недостаточным для идентификации, поэтому нетипичные виды грибов могут быть упущены [6, 17].

Гифы и конидии визуализируются черными или темно-коричневыми на голубом фоне [28].

ОКРАШИВАНИЕ КРАСИТЕЛЕМ МЕТЕНАМИН-СЕРЕБРО ПО ГОМОРИ

Чувствительность метода составляет 85–86% [16, 21]. Клеточные стенки грибов и перегородки ярко очерчены и хорошо видны на бледном фоне, что повышает вероятность идентификации вида гриба. Элементы гриба окрашиваются в цвет от серебристого до черного и хорошо видимы в слое образца ткани [28]. Помимо грибов также могут идентифицироваться цисты *Acanthamoeba* и *Pneumocystis carinii* [17].

Недостатком такого метода является избыточное депонирование серебра в тканях, что может скрывать детали морфологии гриба. Прокрашивание клеточных включений и меланина может давать ложноположительные результаты и неправильную интерпретацию. Реагенты и процедура окрашивания не стандартизированы [17]. Процедура является многоступенчатой, требуя 2–3 ч для подготовки образца [16].

ОКРАШИВАНИЕ КАЛЬКОФЛУОРОМ БЕЛЫМ

Чувствительность метода составляет 80–90% [5]. Гифы грибов и клетки дрожжей визуализируются хорошо очерченными ярко-зелеными элементами на красно-коричневом фоне [28]. Несомненным преимуществом метода является возможность даже в толстых образцах взятого материала ясно различать детали морфологии грибов. Также могут визуализироваться цисты *Acanthamoeba* и *Pneumocystis carinii* [16, 31]. Метод окрашивания является двухэтапным. Время подготовки образца для микроскопии составляет 30 мин [16].

Одним из основных недостатков данного метода окраски является обязательное приготовление свежих реагентов перед каждым окрашиванием, в противном случае высока вероятность появления артефактов [32]. Кроме того, требуется наличие сложного оборудования — для визуализации необходимо использование ультрафиолетового микроскопа [16, 17]. Во время проведения микроскопии исследователь должен быть защищен от вредного воздействия ультрафиолета. Реагенты и процедура требуют стандартизации [17].

ОПТИЧЕСКАЯ КОГЕРЕНТНАЯ ТОМОГРАФИЯ

Оптическая когерентная томография (ОКТ) является современным методом визуализации переднего отрезка глаза. С помощью ОКТ можно проанализировать морфологию нормальной и пораженной инфекцией роговицы. Метод является неинвазивным, что позволяет использовать его не только для постановки диагноза, но и для наблюдения за состоянием роговицы в динамике [33].

Стромальные инфильтраты на ОКТ визуализируются гиперрефлексивными зонами в строме. Отек проявляется в виде диффузного утолщения стромы роговицы [34]. Метод ОКТ позволяет осуществлять контроль за толщиной роговицы в случае ее изъязвления или развития стромального отека. В случае экссудации в передней камере глаза воспалительные клетки выявляются в виде гиперрефлексивных плавающих точек или агрегатов на заднем эпителии роговицы, визуализирующихся при биомикроскопии как преципитаты [33]. В исследовании Y. Takezawa et al. (2017) было показано, что у большинства пациентов с грибковым кератитом наблюдается шероховатая линия раздела между задним эпителием и наложениями на нем, тогда как для бактериальных

кератитов характерна четкая граница раздела эндотелий — преципитаты, что может служить дополнительным маркером при определении этиологии заболевания [35].

КОНФОКАЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ

Конфокальная микроскопия (КМ) является методом диагностики *in vivo*, который позволяет исследовать передний сегмент глаза на различных уровнях и при различном масштабировании (возможно увеличение изображения в 200–500 раз) [36, 37]. Неинвазивность процедуры позволяет проводить повторные исследования для контроля лечения и оценки динамики заболевания [25]. КМ может использоваться для оценки глубоких стромальных инфильтратов роговицы, для которых невозможно проведение микроскопического или культурального исследования [37]. В исследованиях P.K. Vaddavalli et al. (2011) показано, что чувствительность метода составляет 88,3%, а специфичность — 91,1% [38]. КМ может быть полезна при получении пациентами активной антимикотической терапии, т. к. в этих случаях чувствительность культурального метода значительно снижается [38].

