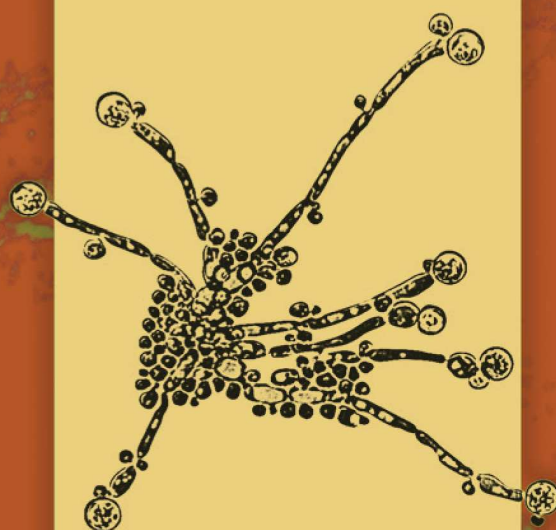


ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

Том 21 №4



Problems in medical mycology

Vol.21 №4

2019

ВСЕРОССИЙСКИЙ КОНГРЕСС ПО МЕДИЦИНСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ, ЭПИДЕМИОЛОГИИ, КЛИНИЧЕСКОЙ МИКОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ

XXIII КАШКИНСКИЕ ЧТЕНИЯ

9-11 июня 2020 г., Санкт-Петербург



Место проведения:

отель «Санкт-Петербург» (Пироговская набережная, дом 5/2).

Информация о конференции, предварительной регистрации, подаче тезисов на публикацию, заявке на выступление с устными докладами и участии в конкурсе молодых ученых на сайте <http://www.mycology.szgmu.ru>

Оргкомитет конгресса:

НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина

СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России

e-mail: mycocongress@szgmu.ru

тел./факс: +7 (812) 303-51-40

<http://mycology.szgmu.ru/congress>



EDITORIAL BOARD

Chief Editor —

N.V. Vasilyeva — Ph.D., prof. (Russia)

Deputies Chief Editor —

N.N. Klimko — M.D., prof. (Russia)

A.E. Taraskina — Ph.D. (Russia)

Responsible secretary —

T.S. Bogomolova — Ph.D. (Russia)

SCIENTIFIC EDITORIAL BOARD

J. Bennett — M.D. (USA), B. Dupont — M.D. (France), O.G. Hurzilava — M.D., prof. (Russia), V.I. Golubev — Ph.D. (Russia), K.P. Kashkin — M.D., academician of RAMS, prof. (Russia), Kolbin A.C. — M.D., prof. (Russia), V.I. Mazurov — M.D., academician of RAMS, prof. (Russia), S.M. Ozerskaya — Ph.D. (Russia), I. Polachek — M.D. (Israel), A.V. Samzov — M.D., prof. (Russia), S.V. Sidorenko M.V. — M.D., prof. (Russia), M.V. Shulgina — Ph.D. (Russia), H.J. Tietz — M.D. (Germany), M.A. Viviani — M.D. (Italy), V.A. Zinzerling — M.D., prof. (Russia), Yamaguchi M. — Ph.D. (Japan), Zhang F. — M.D. & Ph.D. (China)

PROBLEMS IN MEDICAL MYCOLOGY

Vol. 21, № 4, 2019

Kashkin Research Institute of Medical Mycology
© North-Western State Medical University
named after I.I. Mechnikov

ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

Том 21, № 4, 2019

Научно-исследовательский институт
медицинской микологии им. П.Н.Кашкина
© ФГБОУ ВО Северо-Западный
государственный медицинский университет
им. И.И. Мечникова Минздрава России

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор —

Н.В. Васильева — д.б.н., профессор (Россия),

Заместители главного редактора:

Н.Н. Клишко — д.м.н., профессор (Россия)

А.Е. Тараскина — к.б.н. (Россия)

Ответственный секретарь —

Т.С. Богомолова — к.б.н. (Россия)

НАУЧНО-РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Дж. Беннетт — доктор медицины (США),
М.А. Вивiani — доктор медицины (Италия),
В.И. Голубев — д.б.н. (Россия), Б. Дюпон —
доктор медицины (Франция), К.П. Кашкин —
д.м.н., академик РАМН, профессор (Россия),
Колбин А.С. — д.б.н., профессор (Россия),
В.И. Мазуров — д.м.н., акад. РАМН, профессор
(Россия), С.М. Озерская — д.б.н. (Россия),
И. Полачек — доктор медицины (Израиль),
А.В. Самцов — д.м.н., профессор (Россия),
С.В. Сидоренко — д.м.н., профессор (Россия),
Х-Й. Титц — доктор медицины (Германия),
О.Г. Хурцилава — д.м.н., проф. (Россия),
В.А. Цинзерлинг — д.м.н., профессор (Россия),
Чжан Ф. — доктор медицины (Китай),
М.В. Шульгина — д.б.н. (Россия), М. Ямагучи —
доктор медицины (Япония)

Проблематика журнала: Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской микробиологии — биология возбудителей, клиника, диагностика, эпидемиология, иммунитет, терапия и профилактика инфекций, микроорганизмы-контаминанты в лабораторных, клинических и других условиях.

Editorial policy: The Journal «Problems in Medical Mycology» specializes in original articles that describe innovative research on all aspects of Medical Microbiology — biology of pathogens, clinic, diagnostic, epidemiology, immunity, therapy and prophylaxis of infections, microorganisms — contaminants in laboratory, clinical and other conditions.

СОДЕРЖАНИЕ

ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ И ОБЗОРЫ

- Васильева Н.В., Степанова А.А., Богомолова Т.С., Босак И.А., Авдеенко Ю.Л., Чилина Г.А., Выборнова И.В., Аак О.В., Соловьева Г.И., Рябинин И.А., Павлова И.Э., Спиридонова В.А.* Цитологическое изучение возбудителя мукормикоза *Lichtheimia corymbifera* in vivo 3
- Герасимчук Е.В.* Современные возможности диагностики и наружной терапии онихомикоза (обзор литературы) 8

КЛИНИЧЕСКАЯ МИКОЛОГИЯ

- Диникина Ю.В., Шадривова О.В., Белогурова М.Б., Игнатъева С.М., Богомолова Т.С., Клишко Н.Н.* Первый случай успешного лечения хронического диссеминированного кандидоза у ребенка с интракраниальной герминогенно-клеточной опухолью: описание клинического наблюдения и обзор литературы 12
- Шагдилеева Е.В., Файзуллина Р.Р., Белова О.А., Кузнецова Т.Н., Воронович С.Э., Рубин Г.В., Воробьева С.К., Хонько В.С., Котина Н.З., Богомолова Т.С., Выборнова И.В., Колбин А.С., Клишко Н.Н.* Инвазивный кандидоз у новорожденных в Санкт-Петербурге: описание клинического случая и результаты проспективного исследования 17
- Хостелиди С.Н., Шагдилеева Е.В., Шадривова О.В., Сатурнов А.В., Калинина Е.Ю., Авдеенко Ю.Л., Медников С.Н., Клещев М.А., Степанова А.А., Тараскина А.Е., Игнатъева С.М., Клишко Н.Н.* Случай генерализованного сочетанного микоза на фоне острой респираторной вирусной инфекции 24
- Файзуллина Е.В., Хисматулина И.М., Гордеева А.М.* Лечение акне, осложненного сопутствующей микобией 30
- Хисматуллина З.Р., Альхашаш Субхи М.С.* Клинический случай распространенной нагноительной формы зооантропонозной трихофитии 34

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МИКОЛОГИЯ

- Игнатъева С.М., Спиридонова В.А., Богомолова Т.С., Авдеенко Ю.Л., Борзова Ю.В., Хостелиди С.Н., Шадривова О.В., Попова М.О., Чудиновских Ю.А., Зюзгин И.С., Успенская О.С., Васильева Н.В.* Апробация мультиплексной тест-системы «HRM-Zygo-Asp» на клиническом материале больных мукормикозами 36
- Степанова А.А., Богданова Т.В., Родченко Ю.В., Мелкумян А.Г., Любасовская Л.А., Игнатъева С.М., Алексеев А.Ю., Гольцева И.С., Босак И.А., Пчелин И.М.* Морфологические особенности дрожжевых клеток изолятов *Malassezia furfur* (C.P. Robin) Baill. 43
- Цурупа Е.Н., Рябинин И.А., Котрехова Л.П., Чилина Г.А., Васильева Н.В., Разнатовский К.И.* Морфологический полиморфизм *Scopulariopsis brevicaulis* – возбудителя онихомикоза, проблемного для терапии 48
- Халдеева Е.В., Лисовская С.А., Глушко Н.И.* Микобиота кожных покровов и шерсти домашних животных как потенциальный источник возбудителей дерматомикозов 54

CONTENTS

PROBLEM ARTICLES AND REVIEWS

- Vasilyeva N.V., Stepanova A.A., Bogomolova T.S., Bosak I.A., Avdeenko Y.L., Chilina G.A., Vybornova I.V., Aak O.V., Solovieva G.I., Ryabinin I.A., Pavlova I.E., Spiridonova V.A.* Cytological study of the causative agent of mucormycosis *Lichtheimia corymbifera* in vivo 3
- Gerasimchuk E.V.* Update on current approaches to diagnosis and treatment of onychomycosis (literature review) 8

CLINICAL MYCOLOGY

- Dinikina Y.V., Shadrivova O.V., Belogurova M.B., Ignatyeva S.M., Bogomolova T.S., Klimko N.N.* The first case of successfully treated chronic disseminated candidiasis in a girl with intracranial germ cell tumor: clinical case report and literature review 12
- Shagdileeva E.V., Faizullina R.R., Belova O.A., Kuznetsova T.N., Voronovich S.E., Rubin G.V., Vorobeva S.K., Khonko V.S., Kotina N.Z., Bogomolova T.S., Vybornova I.V., Kolbin A.S., Klimko N.N.* Invasive candidiasis in neonates in Saint Petersburg: clinical case and results of the prospective study 17
- Khostelidi S.N., Shagdileeva E.V., Shadrivova O.V., Saturnov A.V., Kalinina E.Yu., Avdeenko Yu.L., Mednikov S.N., Kleshchov M.A., Stepanova A.A., Taraskina A.E., Ignatyeva S.M., Klimko N.N.* The case of generalized combined mycosis on the background of acute respiratory viral infection 24
- Fayzullina E.V., Khismatullina I.M., Gordeeva A.M.* Treatment of acne complicated by concomitant mycobiota 30
- Hismatullina Z.R., Sobhi M.S. Alhashash.* A clinical case of the suppurative form of zoonotic trichophytosis 34

EXPERIMENTAL MYCOLOGY

- Ignatieva S.M., Spiridonova V.A., Bogomolova T.S., Avdeenko Y.L., Borzova Yu.V., Khostelidi S.N., Shadrivova O.V., Popova M.O., Chudinovskikh Y.A., Zyuzgin I.S., Uspenskaya O.S., Vasilyeva N.V.* Approbation of multiplex test system «HRM-Zygo-Asp» on the clinical material of patients with mucormycosis 36
- Stepanova A.A., Bogdanova T.V., Rodchenko J.V., Melkumyan A.G., Lyubasovskaya L.A., Ignatieva S.M., Alekseev A.U., Goltzeva I.S., Bosak I.A., Pchelin I.M.* Morphological peculiarities of the isolates yeast cells *Malassezia furfur* (C.P. Robin) Baill. 43
- Tsurupa E.N., Ryabinin I.A., Kotrkhova L.P., Chilina G.A., Vasilyeva N.V., Raznatovsky K.I.* Morphological polymorphism of *Scopulariopsis brevicaulis* – the cause agent of onychomycosis, problematic for therapy 48
- Khaldeeva E.V., Lisovskaya S.A., Glushko N.I.* Mycobiota of skin and hair of pets as a potential source of dermatomycosis pathogens 54

ЦИТОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ МУКОРМИКОЗА *LICHTHEIMIA CORYMBIFERA* IN VIVO

**Васильева Н.В. (директор НИИ, зав. кафедрой),
Степанова А.А. (зав. лаб.)*, Богомолова Т.С. (зав.
лаб.), Босак И.А. (с.н.с.), Авдеенко Ю.Л. (с.н.с.),
Чилина Г.А. (зав. лаб.), Выборнова И.В. (н.с.), Аак
О.В. (в.н.с.), Соловьева Г.И. (в.н.с.), Рябинин И.А.
(м.н.с.), Павлова И.Э. (н.с.), Спиридонова В.А. (н.с.)**

НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

Изученные клетки гиф тканевых форм Lich-theimia corymbifera в легких мышей были сходны по числу и строению ядер, митохондрий, по типу и количеству аккумулируемых запасных веществ. Для зрелых клеток тканевых форм L. corymbifera характерно большое разнообразие ультраструктуры клеточных стенок. Отмечено утолщение клеточных стенок мицелия гриба in vivo в сравнении с культуральной формой.

Ключевые слова: in vivo, *Lichtheimia corymbifera*, легкие мышей, световая микроскопия, трансмиссионная электронная микроскопия, ультраструктура, морфология

CYTOLOGICAL STUDY OF THE CAUSATIVE AGENT OF MUCORMYCOSIS *LICHTHEIMIA CORYMBIFERA* IN VIVO

**Vasilyeva N.V. (director of the institute, head
of the department), Stepanova A.A. (head
of the laboratory), Bogomolova T.S. (head of
the laboratory), Bosak I.A. (senior scientific
collaborator), Avdeenko Y.L. (senior scientific
collaborator), Chilina G.A. (head of the laboratory),
Vybornova I.V. (scientific collaborator), Aak
O.V. (leading scientific collaborator), Solovieva
G.I. (leading scientific collaborator), Ryabinin
I.A. (junior scientific collaborator), Pavlova I.E.
(scientific collaborator), Spiridonova V.A. (scientific
collaborator)**

Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia

The studied hyphal cells of the Lichtheimia corymbifera tissular forms were similar in number and the structure of nuclei, mitochondria, in type and quantity of the accumulated storage substances. For the mature cells of L. corymbifera big variability in the cell walls ultrastructure was typical what can be considered as the protective mechanism in response to influence of the cells of immune system of murine lungs.

Key words: in vivo, *Lichtheimia corymbifera*, light and transmission electron microscopy, murine lung, ultrastructure

ВВЕДЕНИЕ

Наиболее частыми этиологическими агентами мукоормикоза являются: *Rhizopus arrhizus* (прежнее название – *R. oryzae*), *Rhizopus microsporus*, *Rhizomucor pusillus*, *Lichtheimia corymbifera* (прежнее название – *Absidia corymbifera*). Представители различных родов мукоормицетов отличаются по морфологическим признакам, выявляемым при световой микроскопии: ветвление спорангиеносцев, форма спорангиев и колумелл, наличие и размеры апофиз, расположение и разветвленность ризоидов. Наиболее выраженные отличия наблюдаются у *Lichtheimia* spp.: интенсивное ветвление мицелия, грушевидная форма спорангиев, коническая форма и верхушечные выросты колумелл, крупные апофизы [1]. Ранее виды мукоормицетов, известные в настоящее время как *Lichtheimia* spp., относились к термотолерантным видам рода *Absidia*, семейству *Mucoraceae* [1], но в 2009 г. были переведены в семейство *Lichtheimiaceae*, род *Lichtheimia* [2] на основании филогенетических, физиологических и морфологических характеристик.

Сведения о различиях между родами и видами мукоормицетов на уровне ультраструктуры ограничены [2]. Обнаруженные особенности ультраструктуры клеток *L. corymbifera* в условиях культуры [3, 4] явились предпосылкой для проведения настоящего исследования, цель которого – изучить ультраструктуру тканевых форм гриба на модели экспериментального мукоормикоза легких [5].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для заражения мышей использовали штамм *L. corymbifera* (Cohn) Vuill. (РКПГФ-1601/1966) из коллекции НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, выделенный от больного с риноцеребральным мукоормикозом. Культуру гриба выращивали на агаризированной среде Сабуро в термостате при 28 °С.

В качестве экспериментальных животных были взяты самцы беспородных белых мышей с массой тела 18-20 г. Для моделирования иммунодефицитного состояния (нейтропения) животным внутрибрюшинно вводили циклофосфан в дозе 150 мг/кг четырёхкратно (-3, 0, 4 и 8 дни). Заражение мышей выполняли путем интраназального введения 50 µl взвеси спор гриба в концентрации 1·10⁷ КОЕ/мл. Оценку наличия мукоормицета в ткани легких мышей осуществляли путем посева части легких погибших животных на среду агар Сабуро. Кусочки легких мышей, погибших через 8 суток от начала эксперимента, фиксировали для световой микроскопии по стандартной методике, описанной ранее [4]. Окраску срезов проводили по методу Гомори-Грокотт и гематоксилин-эозином (Г-Э). Съемку препаратов выполняли на световом микроскопе AxioLab.A1 (фирма Zeiss, Германия).

Для трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) из парафиновых срезов вырезали участки с наибольшей концентрацией гиф гриба, которые депарфинировали в ксилоле и фиксировали для ТЭМ по методике, оработанной и описанной нами ранее [5]. Ультратонкие срезы готовили на ультратоме Ultratome 2088 (LKB, Bromma, Sweden), окрашивали уранилацетатом и цитратом свинца, а затем изучали в ТЭМ Jem 100 SX (Jeol, Tokyo, Japan).

* Контактное лицо: Степанова Амалия Аркадьевна, e-mail: amaliya.stepanova@szgmu.ru

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Гистологические данные. При гистологическом исследовании легких погибших мышей (Г-Э, Гомори-Грококотт) гифы гриба обнаружены в ткани легкого (Рис. 1 а), сосудах (1 б) и просвете бронхов. В кровеносных сосудах отмечали скопления широких (7-8 мкм) гиф, которые заполняли весь их просвет и располагались плотно и хаотично относительно друг друга. В просвете бронхов наблюдали лишь редкие сильно деформированные и короткие отрезки гиф. В ткани легкого имели место обширные участки некроза с многочисленными (параллельно и беспорядочно ориентированными относительно друг друга) скоплениями протяженных прямых широких (8-10 мкм) гиф, ветвящихся под прямым углом (Рис. 1 а, стрелка). Воспалительная реакция слабая, встречались немногочисленные макрофаги и лейкоциты. В ткани легкого преобладали альтеративные изменения. Элементы спороношения на срезах легких отсутствовали.

Ультраструктура *L. corymbifera* in vivo. На срезах легких мышей выявлены гифы несегментированного мицелия диаметром 7-10 мкм, формирующие многочисленные скопления. Гифы мицелия различались между собой по характеру содержимого. Они находились на разных стадиях развития: роста, созревания, зрелости и старения. Довольно часто наблюдали полностью отмершие, часто сильно искривленные гифы мицелия без цитозоля, с обрывками мембран, без плазмалеммы, заполненные тонко-фибрилярным содержимым (Рис. 1 в). Клеточные стенки отмерших и отмирающих гиф могли быть равномерно утолщены (0,3 мкм), плотные, умеренной электронной плотности либо с локальными (Рис. 1 г, д) электронно-плотными утолщениями, иногда причудливой конфигурации на продольном срезе (Рис. 1 д).

Ядра одиночные (Рис. 1 е, ж) либо в небольших группах (обычно приурочены к клеточной стенке), округлой (2,3 мкм) или эллипсоидной (2,0 x 2,5 мкм) формы. В нуклеоплазме преобладал диффузный хроматин. Ядрышко одно, эксцентричное, крупное (0,5 мкм), довольно плотное, с неровным контуром и преобладанием гранулярного компонента (Рис. 1 е). Оболочка ядра ровная либо слегка волнистая, несет редкие рибосомы.

Митохондрии многочисленные, располагались в группах от 5 до 35 и находились в тесном контакте друг с другом (Рис. 1 е). Они округлой (1,2-1,5 мкм) либо эллипсоидной (0,4-0,5 мкм) формы. Матрикс органелл по электронной плотности сходен с цитозолем. Крысты многочисленные, расположены плотно, с более светлым содержимым. Митохондриальный ретикулум не обнаружен.

Вакуоли многочисленные (Рис. 1 з), равномерно распределены по площади среза, мелкие, светлые, неправильной формы, с контрастным тонопластом. Чаще всего встречались профили гиф с небольшим числом светлых вакуолей средних размеров разнообразной формы (Рис. 1 и) либо с одной или несколькими крупными с аналогичным содержимым (Рис. 1 ж). Часто наблюдали вакуоли с картинами локального автолиза органелл или мелких липидных включений (1 и, стрелки).

Из запасных веществ в цитозоле интактных гиф обнаружили только липидные включения умеренной

плотности, округлой или неправильной формы (Рис. 1 е, и). Для просветов молодых гиф с большим числом мелких вакуолей и митохондрий характерно наличие довольно мелких (0,2-0,3 мкм) липидных включений. В профилях гиф с вакуолями средних размеров, помимо описанных липидных включений, имели место более крупные (3,0-4,0 мкм). В зрелых гифах формировались крупные липидные включения (Рис. 1 к), заполняющие весь их просвет.

В цитозоле клеток отмечали редкие мелкие светлые пузырьки и короткие цистерны агранулярного эндоплазматического ретикулума. Одиночные цистерны Гольджи отсутствовали. Цитозоль отличался умеренной электронной плотностью, насыщен свободными рибосомами в виде моно- и полисом. Плазмалемма трехслойная, асимметричная, плотно прилегала к клеточной стенке.

Отличительной чертой ультраструктуры зрелых гиф тканевой формы гиф мицелия *L. corymbifera* было то, что они сильно различались между собой по строению (толщина, форма, электронная плотность) клеточных стенок. У объекта настоящего исследования обнаружено три основных типа строения клеточных стенок зрелых гиф: 1) тонкие – в среднем 0,3 мкм (Рис. 1 в, е, и, к), однослойные, темные, гомогенные; 2) равномерно утолщенные – в среднем 2,5 мкм (Рис. 1 з), однослойные, темные, гомогенные; 3) неравномерно утолщенные (1,5-3,0 мкм), темные, разнообразной, часто причудливой (на поперечном срезе гифы) формы (Рис. 1 г, д, ж). Чаще выявляли клетки гиф с клеточными стенками третьего типа (70% от общего числа изученных), реже (5%) – первого. Гифы с клеточными стенками второго типа составляли 15% от общего числа исследованных. Аналогичное разнообразие в строении латеральных клеточных стенок было выявлено для тканевых форм *Lichtheimia* spp. [4]. Эти данные свидетельствуют о большой пластичности латеральных стенок клеток мицелия объекта настоящей работы, что резко отличает его от тканевых форм *Aspergillus fumigatus* [6-10].

В гифах мицелия тканевых форм *L. corymbifera* септы (трехслойные сплошные, без пор), характерные для спорангиеносцев этого штамма в условиях культуры [3], не обнаружены.

При переходе гиф к старению цитозоль просветлялся и впоследствии полностью исчезал, существенно уменьшалась численность органелл и запасных веществ. Ядра теряли групповое расположение, размеры ядрышка уменьшались, нуклеоплазма просветлялась. Конденсированный хроматин формировал крупные глыбки (Рис. 2 а), равномерно распределенные по площади среза ядра. Контур ядерной оболочки становился извилистым. Матрикс митохондрий просветлялся, резко сокращалось число крист, их форма становилась неправильной. Топопласт вакуолей и плазмалемма распадалась на фрагменты, что приводило к формированию везикулярных элементов. Клеточные стенки утоньшались, теряли слоистость, электронную плотность и присущую им форму. В них появлялись локальные разрывы (Рис. 2 а, стрелка), что было нами ранее выявлено и для культуральных форм этого вида гриба [3].

Редко можно было наблюдать ранние стадии контакта макрофагов с участком гифы (Рис. 2 г). Чаще

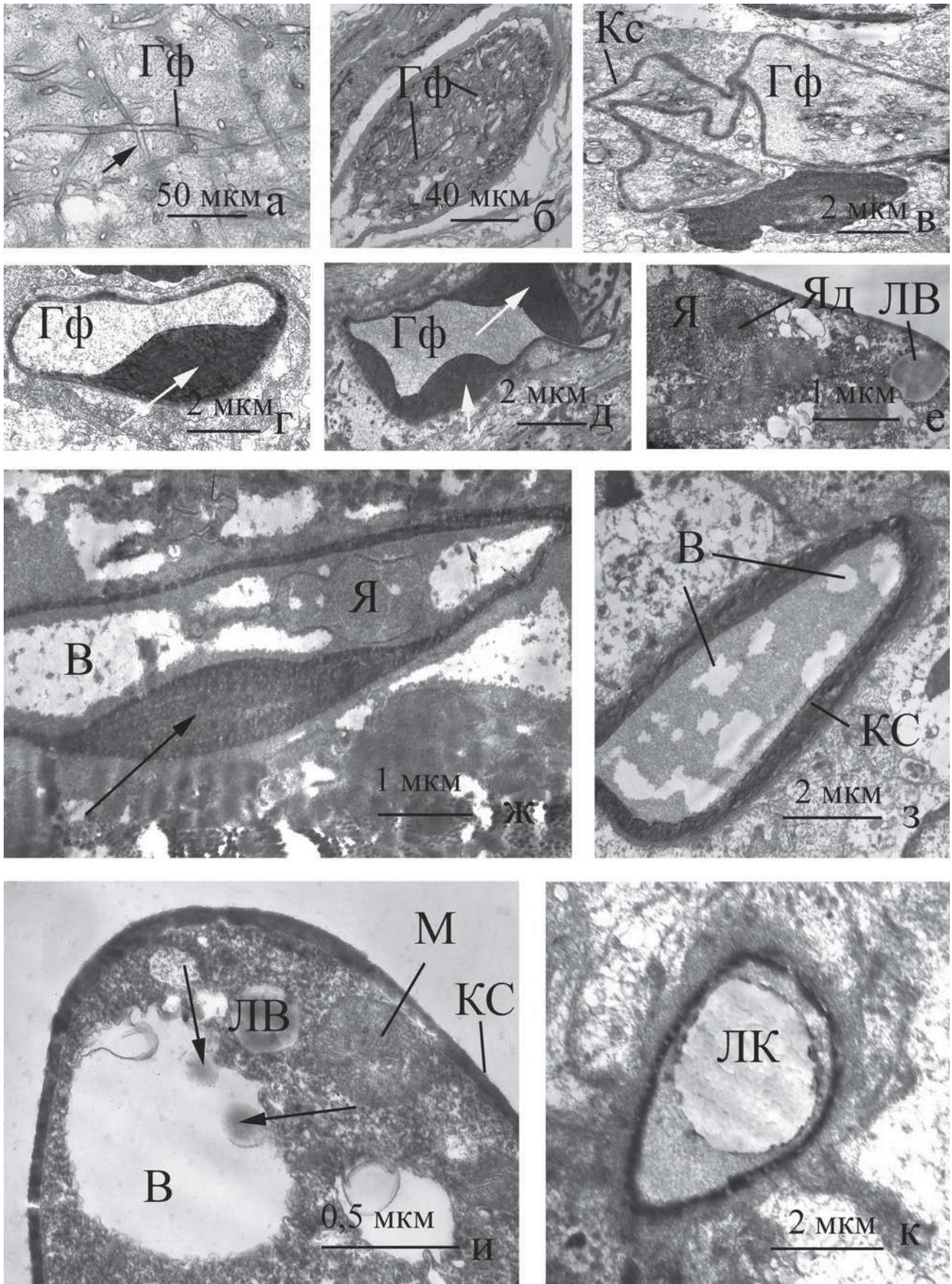


Рис. 1. а – фрагмент ткани легкого мыши после 8 суток от начала инфекции (стрелкой показано латеральное ветвление); б – скопление гиф гриба в сосуде ткани легкого мыши; в - к – особенности ультраструктуры гиф, инфицирующих ткань легкого мыши. а, б – окраска по Гомори-Грокотт. Условные обозначения здесь и на рисунке 2: В – вакуоль; Гф – гифа; Кс – клеточная стенка; ЛВ – липидное включений; М – митохондрия; Мф – макрофаг; Я – ядро; Яд – ядрышко.

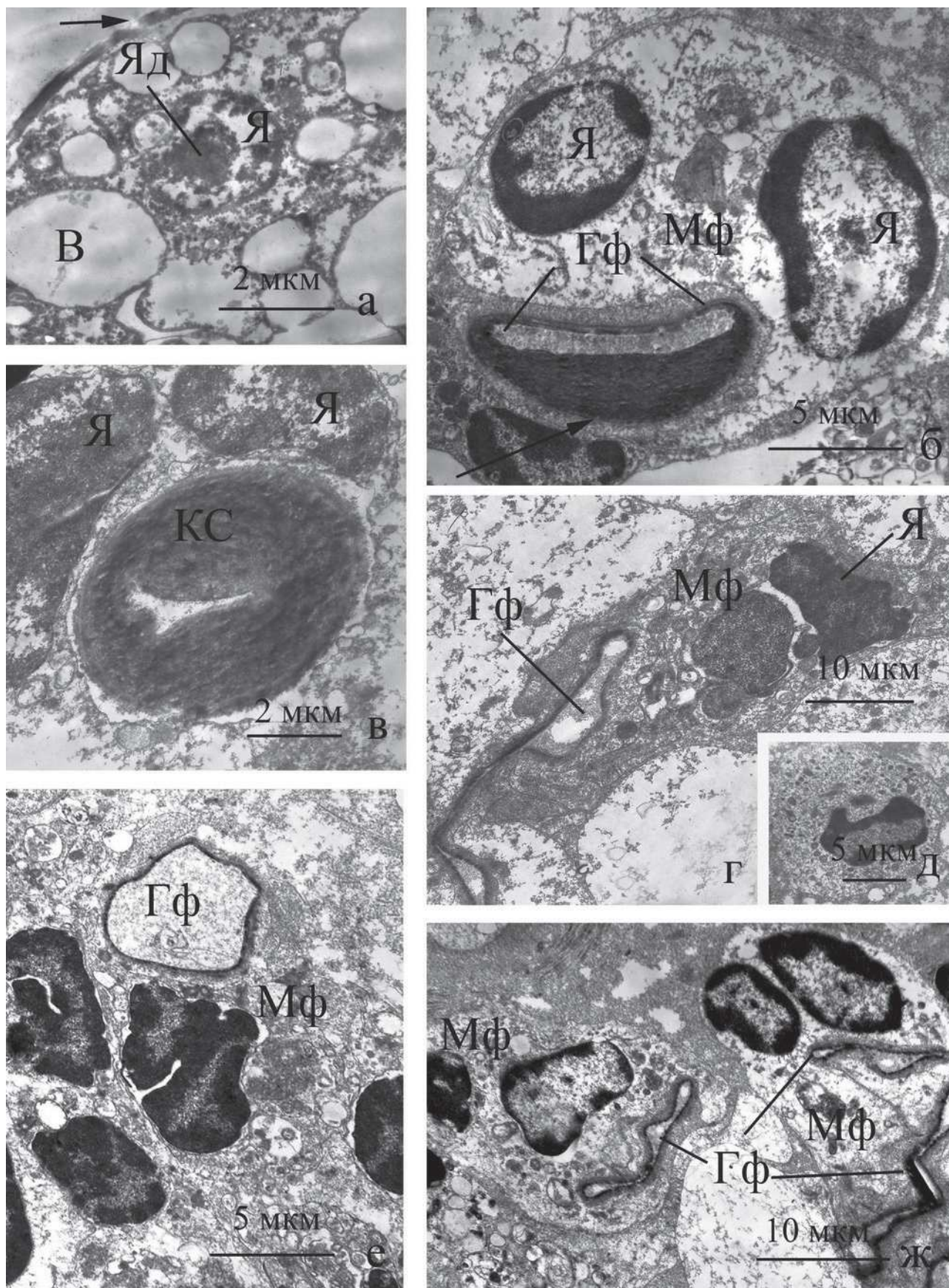


Рис. 2. Особенности строения клеток гиф *L. corymbifera* (а) и макрофагов (б-ж) в ТЭМ.

всего выявляли макрофаги, содержащие отрезки отмерших гиф. В таких случаях содержимое макрофагов было интактным (Рис. 2 е, ж, макрофаг слева внизу). Иногда встречали макрофаги, содержащие интактные отрезки гиф (Рис. 2 б). Наиболее часто обнаруживали интактные клетки макрофаги (Рис. 2 д) без гиф гриба и признаков активности (Рис. 2 д). «Противостояние» гиф гриба макрофагам ткани легкого сопровождалось значительным утолщением латеральных клеточных стенок первых вплоть до полного сужения их просвета (Рис. 2 б, в).

ВЫВОДЫ

Гистологические и ТЕМ исследования показали наличие в просвете бронхов, сосудах и тканях легких мышей через 8 суток после заражения присутствие многочисленных гиф *L. corymbifera*. Наличие в легких

элементов гриба вызывало выраженные альтеративные изменения и слабовыраженную воспалительную реакцию.

При сравнении ультраструктуры клеток вегетативного мицелия тканевых и культуральных форм *L. corymbifera* выявили, что они сходны по числу и строению ядер, митохондрий и по типу аккумулируемых запасных веществ, но различались по строению клеточных стенок. Тканевые формы гриба, по сравнению с культуральными, аккумулировали больше липидных включений.

Данная работа выполнена в рамках Государственного задания «Изучение морфо-биологических особенностей патогенных мукоморлицетов – возбудителей микозов у пациентов с иммунодефицитом» (2019-2021 гг.).

ЛИТЕРАТУРА

1. de Hoog G.S., Guarro F, Gene J., et al. Atlas of clinical fungi. 2019. clinicalfungi.org/BioloMicsInfo.aspx
2. Hawksworth D.L., Crous P.W., Dianese J.C., et al. Proposals 016-020 to amend the International Code of Botanical Nomenclature. *Mycotaxon*. 2009; 108:1-4. doi.org/10.5248/108.1
3. Васильева Н.А., Степанова А.А., Богомолова Т.С. и др. Цитологическое изучение *Lichtheimia corymbifera*. Проблемы медицинской микологии. 2019; 21 (3): 3-8. [Vasil'eva N.A., Stepanova A.A., Bogomolova T.S. i dr. Citologicheskoe izuchenie *Lichtheimia corymbifera*. *Problemy medicinskoj mikologii*. 2019; 21 (3): 3-8. (In Russ)]. mycology.szgmu.ru/files/№3_2019.pdf
4. Stepanova A.A., Vasilyeva N.V., Yamaguchi M., et al. Electron microscopy of autopsy material from the human brain cryptococcosis and AIDS. *Problems in medical mycology*. 2015; 17 (1): 35-40. mycology.szgmu.ru/files/№1_2015.pdf
5. Васильева Н.В., Босак И.А., Богомолова Т.С. и др. Экспериментальная модель мукоморлицоза легких, обусловленного *Lichtheimia ornate*. Проблемы медицинской микологии. 2019; 21 (1): 3-6. [Vasil'eva N.V., Bosak I.A., Bogomolova T.S. i dr. Eksperimental'naya model' mukormikoza legkih, obuslovlennogo *Lichtheimia ornate*. *Problemy medicinskoj mikologii*. 2019; 21 (1): 3-6 (In Russ)]. mycology.szgmu.ru/images/1_2019.pdf.pdf
6. Степанова А.А., Хостелиди С.Н., Аравийский Р.А. и др. Электронно-микроскопическое исследование *Lichtheimia* spp. *in vivo* и *in vitro*. Проблемы медицинской микологии. 2012; 14 (4): 55-61. [Stepanova A.A., Hostelidi S.N., Aravijskij R.A. i dr. Elektronno-mikroskopicheskoe issledovanie *Lichtheimia* spp. *in vivo* i *in vitro*. *Problemy medicinskoj mikologii*. 2012; 14 (4): 55-61 (In Russ)]. mycology.szgmu.ru/files/МАРО_4_2012.pdf
7. Loussert C., Schmitt C., Prevost M.-C., et al. *In vivo* biofilm composition of *Aspergillus fumigatus*. *Cellular Microbiology*. 2010; 12 (3): 405-410. doi:10.1111/j.1462-5822.2009.01409.x
8. Степанова А.А., Босак И.А., Синицкая И.А. Цитологическое исследование *Aspergillus fumigatus* Fres. в легких мышей. Проблемы медицинской микологии. 2013; 15 (1): 52-58. [Stepanova A.A., Bosak I.A., Sinickaya I.A. Citologicheskoe issledovanie *Aspergillus fumigatus* Fres. v legkih myshej. *Problemy medicinskoj mikologii*. 2013; 15 (1): 52-58 (In Russ)]. mycology.szgmu.ru/files/МАРО_1_2013.pdf
9. Степанова А.А., Васильева Н.В., Борзова Ю.В. и др. Электронно-микроскопическое изучение аспергиллеза легких человека на примере архивного материала. Проблемы медицинской микологии. 2014; 16 (3): 70-79. [Stepanova A.A., Vasil'eva N.V., Borzova Y.V. i dr. Elektronno-mikroskopicheskoe izuchenie aspergilleza legkih cheloveka na primere arhivnogo materiala. *Problemy medicinskoj mikologii*. 2014; 16 (3): 70-79 (In Russ)]. mycology.szgmu.ru/files/МАРО_3_2014.pdf
10. Степанова А.А., Васильева Н.В., Zhang F., et al. Electron microscopic investigations of invasive aspergillosis, caused with *Aspergillus fumigatus*. *Problems in medical mycology*. 2015; 17 (3): 38-41. mycology.szgmu.ru/files/№3_2015.pdf
11. Степанова А.А., Васильева Н.В., Босак И.А. и др. Особенности строения *Aspergillus fumigatus* при экспериментальном аспергиллезе у мышей. Проблемы медицинской микологии. 2016; 18 (4): 40-52. [Stepanova A.A., Vasil'eva N.V., Bosak I.A. i dr. Osobennosti stroeniya *Aspergillus fumigatus* pri eksperimental'nom aspergilleze u myshej. *Problemy medicinskoj mikologii*. 2016; 18 (4): 40-52 (in Russ)]. mycology.szgmu.ru/files/МАРО_№4_2016.pdf
12. Schwartze V.U., Winter S., Shelest E., et al. Gene expansion shapes genome architecture in the human pathogen *Lichtheimia corymbifera*: an evolutionary genomics analysis in the ancient terrestrial mucorales (Mucoromycotina). *PLoS Genet*. 2014; 10 (8): e1004496. doi.org/10.1371/journal.pgen.1004496

Поступила в редакцию журнала 02.07.2019

Рецензент: О.В. Яковлева



СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ДИАГНОСТИКИ И НАРУЖНОЙ ТЕРАПИИ ОНИХОМИКОЗА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Герасимчук Е.В. (зав. отд.)*

Поликлиника 52 Консультативно-диагностического центра, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (кафедра кожных и венерических болезней им. В.А. Рахманова), Москва, Россия

Всесторонний анализ современных клинических исследований и метаанализов отражает актуальность проблемы выбора оптимальной наружной терапии онихомикоза. Увеличение числа больных вызывает широкий интерес научного сообщества. В статье описаны текущие возможности диагностики заболевания как первого этапа оказания высокотехнологичной медицинской помощи. Приведены данные о последних разработках новых лекарственных препаратов, способах повышения проницаемости и активности уже имеющихся средств.

