

EDITORIAL BOARD

Chief Editor —

N.P. Yelinov — Ph.D., prof. (Russia)

Deputies Chief Editor —

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

N.N.Klimko — M.D., prof. (Russia)

Responsible secretary —

T.S. Bogomolova — Ph.D. (Russia)

SCIENTIFIC EDITORIAL BOARD

N.A. Belyakov — M.D., academician of RAMS, prof. (Russia), J. Bennett — M.D. (USA), S.A. Burova — M.D., prof. (Russia), B. Dupont — M.D. (France), O.G. Hurzilava — M.D., prof. (Russia), V.I. Golubev — Ph.D. (Russia), Z.O. Karayev — M.D., prof. (Azerbaijan), K.P. Kashkin — M.D., academician of RAMS, prof. (Russia), V.G. Kubas' — M.D., prof. (Russia), A.V. Lipnizky — M.D., prof. (Russia), V.I. Mazurov — M.D., academician of RAMS, prof. (Russia), Iu.A. Medvedev — M.D., prof. (Russia), A.K. Mirzabalaeva — M.D., prof. (Russia), S.M. Ozerskaya — Ph.D. (Russia), I. Polachek — M.D. (Israel), Ye.V. Pronina — M.D., prof. (Russia), A.G. Rakhmanova — M.D., prof. (Russia), K.I. Raznatovsky — M.D., prof. (Russia), F.P. Romanyuk — M.D., prof. (Russia), A.V. Samzov — M.D., prof. (Russia), N.V. Shabashova — M.D., prof. (Russia), M.A. Shevyakov — M.D., prof. (Russia), A.V. Sobolev — M.D., prof. (Russia), A.A. Stepanova — Ph.D. (Russia), H.J. Tietz — M.D. (Germany), T.N. Trofimova — M.D., prof. (Russia), M.A. Viviani — M.D. (Italy), V.A. Zinzerling — M.D., prof. (Russia)

PROBLEMS IN MEDICAL MYCOLOGY

Vol. 15, № 4, 2013

North-Western State Medical University
named after I.I. Mechnikov
Kashkin Research Institute
of Medical Mycology (KRI MM)

ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

Том 15, № 4, 2013

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (СЗГМУ)
Научно-исследовательский институт
медицинской микологии им. П.Н.Кашкина
(НИИ ММ)

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор —

Н.П. Елинов — д.б.н., профессор (Россия)

Заместители главного редактора:

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

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

Ответственный секретарь —

Т.С. Богомолова — к.б.н. (Россия)

НАУЧНО-РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Н.А. Беляков — д.м.н., акад. РАМН, профессор (Россия),
Дж. Беннетт — доктор медицины (США), С.А. Бурова —
д.м.н., профессор (Россия), М.А. Вивиани — доктор
медицины (Италия), В.И. Голубев — д.б.н., вед.н.с.
(Россия), Б. Дюпон — доктор медицины (Франция),
З.О. Караев — д.м.н., профессор (Азербайджан),
К.П. Кашкин — д.м.н., академик РАМН, профессор
(Россия), В.Г. Кубась — д.м.н., профессор (Россия),
А.В. Липницкий — д.м.н., профессор (Россия),
В.И. Мазуров — д.м.н., акад. РАМН, профессор
(Россия), Ю.А. Медведев — д.м.н., профессор (Россия),
А.К. Мирзабалаева — д.м.н., профессор (Россия),
С.М. Озерская — д.б.н. (Россия), И. Полачек —
доктор медицины (Израиль), Е.В. Пронина — д.м.н.,
профессор (Россия), К.И. Разнатовский — д.м.н.,
профессор (Россия), А.Г. Рахманова — д.м.н.,
профессор (Россия), Ф.П. Романюк — д.м.н.,
профессор (Россия), А.В. Самцов — д.м.н., профессор
(Россия), А.В. Соболев — д.м.н., профессор (Россия),
А.А. Степанова — д.б.н. (Россия), Х.И. Титц — доктор
медицины (Германия), Т.Н. Трофимова — д.м.н.,
профессор (Россия), О.Г. Хурцилава — д.м.н., проф.
(Россия), В.А. Цинзерлинг — д.м.н., профессор
(Россия), Н.В. Шабашова — д.м.н., профессор (Россия),
М.А. Шевяков — д.м.н., профессор (Россия)

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 Mycology — 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

<i>Шабашова Н.В., Учеваткина А.Е., Фролова Е.В., Филиппова Л.В., Чернопятова Р.М., Малеева Е.Г.</i> Иммуные нарушения у больных с разными клинико-генетическими вариантами хронического кандидоза кожи и слизистых оболочек.....	3
<i>Корнишева В.Г., Могилева Е.Ю.</i> Микозы при ВИЧ-инфекции. Обзор литературы.....	10
<i>Козлова Я.И., Клишко Н.Н.</i> Аллергический микотический риносинусит. Обзор литературы.....	20

КЛИНИЧЕСКАЯ МИКОЛОГИЯ

<i>Савостеева И.С., Десятник Е.А., Чернопятова Р.М., Шадривова О.В., Одинцова Т.С., Богомолова Т.С., Игнатъева С.М., Васильева Н.В., Клишко Н.Н.</i> Хронический некротизирующий аспергиллез легких как осложнение саркоидоза легких. Описание клинического случая и обзор литературы.....	25
<i>Хостелиди С.Н., Потапенко В.Г., Шейдаева Э.Н., Самородова И.А., Котова Н.А., Климович А.В., Богомолова Т.С., Игнатъева С.М., Медведева Н.В., Клишко Н.Н.</i> Случай успешного лечения криптококкового менингоэнцефалита у пациента с хроническим лимфоцитарным лейкозом.....	31
<i>Мавлянова Ш.З., Хакимов Д.Р.</i> Роль <i>Candida</i> spp. в клиническом течении аспе <i>vulgaris</i>	37
<i>Авалуева Е.Б., Шевяков М.А., Ситкин С.И., Жигалова Т.Н., Нилова Л.Ю., Сказываева Е.В., Иванов С.В.</i> Клиника и микробиота кишечника у пациентов с болезнью Крона.....	40
<i>Игнатъева С.М., Спиридонова В.А., Богомолова Т.С., Шадривова О.В., Десятник Е.А., Борзова Ю.В., Хостелиди С.Н., Волкова А.Г., Попова М.О., Зюзгин И.С., Колбин А.С., Климович А.В., Зубаровская Л.С., Афанасьев Б.В., Васильева Н.В., Клишко Н.Н.</i> Особенности определения галактоманна в сыворотке крови и бронхоальвеолярном лаваже онкогематологических больных с инвазивным аспергиллезом. Собственные данные и обзор литературы.....	45

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МИКОЛОГИЯ

<i>Михайлова Ю.В., Белоцерковская Е.В., Богомолова Т.С., Борзова Ю.В., Волкова А.Г., Михайлов В.И., Полищук А.Г.</i> Молекулярное и микробиологическое выявление и идентификация патогенных микромицетов в мокроте, бронхоальвеолярном лаваже и аутопсийном материале.....	52
<i>Серебренникова Е.С., Давыдова В.А., Гурина С.В., Иозеп А.А.</i> Изучение антимикробной активности некоторых производных альгиновой кислоты.....	60
<i>Громовых Т.И., Иванова И.Е., Шнырева А.В., Барсегян Г.Г., Данильчук Т.Н., Левин М.А.</i> Исследование токсических свойств штамма <i>Ls 1-06 Laetiporus sulphureus</i> (Bull.) Murril L. и оценка перспектив его использования.....	63
<i>Леонов В.В., Курлович Н.А., Соколова Т.Н., Тимохина Т.Х., Фатеева Н.М.</i> Ионы железа и гемолитическая активность <i>Candida albicans</i>	70
<i>Оришак Е.А., Шеглов В.С., Нилова Л.Ю.</i> Сравнительная характеристика антибиотикорезистентности некоторых представителей микробиоты кишечника и пробиотических штаммов.....	74
<i>Пинегина О.Н., Васильева Н.В., Сатурнов А.В.</i> Видовой состав микроорганизмов, образование биопленок и колонизация центральных венозных и уретральных катетеров.....	81
<i>Рауш Е.Р., Васильева Н.В., Полищук А.Г., Шагдильева Е.В., Лавникевич Д.М., Руднева М.В., Михайлова Ю.В., Клишко Н.Н.</i> Определение видов возбудителей инвазивного кандидоза: в поиске быстрых решений.....	87
<i>Доршакова Е.В.</i> Особенности роста, биологии и продукции микотоксинов <i>Chaetomium</i> spp. – микромицетами-биодеструкторами.....	92

CONTENTS

PROBLEM ARTICLES AND REVIEWS

<i>Shabashova N.V., Uchevatkina A.E., Frolova E.V., Filippova L.V., Chernopyatova R.M., Maleeva E.G.</i> Immune disorders in patients with different clinical-genetic variants of the chronic mucocutaneous candidosis.....	3
<i>Kornisheva V.G., Mogileva E.Yu.</i> Mycoses at HIV-Infection. A review of literature.....	10
<i>Kozlova Y.I., Klimko N.N.</i> Allergic fungal rhinosinusitis. A review of literature.....	20

CLINICAL MYCOLOGY

<i>Savostyeva I.S., Desyatnik E.A., Chernopyatova R.M., Shadrivova O.V., Odincova T.S., Bogomolova T.S., Ignatyeva S.M., Vasilyeva N.V., Klimko N.N.</i> Chronic necrotizing pulmonary aspergillosis complicating pulmonary sarcoidosis. A clinical case and review of literature.....	25
<i>Khostelidi S.N., Potapenko V.G., Sheydaeva E.N., Samorodova I.A., Kotova N.A., Klimovich A.V., Bogomolova T.S., Ignatyeva S.M., Medvedeva N.V., Klimko N.N.</i> The case of cryptococcosis meningitis successful treatment in a patient with chronic lymphocytic leukemia.....	31
<i>Mavlyanova Sh.Z., Khakimov D.R.</i> The role of <i>Candida</i> spp. in the progressing of acne vulgaris.....	37
<i>Avaluyeva E.V., Shevyakov M.A., Sitkin S.I., Zhigalova T.N., Nilova L.Yu., Skazyvayeva E.V., Ivanov S.V.</i> Clinic and microbiota of intestine in patients with Crohn's disease.....	40
<i>Ignatyeva S.M., Spiridonova V.A., Bogomolova T.S., Shadrivova O.V., Desyatnik E.A., Borzova Ju.V., Khostelidi S.N., Volkova, A.G., Popov M.O., Zuzgin I.S., Kolbin A.S., Klimovich A.V., Zubarovskaya P.S., Afanasyev B.V., Vasilyeva N.V., Klimko N.N.</i> Peculiarities of galactomannan definition in blood serum and broncho-alveolar lavage at oncohematological patients with invasive aspergillosis. Own data and review of literature.....	45