Различные виды и роды этиологических агентов имеют особенности визуализации при проведении КМ. Так, грибы родов *Fusarium* и *Aspergillus* представляются в виде высококонтрастных элементов шириной от 3 до 8 мкм и длиной 200–300 мкм [39]. Они имеют перегородки и двойной контур, постоянную форму и ширину, несимметричные ответвления. Обычно грибы-филаменты выглядят яркими линейными структурами, стенки которых параллельны друг другу [17, 38, 40]. Виды филаментов различаются между собой углом ветвления гифов: например, для грибов рода *Fusarium* характерен угол 90°, для рода *Aspergillus* — угол 45° [39]. Грибы рода *Candida* отличаются своими псевдогифами [41]. Они имеют вид высококонтрастных, удлинённых частиц длиной 10–40 мкм и шириной 5–10 мкм [39].

Помимо возбудителя заболевания с помощью КМ визуализируются воспалительные клетки вокруг очага инфекции, а также эпителиальная и стромальная дезорганизация, обусловленная активацией фибробластов [39].

Кроме грибковых частиц при помощи КМ можно выявить нервные волокна роговицы и оценить их состояние. В норме они визуализируются как яркие продолговатые единообразные (нервные волокна) или бусоподобные (суббазальные сплетения) структуры толщиной от 5 до 20 мкм, имеющие ответвления, отходящие под острым углом [37]. При повреждении нервов роговицы развивается нейротрофическая кератопатия, что приводит к дополнительному повреждению роговицы и к образованию в исходе заболевания грубого рубцового помутнения, которое может значительно снижать остроту зрения пациента [42, 43]. Такие дистрофические изменения характерны для течения грибковых кератитов [43].

Стоимость оборудования, низкая доступность метода в рутинной практике, необходимость обучения персонала для верной интерпретации результатов являются значительными ограничивающими факторами для проведения исследования КМ в широкой практике [37].

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

К молекулярным методам диагностики грибковых кератитов относятся полимеразная цепная реакция и масс-спектрометрия. Несомненными преимуществами данных методов являются оперативность и высокая точность получения информации об инфекционном агенте.

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является современным методом обнаружения компонентов ДНК инфекционного агента в образце ткани. ПЦР представляет собой ферментативную амплификацию участка ДНК. Для исследования достаточно даже небольшого количества ДНК этиологического агента (10 пг грибов рода *Candida*, 100 пг грибов-филаментов [44]), что является преимуществом для обнаружения патогенного организма, при культивировании которого возникают трудности. ПЦР-диагностика является быстрым методом диагностики, т. к. требует всего 2,5 ч для получения достоверного результата после извлечения ДНК из образца [45]. Материалами для проведения исследования могут служить: внутриглазная жидкость, слеза, «свежие» ткани глаза, формалин- или парафин-фиксированные ткани, окрашенные или неокрашенные цитологические срезы, из которых может быть получена ДНК [17]. Чувствительность метода ПЦР составляет 94%, специфичность — 64% [22]. Низкая специфичность обусловлена тем, что результат ПЦР может быть положительным даже в том случае, когда микроорганизм нежизнеспособен. Ложноположительные результаты составляют около 3% [2], что всегда нужно иметь в виду при оценке результата. В своем исследовании N. Menassa et al. показали, что у 1—8,3% пациентов без грибкового кератита методом ПЦР выявлялись ДНК различных видов грибов [46]. Тем не менее ПЦР — один из наиболее ценных методов диагностики кератомикозов, т. к. позволяет получить результат в короткие сроки [47, 48], а также может использоваться для обнаружения неспорообразующих грибов [49]. Из-за высокой чувствительности ПЦР-диагностика не может быть использована для оценки динамики заболевания и ответа на терапию вследствие невозможности определить жизнеспособность микроорганизмов. Наконец, при ПЦР можно идентифицировать только того возбудителя, для которого существуют праймеры и имеется известная последовательность ДНК. ПЦР не предоставляет информации о клеточном строении и локализации этиологического агента [50].