Ключевые слова: онихомикоз, микология, диагностика, наружная терапия, повышение проницаемости препаратов

UPDATE ON CURRENT APPROACHES TO DIAGNOSIS AND TREATMENT OF ONYCHOMYCOSIS (LITERATURE REVIEW)

Gerasimchuk E.V. (head of department)

Polyclinic of the 52 Consultative and Diagnostic Center, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Department of Dermatology and Venereology), Moscow, Russia

Modern clinical trial analysis demonstrated that a selecting the optimal topical treatment option for onychomycosis is an important task. The prevalence of onychomycosis is increasing steadily, that fact has aroused great interest among the scientific communities. In this article new diagnostic possibilities, the first stage of high-tech medical care are described. Recent advances in drug development, permeability-increasing methods are presented.

Key words: onychomycosis, mycology, diagnostics, topical treatment, penetration enhancer

Систематический анализ литературы с использованием баз данных MEDLINE/PubMed, EMBASE, Cochrane Library, Scopus, Web of Science, ClinicalTrials.gov, Google Scholar продемонстрировал высокую актуальность проблем диагностики и выбора оптимальной терапии онихомикоза – инфекционного поражения ногтей, вызываемого дерматомицетами (DM) (*Trichophyton* spp.), нитчатými недерматомицетами (NDM) (*Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. и др.) и дрожжеподобными грибами (*Candida* spp., *Trichosporon* spp., *Malassezia* spp.) [1]. В современном мире неуклонно возрастает число больных онихомикозом (10-15%) [2]. Среди факторов, предполагающих к развитию заболевания, выделяют пол, возраст, профессиональную деятельность, аутосомно-доминантный характер наследования. Так, лица с мутациями, затрагивающими образ-распознающие рецепторы врожденной иммунной системы PRRs или пути IL-17 и IL-22, более восприимчивы к инфекции [3, 4].

Согласно Стандарту медицинской помощи, больным с микозом ногтей (утв. приказом Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 11.12.2007 г. №747) диагностика включает микроскопическое исследование соскоба с ногтей [5]. В настоящее время с целью совершенствования качества оказания помощи разработан ряд новых методик.

Тест-системы на основе ПЦР (качественная оценка) и ПЦР в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ, Real-Time PCR, RT-PCR) с количественным анализом у различных производителей отличаются протоколами экстракции ДНК, используемыми праймерами и способами выявления ампликонов. Среди значимых для диагностики онихомикоза разновидностей метода выделяют мультиплексные ПЦР системы с использованием панфунгальных и/или пандерматофитных праймеров и ПЦР с видоспецифичными праймерами для избирательной детекции наиболее частых этиологических агентов (*T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Candida* spp., *Aspergillus* spp.) [6].

Преимуществами конфокальной лазерной сканирующей *in vivo* микроскопии (КЛСМ) являются высокое разрешение, контрастность изображения, возможность получения горизонтальных оптических срезов, идентификации ветвящихся гиф как ярких, преломляющих свет линейных структур в их естественном состоянии без фиксации, секционирования и окрашивания [7].

Оптико-когерентная томография (ОКТ) – высоко разрешающий неинвазивный метод, при котором в качестве зондирующего излучения используется ближний инфракрасный диапазон (~1 мкм). В настоящее время по данным ОКТ-изображений предложен набор морфологических критериев, характерных для онихомикоза: нарушение слоистой структуры и снижение интенсивности сигнала – однородность, темные полосы; увеличение толщины и неровная поверхность пластины; яркие (повышение интенсивности сигнала) сгруппированные и резко разграниченные тонкие горизонтальные линии и яркие точки, единичные и собранные в грозди [8]. Преимущества ОКТ (глубина визуализации 1,5 мм, наблюдение в режиме реального времени) позволяют использовать ее в качестве вспомогательного инструмента и для мониторинга проводимой терапии.

* Контактное лицо: Герасимчук Елена Владимировна, e-mail: elengeras@yandex.ru

Сравнение методик позволило ранжировать их по возрастанию чувствительности: культура, выращенная на агаре (21%) < ШИК-реакция (Шифф-йодная кислота; PAS) (69%) < КОН-микроскопия (75%) < КЛСМ (80%) < ОКТ (92%) < ПЦР (95%), и специфичности: ОКТ (43%) < КОН-микроскопия (76%) < КЛСМ (81%) < культура, ШИК, ПЦР (100%) [9].

Посредством инфракрасной термографии установлено, что среди лиц с подногтевым гиперкератозом больные с онихомикозом имеют более низкую температуру пальцев стоп ($30,2 \pm 2,6^\circ\text{C}$, $p=0,001$), поэтому предлагают использовать данную методику в качестве скрининговой (чувствительность – 81,8%, специфичность – 65,7%) [10].

В научной литературе описаны возможности применения основанной на регистрации флуоресценции и светорассеяния проточной цитометрии как для диагностики онихомикоза – по показателям прямого (FSC) и бокового светорассеяния (SSC) для определения относительного размера и гранулярности клеток или частиц, выявлению белков и ДНК с помощью красителей – флуоресцеин-5-изотиоционата и йодистого пропидия [11], так и для изучения патогенеза заболевания: у больных онихомикозом была выявлена повышенная экспрессия CD4+CD25+high T-regulatory cells (Treg)-клеток, которые связаны с развитием воспаления [12].

В перспективе использование специфичных антител (anti-Sub6) для обнаружения *T. rubrum* и *T. interdigitale* может быть эффективно для диагностики онихомикоза путем гетерогенного твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) или иммунохроматографии (стрип-тесты) [13].

Идентификацию дерматомицетов можно проводить и с помощью матрично-активированной лазерной десорбционно-ионизационной масс-спектрометрии материала культуры (MALDI-TOF MS), включающей сопоставление полученных масс-спектров с типовыми масс-спектро-профилями из базы данных. Среди преимуществ: использование информационной системы для однозначной идентификации видов; меньшие, по сравнению с ПЦР, материальные и временные затраты (выполнение одного анализа в течение нескольких минут) [14].

Метод инфракрасной Фурье-спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения (ATR-FTIR) построен на возбуждении колебательных движений молекул/их фрагментов при пропускании излучения: в результате проведенного в 2019 г. исследования *ex vivo* выявили значимые спектральные различия для DM, NDM и дрожжеподобных грибов, а также для пораженных и здоровых ногтей *in vivo* с точностью до 96,9% [15].

Дополнительными источниками информации о статусе больного могут стать PRO-инструменты (patient reported outcomes), шкалы и опросники для оценки качества жизни, депрессии и тревоги, общего состояния здоровья [16-18].

Спектр препаратов для наружного лечения онихомикоза в разных странах значительно варьирует. За последние годы были разработаны продемонстрировавшие достаточную активность новые триазолы и имидазолы (эфинаконазол, луликоназол и ланоканазол).

Для лечения онихомикоза легкой и умеренной степени тяжести (*T. rubrum* / *T. mentagrophytes*) Министерством здравоохранения Канады (Health Canada) в 2013 г. был одобрен 10% раствор для наружного применения – эфинаконазол [19]. В 2014 г. он был разрешен Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (FDA) [20], а также в Японии с теми же показаниями; в 2015 г. – Европейским агентством по лекарственным средствам (EMA) – для лечения онихомикоза [21]. Азолы ингибируют цитохром-P450-зависимую 14-альфа-деметилазу, угнетая превращение ланостерола в эргостерол, что приводит к увеличению проницаемости микробных клеток.

Препарат ланоканазол (LAN) зарегистрирован в Японии (1% крем, 1% раствор) для лечения дерматофитии стоп [22]. Луликоназол (LUL) является R-энантиомером и обладает более сильным противогрибковым действием, чем ланоканазол, который представляет собой рацемическую смесь [23]. Луликоназол обладает уникальной структурой, где имидазольный фрагмент включен в структуру дитиоацетата кетена, и высоким сродством к кератину; в форме 1% крема одобрен в Японии с 2005 г. для лечения дерматомикозов [24], FDA с 2013 г. – для лечения дерматофитии стоп, паховой эпидермофитии и трихофитии; назначается в течение 1 недели, что выгодно отличает его от аналогов [25].

По данным двойного слепого многоцентрового рандомизированного исследования III фазы, на фоне применения луликоназола в виде 5% раствора ежедневно в течение 48 недель для лечения онихомикоза (DLSO, вовлечение 20-50% пластины) была доказана статистически значимая эффективность препарата по показателям клинического и микологического излечения (14,9 и 45,4%) по сравнению с группой контроля (5,1 и 31,2%) ($p=0,012$; $p=0,026$) [26].

Минимальная ингибирующая концентрация, способная остановить рост 90% штаммов *in vitro* (MIC₉₀), и минимальная фунгицидная концентрация (MFC) луликоназола в отношении *T. rubrum* и *T. mentagrophytes* составляет 0,00098 и 0,0078 мкг/мл, что соответствует наиболее выраженной антифунгальной активности среди продаваемых в настоящее время противогрибковых препаратов [27]. В исследовании 2019 г. на образцах ногтей ($n=257$) с подтверждением диагноза онихомикоза методом PCR-RFLP ($n=180$; 70,03%) была продемонстрирована высокая активность люликоназола и ланоканазола в отношении всех изолятов (NDM – 51,1%, дрожжи – 35%, DM – 10,6%) – MIC 0,0154 и 0,0309 мкг/мл, отдельно для дерматомицетов – MIC в диапазоне от 0,016 до 0,032 и от 0,063 до 1 мкг/мл соответственно [28]. Кроме того, люликоназол и ланоканазол высокоактивны в отношении *Aspergillus* spp.: MIC – 0,009 мкг/мл (0,004-0,062) и 0,02 мкг/мл (0,004-0,125) и *S. albicans*: MIC – 0,031-0,25 и 0,063-0,25 мкг/мл (для тербинафина – 2-64 мкг/мл, бифоназола – 0,5-4 мкг/мл, флуконазола – 0,38 мкг/мл, итраконазола – 0,5 мкг/мл) [29].

Производное имидазола – эконазол доступен в РФ в виде 1% крема, 1% раствора, 1% порошка для наружного применения по показаниям: грибковые поражения кожи и волосистой части головы, разноцветный лишай, эритразма. При этом в литературе представле-

ны данные II-III фазы клинических исследований лака эконазола: добавление 2-н-нонил-1,3-диоксола усиливает проникновение эконазола в ногтевую пластину в 200 раз при двукратном ежедневном нанесении лака в течение 14 дней по сравнению с группой контроля ($p=0,008$) [30].

В декабре 2018 г. группа исследователей из Испании объявила о достижении первичной (излечение) и вторичных конечных точек двойного слепого, многоцентрового, рандомизированного исследования III фазы по оценке эффективности 10% раствора для ногтей с тербинафином (P-3058), официальное объявление результатов запланировано на конец 2019 г. [31].

Для лечения онихомикоза, вызванного *T. rubrum* / *T. mentagrophytes*, в 2014 г. FDA одобрило 5% раствор таваборол – боросодержащее средство, которое ингибирует лейцил-tРНК-синтетазу – фермент грибов, необходимый для синтеза белка и для катализа АТФ-зависимого лигирования L-лейцина в tРНК, что приводит к прекращению роста клеток и их гибели, устраняя инфекцию [32].

Среди противогрибковых препаратов для наружного применения с заявленными показаниями «Грибковые инфекции ногтей (онихомикозы)», официально разрешенных к медицинскому применению в РФ, можно выделить следующие (МНН, лекарственная форма, по данным Инструкции по медицинскому применению): аморолфин – лак для ногтей; бифоназол + мочевины – мазь для наружного применения; нафтифин – крем и 1% раствор для наружного применения, циклопирокс – лак для ногтей.

Согласно Рекомендациям по лечению онихомикоза Британской ассоциации дерматологов (British Association of Dermatologists), при поверхностной или дистальной клинической форме онихомикоза у взрослых следует использовать аморолфин или тиоканазол, циклопирокс – у больных с противопоказаниями к си-

стемной терапии [33].

Тиоканазол, одобренный для медицинского использования еще в 1982 г., в виде 28% раствора для ногтей содержит ундециленовую кислоту, однако в литературе описаны случаи развития контактного дерматита на фоне данной терапии [34].

Увеличения проницаемости лекарственных средств стараются достичь посредством создания новых лекарственных форм: диспергирование в липосомы тербинафина в составе лака для ногтей [35], доставка в виде наноземульсии и трансферсом (TDT 067) [36, 37]; физическими (ионтофорез) и механическими методами (фенестрация, технология «мезосреза») [38, 39].

В литературе описаны и специальные вещества, повышающие проницаемость *ex vivo* и активность препаратов (penetration enhancer): гидрогель кетоконазола на основе микроэмульсии с маслом черного тмина [40], выделение 5% папаина (фермент эндопептидазы) для оптимизации формулы циклопирокса [41], включение тиогликолевой кислоты и мочевины в составы гидрохлорида аморфолина [42].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ключевой шаг к достижению эффективности лечения – точная диагностика онихомикоза, основанная на оценке клинической картины и микологического исследования. Назначение наружной терапии позволяет избежать проблем, ассоциированных с развитием нежелательных побочных реакций из-за поступления препарата в системный кровоток; снизить риск межлекарственного взаимодействия; создавать на поверхности ногтя достаточные фунгицидные концентрации препарата. Совершенствование знаний и навыков путем обучения, ознакомление и овладение новыми технологиями диагностики и лечения являются залогом профессионализма для оказания квалифицированной медицинской помощи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tolstrup J., Jemec G.B., Hare R.K., et al. Diagnosing and treating of onychomycosis. Ugeskr Laeger. 2018; 180 (20). PMID:29761779
2. Wollina U., Nenoff P., Haroske G., Haenssle H.A. The diagnosis and treatment of nail disorders. Dtsch. Arz.-tebl. Int. 2016; 113 (29-30): 509-18. doi.org/10.3238/arztebl.2016.0509
3. Герасимчук Е.В. Целесообразность коррекции микробиоценоза кишечника при комплексной терапии больных микозами в амбулаторных условиях. Клиническая дерматология и венерология. 2008; 6 (2): 51-54. [Gerasimchuk E.V. Advisability of correction of the gut microbiocenosis in a complex therapy of outpatients with mycoses. Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya. 2008; 6 (2): 51-54 (In Russ)].
4. Gupta A.K., Carviel J., Shear N.H. Onychomycosis and chronic fungal disease: exploiting a commensal disguise to stage a covert invasion. J. Cutan. Med. Surg. 2018; 22 (3): 318-322. doi.org/10.1177/1203475417745827
5. Герасимчук Е.В. Микооптикфейс – современный диагностический алгоритм. Медицина и высокие технологии. 2017; 1: 22-24. [Gerasimchuk E.V. Mycooptiface - up-to-date diagnostic algorithm. Medicine and high technology. 2017; 1: 22-24 (In Russ)].
6. Hafirassou A.Z., Valero C., Gasse N., et al. Usefulness of techniques based on real time PCR for the identification of onychomycosis-causing species. Mycoses. 2017; 60 (10): 638-644. doi.org/10.1111/myc.12629
7. Hongcharu W., Dwyer P., Gonzalez S., Anderson R.R. Confirmation of onychomycosis by in vivo confocal microscopy. J. Am. Acad. Dermatol. 2000; 42 (2 Pt 1): 214-6. doi.org/10.1016/S0190-9622(00)90128-2
8. Olsen J., Lindsø Andersen P., Themstrup L., et al. Optical coherence tomography of onychomycosis: pro-posed terminology and a suggestion of practical usage. Arch. Dermatol. Res. 2019. doi.org/10.1007/s00403-019-01989-8
9. Rothmund G., Sattler E.C., Kaestle R., et al. Confocal laser scanning microscopy as a new valuable tool in the diagnosis of onychomycosis – comparison of six diagnostic methods. Mycoses. 2013; 56: 47-55. doi.org/10.1111/j.1439-0507.2012.02198.x
10. Miura Y., Takehara K., Nakagami G., et al. Screening for tinea unguium by thermography in older adults with subungual hyperkeratosis. Geriatr. Gerontol. Int. 2015; 15 (8): 991-6. doi.org/10.1111/ggi.12380
11. Arrese J.E., Pitard-Franchimont C., Greimers R., et al. Fungi in onychomycosis: a study by immuno-histochemistry and dual flow cytometry. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 1995; 4: 123-30. doi.org/10.1111/j.1468-3083.1995.tb00305.x
12. Kaya T.I., Eskandari G., Guvenc U., et al. CD4+CD25+ Treg cells in patients with toenail onychomycosis. Arch. Dermatol. Res. 2009; 301 (10): 725-9. doi.org/10.1007/s00403-009-0941-y

13. Méhul B., de Coi N., Grundt P., et al. Detection of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale* in onychomycosis using monoclonal antibodies against Sub6 (Tri r 2). *Mycoses*. 2019; 62 (1): 32-40. doi.org/10.1111/myc.12843
14. Erhard M., Hipler U.C., Burmester A., et al. Identification of dermatophyte species causing onychomycosis and tinea pedis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Exp. Dermatol.* 2008; 17 (4): 356-61. doi.org/10.1111/j.1600-0625.2007.00649.x
15. De Bruyne S., Speeckaert R., Boelens J., et al. Infrared spectroscopy as a novel tool to diagnose onychomycosis. *Br. J. Dermatol.* 2019; 180 (3): 637-646. doi.org/10.1111/bjd.17199
16. Герасимчук Е.В., Герасимчук М.Ю. Новые подходы к решению полипрофессиональных проблем в клинической медицине. Вестник последипломного медицинского образования. 2017; 1: 9-13. [Gerasim-chuk E.V., Gerasimchuk M.Y. New approaches to polyprofessional problems in clinical medicine. *Journal of postgraduate medical education*. 2017; 1: 9-13 (In Russ)].
17. Wang J., Wiznia L.E., Rieder E.A. Patient-reported outcomes in onychomycosis: a review of psychometrically evaluated instruments in assessing treatment effectiveness. *Skin Appendage Disord.* 2017; 3 (3):144-155. doi.org/10.1159/000469666
18. Герасимчук М.Ю. Особенности депрессии у больных с разными хронотипами. Вестник Российской академии медицинских наук. 2017; 72 (6): 435-441. [Gerasimchuk M.Y. Characteristics of depression in patients with different chronotypes. *Annals of the Russian academy of medical sciences*. 2017; 72 (6): 435-441 (In Russ)]. doi.org/10.15690/vramn881
19. <https://healthproducts.canada.ca/dpd-bdpp/dispatch-repartition.do>
20. <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/drug-trials-snapshot-jublia-efinaconazole>
21. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/pips/EMEA-001627-PIP01-14/pip_001300.jsp&mid=WC0b01ac058001d129
22. Tanuma H., Tanuma M., Abe M., Kume H. Usefulness of lanocanazole (Astat) cream in the treatment of hyperkeratotic type tinea pedis. Comparative study of monotherapy and combination therapy with 10% urea ointment (Pastaron). *Mycoses*. 2001; 44 (5): 181-90. doi.org/10.1046/j.0933-7407.2001.00607.x
23. Khanna D., Bharti S. Luliconazole for the treatment of fungal infections: an evidence-based review. *Core Evid.* 2014; 9: 113-24. doi.org/10.2147/CE.S49629
24. Kawai M. Characteristics and efficacy of two topical therapeutic agents for onychomycosis. *Med. Mycol. J.* 2019; 60 (3): 71-74. doi.org/10.3314/mmj.19.006
25. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/204153s000lbl.pdf
26. Watanabe S., Kishida H., Okubo A. Efficacy and safety of luliconazole 5% nail solution for the treatment of onychomycosis: A multicenter, double-blind, randomized phase III study. *J. Dermatol.* 2017; 44 (7): 753-759. doi.org/10.1111/1346-8138.13816
27. Maeda J., Nanjoh Y., Koga H., et al. In vitro antifungal activity of luliconazole against *Trichophyton* spp. *Med. Mycol. J.* 2016; 57: J1-J6 (In Japanese). doi.org/10.3314/mmj.57.J1
28. Haghani I., Shams-Ghahfarokhi M., Dalimi Asl A., et al. Molecular identification and antifungal susceptibility of clinical fungal isolates from onychomycosis (uncommon and emerging species). *Mycoses*. 2019; 62 (2): 128-143. doi.org/10.1111/myc.12854
29. Baghi N., Shokohi T., Badali H., et al. In vitro activity of new azoles luliconazole and lanocanazole compared with ten other antifungal drugs against clinical dermatophyte isolates. *Med Mycol.* 2016; 54 (7): 757-63. doi.org/10.1093/mmy/myw016
30. Hui X., Chan T.C., Barbadillo S., et al. Enhanced econazole penetration into human nail by 2-n-nonyl-1,3-dioxolane. *J. Pharm. Sci.* 2003; 92 (1): 142-8. doi.org/10.1002/jps.10291
31. https://www.almirall.com/documents/10876/3973413/190225_FY+Results_ENG.pdf/5173a49d-f8c5-4ed4-be02-8caabd4d87ea
32. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.DrugDetails>
33. Ameen M., Lear J.T., Madan V., et al. British Association of Dermatologists' guideline for the management of onychomycosis 2014. *Br J Dermatol.* 2014; 171(5): 937-58. doi.org/10.1111/bjd.13358
34. Ochando-Ibernón G., Schneller-Pavelescu L., Vergara de Caso E.F., Silvestre-Salvador J.F. Allergic contact dermatitis caused by undecylenic acid in an antifungal nail solution. *Contact Dermatitis.* 2019; 80 (5): 313-314. doi.org/10.1111/cod.13195
35. Shah V.H., Jobanputra A. Enhanced ungual permeation of terbinafine HCl delivered through liposome-loaded nail lacquer formulation optimized by QbD approach. *AAPS PharmSciTech.* 2018; 19 (1): 213-224. doi.org/10.1208/s12249-017-0831-0
36. Sinha P., Srivastava S., Mishra N. Development, optimization and characterization of a novel tea tree oil nanogel using response surface methodology. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2016; 42 (9): 1434-45. doi.org/10.3109/03639045.2016.1141931
37. Sigurgeirsson B., Ghannoum M. Therapeutic potential of TDT 067 (terbinafine in transfersome): a carrier-based dosage form of terbinafine for onychomycosis. *Expert Opin. Invest. Drugs.* 2012; 21 (10): 1549-62. doi.org/10.1517/13543784.2012.711315
38. Kushwaha A., Shivakumar H.N., Murthy S.N. Iontophoresis for drug delivery into the nail apparatus: Exploring hyponychium as the site of delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2016; 42 (10): 1678-82. doi: 10.3109/03639045.2016.1165690.
39. Cordoba Díaz D., Losa Iglesias M.E., Becerro de Bengoa Vallejo R., Cordoba Diaz M. Transungual delivery of ciclopirox is increased 3-4-fold by mechanical fenestration of human nail plate in an in vitro model. *Pharmaceutics.* 2019; 11 (1). pii: E29. doi.org/10.3390/pharmaceutics11010029
40. Amra K., Momin M. Formulation evaluation of ketoconazole microemulsion-loaded hydrogel with nigella oil as a penetration enhancer. *J. Cosmet. Dermatol.* 2019. doi.org/10.1111/jocd.12945
41. Khattab A., Shalaby S. Optimized ciclopirox-based eudragit RLPO nail lacquer: effect of endopeptidase enzyme as permeation enhancer on transungual drug delivery and efficiency against onychomycosis. *AAPS PharmSciTech.* 2018; 19 (3): 1048-1060. doi.org/10.1208/s12249-017-0917-8
42. Šveikauskaitė I., Počekvičius A., Briedis V. Potential of chemical and physical enhancers for transungual delivery of amorolfine hydrochloride. *Materials (Basel).* 2019; 12 (7). pii: E1028. doi.org/10.3390/ma12071028

Поступила в редакцию журнала 18.10.2019

Рецензент: К.И. Разнатовский



ПЕРВЫЙ СЛУЧАЙ УСПЕШНОГО ЛЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ДИССЕ- МИНИРОВАННОГО КАНДИДОЗА У РЕБЕНКА С ИНТРАКРАНИАЛЬНОЙ ГЕРМИНОГЕННО-КЛЕТОЧ- НОЙ ОПУХОЛЬЮ: ОПИСА- НИЕ КЛИНИЧЕСКОГО НАБЛЮДЕНИЯ И ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

^{1,3}Диникина Ю.В. (зав. отделением)*, ²Шадринова О.В. (доцент кафедры), ^{1,3}Белогурова М.Б. (в.н.с., зав. кафедрой), ²Игнатьева С.М. (в.н.с.), ²Богомолова Т.С. (зав. лаб.), ²Климко Н.Н. (зав. кафедрой)

¹Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова; ²Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова; ³Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

Хронический диссеминированный кандидоз (ХДК) – редкий вариант инвазивного кандидоза (ИК), который наиболее часто протекает с поражением печени и селезенки (другое название – гепатолиенальный кандидоз). Определяющим фактором риска является длительная глубокая нейтропения, преимущественно у пациентов с онкогематологическими заболеваниями. Публикации о ХДК у детей немногочисленны. Приводим описание клинического случая успешного лечения ХДК, протекавшего с синдромом иммунологической реконституции (СИР) у девочки с интракраниальной герминогенно-клеточной опухолью, и обзор литературных данных.

Ключевые слова: хронический диссеминированный кандидоз, гепатолиенальный кандидоз, дети, онкогематология, острый лейкоз, синдром иммунной реконституции

THE FIRST CASE OF SUCCESSFULLY TREATED CHRONIC DISSEMINATED CANDIDIASIS IN A GIRL WITH INTRACRANIAL GERM CELL TUMOR: CLINICAL CASE REPORT AND LITERATURE REVIEW

^{1,3}Dinikina Y.V. (head of the clinical department), ²Shadrivova O.V. (associate professor), ^{1,3}Belogurova M.B. (leading scientific collaborator, head of department), ²Ignatyeva S.M. (leading scientific collaborator), ²Bogomolova T.S. (head of the laboratory), ²Klimko N.N. (head of department)

¹V.A. Almazov National Medical Research Centre; ²North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov; ³St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russia

* Контактное лицо: Диникина Юлия Валерьевна, e-mail: dinikina_yuv@almazovcentre.ru

*Chronic disseminated candidiasis (CDC) is a rare type of disseminated invasive fungal infection, associated with *Candida* spp., with main involvement of the liver and spleen (so called “hepatosplenic candidiasis”). The main risk factor is profound and prolonged neutropenia, which is mostly observed in patients with hematological malignancies. We present a clinical case of successful treatment of CDC with IRIS in a girl with intracranial germ cell tumor and analyzed literature data.*

Key words: chronic disseminated candidiasis, hepatosplenic candidiasis, children, malignancies, oncohematology, immune reconstitution inflammatory syndrome

ВВЕДЕНИЕ

Хронический диссеминированный кандидоз (ХДК) – один из вариантов оппортунистических микозов, как правило, развивающийся у пациентов с длительным агранулоцитом в постцитостатическом периоде. ХДК наиболее часто протекает с поражением печени и селезенки, однако возможна генерализация заболевания с вовлечением других органов (почки, легкие и пр.) [1]. Наиболее частой фоновой патологией являются онкогематологические заболевания, при которых частота ХДК составляет от 3% до 29,1% [1, 2]. Диагностика основана на клинических, радиологических и микробиологических методах. Неспецифичность симптомов ХДК определяет трудности своевременной диагностики и начала антифунгальной терапии [2-4]. Отметим, что у 85% пациентов диагноз устанавливается после восстановления числа нейтрофилов, и длительность этого периода может варьировать от 14 до 165 дней [5].

После восстановления количества нейтрофилов и разрешения иммуносупрессии характерным является развитие синдрома иммунологической реконституции (СИР), характеризующегося чрезмерным воспалительным ответом как реакции на инфицирование оппортунистическими микроорганизмами [4]. Патогенез СИР до настоящего времени не до конца изучен, что обуславливает отсутствие систематизированных подходов к терапии [4].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для диагностики ХДК использовали критерии Европейской организации по исследованию и лечению рака (EORTC/MSG, 2008) [6]. Лабораторная диагностика включала микроскопию, посев крови и мочи, серологические методы (совместное определение маннана и антиманнанных антител в сыворотке крови). Осуществляли мониторинг гематологических и биохимических показателей крови. Методами визуализации были: мультиспиральная компьютерная томография (МСКТ) органов брюшной полости (ОБП) и грудной клетки (ОГК), придаточных пазух, а также ультразвуковое исследование ОБП. Оценку эффективности антифунгальной терапии проводили согласно критериям EORTC/MSG, 2008 [6].

Проанализировали данные литературы о случаях ХДК у детей с онкологическими и гематологическими заболеваниями за последние 10 лет, а также особенностях диагностики и лечения синдрома иммунологической реконституции.

Описание клинического случая

Девочка, 14 лет, фоновое заболевание: секреторная герминогенно-клеточная опухоль смешанной этиологии хиазмально-селлярной области с выраженным экстра- и ретроселлярным ростом, R+M0, группа высокого риска. Состояние после частичной резекции

от 24.04.2017 г., 2-х курсов полихимиотерапии, высокодозной химиотерапии (ВДХТ) с аутотрансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (аутоТГСК), локальной лучевой терапии. Рецидив 1 с лептоменингеальным распространением.

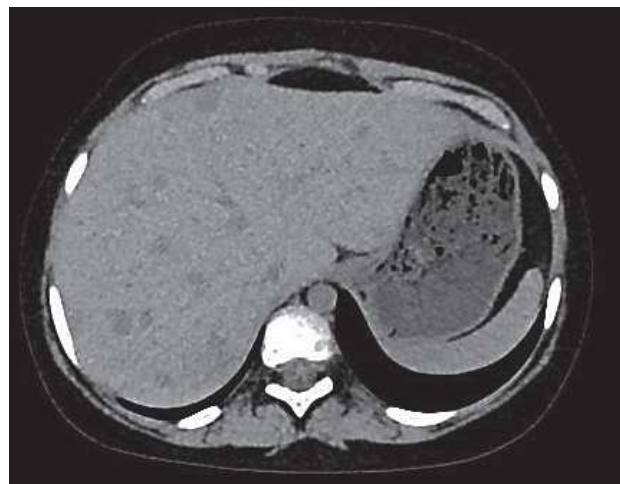
Болеет с марта 2017 г., когда впервые диагностировали герминогенно-клеточную опухоль хиазмально-селлярной области. В отделении химиотерапии онкогематологических заболеваний и ТКМ для детей ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» в соответствии с протоколом SIOP CNS GCT II 2010 г. проведено комплексное лечение заболевания с применением метода ВДХТ с аутоТГСК. Программная терапия была завершена в декабре 2017 г. с достижением ремиссии.

В июле 2018 г. диагностировали рецидив заболевания, по поводу которого проведен курс противорецидивной химиотерапии (ХТ) по схеме карбоплатин/этопозид. С учетом объема проводимого лечения был установлен центральный венозный катетер, длительность использования которого составила 24 дня.

После 1 блока противорецидивной ХТ в периоде постцитостатической миелосупрессии 4 ст. возникли фебрильная нейтропения, нейтропенический энтероколит (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*), бактериурия (*Enterococcus faecium*), ДНК-емия цитомегаловирусной инфекции ($3,6 \cdot 10^3$ копий ДНК ЦМВ/ 10^5 клеток). Отмечали многофокусную колонизацию *Candida* spp.: *C. albicans* и *C. tropicalis* (кал), *C. parapsilosis* (зев). При проведении визуализирующих методов обследования (МСКТ ОГК, УЗИ ОБП) патологии не выявлено. По поводу инфекционных эпизодов проводили антибактериальную терапию с постепенной эскалацией (цефоперазон+сульбактам, меропенем, ванкомицин, полимиксин В, линезолид), а также эмпирическое назначение микафунгина в дозе 100 мг/кг и удаление ЦВК (роста при посеве дистального фрагмента не получено) с эффектом в виде достижения апирексии, купирования симптомов энтероколита, санации мочи, а также снижения маркеров системного воспаления (СРБ, ПКТ). Для стимуляции лейкопоза пациентка получала филграстим. Длительность постцитостатического агранулоцитоза составила 28 дней, однако сохранялась тромбоцитопения 3-4 ст., что препятствовало продолжению противорецидивной химиотерапии. После разрешения инфекционного эпизода и достижения АЧН $>1,5 \cdot 10^9$ /л антибактериальная и противогрибковая терапия были завершены.

На 39 сутки 1-го противорецидивного курса ХТ, после восстановления лейкопоза и нормализации АЧН в гемограмме, отмечали ухудшение состояния в виде учащения эпизодов фебрильной лихорадки, появления интенсивных болей в правом подреберье, гепатомегалии, нарастания СРБ без диагностически значимого повышения ПКТ. При УЗИ ОБП во всех отделах печени (Рис.) выявили множественные очаговые образования пониженной эхогенности размерами до 0,5 см. При МСКТ ОБП с контрастным усилением в структуре печени и селезенки выявили очаги пониженной плотности без четких контуров (Рис.). Биопсию очаговых образований печени не провели в связи с сохраняющейся тромбоцитопенией 3-4 ст. и высоким риском геморрагических осложнений. Результат теста на маннан в сыворотке крови был отрицательным (С=0,1 пг/мл), теста на антимаанновые антитела – по-

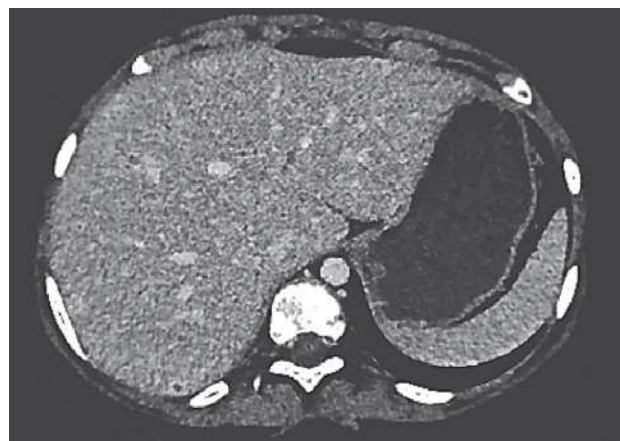
ложительным (С=44 УА/мл). В динамике отмечено нарастание уровня щелочной фосфатазы до 348 Ед/л.



a



a



a, b

Рис. УЗ и КТ признаки множественных очаговых образований в паренхиме печени (a) и селезенки (b).

На основании клинических, радиологических и серологических методов диагностики в соответствии с критериями EORTC/MSG диагностировали «вероятный» ХДК. Возобновили антифунгальную терапию микафунгином в дозе 100 мг/сут. В связи с сохраня-

ющимися эпизодами фебрильной лихорадки на фоне проводимой оптимальной антимикотической терапии в течение 7 дней, нарастанием уровня СРБ, а также учитывая стабильный клинический статус пациентки, отрицательные результаты микробиологических исследований и восстановление числа нейтрофилов, диагностировали СИР, ассоциированный с ХДК. К антифунгальной терапии был добавлен дексаметазон в дозе 0,5 мг/кг/сут. В течение 2-х суток нормализовалась температура тела, снизился уровень СРБ. Снижение дозы и отмену дексаметазона проводили в течение 28 дней. При контрольном УЗИ ОБП констатировали уменьшение размеров и количества очаговых образований в печени, регресс образований в селезенке. В последующие 4 месяца продолжали противоопухолевую терапию на фоне применения микафунгина. Пероральные триазольные ЛС (флуконазол, вориконазол) не назначали в связи с риском межлекарственных взаимодействий.

Исчезновение клинических и КТ признаков ХДК расценили как полный ответ на антифунгальную терапию.

ОБСУЖДЕНИЕ

ХДК был впервые описан в 1950 г., и за последние годы значимо улучшилось понимание патогенеза и иммунологических аспектов течения заболевания [1]. В группе риска находятся иммунокомпрометированные пациенты, в частности больные онкогематологическими заболеваниями, иммуносупрессия у которых обычно обусловлена эпизодами длительной и глубокой постцитостатической нейтропении [1]. Факторами риска развития ХДК, помимо фонового заболевания, являются повреждение целостности кожи и слизистых оболочек, наличие ЦВК, антибактериальная терапия широкого спектра действия, полное парентеральное питание, а также мультифокальная колонизация грибами рода *Candida* [1, 7]. Независимыми факторами риска являются возраст молодой возраст, агранулоцитоз >15 дней и использование фторхинолонов [8].

За последние 10 лет опубликовано 11 исследований ХДК у детей с онкогематологическими заболеваниями (табл.). Среди них не было пациентов с секретирующей герминогенно-клеточной опухолью.

Таблица

Анализ литературных данных по случаям ХДК у детей с онкологическими заболеваниями

Автор/ группа исследователей	N случаев	Фоновое заболевание	ВДХТ с аутоТКМ	Лечение	Выжили (%)
Bayram C., et al. [9]	1	ОЛЛ	нет	вориконазол	100
Donker A.E., et al. [10]	4	ОЛЛ, Т-НХЛ	нет	амфоВ + комбинированная терапия	100
Genc D.B., et al. [11]	1	ОЛЛ	нет	вориконазол, амфоВ	100
Kaya Z., et al. [12]	2	ОЛЛ, ОМЛ	нет	амфоВ	100
Madney Y., et al. [13]	25	ОЛ	нет	каспофунгин – 14, амфоВ – 6, азолы – 5	96
Marques C.H., et al. [14]	13	СЮ, ЛХ, НБ, МБ, ОМЛ, ОЛЛ, комбинированный иммунодефицит	2 случая	амфоВ – 11, каспофунгин, вориконазол, сочетание – 3	100

Saint-Faust et al. [15]	2	ОЛЛ, ОМЛ	нет	амфоВ	100
Schkalim-Zemer V., et al. [16]	6	ОЛЛ, ОМЛ, АА, В-НХЛ	нет данных	амфоВ	50
Verdeguer A., et al. [17]	3	ОЛЛ	нет	амфоВ, 5-фторцитозин	67
Yen T.Y., et al. [18]	13	ОЛЛ, ОМЛ, АА, НБ	1	амфоВ	нет данных
Zajac-Spychala O., et al. [3]	1	ОЛЛ	нет	каспофунгин	100

АА – апластическая анемия; В-НХЛ – В-неходжкинская лимфома; ЛХ – лимфома Ходжкина; МБ – медуллобластома; НБ – нейробластома; ОЛ – острый лейкоз; ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз; ОМЛ – острый миелобластный лейкоз; СЮ – саркома Юинга; Т-НХЛ – Т-неходжкинская лимфома

По совокупности опубликованных данных за последние 10 лет общее число случаев ХДК при онкологических заболеваниях у детей составило 71 (табл.), при этом количество пациентов с солидными опухолями было значительно меньше (n=4), чем с гемобластомами (n=67). Среди онкогематологических заболеваний доминировали случаи ОЛЛ [3, 9-12, 14-18], в когорте детей с солидными опухолями – нейробластома (n=2), медуллобластома (n=1) и саркома Юинга (n=1) [14, 18]. Мы не встретили описания ХДК у ребенка с интракраниальной герминогенно-клеточной опухолью. Вклад ВДХТ с аутоТКМ не является значимым. В качестве терапии ХДК наиболее часто использовали липидную форму амфотерицина В, реже – каспофунгин, вориконазол или комбинированное лечение. Общая выживаемость варьировала от 50% до 100%, но, по данным большинства исследователей, составила 100% [3, 9-12, 14, 15].