EXPERIMENTAL MYCOLOGY

<i>Mikhaylova Y.V., Belotcerkovskaya E.V., Bogomolova T.S., Borzova Y.V., Volkova A.G., Mikhaylov V.I., Polischouk A.G.</i> Molecular and microbiological detection and identification of pathogenic micromycetes in sputum, bronchoalveolar lavage and autopsy material.....	52
<i>Serebrennikova E.S., Davydova V.L., Gurina S.V., Iozep A.A.</i> Studying of antimicrobial activity of some derivatives of alginic acid.....	60
<i>Gromovych T.I., Ivanova I.E., Shnyryova A.V., Bargesjan G.G., Danilchuk T.N., Levin M.A.</i> Investigation of the toxic properties of strain <i>Ls 1-06 Laetiporus sulphureus</i> (Bull.) Murril L. and evaluation of its use perspectives.....	63
<i>Leonov V.V., Kurlovich N.A., Sokolova T.N., Timokhina T.H., Fateeva N.M.</i> Iron ions and haemolytic activity of <i>Candida albicans</i>	70
<i>Orishak E.A., Shcheglov V.S., Nilova L.Ju.</i> The comparative characteristic of antibiotic resistance of some representatives of the intestinal microbiota and probiotic strains.....	74
<i>Pinegina O.N., Vasilyeva N.V., Saturnov A.V.</i> Species composition of microorganisms, formation of biofilms and colonization of central venous and urinary catheters.....	81
<i>Raush E.R., Vasilyeva N.V., Shagdileeva E.V., Polischouk A.G., Lavnikovich D.M., Rudneva M.V., Mikhaylova Y.V., Klimko N.N.</i> Species identification of etiologic agents of invasive candidosis : in search of quick decisions.....	87
<i>Dorshakova Ye.V.</i> Peculiarities of growth, biology and production of mycotoxins with <i>Chaetomium</i> spp. – micromycetes-biodestructors.....	92

ИММУННЫЕ НАРУШЕНИЯ У БОЛЬНЫХ С РАЗНЫМИ КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИМИ ВАРИАНТАМИ ХРОНИЧЕСКОГО КАНДИДОЗА КОЖИ И СЛИЗИСТЫХ ОБОЛОЧЕК

¹Шабашова Н.В. (профессор кафедры)*, ²Учеваткина А.Е. (с.н.с.), ²Фролова Е.В. (зав. лаб.), ²Филиппова Л.В. (н.с.), ²Чернопятова Р.М. (зав. отд.), ²Малеева Е.Г. (врач-педиатр)

Северо-западный государственный университет им. И.И. Мечникова: ¹Кафедра клинической микологии, аллергологии и иммунологии и ²НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2013

В статье представлены результаты многолетнего иммунологического мониторинга шести больных хроническим кандидозом кожи и слизистых оболочек, их клинические и генетические особенности. Установили, что единственным признаком, объединяющим этих пациентов, является хроническая рецидивирующая Candida-инфекция барьерных тканей. Распространенность и выраженность этой инфекции, сопутствующие клинические признаки весьма индивидуальны, как и отклонения исследованных иммунологических показателей и генетические поломки. Однако, совершенно очевидно, что у всех пациентов нарушены функции T-клеток, обусловленные разными генетическими причинами.

Ключевые слова: генетические мутации, иммунные нарушения, кандидоз кожи и слизистых оболочек

IMMUNE DISORDERS IN PATIENTS WITH DIFFERENT CLINICAL-GENETIC VARIANTS OF THE CHRONIC MUCOCUTANEOUS CANDIDOSIS

¹Shabashova N.V. (professor of the chair), ²Uchevatkina A.E. (senior scientific collaborator), ²Frolova E.V. (head of the laboratory), ²Filippova L.V. (scientific collaborator), ²Chernopyatova R.M. (head of the department), ²Maleeva E.G. (pediatrist)

* Контактное лицо: Шабашова Надежда Венедиктовна, Тел.: (812) 303-51-46

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov: ¹Chair of Clinical Mycology, Allergology and Immunology and ²Kashkin Research Institute of Medical Mycology, St. Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2013

Results of long-term immunological monitoring of six patients with chronic mucocutaneous candidosis, their clinical and genetic features have been presented in the article. Found that the only sign of the uniting these patients was the chronic recurrent Candida-infection of barrier tissues. The prevalence and expressiveness of this infection, accompanying clinical signs were very individual, as well as deviations of the studied immunological indicators and genetic damages. However, it is obvious that all of these patients had function disorders of the T-cells, caused by the different genetic reasons.

Key words: chronic mucocutaneous candidosis, genetic mutations, immune disorders

ВВЕДЕНИЕ

Хронический кандидоз кожи и слизистых оболочек в международной номенклатуре называют Chronic Mucocutaneous Candidiasis (CMC). Kirkpatrick and al. (1971 and 2001) и Higgs and Wells (1972) рассматривали это заболевание как персистирующую селективную *Candida*-инфекцию с неустановленной изначальной причиной первичной чувствительности слизистых оболочек и кожи к *Candida* spp. [1-3]. D. Lilic and Ken Haynes [4] добавили к этому определению принципиально интересную подробность, что это – **гетерогенная группа больных, объединяемых общей проблемой – наличием первичной, необъяснимой (невьясненной) чувствительности** к персистирующим, рецидивирующим, изнурительным и мучительным инфекциям кожи и слизистых оболочек, вызванных *Candida* spp. Таким образом, основным клиническим признаком заболевания является СМС. Следует учитывать, что к СМС не относят случаи *Candida*-инфекции слизистых оболочек и кожи при наличии предрасполагающих факторов или предшествующих болезней, например, орофарингеальный кандидоз при ВИЧ/СПИД, при гематоонкологических болезнях, лечении кортикостероидами и т.д.

Синдром СМС считают редким, хотя фактическую частоту его не изучали, качественной статистики заболевания нет [5, 6]. В отечественной и зарубежной научной литературе представлены данные анализа немногочисленных групп или, даже, индивидуальных пациентов. Однако есть популяции (в Финляндии, Норвегии, Иране и на Сардинии), где исследовали частоту поверхностной *Candida*-инфекции при аутоиммунном полиэндокринном *Candida*-эктодермальном дистрофическом синдроме (Autoimmune Polyendocrinopathy Candidosis Ectodermal Dystrophy Syndrome – APECED). В этих регионах заболевание встречается чаще, как полагают, из-за высокой закрытости и потому высокой вероятности родственных браков [5, 6]. В России на учете состоит около 60 больных APECED или APS1 (Autoimmune Polyendocrinopathy Syndrome Type 1 - аутоиммунный

полиэндокринный синдром) [7]. Однако в последней классификации 2006 г., признанной международным консенсусом, подгруппу больных с признаками хронической *Candida*-инфекции кожи и слизистых оболочек и APS1, не относят к СМС. Заболевание включили в раздел болезней иммунной дисрегуляции (по OMIM *240300), поскольку к 2006 году уже были открыты некоторые мутации гена (который был назван **аутоиммунным регулятором** – AIRE), ответственного за этот синдром [6-8]. При APS1 (APESCED) тип наследования – классический аутосомно-рецессивный, но может быть и аутосомно-доминантный. У классических больных этим заболеванием, кроме хронического кандидоза кожи и слизистых оболочек, с детства всегда присутствуют аутоиммунные поражения эндокринных (паращитовидных желез, надпочечников и гонад, сахарный диабет) и других органов (гепатит, кератоконъюнктивиты, кишечные дисфункции, витилиго, алопеция и т.д.). Недавно выявили наличие этого синдрома и среди взрослых. Идентифицировали аутоантигены (АУАГ), которые считают ключевыми, потому что к ним найдены аутоантитела (АУАТ) в эндокринных железах и других поврежденных органах. Это АУАТ против двух групп энзимов: цитохрома P450, который участвует в синтезе стероидов, и против энзимов (гидроксилазы, декарбоксилазы), вовлекаемых в синтез нейротрансмиттеров, но могут быть и другие, например, при алопеции – антитела к кальций-чувствительному рецептору в паращитовидной железе. Найдены также антитела (АТ) к цитокинам Т-хелперов17 (Th17) – интерлейкинам 17А (IL17А), IL17Е, IL22 и интерферону- ω [7, 9].

Истинную хроническую *Candida*-инфекцию кожи и слизистых оболочек (СМС) по этой классификации [3, 6, 8] относят к первичным иммунодефицитам (ПИД) в реестре орфанных (редких) «легко выявляемых иммунодефицитных синдромов» с невыясненной причиной, так как у большинства больных изначально обнаруживают различные нарушения, преимущественно – клеточно-опосредованного иммунитета [3-6, 8].

Таким образом, в 2006 году выделены следующие варианты СМС (по OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man) [3, 4, 6, 8]:

1. OMIM*606415 – семейный СМС с заболеванием щитовидной железы как отдельный от APESCED синдром, с аутосомно-доминантным типом наследования, без повреждения других эндокринных органов. Возможной причиной повреждения считали регион хромосомы 2p [4].

2. OMIM * 11458 – семейный СМС с аутосомно-доминантным типом наследования без повреждения эндокринных органов. Такие пациенты страдают рецидивирующими инфекциями и утратой зубов [4].

3. OMIM *212050 – семейный СМС с аутосомно-рецессивной наследственностью и без поражения эндокринных органов, который может иметь позднее начало и ассоциироваться с дефицитом железа у

некоторых пациентов [4].

Из представленной классификации следует, что СМС является наследственным заболеванием с разными путями передачи основного признака – хронической рецидивирующей *Candida*-инфекции кожи и слизистых оболочек, но в ней никак не отражены иммунологические особенности и их взаимосвязь с особенностями наследования инфекции. Даже при APESCED остается непонятно, как мутации в гене – **аутоиммунном регуляторе** (AIRE) приводят к развитию *Candida*-инфекции [4, 6, 8, 9].

Именно факт открытия генетических причин APESCED и иммунных дефектов при многих ПИД послужили толчком к появлению многочисленных исследований и, соответственно, публикаций результатов изучения самих иммунных дефектов и генетических находок у больных СМС [9]. Каждое такое сообщение вносит новые или подтверждает уже опубликованные данные, что, несомненно, важно не только для понимания патогенеза, но и для оптимизации лечения этого заболевания [6, 10-15 и др.].

Цель работы – представить и обсудить результаты повторных иммунологических обследований, клинические особенности и некоторые генетические мутации, выявленные у больных СМС, которые длительное время наблюдаются в клинике НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В таблице 1 представлены клинические особенности 6 больных, 5 из которых неоднократно и 1 – впервые поступали для лечения *Candida*-инфекции в микологическую клинику НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина (зав. отделением №2 – к.м.н. Чернопятава Р.М.). Трое пациентов находятся под наблюдением с раннего детского возраста, остальные – с 8-18 лет (педиатр-миколог Малеева Е.Г.). Основным клиническим диагнозом больных всегда был хронический кандидоз кожи и слизистых оболочек, вне зависимости от других симптомов. В последние годы, согласно международной классификации 2006 г. [3, 4, 6, 8], больные были разделены на 2 группы. В группу СМС вошли пациенты К., А. и Пх., а больные И., Ч. и Пв. – в группу APESCED или APS1 в соответствии с клиническими признаками. Представленные результаты генетического анализа 4-х из этих больных были получены при любезном содействии других учреждений. Больные К. и А. обследованы в Медицинском университете г. Дебрецена, Венгрия (методы и результаты генетического анализа опубликованы [15]; пациенты Ч. и Пв. – в Институте детской эндокринологии и лаборатории наследственных болезней обмена медико-генетического центра (г. Москва, Россия), за что мы приносим глубокую благодарность сотрудникам этих учреждений.