Из-за высокой стоимости и ограниченной доступности метода ПЦР некоторые авторы рекомендуют выполнять его не сразу при подозрении на грибковый этиологический агент, а в течение 1 нед. при отрицательном результате посева материала на питательных средах [22].

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ

Масс-спектрометрия является методом, позволяющим быстро идентифицировать и классифицировать микроорганизмы [51]. В основе метода масс-спектрометрии лежат получение масс-спектра рибосомальных белков исследуемого микроорганизма, являющихся высококонсервативными и видоспецифичными, и сравнение его с масс-спектрами, содержащимися в базе данных. Степень сходства выражается в относительных единицах, что позволяет сделать вывод о принадлежности микроорганизма к тому или иному виду [52].

В настоящее время существует три основных подхода к определению протеома клетки: 1) «классическая» стратегия «снизу вверх» основана на разделении белковых фракций с помощью ферментного гидролиза на мелкие фрагменты белковых молекул с последующим масс-спектрометрическим анализом пептидов; 2) метод «панорамной протеомики» основан на ферментном гидролизе комплексов белковых молекул с последующим отщеплением пептидов от ферментов с помощью капиллярного хрома-

тографа или электрофоретического сепаратора; 3) методика «сверху вниз» заключается в масс-спектрометрическом анализе изолированных фрагментированных протеинов, полученных с помощью комплекса процедур очистки [53]. Стоит также отметить, что дрожжеподобные грибы имеют толстую стенку, поэтому для их распознавания необходимо дополнительный этап разрушения клеточной стенки, аналогичный с протоколами идентификации бактериальных клеток [54].

Для определения этиологии кератита используют слезу пораженного глаза в качестве исследуемого материала и слезу контрлатерального глаза для контроля [55]. Для подтверждения грибковой этиологии кератита исследуют не только наличие рибосомальных белков и протеинов, выделяемых клеткой гриба в процессе метаболизма (например, количество глутаредоксина и глутаредоксин-связанных протеинов), но и количественное изменение белков слезы человека. Так, для кератомикозов характерны снижение количества прекурсора цистатина S, прекурсора цистатина SN, цистатина, липокалина слезы человека, а также увеличение количества пролактин-индуцированного протеина и прекурсора сывороточного альбумина [55].

Метод масс-спектрометрии является быстрым — результат может быть получен в течение 24 ч с момента взятия материала, что позволяет быстро назначить адекватную терапию. Метод имеет высокую специфичность (97%) и высокую чувствительность — для идентификации необходимо всего 10 пг протеома этиологического агента [56]. Однако одним из основных недостатков метода является отсутствие данных белковых профилей всех возможных микроорганизмов [57]. Это может привести к отрицательному или ложному результату исследования в случае развития кератита, вызванного редкими видами грибов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день в распоряжении врачей имеется множество путей для оперативной идентификации грибковой инфекции. Тем не менее ни один из представленных методов не является эталонным, и их применение в широкой практике крайне ограничено.

Использование красителей сопряжено с необходимостью организации рабочего места для проведения исследований (особенно при проведении исследований у неотложных пациентов), наличия опыта работы с ними как у офтальмолога, так и у микробиолога.

Инструментальные методы диагностики (ОКТ, КМ) являются неинвазивными и могут использоваться многократно у одного пациента, однако требуют большого опыта от исследователя для верной интерпретации получаемых изображений.

Для молекулярных методов диагностики характерна высокая чувствительность при относительно невысокой специфичности вследствие возможности получения ложноположительных результатов. Однако основными ограничениями их использования на сегодня являются высокая стоимость исследования, необходимость наличия сложного оборудования и обученного персонала. Кроме того, в настоящее время не накоплена база данных ДНК- и белковых профилей всех существующих микроорганизмов, в особенности возбудителей грибковой инфекции.

При использовании единственного метода исследования можно предположить наличие лишь наиболее вероятного возбудителя заболевания. Для наибо-

лее точной верификации предпочтительнее использовать комбинации различных методик в сочетании с традиционными культуральными методами диагностики. Проблема диагностики грибковой инфекции глаз требует дальнейших разработок и совершенствования.