Наиболее частыми клиническими проявлениями ХДК являются резистентная к антибактериальной терапии широкого спектра действия лихорадка, тянущие боли в правом подреберье/животе и гепато-/спленомегалия [1]. Как правило, течение ХДК сопровождается неспецифическими изменениями лабораторных показателей в виде повышения уровня С-реактивного белка (СРБ), печеночных трансаминаз, щелочной фосфатазы, фибриногена и ПКТ [5, 19]. При этом подчеркивается важность диссоциации вышеуказанных показателей: нарастание СРБ и фибриногена наряду с низкими значениями ПКТ [19]. В исследовании Leli и соавторов было показано, что использование ПКТ может быть эффективным для дифференциальной диагностики вида инфекции [20], при этом в случае микозов его содержание значительно ниже [21].

Среди методов визуализации наибольшей диагностической ценностью обладают МРТ и КТ с КУ [1]. За последние годы отмечена возрастающая диагностическая ценность ПЭТ/КТ с ФДГ, в том числе для оценки ответа на проводимую терапию [22].

Большая часть случаев ХДК ассоциирована с *C. albicans* [1], при этом выделение возбудителя из культуры крови выявляли не более чем в 20% случаев [1]. Для верификации диагноза необходимо проведение биопсии печени с выполнением гистологического и/или микробиологического исследований [6], что зачастую является невозможным у пациентов в период постцитостатической аплазии кроветворения. В качестве диагностических биомаркеров инвазивного кандидоза, согласно рекомендациям EORTC/MSG [6] и ECIL [23], могут быть информативны тест на (1→3)-β-D-глюкан и совместное определение маннана и антимананновых

антител в сыворотке крови.

Стандартом инициальной терапии ХДК является назначение липидной формы амфотерицина В (3-5 мг/кг/сут) или эхинокандинов: микафунгина (100 мг/сут), каспофунгина (70 мг – нагрузочная доза, далее – 50 мг/сут) с последующим переходом на пероральную терапию флуконазолом (6 мг/кг/сут) при отсутствии данных за флуконазол-резистентные штаммы, а также вориконазолом [24]. Как правило, рекомендуемая длительность антифунгальной терапии составляет несколько месяцев, преждевременное прекращение лечения ассоциировано с рецидивом ХДК [24]. Параметрами для оценки ответа на проводимую антимикотическую терапию являются разрешение атрибутивных симптомов заболевания, документированная элиминация возбудителя, регресс радиологических признаков и выживаемость пациентов [25]. Разрешение клинических симптомов после начала антифунгальной терапии, как правило, наступает в течение 2-8 недель, однако лихорадка может персистировать длительно, до нескольких недель после полного восстановления числа нейтрофилов.

Одной из особенностей течения ХДК является СИР, характеризующийся «парадоксальным» клиническим ухудшением состояния пациента в период восстановления числа нейтрофилов при отсутствии данных за реинфекцию и, в большинстве случаев, является диагнозом исключения [26]. Патогенез СИР объясняется развитием дисбаланса субпопуляций Т-лимфоцитов с преобладанием провоспалительных (Th7, Th17) и уменьшением числа противовоспалительных (Th9, Treg), а также продукцией фактора некроза опухоли-а (TNF-а) и интерферона d (IFN-d) [1, 4, 26]. Снижение количества регуляторных клеток (Treg), ингибирующих пролиферацию/созревание эффекторных Т-лимфоцитов и тормозящих избыточный воспалительный ответ, приводит к развитию чрезмерного и неконтролируемого СИР на различные патогены [26].

В качестве наиболее изученной терапевтической опции микоз-ассоциированного СИР на сегодняшний день является использование кортикостероидов в средней дозе 0,66 мг/кг/сут (0,4-2 мг/кг/сут в расчете на преднизолон), при этом срок до наступления клинического улучшения в среднем составляет 4,5 дня (1-30) [4, 24, 26]. Механизм действия опосредован через подавление секреции провоспалительных и стимуляцию противовоспалительных цитокинов [3]. Согласно литературным данным, длительность терапии кортикостероидами может составлять от 14 до 240 дней [4, 26]. Иными возможными опциями купирования микоз-ассоциированного СИР являются использование анти- TNF антител, например, адалимумаба или талидомида [4].

После достижения контроля на фоне антимикотической терапии с учетом межлекарственных взаимодействий возможно продолжение противоопухолевого лечения, в том числе проведение ВДХТ с аллогенной ТГСК [1, 24].

ВЫВОДЫ

1. У детей ХДК может возникать на фоне лечения как гематологических, так и онкологических заболеваний.
2. Основной фактор риска развития ХДК у детей – длительная выраженная нейтропения.
3. При диагностике ХДК необходимо учитывать данные КТ/МРТ, а также гистологических и серологических методов исследования. Результаты посевов крови обычно отрицательные.
4. Лечение ХДК состоит из длительного применения антимикотиков: сначала эхинокандинов, после стабилизации состояния пациента – азольных ЛС.
5. Для лечения СИР при ХДК используют кортикостероиды на фоне антифунгальной терапии.
6. При достижении контроля над ХДК следует продолжать лечение фонового заболевания на фоне антифунгальной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rammaert B., Desjardins A., Lortholary O. New insights into hepatosplenic candidosis, a manifestation of chronic disseminated candidosis. *Mycoses*, 2012; 55: e74-e84. doi: 10.1111/j.1439-0507.2012.02182.x.
2. Yen T., Huang L.M., Lee P., et al. Clinical characteristics of hepatosplenic fungal infection in pediatric patients. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2011; 44: 296-302. doi:10.1016/j.jmii.2010.08.005.
3. Zajac-Spychala O.Z., Ukielska B., Jonczyk-Potoczna K., et al. Chronic disseminated candidiasis complicated by immune reconstitution inflammatory syndrome in child with acute lymphoblastic leukemia. *Case Reports in Hematology*. 2016: 1-4. doi.org/10.1155/2016/5960150.
4. Delliere S., Guery R., Candon S., et al. Understanding pathogenesis and care challenges of immune reconstitution inflammatory syndrome in fungal infections. *J. Fungi*. 2018; 4 (139): 2-22. doi: 10.3390/jof4040139
5. Anttila V.J., Ruutu P., Bondestam S., et al. Hepatosplenic yeast infection in patients with acute leukemia: a diagnostic problem. *Clin. Infect. Dis*. 1994; 18: 979-981. doi.org/10.1093/clinids/18.6.979
6. De Pauw B., Walsh T.J., Donnelly J.P., et al. European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group; National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin. Infect. Dis* 2008; 46: 1813-1821. doi: 10.1086/588660.
7. Елинов Н.П., Васильева Н.В., Степанова А.А. и др. Краткий атлас медицински значимых микромицетов рода *Candida*. СПб., 2013: 73 с. [Elinov N.P., Vasileva N.V., Stepanova A.A. i dr. Kratkij atlas medicinski znachimyh mikromicetov roda *Candida*. SPb., 2013: 73 s. (In Russ)].
8. Sallah S., Wan J.Y., Nguyen N.P., et al. Analysis of factors related to the occurrence of chronic disseminated candidiasis in patients with acute leukemia in a non-bone marrow transplant setting: a follow-up study. *Cancer*. 2001; 92: 1349-1353. doi.org/10.1002/1097-0142(20010915)92:6<1349::AID-CNCR1457>3.0.CO;2-E
9. Bayram C., Fettah A., Yarali N., et al. Adjuvant Corticosteroid therapy in hepatosplenic candidiasis-related iris. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis*. 2012; 4 (1): e2012018. doi: 10.4084/MJHID.2012.018.
10. Donker A.E., Mavinkurve-Groothuis A.M., van Die L.E., et al. Favorable outcome of chronic disseminated candidiasis in four

- pediatric patients with hematological malignancies. *Med. Mycol.* 2012; 50 (3): 315-9. doi: 10.3109/13693786.2011.588256.
11. *GenV D.B., Vural S., Urganci N., et al.* *Candida*-related immune response inflammatory syndrome treated with adjuvant corticosteroids and review of the pediatric literature. *Turk. J. Hematol.* 2017; 34: 99-117. doi.org/10.4274/tjh.2016.0237
 12. *Kaya Z., Gursel T., Kocak U., et al.* Invasive fungal infections in pediatric leukemia patients receiving fluconazole prophylaxis. *Pediatr. Blood Cancer.* 2019; 52 (4): 470-475. doi: 10.1002/pbc.21868.
 13. *Madney Y., Hafez H., Elany M., et al.* Clinical features and outcome of hepatosplenic fungal infections in children with hematological malignancies. *Mycoses.* 2019. doi: 10.1111/myc.13002.
 14. *Marqués H.C., Lassaletta-Atienza A., González-Vicent M., et al.* Hepatosplenic candidiasis in paediatric haematology-oncology patients. *An Pediatr (Barc).* 2011; 75 (1): 26-32. doi: 10.1016/j.anpedi.2011.01.022.
 15. *Saint-Faust M., Boyer C., Gari-Toussaint M., et al.* Adjuvant corticosteroid therapy in 2 children with hepatosplenic candidiasis-related IRIS. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 2009; 31: 794-796. doi.org/10.1097/MPH.0b013e3181b795ec
 16. *Shkalim-Zemer V., Levi I., Fischer S., et al.* response of symptomatic persistent chronic disseminated candidiasis to corticosteroid therapy in immunosuppressed pediatric patients: case study and review of the literature. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2018; 37 (7): 686-690. doi: 10.1097/INF.0000000000001844.
 17. *Verdeguer A., Fernandez J.M., Esquembre C., et al.* Hepatosplenic candidiasis in children with acute leukemia. *Cancer.* 2010; 65 (4): 874-877. doi.org/10.1002/1097-0142(19900215)65:4<874::AID-CNCR2820650408>3.0.CO;2-Z
 18. *Yen T.Y., Huang L.M., Lee P.I., et al.* Clinical characteristics of hepatosplenic fungal infection in pediatric patients. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection,* 2011; 44: 296-302. doi.org/10.1016/j.jmii.2010.08.005
 19. *Marková M., Brodská H., Malíčková K., et al.* Substantially elevated C-reactive protein (CRP), together with low levels of procalcitonin (PCT), contributes to diagnosis of fungal infection in immunocompromised patients. *Support Care Cancer.* 2013; 21 (10): 2733-42. doi: 10.1007/s00520-013-1844-1.
 20. *Leli C., Ferranti M., Moretti A., et al.* Procalcitonin levels in gram-positive, gram-negative, and fungal bloodstream infections. *Disease Markers.* 2015: 1-8. doi: 10.1155/2015/701480.
 21. *Roques M., Chretien M., Favenne C., et al.* Evolution of procalcitonin, C-reactive protein and fibrinogen levels in neutropenic leukemia patients with invasive pulmonary aspergillosis or mucormycosis. *Mycoses.* 2016; 59 (6): 383-390. doi: 10.1111/myc.12487.
 22. *Hot A., Maunoury C., Poiree S., et al.* Diagnostic contribution of positron emission tomography with [18F] fluorodeoxyglucose for invasive fungal infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011; 17: 409-417. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03301.x
 23. *Mikulska M., Calandra T., Sanguinetti M., et al.* The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. *Crit. Care.* 2010; 14: R222. doi.org/10.1186/cc9365
 24. *Pappas P.G., Kauffman C.A., Andes D.R., et al.* Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the infectious diseases society of America. *Clin. Infect. Dis.* 2016; 62 (4): e1-50. doi: 10.1093/cid/civ933.
 25. *Segal B.H., Herbrecht R., Stevens D.A., et al.* Defining responses to therapy and study outcomes in clinical trials of invasive fungal diseases: Mycoses Study Group and European Organization for Research and Treatment of Cancer consensus criteria. *Clin. Infect. Dis.* 2008; 47: 674-683. doi: 10.1086/590566.
 26. *Chaussade H., Bastides F., Lissandre S., et al.* Usefulness of corticosteroid therapy during chronic disseminated candidiasis: case reports and literature review. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012; 67: 1493-1495. doi.org/10.1093/jac/dks044

Поступила в редакцию журнала 28.10.19

Рецензент: М.А. Шевяков



ИНВАЗИВНЫЙ КАНДИДОЗ У НОВОРОЖДЕННЫХ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ: ОПИСАНИЕ КЛИНИЧЕСКОГО СЛУЧАЯ И РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОСПЕКТИВНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

¹Шагдилеева Е.В. (доцент)*, ¹Файзуллина Р.Р. (студентка), ²Белова О.А. (анестезиолог-реаниматолог), ³Кузнецова Т.Н. (врач-реаниматолог), ²Воронович С.Э. (анестезиолог-реаниматолог), ²Рубин Г.В. (зав. отд.), ³Воробьева С.К. (врач-неонатолог), ³Хонько В.С. (анестезиолог-реаниматолог), ³Котина Н.З. (зав. отд.), ¹Богомоллова Т.С. (зав. лаб.), ¹Выборнова И.В. (н.с.), ^{4,5}Колбин А.С. (зав. кафедрой, профессор кафедры), ¹Климко Н.Н. (зав. кафедрой)

¹Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина и кафедра клинической микологии, аллергологии и иммунологии); ²Детская городская больница № 17 Святителя Николая Чудотворца; ³Детская городская больница №1; ⁴Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова; ⁵Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Инвазивный кандидоз (ИК) – тяжелое осложнение у новорожденных. В проспективное исследование с января 2015 по июль 2019 гг. включили 31 новорожденного с диагнозом «доказанный» ИК по критериям EORTC/MSG 2008, девочек – 58%. ИК развивался преимущественно у недоношенных новорожденных (87%) с массой тела при рождении от 560 г до 4000 г (медиана – 1280 г) и медианой гестационного возраста при рождении – 29 недель (23-40 недель). Факторы риска ИК: применение антибактериальных препаратов широкого спектра действия (100%), использование центрального венозного катетера (93%), проведение искусственной вентиляции легких (84%), полного парентерального питания (71%) и гемотрансфузий (55%). Основной клинический вариант ИК – кандидемия (97%), реже выявлялись хориоретинит (6%), поражение ЦНС (3%) и печени (3%). Основные возбудители – *C. albicans* – 45%, *C. parapsilosis* (29%) и *C. famata* (13%). Определяли чувствительность *Candida spp.* к флуконазолу и каспифунгину. Выявили резистентность штаммов к флуконазолу – 3%, с дозозависимой чувствительностью к флуконазолу – 6%, к каспифунгину все возбудители были чувствительны. Первичную антифунгальную профилактику флуконазолом получали 94% новорожденных. Удаление/замену ЦВК в первые 24 часа после постановки диагноза ИК выполнили у 87% пациентов. Антимикотические препараты в первые сутки получали 100% больных, флуконазол – 93%, микафунгин – 35%. Общая 30-дневная выживаемость составила 80,6%.

Ключевые слова: антифунгальная терапия, инвазивный кандидоз, инвазивный микоз, кандидемия, новорожденные, *Candida spp.*

INVASIVE CANDIDIASIS IN NEONATES IN SAINT PETERSBURG: CLINICAL CASE AND RESULTS OF THE PROSPECTIVE STUDY

¹Shagdileeva E.V. (associate professor of the department), ¹Faizullina R.R. (student), ²Belova O.A. (anesthesiologist-resuscitator), ³Kuznetsova T.N. (resuscitator), ²Voronovich S.E. (anesthesiologist-resuscitator), ²Rubin G.V. (head of the clinical department), ³Vorobeva S.K. (neonatologist), ³Khonko V.S. (anesthesiologist-resuscitator), ³Kotina N.Z. (head of the clinical department), ¹Bogomolova T.S. (head of laboratory), ¹Vybornova I.V. (scientific collaborator), ^{4,5}Kolbin A.S., ¹Klimko N.N. (head of the department)

¹I.I. Mechnikov North-Western State Medical University (Kashkin Research Institute of Medical Mycology and Department of Clinical Mycology, Allergy and Immunology); ²City Children's Hospital № 17; ³City Children's Hospital № 1; ⁴I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University; ⁵ St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

*Invasive candidiasis is a serious complication in newborns. In the prospective study from January 2015 to July 2019 were included 31 neonates with "proven" IC according to the EORTC / MSG 2008 criteria, females – 58%. Premature neonates accounted for 87% of patients. Birth weight was from 560 to 4000 g (median – 1280 g), median gestational age at birth – 29 weeks (23 - 40). Broad-spectrum antibacterial drugs were prescribed in 100% patients, central venous catheter (CVC) – 93%, mechanical ventilation – 84%, parenteral nutrition – 71 %, blood transfusion – 55%. The main clinical variant of IC was candidemia – 97%, chorioretinitis (6%), meningitis (3%), and hepatitis (3%). The pathogens of IC were *C. albicans* – 45%, *C. parapsilosis* – 29%, and *C. famata* – 13%. In vitro resistant to fluconazole were 3% pathogens, dose-dependent susceptible to fluconazole – 6%. Fluconazole prophylaxis received 94% patients. In the first 24 hours after diagnosis, CVC was removed / replaced in 87% patients. In the first 24 hours after diagnosis, antifungal treatment was used in 100% patients: fluconazole (100%), micafungin (35%). The overall 30-day survival rate was 80,6%, the survival of three patients was unknown.*

Key words: antifungal treatment, invasive candidiasis, invasive mycosis, candidemia, newborns, neonates, *Candida spp.*

В течение последних трех десятилетий заболеваемость грибковыми инфекциями у новорожденных нарастает [1]. Наиболее частый микоз в неонатологии – инвазивный кандидоз (ИК) [2]. В отделении реанимации и интенсивной терапии новорожденных (ОРИТН) ИК занимает третье место среди инфекций кровотока [3].

Возникновению ИК способствуют недоношенность, низкая масса тела при рождении, наличие инвазивных устройств (центрального венозного катетера (ЦВК), других катетеров, дренажей), применение антибактериальных препаратов и длительное пребывание в ОРИТН [1, 4-8]. У новорожденных ИК отличается высокой общей летальностью – 20-54% [8-13]. Однако количество посвященных данной проблеме публикаций в нашей стране ограничено.

Цель данной работы – изучить этиологию, факторы риска, клинические проявления и результаты лечения ИК у новорожденных в Санкт-Петербурге.

* Контактное лицо: Шагдилеева Елена Владимировна, e-mail: Elena.Shagdileeva@sngmu.ru

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проспективное исследование было проведено с января 2015 г. по июль 2019 г. Мы обследовали новорожденных с подтвержденным диагнозом ИК. Для постановки диагноза использовали клинические и лабораторные критерии, предлагаемые европейской организацией по изучению и лечению рака (EORTC), и группой, исследующей микозы (MSG), Национального института аллергологии и инфекционных заболеваний (NIAID) NIH США [14].

Чувствительность к антимикотическим препаратам определяли диско-диффузионным методом, применяли бумажные диски диаметром 6 мм, пропитанные вориконазолом, – содержание препарата в диске 1 мкг (Oxoid) и флуконазолом – содержание препарата в диске 25 мкг (Oxoid). Взвеси *Candida* spp. готовили из выращиваемых в течение 1 суток при +37 °С (+28 °С – для *S. lipolytica*) культур на агаре Сабуро в чашках Петри, затем клеточную массу снимали с поверхности агара бактериологической петлей, суспендировали в пробирке с 0,85% стерильным раствором натрия хлорида до густоты рабочих взвесей 0,5 ЕД по Мак Фарланду, что соответствует концентрации 1-5·10⁶ клеток/мл. Инокулом наносили по всей поверхности чашки с агаром Мюллера-Хинтон с добавлением 2% глюкозы и 0,5 мкг/мл метиленового синего одноразовым стерильным тампоном (хлопок-дерево). Контроль качества исследования проводили с использованием тест-культуры *S. parapsilosis* ATCC 22019 (РКПГУ-1245). Инкубацию осуществляли при 35 °С 18-24 часа [15]. МИК определяли с помощью микробиологического анализатора BIOMIC Vision (Giles Scientific, США) по образующейся зоне задержки роста.

Также авторы провели анализ данных научной литературы в базах PubMed (октябрь 2019 г.), ClinicalKey (октябрь 2019 г.) и Elibrary (октябрь 2019 г.). При поиске информации использовали следующие ключевые слова: *антифунгальная терапия, инвазивный кандидоз, инвазивный микоз, новорожденные, кандидемия, Candida* spp.

Описание клинического случая.

Недоношенный мальчик в возрасте двух суток жизни 4 апреля 2015 г. был переведён из родильного дома №18 в ОРИТН детской городской больницы (ДГБ) №17. Ребенок был в тяжелом состоянии, на искусственной вентиляции легких (ИВЛ) вследствие выраженной дыхательной недостаточности (ДН) 3 степени.

При объективном осмотре общее состояние крайне тяжелое за счёт ДН 3 степени, гемодинамических нарушений, течения инфекционного процесса, метаболических расстройств, на фоне морфофункциональной незрелости.

Анамнез заболевания: ребенок недоношенный – 26 недель, масса тела при рождении 680 г, второй из дихориальной диамниотической двойни (ДХДА), по шкале Апгар – 5/6 баллов, асфиксия при рождении. Состояние крайне тяжелое с рождения, ДН 3 степени, артериальная гипотензия.

По данным лабораторных исследований: метаболический ацидоз, гипергликемия.

Лечение: искусственная вентиляция легких (ИВЛ) с рождения, инотропная поддержка (добутамин, допамин), антибактериальные препараты широкого спектра действия: ампициллин сульбактам, гентамицин,

меропенем, ванкомицин. Ребенок получал полное парентеральное питание (ППП), трофическое питание не усваивал.

Мать: 37 лет, в анамнезе хронический аднексит и сальпингит, вегето-сосудистая дистония по кардиальному типу, бесплодие II, вторая беременность, наступившая в результате экстракорпорального оплодотворения с интрацитоплазматической инъекцией сперматозоида. Беременность протекала на фоне угрозы прерывания с ранних сроков, укорочение шейки матки с 18 недель, шва на шейке матки с 20 недель. Роды первые преждевременные на сроке 26 недель.

При поступлении у ребенка: в клиническом анализе крови – лейкопения с нейтрофилезом, в биохимическом анализе крови – гипергликемия, повышение С-реактивного белка (СРБ) – 8 мг/л. По результатам ЭХО-кардиографии от 06.04.15 г. патологии не выявили (без открытого артериального протока, функция выброса сердца 66%). На нейросонографии головного мозга от 06.04.15 г.: сплетения расширены неоднородные, мелкие тромбы в просвете; повышение эхо-плотности в перивентрикулярных зонах. На рентгенограмме органов грудной клетки (04.04.15 г.): снижение пневматизации легких за счёт тяжелого течения синдрома дыхательных расстройств (СДР).

Диагноз при поступлении: внутриамниотическая инфекция (ВАИ), СДР, ДН 3 степени. Асфиксия при рождении. Недоношенность 26 недель, II из ДХДА. Экстремально низкая масса тела (ЭНМТ).

Ребенку установили ЦВК. Была продолжена антибактериальная терапия препаратами широкого спектра действия (меропенем, ванкомицин) и высококачественная ИВЛ, параметры жесткие.

С учетом наличия показаний для проведения специфической антимикотической профилактики (ЭНМТ – 680 г, терапия антибактериальными препаратами широкого спектра действия и применение ЦВК), ребенок профилактически получал флуконазол – 3 мг/кг в сутки два раза в неделю.

В первые две недели жизни состояние ребенка было очень тяжелым, за счет прогрессирования ДН до 2 степени (проводили частые санации трахеобронхального дерева) и некротизирующего энтероколита (НЭК). В биохимическом анализе крови – нестабильный уровень глюкозы (до 2,1 ммоль/л). В клиническом анализе крови - прогрессировала анемия (71 г/л) по поводу которой провели гемотрансфузии фильтрованной эритроцитарной взвесью.

Модифицировали антибактериальную терапию (метронидазол и амикацин). Также с учетом клинического состояния и наличия факторов риска ИК: недоношенности (малый гестационный возраст – 26 недель, ЭНМТ – 680 г), интубации трахеи, наличия ЦВК, длительного применения антибиотиков широкого спектра действия, НЭК, проведения ППП и гемотрансфузий, с 15.04.15 г. была назначена эмпирическая противогрибковая терапия (флуконазол – 6 мг/кг сутки).

Спустя три дня проводимого лечения достигли положительной динамики в течении НЭК, ввели искусственное энтеральное питание, еще через два дня добавили грудное вскармливание.

При посевах крови роста микробиоты не было.

При посеве мокроты от 22.04.15 г. выделили *Staphylococcus haemolyticus*. Антибактериальная тера-

пия изменена (ванкомицин).

С третьей недели жизни у ребенка отмечали эпизоды выраженных бронхоспазмов, в связи с чем назначили системные глюкокортикостероиды (ГКС) (гидрокортизон – 5 мг/кг/сут, 8 дней) и симптоматическое лечение (аминофиллин, сальбутамол). На 27 сутки жизни 29.04.19 г. ребенка удалось перевести на неинвазивную респираторную поддержку (НСРАР).

К концу первого месяца жизни состояние оставалось тяжёлым за счёт ДН 2 степени, инфекционного процесса и морфофункциональной незрелости. По данным лабораторных исследований: компенсированный метаболический ацидоз, лейкоцитоз со сдвигом влево, тромбоцитопения и нарастающая анемия. Провели повторные заместительные гемотрансфузии.

29.04.19 г. был заменен ЦВК, при посеве дистального конца удаленного ЦВК 30.04.19 г. получен рост *Candida* spp. В связи с чем на 25 день жизни установлен диагноз «инвазивный кандидоз». Выделенная культура *Candida* была идентифицирована в НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина как *C. parapsilosis*, чувствительный к флуконазолу и вориконазолу и эхинокандинам *in vitro*.

Для выявления очагов диссеминации выполнили:

- рентгенографию органов грудной клетки: снижение пневматизации за счёт вздутия легких;
- ЭХО-кардиографию: умеренно повышенное среднее давление на легочной артерии;
- ультразвуковое исследование (УЗИ) органов брюшной полости: без особенностей;
- офтальмоскопический осмотр: ретинопатия недоношенных активная фаза III стадии I-II степени ОУ. Очаги диссеминации не выявили.

Учитывая неэффективность длительной эмпирической терапии, 04.05.15 г. антимикотик был заменен на микафунгин 4 мг/кг/сут, но в связи с отсутствием эхинокандинов в стационаре с 07.05.15 г. был назначен флуконазол. С 21.05.15 г. к проводимой антимикотической терапии добавили микафунгин в прежней дозировке.

При посеве дистального конца ЦВК от 26.05.15 г. и посеве крови от 27.05.19 г. повторно получили рост *C. parapsilosis*. В связи с отсутствием эффекта от антифунгальной терапии 29.05.15 г. ЦВК был удален, ребенка в дальнейшем вели без ЦВК.

При посеве крови от 01.06.15 г. выделены *S. haemolyticus*, *Enterococcus faecalis*, микобиоты не было.

Антибактериальная терапия модифицирована (ванкомицин – 45 мг/кг/сут), на фоне лечения отмечали клиничко-лабораторное улучшение, с 09.06.15 г. и в дальнейших посевах крови роста микобиоты не обнаружили.

05.06.15 г. отменили микафунгин, а еще через 7 дней – и флуконазол. Общая длительность антимикотического лечения составила 39 дней.

К 19.06.19 г. состояние ребенка стабилизировалось, в возрасте 2 месяцев 16 дней пациент переведён для дальнейшего ведения в педиатрическое отделение. При офтальмологических осмотрах в динамике до 13.07.15 г. данных за кандидозный ретинит не было. В возрасте 3 месяцев 12 дней с массой тела 2480 г в удовлетворительном состоянии ребенок был выписан домой.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В проспективное исследование включили 31 новорожденного с диагнозом «доказанный» ИК. Медиана гестационного возраста при рождении – 29 недель (23 – 40), масса тела при рождении составила от 560 г до 4000 г (медиана – 1280 г). Соотношение пациентов мужского и женского пола – 1:1,5. Отметим, что среди младенцев с ИК 26% были с низкой массой тела при рождении, еще 26% – с очень низкой массой тела (ОНМТ) и 32% – с ЭНМТ. Недоношенные новорожденные составили 87% от общего числа пациентов, а дети, рожденные в результате многоплодной беременности, – 19%.

ИК развивался на 5-88 день госпитализации, медиана – 22 дня. В большинстве случаев ИК был внутрибольничной инфекцией (94%), реже – врожденной (6%).

Оценку частоты ИК провели в ДГБ Санкт-Петербурга: за период с 2015 г. по 2018 г. в ДГБ она составила 3,7 на 1000 госпитализированных (27 пациентов ИК из 7264 госпитализированных), а в ОРИТН – в пять раз выше – 18,7 на 1000 госпитализированных (27 пациентов ИК из 1489 госпитализированных).

Выявлены основные фоновые состояния, способствующие развитию ИК у новорожденных: недоношенность – 87%, внутриамниотические инфекции – 74%, оперативные вмешательства – 10%, ВИЧ-инфекция – 6%.

Установлено, что ИК развивался преимущественно у недоношенных новорожденных, получающих антибактериальные препараты широкого спектра действия, ИВЛ, ППП и гемотрансфузии, которым был установлен ЦВК (табл.).

Таблица

Факторы риска ИК у новорожденных		
Факторы риска	абсолютные	%
Антибактериальные препаратов широкого спектра действия	31	100
ЦВК	29	93
Недоношенность	27	87
- масса тела при рождении меньше 1000 г	10	37 из недоношенных
- гестационный возраст менее 27 недель	7	26 из недоношенных 23 из всех новорожденных
ИВЛ	26	84
ППП	22	71
Гемотрансфузии	17	55
ГКС	4	13
Оперативные вмешательства	3	10
ВИЧ-инфекция	2	6

Основной клинический вариант ИК – кандидемия (97%), реже выявляли хориоретинит (6%), поражение центральной нервной системы (3%) и печени (3%).

У большинства новорожденных диагноз был подтвержден посевом крови и дистального конца ЦВК (97%), у одного пациента – посевом спинномозговой жидкости (3%).

Возбудителями ИК были: *C. albicans* – 45%, *C. parapsilosis* – 29%, *C. famata* – 13%, *C. pelliculosa* – 6%, *C. tropicalis* – 6%, *C. guiliermondii* – 3%, идентифицированы только до рода были 3% штаммов. При определении этиологии установили, что ИК был обусловлен двумя видами *Candida* spp. у 6% пациентов, а также у 6% детей выявили микст-микозы, которые были обусловлены *Candida* spp. в сочетании с *Exophiala dermatitidis* – 3% и с *Aspergillus flavus* – 3%.

Определили чувствительность возбудителей ИК к флуконазолу и каспофунгину. Выделенные культуры были чувствительны к каспофунгину; к флуконазолу были чувствительны – 91% изолятов, с дозозависимой чувствительностью – 6%, резистентны – 3%.

Первичную антифунгальную профилактику флуконазолом получали 94% новорожденных.

Удаление или замену ЦВК в первые 24 часа после постановки диагноза ИК выполнили у 87% пациентов.

Антимикотики в первые 24 часа после постановки диагноза назначены 100% больных. Наиболее часто использовали флуконазол (94%), микафунгин (35%), реже – амфотерицин В (19%), вориконазол (13%) и липосомальный амфотерицин В (3%).

Продолжительность лечения составила от 1 до 54 дней (медиана – 20). Общая 30-дневная выживаемость – 80,6% (Рис.).

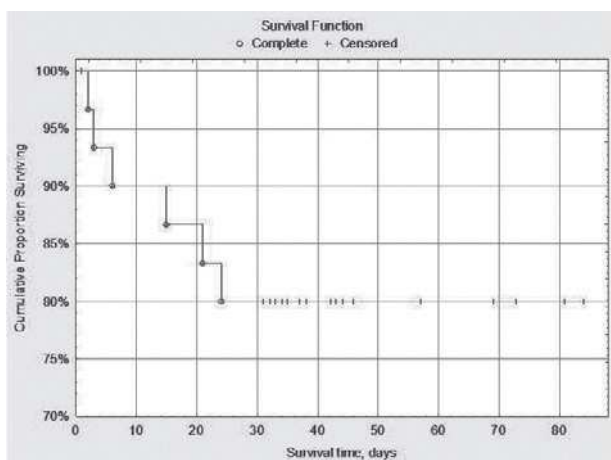


Рис. Общая 30-дневная выживаемость новорожденных с инвазивным кандидозом.

ОБСУЖДЕНИЕ И ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Инвазивный кандидоз может проявляться кандидемией и/или вовлечением в процесс любых органов и систем ребенка [16, 17].

По сведениям экспертной группы Российской ассоциации специалистов перинатальной медицины, частота ИК у новорожденных в структуре инфекционно-воспалительных заболеваний составляет от 15% до 30% [2, 9, 11, 18]. Данные нашего исследования показывают, что заболеваемость ИК в ОРИТН в Санкт-Петербурге составила 1,8% (18,7 на 1000 госпитализированных), что сопоставимо с результатами исследований в Европе (частота ИК – от 1,1% до 3,0%) [10, 19], в Северной и Южной Америке (от 0,5% до 1,6%) [10, 20] и значительно ниже показателей распространенности этого микоза среди новорожденных в Азии (от 4% до 7,7%) [10, 20]. Частота ИК у новорожденных имеет четкую связь со сроком гестации и массой тела при рождении, которая варьирует от 2,6% до 3,1% у новорожденных с ОНМТ и от 10% до 16% – у новорожденных с ЭНМТ [5, 7, 8, 11, 18, 21]. В нашем исследовании больше половины больных ИК было с ОНМТ и ЭНМТ.

В соответствии с опубликованным отечественными клиническим рекомендациям, факторами риска ИК у новорожденных являются: недоношенность (малая масса тела при рождении менее 1000 г и малый гестационный возраст менее 27 недель); наличие

ЦВК; интубация трахеи; наличие других инвазивных устройств (дренажей, катетеров); терапия антимикробными препаратами широкого спектра действия, особенно цефалоспорины III поколения и карбапенемами; проведение ППП; оперативные вмешательства на органах брюшной полости; течение НЭК; использование в терапии антацидов и H₂-блокаторов; наличие кандидозной инфекции у матери во время настоящей беременности и родов; наличие поверхностного (неинвазивного) кандидоза [8]. Мы выявили, что основным фактором риска, характерным для всех новорожденных, был прием антибактериальных препаратов широкого спектра действия, такие же результаты были получены в недавних исследованиях наших зарубежных коллег [22-25]. Использование в рутинной практике неонатологов ОРИТН ЦВК неизменно остается одним из ключевых факторов, способствующих развитию инвазивного микоза, обусловленного *Candida* spp., все проведенные исследования, включая наше, это подтверждают [1, 3, 6-11, 17-19, 24-27]. Это связано с тем, что дрожжеподобные грибы рода *Candida* способны прилипать к тромбоцитам и фибриногену на поверхности катетеров и образовывать биопленки, которые могут стать источником системного распространения [24, 28-30]. По полученным данным, недоношенные младенцы составили 87% случаев ИК, медиана гестационного возраста – 29 недель, а массы тела при рождении – 1280 г, в аналогичных исследованиях были получены схожие результаты [10, 24, 28, 29]. ИВЛ и ППП также оказались частыми причинами развития этого микоза. Кроме того, мы установили, что немаловажным фактором риска могут быть заместительные гемотрансфузии (55%). Остальные факторы риска встречались реже. В описанном нами случае, у мальчика выявили шесть известных факторов риска ИК, при этом мы не знаем, была ли у его матери кандидозная инфекция во время настоящей беременности и родов, а вот у его брата, I из ДХДА, были проявления поверхностного неинвазивного кандидоза.

В настоящее время по результатам проведенных исследований, включая наше, основным клиническим вариантом ИК остается кандидемия [9, 19-22, 25, 27, 31-36]. Другие варианты развиваются редко. Согласно опубликованным рекомендациям [8, 11], при выявлении кандидемии следует исключить поражение почек и ЦНС. При подозрении на развитие ИК ЦНС необходимо проведение люмбальной пункции с последующим культуральным исследованием СМЖ. Для выявления очагов диссеминации требуются дополнительные обследования: компьютерная томография головного мозга, легких и/или органов брюшной полости высокого разрешения, рентгенологическое исследование органов грудной клетки, УЗИ органов брюшной полости и почек, офтальмоскопия с расширением зрачка.

В последние годы наблюдают сдвиг в этиологии ИК от *S. albicans* к другим видам *Candida*, вероятно, связанный с широким использованием азольных антимикотиков, и с явной тенденцией к увеличению количества резистентных к противогрибковым препаратам штаммов [37-38]. В неонатологии происходят те же изменения. Мы установили, что не-*albicans* виды *Candida* составили 55% всех выделенных изолятов, подобный сдвиг продемонстрировали и другие исследователи

[10, 16, 26, 39, 40]. Но все же, согласно полученным данным, *C. albicans* сохраняет свои лидирующие позиции и остается основным возбудителем ИК, так же как и в Европе, Китае, США, Канаде, Индии, Иране, Нигерии [25, 27, 32-36, 40-43], и в целом в России [16, 39]. Среди не-*albicans* видов *Candida* преобладал *C. parapsilosis*, который часто выявляют у новорожденных, его чаще других обнаруживают на руках медицинского персонала, медицинском оборудовании, умывальниках и прочем. *C. parapsilosis* – второй по частоте возбудитель ИК и в аналогичных исследованиях [10, 11, 16, 18]. Необычно, что третье место в спектре изолятов у наших новорожденных занял *C. famata* – 13%. В доступной литературе мы не нашли подобных результатов. Остальные возбудители встречаются редко. Во многих последних исследованиях возбудители были чувствительны к флуконазолу [10, 19, 35, 40, 41, 44], а наши данные свидетельствуют о том, что к флуконазолу 9% штаммов были устойчивы или обладали дозозависимой чувствительностью, что следует учитывать при назначении стартовой антимикотической терапии. Все выделенные нами культуры *Candida* spp. были чувствительны к каспофунгину.