Таблица 1

Клинические особенности и генетические мутации больных СМС и APS1

Признаки	Пациенты					
	К.	А.	Пх.	И.	Ч.	Пв.
СМС:*	8 мес.	1 год	8 лет	17 лет	1-9 лет	18 лет
Слизистая оболочка полости рта	+	+	+	+	+	+
Пищевод	+	+(ст-з)		+		+
Желудок				-		
Гениталии				-		
Кожа, ногти	+	+		+	+	
Вирусные инфекции:						
Герпес						+
Частые ОРВИ	+				+	
Ветряная оспа		+				
Другие инфекции:						
Пневмония	+	+6			+	
Фурункулез		+				
Частые ангины					+	
Афтозный стоматит	+					
Синуситы					+	
Менингит					+	
Глазные заболевания			+			
Цистит		+2				
Панкреатит				+		
Гепатит	+(?)					
Эндокринопатии:						
Гипотиреоз	+					+
Аутоиммунный тиреоидит	+	+	+	+	+	+
Надпочечниковая недостаточность					+	+
Нарушение полового развития					+	
Другие особенности:						
Гастрит			+			+
Гастродуоденит		+	+	+		
Аномалии желчного пузыря и путей	+	+	+			
Желчно-каменная болезнь				+		
Витилиго				+		
Анемия		+				+
Алопеция					+(Т)	
Лейкоплакия					+	
Аллергические заболевания					+	
Сердечно-сосудистые заболевания					Инфаркт	
Пневмофиброз		+				
Чувствительность к антимикотикам	+(Д-н)	Поз-л	+(Д)	+(Д)	+(Д)	+(Д)
Мутации, их локализация	STAT1 с.854A >G	STAT1 с.821G>A	н/д	н/д	AIRE R257X	AIRE pA58V

Примечания: * - возраст появления первых признаков заболевания; (+) - наличие признака; (-) – отсутствие признака в настоящее время.

Субпопуляционный состав лимфоцитов определяли методом иммуноцитохимии с использованием моноклональных антител «DAKO» и «Diagnostic Biosystems», USA. Фагоцитарную и киллерную активности нейтрофилов оценивали с применением референтного штамма *Candida albicans*. Кислород-зависимую микробицидную активность нейтрофилов устанавливали в НСТ-тесте (спонтанную и активированную зимозаном, «Serva», USA). Уровни иммуноглобулинов в сыворотке крови измеряли методом нефелометрии с помощью Orion Diagnostica Turbox, Finland. Продукцию интерферонов -α, -γ (IFN-α, IFN-γ), интерлейкинов (IL) IL-6, IL-10, IL-17 выявляли в супернатантах клеток крови после 24-часовой индукции фитогемагглютинином в конечной концентрации 50 мкг/мл (PHA-P, SIGMA, USA), а моноцитарный хемоаттрактант протеин-1 (Monocyte chemoattractant protein-1, MCP1) оценивали в сыворотке крови с применением коммерческих иммуноферментных тест-систем («Цитокин», «Вектор-Бест», Россия). В качестве контрольных показателей были использованы референтные значения, а также результаты обследования 20 практически здоровых людей (медиана возраста – 29 лет) при оценке продукции цитокинов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В зависимости от семейного анамнеза и клинической картины, выделены 2 группы пациентов. В соответствии с вышеназванной классификацией 2006 г. в первую группу включили больных К.,А. и Пх., заболевание которых можно отнести к СМС. Причем пациентки К. и А. имеют аутосомно-рецессивный, а Пх. – аутосомно-доминантный тип наследования указанного признака – поверхностной хронической *Candida*-инфекции. Пациенты И., Ч. и Пв., согласно

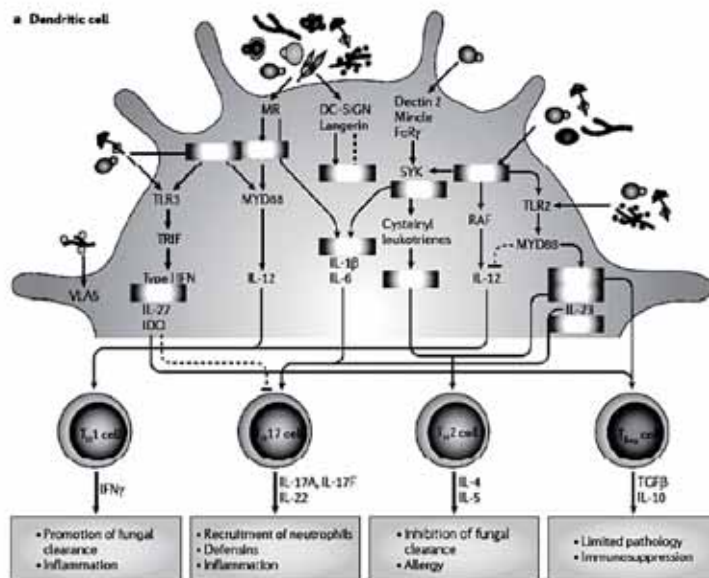


Рис.1 Генетические мутации, нарушающие распознавание АПК и ответ на *Candida albicans*

клиническим признакам, имеют другую патологию – APS1 и могут быть включены во вторую группу.

Установлено, что пациентки К. и А. имеют разные мутации гена STAT1 (Signal Transducers and Activators of Transcription), который кодирует образование и функции сигнального трансдуктора и активатора транскрипции STAT1 – молекулы, участвующей в передаче информации в ядро для активации синтеза IL17 и IFN-γ [10, 11, 14, 15]. У пациентки К. обнаружили новую, ранее не описанную мутацию с.854A>G в STAT1 – гене, приводящую к изменению в р.Q284R-аминокислотном остатке протеина с изменением его функциональных параметров [15]. Этот измененный аминокислотный остаток локализован в домене, «считывающем» информацию в пути после взаимодействия рецептора Dectin-1 с β-глюканами гриба. В результате нарушается экспрессия генов синтеза, прежде всего, IL17 и, соответственно, формирование адекватного инициативного воспаления с образованием антимикробных пептидов (АМП), хемокинов, привлекающих клетки воспаления, способные элиминировать грибы, препятствовать их размножению и развитию инфекции (Рис.1) [11, 13, 14, 15].

У пациентки А. также обнаружили мутацию в гене STAT 1 - в с. 821G>A, приводящую к изменению R274Q-аминокислотного остатка протеина, которая уже была описана ранее [11, 15]. При этом иммунологические последствия оказались аналогичными у пациенток К. и А. при существенных отличиях в клинической картине. В первом случае (больная К.) СМС сочетается с эндокринопатией, инфекция течет агрессивно, чаще обостряется и сопровождается частыми острыми респираторными вирусными инфекциями (ОРВИ). Имеет место неадекватно низкое содержание лимфоцитов (ЛФ) в периферической крови, хотя субпопуляционный состав этих клеток не отличается от контрольных показателей, как и у всех остальных больных (табл.2).

Таблица 2

Содержание клеток и иммуноглобулинов в периферической крови больных при последней госпитализации

Пациенты, возраст	Показатели							Контрольные значения
	К., 9 лет	А., 17 лет	Пх., 34 года	И., 43 года	Ч., 17 лет	Пв., 18 лет		
Ig (г/л)	A	1,88	1,7	2,16	3,63	5,98	1,62	0,7-4,0
	M	1,49	0,40	4,46	1,94	1,85	1,35	0,4-2,6
	G	22,57	10,3	15,30	7,50	19,7	16,0	7,0-15,0
IgE (ЕД/мл)	52	2,0	-	239	1,0	2,0	-	до 80
Лейкоциты ×10 ⁹ /л	6,8	4,5	5,0	17,4	6,3	9,1	-	4-9
Мон %	9	5	7	7	6	3	-	3-11
НФ %	68	63	59	74	41	62	-	47-72
ЛФ %	19	30	30	17	48	33	-	20-39
CD3+ % (абс.)	66 (0,85)	81 (1,09)	75 (1,13)	78 (2,31)	66 (1,99)	77 (2,31)	-	50-76 (0,8-2,0)
CD4+ % (абс.)	35 (0,45)	50 (0,68)	51 (0,77)	49 (1,45)	40 (1,21)	48 (1,44)	-	32-44 (0,68-1,10)
CD8+ % (абс.)	32 (0,41)	32 (0,43)	28 (0,42)	28 (0,83)	24 (0,73)	37 (1,11)	-	18-30 (0,28-0,70)

CD19+ % (абс.)	20 (0,26)	16 (0,21)	13 (0,20)	7 (0,21)	25 (0,76)	8 (0,241)	11-20 (0,230-0,35)
CD25+ % (абс.)	8 (0,10)	8 (0,11)	8 (0,12)	7 (0,21)	16 (0,48)	13 (0,39)	10-15 (0,20-0,30)
CD16+ % (абс.)	9 (0,12)	12 (0,16)	13 (0,20)	15 (0,44)	14 (0,42)	16 (0,48)	11-23 (0,20-0,40)
Иммунорегуляторный индекс	1,1	1,6	1,7	1,8	1,7	1,3	1,5-2,0

У больной А. до настоящего времени нет признаков эндокринных заболеваний, но СМС осложняется наличием анемии, присоединением нескольких пневмоний и фурункулеза (табл.1). Это неудивительно, поскольку из-за недостаточной активности синтеза IL17 и IFN-γ, выявленных у всех трех пациенток первой группы (табл.3), страдает в целом функция воспаления, необходимая не только для адекватной защиты против грибов, но и против гноеродных микроорганизмов. Отметим, что ограниченный синтез этих цитокинов сопровождается сниженной продукцией IL10 (табл.3, Рис.2), что может указывать на слабую функциональную активность дендритных клеток (Рис.1) – важнейших регуляторов ответов, опосредованных Т-лимфоцитами (Т-ЛФ) [1-4].

Таблица 3

Функциональные показатели иммунитета при последнем обследовании и генетические мутации

Пациенты	Показатели	К.	А.	Пх.	И.	Ч.	Пв.	Контрольные значения
		спонт.	37	28	39	17	26	
НСТ-тест (%)	инд.	61	60	61	17	64	23	40-60
	спонт./инд.	1,65	2,1	1,56	1,0	2,46	3,8	
Коэф. киллинга (%)		24	25	24	17	10	5	25-45
IFNα (пг/мл)	спонт.	0	3	11	7	5	3	0-30
	инд.	226	163	146	20	23	8	100-500
IFNγ (пг/мл)	спонт.	73	6	41	12	172	41	0-50
	инд.	230	146	163	1265	950	222	700-2000
IL6 инд. (пг/мл)		-	294	-	-	-	-	570-680
IL8 инд. (пг/мл)		-	327	-	-	-	-	235-280
IL10 инд. (пг/мл)		48	94	131	410	595	-	195-535
IL17 инд. (пг/мл)		7	10	27	345	6	-	80-300
МСР1сыв.(пг/мл)		-	58	108	243	144	-	17-180

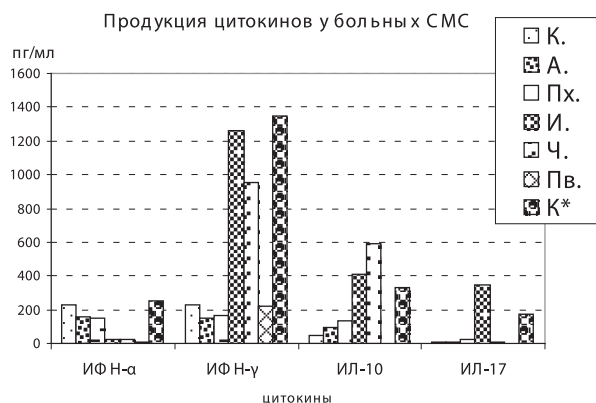


Рис. 2. Изменение продукции цитокинов у больных с СМС К* – контрольные значения

Весьма разнообразная клиническая картина отличает больных APS1 (И, Ч., Пв), несмотря на мутации в одном и том же гене-иммунорегуляторе AIRE (табл.1). Так, у больного Ч. гетерозиготная мутация R257X сочетается с ранним появлением *Candida*-инфекции кожи и слизистых оболочек, в подростковом возрасте ее симптомы практически исчезли, однако были выявлены признаки нарушения полового развития с низким уровнем тестостерона, и возникла тотальная алопеция. У больного Пв. мутация pA58V в том же гене явилась причиной достаточно раннего развития тяжелых эндокринопатий (табл.1). Только в последний год было обращено внимание на инфекцию, вызванную *Candida* spp., и впервые было проведено лечение дифлюканом. Создается впечатление, что лечение эндокринопатий способствовало появлению этой инфекции. К сожалению, третий больной из этой группы, генетически не обследован, хотя клиническая картина его заболевания не вызывает сомнений в диагнозе и отличается поздним (в юношеском возрасте) и почти одновременным появлением признаков *Candida*-инфекции и эндокринопатий. Выяснили, что 2 года назад больной перенес инфаркт миокарда. У больных СМС и APS1 в научной литературе описаны серьезные заболевания сердечно-сосудистой системы, например, аневризмы единичные и множественные сосудов головного мозга [15].