Литература/References

- Vemuganti G.K., Garg P., Gopinathan U. et al. Evaluation of agent and host factors in progression of mycotic keratitis: A histologic and microbiologic study of 167 corneal buttons. *Ophthalmology*. 2002;109 (8):1538–1546.
- Thomas P.A. Fungal infections of cornea. *Eye*. 2003;17 (8):852–862.
- Wilson L.A., Ajello L. Agents of oculomycosis: fungal infections of the eye. London: Arnold, 1998;525–567.
- Kredics L., Narendran V., Shobana C.S., Vagvolgyi C., Manikandan P. Indo-Hungarian Fungal Keratitis Working G. Filamentous fungal infections of the cornea: a global overview of epidemiology and drug sensitivity. *Mycoses*. 2015; 58:243–260.
- Gopinathan U., Garg P., Fernandes M., Athmanathan S., Rao G.N. The epidemiological features and laboratory results of fungal keratitis: a 10-year review at a referral eye care center in South India. *Cornea*. 2002;21 (6):555–559.
- Thomas P.A., Kuriakose T., Kirupashanker M.P. Use of lactophenol cotton blue mounts of corneal scrapings as an aid to the diagnosis of mycotic keratitis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1991;14 (3):219–224.
- Zhang W., Yang H., Jiang L., Han L., Wang L. Use of potassium hydroxide, giemsa and calcofluor white staining techniques in the microscopic evaluation of corneal scrapings for diagnosis of fungal keratitis. *Journal of International Medical Research*. 2010;38 (6):1961–1967.
- Sharma S., Silverberg M., Mehta P. et al. Early diagnosis of mycotic keratitis: predictive value of potassium hydroxide preparation. *Indian J Ophthalmol*. 1998;46 (1):31–35.
- Vanzzini Zago V., Alcantara Castro M., Naranjo Tackman R. Support of the laboratory in the diagnosis of fungal ocular infections. *Int J Inflam*. 2012;2012:643104. 8 pages.
- Mittal R., Jena S.K., Desai A., Agarwal S. Pythium Insidiosum Keratitis: Histopathology and Rapid Novel Diagnostic Staining Technique. *Cornea*. 2017 Sep;36 (9):1124–1132.
- Kanungo R., Srinivasan R., Rao R.S. Acridine orange staining in early diagnosis of mycotic keratitis. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1991 Dec;69 (6):750–753.
- Joseph J., Murthy S., Garg P., Sharma S. Microscopic Evaluation of Corneal Scrapings using Different Stains for the Diagnosis of Microsporidial Keratitis. *J Clin Microbiol*. 2006, 22 (4): 583–585.
- Lan L., Wang F.Y., Zeng G. Staining with methylthioninium chloride for the diagnosis of fungal keratitis. *Exp Ther Med*. 2013 Nov;6 (5):1229–1232.
- Moemen D., Bedir T., Awad EA., Ellayeh A. Fungal keratitis: Rapid diagnosis using methylene blue stain. *EJBAS*. 2015;2:289–294.
- Rosa R.H., Miller D., Alfonso E.C. The changing spectrum of fungal keratitis in south Florida. *Ophthalmology*. 1994;101 (6):1005–1013.
- Rao N.A. A laboratory approach to rapid diagnosis of ocular infections and prospects for the future. *Am J Ophthalmol*. 1989;107 (3):283–291.
- Thomas P.A. Current perspectives on ophthalmic mycoses. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16 (4):730–797.
- Wong T.Y., Ng T.P., Fong K.S., Tan D.T. Risk factors and clinical outcome between fungal and bacterial keratitis: a comparative study. *CLAO J*. 1997;23 (4):275–281.
- Xie L., Dong X., Shi W. Treatment of fungal keratitis by penetrating keratoplasty. *Br J Ophthalmol*. 2001;85 (9):1070–1074.
- Jacob P., Gopinathan U., Sharma S., Rao G.N. Calcium alginate swabs versus Bard-Parker blade in the diagnosis of microbial keratitis. *Cornea*. 1995;14 (4):360–364.
- Liesegang T.J., Forster R.K. Spectrum of microbial keratitis in South Florida. *Am J Ophthalmol*. 1980;90 (1):38–47.
- Pouyeh B., Galor A., Miller D., Alfonso E.C. New horizons in one of ophthalmology's challenges: fungal keratitis. *Expert Rev Ophthalmol*. 2011;6 (5):529–540.
- Kompa S., Langefeld S., Kirchkof B., Schrage N. Corneal biopsy in keratitis performed with the microtrephine. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1999;237 (11):915–919.
- Alexandrakis G., Haimovici R., Miller D., Alfonso E.C. Corneal biopsy in the management of progressive microbial keratitis. *Am J Ophthalmol*. 2000;129 (5):571–576.
- Sharma S. Diagnosis of fungal keratitis: current options. *Expert Opin Med Diagn*. 2012;6 (5):449–455.
- Sharma S., Kunimoto D.Y., Gopinathan U. et al. Evaluation of corneal scraping smear examination methods in the diagnosis of bacterial and fungal keratitis. *Cornea*. 2002;21 (7):643–647.
- Chander J., Chakrabarti A., Sharma A., Saini J.S., Panigrahi D. Examination of calcofluor staining in the diagnosis of fungal corneal ulcer. *Mycoses*. 1993;36 (7–8):243–245.