В соответствии с клиническими рекомендациями [16] стартовая эмпирическая антимикотическая терапия должна быть назначена не позднее первых 12 ч. от момента подозрения на наличие ИК и/или выявления *Candida* spp. при посеве крови и/или материала из иных стерильных локусов (СМЖ, плевральной жидкости и др.). Максимально раннее начало эмпирической антимикотической терапии улучшает последующий прогноз в плане выживаемости и снижения инвалидизации у новорожденных. После получения результатов микробиологических исследований крови и/или материала из иных стерильных локусов необходимо выполнить коррекцию эмпирической антимикотической терапии. Целенаправленная антимикотическая терапия должна быть назначена с учетом чувствительности выявленного возбудителя к антимикотическим препаратам и, наряду с ней, необходимо осуществлять замену всех сосудистых и иных катетеров, эндотрахеальной трубки, любых видов дренажей с момента постановки диагноза ИК. Отсроченное удаление катетеров при кандидемии может быть связано с увеличением показателей летальности у новорожденных.

В ходе нашего исследования мы установили, что большинство новорожденных получали антимикотическую профилактику флуконазолом, что может быть связано с возникновением резистентности [10]. Удаление или замену ЦВК в первые 24 часа после постановки диагноза ИК выполнили 87% пациентов. Авторы [45] сообщают, что раннее удаление/замена ЦВК значительно улучшают выживаемость данной когорты пациентов. А в представленном нами клиническом случае, несмотря на адекватную антимикотическую терапию и смену ЦВК, в первые 24 часа после постановки диагноза, кандидемия плохо поддавалась лечению, и получить отрицательные результаты посева удалось только после полного удаления ЦВК.

При подтверждении диагноза всем нашим младенцам антимикотическая терапия была назначена в первые сутки. Флуконазол остается наиболее часто используемым препаратом как в нашем исследовании, так и во многих других [25, 32, 35], в то время как микафунгин применяли только у 35% пациентов. Медиана длительности антимикотической терапии составила 20 дней.

Согласно нашим данным, 30-дневная выживаемость у новорожденных с ИК в г. Санкт-Петербург составила 80,6%, в других исследованиях – от 46% до 80% [6, 8-13].

ВЫВОДЫ

Инвазивный кандидоз развивается преимущественно у недоношенных новорожденных (87%), средний гестационный возраст при рождении – 29 недель с медианой массы тела при рождении 1280 г.

Факторы риска развития инвазивного кандидоза: применение антибактериальных препаратов широкого спектра действия (100%), ЦВК (93%), ИВЛ (84%), гемотрансфузии (55%).

Основные возбудители – *C. albicans* (45%), *C. parapsilosis* (29%), *C. famata* (13%)

Основной клинический вариант ИК – кандидемия (97%).

Удаление или замену ЦВК в первые 24 часа после постановки диагноза ИК выполнили 87% пациентов.

Антимикотические препараты получали 100% больных, флуконазол – 100%, микафунгин – 35%

Общая 30-дневная выживаемость составила 80,6%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chermont A.G., Rodrigues R.A., Praxedes F.B., et al. Candidemia in a reference center for maternal and infant health: clinical and epidemiological features and risk factors in premature infants weighing less than 1,500 g. J. Rev. Pan-Amaz Saude. 2015; 6 (4): 35-38. doi.org/10.5123/S2176-62232015000400005
2. Guillermo Quindós. Epidemiology of invasive mycoses: A landscape in continuous change. J. Rev. Iberoam. Micol. 2018; 35(4):171-178. doi.org/10.1016/j.riam.2018.07.002
3. Zaoutis T.E., Prasad P.A., Localio A.R., et al. Risk factors and predictors for candidemia in pediatric intensive care unit patients: implications for prevention. J. Clin. Infect. Dis. 2010; 51: 38-45. doi.org/10.1086/655698
4. Никитина И.В., Ионоу О.В., Приходько Н.А. Современные подходы к диагностике, терапии и профилактике инвазивных микозов у новорожденных. Неонатология: новости, мнения, обучение. 2014; 4: 64-72. [Nikitina I.V., Ionov O.V., Prikhod'ko N.A. Sovremennyye podkhody k diagnostike, terapii i profil-aktike invazivnykh mikofov u novorozhdennykh. Neonatologiya: novosti, mneniya, obucheniye. 2014; 4: 64-72 (In Russ)].
5. Любасовская Л.А., Припутневич Т.В., Анкирская А.С. и др. Особенности микробной колонизации новорожденных в отделении реанимации и интенсивной терапии. Рос. вестн. перинатологии и педиатрии. 2013; 3: 87-91. [Lyubasovskaya L.A., Priputnevich T.V., Ankirskaya A.S. i dr. Osobennosti mikrobnoy kolonizatsii novorozhdennykh v otdelenii reanimatsii i intensivnoy terapii. Ros. vestn. perinatologii i pediatrii. 2013; 3: 87-91 (In Russ)].
6. Aliaga S., Clark R., Laughon M. et al. Changes in the incidence of candidiasis in neonatal intensive care units. Pediatrics. 2014; 133 (2): 236-242. doi.org/10.1542/peds.2013-0671
7. Greenberg R.G., Benjamin D.K. Neonatal candidiasis: diagnosis, prevention, and treatment. J. Infect. 2014; 69: 19-22. doi.

- org/10.1016/j.jinf.2014.07.012
8. Антонов А.А., Байбарина Е.Н., Балашова Е.Н. и др. Инвазивный кандидоз у новорожденных (клинические рекомендации). Неонатология: новости, мнения, обучение. 2017; 4: 122-132. [Antonov A.A., Baybarina Y.N., Balashova Y.N. et al. Invazivnyy kandidoz u novorozhdennykh (klinicheskiye rekomendatsii). Neonatologiya: novosti, mneniya, obucheniye. 2017; 4: 122-132 (In Russ)].
 9. Pappas P.G., Kauffman C.A., Andes D.R., et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. J. Clin. Infect. Dis. 2016; 62 (4): 1-50. doi.org/10.1093/cid/civ1194
 10. Caggiano G., Lovero G., De Giglio O., et al. Candidemia in the neonatal intensive care unit: a retrospective, observational survey and analysis of literature data. Biomed Res. Int. 2017; (1): 1-12. doi.org/10.1155/2017/7901763
 11. Клишко Н.Н. Диагностика и лечение микозов в отделениях реанимации и интенсивной терапии: Российские рекомендации. 2-е изд. доп. и перераб. М.: Фармтек, 2015: 96 с. [Klimko N.N. Diagnostika i lechenie mikozov v otdeleniyah reanimatsii i intensivnoy terapii: Rossijskie rekomendatsii. 2-e izd. dop. i pererab. M.: Farmtek, 2015: 96 s. (In Russ)].
 12. Oeser C., Lamagni T., Heath P.T., et al. The epidemiology of neonatal and pediatric candidemia in England and Wales, 2000-2009. J. Pediatr. Infect. Dis. 2013; 32: 23-26. doi.org/10.1097/INF.0b013e318275612e
 13. Karadag-Oncel E., Kara A., Ozsurekci Y., et al. Candidemia in a paediatric centre and importance of central venous catheter removal. Mycoses. 2014; 58: 140-148. doi.org/10.1111/myc.12288
 14. De Pauw B., Walsh T.J., Donnelly J.P., et al. Revised definitions of invasive fungal from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Disease Mycoses Study Group. 2017; 31 (3): 475-487. doi: 10.1086/588660.
 15. Рауш Е.Р., Выборнова И.В., Шагдилеева Е.В. и др. Определение чувствительности возбудителей инвазивного кандидоза к флуконазолу и вориконазолу по международным стандартам. Проблемы медицинской микологии. 2013; 15 (1): 60-63. [Raus E.R., Vybornova I.V., Shagdileeva E.V. et al. Opredelenie chuvstvitel'nosti vzbuditelej invazivnogo kandidoza k flukonazolu i vorikonazolu po mezhdunarodnym standartam. Problemy medicinskoj mikologii. 2013; 15 (1): 60-63 (In Russ)]. mycology.szgmu.ru/files/MAPO_1_2013.pdf
 16. Приходько Н.А., Припутневич Т.В., Никитина И.В. и др. Применение препарата микафунгин при лечении инвазивных кандидозов у недоношенных детей в условия отделения реанимации и интенсивной терапии новорожденных. Неонатология: новости, мнения, обучение. 2015; 4: 84-90. [Prikhod'ko N.A., Priputnevich T.V., Nikitina I.V. et al. Primeneniye preparata mikafungin pri lechenii invazivnykh kandidozov u nedonoshennykh detey v usloviya otdeleniya reanimatsii i intensivnoy terapii novorozhdennykh. Neonatologiya: novosti, mneniya, obucheniye. 2015; 4: 84-90 (In Russ)].
 17. Hope W.W., Castagnola E., Groll A.H., et al. ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: prevention and management of invasive infections in neonates and children caused by *Candida* spp. J. Clin. Microbiol. Infect. 2012; 18 (7): 38-52. doi.org/10.1111/1469-0691.12040
 18. Клишко Н.Н. Микозы: диагностика и лечение. Руководство для врачей. 3-е изд. перераб. и доп. М.: Фармтек, 2017: 272 с. [Klimko N.N. Mikrozy: diagnostika i lechenie. Rukovodstvo dlya vrachej. 3-e izd. pere-rab. i dop. M.: Farmtek, 2017: 272 s. (In Russ)].
 19. Montagna M. T., Lovero G., De Giglio O., et al. Invasive fungal infections in neonatal intensive care units of Southern Italy: a multicentre regional active surveillance (AURORA project). Journal of Preventive Medicine and Hygiene. 2010; 51 (3): 125-130. PMID: 21361118
 20. Robinson J. A., Pham H. D., Bloom B. T., et al. Risk factors for persistent candidemia infection in a neonatal intensive care unit and its effect on mortality and length of hospitalization. Journal of Perinatology. 2012; 32 (8): 621-625. doi.org/10.1038/jp.2011.162
 21. Barton M., Shen A., O'Brien K., et al. Early onset of invasive candidiasis in extremely low birth weight infants: perinatal acquisition predicts poor outcome. Clin. Infect. Dis. 2017; 64 (7): 921-927. doi: 10.1186 / 1471-2334-14-327
 22. Blyth C.C., Chen S.C., Slavin M.A., et al. Australian candidemia study. Not just little adults: candidemia epidemiology, molecular characterization, and antifungal susceptibility in neonatal and pediatric patients. Pediatrics. 2009; 123: 1360-1368. doi.org/10.1542/peds.2008-2055
 23. Liu M., Huang S., Guo L., et al. Clinical features and risk factors for blood stream infections of *Candida* in neonates. Exp. Ther. Med. 2015; 10: 1139-1144. doi.org/10.3892/etm.2015.2626
 24. Kelly M.S., Benjamin D.K., Smith P.B. The epidemiology and diagnosis of invasive candidiasis among premature infants. Clin. Perinatol. 2015; 42: 105-117. doi.org/10.1016/j.clp.2014.10.008
 25. Jinjian Fu, Yan Ling Ding, Yongjiang Jiang, et al. Persistent candidemia in very low birth weight neonates: risk factors and clinical significance. BMC Infect. Dis. 2018; 18: 558. doi.org/10.1186/s12879-018-3487-9
 26. Celebi S., Hacimustafaoglu M., Koksali N., et al. Neonatal candidiasis: results of an 8 year study. Pediatr. Int. 2012; 54: 341-349. doi.org/10.1111/j.1442-200X.2012.03574.x
 27. Benjamin D.K., Jr., Stool B.J., Gantz M.G., et al. Neonatal candidiasis: epidemiology, risk factors, and clinical judgment. Pediatrics. 2010; 126: 865-73. doi.org/10.1542/peds.2009-3412
 28. Testoni D., Hayashi M., Cohen-Wolkowicz M., et al. Late-onset bloodstream infections in hospitalized term infants. Pediatric Infect. Dis. J. 2014; 33 (9): 920-923. doi.org/10.1097/INF.0000000000000322
 29. Leibovitz E. Strategies for the prevention of neonatal candidiasis. Pediatrics and Neonatology. 2012; 53(2): 83-89. doi.org/10.1016/j.pedneo.2012.01.004
 30. Елинов Н.П., Васильева Н.В., Степанова А.А., Чилина Г.А. *Candida*. Кандидозы. Лабораторная диагностика. СПб., 2010: 224 с. [Elinov N.P., Vasil'eva N.V., Stepanova A.A., Chilina G.A. Candida. Kandidozy. Laboratornaya diagnostika. SPb., 2010: 224 s. (In Russ)].
 31. Al-Sweih N., Khan Z., Khan S., et al. Neonatal candidemia in Kuwait: A 12-year study of risk factors, species spectrum and antifungal susceptibility. Mycoses. 2009; 52 (6): 518-523. doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01637.x
 32. Ezenwa B.N., Oladele R.O., Akintan P.E., et al. Invasive candidiasis in a neonatal intensive care unit in Lagos, Nigeria. Niger Postgrad Med. J. 2017; 24: 150-4. doi.org/10.4103/npmj.npmj_104_17

33. Wadile R.G., Bhate V.M. Study of clinical spectrum and risk factors of neonatal candidemia. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 2015; 58 (4): 472-4. doi.org/10.4103/0377-4929.168888
34. Mahieu L.M., Van Gasse N., Wildemeersch D., et al. Number of sites of perinatal *Candida* colonization and neutropenia are associated with nosocomial candidemia in the neonatal intensive care unit patient. *Pediatr. Crit. Care Med.* 2010; 11: 240-245. doi.org/10.1097/PCC.0b013e3181b808fb
35. Kooshki P., Rezaei-Matehkolaie A., Mahmoudabadi A.Z. The patterns of colonization and antifungal susceptibility of *Candida*, isolated from preterm neonates in Khorramabad, South West of Iran. *J. Mycol. Med.* 2018; 28 (2): 340-344. doi.org/10.1016/j.mycmed.2018.02.010
36. Barton M., O'Brien Karel, Robinson Joan L., et al. Invasive candidiasis in low birth weight preterm infants: risk factors, clinical course and outcome in a prospective multicenter study of cases and their matched controls. *BMC Infect. Dis.* 2014; 14: 327. doi.org/10.1186/1471-2334-14-327
37. Quindós G., Marcos-Arias C., San-Millán R., et al. The continuous changes in the aetiology and epidemiology of invasive candidiasis: from familiar *Candida albicans* to multiresistant *Candida auris*. *Int. Microbiol.* 2018; 21(3): 107-119. doi.org/10.1007/s10123-018-0014-1
38. Шагдилеева Е.В., Шадривова О.В., Чудиновских Ю.А. и др. Первый случай острого диссеминированного кандидоза, обусловленного двумя возбудителями (*Candida albicans* и *Candida glabrata*), у пациентки с лимфогранулематозом. Проблемы медицинской микологии. 2019; 21 (2):15-22. [Shagdileeva E.V., Shadrivova O.V., Chudinovskikh Y.A. i dr. Pervyj sluchaj ostrogo disseminirovannogo kandidoza, obuslovlennogo dvumya vozбудитelyami (*Candida albicans* i *Candida glabrata*), u pacientki s limfогranulematozom. Problemy medicinskoj mikologii. 2019; 21 (2):15-22 (In Russ)]. mycology.szgmu.ru/images/2_2019.pdf
39. Клишко Н.Н., Рубинчик В.Е., Соболев М.М. и др. Результаты проспективного многоцентрового исследования применения анидулафунгина – ЭРА (Эраксис в Российской Федерации). Проблемы медицинской микологии. 2018; 21 (2): 15-22. [Klimko N.N., Rubinchik V.E., Sobol' M.M. i dr. Rezul'taty prospektivnogo mnogocentrovogo issledovaniya primeneniya anidulafungina – ERA (Eraksis v Rossijskoj Federacii). Problemy medicinskoj mikologii. 2018; 21 (2): 15-22 (In Russ)]. mycology.szgmu.ru/files/МАРО_2_2018.pdf
40. Spiliopoulou A., Dimitriou G., Jelastopulu E., et al. Neonatal intensive care unit candidemia: epidemiology, risk factors, outcome, and critical review of published case series. *Mycopathologia.* 2012; 173 (4): 219-228. doi.org/10.1007/s11046-011-9498-3
41. Lovero G., De Giglio O., Montagna O., et al. Epidemiology of candidemia in neonatal intensive care units: A persistent public health problem. *Annali di Igiene.* 2016; 28 (4): 282-287. doi: 10.7416/ai.2016.2107.
42. Tortorano A. M., Prigitano A., Lazzarini C., et al. A 1-year prospective survey of candidemia in Italy and changing epidemiology over one decade. *Infection.* 2013; 41 (3): 655-662. doi.org/10.1007/s15010-013-0455-6
43. Vergnano S., Menson E., Kennea N., et al. Neonatal infections in England: The neon in surveillance net-work. *Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition.* 2011; 96 (1): 9-14. doi.org/10.1136/adc.2009.178798
44. Pemán J., Cantón E., Linares-Sicilia M.J., et al. Epidemiology and antifungal susceptibility of bloodstream fungal isolates in pediatric patients: A Spanish multicenter prospective survey. *Journal of Clinical Microbiology.* 2011; 49 (12): 4158-4163. doi.org/10.1128/JCM.05474-11
45. Fisher B.T., Vendetti N., Bryan M., et al. Central venous catheter retention and mortality in children with candidemia: a retrospective cohort analysis. *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.* 2015; 8: 1-6. doi.org/10.1093/jpids/piv048

Поступила в редакцию журнала 19.11.19

Рецензент: А.В. Соболев



СЛУЧАЙ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОГО СОЧЕТАННОГО МИКОЗА НА ФОНЕ ОСТРОЙ РЕСПИРАТОРНОЙ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

¹Хостелиди С.Н. (доцент)*, ¹Шагдилеева Е.В. (доцент), ¹Шадривова О.В. (доцент), ²Сатурнов А.В. (зав. отд.), ²Калинина Е.Ю. (доцент), ¹Авдеенко Ю.Л. (с.н.с.), ²Медников С.Н. (патологоанатом), ²Клещев М.А. (зав. отд.), ¹Степанова А.А. (зав. лаб.), ¹Тараскина А.Е. (зав. лаб.), ¹Игнатьева С.М. (в.н.с.), ¹Климко Н.Н. (зав. кафедрой)

¹Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина и кафедра клинической микологии, аллергологии и иммунологии); ²Ленинградская областная клиническая больница, Санкт-Петербург, Россия

Инвазивный аспергиллез и мукормикоз – оппортунистические инфекции, которые развиваются у иммунокомпрометированных больных. В последние десятилетия появились публикации о развитии инвазивного аспергиллеза у иммунокомпетентных в прошлом пациентов, поступивших в ОРИТ на фоне тяжелого гриппа. Представлен случай развития генерализованного сочетанного микоза у молодого, в прошлом иммунокомпетентного, пациента на фоне тяжелой ОРВИ. Проведен систематический обзор публикаций о случаях сочетания инвазивного аспергиллеза и мукормикоза у иммунокомпетентных взрослых после перенесенной острой респираторной вирусной инфекции в PubMed и Web of Science.

Ключевые слова: диссеминированный мукормикоз, инвазивный аспергиллез, иммунокомпетентный, острая вирусная инфекция, *Rhizopus microsporus*

THE CASE OF GENERALIZED COMBINED MYCOSIS ON THE BACKGROUND OF ACUTE RESPIRATORY VIRAL INFECTION

Khostelidi S.N. (associate professor)¹, Shagdileeva E.V. (associate professor)¹, Shadrivova O.V. (associate professor)¹, Saturnov A.V. (head of the clinical department)², Kalinina E.Yu. (associate professor)², Avdeenko Yu.L. (senior scientific collaborator)¹, Mednikov S.N. (pathologist)², Kleshchov M.A. (head of the pathology department)², Stepanova A.A. (head of laboratory)¹, Taraskina A.E. (head of laboratory)¹, Ignatyeva S.M. (leading scientific collaborator)¹, Klimko N.N. (head of the department)¹

¹ I.I. Mechnikov North-Western State Medical University (Kashkin Research Institute of Medical Mycology and Department of Clinical Mycology, Allergology and Immunology); ² Leningrad Regional Clinical Hospital, St. Petersburg, Russia

Aspergillosis and mucormycosis are opportunistic infections that develop in immunocompromised patients. Over a hundred new clinical cases have been published in the last 10 years. We presented the clinical

* Контактное лицо: Хостелиди Софья Николаевна, e-mail: sofianic@mail.ru

case of generalized combined mycosis in patients with a severe course of acute respiratory viral infection. A systematic review of publications on cases of a combination of invasive aspergillosis and mucormycosis in immunocompetent patients after respiratory viral infection was carried out in PubMed and Web of Science.

Key words: disseminated mucormycosis, invasive aspergillosis, immunocompetent, acute respiratory viral infection, *Rhizopus microsporus*

ВВЕДЕНИЕ

Инвазивные микозы – оппортунистические инфекции, характеризующиеся высокой летальностью. Одними из наиболее тяжелых микотических инфекций считают инвазивный аспергиллез и мукормикоз, частота их развития в России составляет 2,27/1000000 и 0,16/1000000 населения в год соответственно [1]. Наиболее часто данные заболевания развиваются у больных гемобластозами, прежде всего, острым лимфобластным и миелобластным лейкозом, а также у реципиентов трансплантатов кроветворных стволовых клеток [2, 3]. В последние годы появились публикации о развитии инвазивного аспергиллеза у иммунокомпетентных в прошлом пациентов, поступивших в ОРИТ на фоне тяжелого гриппа [4]. Развитие генерализованной микотической микст-инфекции у иммунокомпетентного пациента на фоне острой респираторной вирусной инфекции (ОРВИ) ранее описано не было.

Мы представляем первый клинический случай генерализованного микоза, вызванного *Aspergillus* sp. и *Rhizopus microsporus*, у иммунокомпетентного в прошлом больного с тяжелым ОРВИ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовали критерии иммунокомпрометированного больного и критерии диагностики микозов EORTC/ MSG 2008 (Европейской организации по изучению и лечению рака/ группы, исследующей микозы, Национального института аллергологии и инфекционных заболеваний (NIAID) США) [5].

Для проведения гистологических исследований образцы биопсий и аутопсийного материала закладывали в биопсийные кассеты, фиксировали 6 часов 10% забуференным раствором формалина, а затем помещали в аппарат для гистологической обработки биологических тканей Tissue-Tek®VIPTM 5Jr. (Япония) для проведения проводки через серию изопропанола (IsoPrep). Последующую заливку в среду Biomix осуществляли с помощью модульной системы Tissue-Tek®TECTM (Япония). Серийные срезы толщиной 3 мкм получали на санном микротоме Slide 2003 (Stormoff), затем монтировали на предметные стекла с применением адгезивной жидкости фирмы Biovitrum. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином для изучения характера воспалительной реакции, а также для выявления элементов гриба по методу PAS и Гомори-Грокотт. Окрашенные срезы заключали в заливочную среду Bio Mount (Bio-Optica). Препараты изучали и фотографировали в световом микроскопе AxioLab.A1 (Германия).

Также был проведен молекулярно-генетический анализ парафиновых блоков. ДНК из парафиновых блоков выделяли с помощью хлороформ-изоамиловой экстракции с предварительным измельчением биологического материала на вортексе со стеклянными шариками 5 мм (США) и инкубацией гомогената с экстракционным буфером (2% цетилтриметиламмонийбромид, 1.4 M NaCl, 20 mM ЭДТА, 100 mM Трис-HCl, pH 8,0) в течение ночи при 65 °С. Концентрацию выде-

ленной ДНК измеряли на флуориметре Qubit (США).

Молекулярно-генетический анализ гистологического препарата выполняли с использованием мультиплексной ПЦР-тест-системы «HRM-Zygo-Asp» в режиме реального времени с анализом кривых плавления ПЦР продуктов высокого разрешения (HRM от англ. High-resolution melting). Экспериментальная тест-система разработана в НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина и предназначена для выявления возбудителей аспергиллеза и/или мукоромикоза в биосубстратах больных и позволяет идентифицировать *Aspergillus* spp. до рода и некоторые виды мукоромикетов. Структура праймеров заимствована из литературных источников [6, 7].

Также были проанализированы данные научной литературы за последние 10 лет в базах PubMed (октябрь 2019 г.) и Web of Science (октябрь 2019 г.). При поиске информации использовали следующие ключевые слова: *disseminated, mucormycosis, aspergillosis, immunocompetent, influenza, acute respiratory viral infection (ARVI), mixed invasive fungal infection.*

Описание клинического случая.

Пациент П., 29 лет, был госпитализирован в отделение реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) №1 Ленинградской областной клинической больницы (ЛОКБ) 19.01.19 г. с жалобами на выраженную слабость, онемение и боли в нижних конечностях, повышение температуры тела до 40 °С, отсутствие аппетита.

Из анамнеза заболевания выяснено, что мужчина считал себя больным с 15.01.15 г., когда после сильного переохлаждения на работе появились мышечные боли и высокая лихорадка до 40 °С. Самостоятельно принимал витамины и жаропонижающие препараты (по поводу предполагаемого ОРВИ). За медицинской помощью обратился 18.01.19 г. в районную больницу. Пациент диагностически неясен. При обследовании в клиническом анализе крови: эритроциты – $5,5 \cdot 10^{12}/л$, гемоглобин – 178 г/л, лейкоциты – $4,9 \cdot 10^9/л$, СОЭ – мм/ч; в биохимическом анализе крови: глюкоза – 5,7 ммоль/л, билирубин – 12,5 ммоль/л, аланинаминотрансфераза (АЛТ) – 56,1 мкмоль/л, общий белок – 58 г/л, мочевины – 7,9 ммоль/л, креатинин – 115 ммоль/л, К⁺ – 3,09 ммоль/л, Na⁺ – 138,0 ммоль/л. Инфекционным заподозрены геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, лептоспироз? 19.01.19 г. состояние ухудшилось: развился рабдомиолиз и острая почечная недостаточность (появилась анурия). В биохимическом анализе крови: глюкоза – 4,9 ммоль/л, общий белок – 59 г/л, АЛТ – 185 мкмоль/л, мочевины – 17,5 ммоль/л, креатинин – 389 ммоль/л, калий – 4,31 ммоль/л, натрий – 131,8 ммоль/л, С-реактивный белок – более 20 ед, фибриноген – 3,48 г/л, протромбиновый индекс – 76%, КФК – 4490, миоглобин – 4047,0, миоглобин в моче – 45,2 нг/мл). В связи с ухудшением состояния пациент был переведен в отделение интенсивной терапии нефрологического отделения с целью проведения гемодиализа и уточнения диагноза.

Из анамнеза жизни выяснено, что пациент страдает с детства хроническим тонзиллитом. Туберкулез, сахарный диабет, онкологические заболевания в анамнезе отрицает. Со слов мужчины, травм и операций не было. Аллергологический анамнез без особенностей. Наследственность не отягощена. В течение 5 лет работал санитаром в морге. При поступлении в стационар

признаков иммунокомпрометированного больного по критериям EORTC/ MSG 2008 не было.

При осмотре на отделении интенсивной терапии: пациент в сознании, несколько эйфоричен; температура тела – 38,3 °С; отек и гиперемия нижних конечностей и правой руки; лимфоузлы несколько увеличены, подвижны, безболезненны; дыхание самостоятельное с поддержкой увлажненным кислородом, проводится во все отделы, хрипов нет, частота дыхательных движений – 22 в 1 мин.; тоны сердца приглушены, ритм правильный; артериальное давление – 125/70 мм рт. ст., пульс – 130 в 1 минуту; язык влажный, обложен белым налетом, живот мягкий, безболезненный, стула нет 3 суток; диурез – 100 мл в день; специфических неврологических симптомов нет.

При поступлении осмотрен травматологом – позиционный синдром и синдром длительного сдавления тканей исключен.

При обследовании в клиническом анализе крови от 19.01.19 г.: лейкоциты – $2,90 \cdot 10^9/л$, эритроциты – $4,68 \cdot 10^{12}/л$, гемоглобин – 147 г/л, тромбоциты – $69 \cdot 10^9/л$; нейтрофилы – 83,5%, лимфоциты – 6,2%, моноциты – 9,3%. В биохимическом анализе крови: мочевины – 20,37 ммоль/л, креатинин – 557,04 ммоль/л. Микрореакция – тест отрицательный. В коагулограмме от 19.01.19 г.: АПТВ – 40,30 сек, фибриноген – 8,74 г/л, протромбин – 59,00%, МНО – 1,40. Антигены и антитела класса G, M к ВИЧ 1,2; HIV-I, HIV-II не обнаружены. Тест на HBsAg и HCV-ab – отрицательный. По данным электрокардиограммы: выраженная синусовая тахикардия, частота сердечных сокращений – 113 ударов в минуту, нарушение внутрижелудочковой проводимости, увеличение нагрузки на левый желудочек, неспецифические изменения реполяризации. Эхо-кардиография: гипертрофия левого желудочка. На компьютерной томографии органов грудной клетки и брюшной полости: инфильтрация в задне-базальных отделах обоих легких, малый двусторонний гидроторакс.

Пациенту проводили гемодиализ, антибактериальную терапию (цефатоксим, ампициллин, ванкомицин) без эффекта. Сохранялась лихорадка 37,4–38,0 °С. 20.01.19 г. в связи с развитием дыхательной недостаточности переведен на ИВЛ. Была выполнена эзофагогастроудоденоскопия (заключение: поверхностный гастрит), установлен назогастральный зонд. Переведен на полное парентеральное питание.

21.01.19 г. при осмотре отмечено наличие эпидермальных пузырей на конечностях, в связи с чем была сделана фасциотомия обоих бедер, правого предплечья, правой голени, выявлена гиперемия до 41,5 °С. Проведен консилиум врачей: пациент диагностически неясен, тяжесть состояния обусловлена септическим шоком на фоне фасциита, предположительно, вследствие длительного сдавления мягких тканей на фоне приема анаболиков; рекомендованы замена антибиотикотерапии (имепенем, тигециклин) и хирургическое лечение. Во время операции был выявлен некроз подкожной клетчатки, участков поверхностных и глубоких фасций на бедре, голени и предплечье справа; некротизированные участки были удалены. Выполнены посевы послеоперационного материала (роста бактериальной биоты нет). Результаты гистологического исследования от 22.01.15 г.: явления продуктивного васкулита с муфтообразным утолщением стенок арте-

рий, выраженная воспалительная инфильтрация жировой и мышечной ткани, дистрофические и некробиотические изменения мышечных волокон.

Состояние пациента ухудшалось, прогрессировали явления интоксикации. 23.01.19 г. в связи с нарастанием явлений лимфангита на левой нижней конечности выполнена фасциотомия левого бедра и левой голени. Был выявлен отек мягких тканей левого бедра, миофасцитит, отек подкожной клетчатки и левой голени. Мышцы оставались жизнеспособными. 23.01.15 г. по реанимационным показаниям проведена трахеостомия. Послеоперационные раны вели открыто, выполняли перевязки. Раневое отделяемое было серозно-геморрагическое, без гноя, без запаха. В связи с появлением анизокории и гематомы век пациента консультировал офтальмолог и нейрохирург. Была рекомендована компьютерная томография (КТ) головного мозга, которую из-за тяжести состояния больного выполнить не удалось. 25.01.15 г. – внезапное ухудшение состояния, фибрилляция желудочков с переходом в асистолию. Реанимационные мероприятия были без эффекта, 25.01.15 г. в 23:15 констатирована биологическая смерть.

При исследовании аутопсийного материала в тканях головного мозга отмечали резкое полнокровие сосудистого русла с наличием в сосудах вещества головного мозга и в сосудах его оболочек эмболов, представленных скоплениями микромицетов. В центральной части – гифы гриба короткие и утолщенные, септированные, по окружности мицелий истонченный, удлиненный с ветвлениями типа «рогатки» под острым углом. Мицелий гриба прорастал стенки сосудов с развитием некротических изменений в ткани мозга, с перифокальной нейтрофильно-гранулоцитарной инфильтрацией (Рис.1).

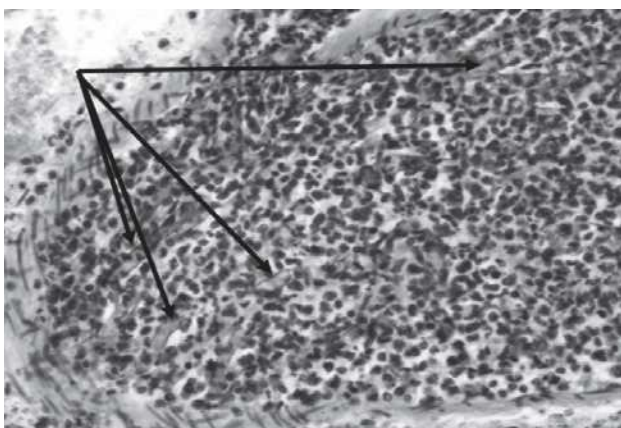


Рис. 1. Гистологический препарат оболочки головного мозга (PAS-реакция, X100). Визуализируются множественные элементы гриба.

В сосудах почек и эндокарда, легких – тромбы, содержащие структуры гриба. Выявили некротические изменения кардиомиоцитов (Рис.2).



Рис. 2. Гистологический препарат миокарда (PAS-реакция, X100). Визуализируются множественные элементы гриба.

В сердце, тонкой кишке, мышцах бедра – эмболы с мицелием гриба в просвете сосудов, с разрушением стенки и распространением на окружающие ткани. В почках и эндокарде – тромбы со структурами гриба. В просвете бронхов – скопление мицелия гриба, стенки некротизированы. В легких: стенки бронхиол некротизированы, в их просвете – скопление фибрина и мицелия гриба, некротические изменения легочной ткани вследствие массивного распространения гриба с выраженной нейтрофильно-гранулоцитарной инфильтрацией; в просвете артерий – тромбы с наличием мицелия гриба, обширные участки геморрагических инфарктов. В просвете трахеи – вегетация гриба с инвазией в стенку органа и подлежащие ткани с распространением на стенку пищевода.

Патологоанатомический диагноз: генерализованный аспергиллез с двусторонним поражением легких, эндокарда с формированием микотического тромба в полости левого желудочка, ЦНС, трахеи, пищевода, тонкой кишки, почек, мышц и фасций нижних конечностей; аспергиллезный сепсис. Наличие эрозивно-геморрагического ларинготрахеита и бронхита не исключает присоединение микотической инфекции на фоне тяжелого течения ОРВИ (гриппа).

В НИИ медицинской микологии при пересмотре гистологических препаратов выявили генерализованную микотическую инфекцию, характерной особенностью которой является тропность гриба к сосудам с образованием множественных тромбов и инфарктов в органах. В гистологических препаратах головного мозга, легких, пищевода, кишечника, почек, миокарда, мышц и фасций нижних конечностей обнаружены элементы гриба, сходного с аспергиллами, и широкие нити несептированного мицелия, характерного для мукормицетов (Рис. 3).

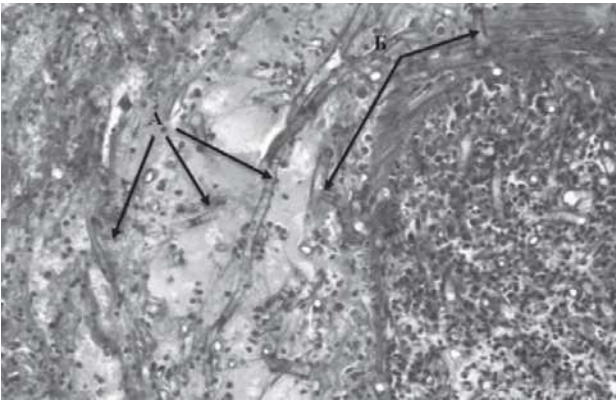


Рис. 3. Ткань легкого (PAS-реакция, X100). Визуализируются тонкие нити септированного мицелия (А) и толстые гифы несептированного мицелия с ветвлением под прямым углом (Б).

При проведении молекулярно-генетического анализа образцов тканей пациента П., заключенных в парафиновые блоки, с использованием мультиплексной ПЦР-тест-системы «HRM-Zygo-Asp» в режиме реального времени были получены пики плавления ПЦР продуктов высокого разрешения в диапазоне 80,35-80,72 и 77,5-78,3 °С, которые соответствуют температуре плавления ПЦР продуктов ДНК *Rhizopus microsporus* и *Aspergillus* spp.

ОБСУЖДЕНИЕ

В последние два десятилетия инвазивные микозы, вызванные грибами рода *Aspergillus* и семейства *Mucoraceae*, стали одними из наиболее актуальных оппортунистических инфекций. Возбудители заболевания – микромицеты распространены повсеместно. Они хорошо растут в почве, гниющих растительных отходах, их можно обнаружить во всех видах органических остатков, в различных пищевых продуктах (особенно пакетированных специях, кофе, чай и др.) [5]. Местами обитания мукормицетов и *Aspergillus* spp. являются системы вентиляции и водоснабжения, значительно повышается концентрация спор грибов в воздухе во время строительных и ремонтных работ. Конидии грибов могут сохранять жизнеспособность в течение нескольких месяцев. При значительной контаминации воздуха люди регулярно вдыхают сотни конидий в день. Примечательно, что несмотря на постоянный контакт со спорами грибов, у большинства людей они не вызывают заболеваний. Развитие инфекционного процесса наступает, как правило, у лиц с нарушениями иммунной защиты [4, 5].

К основным факторам риска развития ИА относят нейтропению $<0,5 \cdot 10^9/\text{л}$ в течение 10 дней в период диагностики или в предыдущие 60 дней; реакцию «трансплантат против хозяина» у реципиентов аллотГСК; длительное (более 3-х недель) использование высоких доз ГКС (более 0,3 мг/кг/сутки в пересчете на преднизолон); недавнее или текущее применение иммуносупрессивных препаратов, таких как ингибиторы кальциневрина (циклоспорин, такролимус и т.д.); синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД); первичные иммунодефициты (хроническая гранулематозная болезнь, тяжелый комбинированный иммунодефицит) [2, 3, 5].

Тяжелые вирусные инфекции и грипп не являются «классическими» факторами риска развития инва-

зивного аспергиллеза и мукормикоза. В то же время первые случаи развития инвазивного аспергиллеза на фоне перенесенной острой респираторной вирусной инфекции и гриппа были описаны еще в середине прошлого столетия [8, 9]. Число публикаций значительно выросло с 2010 г., что связано с эпидемией гриппа, вызванного вирусом H1N1 в 2009 г. [9, 10].