В нашем исследовании у больных группы APS1 была постоянно снижена киллерная активность нейтрофильных гранулоцитов (НГ) периферической крови до 5-17% (при 25-45% – у здоровых людей), а также продукция IFN- α – от 5 до 20 пг/мл против 100-500 пг/мл – у здоровых лиц (табл. 3, Рис. 2, 3).

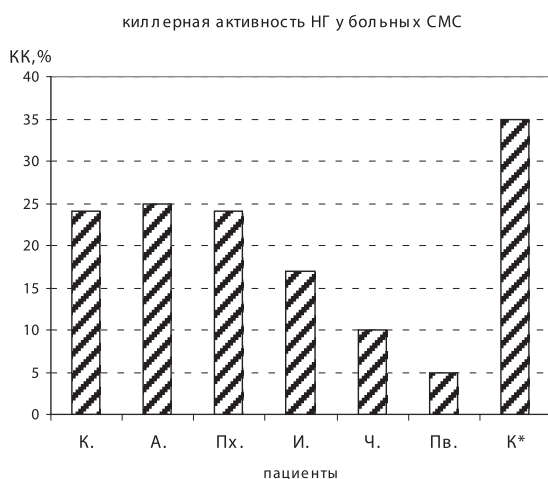


Рис. 3. Нарушение киллерной активности нейтрофилов ПК при СМС

При этом уровень IFN- γ и IL10 не отличался от контроля у двух пациентов, а содержание IL17 было понижено только у больного Ч. Известно, что этот синдром сопровождается появлением множества АУАТ, в том числе – у больных обнаружили АУАТ к цитокинам, синтезируемым Th-17 [7,9], что может быть причиной снижения содержания IL17 в сы-

воротке. Однако антитела к этим цитокинам могут нарушать ход иммунного ответа на стадии раннего инициативного воспаления, в частности, экранируя соответствующие рецепторы и механизм аутокринной регуляции образования как самих Th-17, так и выработки ими цитокинов. Соответственно, контроль за ростом и размножением *Candida* spp., постоянно или периодически присутствующих на барьерных тканях, как нам представляется, может быть нарушен, что будет сопровождаться появлением клинических признаков *Candida*-инфекции.

Таким образом, иммунопатогенез *Candida*-инфекции у всех представленных пациентов, даже при генетических поломках в одних и тех же генах, весьма разнообразен. При этом во всех случаях, по данным иммунологических исследований, выявляли нарушения продукции цитокинов, ответственных за функциональную активность фагоцитов и Т-клеточного звена иммунитета. Однако эти дефекты, видимо, изначально обусловлены мутациями генов, ответственных за синтез различных молекул информационных путей внутри клеток врожденного иммунитета – продуцентов цитокинов, участников иммунного воспаления и адаптивного ответа.

В зарубежной научной литературе описаны другие мутации [11-14] (Рис.1), следствием которых могут быть дефекты функции рецептора Dectin-1 и маннозного рецептора, исключительно значимых паттерн-распознающих рецепторов (PRR) для первичного распознавания, организации раннего воспалительного ответа для быстрой элиминации грибов, предотвращения их размножения и развития инфекции на тех барьерных тканях, на которых всегда в ассоциациях в норме могут присутствовать *Candida* spp. [1-4, 6, 10-14]. Например, установлено, что мутация CLEC7A (C-type lectin domain family 7, member A) – гена, кодирующего образование рецептора Dectin-1, вызывает потерю 10 аминокислот в экстрацеллюлярном углеводород-распознающем домене протеина. В результате АПК, в частности, макрофаги не могут связывать – распознавать β -глюканы грибов. Соответственно, этот дефект приводит к отсутствию синтеза IL6, TNF- α и, особенно, IL17, хотя нейтрофильные гранулоциты больных могут нормально поглощать и убивать *S. albicans*. Подобным иммунологическим результатом также сопровождаются выявленные дефекты функции внутриклеточного молекулярного участника информационного пути CARD9 (Caspase recruitment domain-containing protein 9) и мутации в соответствующем гене при полноценности рецепторов [10, 12]. Следует еще раз уточнить, что все современные находки: мутации генов, ответственных за образование, функции рецепторов, участников информационных путей и цитокинов касаются, прежде всего, клеток врожденного иммунитета, хотя более полувек считали, что синдром СМС возникает только на фоне первичного иммунодефицита Т-системы иммунитета [1-6].

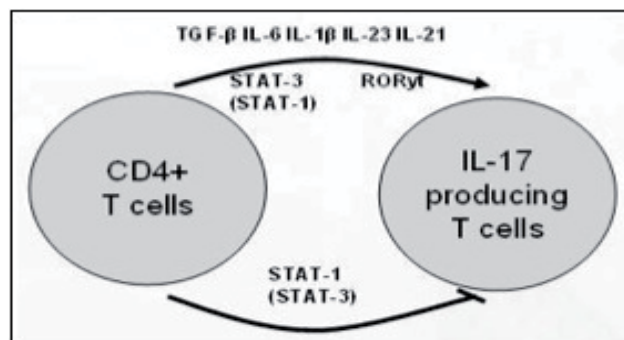
Такое мнение сложилось, потому что на том этапе

развития иммунологии постоянно обнаруживали нарушения Т-эффекторных функций: отрицательную или слабо выраженную кожную реакцию гиперчувствительности замедленного типа только на антигены (АГ) гриба и/или на другие облигатные АГ и митогены, снижение или отсутствие *in vitro* пролиферативного ответа Т-ЛФ в ответ только на АГ *Candida* и/или также на другие АГ (туберкулин, например) и ФГА, снижение образования лимфокинов (МИФ и др.), снижение числа Т-ЛФ и клеток их субпопуляций – Т-хелперов и Т-цитотоксических (Th и Tc) [1-6]. Также выявили снижение содержания и функциональной активности натуральных киллерных клеток, нарушение экспрессии разнообразных рецепторов на Т-ЛФ, в том числе – к IL2, нарушение синтеза IL2 и баланса образования растворимых факторов в условиях *in vitro* при стимуляции АГ гриба, фитогемагглютинином, конканавалином А, гистамином, изменение соотношения цАМФ в ЛФ и плазме, усиление выработки IgE с появлением и преобладанием у больных СМС кожной реакции гиперчувствительности по немедленному типу к АГ гриба, а также нарушения функций фагоцитов (Сардыко (Шабашова) Н.В., 1991; 1998.) [3]. Позже в работах [1-4, 6, 13] было показано, что для эффективной защиты от инвазии гриба требуется активный синтез Th1-цитокинов, и Th1-тип ответа ассоциируется с устойчивостью, а Th2-ответ – с чувствительностью к кандидозу. Сейчас стало очевидно, что все эти, обнаруженные ранее при СМС, нарушения функций Т-ЛФ не являются первичными, а зависят, по-видимому, от генетически обусловленных дефектов клеток врожденной защиты: на уровне PRR, внутриклеточных путей передачи информации для синтеза тех же рецепторов, антимикробных факторов и цитокинов [6, 13, 15].

У больных APS1 причиной *Candida*-инфекции, по-видимому, является дефект регуляции воспаления на уровне Т-регуляторных клеток, что сопровождается повышенным образованием провоспалительных цитокинов инициативного раннего воспаления и АУАТ к ним. Это способствует значительному повреждению собственных тканей хозяина, размножению и усилению вирулентности условно-патогенных грибов рода *Candida* [7, 9, 13]. Однако мутации гена регулятора сопровождаются и другими, в том числе – аутоиммунными патологическими процессами, зачастую гораздо более выраженными и серьезными для жизни пациентов, требующими постоянного наблюдения эндокринолога и, даже, гормонозаместительной терапии. Это последнее правило не исключается и для больных СМС, поскольку у них также могут развиваться эндокринопатии. С нашей точки зрения, было бы разумным проводить генетическое тестирование AIRE-гена у всех больных СМС. Не исключено, что такое обследование может дать

неожиданные результаты.

Таким образом, по данным наших наблюдений и международных исследований последних лет, первичные иммунодефициты у больных СМС могут быть, в первую очередь, обусловлены мутациями генов, ответственных за образование и функции участников внутриклеточных путей передачи информации, начиная с PRR, в клетках врожденного иммунитета. Это приводит к дисрегуляции образования цитокинов раннего инициативного и более позднего Т-клеточного воспаления (Рис. 4).



- В результате нарушения структуры полностью теряется или изменяется функция белка → нарушается путь передачи информации для преобразования Th0 в Th17, синтез их цитокинов и все функции этих клеток → дефект ранней инициативной фазы защитного воспаления, привлечение нейтрофильных гранулоцитов, образование АМП → нарушение клиренса грибов → поверхностная *Candida*-инфекция.
- Другие мутации этого гена **нарушали не только функции Th17, их цитокинов, но и путь IL12/INFγ/Th1**
- Но наиболее постоянным был дефект функции Th17, выработки их цитокинов при любой мутации.