- Prajna L., Vijayakumar, Prajna N.V., Srinivasan M. Aravind's Atlas of Fungal Corneal Ulcers: Clinical Features and Laboratory Identification Methods. India: Jaypee Brothers Medical Publishers, 2008:160.
- Radhakrishnan A. Fungal keratitis. *Kerala J Ophthalmol*. 2011;23 (1):20–24.
- Thomas P.A., Kuriakose T. Rapid detection of Acanthamoeba cysts in corneal scrapings by lactophenol cotton blue staining. *Arch Ophthalmol*. 1990;108 (2):168.
- Monheit J.E., Cowan D.F., Moore D.G. Rapid detection of fungi in tissues using calcofluor white and fluorescence microscopy. *Arch Pathol Lab Med*. 1984;108:616.
- Koch H.H., Pimsler M. Evaluation of Uvitex 2B. A nonspecific fluorescent stain for detecting and identifying fungi and algae in tissue. *Lab Med*. 1987;18 (9):603–606.
- Konstantopoulos A., Kuo J., Anderson D., Hossain P. Assessment of the use of anterior segment optical coherence tomography in microbial keratitis. *Am J Ophthalmol*. 2008;146 (4):534–542.
- Hixson A., Blanc S., Sowka J. Monitoring keratitis resolution with optical coherence tomography. *Optometry and Vision Science*. 2014;91:40–45.
- Takezawa Y., Suzuki T., Shiraishi A. Observation of retrocorneal plaques in patients with infectious keratitis using anterior segment optical coherence tomography. *Cornea*. 2017;36 (10):1237–1242.
- Kaufman S.C., Musch D.C., Belin M.W. et al. Ophthalmic technology assessment committee cornea panel. Confocal microscopy: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology*. 2004;111 (2):396–406.
- Das S., Samant M., Vaddavalli P.K., Vemuganti G.K. Role of Confocal Microscopy in Deep Fungal Keratitis. *Cornea*. 2009;28:11–13.
- Vaddavalli P.K., Garg P., Sharma S. et al. Role of confocal microscopy in the diagnosis of fungal and Acanthamoeba keratitis. *Ophthalmology*. 2011;118 (1):29–35.
- Brasnu E., Bourcier T., Dupas B. et al. In vivo confocal microscopy in fungal keratitis. *Br J Ophthalmol*. 2006;91 (5):588–591.
- Winchester K., Mathers W.D., Sutphin J.E. Diagnosis of Aspergillus keratitis in vivo with confocal microscopy. *Cornea*. 1997;16 (1):27–31.
- Chang H.Y., Chodosh J. Diagnostic and therapeutic considerations in fungal keratitis. *Int Ophthalmol Clin*. 2011;51 (4):33–42.
- Nishida T. Neurotrophic mediators and corneal wound healing. *The Ocular Surface*. 2005;3 (4):194–202.
- Kurbanyan K., Hoels L.M., Schrems W.A., Hamrah P. Corneal nerve alterations in acute Acanthamoeba and fungal keratitis: an in vivo confocal microscopy study. *Eye*. 2012;26 (1):126–132.
- Jaeger E.E., Carroll N.M., Choudhury S. et al. Rapid detection and identification of Candida, Aspergillus, and Fusarium species in ocular samples using nested PCR. *J Clin Microbiol*. 2000;38 (8):2902–2908.
- Goldschmidt P., Degorge S., Benallaoua D. et al. New strategy for rapid diagnosis and characterization of keratomycosis. *Ophthalmology*. 2012;119 (5):945–950.
- Menassa N., Bosshard P.P., Kaufmann C., Grimm C. Rapid detection of fungal keratitis with DNA-stabilizing FTA filter paper. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51 (4):1905–1910.