Проведенный анализ опубликованных статей показал, что на 2019 г. представлено более 150 случаев развития инвазивного аспергиллеза и один случай мукормикоза после перенесенной острой респираторной вирусной инфекции [10-12]. При этом до сих пор не было описано генерализованной микст-инфекции инвазивного аспергиллеза и мукормикоза у иммунокомпетентного пациента на фоне острой респираторной вирусной инфекции.

По данным различных авторов, инвазивный аспергиллез после гриппа и ОРВИ развивался преимущественно у больных, находящихся на лечении в отделении реанимации и интенсивной терапии. Основными фоновыми заболеваниями были: хроническая обструктивная болезнь легких и бронхиальная астма, цирроз печени, сахарный диабет, солидные опухоли, СПИД, ревматоидный артрит, миастения, хронические заболевания почек, хроническая сердечная недостаточность, тромбоцитопеническая пурпура [11, 12]. В свою очередь Stevens D.A. с соавт. и Crum-Cianflone N.F. выделяют следующие факторы, способствующие развитию ИА: перенесенные трансплантации органов, длительное (более 5 дней) пребывание в отделении интенсивной терапии и ИВЛ, многократные переливания элементов крови (и развитие трансфузионно-ассоциированного гемосидероза), применение высоких доз глюкокортикостероидов и антибиотиков по поводу септического шока, полное парентеральное питание, интубация трахеи. Некоторые пациенты имели несколько из перечисленных фоновых состояний [8, 9].

Отметим, что у представленного выше больного не было подобных фоновых состояний. Он поступил в клинику с признаками местной (фасцит нижних конечностей) и генерализованной инфекции (высокая лихорадка, септический шок с развитием почечной недостаточности) на 3 сутки от начала острой респираторной вирусной инфекции.

В чем же причина развития столь тяжелой микотической инфекции у пациентов без иммунодефицита? Патогенез развития инвазивного микоза у больных гриппом и ОРВИ может быть обусловлен как локальными, так и системными воздействиями вируса на макроорганизм. Местные иммунные дефекты связаны с повреждением слизистой оболочки трахеобронхального дерева и нарушением нормального клиренса ресничек. Вирусы повреждают весь эпителий дыхательных путей от носовых ходов до альвеол, вызывая некроз слизистой оболочки бронхов и подслизистые кровоизлияния, в связи с чем и происходит последующее присоединение суперинфекций (чаще бактериальных) [8, 9]. Это может позволить грибам как колонизировать дыхательные пути, так и вызывать инвазию. Вирусы гриппа способны снижать активность фагоцитирующих клеток и естественных киллеров, а также вызывать «цитокиновый шторм» вследствие нарушения баланса цитокинов [8-11]. Вирусные воздействия на организм связаны с количественными и качествен-

ными нарушениями системы Th1 / Th2, что приводит к лимфоцитопении, которая является дополнительным фактором риска развития инвазивного аспергиллеза и мукормикоза [9-11]. Хотя ни в одном из опубликованных случаев не проводили полное иммунологическое обследование, у большинства больных отмечали лимфоцитопению на момент диагностики инвазивного микоза [9].

Выраженную лимфоцитопению наблюдали и у нашего пациента, которая усугублялась ежедневно.

По данным [4, 12], основными клиническими проявлениями инвазивного аспергиллеза на фоне ОРВИ были кашель, нарастающая одышка и развитие респираторного дистресс-синдрома у взрослых. Наиболее часто развивалось поражение легких, диссеминацию выявляли у 11% больных [4, 13].

У представленного нами пациента микотическая суперинфекция развивалась стремительно, практически сразу появились сепсис и полиорганная недостаточность.

Клинические симптомы и рентгенологические признаки не являются специфичными для инвазивного аспергиллеза и мукормикоза, поэтому для ранней диагностики сочетанной инфекции необходимо комплексное обследование, включающее радиологические, серологические и микологические методы. Диагностика мукормикоза требует многократного исследования лабораторного материала из очагов поражения, что является трудновыполнимой задачей ввиду тяжести состояния пациентов. Микроскопические признаки наличия инвазивного аспергиллеза и мукормикоза в биосубстратах обнаружили у 33-35% больных гриппом и ОРВИ [9, 10]. Культуральное исследование было позитивным у 36-34% пациентов с инвазивным микозом, гистологическое подтверждение диагноза – у 35% (17% из них – это данные аутопсии) [11].

Vanderbeke L. и др. в 2018 г. отметили, что 69% больных получали противовирусную терапию для лечения гриппа и ОРВИ (93% – осельтальмивир). Для терапии инвазивного аспергиллеза преимущественно использовали вориконазол (89%), т.к. он является препаратом выбора, согласно международным и отечественным рекомендациям [11]. Для лечения инвазивного мукор-

микоза применяли липидный амфотерицин В [10].

Анализ литературных данных показал, что диссеминация инвазивного аспергиллеза и мукормикоза у больных гриппом и ОРВИ ассоциируются с высокой летальностью 90-100% [13-15]. При изолированном поражении легких летальность составляет 57% [11]. Отметим, что летальность зависит от своевременной диагностики и лечения. Ранняя диагностика инвазивного микоза (в первые 24-48 часов от начала клинических проявлений) и своевременная антифунгальная терапия снижают летальность до 35% [13, 14].

В приведенном нами клиническом случае генерализованный инвазивный аспергиллез и мукормикоз диагностированы посмертно. Летальный исход наступил на 6 сутки после госпитализации. Любопытно, что согласно литературным данным, медиана дней от диагностики ОРВИ или гриппа до диагностики инвазивного аспергиллеза также соответствует 6 суткам [9].

Таким образом, представленный клинический случай интересен тем, что демонстрирует необходимость «микотической» настороженности даже у пациентов без признаков иммуносупрессии. Отсутствие специфических симптомов и характерных рентгенологических признаков на ранних этапах развития заболевания затрудняет диагностику инвазивного микоза, развивающегося на фоне ОРВИ и гриппа. Высокая летальность, наблюдаемая у данной категории больных, является поводом для дальнейшего изучения этой проблемы. Для успешного лечения необходимы быстрая верификация диагноза и адекватная антимикотическая терапия.

ВЫВОДЫ

Тяжело протекающая респираторная вирусная инфекция и грипп могут быть фоновым состоянием для развития инвазивного аспергиллеза и мукормикоза, а также сочетания этих микотических осложнений. Основным фактором риска у таких пациентов является быстро прогрессирующая лимфоцитопения. Клиническая настороженность и постановка диагноза в первые 24-48 часов от начала клинических проявлений микозов, применение рекомендуемых антимикотических препаратов могут снизить летальность у таких больных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Klimko N., Kozlova Y., Khostelidi S., et al. The burden of serious fungal diseases in Russia. *Mycoses*. 2015; 58 (S5): 58-62. doi:10.1111/myc.1238
2. Skiada A., Lass-Floerl C., Klimko N., et al. Challenges in the diagnosis and treatment of mucormycosis. *Med Mycol*. 2018; 56 (suppl.1): 93-101. doi: 10.1093/mmy/myx101.
3. Ullmann A.J., Aguado J.M., Arikan-Akdagli S., et al. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin. Microbiol. Infect.* 2018; 24 (Suppl. 1): e1-e38. doi: 10.1016/j.cmi.2018.01.002.
4. Schauwvlieghe A.F.A.D., Rijnders B.J.A., Philips N., et al. Invasive aspergillosis in patients admitted to the intensive care unit with severe influenza: a retrospective cohort study. *Lancet Respir. Med.* 2018; 6 (10): 782-792. doi: 10.1016/S2213-2600(18)30274-1.
5. De Pauw B., Walsh T.J., Donnelly J.P., et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis.* 2008; 46: 1813-21. doi: 10.1086/588660.
6. Buelow D.R., Gu Z., Walsh T.J., Hayden R. T. Evaluation of multiplexed PCR and liquid-phase array for identification of respiratory fungal pathogens. *Med. Mycol.* 2012; 50 (7): 775-80. doi.org/10.3109/13693786.2012.666681
7. Hrnčirova K., Lengerova M., Kocmanova I., et al. Rapid detection and identification of mucormycetes from culture and tissue samples by use of high-resolution melt analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48 (9): 3392-4. doi.org/10.1128/JCM.01109-10
8. Stevens D.A., Melikian G.L. Immunol invest. aspergillosis in the 'nonimmunocompromised' host. 2011; 40 (7-8): 51-66. doi: 0.3109/08820139.2011.614307.
9. Crum-Cianflone N.F. Invasive aspergillosis associated with severe influenza infections. *Open Forum Infectious Diseases*. 2016;

- 3 (3): ofw171. doi.org/10.1093/ofid/ofw171
10. *Ajmal S., Mahmood M., Abu Saleh O., et al.* Invasive fungal infections associated with prior respiratory viral infections in immunocompromised hosts. *Infection*. 2018; 46 (4): 555-558. doi: 10.1007/s15010-018-1138-0.
 11. *Vanderbeke L., Spriet I., Breynaert C., et al.* Invasive pulmonary aspergillosis complicating severe influenza: epidemiology, diagnosis and treatment. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2018; 31 (6): 471-480. doi: 10.1097/QCO.0000000000000504.
 12. *Saint-Léger P.* Invasive pulmonary aspergillosis in an immunocompetent patient presenting with influenza infection *Med. Mal. Infect.* 2019; 49 (4): 291-292. doi: 10.1016/j.medmal.2019.01.004.
 13. *Immel S., Yu E.* Case report: Disseminated aspergillosis complicating influenza. *Med. Mycol. Case Rep.* 2019; 24: 65-68. doi: 10.1016/j.mmcr.2019.04.007
 14. *Melisa M. Shah, Eric I. Hsiao, Carl M. Kirsch, et al.* Invasive pulmonary aspergillosis and Influenza co-infection in immunocompetent hosts: case reports and review of the literature. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2018; 91 (2): 147-152. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.01.014.
 15. *Pozo-Laderas J.C., Pontes-Moreno A., Robles-Arista J.C., et al.* Mixed invasive fungal infection due to *Rhizomucor pusillus* and *Aspergillus niger* in an immunocompetent patient. *Rev. Iberoam. Micol.* 2015; 32 (1): 46-50. doi: 10.1016/j.riam.2013.03.002

Поступила в редакцию журнала 26.11.19

Рецензент: М.А. Шевяков



ЛЕЧЕНИЕ АКНЕ, ОСЛОЖНЕННОГО СОПУТСТВУЮЩЕЙ МИКОБИОТОЙ

¹Файзуллина Е.В. (профессор кафедры),
¹Хисматулина И.М. (ассистент кафедры)*,
²Гордеева А.М. (врач-дерматовенеролог)

¹Казанский государственный медицинский университет (кафедра дерматовенерологии), ²ООО «Центр Дерматология», Казань, Россия

Цель работы – анализ успешности лечения акне, осложненного сопутствующей микобиотой.

В исследование, проведенное в 2013-2018 гг., были включены 96 пациентов в возрасте от 13 до 36 лет с папулопустулезными формами акне, имеющие сопутствующую микобиоту на коже лица. При наблюдении в группах пациентов с папулопустулезными акне и сопутствующей микобиотой определены преимущества терапии с включением противогрибковых препаратов. Клиническое выздоровление у таких больных достигнуто достоверно чаще, чем у лиц, получавших лишь стандартное лечение. Клиника и жалобы у пациентов с сопутствующей микобиотой, получавших антимикотики, регрессировали достоверно быстрее. Разрешилось большинство папул и папулопустул, нормализовалась жирность кожи, восстановился её цвет, исчез зуд и шелушение, в то время как у больных с сопутствующей микобиотой без противогрибковой наружной терапии клиника и жалобы сохранялись дольше. Кроме того, восстановление нормальной микробиоты кожи было успешнее при использовании расширенного терапевтического алгоритма с включением антимикотиков, чем при применении только стандартной терапии, и сопоставимо с результатами лечения больных акне без сопутствующей микобиоты.

Ключевые слова: акне, сопутствующая микобиота, особенности клинического течения

TREATMENT OF ACNE COMPLICATED BY CONCOMITANT MYCOBIOTA

¹Fayzullina E.V. (professor of the department),
¹Khismatulina I.M. (assistant of the department),
²Gordeeva A.M. (dermatovenerologist)

¹Kazan State Medical University (Department of Dermatology and Venereology), ²«Center of Dermatology», Kazan, Russia

The purpose of this study was to analyze the success of acne treatment in patients with concomitant mycobiota.

The study was conducted in 2013-2018 and included 96 patients aged 13 to 36 years with papulopustular forms of acne with concomitant mycobiota of the skin. The advantages of therapy in patients with papulopustular acne and concomitant mycobiota with the inclusion of antifungal drugs were determined. Clinical recovery in such patients was achieved significantly more often than in patients receiving only standard therapy. Clinical signs and complaints in patients with concomitant mycobiota receiving antimicrobics regressed significantly faster. Most papules and papulopustules were resolved, sebum was normalized, its color was restored, itching and peeling disappeared. The clinic and complaints in patients with concomitant mycobiota without antifungal external therapy persisted longer. In addition, the restoration of normal skin microbiota was more successful with the additional use of advanced therapeutic algorithm with the inclusion of antimicrobics than with the use of standard therapy only. The results of treatment are comparable with the results in acne patients without concomitant mycobiota.

Key words: an acne, the accompanying mycobiota, features of a clinical current

* Контактное лицо: Хисматулина Ирина Мансуровна, e-mail: xomenko-aa@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Акне – часто встречающееся заболевание в возрастной группе от 12 до 30 лет, по данным разных авторов, распространенность среди подростков и молодых людей составляет от 82% до 96%. Согласно Zouboulis С.С., не менее 15-30% пациентов нуждаются в лечении из-за тяжести или продолжительности заболевания [1-4].

В России лечение акне проводят в зависимости от формы и степени тяжести заболевания, согласно Федеральным клиническим рекомендациям Российского общества дерматовенерологов и косметологов 2015 г. Несмотря на то, что ряд авторов отмечает наличие сопутствующей акне себореи, в научной литературе не встречается рекомендаций по коррекции данного состояния [3, 5].

Цель работы – анализ успешности лечения акне, осложненного сопутствующей микобиотой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование, проведенное в 2013-2018 гг., были включены 142 пациентов в возрасте от 13 до 36 лет с папулопустулезными формами акне**. Из них 96 пациентов имели, по данным микологического исследования***, сопутствующую микобиоту (МБ) на коже лица.

В целях изучения успешности терапии больных с акне были сформированы следующие группы:

I группа – 48 пациентов с акне и сопутствующей МБ, получавших, помимо стандартной терапии, местный противогрибковый препарат;

II группа – 48 пациентов с акне и сопутствующей МБ, получавших только стандартную терапию;

III группа – сформирована для контроля эффективности и безопасности лечения, 46 пациентов с акне без МБ, получавших стандартную терапию.

Терапевтические мероприятия для больных всех групп были идентичными, лишь с одним отличием, что пациентам I группы в терапию был включен антимикотический препарат.

При лечении больных с акне легкой и средней степени во всех трех группах применяли только наружную терапию, которую осуществляли в два этапа.

На первом этапе проводили очищение кожи лица с помощью пенки или геля; на втором – на элементы акне 1 раз в день на ночь наносили комбинированное наружное средство – адапален + бензоил-пероксид. Препарат осуществлял патогенетический контроль над состоянием фолликулярного аппарата за счет уменьшения продукции кожного сала, подавления фолликулярного гиперкератоза и умеренного антибактериального и противовоспалительного действия [5].

Для лечения больных с тяжелой степенью папулопустулезных акне во всех трех группах применяли

** Для постановки диагноза акне использовали клинические критерии Федеральных клинических рекомендаций 2015 г. Российского общества дерматовенерологов и косметологов, а также Национального руководства по дерматовенерологии [3, 5].

*** Клинико-лабораторное обследование всех пациентов осуществляли с определением микробиоты отделяемого из элементов угревой сыпи. Микробиологическое и микологическое исследование проводили на базе «Казанского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (КНИИЭМ).

системную терапию изотретиноином. Препарат назначали внутрь во время приема пищи по 500 мг на кг веса в сутки, распределяя суточную дозировку на 2 приема.

Пациентам I группы применяли наружный антимикотический препарат –1% гель тербинафин 1 раз в день на 2 недели ввиду его широкого спектра действия на микобиоту [6].

Длительность лечения во всех группах составила 3 месяца; результаты оценивали каждые 2 недели курса в течение 3 месяцев и 1 раз в 2 месяца в течение 1 года после окончания основного курса терапии.

Всем больным проводили сбор анамнестических данных, объективный осмотр.

Критериями включения были пациенты с клиническими проявлениями акне:

- 1) количество комедонов;
- 2) жирность кожи умеренная – кожа лица матовая;
- 3) жирность кожи выраженная – кожа лица блестящая, лоснится, имеется сальный блеск;
- 4) количество папулопустул;
- 5) поставке пигментные – пятна вторичного характера, застойно-синюшного цвета, округлой формы с четкими границами 0,1-0,3 см;
- 6) поставке рубцовые – атрофические рубцы округлой формы с четкими границами 0,1-0,3 см.

Объективные и субъективные неспецифические симптомы:

- покраснение, шелушение кожи;
- зуд;
- дискомфорт, болезненные ощущения.

Критерием исключения были проявления розацеа. Также в исследование не включали лиц, применявших местные или системные антибактериальные и противогрибковые препараты менее чем за 10 дней до забора биоматериала.

Для анализа результатов лечения на каждого пациента была заведена индивидуальная карта. Жалобы, клинические признаки с подсчетом акне-элементов на одной стороне лица фиксировали до лечения, в процессе терапии при каждом визите и после ее окончания. Отдельно учитывали комедоны, папулопустулы, жирность кожи, шелушение, субъективные ощущения. В индивидуальной карте фиксировали данные при каждом визите пациента: возможные побочные эффекты от терапии, динамика положительных изменений. Основной курс лечения составил 3 месяца.

Результаты терапии оценивали, исходя из следующих критериев:

- клиническая ремиссия – разрешение клинических проявлений на 90-100%;
- клиническая ремиссия – регресс на 75-90%;
- без изменений – регресс 0-75% акне-проявлений.

Увеличение количества акне-элементов к концу лечения расценивали как ухудшение. Во внимание также принимали субъективную оценку пациентами результатов терапии [5].

Кроме того, изучали влияние лечения на микробиоту кожи лица.

При клинко-лабораторном обследовании пациентов осуществляли определение микробиоты отделяемого из элементов угревой сыпи. Проводили микробиологическое и микологическое исследование на базе «Казанского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии» Федеральной служ-

бы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (КНИИЭМ). Микроорганизмы идентифицировали общепризнанными микроскопическими, биохимическими методами и с помощью физико-химического исследования – MALDI-TOF-MS (MALDI Biotyper Microflex (Bruker, Германия), анализ белкового профиля. В работе использовали селективные хромогенные среды (Bio-Rad) и коммерческие тест-системы, основанные на исследовании ауксаногаммы: «Auxacolor 2» (Bio-Rad). В результате исследования микробных изолятов методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии клеточных биомасс и клеточных экстрактов значения показателя «Score Value» (условный индекс, указывающий на достоверность физико-химической идентификации) составили >2,400 для всех штаммов (с учетом допустимого для достижения уровня вида диапазона значений от 2,300 до 3,000).

Для выявления грибов рода *Malassezia* применяли цитологический метод окрашивания препаратов с кожных покровов калькофлюором белым.

Медико-биологические данные обрабатывали с помощью программной системы STATISTICA for Windows (версия 8.0).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эффективность использования терапии у пациентов с папулопустулезным вариантом акне представлена в таблице 1.

Таблица 1

Число больных	I группа (n=48)		II группа (n=48)		III группа (n=46)		Всего (n=142)	
	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%
Клиническое излечение	33*	68,8*	14*	29,2*	40**	87,0**	87	61,3
Клиническая ремиссия	15	31,2	16	33,3	6	13,0	37	26,0
Без изменений	-	-	18*	37,5*	-	-	18	12,7
Всего	48	100,0	48	100,0	46	100,0	142	100,0

*p<0,05 сравнение между значениями показателей больных I и II групп

В результате комплексной наружной терапии клиническое излечение в I группе больных акне с сопутствующей микобиотой с применением топического антимикотика составило 68,8% и было достоверно выше, чем во II группе без противогрибкового лечения – 29,2% (p<0,05).

При легком течении акне клиническое излечение наступило у 100% пациентов в I и III группах и у 75% – во II группе (Рис. 1).

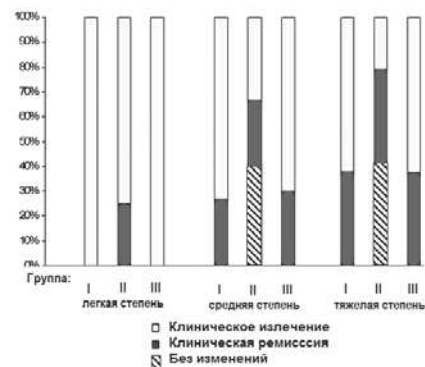


Рис. 1. Распределение результатов комплексной терапии акне легкой и средней степени в I, II и III группах по степени тяжести.

Однако у больных со средне-тяжелыми папулопустулезными акне и сопутствующей микобиотой без противогрибкового лечения (II группа) терапия была неуспешной в 40,0% случаев.

В результате комбинированной системной терапии и наружным антимикотиком у пациентов с тяжелыми акне клиническое выздоровление в I группе достигнуто в 62,1%, что достоверно выше, чем во II группе – 20,7% (P<0,001), и сопоставимо с результатами монотерапии изотретиноином в III группе больных без сопутствующей микобиоты (62,5%).

У больных папулопустулезными акне на фоне лечения в I группе (с включением антимикотических препаратов) и III группе (без микобиоты) статистически достоверно уменьшилось количество папулопустул, снизилась жирность кожи относительно пациентов II группы (p <0,05). У пациентов I и III групп достоверно

уменьшились такие симптомы, как покраснение кожи лица и пигментные постакне, по сравнению с больными акне II группы (p<0,05) (табл. 2).

При изучении динамики таких неспецифических для акне симптомов и жалоб, как зуд, дискомфорт, шелушение кожи в процессе лечения, наблюдали достоверно лучший результат в I и III группах больных по сравнению с II группой (p<0,001). (табл. 3).

У больных акне в I и III группах папулопустулы разрешились достоверно быстрее, нежели во II группе (P<0,001) (Рис. 2).

Таблица 2

Динамика клинических симптомов пациентов акне в процессе терапии

Клинические симптомы	I группа (n=48)				II группа (n=48)				III группа (n=46)			
	До лечения		После лечения		До лечения		После лечения		До лечения		После лечения	
	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%
Количество папулопустул	27,6±10,2	100,0	1,5±0,5*	5,4±1,8*	27,1±10,2	100,0	6,8±2,1*	25,1±7,7*	13,2±9,0	100,0	0,8±1,0**	6,1±7,5**
Количество комедонов	19,9±2,6	100,0	6,9±1,3	34,7	18,6±3,4	100,0	7,4±0,7	39,8	20,0±3,6	100,0	6,7±1,9	33,5±9,5
Жирность кожи умеренная	26	54,2	10*	20,8*	27	56,25	24*	47,9*	30	65,2	8**	17,4**
Жирность кожи выраженная	22	45,8	-	-	21	43,75	4	12,5	16	34,8	2	4,3
Покраснение кожи лица	46	100,0	4*	8,3*	46	100,0	20*	41,7*	15	32,6	4**	8,7**
Постакне пигментные	47	97,9	14*	29,1*	47	97,9	32*	66,7*	42	91,3	14**	30,4**
Постакне рубцовые	8	16,7	8	16,7	8	16,7	8	16,7	4	8,7	4	8,7

*p<0,05 сравнение между значениями показателей после лечения больных I и II групп

Таблица 3

Динамика неспецифических клинических симптомов и жалоб

Неспецифические клинические симптомы и жалобы	I группа (n=48)				II группа (n=48)				III группа (n=46)			
	До лечения		После лечения		До лечения		После лечения		До лечения		После лечения	
	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%
Зуд кожи	48	100,0	-	-	48	100,0	18*	37,5*	5	10,9	-	-
Шелушение кожи	48	100,0	2*	4,2*	48	100,0	20*	41,7*	8	17,4	2**	4,3**
Дискомфорт	48	100,0	6*	12,5*	48	100,0	22*	45,8*	46	100,0	8**	17,4**

*p<0,001 сравнение между значениями показателей после лечения больных I и II групп

Таблица 4

Микробиота кожи пациентов I, II и III групп до и после лечения

Состав микробиоты у пациентов с акне	I группа (n=48)				II группа (n=48)				III группа (n=46)				Всего (n=142)			
	До лечения		После лечения		До лечения		До лечения		После лечения		До лечения		До лечения		После лечения	
	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%
<i>Propionibacterium acnes</i>	38	79,2	25	52,1	40	83,3	34	70,8	42	91,3	22	47,8	120	84,5	81	57,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	24	50,0	-	-	21	43,7	14	29,2	15	32,6	1	2,2	45	42,3	17	12,0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	29	60,4	42	87,5	28	58,3	30	62,5	29	63,0	42	91,3	57	60,6	114	80,3
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	11	22,9	2	4,2	13	27,1	8	16,7	20	43,5	2	4,4	24	31,0	12	8,4
Другие виды бактерий	5	10,4	3	6,2	8	16,7	6	12,5	6	13,0	2	4,4	13	13,4	11	7,7

Таблица 5

Микобиота кожи пациентов I, II и III групп до и после лечения

Состав микробиоты у пациентов с акне	I группа (n=48)				II группа (n=48)				III группа (n=46)				Всего (n=142)			
	До лечения		После лечения		До лечения		До лечения		До лечения		После лечения		До лечения		До лечения	
	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%
<i>Malassezia spp.</i>	40	83,3	-	-	41	85,4	30	62,5	-	-	-	-	81	57,0	30	21,1
<i>C. albicans</i>	31	64,6	-	-	30	62,5	20	41,7	-	-	-	-	61	43,0	20	14,1
Другие грибы рода <i>Candida</i>	12	25,0	-	-	10	20,8	6	12,6	-	-	-	-	23	16,2	6	4,2
Другие грибы	7	14,6	-	-	6	12,5	4	8,3	-	-	-	-	13	9,2	4	2,8

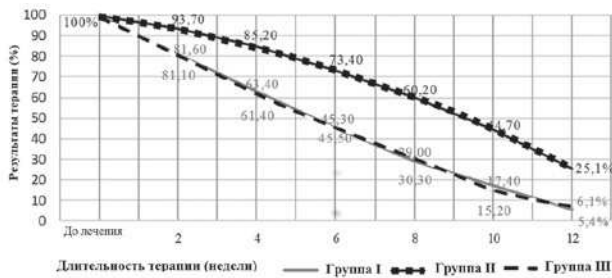


Рис. 2. Динамика количества папул и папулопустул у пациентов I, II и III групп.

Изменение микробной колонизации кожи в результате терапии

Проведен анализ изменений микробиоты кожи (изменение видового состава, степени колонизации) в результате проводимой терапии (табл. 4, 5).

ост *Propionibacterium acnes* отмечали у 120 из 142 пациентов (84,5%), при этом его обнаруживали в ассоциации с *Staphylococcus epidermidis* в 60,6% случаях (n=57), *Staphylococcus aureus* – в 42,3% (n=45).

При исследовании микробиоты кожи после лечения у больных I и III групп было выявлено достоверное, по сравнению со II группой (P<0,05), снижение уровня микробной колонизации *P. acnes* с 10^{4-6} до уровня бактерионосительства – 10^{2-4} КОЕ/мл, практически устранение *S. aureus*, и, наоборот, увеличение степени колонизации *S. epidermidis* и появление ее у тех пациентов, у которых не наблюдали носительства этого микроорганизма до терапии. Возможно, это явилось результатом их замещения в ответ на количественное снижение *P. acnes* и *S. aureus*. При этом возрастание количества *S. epidermidis* не сопровождалось появлением новых акне-элементов и усилением воспаления.

В ходе исследования установлено, что в структуре

микробиоты у пациентов I и II групп преобладали липофильные дрожжи *Malassezia* spp. – в 83,3% и 85,5% случаев соответственно (n=40 и n=41), второе место занимала *Candida albicans* – 64,6% и 62,5% соответственно (n=31 и n=30). Эти грибы обнаруживали в ассоциациях как друг с другом, так и с условно-патогенными бактериями.

При исследовании микробиоты кожи после лечения у всех 100% больных I группы микробиота не выявлена. У пациентов II группы отмечали сохранение микробиоты.

ВЫВОДЫ

При наблюдении в группах больных с папулопустулезными акне и сопутствующей микробиотой определено преимущество терапии с включением противогрибковых препаратов. Клиническое выздоровление у таких пациентов достигнуто достоверно чаще, чем у лиц, получавших лишь стандартную терапию. Клиника и жалобы у больных с сопутствующей микробиотой, получавших антимикотики, регрессировали достоверно быстрее. Разрешилось большинство папул и папулопустул, нормализовалась жирность кожи, восстановился её цвет, исчезли зуд и шелушение, в то время как у пациентов с сопутствующей микробиотой, не получавших противогрибковую наружную терапию, клиника и жалобы сохранялись дольше.

Таким образом, в группах больных с наличием микробиоты восстановление дерматологического здоровья, а также нормальной микробиоты кожи было успешнее при использовании расширенного терапевтического алгоритма с включением антимикотиков, чем при применении только стандартной терапии, и сопоставимо с результатами лечения больных акне без сопутствующей микробиоты.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Rzany B., Kahl C.* Epidemiology of acne vulgaris. J. Dtsch. Dermatol. Ges. 2006; 4: 8-9. doi.org/10.1111/j.1610-0387.2005.05876.x
2. *Zouboulis C.C.* Acne and sebaceous gland function. Clin. Dermatol. 2004; 22: 360-6. doi.org/10.1016/j.clindermatol.2004.03.004
3. *Дерматовенерология.* Национальное руководство. Краткое издание/ Под ред. Ю.С. Бутова, Ю.К. Скрипкина, О.Л. Иванова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013; 896 с. [Dermatovenerologiya. Nacional'noe rukovodstvo. Kratkoe izdanie/ Pod red. Y.S. Butova, Y.K. Skripkina, O.L. Ivanova. M.: GEOTAR-Media, 2013; 896 s. (In Russ)].
4. *Альбанова В.И., Забненкова О.В.* Угри: учеб. пособие для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. [Al'banova V.I., Zabnenkova O.V. Ugri: ucheb. posobie dlya vrachej. M.: GEOTAR-Media, 2016 (In Russ)].
5. *Федеральные клинические рекомендации.* Дерматовенерология 2015: Болезни кожи. Инфекции, передаваемые половым путем. – 5-е изд., перераб. и доп. М.: Деловой экспресс. 2016; 768 с. [Federal'nye klinicheskie rekomendacii. Dermatovenerologiya 2015: Bolezni kozhi. Infekcii, peredavaemye polovym putem. – 5-e izd., pererab. i dop. M.: Delovoj ekspress. 2016; 768 s. (In Russ)].
6. *Ламифунгин®* Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения [Lamifungin® Instrukciya po primeneniyu lekarstvennogo preparata dlya medicinskogo primeneniya (In Russ)]. drive.google.com/file/d/1ujWagPZpO_tTKXxev9GY1bGTaw5VC5sX/view//

Поступила в редакцию журнала 26.06.2019

Рецензент: Л.П. Котрехова



КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ РАСПРОСТРАНЕННОЙ НАГНОИТЕЛЬНОЙ ФОРМЫ ЗООАНТРОПОНОЗНОЙ ТРИХОФИТИИ

**Хисматуллина З.Р. (зав. кафедрой)*, Альхашаш
Субхи М.С. (аспирант)**

Башкирский государственный медицинский университет (кафедра дерматовенерологии с курсами дерматовенерологии и косметологии ИДПО), Республика Башкортостан, Уфа, Россия

Описан клинический случай распространенной нагноительной формы зооантропонозной трихофитии волосистой части головы. Указана важность своевременной диагностики данной микотической инфекции с целью профилактики развития запущенных распространенных нагноительных процессов, приводящих к стойкому косметическому дефекту в виде очагов рубцовой атрофии волосистой части головы.

Ключевые слова: зооантропонозная трихофития, нагноительная форма, волосистая часть головы

A CLINICAL CASE OF THE SUPPURATIVE FORM OF ZOOANTHROPONOUS TRICHOPHYTOSIS

**Hismatullina Z.R. (head of the department), Sobhi
M.S. Alhashash (postgraduate student)**

Bashkir State Medical University (Department of Dermatovenerology with Courses of Dermatovenerology and Cosmetology with Course of Postgraduate Education), Republic of Bashkortostan, Ufa, Russia

A clinical case of a common suppurative form of zoonotrophic trichophytosis of the scalp is described. The importance of timely diagnosis of this mycotic infection in order to prevent the development of advanced widespread suppurative processes leading to a persistent cosmetic defect in the form of foci of scar atrophy of the scalp is indicated.

Key words: zoonotrophic trichophytosis, suppurative form, scalp

В настоящее время особое внимание уделяется дерматофитиям, обусловленным зоофильными грибами, ввиду роста заболеваемости и частых эпидемических вспышек, что влечет за собой не только вред здоровью человека, но и экономический ущерб [1-4]. Более того, стали чаще отмечать нагноительные формы зооантропонозных дерматофитий, обуславливающие диагностические ошибки или позднюю диагностику микотической инфекции [2, 4, 5]. В частности, поздняя обращаемость и самолечение пациентов с зооантропонозной трихофитией приводят к развитию запущенных, инфильтративно-нагноительных форм микоза, которые заканчиваются рубцовой атрофией волосистой части головы, т.е. косметическим дефектом [6-8].

Приводим наше клиническое наблюдение нагноительной формы трихофитии и стойкой алопеции у ребенка в ходе микотической инфекции ввиду поздней обращаемости родителей.

Родители пациента К., 8 лет, проживающие в сельской местности, обратились в поликлинику Республиканского кожно-венерологического диспансера (РКВД) с жалобами на появление гнойных очагов на волосистой части головы ребенка. Из анамнеза было выявлено, что в домашнем хозяйстве имеются две коровы, одна из которых страдает «стригущим лишаем» (со слов матери). Ребенок часто помогал кормить коров и убираться в сарае, где находились домашние животные. Родители увидели небольшую «бляшку с гноем» на волосистой части головы два месяца назад. Пытались лечить самостоятельно, смазывая очаг поражения различными наружными средствами (тетрациклиновая мазь, мазь Вишневского, спиртовой раствор йода). Постепенно «бляшка» увеличивалась в размере, гноя становилось больше, появились новые очаги. Фельдшер заподозрил абсцесс волосистой части головы и посоветовал обратиться к хирургу в районной больнице. Хирургом было назначено «промывание» очагов гипертоническим раствором и наложение мази Левомеколь. Ввиду отсутствия положительной динамики было предложено хирургическое вскрытие инфильтратов на голове у ребенка. Но с целью исключения дерматологической нозологии волосистой части головы пациент сначала был направлен к дерматологу, где был выставлен диагноз «зооантропонозная трихофития».

На момент обращения в РКВД у ребенка отмечали вялость, отсутствие аппетита, повышение температуры до 37,6 °С, головную боль. Объективно в пограничной зоне между теменной и затылочной областями волосистой части головы обнаружен крупный плоский воспалительный очаг (размером 7,5х7,0 см в диаметре) с большим количеством гнойного отделяемого. На всей поверхности волосистой части головы имелись множественные округло-овальные очаги различных размеров.

В очагах поражения наблюдали частичное выпадение волос. Оставшиеся волосы без труда эпилировались из расширенных волосяных фолликулов, откуда также легко выделялось гнойное содержимое. Выявлено увеличение (до 1,5-2 см) и болезненность затылочных и околоушных лимфатических узлов. При люминесцентной диагностике под лампой Вуда свечения не отмечали.

При микроскопическом исследовании пораженных

* Контактное лицо: Хисматуллина Зарема Римовна, e-mail: hzr07@mail.ru

волос волосистой части головы обнаружены споры гриба, расположенные по типу *trichophyton ectotrix* (т.е. снаружи волоса). При культуральном исследовании выделен *Trichophyton verrucosum*. Пациенту был выставлен диагноз: инфильтративно-нагноительная трихофития волосистой части головы (множественные очаги). Больной был госпитализирован в микологическое отделение РКВД.

Терапию пациенту начали с приема внутрь препарата «гризеофульвин» (в дозе 17 мг/кг). На очаги поражения накладывали рассасывающие наружные средства (5% серно-дегтярную мазь, нафталановую мазь). К концу лечения у ребенка сформировались очаги рубцовой атрофии во всех очагах поражения (Рис. 1), при микроскопическом исследовании волос грибы не выявляли.