Рис. 4. Роль мутаций STAT1 в нарушении Т-клеточной регуляции иммунного ответа

В результате нарушается контроль за размножением и элиминацией *Candida* spp., и развивается хроническая *Candida*-инфекция барьерных тканей разной степени выраженности, распространенности и с разной частотой рецидивов. Однако неспособность организма очищаться от *Candida* spp. базируется, по-видимому, на комплексном и/или гетерогенном иммунном дефекте(ах) или различных дефектах в одном и том же **пути иммунного ответа, необходимого исключительно для защиты от *Candida***. Причинами этих дефектов являются известные или еще неизвестные генетические дефекты. Поэтому разные группы больных или отдельные пациенты имеют различные клинические симптомы, но у них **всегда есть селективная чувствительность к кандидозу барьерных тканей и СМС**.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. *Shoham S. and Levitz S.M.* The immune response to fungal infections//British J. of Immunol. – 2005. – №129. – P. 569-582.
2. *Brown G.D. and Netea M.G. (eds.)* Immunology of Fungal infections. Springer. – The Netherlands, 2007. – 487 P.
3. *Шабашова Н.В.* Иммунодефициты при хроническом кандидозе кожи и слизистых оболочек // Проблемы медицинской микологии. – 2009. – Т. 11, №1. – С. 3-10.
4. *Lilic D.* Candida. Chapter 16 / In: Brown G.D. and Netea M.G.(eds.) Immunology of Fungal infections. – London, 2007. – P. 361-382.
5. *Eyerich K., Eyerich S., Hiller J., et al.* Chronic mucocutaneous candidiasis from bench to bedside // Eur. J. Dermatol. – 2010. – Vol. 3, №20. – P. 260-265.
6. *Шабашова Н.В.* Хронический кандидоз кожи и слизистых оболочек и иммуногенетические механизмы врожденной чувствительности макроорганизма к грибам рода *Candida* // Проблемы медицинской микологии. – 2012. – Т. 14, №4. – С. 20-28.
7. *Orlova E.M., Bukina A.M., Kuznetsova E.S., et al.* Autoimmune polyglandular syndrome type 1/ In: Russian patients: clinical variants and autoimmune regulator mutations // Horm. Res. Paediatr. – 2010. – Vol.73, № 6. – P. 449-457.
8. *Notarangelo L., Casanueva J.-L., Conole M.E. et al.* For the International Union of Immunological Societies (IUIS) Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee // J. Allergy Clin. Immunol. – 2006. – №117. – P. 883-896.
9. *Puel A., Doffinger R., Natividad A., et al.* Autoantibodies against IL-17A, IL-17F and IL-22 in patients with chronic mucocutaneous candidiasis and autoimmune polyendocrine syndrome type 1 // J. Exp. Med. – 2007. – Vol. 207, №2. – P. 291-297.
10. *Glocker E.-O., Hennigs A., Nabavi M., et al.* A homozygous CARD9 mutation in family with susceptibility to fungal infections // N. Engl. J. Med. – 2009. – Vol. 361, №18. – P. 1727-1735.
11. *Veerdonk F.L., Plantinga T.S., Hoischen A., et al.* STAT1 Mutations on autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis // N. Engl. J. Med. – 2011. – Vol. 365. – P. 54-61.
12. *Netea M. G., van der Meer J.W.M.* Immunodeficiency and genetic defects of pattern-recognition receptors // N. Engl. J. Med. – 2011. – Vol. 364, №6. – P. 60-70.
13. *Romani L.* Immunity to fungal infections // Nat. Rev. Immunol. – 2011. – Vol.11, №4. – P.275-288.
14. *Lionakis M.S.* Genetic Susceptibility to Fungal Infections in Humans // Curr. Fungal. Infec. Rep. – 2012. – Vol.6, №1. – P. 11-22.
15. *Soltész B., Toth B., Shabashova N., et al.* New and recurrent gain-of-function *STAT1* mutations in patients with chronic mucocutaneous candidiasis from Eastern and Central Europe // J. Med. Genetics. – 2013. – Vol. 50. – P. 567-578.

Поступила в редакцию журнала 11.11.2013

Рецензент: Н.П. Елинов



МИКОЗЫ ПРИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

¹Корнишева В.Г. (профессор кафедры)*, ²Могилева Е.Ю. (врач-дерматовенеролог)

¹Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (кафедра дерматовенерологии), г. Санкт-Петербург;

²Орловский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, г. Орел, Россия

© Корнишева В.Г., Могилева Е.Ю., 2013

В статье представлен обзор литературы по заболеваемости кандидозом, дерматомикозами, отрубевидным лишаем, криптококкозом, аспергиллезом, пневмоцистозом среди больных с ВИЧ-инфекцией.

Ключевые слова: аспергиллез, ВИЧ, дерматомикозы, кандидоз, криптококкоз, Malassezia, пневмоцистоз, разноцветный лишай, Rhodotorula, себорейный дерматит, СПИД

MYCOSES AT HIV-INFECTED. A REVIEW OF LITERATURE

¹Kornisheva V.G. (professor of the chair), ²Mogileva E.Yu. (dermatologist)

¹North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov (chair of dermatovenereology); ²Orel Regional center of prophylaxis and fight with AIDS and infectious diseases, Orel, Russia

© Kornisheva V.G., Mogileva E.Yu., 2013

The literature review on the incidence of candidosis, dermatomycosis, pityriasis versicolor, cryptococcosis, aspergillosis, pneumocystosis in patients with HIV infection has been presented in this article.

Key words: AIDS, aspergillosis, candidosis, cryptococcosis, dermatomycoses, HIV, Malassezia, pneumocystosis, Rhodotorula, seborrheic dermatitis, tinea versicolor

С 2004 г. во всех субъектах Российской Федерации возрастает заболеваемость ВИЧ-инфекцией. Среди вновь заразившихся 73% составляют молодые люди в возрасте от 15 до 29 лет [1, 2].

У ВИЧ-инфицированных пациентов из оппортунистических инфекций микозы являются частыми и нередко первыми клиническими маркерами прогрессирования иммунодефицита. На ранних стадиях основного заболевания отмечают поверхностное поражение грибами кожи и слизистых оболочек, на поздних стадиях ВИЧ-инфекции – инвазивные поражения. Встречаемость микотических инфекций у ВИЧ-инфицированных лиц колеблется от 23,8% до 90,1% [3-6]. Сочетание двух и более клинических разновидностей микотической и вирусной патологий наблюдают у 87,8% больных [3].

Из всех микотических поражений при ВИЧ-инфекции наиболее часто выявляют кандидоз. [7,8]. Риск развития кандидоза и рост резистентности к традиционной антимикотической терапии находится в прямой зависимости от стадии ВИЧ-инфекции [9].

Кандидоз слизистых оболочек является ранним проявлением ВИЧ-инфекции и имеет место у 48-85% инфицированных [10, 11]. Рахманова А.Г., Лобзин Ю.В. [9] орофарингеальный кандидоз установили у 20 ВИЧ-инфицированных пациентов (32%). Сроки от момента инфицирования до развития кандидоза пищевода колебались от 3 до 13 лет (в среднем, 6,8 лет), развитию предшествовал и сопутствовал кандидоз слизистой оболочки ротовой полости. У 50% больных кандидоз пищевода был первым проявлением ВИЧ-инфекции. Кандидоз с поражением пищевода, трахеи, бронхов, легких наблюдали у 19,4% пациентов, при этом поражение трахеи и бронхов отмечали у 11,3%. Данные варианты кандидоза обычно обнаруживали у больных на стадии СПИДа, преимущественно при $CD4 < 200/мм^3$. Частота выявляемости орального кандидоза при $CD4$ 200-500 клеток/ $мм^3$ составляла 33%, при $CD4 < 100$ клеток/ $мм^3$ – 44%, а смертность от генерализованного кандидоза – 3,3% [9].

Кандидоз ротовой полости, в зависимости от стадии заболевания, регистрируют у больных на стадии ВИЧ в 21-32,7% случаях, на стадии СПИДа – в 74-84,6% [12-14]. По данным [4], кандидоз диагностировали у 69,1% больных (орофарингеальный – у 72 пациентов, распространённые формы – у 22, ангулярный хейлит – у 13). При орофарингеальном кандидозе уровень $CD4$ -лимфоцитов составил 283 ± 32 клеток в 1 мкл ($n=37$); при распространённых формах – 132 ± 43 клеток в 1 мкл ($n=18$) [4].

В работе [15] авторы сообщают об установлении диагноза орофарингеального кандидоза у 44% ВИЧ-инфицированных пациентов: на первой стадии – у 27 (25%), на второй – у 10 (71%), на третьей – у 25 (86%), на четвертой – у 9 (100%). *Candida albicans* обнаружили у 49 (69%) больных. Наиболее распространенной оказалась эритематозная (атрофическая) форма

* Контактное лицо: Корнишева Вера Гавриловна, Тел.: (812) 303-51-47



УСТРОЙСТВО ДЛЯ ПРОТИВОГРИБКОВОЙ ОБРАБОТКИ ОБУВИ «ТИМСОН»



- Уничтожит грибок
- Уничтожит бактерии
- Уничтожит запах пота
- Высушит Вашу обувь

Клинически доказано,
эффект достигается
после 4-6 часов
обработки обуви.

Рекомендовано
Минздравом России

Тел.: +7 (495) 787-44-17
Сайт: gribkov.net

Спрашивайте в аптеках города!

кандидозного стоматита, которую диагностировали у 24 (43%) пациентов. Apwar K. и соавт. [16] наблюдали кандидоз ротовой полости у 71,2% больных с уровнем CD4 менее 200 клеток/мм³.

У 89% ВИЧ-инфицированных детей, находящихся в 3-ей стадии заболевания, регистрировали кандидоз ротовой полости, а также системные микозы. Наличие орального кандидоза у ВИЧ-позитивных лиц, а также его сочетание с туберкулезом, являлись индикатором перехода ВИЧ-инфекции в стадию СПИДа [17].

По данным Бариновой А.Н. и соавт. [12], у всех ВИЧ-инфицированных пациентов с кандидозом в 28,8% случаев развивался кандидоз полости рта, в 35,5% – орофарингеальный кандидоз, персистирующий и генерализованный вульвовагинит – в 3,72% и 5,19% соответственно, инвазивный кандидоз – в 1,24%. При поверхностном кандидозе среднее число CD4 Т-лимфоцитов составило 240 клеток/мкл, при генерализованном – меньше 212 клеток/мл. Исследователи [18] выявили кандидозный вульвовагинит у ВИЧ-инфицированных женщин в 88,8% случаев, в то время как у ВИЧ-негативных – в 58,6%. Наряду с поражением слизистой оболочки полости рта, отмечают кандидозный хейлит, кандидозный синусит, кандидозные онихии, с более частым поражением ногтевых пластинок кистей, кандидоз крупных складок и перианальной области, кандидозный эпидидимит, висцеральный кандидоз [3, 15].

С внедрением высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ), в том числе ингибиторов протеазы, значительно сократилась распространенность кандидоза ротоглотки и пищевода у ВИЧ-инфицированных пациентов – в первые 12-24 месяцев после внедрения ВААРТ она снизилась с 50% -80% до ~ 10% [19]. Huang X. и соавторами [20] наблюдали пациентов с CD4 +-клеток <200 мкл, у которых кандидоз диагностировали в 25,8%, дерматомикозы – в 10,6%, причем на фоне использования ВААРТ эти показатели снизились до 0% и до 3,5% соответственно.

Гастроинтестинальная локализация кандидоза у больных СПИД может быть источником кандидемии, которую у этих пациентов при других локализациях кандидоза выявляют всего в 1% случаев [17]. В работе [21] авторы наблюдали 9 случаев инвазивного кандидоза у ВИЧ-инфицированных на 2В-4Б, 4В стадиях (при уровне CD-4 лимфоцитов 57-660 кл/мкл). *C. albicans* и *C. glabrata* были выделены из крови и трупного материала. В 5 случаях обнаружили ассоциацию грибов и бактерий.

Механизмы возникновения кандидоза слизистых оболочек у ВИЧ-инфицированных лиц аналогичны таковым у иммунокомпетентных пациентов. При колонизации организма *Candida spp.*, в отличие от *Candida*-носительства, имеет место адгезия клеток гриба к эпителию слизистых оболочек за счет специфических ферментов – коагулазы, каталазы, кезиназы, фосфолипазы, протеиназы. Cassone A. с со-

авторами [22] считают, что комменсализм *Candida spp.* является результатом мощных врожденных и адаптивных иммунных реакций хозяина, которые ограничивают рост потенциально опасного микроба в эпителии человеческого организма. Среди них важную роль отводят Th17, количество которых прогрессивно уменьшается при ВИЧ-инфекции, что способствует проявлению патогенных свойств *Candida spp.* При этом грибы подавляют активность таких защитных компонентов, как комплемент и дефензины эпителия (histatin-5 and E-cadherin). Среди ВИЧ-негативных пациентов *C. albicans* как патоген орофарингеального кандидоза выявляют в 70-80% случаев, *C. glabrata* и *C. tropicalis* – в 5-8% [23]. У ВИЧ-инфицированных пациентов с низким уровнем CD4 лимфоцитов и у больных, ранее интенсивно леченных азоловыми препаратами, в 10-15% случаев инфекция была вызвана разными штаммами (не *C. albicans*), нечувствительными к флуконазолу. Большинство этих штаммов составляли *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis* [17]. При обследовании 50 ВИЧ-инфицированных женщин с урогенитальным микозом у 46 (51,1%) обнаружили *C. albicans*, у 4 (4,4%) – *C. glabrata*, у 6 (6,7%) – *C. tropicalis* [24].