- Ferrer C., Colom F., Frases S. et al. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. *J Clin Microbiol*. 2001;39 (8):2873–2879.
- Ferrer C., Munoz G., Alio J.L., Abad J.L., Colom F. Polymerase chain reaction diagnosis in fungal keratitis caused by *Alternaria alternata*. *Am J Ophthalmol*. 2002;133 (3):398–399.
- Badenoch P.R. Pythium insidiosum keratitis confirmed by DNA sequence analysis. *Br J Ophthalmol*. 2001;85 (4):496.
- Rajeev B., Biswas J. Molecular biologic techniques in ophthalmic pathology. *Indian Journal of Ophthalmology*. 1998;46 (1):3–13.
- Chalupová J., Raus M., Sedlářová M., Sebel M. Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biotechnol Adv*. 2014;32 (1):230–241.
- Ломинадзе Г.Г., Семенова Е.А., Мотузова О.В., Калакучкая А.Н. Использование метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для ускорения идентификации микроорганизмов в гемокультурах пациентов с подозрением на сепсис. *Поликлиника*. 2014;1 (3):17–20 [Lominadze G.G., Semenova E.A., Motuzova O.V., Kalakuchkaja A.N. Using MALDI-TOF for accelerated identification of microorganisms in hemoculture of patients with suspected sepsis. *Poliklinika*. 2014;1 (3):17–20 (in Russ.)].
- Domon B., Aerborsold R. Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science*. 2006;312 (5771):212–217.
- Rizzato C., Lombardi L., Zoppo M., Lupetti A., Tavanti A. Pushing the Limits of MALDI-TOF Mass Spectrometry: Beyond Fungal Species Identification. *J Fungi*. 2015;1 (3):367–383.
- Ananthi S., Chitra T., Bini R., Prajna N.V., Lalitha P. Comparative analysis of the tear protein profile in mycotic keratitis patients. *Mol Vis*. 2008;12 (14):500–507.
- Leaw S.N., Chang H.C., Barton R., Bouchara J.P., Chang T.C. Identification of medically important Candida and non-Candida yeast species by an oligonucleotide array. *J Clin Microbiol*. 2007;45 (7):2220–2229.
- Brandt M.E., Lockhart S.R. Recent taxonomic developments with Candida and other opportunistic yeasts. *Curr Fungal Infect Rep*. 2012;6 (3):170–177.

Сведения об авторах: Бельская Ксения Игоревна — студентка 6-го курса педиатрического факультета ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России. 117997, Российская Федерация, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1; Обрубов Анатолий Сергеевич — к.м.н., врач-офтальмолог 4-го офтальмологического отделения № 1 «Офтальмологическая клиника» ГБУЗ «ГКБ им. С.П. Боткина» ДЗ г. Москвы. **Контактная информация:** Обрубов Анатолий Сергеевич, e-mail: as.obrubov@yandex.ru. **Прозрачность финансовой деятельности:** никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. **Конфликт интересов отсутствует.** Статья поступила 27.10.2017.

About the authors: Kseniia I. Belskaia — medical student of Pirogov Russian National Reserch Medical University. 1, Ostrovitianov str., Moscow, 117997, Russian Federation. Anatoly S. Obrubov — MD, Ph.D., ophthalmologist of City Clinical Hospital named after S.P. Botkin, Branch № 1. **Contact information:** Anatoly S. Obrubov, e-mail: as.obrubov@yandex.ru. **Financial Disclosure:** no author has a financial or property interest in any material or method mentioned. There is no conflict of interests. Received 27.10.2017.