Рис. 1. Множественные очаги рубцовой атрофии у больного с нагноительной трихофитией

Приведенный клинический случай в очередной раз указывает на запоздалую диагностику зооантропонозной трихофитии. Неадекватное лечение привело к развитию тяжелых, диссеминированных нагноительных форм волосистой части головы, сопровождающихся нарушением общего состояния и приводящих к стойкому косметологическому дефекту. Информированность о клиническом многообразии зооантропонозных дерматофитий имеет большое значение для врачей всех специальностей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Michaels B.D., Del Rosso J.Q. Tinea capitis in infants: recognition, evaluation, and management suggestions. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* 2012; 5 (2): 49-59. PMID: 22468173, PMCID: PMC3315884
2. Klimko N.N., Kozlova Ya.I., Khostelidi S.N., et al. The burden of serious fungal diseases in Russia. *Mycoses.* 2015; 58: 58-62. doi.org/10.1111/myc.12388
3. Brown G.D., Denning D.W., Gow N.A.R., et al. Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Sci. Transl. Med.* 2012; 4: 1-9. doi.org/10.1126/scitranslmed.3004404
4. Mashiah J., Kutz A., Ben Ami R., et al. Tinea capitis outbreak among pediatric refugee population, an evolving healthcare challenge. *Mycoses.* 2016; 59: 553-557. doi.org/10.1111/myc.12501
5. Bongomin F., Gago S., Oladele R., Denning D. Global and multi-national prevalence of fungal diseases – estimate precision. *J. Fungi.* 2017; 3: 57. doi.org/10.3390/jof3040057
6. Kundu D., Mandal L., Sen G. Prevalence of tinea capitis in school going children in Kolkata, West Bengal. *J. Nat. Sci. Biol. Med.* 2012; 3: 152-155. doi.org/10.4103/0976-9668.101894
7. Fremerey C., Nenoff P. Tinea capitis in a newborn. *New England Journal of Medicine.* 2018; 378: 2022. doi.org/10.1056/NEJMicm1711862
8. Shemer A., Grunwald M.H., Gupta A.K., et al. Griseofulvin and fluconazole reduce transmission of tinea capitis in schoolchildren. *Pediatric Dermatology.* 2015; 32: 696-700. doi.org/10.1111/pde.12653

Поступила в редакцию журнала 06.11.2019

Рецензент: Л.П. Котрехова



АПРОБАЦИЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ТЕСТ- СИСТЕМЫ «HRM-ZYGO- ASP» НА КЛИНИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ БОЛЬНЫХ МУКОРМИКОЗАМИ

¹Игнатьева С.М. (в.н.с.), ¹Спиридонова В.А. (н.с.),
¹Богомолова Т.С. (зав. лаб.), ¹Авдеенко Ю.Л. (с.н.с.),
¹Борзова Ю.В. (зав. клиникой), ¹Хостелиди С.Н. (доцент
кафедры), ¹Шадринова О.В. (доцент кафедры),
²Попова М.О. (врач-гематолог), ³Чудиновских Ю.А.
(врач-гематолог), ³Зюзгин И.С. (зав. отд.),
⁴Успенская О.С. (зав. отд.), ¹Васильева Н.В. (директор
института, зав. кафедрой)

¹Северо-Западный государственный медицинский
университет им. И.И.Мечникова: НИИ медицинской
микологии им. П.Н.Кашкина и кафедра клинической
микологии, аллергологии и иммунологии; ²Санкт-
Петербургский государственный медицинский
университет им. акад. И.П. Павлова; ³Институт детской
гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой;
³Национальный медицинский исследовательский центр
онкологии им. Н.Н. Петрова; ⁴Ленинградская областная
больница, Санкт-Петербург, Россия

Цель работы заключалась в апробации разработанной мульти-
плексной ПЦР-тест-системы «HRM-Zygo-Asp» в режиме реального
времени (РВ) с анализом кривых плавления ПЦР-продуктов высоко-
го разрешения (HRM) для выявления и идентификации аспергиллов
и мукоормицетов. Исследовали различный биологический материал
(биопсийный и аутопсийный), в т.ч. в парафиновых блоках и БАЛ от
больных мукоормикозами. Представлены сравнительные результаты
исследования 19 образцов биоматериала от 13 больных мукоормико-
зом микологическими, гистологическими, серологическими и молеку-
лярными методами. Показаны примеры эффективного использо-
вания тест-системы для отдельных клинических случаев при анализе
различных типов биологического материала, а также возможность
выявлять смешанную мукоормикоз-аспергиллезную инфекцию.

Ключевые слова: мукоормикоз, инвазивный аспергиллез, онко-
логические пациенты, мукоормицеты, аспергиллы, полимеразно-
цепная реакция (ПЦР), мультиплексная тест-система

APPROBATION OF MULTIPLEX TEST SYSTEM «HRM-ZYGO- ASP» ON THE CLINICAL MATERIAL OF PATIENTS WITH MUCORMYCOSIS

¹Ignatieva S.M. (leading scientific collaborator),
¹Spiridonova V.A. (scientific collaborator), ¹Bogomolova
T.S. (head of the laboratory), ¹Avdeenko Y.L. (leading
scientific collaborator), ¹Borzova Yu.V. (head of the
clinic), ¹Khostelidi S.N. (associate professor), ¹Shadrivova
O.V. (associate professor), ²Popova M.O. (physician-
hematologist), ³Chudinovskikh Y.A. (physician-
hematologist), ³Zyuzgin I.S. (head of the clinical
department), ⁴Uspenskaya O.S. (head of the clinical
department), ¹Vasilyeva N.V. (director of the institute,
head of the department)

* Контактное лицо: Игнатьева Светлана Михайловна,
e-mail: svetlana.ignatieva@szgmu.ru

¹North-Western State Medical University named after
I.I. Metchnikov: Kashkin Research Institute of Medical
Mycology and Department of Clinical Mycology, Allergy
and Immunology; ²R. Gorbachova Institute of Children's
Hematology and Transplantology; ³N.N. Petrov Research
Institute of Oncology; ⁴Leningrad Regional Clinical Hospital,
St. Petersburg, Russia

The purpose of the work was to test the previously developed multiplex
PCR test-system "HRM-Zygo-Asp" in real time (RT) with analysis of the
melting curves of high-resolution PCR products (HRM) to detect and identify
aspergillus and mucormycetes. We studied various biological material:
biopsy samples, autopsy material, paraffin blocks with tissues affected by
micromycetes, BAL from patients with mucormycosis. Comparative results
of a study of 19 clinical samples from 13 patients with mucormycosis by
molecular, mycological, histological and serological methods are presented.
Examples of the effective use of the test system for individual clinical cases in
the analysis of various types of biological material, as well as the ability to
detect mixed mucormycosis-aspergillosis infection are shown.

Key words: mucormycosis, invasive aspergillosis, cancer patients,
mucorales, aspergillus, polymerase chain reaction (PCR), multiplex test
system

ВВЕДЕНИЕ

Мукоормикоз – тяжелая инфекция, частота которой
в 21 веке возросла у пациентов с гематологическими
злокачественными новообразованиями и у реципи-
ентов трансплантатов гемопоэтических стволовых
клеток [1, 2]. Мукоормикоз вызывают представители
порядка *Mucorales*, из которых наиболее распро-
страненными являются виды *Rhizopus* (48%), *Mucor* (14%),
Lichtheimia (13%), *Cunninghamella* (7%) и *Rhizomucor*
(6%) [2-4]. У онкогематологических пациентов г.
Санкт-Петербурга основные возбудители мукоормико-
за – представители родов *Rhizopus* (47%), *Rhizomucor*
(28%), *Lichtheimia* (17%) и *Mucor* (8%) [5]. Для успешно-
го лечения пациентов с этим заболеванием решающее
значение имеют ранняя диагностика и быстрое начало
противогрибковой терапии. Лабораторная диагности-
ка мукоормикоза сложна, диагноз подтверждается, как
правило, при прямой микроскопии биоматериалов и/
или получением культуры возбудителя (только в 50%
случаев) [6]. При гистологических исследованиях па-
тологического материала иногда сложно различить
возбудителей аспергиллеза и мукоормикоза [7]. Серо-
логическая диагностика этого заболевания отсутству-
ет. Одним из наиболее перспективных направлений
в диагностике мукоормикоза является использование
быстрых молекулярных методов идентификации гри-
ба непосредственно в инфицированных тканях [8, 9]
и биологических жидкостях, таких как бронхо-альве-
олярный лаваж (БАЛ), плазма или сыворотка [10, 11]
и моча [12]. Среди молекулярных методов детекции
представителей *Mucorales* применяют, главным обра-
зом, различные модификации ПЦР [13-16].

Например, вариант ПЦР в режиме реального вре-
мени (РВ-ПЦР) с праймерами к фрагменту гена 18Sр
ДНК *Mucorales* с использованием флуоресцирующих
интеркалирующих красителей (Eva Green, Sybr Green)
и последующим анализом кривых плавления ПЦР-
продуктов высокого разрешения (HRM – от англ. high
– resolution melting) позволяет различать род и вид в
зависимости от температуры плавления ампликонов.
В 2010 г. Hrnairova K. с соавторами [17] впервые при-
менила этот метод для выявления и идентификации
основных клинически значимых мукоормицетов в об-
разцах тканей и изолятах, показав высокую аналити-
ческую и диагностическую чувствительность (92%) и

специфичность (100%) метода.

На основе данной технологии в НИИ медицинской микологии им. П.Н.Кашкина впервые в России была разработана мультиплексная ПЦР-тест-система «HRM-Zygo-Asp» в режиме РВ. Тест-система позволяет обнаружить в одном клиническом образце одновременно ДНК грибов рода *Aspergillus* и/или порядка *Mucorales*, а последующий анализ кривых плавления ПЦР-продуктов высокого разрешения (HRM) – идентифицировать аспергиллы до рода и мукоромицеты – до вида или комплекса видов.

Цель данного исследования – апробация мультиплексной ПЦР-тест-системы «HRM-Zygo-Asp» в режиме РВ при исследовании различных типов биологического материала от пациентов с мукормикозами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали 19 клинических образцов: БАЛ (6), биоптат печени (2), биоптат легкого (1), аутопсийный материал (1), парафиновые блоки (10) от 10 гематологических больных с мукормикозом и 3 – с микст-микозом смешанной этиологии, госпитализированных в стационары г. Санкт-Петербурга с 2013 по 2019 гг. В качестве контрольных использовали 17 образцов тканей и 20 образцов БАЛ от пациентов без микозов. Диагноз мукормикоза и аспергиллеза устанавливали в соответствии с критериями Европейской организации по лечению и исследованию рака /группы, изучающей микозы (EORTC/MSG, 2008) [18], и Европейского общества клинических микробиологов и инфекционных заболеваний, Европейской конфедерации медицинских микологов и Европейского респираторного общества (ESCMID-ЕСММ-ERS, 2017) [19]. На основании обнаружения микромицетов при гистологическом исследовании срезов, окрашенных по методу Гомори-Грокотт и PAS, и/или при микологическом исследовании патологического материала, включающего в себя прямую микроскопию образцов с добавлением калькофлюора белого и посев на среду Сабуро, подтверждали диагноз микоза. Кроме того, определяли галактоманновый антиген *Aspergillus* spp. в БАЛ с помощью тест-системы «Platelia *Aspergillus* Ag» (Bio-Rad Laboratories). Выделение ДНК из клинических образцов проводили методом хлороформ-изоамиловой экстракции. При работе с парафиновыми блоками совершали предобработку ксилолом, направленную на очистку от парафина. В одном образце при отсутствии культуры возбудителя проводили секвенирование ДНК, полученной из тканей, заключенных в парафин, согласно рекомендациям Института Клинических и Лабораторных стандартов США (CLSI) [20]. Амплификацию осуществляли на приборе Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science, Австралия) с помощью разработанной нами ПЦР-тест-системы «HRM-Zygo-Asp», включающей в себя две пары праймеров (аспергилл- и мукоромицет-специфичных) и набора реагентов для проведения ПЦР в реальном времени с интеркалирующим красителем Eva Green (Синтол, Москва) в модификации ранее предложенного протокола [21]. При использовании Eva Green уровень его флуоресценции резко возрастает при связывании с двухцепочечной ДНК, а при достижении температуры плавления ампликонов – снижается. Наличие пика с соответствующей температурой на дифференциальной кривой

плавления означает присутствие специфического продукта ПЦР. Для микромицетов наличие пика при 76,8-77,7 °С свидетельствовало о наличии ДНК аспергиллов, а при 83-86 °С – о наличии ДНК мукоромицетов (Рис.1).

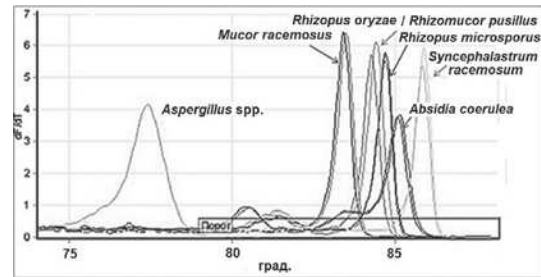


Рис.1. Кривые плавления ПЦР-продуктов ДНК микромицетов: T_{пл.} *Aspergillus* spp. – 77 ÷ 78 °С, T_{пл.} *Mucorales* – 83 ÷ 86 °С.

Разные виды *Aspergillus* spp. имели пики плавления в узком диапазоне температур (76,8-77,8 °С), а разные виды мукоромицетов – индивидуальные температуры плавления, по которым их можно было дифференцировать: представителей *Aspergillus* spp. – до рода и мукоромицетов *Rhizomucor pusillus*, *Rhizopus microsporus*, *Mucor circinelloides*, *Cunninghamella echinulata*, *Syncephalastrum racemosum*, *Lichtheimia corymbifera*, *Rhizopus arrhizus* / *Rhizopus stolonifer*, *Mucor racemosus* / *Mucor plumbeus* – до вида или комплекса видов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основании клинических и лабораторных данных у 8 онкогематологических больных были зарегистрированы локализованные формы мукормикоза: легких (5), кишечного тракта (2) и печени (1), а также поражение двух органов – легких и почки (1), микст-микоз легкого (2) и генерализованные формы, обусловленные грибами рода *Aspergillus* и порядка *Mucorales* (2). Наиболее часто мукормикоз развивался на фоне острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) – 39%, неходжкинской лимфомы (НХЛ) и острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) – по 23%, реже – при лимфоме Ходжкина (ЛХ) – 15%.

При исследовании 9 нативных образцов больных (3 биоптата и 6 БАЛ) методом прямой микроскопии в 8 (89%) случаев выявлен широкий несептированный мицелий мукоромицета (табл.1).

Положительный высев мукоромицетов из клинического материала больных получен в 6 (67%) образцах. Основными возбудителями мукормикоза были: *Rhizopus* spp. (66%), *L. corymbifera* (17%) и *Rhizomucor* spp. (17%). У 1 пациента (3Б) диагностировали микст-микоз, т.к. при микроскопическом исследовании, кроме мицелия мукорового гриба, обнаруживали элементы септированного мицелия, ветвящегося под острым углом, характерного для грибов рода *Aspergillus*, а при культуральном – выделили *Rhizopus* spp. и *Aspergillus fumigatus*. С помощью РВ-ПЦР мукоромицет идентифицировали как *R. arrhizus*. Галактоманновый тест в БАЛ был положительным. Таким образом, молекулярно-генетическое исследование нативных 9 образцов с помощью мультиплексной ПЦР-тест-системы «HRM-Zygo-Asp» позволило идентифицировать мукоромицеты до видов: *R. arrhizus* (44%), *L. corymbifera* (33%), *R. pusillus* (11%) и *R. microsporus* (11%). Результаты ПЦР-исследований биоптатов и БАЛ от больных с мукорми-

козами совпадали с данными прямой микроскопии в 89% случаев и в 67% – с результатами посевов, а при анализе «положительные микроскопия и/или посев» – полностью коррелировали с общими показателями микологических исследований. У пациента 8-Ш, кроме выявленного микроскопически и полученного из БАЛ изолята *R. arrhizus* методом ПЦР, была обнаружена ДНК двух возбудителей – *R. arrhizus* и *Aspergillus* spp., что способствовало (вместе с положительным галактоманновым тестом *Aspergillus* в БАЛ) уточнению лабораторного диагноза микст-микоза.

В 10 парафиновых блоках от больных мукомикозом был представлен следующий операционный материал: ткань легкого (3), почки (1), печени (1), кишечника (2) и сальника (1), фрагмент ткани (1) от больного с диссеминированным процессом (табл. 2).

При гистологическом исследовании окрашенных срезов во всех случаях были обнаружены морфологические элементы грибов (широкий несептированный мицелий, ветвящийся под прямым углом), в нескольких заключениях указаны признаки их сходства с микромикетами рода *Aspergillus* или/и порядка *Mucorales*. Молекулярно-генетическое исследование всех тканей, заключенных в парафин, позволило выявить в 100% случаев мукоморичеты и идентифицировать их до вида: *L. corymbifera* – в 5 образцах (56%), *R. pusillus* – в 3 (33%) и *R. microsporus* – в 1 (11%). Чувствитель-

ность мультиплексной тест-системы «Zygo-Asp-HRM» при исследовании операционного материала была выше, чем гистологических методов. Так, при гистологическом исследовании срезов ткани легкого от пациента 3-Б был обнаружен септированный мицелий, сходный с *Aspergillus* spp., в то время как с помощью тест-системы «Zygo-Asp-HRM» была выявлена ДНК *Aspergillus* sp. и *R. arrhizus*. Учитывая, что у данного больного был положительным галактоманновым тест в БАЛ и выделены культуры грибов *A. fumigatus* и *Rhizopus* spp., диагностирован микст-микоз, обусловленный *A. fumigatus* и *R. arrhizus*. В 17 контрольных образцах операционного материала и 20 БАЛ от больных с неподтвержденным лабораторно диагнозом микоза ДНК микромицетов не обнаруживали.

Таким образом, при исследовании клинического материала от 13 больных мукомикозом положительные результаты молекулярного исследования полностью совпадали с микологическими (микроскопия + посев) и/или с гистологическими находками грибов в патологическом материале больных. У 4 пациентов с мукомикозом (1-Т, 2-П, 3-Б, 5-К) было проанализировано наибольшее количество биосубстратов – биоптаты тканей /БАЛ/ парафиновые блоки. Микологические, гистологические и серологические методы дополняли друг друга в обнаружении возбудителя в клиническом материале, а молекулярно-биологические

Таблица 1

Исследование биоптатов тканей и БАЛ пациентов с мукомикозами

Пациенты	Гематологический диагноз	Микологический диагноз	Клинический материал	Галактоманнан <i>Aspergillus</i> sp.	Микологическое исследование		Молекулярно-биологическое исследование
					Прямая микроскопия	Посев	
1-Т	НХЛ	Диссеминированный микст-микоз (аспергиллез + мукомикоз)	Ткань печени	-	Широкий несептированный мицелий	Отрицательный	<i>Rhizopus microsporus</i>
2-П	ОМЛ	Мукомикоз легких и почки	БАЛ	Отрицательный	Отриц.	<i>Rhizomucor</i> spp.	<i>Rhizomucor pusillus</i>
3-Б	НХЛ	Микст-микоз (аспергиллез + мукомикоз) легкого	БАЛ	Положительный	Широкие несептированные гифы + септированный мицелий, ветвящийся под углом 45°С	<i>Aspergillus fumigatus</i> + <i>Rhizopus</i> spp.	<i>Aspergillus</i> sp. + <i>Rhizopus arrhizus</i>
4-Ш	ОМЛ	Мукомикоз печени	Ткань печени	-	Несептированный мицелий	Отрицательный	<i>Lichtheimia corymbifera</i>
5-К	НХЛ	Мукомикоз легких	БАЛ	Отрицательный	Несептированный мицелий	Отрицательный	<i>Lichtheimia corymbifera</i>
			Ткань легкого	-		<i>Lichtheimia corymbifera</i>	<i>Lichtheimia corymbifera</i>
6-М	ОМЛ	Мукомикоз легких	БАЛ	Отрицательный	Широкий несептированный мицелий	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Rhizopus arrhizus</i>
7-П	ОЛЛ	Мукомикоз легких	БАЛ	Отрицательный	Широкий несептированный мицелий	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Rhizopus arrhizus</i>
8-Ш	ЛХ	Микст-микоз (аспергиллез + мукомикоз) легкого	БАЛ	Положительный	Широкий несептированный мицелий	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Rhizopus arrhizus</i> + <i>Aspergillus</i> sp.

Таблица 2.

Исследование парафиновых блоков с тканями, инфицированными мукомикетами

Пациенты	Гематологический диагноз	Микологический диагноз	Клинический материал	Гистологическое исследование	Молекулярно-биологическое исследование
1-Т	НХЛ	Диссеминированный микст-микоз (аспергиллез + мукомикоз)	Ткань печени	Широкий несептированный мицелий	<i>Rhizopus microsporus</i> + <i>Aspergillus</i> spp.
2-П	ОМЛ	Мукомикоз легких и почки	Ткань почки	Мицелий мукоморичета	<i>Rhizomucor pusillus</i>
3-Б	НХЛ	Микст-микоз (аспергиллез + мукомикоз) легкого	Ткань легкого	Септированный мицелий, ветвящийся под острым углом	<i>Aspergillus</i> sp. + <i>Rhizopus arrhizus</i>
4-Г	ОЛЛ	Мукомикоз кишечного тракта	Ткань кишечника Ткань сальника	Мицелий мукоморичета Мицелий мукоморичета	<i>Rhizomucor pusillus</i> <i>Rhizomucor pusillus</i>
5-К	НХЛ	Мукомикоз легких	Ткань легкого	Мицелий мукоморичета	<i>Lichtheimia corymbifera</i>
6-Г	ОЛЛ	Мукомикоз легких	Ткань легкого	Мицелий мукоморичета	<i>Lichtheimia corymbifera</i>
7-В	ЛХ	Мукомикоз толстой кишки	Ткань толстой кишки	Морфологические признаки грибковой инвазии прямой кишки	<i>Lichtheimia corymbifera</i>
8-Р	ОЛЛ	Диссеминированный мукомикоз	Фрагменты некротизированной и грануляционной ткани	Структуры толстых септирующихся ветвящихся грибковых микроорганизмов	<i>Lichtheimia corymbifera</i>
9-О	ОЛЛ	Мукомикоз легких	Ткань легкого	Мицелий мукоморичета	<i>Lichtheimia corymbifera</i>

исследования позволяли уточнить вид мукоромицета и выявить смешанную инфекцию, вызванную грибами рода *Aspergillus* и порядка *Mycorales*.

Далее представлены отдельные примеры использования мультиплексной тест-системы «Zygo-Asp-HRM» для исследования БАЛ, биопсийных образцов и тканей, заключенных в парафин, у некоторых больных с мукормикозом.

Пример 1. Применение тест-системы «Zygo-Asp-HRM» при анализе образцов из парафиновых блоков сопереационным материалом пациента Г. с гематологическим заболеванием и мукормикозом желудочно-кишечного тракта, органов брюшной полости.

Пациент Г., 13 лет, с ОЛЛ находился в отделении реанимации многопрофильного стационара г. Москвы с 18.10.16 г. по поводу двусторонней полисегментарной пневмонии. Через 3 дня у больного диагностировали полную окклюзию наружной подвздошной вены, тромбоз общей подвздошной артерии, некроз терминального отдела подвздошной вены. Была проведена резекция терминального отдела подвздошной и восходящего отдела толстой кишки.

При гистологическом исследовании парафиновых блоков операционного материала тканей тонкой, толстой кишки и сальника обнаружены обширные разрастания редко септированных широких гиф мицелия, ветвящегося под прямым углом, по микроморфологии соответствующего мукоромицету.

Результаты молекулярного исследования клинического материала пациента Г. получены на основании анализа кривых плавления ПЦР-продуктов, выявленных при амплификации тотальной ДНК с праймерами, специфичными для *Aspergillus* spp. и грибами порядка *Mucorales* (Рис. 2).

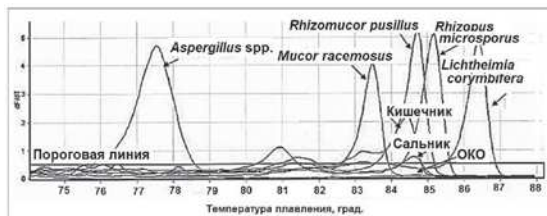


Рис. 2. Кривые плавления ПЦР-продуктов ДНК, выделенной из парафиновых блоков с тканями разных органов (кишечник и сальник) больного Г., *Aspergillus* spp. – ДНК культуры (положительный контроль), ОКО – отрицательный контрольный образец.

Как видно из рисунка, мы получили пики плавления ДНК-образцов пациента Г. в диапазоне 84-85 °С, который соответствует температуре плавления ДНК *R. pusillus*, при этом отсутствовали пики плавления ДНК в зоне 77,5-78,3 °С, характерной для *Aspergillus* spp. Интенсивность флуоресцентного сигнала (высота пика) у образцов с одинаковой концентрацией ДНК различалась: бóльшая интенсивность зарегистрирована в тканях кишечника, чем в сальнике. Таким образом, только с помощью молекулярного анализа тканей кишечника и сальника с применением мультиплексной ПЦР-РВ с функцией высокого разрешения (HRM) был обнаружен и идентифицирован возбудитель мукормикоза желудочно-кишечного тракта – *R. pusillus*.

Пример 2. Применение тест-системы «Zygo-Asp-HRM» при исследовании БАЛ и биопсийного образца легкого пациента К. с гематологическим заболеванием и мукормикозом.

Пациент К., 57 лет, с НХЛ от февраля 2015 г. С 07.09.17 г. больному проведен курс высокодозной химиотерапии с трансплантацией аутологичных стволовых кроветворных клеток и реинфузией 13.09.17 г. На 9 день после ТСКК – подъем температуры тела выше 38 °С. На КТ от 04.10.17 г.: в S6 и S1,2 левого легкого – инфильтрат неоднородной структуры с воздушными полостями 36x28 мм. Пациенту выполнена фибробронхоскопия (05.10.17 г.).

Методом прямой микроскопии с калькофлюором белым в образце БАЛ был обнаружен несептированный мицелий гриба, ветвящийся под прямым углом. Культура гриба получена не была (табл. 3).

Таблица 3

Результаты исследования БАЛ пациента К.	
Люминесцентная микроскопия с калькофлюором белым	Обнаружен несептированный мицелий гриба, ветвящийся под прямым углом
Посев БАЛ	Культура гриба не выявлена
Тест на галактоманнан <i>Aspergillus</i> spp.	Отрицательный
Молекулярное исследование с помощью «Zygo-Asp-HRM»	Кривая плавления ПЦР-продукта имеет пик в области 86-87 °С, характерный для <i>Lichtheimia corymbifera</i> (Рис.3).

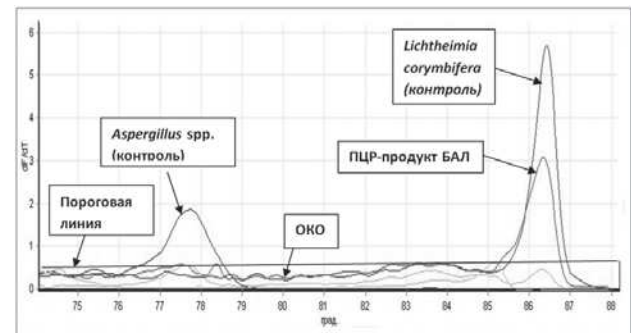


Рис. 3. Профили кривых плавления ПЦР-продукта ДНК, выделенной из БАЛ больного К., *Aspergillus* spp. и *L. corymbifera* – ДНК культур (положительные контроли), ОКО – отрицательный контрольный образец.

Галактоманнановый тест в БАЛ был отрицательный. При молекулярном исследовании методом ПЦР-РВ в клиническом материале удалось обнаружить ДНК *L. corymbifera*. Как видно из рисунка 3, мы получили пик плавления ПЦР-продукта из БАЛ пациента К. в диапазоне 86-87 °С, который соответствует температуре плавления ДНК *L. corymbifera*, при этом отсутствовали пики плавления ДНК в зоне 77,5-78,3 °С, характерной для *Aspergillus* spp. С 09.10.17 г. у пациента регистрировали прогрессирование пневмонии с появлением новых инфильтратов, и была выполнена нижняя лобэктомия с резекцией субсегмента С2а и краевой резекцией С4 левого легкого. Результаты лабораторного исследования биоптата легкого представлены в таблице 4.

Таблица 4

Результаты исследования биоптата легкого пациента К.	
Люминесцентная микроскопия с калькофлюором белым	Обнаружен несептированный мицелий гриба, ветвящийся под прямым углом (Рис. 4)
Посев	Получена культура мукоромицета <i>Lichtheimia corymbifera</i>
Молекулярное исследование с помощью «Zygo-Asp-HRM»	Кривая плавления ПЦР-продукта имеет пик в области 86-87 °С, характерный для <i>Lichtheimia corymbifera</i> (Рис. 5)
Гистологическое исследование	В нижней доле левого легкого полость распада, заполненная детритом, с многочисленными широкими малосептированными гифами, ветвящимися под прямым углом, характерными для мукоромицетов

При люминесцентной микроскопии биоптата легкого (Рис. 4) был отчетливо виден несептированный мицелий гриба с ветвлением под прямым углом, а при посеве на среду Сабуро выделена культура *L. corymbifera*. При гистологическом исследовании биоптата обнаруживали несептированный мицелий гриба с ветвлением под прямым углом, характерный для мукоромицетов.

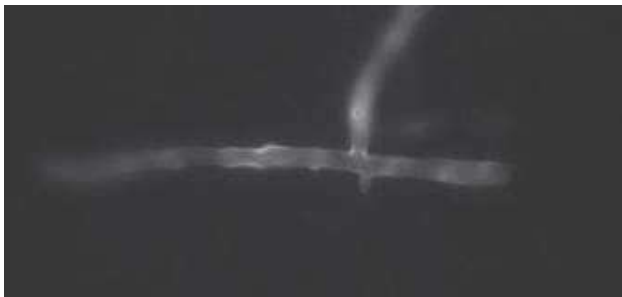


Рис. 4. Люминесцентная микроскопия биоптата легкого пациента К. с калькофлюором белым X400.

При проведении ПЦР с мультиплексной тест-системой «Zygo-Asp-HRM» были получены пики плавления ДНК, выделенной из биоптата и культуры гриба, в диапазоне 86–87 °С, которые совпадали с пиком плавления ДНК референс-культуры *L. corymbifera* (Рис. 5). Данные молекулярного анализа биологического материала были сопоставимы с показателями микробиологических и гистологических исследований.

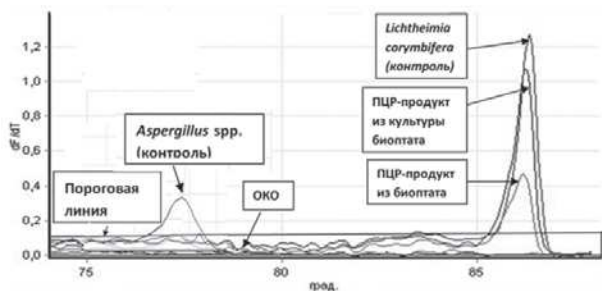


Рис. 5. Профили кривых плавления ПЦР-продуктов ДНК, выделенной из биоптата и культуры, полученной при посеве биоптата легкого больного К., *Aspergillus spp.* и *L. corymbifera* – ДНК культур (положительные контроли), ОКО – отрицательный контрольный образец.

По результатам лабораторных исследований больному была назначена антимикотическая терапия (амфотерин, затем амфотерицин, затем каспофунгин, позмаконазол). На фоне лечения отмечено улучшение самочувствия, положительная КТ-динамика, и пациент выписан из стационара.

Пример 3. Применение тест-системы «Zygo-Asp-HRM» при исследовании нативного аутопсийного материала и парафиновых блоков ткани печени от пациентки Т. с микст-микозом.

Пациентка Т., 35 лет, с НХЛ. В июне 2014 г. выполнена аутологичная трансплантация костного мозга. На 19 день после трансплантации появились боли в правом подреберье, лихорадка. Проведена компьютерная томография брюшной полости. Диагностирован диссеминированный процесс во всех органах. На 23 день была констатирована смерть пациентки.

При микроскопическом исследовании аутопсийного материала печени у больной обнаружен несептированный мицелий, ветвящийся под углом 90°, посев на

питательные среды был отрицательным. Гистологическое исследование операционного материала позволило выявить широкие нити несептированного мицелия, сходного с мукоромицетами (Рис. 6).

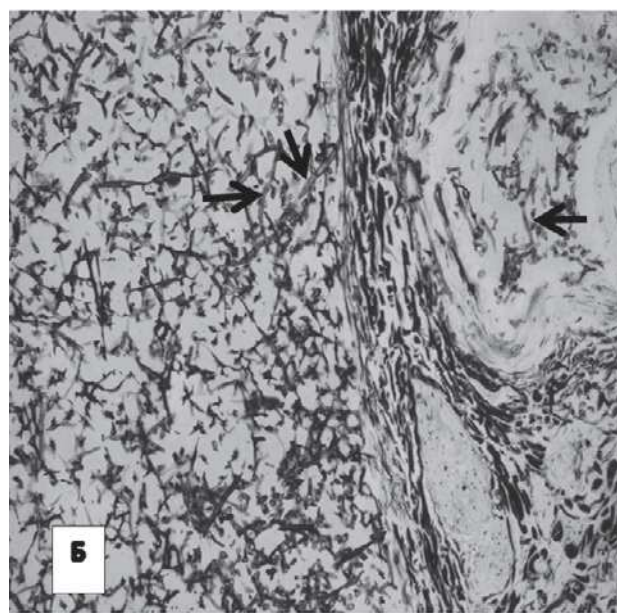
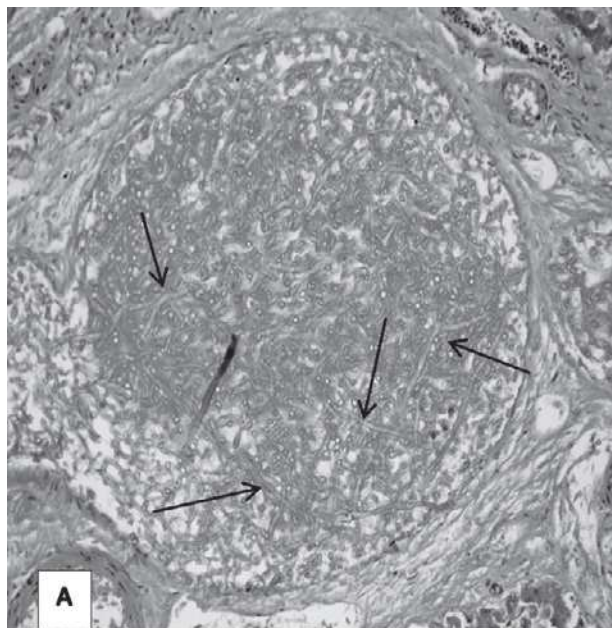


Рис. 6. Аутопсийный материал (печень) пациентки Т. Хорошо видны нити толстого несептированного мицелия, ветвящегося под прямым углом. А – PAS-реакция, x100. Б – окраска по Гомори-Грокотт, x100. Исследование выполнено Артемьевой А.С., гистологическая лаборатория НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова.

При молекулярном исследовании материала печени обнаружена ДНК двух грибов – *Aspergillus sp.* и *R. microsporus*. Кривые плавления ПЦР-продуктов ДНК, полученной из ткани печени пациентки Т. (Рис. 7), имели 2 пика с различными точками плавления: в районе 78 °С, характерном для *Aspergillus spp.*, и 85,5 °С – для *R. microsporus*.

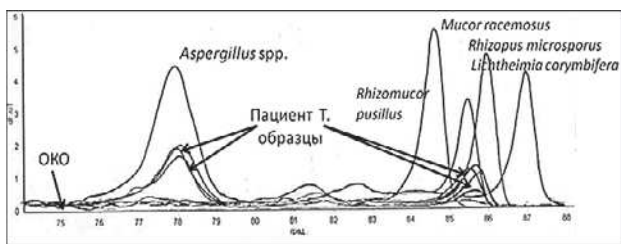


Рис. 7. Кривые плавления ПЦР-продуктов ДНК, выделенной из ткани печени больной Т., *Aspergillus* spp.– ДНК культуры (положительный контроль), ОКО – отрицательный контрольный образец.

Наличие аспергиллов в ткани печени подтверждено секвенированием грибной ДНК, выделенной непосредственно из парафинового блока, и определен вид возбудителя – *Aspergillus flavus*. У пациентки был диагностирован микст-микоз, обусловленный *A. flavus* и *R. microsporus*. Чувствительность мультиплексной тест-системы «Zygo-Asp-HRM» была выше, чем традиционных микологических методов.

Таким образом, при исследовании клинического материала от 13 больных мукоормикозом тест-система «Zygo-Asp-HRM» отличалась большей чувствительностью, чем традиционные методы, что уже отмечали другие исследователи для молекулярных методов в целом [22]. Положительные результаты, полученные нами с помощью мультиплексной ПЦР, полностью совпадали с микологическими (микроскопия + посев) и с гистологическими находками грибов в патологическом материале больных. У 3 пациентов с мукоормикозом (1-Т, 2-П, 3-Б) было проанализировано наибольшее количество биосубстратов: биоптаты тканей /БАЛ/ парафиновые блоки. Микологические, гистологические и серологические методы дополняли друг друга в обнаружении возбудителя в клиническом материале, а молекулярно-биологические исследования позволяли уточнить вид мукоормицета и выявить у пациентов смешанную инфекцию, вызванную *Aspergillus* spp. и грибами порядка *Mucorales*. Тест-система была эффективна при изучении разного биологического материала.

При тестировании образцов нативных биоптатов и парафиновых блоков с тканями, пораженными мукоормицетами, концентрация геномной ДНК, выделенной из парафиновых блоков, была в 10 раз ниже, чем из свежих тканей. Эти результаты сопоставимы с зарубежными данными, в которых аналитическая чувствительность, не зависимо от типа молекулярного метода, составляла от 56% до 80% при тестировании образцов из парафиновых блоков и от 97% до 100% – для образцов свежих тканей [13-16].

Исследование БАЛ для выявления ДНК возбудителей мукоормикозов представляется перспективным при отрицательных посевах БАЛ. Чувствительность ПЦР-исследований БАЛ у таких пациентов выше, чем крови/плазмы. В 2014 г. Lengerova M. и соавт. использовали ПЦР с последующим анализом кривых плавления ПЦР-продуктов высокого разрешения (ПЦР/HRM) для обнаружения мукоормицетов в БАЛ иммунокомпрометированных пациентов. Методика показала высокую чувствительность (100%) и специфичность (93%) обнаружения ДНК *Mucorales* в образцах БАЛ [23]. Мы в своей работе проанализировали 6 образцов БАЛ от больных с подтвержденным мукоормикозом, однако необходимо тестирование большего количества биоматериала. Наши исследования согласуются с Глобальными рекомендациями для диагностики и лечения мукоормикоза, опубликованными недавно [24], в которых подчеркнута перспективность использования молекулярных методов в диагностике мукоормикозов (сила рекомендации ВІІu).