Nilima K. и соавт. [25] выявили кандидоз слизистых оболочек у 62,8% ВИЧ-инфицированных детей, из которых у 70,4% регистрировали *C. albicans*, у 29,6% – не-*albicans* виды *Candida* (*C. kefyr*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*). У 30% ВИЧ-инфицированных лиц из полости рта были выделены *C. dubliniensis*, которые связали с инвазивным кандидозом. У здоровых лиц этот вид является незначительным комменсалом микробиоты ротовой полости [16]. Junqueira J.C. с соавт. [26] при исследовании состава биопленки ротовой полости и кишечника у ВИЧ-инфицированных пациентов обнаружили *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. norvegensis*, *C. dubliniensis*. Возбудителями инвазивного кандидоза были *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr*. Авторы отмечают, что максимальными инвазивными свойствами обладали *C. albicans*, независимо от места ее локализации в организме. Исследователи [27] при обследовании иммунокомпromетированных пациентов (с нейтропенией на фоне онкопатологии, недоношенных новорожденных, больных после хирургического лечения) установили, что в 40,9% случаев кандидемия была вызвана *C. albicans*, в 20,9% – *C. tropicalis*, в 20,5% – *C. parapsilosis* и в 4,9% – *C. glabrata*. Таким образом, с помощью скрининга ВИЧ-инфицированных пациентов на наличие орофарингеального кандидоза можно определить в выборе и начале антиретровирусной терапии. Идентификация *Candida spp.* до вида необходима для выбора адекватного лечения.

При терапии орофарингеального кандидоза используют сочетание местных (нистатина, клотримазол и др.) и системных форм антимикотиков (кетоконазол, флуконазол, итраконазол, позаконазол, вориконазол, каспофунгин, микафунгин и

анидулафунгин) [28]. Jose A. с соавторами [29] при лечении орофарингеального кандидоза у ВИЧ-инфицированных больных выявили эффективность флуконазола (50 мг/сут) в течение 10 дней или по 100 мг/сут в течение 5-7 дней. Однако в настоящее время появилась информация о нарастающей резистентности *C. albicans* к флуконазолу [16]. Vazquez J.A. [23] выделяет несколько основных факторов риска, связанных с развитием флуконазол-устойчивых форм *Candida*-инфекции у больных СПИД, по сравнению с пациентами без таковых. Эти факторы риска включают большее количество эпизодов орофарингеального кандидоза (6,1% против 1,8%), низкое количество CD4+клеток (11 против 71 клеток/мм³), более длительную среднюю продолжительность антимикотической терапии (419 против 118 дней) и более длительное применение системных азолов (272 против 14 дней). Для лечения больных, имеющих флуконазол-устойчивые формы кандидозного эзофагита, показано применение раствора итраконазола, позаконазола, вориконазола или препаратов из класса эхинокандинов (каспофунгина, микафунгина, анидулафунгина), которые по эффективности сравнимы с флуконазолом [30-33]. Применение эхинокандинов считают второй линией терапии при кандидозном эзофагите у ВИЧ-инфицированных пациентов. Однако их использование ограничено из-за отсутствия пероральных лекарственных форм [23]. Для лечения орофарингеального кандидоза, кандидозного эзофагита эффективнее оказывали действие водные препараты итраконазола, чем капсулированные, и добавление к ним циклодекстрина улучшало клинический эффект антимикотика [34]. Отметим роль высокоактивной антивирусной терапии на наличие устойчивой микотической инфекции у ВИЧ-инфицированных больных. При выполнении только ВААР без антимикотической терапии возникала эрадикация рефрактерного орофарингеального кандидоза [33, 35].

Дерматомикозы выявляют у 8-29% ВИЧ-инфицированных больных и не намного чаще, чем у ВИЧ-негативных лиц [36-39]. Rajesh R. с соавт. [40] при обследовании 238 ВИЧ-инфицированных пациентов с кожной патологией в 56 случаях выявили дерматомикозы. Основным возбудителем микоза гладкой кожи был *Trichophyton rubrum*. Umogu D. и др. [41] наблюдали 200 ВИЧ-положительных детей в возрасте от 5 до 12 лет, из них у 16% диагностировали дерматомикоз с преобладанием поражения волосистой части головы. У детей с 1-й стадией ВИЧ-инфекции дерматомикоз выявили у 6%, со 2-й стадией – у 43,7%, с 3-й – у 37% и с 4-й стадией – у 12,6%. Предрасполагающие факторы к развитию микотического поражения кожи как у ВИЧ-инфицированных пациентов, так и у ВИЧ-негативных, одинаковы [42]. Gniadek A. с соавт. [43] не обнаружили у ВИЧ-больных зависимости между наличием дерматомицетов и иммунологическим статусом, сексуальной ориентацией пациентов и антиретровирусным лече-

нием. ВИЧ-инфекция не была столь важным фактором для микотического поражения. Основным фактором был контакт с патогеном.

Surjushe A. и соавт. [38] из 250 обследованных ВИЧ-инфицированных лиц у 60 клинически заподозрили микотическое поражение: у 38 – онихомироз стоп, у 12 – онихомироз кистей, у 10 – сочетание онихомироза кистей и стоп. Дистальный и латеральный поверхностный онихомироз диагностировали у 21 (35%) респондентов, тотальный дистрофический онихомироз – у 33 (55%), проксимальный подногтевой онихомироз – у 5 (8,33%), белый поверхностный онихомироз – у 1 (1,66%). Дерматомицеты выделяли у 13 (21,66%) больных, недерматомицеты – у 19 (31,66%) (*Aspergillus niger*, *Cladosporium* spp., *Scytalidium hyalinum*, *Penicillium* spp., *Gymnoascus dankaliensis*). Из 13 дерматомицетов в 11 случаях был получен рост *Trichophyton rubrum* и 2 культуры *T. mentagrophytes*. Белую поверхностную форму онихомироза наблюдали у 9,5% ВИЧ-инфицированных лиц, и ее чаще идентифицировали с *T. rubrum* [44]. Для ВИЧ-инфицированных пациентов характерен проксимальный подногтевой онихомироз. *T. rubrum*, поражая ногтевую пластинку, инфицирует проксимальную часть ногтевого ложа [45]. У 187 ВИЧ-инфицированных больных с кожной патологией исследователи [46] выявили следующие заболевания: микоз кистей и стоп с онихомикозом у 3 (4,84%), онихомироз кистей и стоп – у 10 (16,13%), микоз стоп с онихомикозом – у 30 (48,39%), онихомироз стоп – у 19 (30,65%), отрубевидный лишай – у 3 (1,42%), себорейный дерматит – у 5 (2,38%). Онихомироз стоп у больных с 4 стадией ВИЧ-инфекции был тотальным также у подавляющего большинства пациентов с поражением околоногтевых валиков. У ВИЧ-инфицированных лиц не отмечали корреляции между наличием онихомикоза и низким уровнем CD4+ клеток [47]. При лечении онихомикоза при ВИЧ-инфекции флуконазолом (в дозе 150 мг однократно в неделю) или тербинафином (в дозе 250 мг ежедневно в течение 12 недель) обеспечивали сходный терапевтический эффект [48, 49]. Частота рецидивов составила в группах 20% и 15% соответственно [48].

Malassezia spp. обнаруживают в составе временной или постоянной микобиоты кожи примерно у 90% населения [50]. В то же время, *Malassezia* spp. вызывают развитие разноцветного лишая (синонимы: отрубевидный лишай, pityriasis versicolor) или *Malassezia*-фолликулита у лиц, предрасположенных к этим заболеваниям, а также при иммунодефицитных состояниях, декомпенсации эндокринных заболеваний и т.д. В настоящее время доказана ключевая роль *Malassezia* spp. в развитии себорейного дерматита [51], установлено также, что они влияют на характер течения атопического дерматита и себорейного псориаза [50]. При длительном применении иммуносупрессивных препаратов у онкологических, гематологических больных и пациентов, перенесших трансплантацию костного мозга или внутренних

органов, стали развиваться септические состояния, обусловленные *Malassezia* spp. [52]. Эти грибы (липидозависимые) относят к сапробионтам, липофилным, дрожжеподобным, базидиомицетам – *M. globosa*, *M. restricta*, *M. furfur* и др. Изменение химического состава кожного сала (снижение соотношения сквален/триглицериды) способствует гиперколонизации кожи дрожжеподобными грибами и переходу их в патогенную – мицелиальную форму [53-55].

Отрубевидный лишай – инфекционное заболевание кожи, вызванное *Malassezia* spp., характеризуется поражением рогового слоя эпидермиса. Gupta A.K. и соавт. [56] при обследовании 112 пациентов с диагнозами себорейный дерматит, атопический дерматит, разноцветный лишай и СПИД выявили различные виды *Malassezia* spp., из которых наиболее часто у ВИЧ-положительных пациентов с разноцветным лишаем регистрировали патогенную разновидность – *M. globosa*, у больных с себорейным дерматитом – *M. sympodialis*.

При лечении отрубевидного лишая используют фунгицидные средства в виде растворов, шампуней, кремов (кетоконазол, клотримазол, бифоназол, циклопирокс, нафтифин, тербинафин). Более удобной формой лекарственного вещества для применения является спрей. Все антимикотические наружные средства назначают 2 раза в сутки в течение 1-2 недель. Кетоконазол обладает более высокой активностью в отношении *Malassezia* spp., подавляя их рост в концентрациях, в 25-30 раз меньших, чем остальные антимикотики, и в несколько раз меньших, чем любые системные препараты. При нанесении местных форм кетоконазола на кожу эффективные концентрации сохраняются внутри и на поверхности эпидермиса в течение 72 часов после отмены препарата, что можно объяснить сродством препарата к кератинизированным тканям. Цинка пиритион, селена сульфид также оказывают прямое антимикотическое действие. Системное лечение показано пациентам с распространенной формой заболевания, которые не реагируют на местную терапию или у которых часто имеют место рецидивы, при этом применяют итраконазол, кетоконазол в дозе 200 мг в сутки 7 дней, флуконазол 400 мг однократно; системный тербинафин менее эффективен, чем его наружные формы [57].

Malassezia-фолликулит – инфекция волосяного фолликула, вызванная теми же дрожжевыми грибами, что и отрубевидный лишай, и представляет собой отдельно расположенные папуло-пустулезные высыпания, локализующиеся на верхней половине туловища и плечах [56].

В лечении *Malassezia*-фолликулита следует придерживаться тех же принципов, что и в терапии отрубевидного лишая, но предпочтительнее сочетать системный кетоконазол (по 200 мг ежедневно в течение 4 недель) с наружными антимикотиками [56].

Malassezia spp. также принимают участие в воз-

никновении себорейного дерматита (СД). С очагов поражения при СД, по сравнению с результатами обследования здоровой кожи (46%), наиболее часто высевали *M. globosa*, *M. restricta*, *M. furfur* (83%) [54]. Rincón S. и соавт. [58] выделяли с кожи дерматологических больных *M. globosa* (37,5%), *M. sympodialis* (31,3%), *M. furfur* (31,3%). *M. globosa* преобладала у пациентов с отрубевидным лишаем (67%) и у ВИЧ-инфицированных пациентов с СД (85%). У ВИЧ-отрицательных пациентов с атопическим дерматитом или СД *M. furfur* и *M. restricta* были обнаружены в 72% и 26% случаев соответственно.

У ВИЧ-инфицированных пациентов СД появляется рано, встречается чаще, протекает тяжелее и трудно поддается лечению, чем у лиц без ВИЧ-инфекции. СД у ВИЧ-инфицированных лиц развивается при уровне CD4 – 450-550 кл/мкл и ниже. Низкое содержание CD4 клеток предрасполагает к более интенсивным и распространенным высыпаниям СД, сопровождающимся зудом [59-61]. Частота встречаемости СД у ВИЧ-инфицированных различна и незначительно зависит от стадии иммунодефицита. В начальной стадии ВИЧ-инфекции страдают СД 24% больных, при СПИДе – 30,3% [62]. Впервые развившийся СД или его легкое обострение у пациента с установленной ВИЧ-инфекцией может соответствовать переходу бессимптомной фазы ВИЧ-инфекции в клинически выраженную [62]. Точный механизм, под действием которого вирус иммунодефицита способствует атипичному и взрывному началу СД и других распространенных воспалительных заболеваний кожи, не известен. Изучали плотность обсемененности кожи грибами *Malassezia* и влияние факторов питания [63]. Независимо от наличия кожной патологии, при ВИЧ-инфекции в кожном сале снижается содержание свободных жирных кислот и значительно возрастает уровень триглицеридов и сквалена [64, 65]. Prohic A., Kasumagic-Halilovic E. [66] исследовали у 50 пациентов (из них у 20 – ВИЧ-инфицированных) кожные чешуйки с волосистой части головы. В обеих группах наиболее часто выявляли *M. restricta* и *M. globosa*. Существенных различий между полученными результатами обследования у ВИЧ-позитивных и ВИЧ-негативных пациентов не наблюдали.

При СД рекомендуют диету с низким содержанием углеводов, животных жиров, алкоголя; правильный уход за пораженной кожей (температурный режим мытья, ограничение посещений саун, применения косметических декоративных средств). Внутри таким пациентам показаны ферментные препараты, биогенные стимуляторы, витамин А (или бета-каротин), витамины группы В (особенно В1, В2, В6), D, E, аскорбиновая и никотиновая кислоты, биотин, глицерофосфат, препараты серы, кальция, меди, железа, окись цинка. Из физических методов применяют дарсонвализацию и криомассаж кожи волосистой части головы, индуктотермию области надпочечников, лазеропунктуру, транскраниальную электростимуляцию ствола мозга [67].

В перечень средств для лечения СД входят азолы, аллиламины, топические иммуномодуляторы и различные неспецифические агенты [51, 52], но ведущую роль отводят антимикотическим препаратам. Высокий профилактический эффект оказало использование один раз в неделю 2% шампуня с кетоконазолом [68]. Установлено, что кетоконазол *in vitro* более эффективен, чем другие азольные соединения, такие, как флуконазол, эконазол, клотримазол и миконазол. Устойчивых форм *Malassezia* spp. к кетоконазолу не обнаружили [69]. С целью подавления воспаления применяют топические стероиды и препараты цинка, азелаиновой кислоты. В качестве кератолитиков назначают наружные средства, содержащие салициловую кислоту и деготь, а также широко используют лечебные шампуни косметических марок. Нестероидные ингибиторы кальциневрина (такролимус, пимекролимус) подавляют провоспалительную активность Т-лимфоцитов и применяют наружно на очаги поражения. Эти препараты показаны в случаях торпидно текущего СД, особенно актуальны – при лечении СД у ВИЧ-позитивных пациентов [70-72]. При неэффективности наружной терапии рекомендуют в течение четырех недель назначение внутрь следующих системных антимикотических препаратов: кетоконазола (200 мг/сут), флуконазола (300 мг/нед), итраконазола (200 мг/сут) [69, 73-76].

В особо тяжелых случаях используют себосупрессивные препараты, например, изотретиноин, уменьшающий активность и размер сальных желез на величину до 90% и обладающий также противовоспалительным действием. Установили, что ежедневный прием препарата в суточной дозе от 0,1 до 0,3 мг/кг массы тела приводит к улучшению тяжелой себореи после 4-х недель лечения. В последующем можно эффективно поддерживать состояние в течение нескольких лет дозой препарата от 5 до 10 мг/сутки [77].

Dunic I. и соавт. [78] показали, что у ВИЧ-инфицированных пациентов с применением антиретровирусной терапии значительно возросла эффективность стандартных методов лечения СД. В течение 22 месяцев, на фоне проводимой ВААРТ, авторы наблюдали у 84,2% пациентов регресс СД. В группе больных, не получавших ВААРТ, разрешение СД отмечали в 41,2% случаев. Однако, по данным [68], регресс СД под влиянием ВААРТ был незначительным. Себорейный дерматит – это один из ранних кожных признаков у ВИЧ инфицированных лиц. При длительно текущем, торпидном к терапии СД необходимо обязательное обследование на ВИЧ инфекцию [68, 79].

Криптококкоз – оппортунистическая инфекция, в основном, поражающая иммуносупрессивных пациентов. Это заболевание выявляют у 13-23% больных ВИЧ-инфекцией, т.к. оно является одним из основных ВИЧ-ассоциированных инфекций и ярко проявляется в условиях иммунодефицита организма [80]. В Великобритании с 1990 г. ежегодно регистри-

руют от 17 до 66 случаев на 100 больных, имеющих СПИД [80]. Наиболее частые проявления криптококкоза – менингиты и менингоэнцефалиты, основной возбудитель которых *Cryptococcus neoformans*, реже – *C. neoformans* var. *gattii*. Другие виды криптококков широко распространены в природе и являются сапробами, которые (*C. laurentii*) редко также могут вызывать менингит у ВИЧ-инфицированных пациентов [81]. Васильева Н.В. [82] при выделении криптококков от пациентов в России установила, что эти грибы представляют молекулярные типы VNI, VNIII и VNIV, серотипам А, Д, АД и вариантам *C. neoformans* var. *grubii*, var. *neoformans* и var. *grubii*/var. *neoformans*, и что морфология тканевых форм гриба изменяется по мере снижения вирулентности. Наиболее вирулентные штаммы криптококка вызывают более тяжелые поражения головного мозга и легких, при этом формируется большее число очагов лизиса («цист») на фоне подавления воспалительной реакции. Менее вирулентные штаммы индуцируют гранулематозную реакцию при меньшем числе очагов лизиса. В ассоциациях с бактериями и микромицетами проявляются различные взаимоотношения криптококков. Возбудитель попадает в организм ингаляционным путем и поражает легкие, затем легко распространяется по организму, захватывая мозг. Особенно тяжело протекает криптококкоз ЦНС у больных злокачественными заболеваниями крови, у ВИЧ-инфицированных лиц, у пациентов, имеющих другие проявления иммунодефицитов, а также у детей в возрасте до 1 года. Диссеминированный криптококкоз выявляют у лиц с выраженным иммунодефицитом. До внедрения антиретровирусной терапии диссеминированный криптококкоз обнаруживали у 5-8% ВИЧ-инфицированных пациентов при количестве клеток CD4 менее 50 кл/мл. Стоярова Л.Ю. и соавт. [83] наблюдали у 80% ВИЧ-инфицированных лиц криптококковый менингит, который в начальной стадии отличался медленным развитием и отсутствием специфических симптомов. Авторы описывают случай генерализованного криптококкоза на фоне быстро прогрессирующей ВИЧ-инфекции. На стадии СПИД криптококкоз – причина летального исхода больных ВИЧ-инфекцией [84]. При исследовании различных жидких сред организма Parmar R. и соавт. [85] выделили *C. neoformans* у 4% ВИЧ-инфицированных больных. Для лечения криптококкового менингита, менингоэнцефалита применяют длительную терапию флуконазолом, позаконазолом и их комбинацией с амфотерицином В. Проспективным контролируемым исследованием показано, что прием флуконазола и итраконазола снижает частоту встречаемости криптококкоза среди ВИЧ-инфицированных пациентов с CD4 менее 50 кл/мл. При поражении мозга и его оболочек лечение включало амфотерицин В (7 мг/кг ежедневно) в сочетании с флуцитозином (100 мг/кг/сут в течение 2 недель) и последующим использованием флуконазола в дозе до 400 мг в сутки до 4-8 недель. Такую «поддержива-

ющую» терапию продолжали до нормализации количества CD4+ лимфоцитов и внутричерепного давления. К флуконазолу у *C. neoformans* резистентность отмечают редко, поэтому комбинация флуконазола (400-800 мг/сут) с флуцитозином была альтернативой комбинации амфотерицина В с флуцитозином [86].

Грибы рода *Aspergillus* широко распространены в окружающей среде. В организм человека они попадают ингаляционным путем с пылью, реже – через поврежденную кожу. В 90% случаев *A. fumigatus* вызывает аспергиллез у больных группы риска – получающих лечение по поводу рака или после пересадки органов на фоне иммуносупрессивной терапии и имеющих нейтропению, которая не характерна для ВИЧ инфицированных больных, поэтому аспергиллез редко наблюдают у ВИЧ-положительных пациентов. При исследовании соскобов кожи и отделяемого слизистых оболочек у ВИЧ-инфицированных пациентов Parmar R. и соавт. [85] высеивали *Aspergillus* spp. в 3% случаев. По данным Рахмановой А.Г. и соавт. [87], у ВИЧ-инфицированных лиц средняя частота инвазивного аспергиллеза составляет 4%, на поздних стадиях СПИД – 12%. Инвазивный аспергиллез легких (70%) – частая форма аспергиллеза у этой категории пациентов. Возбудители инвазивного аспергиллеза при ВИЧ-инфекции: *A. fumigatus* (84%), *A. flavus* (8%), *A. niger* (5%), *A. terreus* (3%). Первичный аспергиллез кожи у больных ВИЧ-инфекцией выявляют редко [88]. У ВИЧ-положительных лиц с аспергиллезом, не получавших антиретровирусную терапию, уровень CD4 клеток был менее 100 кл/мл [90]. Venson C. и соавт. [89] при обследовании 85% больных СПИД с инвазивным аспергиллезом отмечали у 25% – некротическую пневмонию, трахеобронхит, экстрапульмональные проявления инфекции, у 16% – диссеминированное поражение двух и более органов. Летальность при инвазивном аспергиллезе у ВИЧ-инфицированных пациентов составила 72-81%, медиана выживаемости после постановки диагноза – 10 месяцев.

Данные по лечению аспергиллеза у ВИЧ-инфицированных лиц не систематизированы. Venson C. и соавт. [89] рекомендуют начинать антифунгальную терапию с вориконазола. После стабилизации состояния больного возможно применение раствора итраконазола, который в качестве начальной терапии используют только у больных с умеренной иммуносупрессией. Обычный и липидный амфотерицин В, каспофунгин (50мг/сут) являются альтернативными препаратами. При неэффективности вориконазола применяют комбинированную терапию. Основными факторами, влияющими на благоприят-

ный исход заболевания, являются раннее лечение и эффективная ВААРТ.

Rhodotorula spp. – несовершенные дрожжи, базидиомицеты, широко распространенные в окружающей среде. Их обнаруживают в воздухе, морской воде, на растительном материале. На коже и ногтях человека *Rhodotorula* может присутствовать как сапробионт, колонизировать респираторный и мочевыделительный тракты. Некоторые виды – *R. mucilaginosa (rubra)* и *R. giutinis* составляют менее 0,5% культур, выделяемых из полости рта, и более 12% изолятов – из кала. В научной литературе имеются единичные сообщения об обнаружении этих грибов при менингитах, кератитах, системных микозах, сепсисе у иммунокомпрометированных лиц, в том числе ВИЧ-инфицированных. Менингиты у этой категории пациентов были обусловлены *R. mucilaginosa (rubra)*, *R. glutinis* [90-92].