ВЫВОДЫ

1. Тест-система позволяет быстро и точно выявлять и идентифицировать мукоормицеты до вида и аспергиллы до рода в биоптатах, операционном материале, заключенном в парафин, и БАЛ больных с мукоормикозом.
2. Тест-система может быть полезной для выявления смешанной инфекции, обусловленной грибами рода *Aspergillus* и порядка *Mucorales*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Skiada A., Pagano L., Groll A., et al. European Confederation of Medical Mycology Working Group on Zygomycosis. Zygomycosis in Europe analysis of 230 cases accrued by the registry of the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) Working Group on Zygomycosis between 2005 and 2007. Clin. Microbiol. Infect. 2011;17 (12):1859-1867. doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03456.x
2. Petrikos G., Skiada A., Lortholary O., et al. Epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis. Clin. Infect. Dis. 2012; 54 (Suppl.1): 23-34. doi.org/10.1093/cid/cir866
3. Chamilos G., Lewis R.E., Kontoyiannis D.P. Delaying amphotericin B-based frontline therapy 1357 significantly increases mortality among patients with hematologic malignancy who have 1358 zygomycosis. Clin. Infect. Dis 2008; 47 (4): 503-9. doi: 10.1086/590004.
4. Binder U., Maurer E., Lass-Flörl C. Mucormycosis – from the pathogens to the disease. Clin. Microbiol. Infect. 2014; 20: 60-66. doi.org/10.1111/1469-0691.12566
5. Klimko N., Khostelidi S., Shadrivova O., et al. Contrasts between mucormycosis and aspergillosis in oncohematological patients. Medical Mycology. 2019; 57 (52):138-144. doi.org/10.1093/mmy/myy116
6. Spellberg B., Ibrahim A.S., Chin-Hong P.V., et al. The deferasirox-ambisome therapy for 1399 mucormycosis (DEFEAT Mucor) study: a randomized, double-blinded, placebo-controlled 1400 trial. J. Antimicrob Chemother. 2012; 67(3): 715-22. doi: 10.1093/jac/dkr375.
7. Salehi E., Hedayati M.T., Zoll J., et al. Discrimination of aspergillosis, mucormycosis, fusariosis, and scedosporiosis in formalin-fixed paraffin-embedded tissue specimens by use of multiple real-time quantitative PCR assays. J. Clin. Microbiol. 2016; 54 (11): 2798-2803. doi.org/10.1128/JCM.01185-16
8. Springer J., Lackner M., Ensinger C., et al. Clinical evaluation of a mucorales-specific real-time PCR assay in tissue and serum samples. J. Med. Microbiol. 2016; 65: 1414-1421. doi.org/10.1099/jmm.0.000375
9. Schwarz P., Bretagne S., Gantier J.C., et al. Molecular identification of zygomycetes from culture and experimentally infected tissues. J. Clin. Microbiol. 2006; 44: 340-349. doi.org/10.1128/JCM.44.2.340-349.2006

10. *Legrand M., Gits-Muselli M., Boutin L., et al.* Detection of circulating mucorales DNA in critically ill burn patients: preliminary report of a screening strategy for early diagnosis and treatment. *Clin. Infect. Dis.* 2016; 63: 312-1317. doi.org/10.1093/cid/ciw563
11. *Millon L., Larosa F., Lepiller Q., 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: e95-e101. doi.org/10.1093/cid/cit094
12. *Baldin C., Soliman S.S.M., Jeon H.H., et al.* PCR-based approach targeting mucorales-specific gene family for diagnosis of mucormycosis. *J. Clin. Microbiol.* 2018; 56 (10): e00746-18. doi: 10.1128/JCM.00746-18
13. *Schwarz P., Bretagne S., Gantier J.C., et al.* Molecular identification of zygomycetes from culture and experimentally infected tissues. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44: 340-349. doi.org/10.1128/JCM.44.2.340-349.2006
14. *Bernal-Martínez L., Buitrago M.J., Castelli M.V., et al.* Development of a single tube multiplex real-time PCR to detect the most clinically relevant mucormycetes species. *Clin. Microbiol. Infect.* 2013; 19 (1): E1-E7. doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03976.x
15. *Buitrago M.J., Aguado J.M., Ballen A., et al.* Efficacy of DNA amplification in tissue biopsy samples to improve the detection of invasive fungal disease. *Clin. Microbiol. Infect.* 2013; 19: 271-277. doi.org/10.1111/1469-0691.12110
16. *Lau A., Chen S., Sorrell T., et al.* Development and clinical application of a panfungal PCR assay to detect and identify fungal DNA in tissue specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45: 380-385. doi.org/10.1128/JCM.01862-06
17. *Hrncirova K., Lengerova M., Kocmanova I., et al.* Rapid detection and identification of mucormycetes from culture and tissue samples by use of high-resolution melt analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48: 3392-3394. doi.org/10.1128/JCM.01109-10
18. *DePauw B., Walsh T.J., Donnelly J.P., et al.* Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clinical Infectious Diseases.* 2008; 46 (12): 1813-1821. doi.org/10.1086/588660
19. *Ullmann A.J., Aguado J.M., Arikan-Akdoglu S., et al.* Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clinical Microbiology and Infection.* 2018; 24 (Suppl 1): e1-e38. doi: 10.1016/j.cmi.2018.01.002.
20. *Interpretive Criteria for Identification of Bacteria and Fungi by Targeted DNA Sequencing*, 2nd Edition. CLSI document MM18. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018: 152 p. Order Code PDF: MM18Ed2E. ISBN Number: 978-1-68440-013-3
21. *Buelow D.R., Gu Z., Walsh T.J., Hayden R.T.* Evaluation of multiplexed PCR and liquid-phase array for identification of respiratory fungal pathogens. *Med. Mycol.* 2012; 50 (7): 775-80. doi.org/10.3109/13693786.2012.666681
22. *Dannaoui E., Schwarz P., Slany M., et al.* Molecular detection and identification of zygomycetes species from paraffin-embedded tissues in a murine model of disseminated zygomycosis: A collaborative European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Fungal Infection Study Group (EFISG) evaluation. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48 (6): 2043-2046. doi: 10.1128/JCM.02319-09
23. *Lengerova M., Racil Z., Hrncirova K., et al.* Rapid detection and identification of mucormycetes in bronchoalveolar lavage samples from immunocompromised patients with pulmonary infiltrates by use of high-resolution melt analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52: 2824-2828. doi.org/10.1128/JCM.00637-14
24. *Cornely O.A., Alastruey-Izquierdo A., Arenz D., et al.* Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Lancet. Infect. Dis.* 2019; 5. doi.org/10.1097/01.HS9.0000563416.43453.d2.

Поступила в редакцию журнала 21.11.19
Рецензент: А.Е. Тараскина



МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК ИЗОЛЯТОВ *MALASSEZIA FURFUR* (С.Р. ROBIN) BAILL

¹Степанова А.А. (зав. лаб.), ¹Богданова Т.В. (ассистент кафедры), ²Родченко Ю.В. (м.н.с.), ²Мелкумян А.Г. (зав. центром лаб. диагностики), ²Любасовская Л.А. (зав. отделом), ¹Игнатьева С.М. (в.н.с.), ¹Алексеев А.Ю. (студент), ¹Гольцева И.С. (лаборант-исследователь), ¹Босак И.А. (с.н.с.), ¹Пчелин И.М. (н.с.)

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова: ¹НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, Санкт-Петербург; ²Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова, Москва, Россия

В настоящей работе с помощью методов световой, трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии изучены особенности микроморфологии дрожжевых клеток 10 изолятов *Malassezia furfur*. Отличительной особенностью преобладающего числа зрелых дрожжевых клеток было наличие на поверхности клеточных стенок внеклеточного липидного «гало», ранее описанного для мульти-резистентного к флуконазолу штамма *Candida auris*.

Ключевые слова: *Malassezia furfur*, микроморфология, ультраструктура, электронная микроскопия, внеклеточное липидное «гало»

MORPHOLOGICAL PECULIARITIES OF THE ISOLATES YEAST CELLS *MALASSEZIA FURFUR* (С.Р. ROBIN) BAILL

¹Stepanova A.A. (head of the laboratory), ¹Bogdanova T.V. (assistant of the department), ²Rodchenko J.V. (junior scientific researcher), ²Melkumyan A.G. (head of the center of lab. diagnostics), ²Lyubasovskaya L.A. (head of the department), ¹Ignatieva S.M. (leading scientific collaborator), ¹Alekseev A.U. (student), ¹Goltzeva I.S. (laboratory assistant), ¹Bosak I.A. (senior scientific collaborator), ¹Pchelin I.M. (scientific researcher)

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov: ¹Kashkin Research Institute of Medical Mycology, St. Petersburg; ²National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after academician V.L. Kulakov, Moscow, Russia

In the present paper by the means of methods of the light, transmission and scanning electron microscopy the peculiarities of micromorphology of 10 isolates of *M. furfur* were studied. The characteristic property of the mature yeast cells of *M. furfur* were the existence of the extracellular lipidic "galo" on its surfaces which earlier was described for the multi-resistant to fluconazole strain of *Candida auris*.

Key words: *Malassezia furfur*, micromorphology, ultrastructure, electron microscopy, extracellular lipidic "halo"

* Контактное лицо: Степанова Амалия Аркадьевна, e-mail: amaliya.stepanova@szgmu.ru

ВВЕДЕНИЕ

Malassezia furfur (С. Р. Robin) Bail. – это липофильные и/или липидозависимые микромицеты, представители нормального микробиома кожи человека [1-3]. У людей этот вид дрожжей выделяется из соскобов эпидермальных чешуек разных эпителиев, ногтей, волос, из носовой полости, а также из крови, мочи, кала, чешуек скальпа, лица, рук, ног, а также из ногтей, глаз, носовой полости и др. Данный вид ассоциирован с себорейным [4] и атопическим дерматитом, псориазом [5], кератитом [6], блефаритом [6], он также вызывает отрубевидный лишай [2], фолликулит [7], диссеминированные инфекции у пациентов с нейтропенией [8] и др. В последнее десятилетие довольно часто диагностируют гематогенные инфекции, обусловленные *M. furfur*. Этот микромицет может быть причиной катетер-обусловленной инфекции у иммунокомпрометированных пациентов [3].

Цель настоящей работы – изучить морфологию *Malassezia furfur* с помощью современных методов световой, трансмиссионной (ТЭМ) и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследовали 10 изолятов (1-18, 2-18, 3-18, 4-18, 5-18, 6-18, 7-18, 8-18, 9-18, 10-18) *Malassezia furfur* (С.Р. Robin) Bail, выделенных от 9 новорожденных, находившихся на лечении в реанимационных отделениях Центра акушерства и гинекологии им. В.Л. Кулакова в 2017-2018 гг. Из них четверо детей были из отделения реанимации и интенсивной терапии новорожденных и пятеро – из отделения хирургии, реанимации и интенсивной терапии. Все пациенты получали парентеральное питание липидными растворами. Изоляты были выделены из следующих биосубстратов: кал, моча, кровь, а также в одном случае – из аутопсийного материала (кал, кровь).

Изоляты выращивали в течение 7 суток на агаризованной модифицированной питательной среде Лиминга-Нотман (*mLNA*) при +32 °С. Видовую принадлежность определяли молекулярно-генетическим методом по протоколу CLSI M18. Выделяли ДНК по протоколу: в пробирку емкостью 1,5 мл с 450 мкл лизирующего буфера (20 мМ ТрисНCl pH 8,0, 5 мМ ЭДТА pH 8,0, 100 мМ NaCl, 1% SDS) на кончике наконечника дозатора вносили небольшой участок колонии гриба, добавляли 2 стеклянных шарика (5 мм) и встряхивали на гомогенизаторе Bertin Precellys в течение 30 сек. Затем добавляли протеиназу К до концентрации 50 мкг/мл и инкубировали при +65 °С два часа в термостате. К лизату добавляли равный объем смеси хлороформа и изоамилового спирта (24:1), после чего перемешивали, инкубировали при комнатной температуре с периодическим встряхиванием на протяжении 10 минут и центрифугировали 10 минут при 9000 g. В новую пробирку отбирали верхнюю фазу и добавляли 0,1 объема 3 М ацетата натрия и 2 объема этилового спирта. После этого пробирку инкубировали в течение 2 часов при температуре - 20 °С. Далее ее центрифугировали 10 минут при 20000 g при +4 °С, осадок пипетировали (или вортексировали) для отмывки от солей в 0,5 мл 70% этилового спирта при +4 °С, центрифугировали 10 минут при +4 °С. Отмывку проводили повторно, а затем высушивали ДНК на воздухе. Осажденную ДНК

растворяли в 50 мкл H₂O. Для определения вида гриба в термодиклере C1000 Touch (Bio-Rad, США) амплифицировали регион ITS рибосомной ДНК, а затем выполняли секвенирование ДНК на приборе ABI 3500 (Thermo Fischer Scientific, США).

Культуры гриба фотографировали в стереомикроскопе Zeiss Stem 2000. Микроморфо-логию дрожжевых клеток изучали на флуоресцентном микроскопе Axio-images.Z1 (Carl Zeiss) с использованием оптики Номарского.

Для изучения ультраструктуры гриба в ТЭМ применяли метод негативного контрастирования интактных дрожжевых клеток фосфорно-вольф-рамовой кислотой (ФВК). Для этого микробиологической петлей небольшую часть колонии гриба перемещали в пластиковые пробирки для микропроб типа Эппендорф (1,5 мл) с физиологическим раствором (0,1 мл) на 10 минут. Затем на электронно-микроскопические медные сетки диаметром 3 мм, покрытые прозрачной формваровой подложкой-пленкой, с помощью дозатора наносили взвесь клеток культур в физиологическом растворе. Через пять минут контакта часть физиологического раствора отсасывали фильтровальной бумагой, при этом на подложке оставался анализируемый материал. Далее на сетки с материалом на 10 минут наносили 1,5% раствор ФВК (рН 6,7), который негативно окрашивал объекты в черный цвет и позволял четко выявить детали их ультраструктурной организации. Сетки после окрашивания ФВК промывали дистиллированной водой, перемещали на сухую фильтровальную бумагу, расположенную в чашке Петри, высушивали 10 минут и исследовали в ТЭМ Jem 100-SX (Jeol, Япония).

Для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) фрагменты колоний гриба (штаммы 1-18, 2-18, 5-18, 7-18, 8-18, 9-18, 10-18) с питательной средой фиксировали в 3% растворе глутаральдегида 3 часа, затем пост-фиксировали в течение ночи в 1% растворе осмиевой кислоты, обезвоживали в серии спиртов, высушивали при критической точке на приборе HCP-2 15 минут, после чего образцы напыляли золотом и изучали в микроскопе JSM 35 (Джеол, Токио, Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследованные 10 изолятов были идентифицированы с помощью ДНК-секвенирования как *Malassezia furfur*.

Характеристика колоний. Рост колоний при посевах штрихом отмечали через 7 суток культивирования на среде Лиминга-Нотман при +32 °С (Рис. 1 а). Края колоний слегка приподнятые, мелко волнистые, цвет – кремовый, с оттенками желтого разной степени интенсивности.

Световая микроскопия. Размер (1,5-4,5 x 2,5-6,5 мкм) и форма (Рис. 1 б) дрожжевых клеток сильно варьировали. Отметим, что ввиду низкой разрешающей способности световой микроскопии воротничок дрожжевых клеток не выявлялся. Почкующиеся клетки встречались часто; почкование однополярное. Диаметр почки меньше такового материнской клетки. Гифальные элементы отсутствовали.

Трансмиссионная и сканирующая электронная микроскопия. Колонии *M. furfur* на малом увеличении сканирующего электронного микроскопа имели вид

многочисленных, невысоких, плотно расположенных «подушек» разной формы и размеров с четко очерченными краями (Рис. 2 а). Поверхность таких «подушек» ровная, плотность расположения дрожжевых клеток высокая (Рис. 2 е). Для зрелых дрожжевых клеток колоний исследованных изолятов *M. furfur* характерно сильное варьирование размеров и формы (Рис. 1 в, 2 е), что свойственно данному виду [1-3]. При использовании метода негативного контрастирования наблюдали, что дрожжевые клетки в изученных колониях могли располагаться одиночно, в небольших группах по 2-3 (Рис. 1 и, п) либо формировать более крупные скопления (Рис. 1 в). Последняя микрофотография наглядно демонстрирует существенные различия в размерах и форме зрелых дрожжевых клеток культуры изученного изолята. Форма клеток могла быть округлой (Рис. 1 г), эллипсоидной (Рис. 1 д), цилиндрической (Рис. 1 е), яйцевидной (Рис. 1 ж) и др. Рисунки 1 г-ж (метод негативного контрастирования) и 2 е (сканирующая электронная микроскопия) показывают разнообразие размеров и форм, диаметра рубчика, степени выраженности воротничка и его топографии в дрожжевых клетках, а также размеров и формы формируемых почек. У некоторых дрожжевых клеток при образовании почки отмечали сужение зоны аннекции (Рис. 1 ж, стрелки).

При контрастировании ФВК отмечали, что на поверхности многих зрелых и почкующихся дрожжевых клеток *M. furfur* присутствовали скопления внеклеточного липидного «гало» умеренной электронной плотности. По степени развития последнего изоляты можно разделить на три группы. Первую группу составили три изолята (1-18, 8-18, 10-18, 30% от общего числа изученных), на поверхности клеток которых наблюдали наиболее обильные скопления внеклеточного липида (Рис. 1 з-к, стрелки; 2 б-г, стрелки). Толщина внеклеточного липидного «гало» варьировала от 0,6 до 0,9 мкм. Он мог равномерно покрывать поверхность клеточной стенки (Рис. 1 з-к; 2 в, стрелка) либо частично (Рис. 2 б, г, стрелки). Сканирующая электронная микроскопия показала, что поверхность внеклеточного липида могла быть гладкой (Рис. 1 в, г, стрелки) или иметь довольно многочисленные углубления (Рис. 2 б, стрелка). В почкующихся дрожжевых клетках он мог располагаться одновременно на материнской клетке и почке (Рис. 1 з, стрелки; 2 з, стрелки) либо только на последней (Рис. 1 л, стрелка).

Вторую группу также составляли три изолята (5-18, 6-18, 9-18, 30% от общего числа изученных), на поверхности клеток культур которых степень развития внеклеточного липида была умеренной. Обычно скопления внеклеточного липида на поверхности разновозрастных (Рис. 1 м, стрелки) и почкующихся (Рис. 1 н) клеток данных изолятов *M. furfur* имели вид отдельных дискретных очагов (Рис. 2 д, ж, стрелки) толщиной от 0,4 до 0,6 мкм.

И наконец, в третью группу вошли четыре изолята (2-18, 3-18, 4-18, 7-18, 40% от общего числа изученных). Степень развития внеклеточного липида на поверхности дрожжевых клеток здесь была наименьшей (Рис. 1 о, п, стрелки; 2 з, и, стрелки). Толщина внеклеточного липида варьировала от 0,2 до 0,3 мкм.

При изучении колоний изолятов *M. furfur* (малые увеличения сканирующего микроскопа) выявили на-

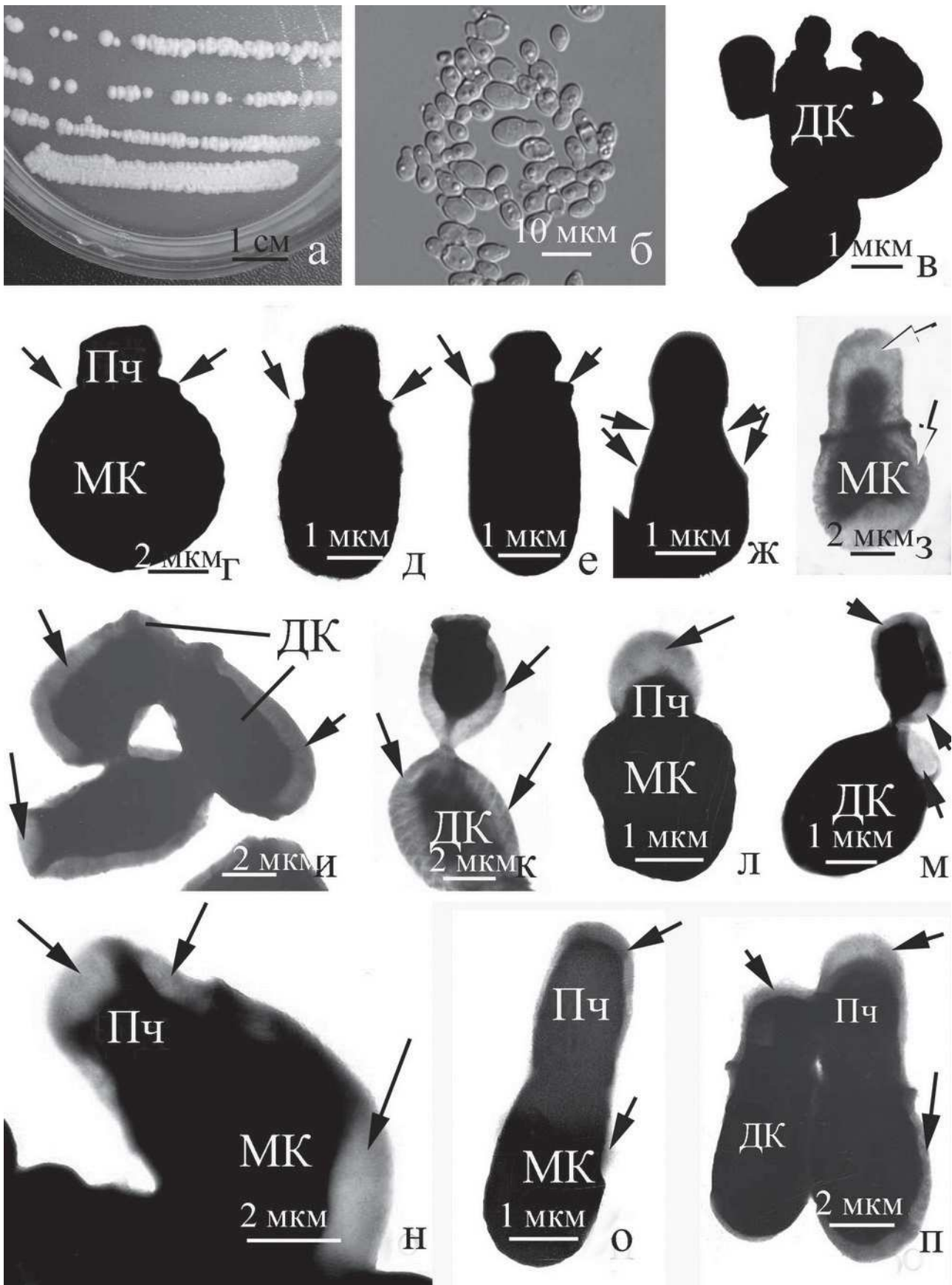


Рис. 1. а – колонии *M. furfur* (посев штрихом) после 7 суток роста на среде Лиминга-Нотман, б – дрожжевые клетки в световом микроскопе (оптика Номарского), в-п – трансмиссионная электронная микроскопия дрожжевых клеток. Условные обозначения: В – воротничок; ДК – дрожжевая(ые) клетки; МК – материнская клетка, Пч – почка. а, б – изолят 5-18, в, д, – изолят 5-18, г – изолят 2-18, е – изолят 3-18, ж, з – изолят 1-18, и – изолят 8-18, к – изолят 10-18, л – изолят 8-18, м – изолят 6-18, н – изолят 9-18, о – изолят 4-18, п – изолят 7-18.

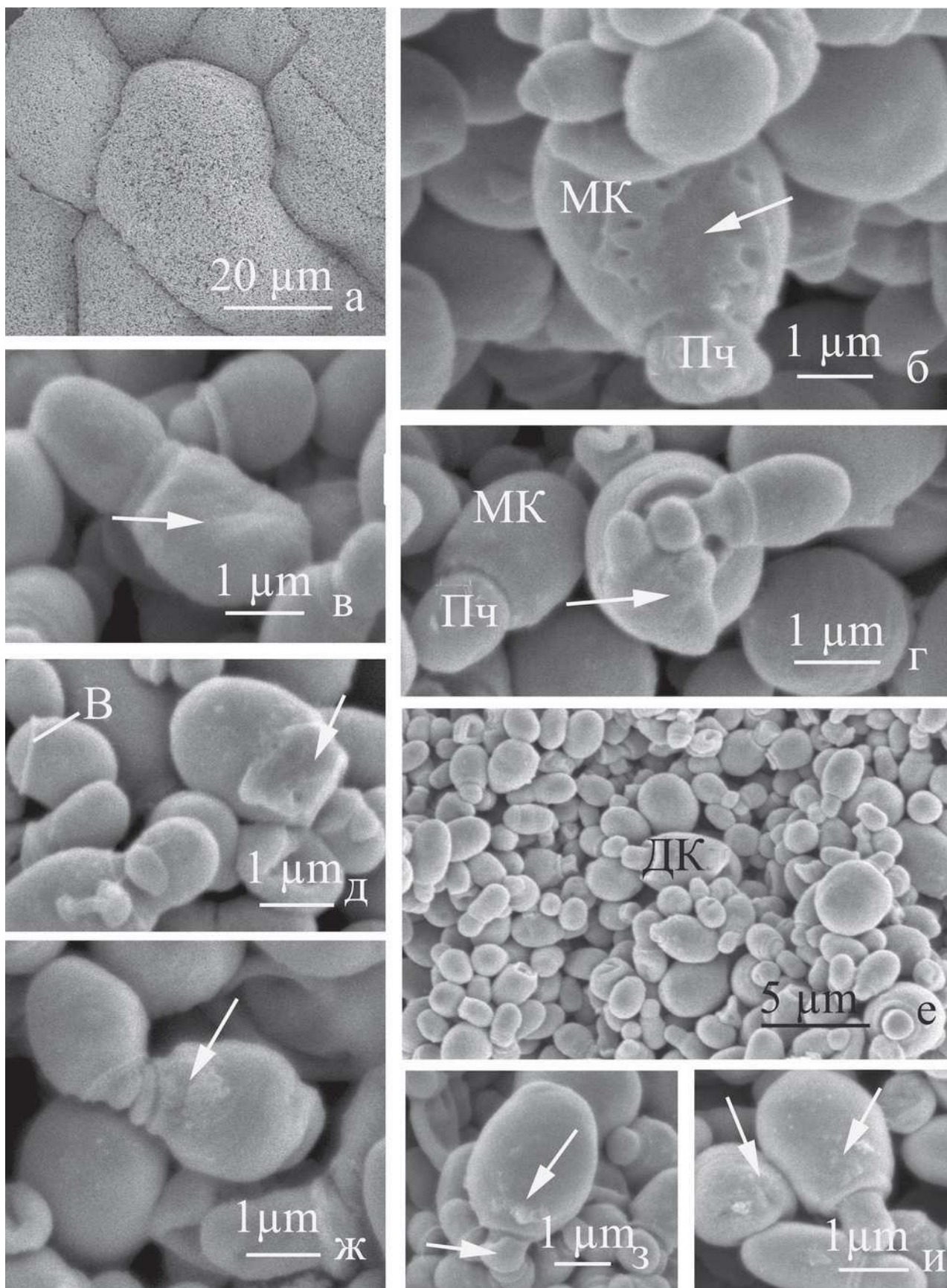


Рис. 2. *M. furfur* в сканирующем электронном микроскопе: а, б – изолят 1-18, в – изолят 8-18, г – изолят 10-18, д – изолят 5-18, е – изолят 2-18, ж – изолят 9-18, з – изолят 4-18, и – изолят 7-18.

личие специфической архитектуры их пространственного строения. Можно ожидать, что для колоний других видов этого рода будет характерна другая морфология колоний, подобно тому, как это впервые было показано нами на примере культур разных видов рода *Candida* [9].

По данным настоящей работы установлено, что для зрелых дрожжевых клеток *M. furfur* характерно присутствие внеклеточного «гало», развитого у разных изолятов в разной мере. Ранее аналогичная особенность была отмечена для зрелых дрожжевых клеток, ростковых трубок и хламидоспор мульти-резистентных штаммов *Candida auris* [10]. Для сравнения, в качестве контроля мы провели анализ снимков, представленных в ряде работ по изучению ультраструктуры дрожжевых клеток культур других штаммов *M. furfur* как методами сканирующей, так и трансмиссионной электронной микроскопии, который показывает отсутствие отложений внеклеточного липидного «гало» на поверхности их клеточных стенок [11 и др.]. При изучении клеточной стенки культуральных форм *M. furfur* обнаружили наличие у них толстой электроноплотной многослойной клеточной стенки, неравномерно покрытой фибриллярным материалом, отложения внеклеточных липидов на представленных в данной работе микрофотографиях, отсутствовали. Пока неизвестно – характерно ли выявленное липидное «гало» исключительно для *M. furfur* либо при определенных обстоятельствах оно может быть атрибутом дрожжевых клеток других видов этого рода. Возмож-

но, что внеклеточное липидное «гало» представляет барьер как для проникновения метаболитов клеток макроорганизма, так и антимикотиков.

Наличие отложений внеклеточного липида существенно усиливает адгезивные свойства клеток и может приводить к формированию устойчивых биопленок. Вероятно, что при длительном хранении и пересеве культур изученных изолятов степень развития внеклеточного липида может существенно сократиться или полностью исчезнуть, тогда как в тканях или крови макроорганизма степень развития внеклеточного липидного «гало» будет намного выше.

Актуальным представляется продолжить начатые исследования с целью выяснения строения дрожжевых клеток использованных в настоящей работе изолятов *M. furfur* при культивировании их на твердых питательных средах с добавлением антимикотиков.

ВЫВОДЫ

1. При световой микроскопии *M. furfur* обнаружены преимущественно дрожжевые клетки с монополярным, перкурентным почкованием. Вегетативный мицелий отсутствует. Дрожжевые клетки имеют размеры 1,5-4,5 x 2,5-6,5 мкм. В основном форма клеток округлая, реже – удлинённая. В апексе дрожжевых клеток присутствует широкий рубчик, окруженный воротничком.

2. С помощью метода негативного контрастирования ФВК и СЭМ выявили на поверхности интактных клеток отложения внеклеточного липида, развитого в разной степени.

ЛИТЕРАТУРА

1. de Hoog G.S., Guarro J., Gené J., et al. Atlas of clinical fungi (e-version). Westerdijk Institute / Universitat Rovira i Virgili, 2019. Utrecht / Reus. www.clinicalfungi.org/
2. Boekhout T., Guého E., Maysers P., Velegaki A. *Malassezia* and the skin. Berlin: Springer, 2010: 319 p.
3. doi.org/10.1007/978-3-642-03616-3
4. Богданова Т.В., Елинов Н.П. Морфолого-физиологические характеристики дрожжевых организмов - *Malassezia* species (Malassez, 1874) Baillon, 1889 (обзор). Проблемы медицинской микологии. 2011; 13 (1): 3-12. [Bogdanova T.V., Elinov N.P. Morfoloogo-fiziologicheskie harakteristiki drozhzhevyyh organizmov - *Malassezia* species (Malassez, 1874) Baillon, 1889 (obzor). Problemy medicinskoj mikologii. 2011; 13 (1): 3-12 (In Russ)].
5. Wikramanayake T.C., Borda L.J., Miteva M., Paus R. Seborrheic dermatitis – looking beyond *Malassezia*. *Exper. Dermatol.* 2019; 28: 991-1001. doi.org/10.1111/exd.14006
6. Jagielski T., Rup E., Ziółkowska A., et al. Distribution of *Malassezia* species on the skin of patients with atopic dermatitis, psoriasis, and healthy volunteers assessed by conventional and molecular identification methods. *BMC Dermatology.* 2014; 14: 2-15. doi.org/10.1186/1471-5945-14-3
7. Ledbetter E.C., Jennifer K. Starr J.R. *Malassezia pachydermatis* keratomycosis in a dog. *Med. Mycol. Case. Rep.* 2015; 10: 24-26. doi.org/10.1016/j.mmcr.2016.01.001
8. Rubenstein R.M., Malerich S.A. *Malassezia* (pityrosporum) folliculitis. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* 2014; 7 (3): 37-41. PMID: 24688625 PMCID: PMC3970831
9. Walsh T.J., Gamaletsou M.N. Treatment of fungal disease in the setting of neutropenia. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 2013; 1: 423-427. doi.org/10.1182/asheducation-2013.1.423
10. Елинов Н.П., Васильева Н.В., Степанова А.А. и др. Краткий атлас медицински значимых микромицетов рода *Candida*. СПб: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2013: 73 с. [Elinov N.P., Vasil'eva N.V., Stepanova A.A. i dr. Kratkij atlas medicinski znachimyyh mikromicetov roda *Candida*. SPb: Izd-vo SZGMU im. I.I. Mechnikova, 2013: 73 с. (In Russ)].
11. Vasilyeva N.V., Stepanova A.A., Chilina G.A., et al. Cytological features of *Candida auris* yeast cells explaining their multi-resistance. *Problems in med. mycology.* 2018; 20 (3): 3-7. mycology.szgmu.ru/files/№3_2018.pdf
12. Kim S.-H., Kim K.-S., Ko H.-C., Kwon K.-S. The effects of detergents on the morphology and immunomodulatory activity of *Malassezia furfur*. *Annals of Dermatology.* 2009; 21 (2): 130-135. doi.org/10.5021/ad.2009.21.2.130

Поступила в редакцию журнала: 23.10.19

Рецензент: Т.С. Богомолова



МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ ПОЛИ- МОРФИЗМ *SCOPULARIOPSIS* *BREVICAULIS* – ВОЗБУДИТЕЛЯ ОНИХОМИКОЗА, ПРОБЛЕМ- НОГО ДЛЯ ТЕРАПИИ

Цурупа Е.Н. (врач-дерматовенеролог), Рябинин И.А. (м.н.с., ассистент кафедры)*, Котрехова Л.П. (доцент кафедры), Чилина Г.А. (зав. лаб.), Васильева Н.В. (директор НИИ, зав. кафедрой), Разнатовский К.И. (зав. кафедрой)

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова: НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина; кафедра медицинской микробиологии; кафедра дерматовенерологии, Санкт-Петербург, Россия

В работе представлена развернутая морфологическая характеристика *Scopulariopsis brevicaulis*, полученная на выборке из 9-ти штаммов. Исследование провели с помощью 4-х подходов: визуального наблюдения за динамикой роста, микроскопии в проходящем свете, стереомикроскопии непрозрачной части колонии и мицелия на стекле в отраженном свете. Все наблюдения выполнили на интактных пробирочных культурах, позволяющих регистрировать морфологическую организацию гриба без повреждений и артефактов. Выявили выраженный, особенно на микроскопическом уровне, полиморфизм штаммов, а также появление у них адаптивных особенностей морфогенеза, включая образование гифальных анастомозов, «гнездную» архитектуру поверхности колоний и конденсацию гиалиновых масс вокруг субстратных гиф. Полученные сведения дополняют типовое описание вида *S. brevicaulis* и могут быть использованы в культуральной диагностике онихомикоза и иных форм скопуляриопсидоза.

Ключевые слова: онихомикоз, полиморфизм, резистентность к антимикотикам, стереомикроскопия, *Scopulariopsis brevicaulis*

MORPHOLOGICAL POLYMORPHISM OF *SCOPULARIOPSIS* *BREVICAULIS* – THE CAUSE AGENT OF ONYCHOMICOSIS, PROBLEMATIC FOR THERAPY

Tsurupa E.N. (dermatologist), Ryabinin I.A. (junior scientific collaborator, assistant of the department), Kotrekhova L.P. (associate professor), Chilina G.A. (head of the laboratory), Vasilyeva N.V. (director of the Institute, head of the department), Raznatovsky K.I. (head of the department)

North-West State Medical University named after I.I. Mechnikov: Kashkin Research Institute of Medical Mycology; Department of Medical Microbiology; Department of Dermatology and Venerology, St. Petersburg, Russia

This report presents the detailed morphological characteristic of *S. brevicaulis* obtained from the sample of 9 strains. The study was carried out with using 4 approaches: visual observation of the growth dynamics, microscopy in transmitted light, stereomicroscopy of the opaque part of the colony and mycelium on glass in reflected light. All observations were performed on intact test tube cultures, allowing the morphological organization of the fungus to be recorded without damage and artifacts. Expressed polymorphism of strains, especially at the microscopic level, was revealed, as well as the appearance of adaptive features of morphogenesis in them, including the formation of hyphal anastomoses, the «nested»

* Контактное лицо: Рябинин Игорь Андреевич,
e-mail: Igor.Ryabinin@szgmu.ru

architecture of the colonies' surfaces and the condensation of hyaline masses around substrate hyphae. The obtained data supplement the typical description of *S. brevicaulis* and can be used in the cultural diagnosis of onychomycosis and other forms of scopulariopsidosis.

Key words: antimycotic resistance, onychomycosis, polymorphism, *Scopulariopsis brevicaulis*, stereomicroscopy

ВВЕДЕНИЕ

Scopulariopsis brevicaulis (Saccardo) Bainier, 1907 (скопуляриопсис короткостебельчатый) – вид условно-патогенных гиалогифомицетов, которые в медицинской практике известны как возбудители онихомикоза, иногда – отомикоза, а также инвазивных микозов у пациентов с иммуносупрессией [1-5]. Более ранние сообщения о скопуляриопсидозах человека представили Martin-Scott I. (1953), Franks G.A. (1956) и Tosti A. (1996). Среди представителей рода *S. brevicaulis* выделяют от человека наиболее часто. Как возбудитель поражения ногтей он представляет ряд проблем, актуальных для клинициста и микробиолога. В связи с тем, что это условно-патогенный грибок, при выявлении культуры этиологическую значимость изолята следует доказывать, в том числе количественным и повторным высевом [5]. Для экспресс-обнаружения *S. brevicaulis* в материале ногтевых пластин, наряду с другими возбудителями онихомикоза, целесообразно использовать мультиплексную ПЦР-тест-систему [6]. Терапия скопуляриопсидного онихомикоза отличается большой продолжительностью в сравнении со стандартной терапией [7].

Изоляты *S. brevicaulis*, для которых определяли чувствительность к противогрибковым препаратам, характеризуются высокими значениями минимальных ингибирующих концентраций триазолов, тербинафина, флуцитозина и амфотерицина В, как сообщают Cuenca-Estrella M. (2003) и ряд других авторов [8, 9]. Молекулярные механизмы антимикотической устойчивости скопуляриопсисов до сих пор не выявлены. Решение этого вопроса тормозит то обстоятельство, что у *S. brevicaulis* подавляющее большинство изученных локусов генома являются таксономическими маркерами (ITS, TEF1-α, β-тубулин), используемыми для экспертной идентификации, но не дающими представление о биохимических особенностях гриба. Исторически *S. brevicaulis* ранее относили к роду *Penicillium* (*P. brevicaulis*), однако отсутствие у скопуляриопсисов типичных кистевидных конидиеносцев и открытие аннелидного конидиогенеза стали весомыми аргументами для изменения таксономического положения.

Аннелиды по структуре схожи с фиалидами аспергиллов и пенициллов, отличия проявляются на этапе отделения конидии: наиболее базальная часть клеточной стенки конидии откалывается от нее и в виде кольца остается на коларетте аннелиды. С высвобождением каждой последующей конидии аннелиды, таким образом, мерно увеличиваются в длину. Аннелиды могут располагаться одиночно либо формировать на мицелии небольшие кластеры, похожие на примитивно организованную одномутовчатую, часто «сидящую» на мицелии кисть. Цепочки аннелоконоидий обычно не очень протяженные. У конидий отчетливо заметен контур с «обрубленной» частью – зоной аннелиации. Скопуляриопсис является своего рода «хрестоматийным» примером аннелидного конидиогенеза, который приводят во многих руководствах по общей

микологии [10, 11]. Другие микромицеты с аналогичным способом образования спор известны в значительно меньшей степени (*Cephalotrichum*, *Pithoascus*, *Annellosporium*, *Melanconium*, *Spilocaeca*, *Annellophora* и другие).

S. brevicaulis – гетероталлический гриб, при скрещивании подходящих штаммов-партнеров противоположного знака образуются открытые сосудоподобные плодовые тела типа перитециев; телеоморфу именуют *Microascus brevicaulis*.

Штаммы *S. brevicaulis* в настоящее время не находят практического применения, но ранее, по данным П.Н. Кашкина, эти грибы использовали в криминалистике при подозрении на отравление мышьяком. На обычных микологических средах культура *S. brevicaulis* обладает слабовыраженным плесневым ароматом, а при наличии в среде мышьяка (из экстракта пищевого продукта или тканей трупа) гриб источает сильный чесночный запах.

Описание вида *S. brevicaulis* помещено авторами в ряд определителей мицелиальных грибов, в том числе и для диагностических целей [12, 13]. Тем не менее, в силу морфологического полиморфизма, использование только эталонных описаний и снимков типовых культур для идентификации микромицетов часто приводит к ошибкам в их определении. В связи с этим обстоятельством изучение полиморфизма штаммов проблемных микромицетов внесет существенный вклад в решение этой проблемы.

Цель исследования – определение вариантов формирования колоний и элементов микроскопического строения у коллекционных штаммов *S. brevicaulis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучено 9 штаммов *S. brevicaulis* из Российской коллекции патогенных грибов (РКПГ F-165, 980, 1084, 1111, 1167, 1288, 1297, 1412, 1597). Реидентификацию штаммов проводили с использованием определителя [12], электронной экспертной системы Института биологического разнообразия грибов им. А. Вестердик [14], а также методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии экстракта из мицелия [15].

Субкультивирование штаммов осуществляли в пробирках на модифицированной агаризованной питательной среде Сабуро по Эммонсу с добавлением 5 г/л дрожжевого экстракта при 28 °С до 12 суток. Фотофиксацию макроскопической картины роста проводили на 5-е, 8-е и 11-е сутки инкубации.

Микроскопическое исследование интактных культур выполняли в «проходящем свете» с помощью микроскопа МБР-1 (ЛОМО, Россия) с фокусировкой на воздушном мицелии, обрастающем стекло, а также в отраженном свете с помощью стереомикроскопа Stemi 2000-C с осветителем KL 1500 LCD (Carl Zeiss Jena, Германия) с фокусировкой на воздушном мицелии (как выше) и на уровне поверхности колонии. Для фотосъемки колоний и элементов микроскопического строения использовали камеру Presto T55 (Rekam, Канада).

Цифровую обработку фотографий осуществляли с использованием редакторов XnView 2.35 и GIMP 2.8.6.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты MALDI-идентификации штаммов.

Все изученные штаммы успешно идентифицировали как «*S. brevicaulis*» со следующими показателями: кате-

гория идентификации «В», коэффициенты достоверности идентификации (Score Values) составили $SV_{F-165}=1,897$; $SV_{F-980}=1,780$; $SV_{F-1084}=2,023$; $SV_{F-1111}=1,805$; $SV_{F-1167}=1,765$; $SV_{F-1288}=1,911$; $SV_{F-1297}=1,812$; $SV_{F-1412}=1,934$; $SV_{F-1597}=1,885$.

Внешний вид колоний *S. brevicaulis*. На раннем этапе наблюдения (4-е сутки) заметили, что колонии распространяются по поверхности агарового скоса у разных штаммов неодинаково. Данный феномен может быть связан как с разной скоростью роста штаммов, так и с неравным размером фрагментов агаровой культуры, взятых для посева, и соотношений содержания жизнеспособного мицелия и конидий в таких фрагментах. Колонии преимущественно пушистые, тускло-белые. Обратная сторона почти не окрашена, желтовато-кремовая.

На 8-е сутки (Рис. 1А) колонии максимально покрывают агаровый блок, оттенок их поверхности варьирует от тускло-белого до белесо-буровато-коричневого, поверхность – от бархатистой до войлочной. Белый воздушный мицелий покрывает культуры либо равномерно, либо больше в центральной части, либо развит сильнее при переходе культуры к росту со скоса среды на столбик агара. Рверзум окрашен слабо, варьирует от бело-желтоватого до бело-коричневатого. С обратной стороны видно, как мицелий заполняет трещины в слое агара. В последующем наблюдении на 11-е сутки картина роста меняется слабо, колонии наиболее активно споронносящих штаммов становятся темнее, а реверзум приобретает более бурый оттенок.

Поверхность колоний *S. brevicaulis*, наблюдаемая при стереомикроскопии, имеет разнообразное строение в зависимости от степени развития воздушного мицелия и его пространственных взаимоотношений с участками развитого споронношения (Рис. 1А, где **sit** – участок интенсивного споронношения, **sns** – участок «гнездовой» поверхности).

У штаммов, претерпевших наиболее длительный период музейного хранения, белый аспорогенный воздушный мицелий на поверхности колонии преобладает, а сама колония имеет войлочную консистенцию. Срединная часть колонии более возвышенная, на краю агарового скоса – более разреженная. Рисунок поверхности имеет вид сложной разнопетливой сети из неправильно переплетенных гиф либо можно видеть более направленное распространение магистральных гиф по радиусу колонии. В иных случаях поверхность колонии отличается наличием ячеистых углублений.

У культур более позднего поступления (на музейное хранение), наряду с высоким белым воздушным мицелием, заметны более пологие коричневатые участки развитого споронношения. В одних случаях они просматриваются через ватообразные массы воздушных гиф, в других – полностью открыты для наблюдателя. Также возможно проступание участков споронношения среди слоя воздушного мицелия в форме «каньона». У сильно споронносящих культур области сосредоточения аннелид расположены больше по периферии, перемежаются с мелкими образованиями из воздушного мицелия в форме гифальных тяжей или компактно спутанных гиф. Открытые участки споронношения имеют мелкогранулярную текстуру.

При **стереомикроскопии культур в отраженном свете** мицелий, аннелиды и цепи конидий обладают

ярко выраженной блёскостью (Рис. 2).

В месте перехода культуры с вершины агарового скоса на стекло видны протяженные гифы, выходящие из стромы колонии под острыми углами к оси пробирки, эти гифы несут кластеры из аннелид, которые образуют спутывающиеся цепи аннелоконидий. В дистальных отделах такие кластеры меньше и образуются более разреженно.

Мицелий, обрастающий стекло, имеет вид островков разнопетливой гифальной сети, которые местами соединяются рядами гиф почти параллельного расположения. В той части мицелия, обрастающей стекло, которая приближена к агаровому скосу, большие группы гиф отличаются наличием сильно утолщенных оболочек. Визуально такие оболочки состоят из некой аморфной гиалиновой субстанции (материал клеточной стенки? конденсация продуктов метаболизма культуры?). Часть мицелия на стекле, особенно в наиболее удаленных от агаровой культуры фрагментах, лишена аннелид.

Спороносный аппарат имеет разнообразную архитектуру. Аннелиды располагаются одиночно, рядами с унилатеральным и супротивным отхождением от конидиеносной гифы, а также в компактных кластерах. Аннелоконидии формируются в виде правильных цепочек почти прямых или извитых, иногда в виде сученной массы. Из кластеров аннелид образуется подобие рыхлой колонки или сильно спутанные конгломераты аннелоконидий.

Картина микроскопии мицелия, обрастающего поверхность стекла, в проходящем свете, показана на рисунке 1Б, где обозначены: **mh** – магистральные гифы, **ah** – гифы-«анастомозы», **lb** – латеральные ветви, **ac** – кластеры аннелид, **sa** – одиночные аннелиды, **vm** – стекловидные массы вокруг гиф, **iac** – объединение кластеров аннелид (примитивный конидиеносец), **sh** – спиральные гифы, **twh** – тонкостенные гифы, **slf** – звездчатые фигуры из гиф.

«Магистральные» гифы распространяются прямо от края культуры на значительном протяжении параллельно друг другу. Между ними под углом формируются гифы-«анастомозы» и неанастомозирующие боковые ветви, часто изогнутые. Аннелиды располагаются на них унилатерально и билатерально одиночно, а также по две и по три. В целом картина строения гриба, выявляемая этой техникой, аналогична наблюдаемой при стереомикроскопии, включая разнообразие положения аннелид, видоизменения мицелия и прочие характеристики. Дополнительно выявили особенности оптических свойств гиф: большинство отличаются довольно развитой клеточной стенкой, но встречаются гифы с сильно уплотненными септами, а клеточной стенкой визуалью тонкой, прозрачной. Гифы-«крючки» в отдаленных участках мицелия на стекле находятся на стебельках либо формируются прямо, как латеральный («сидячий») вырост магистральной гифы. Иногда группы аннелид формируются сосредоточенно на воздушных гифах, которые обращены в полость пробирки. Такие образования можно рассценивать как некое подобие конидиеносцев.

Наблюдали также своеобразные фигуры мицелия: гифы, растущие под разными углами, пересекаются в одной точке (звездчатые фигуры).

ОБСУЖДЕНИЕ

Воздушный мицелий края колонии, изученный у разных штаммов *S. brevicaulis*, находится на различных стадиях дифференцировки: от почти прямо направленных гиф до волнообразных пучков к формированию ямковидной или гнездовой текстуры поверхности. Мы предполагаем, что в последнем случае такая текстура обеспечивает оптимальное дыхание культуры и способность конденсировать атмосферную влагу. Формирующиеся на мицелии, адгезированном на стекле, звездчатые фигуры из пересекающихся гиф, очевидно, являются зачатками объемных «гнезд» воздушного мицелия.

Особый интерес представляет феномен образования более или менее регулярных анастомозов между магистральными гифами на стекле. При росте из основного массива субстратного мицелия наиболее базальные части гиф неизбежно отмирают, а рост обеспечивают апикальные сегменты, которые в отсутствие анастомозов оказались бы разрозненными. Благодаря анастомозом в наиболее отдаленном краевом регионе роста гриба гифы сохраняют способность обмениваться сигнальными и питательными веществами. Логично предположить, что в этом случае их физиологические акты являются согласованными.

Обнаруженные спиральные гифы, вероятно, являются аскогенными. Сосредоточение аморфной стекловидной массы вокруг субстратных гиф можно рассценивать как способ запасаения в мицелии гриба жидкости.

Разнообразие строения конидиогенного аппарата, по-видимому, не имеет какого-либо принципиального биологического значения, а является особенностью наблюдаемого штамма или его культуральной формы.

Свойства изученных в данной работе штаммов сопоставили с ранее проведенными нами наблюдениями за изолятами *S. brevicaulis* из учебной коллекции кафедры медицинской микробиологии (2; на солодовом агаре и картофельном агаре). Последние упомянутые изоляты отличаются более плоскими колониями с бархатистой текстурой и более выраженным коричневым пигментом. Принципиальное отличие в режиме поддержания учебных штаммов от коллекционных связано с более частым их пересевом, по сравнению со штаммами из РКПГ, что, наряду с иным составом питательных сред, определило контрастное своеобразие их субкультур.

Наряду с микологическим аспектом данной работы, следует особо подчеркнуть необходимость насколько возможно полного взаимодействия дерматологов и микробиологов в расшифровке этиологии онихомикоза, обусловленного недерматомицетами.

ВЫВОДЫ

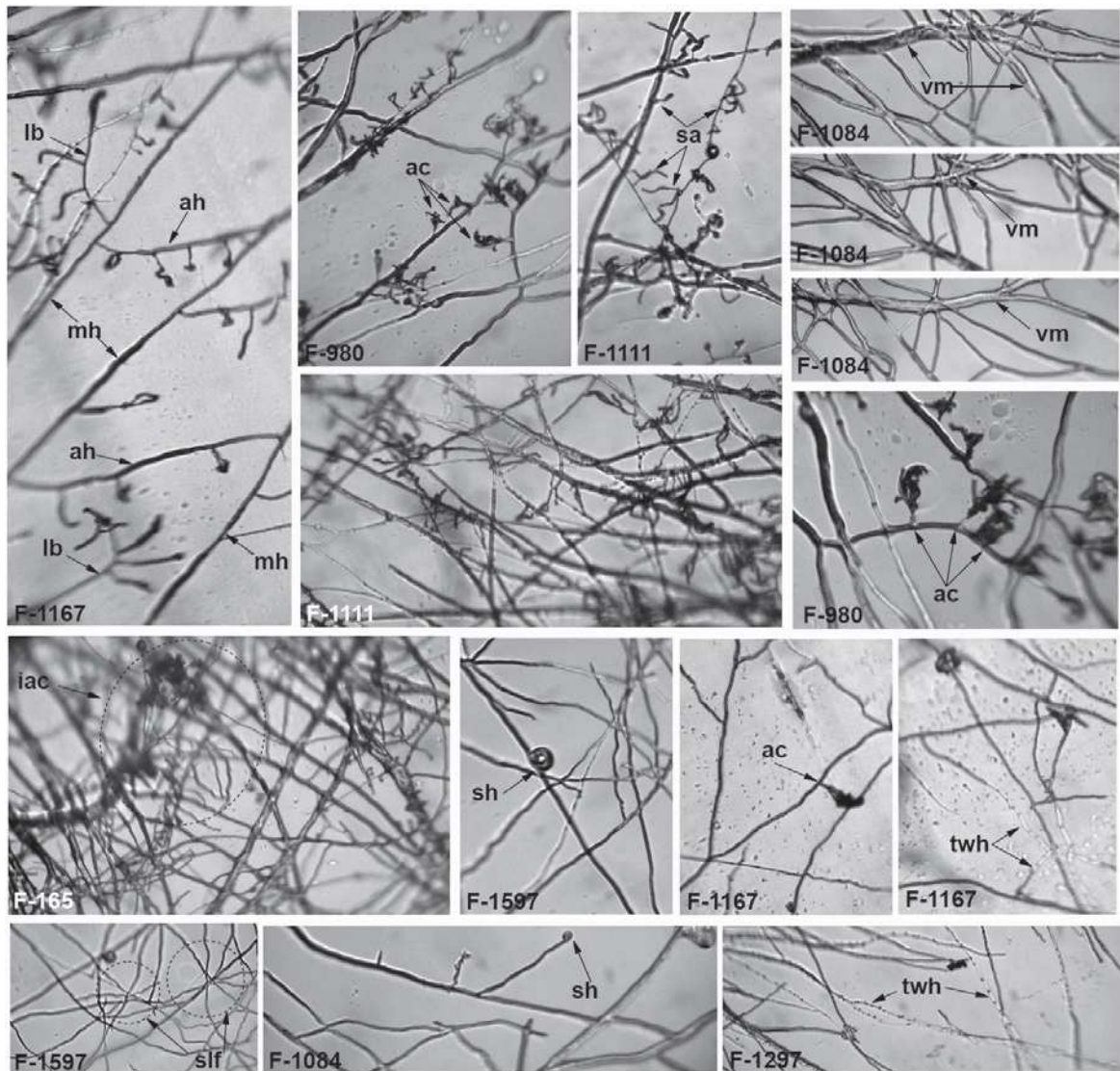
1. Техника стереомикроскопии и микроскопии в проходящем свете позволяют получить тождественные результаты, но при совместном использовании дают возможность наиболее выгодно визуализировать отдельные элементы строения микромицета.

2. Микроскопическое наблюдение микромицета в интактной (пробирочной) культуре позволяет визуализировать его структурную организацию в наиболее естественном состоянии.

3. Штаммы *S. brevicaulis* проявляют морфологиче-



А. Внешний вид культур *Sc. brevicaulis* и стереомикроскопия поверхности.



В. Микроморфология культур *S. brevicaulis* в проходящем свете. Ув. X80.
Micromorphology of *S. brevicaulis* cultures in transmitted light. Mag. X80.

Рис. 1. Внешний вид культур *S. brevicaulis*, особенности их поверхности и элементы строения, видимые в проходящем свете. Обозначения в тексте.

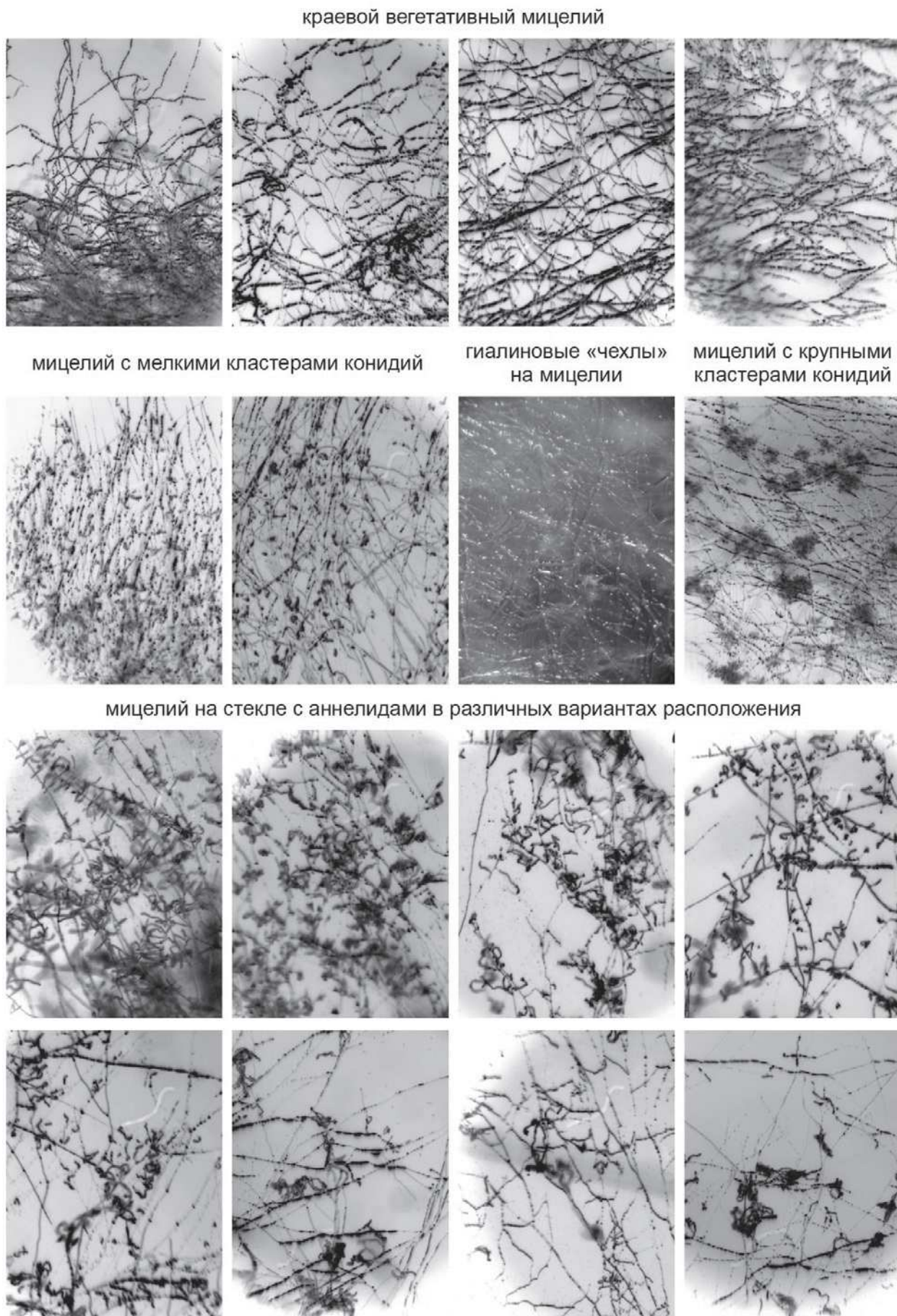


Рис. 2. Элементы строения культур *S. brevicaulis* при стереомикроскопическом наблюдении. Ув. х30. Снимки-негативы.

ский полиморфизм на уровне макро- и микроскопической организации, видимый даже при работе с выборкой небольшой численности.

4. *S. brevicaulis* в культуре осуществляет адаптивные морфологические реакции, направленные, предположительно, на долгосрочное существование в режиме лимита питательных веществ и воды.

5. Гипертрофия воздушного мицелия является отличительной особенностью длительно сохраняемых штаммов *S. brevicaulis* в сравнении со штаммами, часто пересеваемыми и типовыми описаниями видов.

6. Выявленные особенности пространственной организации вегетативного мицелия и органов спороношения *S. brevicaulis* необходимо учитывать при диагностической лабораторной работе с посевами биоматериала, содержащими колонии этого микромицета.

териала, содержащими колонии этого микромицета.

7. Использование MALDI-TOF-масс-спектрометрии экстракта из мицелия, при достаточной квалификации микробиолога и комплектности базы типовых масс-спектро-профилей, позволяет идентифицировать изоляты *S. brevicaulis*, в том числе с необычными морфологическими характеристиками.

ПОДДЕРЖКА РАБОТЫ

Работа выполнена в соответствии с Государственным заданием Минздрава России «Разработка быстрых методов диагностики микозов и молекулярных маркеров резистентности клинически значимых микромицетов к противогрибковым препаратам» (№ АААА-А18-118052990083-4).

ЛИТЕРАТУРА

1. Myung H.L., et al. Onychomycosis caused by *Scopulariopsis brevicaulis*: report of two cases. Ann. Dermatol. 2012 May; 24 (2): 209-213. doi.org/10.5021/ad.2012.24.2.209
2. De Miguel-Martínez I., et al. Necrotising otitis externa due to *Scopulariopsis brevicaulis* in a patient without predisposing factors. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 2018; 36 (1): 62-64. doi.org/10.1016/j.eimce.2017.03.024
3. Iwen P.C., et al. Invasive *Scopulariopsis brevicaulis* infection in an immunocompromised patient and review of prior cases caused by *Scopulariopsis* and *Microascus* species. Med. Mycol. 2012; 50 (6): 561-569. doi: 10.3109/13693786.2012.675629
4. Salmon A., et al. Disseminated *Scopulariopsis brevicaulis* infection in an allogeneic stem cell recipient: case report and review of the literature. Clin. Microbiol. Infect. 2010; 16 (5): 508-512. doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02878.x
5. Кубасова Н.Л., Пупкова М.А., Клиценко О.А., Васильева Н.В. Особенности диагностики и лечения онихомикоза стоп, обусловленного нитчатými недерматомицетами и дрожжами. Проблемы медицинской микологии. 2010; 12 (3): 25-28. [Kubasova N.L., Pupkova M.A., Klitsenko O.A., Vasilyeva N.V. Osobennosti diagnostiki i lecheniya onikhomikoza stop, obuslovlennogo nitchatými nedermatomitsetami i drozhzhami. Problemy meditsinskoy mikologii. 2010; 12 (3): 25-28 (in Russ)].
6. Лавникевич Д.М., и др. Способ диагностики онихомикоза. Патент на изобретение. RUS 2584035 от 12.02.2015. Режим доступа: <https://elibrary.ru/item.asp?id=37396340> [Lavnikovich D.M., et al. Sposob diagnostiki onikhomikoza. Patent for an invention. RUS 2584035 dated 12.02.2015. (in Russ)].
7. Ameen M., et al. British Association of Dermatologists' guidelines for the management of onychomycosis 2014. Br. J. Dermatol. 2014; 171 (5): 937-958. <https://doi.org/10.1111/bjd.13358>
8. Skóra M., Macura A.B., Bulanda M. In vitro antifungal susceptibility of *Scopulariopsis brevicaulis* isolates. Med. Mycol. 2014; 52 (7): 723-727. doi.org/10.1093/mmy/myu039
9. Isidro A.M.B., et al. Fungal prosthetic mitral valve endocarditis caused by *Scopulariopsis* species: Case report and review of the literature. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 2006; 131 (5): 1181-1183. doi.org/10.1016/j.jtcvs.2005.12.062
10. *Conidium production* in ascomycetes [Electronic resource]// Study Solutions. Mode of access: <http://istudy.pk/conidium-production-in-ascomycetes/> Date of access 07.11.2019.
11. *Phylum 6. Ascomycota. The Ascomycetes* [Electronic resource] // Mycolog.com. Mycologue Publications. Mode of access: www.mycolog.com/CHAP4a.htm Date of access 07.11.2019.
12. de Hoog G.S., et al. Atlas of Clinical Fungi. Online Edition [Electronic resource]. Utrecht: Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, 2019. Mode of access <http://www.clinicalfungi.org/>
13. Sciortino C.V. Atlas of Clinically Important Fungi. John Wiley & Sons, 2017: 456 pp. doi.org/10.1002/9781119069720
14. *Medical fungi species database. Polyphasic identification* [Electronic resource]. Utrecht: Westerdijk Fungal Biodiversity Institute. Mode of access <http://www.wi.knaw.nl/Medical/Biolomicsid.aspx>
15. Рябинин И.А., Ершова А.И., Батаева К.Д. Анализ процессов идентификации и группировки масс-спектров, получаемых при MALDI-TOF-масс-спектрометрии белковых экстрактов из культур *Aspergillus fumigatus* Fres. Проблемы медицинской микологии. 2015; 17 (1): 52-57. [Ryabinin I.A., Yershova A.I., Batayeva K.D. Analiz protsessov identifikatsii i gruppirovki mass-spektrrov, poluchayemykh pri MALDI-TOF-mass-spektrrometrii belkovykh ekstraktov iz kul'tur *Aspergillus fumigatus* Fres. Problemy meditsinskoy mikologii. 2015; 17 (1): 52-57 (in Russ)]. mycology.szgmu.ru/files/№1_2015.pdf

Поступила в редакцию журнала 07.11.2019

Рецензент: И.А. Босак



МИКОБИОТА КОЖНЫХ ПОКРОВОВ И ШЕРСТИ ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ИСТОЧНИК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ДЕРМАТОМИКОЗОВ

¹Халдеева Е.В. (в.н.с., зав. лаб.)*, ^{1,2}Лисовская С.А. (в.н.с.), ¹Глушко Н.И. (с.н.с.)

¹ Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии; ² Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

Проведено культуральное и микроскопическое исследование образцов соскобов с кожных покровов и шерсти 50 домашних животных (кошек и собак). По результатам культурального исследования при наличии грибов-дерматомицетов отмечено у 44,1% кошек и 43,8% собак, в том числе – *Microsporum canis* – 17,7% кошек и *Microsporum gypseum* (*Nannizia gypsea*) – 12,5% собак. Грибы рода *Trichophyton* выявлены у 32,4% кошек и 31,3% собак. Установлена высокая частота обнаружения плесневых грибов на коже и шерсти домашних животных. Полученные результаты подтверждают, что домашние животные могут являться потенциальным источником заражения грибковой инфекцией, что указывает на необходимость соблюдения гигиенических норм при общении с домашними животными и целесообразность периодического обследования животных на предмет носительства грибов-дерматомицетов.

Ключевые слова: дерматомицеты, домашние животные, *Microsporum*, *Trichophyton*

MYCOBIOTA OF SKIN AND HAIR OF PETS AS A POTENTIAL SOURCE OF DERMATOMYCOSIS PATHOGENS

¹Khaldeeva E.V. (head of the laboratory),
^{1,2}Lisovskaya S.A. (leading scientific researcher),
¹Glushko N.I. (senior scientific researcher)

¹Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology;
²Kazan State Medical University, Kazan, Russia

A cultural and microscopic investigation of scraping samples from the skin and hair of 50 pets (cats and dogs) was carried out. According to the results of the cultural examination, the presence of dermatomycetes was observed in 44.1% of cats and in 43.8% of dogs, including *Microsporum canis* – 17.7% of cats and *Microsporum gypseum* (*Nannizia gypsea*) – 12.5% of dogs. Various species of *Trichophyton* were detected in 32.4% of cats and in 31.3% of dogs. A high frequency of molds detection on the skin and hair of pets was noted. The obtained results confirm that pets can be a potential source of fungal infection, and indicate the need to observe hygiene standards when communicating with pets and the advisability of periodical examination of animals for carriage of dermatomycetes.

Key words: dermatomycetes, pets, *Microsporum*, *Trichophyton*

ВВЕДЕНИЕ

Последние годы ознаменовались возрастающим интересом к исследованию грибов-дерматомицетов. С одной стороны, это связано с ростом заболеваемости дерматомикозами, с другой – со значительным прогрессом в области методов исследования грибов [1]. Изменение социально-экономических условий жизни людей, гигиенических стандартов, рост числа иммунодефицитных состояний, нерациональное применение антибиотиков, гормонов – все это приводит к изменениям микробиоты, в результате которых организм человека становится более восприимчивым к грибковым инфекциям. При этом вновь приобретает актуальность зоонозный путь передачи инфекции, а к ранее существовавшим источникам заражения добавляются новые.

Дерматомицеты делятся на три экологические группы в соответствии с источником метаболизированного кератина. Геофильные виды – сапробы, которые питаются кератином в почве, в то время как антропофильные и зоофильные виды поражают богатые кератином ткани на живом организме человека или животного соответственно [2]. Зоофильные виды дерматомицетов могут передаваться человеку через прямой контакт и вызывать тяжелые воспалительные инфекции [3].

Среди видов дерматомицетов, обнаруживаемых на кожном покрове животных, доминирующую роль занимают зооантропофильные, представляющие опасность для человека. *Microsporum canis* может присутствовать на кожном покрове кошек, собак, лошадей, пушных зверей. *Trichophyton mentagrophytes* обнаруживается у собак, грызунов, пушных зверей, лошадей; *T. verrucosum* – у крупного и мелкого рогатого скота. Патогенный для человека *M. gypseum* (*Nannizia gypsea*) встречается на шерстом покрове лошадей и собак [4]. В связи с адаптацией иммунной системы животные в большинстве случаев являются бессимптомными переносчиками дерматомицетов. Риск заражения зависит от зоофильного агента и частоты контакта человека с животным.

Ранее основным источником заражения человека был скот, однако сейчас в развитых странах, благодаря улучшению гигиенических стандартов и применению эффективных средств профилактики и лечения, острота этой проблемы значительно уменьшилась. В то же время появились новые маршруты передачи инфекции. Так, дети, у которых дома живет бессимптомный питомец, могут заразиться и стать источником инфекции в детских учреждениях, а взрослые – в спортивных залах, бассейнах и т.п. [5]. Животные также могут распространять заболевание среди других зверей.

В связи с этим представляет интерес изучить состав грибковой микробиоты кожных покровов и шерсти домашних животных (кошек и собак) и оценить вероятность носительства домашними животными грибов-дерматомицетов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выполнено исследование образцов соскобов с кожных покровов и шерсти (остевых волос и подшерстка) 50 домашних животных (34 кошки и 16 собак). Отбор биоматериала осуществляли в условиях ветеринарной

* Контактное лицо: Халдеева Елена Владимировна, e-mail: mycology-kazan@yandex.ru

клиники и анализировали в лаборатории микологии КНИИЭМ. Все обследованные животные содержались в домашних условиях, были привиты и наблюдались у ветеринара. Образцы отбирали у животных, чьи хозяева обратились в клинику в связи с проблемами, не связанными с поражением кожи и шерсти питомцев. У нескольких животных (6 кошек и 3 собаки) отмечали незначительные алопеции, но при проведении люминесцентной диагностики с помощью лампы Вуда свечение отсутствовало.

Проводили микроскопию соскоба и шерсти, микроскопическое исследование с КОН и калькофлюором белым, а также культуральное исследование. Посев биоматериала выполняли на среду Сабуро с добавлением антибиотика. Культивирование осуществляли в течение 10-20 суток при 30 °С. Идентификацию проводили классическими методами по культурально-морфологическим и биохимическим признакам.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований элементы мицелия микроскопически обнаружены у 47 животных, присутствие грибов подтверждено культуральными методами в 46 случаях (92%), в т.ч. у 33 кошек (97,1%) и у 13 собак (81,3%).

В результате культурального исследования грибы-дерматомицеты выявлены у 44,1% кошек и 43,8% собак. При этом у 17,7% кошек обнаружен *Microsporum canis*, у 12,5% собак (в двух случаях) – *Microsporum gypseum* (*Nannizia gypsea*). Присутствие *Trichophyton mentagrophytes* отмечено у 23,5% кошек и 25% собак, у 3 кошек и одной собаки наблюдали *Trichophyton* spp. (Рис. 1).

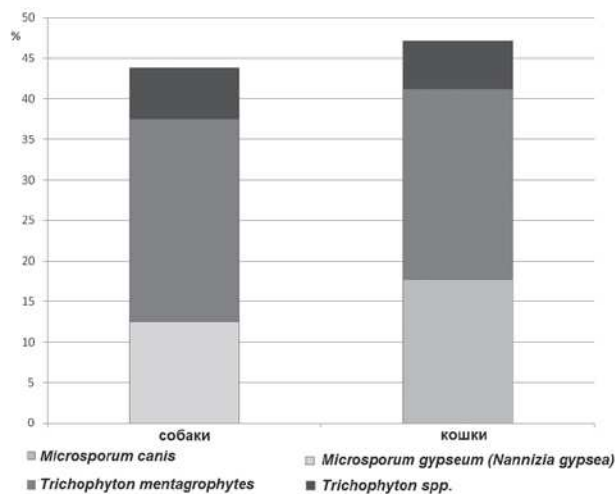


Рис. 1. Видовой состав грибов-дерматомицетов, выявленных у домашних животных.

В большинстве случаев грибы-дерматомицеты вы-

являли в составе ассоциаций с плесневыми грибами (23,5% кошек, 25% собак) или с дрожжеподобными и плесневыми грибами (5,9% кошек). Так, было отмечено присутствие *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*. В одном случае у собаки были обнаружены *Rhodotorula mucilaginosa* в ассоциации с плесневыми грибами.

На коже и шерсти большинства домашних животных были выявлены разнообразные плесневые грибы (Рис. 2), присутствие которых обычно расценивают как контаминацию шерсти, однако в некоторых случаях (5 кошек, 1 собака) грибы наблюдали непосредственно при микроскопическом исследовании остевых волос и подшерстка. При этом отмечали обрастание некоторых волосков без перфорации. Наличие плесневых грибов на шерсти домашних животных может являться дополнительным источником аллергенов, что следует учитывать при возможном контакте.

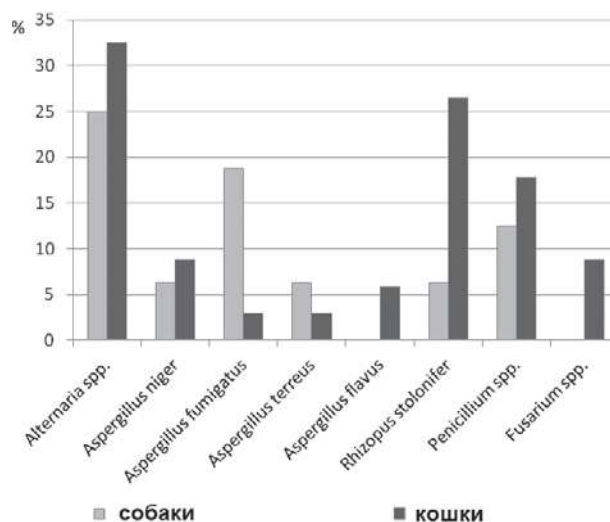


Рис. 2. Видовой состав плесневых грибов, выявленных у домашних животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано частое присутствие грибов-дерматомицетов, представляющих потенциальную опасность заражения человека, на коже и шерсти домашних животных. Отмечена возможность обсеменения кожных покровов и шерсти дрожжеподобными и плесневыми грибами. Все это указывает на необходимость соблюдения гигиенических норм при общении с домашними животными и целесообразность периодического обследования на предмет носительства грибов-дерматомицетов.

Полученные результаты подтверждают важность культуральной диагностики при обследовании домашних животных, поскольку только в этом случае можно идентифицировать вид гриба и принять соответствующие меры по его элиминации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pchelín I.M., Azarov D.V., Churina M.A., et al. Species boundaries in the *Trichophyton mentagrophytes* / *T. interdigitale* species complex. Med Mycol. 2019. 57: 781-789. doi: 10.1093/mmy/myy115.
2. Achterman R.R., White T.C. Dermatophyte virulence factors: Identifying and analyzing genes that may contribute to chronic or acute skin infections. International Journal of Microbiology. 2012; Article ID 358305: 8 p. doi.org/10.1155/2012/358305
3. Абидова З.М., Нурматов У.Б. Клиническое течение и методы лечения зооантропонозной трихофитии у взрослых с локализацией поражений в локтовой области. Проблемы медицинской микологии. 2009; 11 (2): 31-35. [Abidova Z.M., Nurmatov U.B. Klinicheskoe techenie i metody lecheniya zooantropoznoy trihofi-tii u vzroslyh s lokalizaciej porazhenij v lokkovoju oblastj. Problemy medicinskoj mikologii. 2009; 11 (2): 31-35 (In Russ)].

4. Овчинников Р.С., Маноян М.Г., Гайнуллина А.Г. Бессимптомное миконительство и его значение в распространении дерматофитозов животных и человека. *VetPharma*. 2012; 3: 40-45. [Ovchinnikov R.S., Manoyan M.G., Gajnullina A.G. Bessimptomnoe mikonositel'stvo i ego znachenie v rasprostranenii dermatofitozov zhivotnyh i cheloveka. *VetPharma*. 2012; 3: 40-45 (In Russ)].
5. Graser Y., Monod M., Bouchara J.-P. et al. New insights in dermatophyte research. *Medical Mycology*. 2018; 56: S2-S9. doi.org/10.1093/mmy/myx141

Поступила в редакцию журнала 30.10.2019

Рецензент: Т.В. Медведева



Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (СЗГМУ)
Научно-исследовательский институт медицинской микологии им. П.Н.Кашкина (НИИ ММ) СЗГМУ им. И.И. Мечникова
Адрес редакции: 194291, Санкт-Петербург, ул. Сантьяго-де-Куба, 1/28. Тел.: (812) 303-51-45, факс (812) 510-62-77
E-mail: mycobiota@szgmu.ru, elena.gukova@szgmu.ru. Заведующая редакцией: Е.С.Гукова.

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov
Kashkin Research Institute of Medical Mycology
Address of Editorial Office: Santiago-de-Cuba str., 1/28, Saint Petersburg, 194291, RUSSIA.
Tel.: (812) 303-51-45, Fax (812) 510-62-77
E-mail: mycobiota@szgmu.ru, elena.gukova@szgmu.ru. Manager of Editorial Office: E.S.Gukova

«ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ»

Рег. № 77-1396 от 20.12.1999 г. ISSN 1999-6780

Журнал включен в реферативный журнал и базы ВИНТИ.

Сведения о журнале ежегодно публикуются в международной системе по периодическим и продолжающимся изданиям «Ulrich's Periodicals Directory».

Оригинал-макет — НИИ «Медицинской микологии им. П. Н. Кашкина СЗГМУ».

Подписано в печать 29.12.2019. Формат 60×90 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Times. Печать офсетная. Усл. печ. л. 7. Тираж 999 экз.