Пневмоцистоз – наиболее частый оппортунистический микоз, как у больных СПИД, так и у пациентов, получающих кортикостероидную или интенсивную иммуносупрессивную терапию. Эта инфекция остается СПИД-маркерной, несмотря на введение высокоактивной антивирусной терапии. У 65% больных СПИДом это заболевание обнаруживают либо изолированно, либо в сочетании с другими оппортунистическими инфекциями. При СПИДе у больных с легочной патологией возбудитель пневмоцистоза выявляют в 90% случаев [93]. Без специфического лечения от пневмоцистной пневмонии (ПП) умирает 70% больных ВИЧ. У пациентов с ВИЧ-инфекцией в стадии СПИД из легких происходит диссеминация *Pneumocystis* с поражением лимфатических узлов, селезенки, костного мозга, печени, почек, головного мозга, поджелудочной железы, кожи и других органов [94]. Эффективность терапии свежей ПП у больных с ВИЧ-инфекцией достигает 75-80%. Только у 43% пациентов через 5 месяцев исчезают патологические изменения на рентгенограммах; у 10-40% возникают рецидивы, иногда – 5-7 раз в течение жизни. Несмотря на относительную эффективность лечения, средняя продолжительность жизни больного ПП с ВИЧ-инфекцией составляет около 9 месяцев; в течение 21 месяца умирает подавляющее большинство пациентов. Для лечения ПП рекомендуют триметоприм-сульфаметоксазол (котримоксазол): внутрь – 20 мг/(кг-сут)/100мг/(кг-сут) в 4 приема соответственно; внутривенно – 15 мг/(кг-сут)/75мг/(кг-сут) в 4 введения соответственно. В первые 3-5 дней после начала противопневмоцистного лечения имеет место выраженное ухудшение состояния, связанное с массовой гибелью паразитов. Рекомендуют кортикостероидные препараты [94].

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Малов И.В. Ратникова А.И. Вопросы оказания специализированной медицинской помощи пациентам с ВИЧ-инфекцией и заболеваниями, передающимися половым путем. Метод. мат.-лы. – М., 2011. – С. 223.
2. Покровский В.В. ВИЧ-инфекция и СПИД. Клин. рекоменд. – М., 2010. – 192 с.
3. Проценко О.А. ВИЧ-ассоциированные поражения кожи и слизистых оболочек// Междун. мед. журнал. – 2009. – №3. – С. 106-110.

4. Поддубная А.И., Чемич Н.Д. Грибковые поражения у ВИЧ-положительных лиц в северо-восточном регионе Украины // Проблемы медицинской микологии. – 2011. – Т. 13, №2. – С. 102.
5. Vermund S.H., Leigh-Brown A.J. The HIV epidemic: high-income countries// Cold Spring Harb. Perspect. Med. – 2012. – Vol. 2, №5. – P. 1-24.
6. Farrokh R., Ebrahim G., et al. The Relationship between skin manifestations and CD4 counts among HIV positive patients//Pak. J. Med. Sci. – 2008. – Vol. 24. – P. 114-117.
7. Pruthvi B., Vikram S., Suman S., et al. Spectrum of clinical presentation and opportunistic infections in HIV: An Indian scenario// 13th Int. Congress on Infect. Dis. – 2006. – С. 484.
8. Sanjeupandey, Sunder S., Hasan H., et al. Clinical profile and opportunistic infections in HIV/AIDS patients attending SS hospital Varanasi// Indian J. Prev. Soc. Medicine. – 2008. – Vol.1 & 2. – P. 39.
9. Рахманова А.Г., Лобзин Ю.В. и др. Удельный вес микозов в структуре вторичных заболеваний у больных ВИЧ/СПИДом // Проблемы медицинской микологии. – 2004. – Т. 6, №1. – С. 9-12.
10. Папуашвили М.Н. Клинико-эпидемиологический анализ ВИЧ и оппортунистических инфекций. Алгоритмы диагностики и прогнозирования//Иммунопатол., иммунол., аллергол. – 2002. – №4. – С. 88-92.
11. Mills E., Wu P., Ernst E. Complementary therapies for the treatment of HIV: in search of the evidence//J. STD AIDS. – 2005. – Vol. 16, №6. – P. 395-403.
12. Баринова А.Н., Плавинский С.П., Зайцева Е.Е. Микозы у ВИЧ-инфицированных больных//Проблемы медицинской микологии. – 2012. – Т. 14, №2. – С. 34-38.
13. Mulla S.A., Patel M.G., Vaghela G., et al. A study of opportunistic infection in HIVseropositive patients// Indian J. Community Med. – 2007. – Vol. 32. – P. 208-209.
14. Sahand I., Maza J., Eraso E., et al. Evaluation of CHROM-Pal medium for the isolation and direct identification of *Candida dubliniensis* in primary cultures from the oral cavity //J. of Med. Microbiol. – 2009. –Vol. 58. – P. 1437-1442.
15. Затолока П.А. Орофарингеальный кандидоз при ВИЧ-инфекции// Проблемы медицинской микологии. – 2009. – Т. 11, №2. – С. 74.
16. Anwar K., Malik A., Subhan K. Profile of candidiasis in HIV infected patients// Iranian J. of Microbiol. –2012. – Vol. 4. – P. 204-209.
17. Лесовой В.С., Липницкий А.В., Очкурова О.М. Кандидоз ротовой полости. (Обзор)// Проблемы медицинской микологии. – 2004. –Т. 6, №2. – С. 19-23.
18. Umeh E., Umeasanne B. HIV/vaginal *Candida* coinfection: Risk factors in women// J. of Microbiol. and Antimicrob. – 2010. Vol. 2, №3. – P. 30-35.
19. de Repentigny L., Lewandowski D., Jolicoeur P. Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection// Clin. Microbiol. Rev. – 2004. – Vol. 17. – P.729-759.
20. Huang X., Lee H.-L., et al. Clinical analysis of the damage of the skin in 796 Chinese HIV-infected patients// Acta Derm. Venereol. – 2011. – Vol. 91.
21. Чарушина И.П., Воробьева Н.Н. Инвазивный кандидоз при ВИЧ-инфекции//Проблемы медицинской микологии. – 2011. – Т.13, №2. – С. 118.
22. Cassone A, Cauda R. *Candida* and candidiasis in HIV-infected patients: where commensalism, opportunistic behavior and frank pathogenicity lose their borders//AIDS. – 2012. – Vol. 26, №12. – С. 1457-1472.
23. Vazquez J. Optimal management of oropharyngeal and esophageal candidiasis in patients living with HIV infection. HIV/AIDS// Research and Palliative Care. – 2010. – №2. – С.89-101.
24. Мартыничук Н.А. Лечение и профилактика микозов у ВИЧ-инфицированных пациентов// Biomed. and Biosoc. Anthropol. – 2008. – Vol. 11. – С. 83-84.
25. Nilima K., Thanki Ch., Lajwanti K., at al. Fungal infections in HIV infected children// J. Pediatr. – 2010. – P. 49-50.
26. Junqueira J., Fuchs B., Muhammed M., et al. Oral *Candida albicans* isolates from HIV-positive individuals have similar in vitro biofilm-forming ability and pathogenicity as invasive *Candida* isolates// BMC Microbiol. – 2011. – Vol. 11. – С. 247.
27. Nucci M., Queiroz-Telles E, Tobón A., et al. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America//Clin, Infect, Dis. – 2010. – Vol. 51,№5. – P. 561-570.
28. Vazquez J.A. Diagnosing and managing oropharyngeal candidiasis//Infect. Med. –2007. – Vol. 24. – P. 427-436.
29. Jose A., Vazquez J.A. Oropharyngeal and esophageal candidiasis in patients with HIV Infection: Oropharyngeal Candidiasis Therapy//HIV Therapy. – 2010. – Vol. 4, №3. – С. 1-19.
30. Cappelletty D. Eiselstein-McKitrick K. The echinocandins//Pharmacother. – 2007. –Vol. 27. – С. 369-388.
31. Skiest D.J., Vazquez J.A., Anstead G.M., et al. Posaconazole for the treatment of azole-refractory oropharyngeal and esophageal candidiasis in subjects with HIV infection//Clin. Infect. Dis. – 2007. – Vol. 44. – P. 607-614.
32. de Wet N.T., Bester A.J., Viljoen J.J., et al. A randomized, double blind, comparative trial of micafungin (FK463) vs fluconazole for the treatment of oesophageal candidiasis// Aliment Pharmacol, Ther. – 2005. –Vol. 21. – P. 899-907.
33. Krause D.S., Simjee A.E., van Rensburg C., et al. A randomized, double-blind trial of anidulafungin versus fluconazole for the treatment of esophageal candidiasis// Clin. Infect. Dis. – 2004. – Vol. 39. – С. 770-775.
34. Тертышников В.В. Клинико-эпидемиологическая характеристика некоторых микозов у ВИЧ-инфицированных женщин, находящихся в условиях пенитенциарной системы// Успехи современного естествознания. –2008. – №10 – С. 51-55.
35. Milosević I, Korać M, Brmbolić B. Diagnosis and treatment of esophageal diseases in patients with acquired immunodeficiency syndrome in Serbia// Med. Pregl. – 2010. – Vol. 63, № 11-12. – С. 779-783.
36. Ramos-E-Silva M., Lima C.M., Schechtman R.C., et al. Superficial mycoses in immunodepressed patients (AIDS) // Clin. Dermatol. – 2010. – Vol. 2. – P. 217-225.
37. Sud N., Shanker V., Sharma A., et al. Mucocutaneous manifestations in 150 HIV-infected Indian patients and their relationship with CD4 lymphocyte counts// Int. J. STD AIDS. – 2009. – Vol. 11. – P. 771-774.
38. Surjushe A., Kamath R., Oberai C., et al. A clinical and mycological study of onychomycosis in HIV infection//Indian J.

- Dermatol. Venereol. Leprol. – 2007. – Vol. 6. – P. 397-401.
39. Tzung T.Y., Yang C.Y., Chao S.C., Lee J.Y. Cutaneous manifestations of human immunodeficiency virus infection in Taiwan// Kaohsiung J. Med. Sci. – 2004. – Vol. 5. – P. 216-224.
 40. Rajesh R., Subramaniam K., Padmavathy B.K., Vasanthi S. Prevalence and species profile of dermatophytosis among HIV positive patients in rural referral center// Indian J. of Sex. Transm. Dis. – 2006. – Vol. 27, №2. – P. 70-74.
 41. Umoru D., Clinical characteristics of dermatophytosis among children in a Nigeria population; the role of HIV/AIDS. – 2010. – Vol. 12, №1. – P. 32-36.
 42. Graham E., Rodwell J., et al. The prevalence of dermatophyte infection in patients infected with human immunodeficiency virus//Int. J. of Dermatol. – 2008. – Vol. 47, №4. – С. 339-343.
 43. Gniadek A., Skóra M., Garlicki A., et al. Prevalence of dermatophytes in interdigital spaces in HIV patients// Post. Dermatol. Alergol. – 2012. – Vol. XXIX, № 1. – P. 30-34.
 44. Piraccini B., Tosti A. White superficial onychomycosis epidemiological, clinical, and pathological study of 79 patients// Arch. Dermatol. – 2004. – Vol. 140, №6. – P. 696-701.
 45. Самцов А.В. Итраконазол в лечении онихомикозов// Медицинский вестник. – 2009. – №27. – С. 17.
 46. Иванова Ю.А., Райденко О.В. Клинические особенности микозов стоп, кистей и онихомикозов у ВИЧ-инфицированных пациентов// Проблемы медицинской микологии. – 2011. – Т. 13, №4. – С. 18-21.
 47. Singh H., Singh P., Tiwari P. et al. Dermatological manifestations in HIV-infected patients at a tertiary care hospital in a tribal (Bastar) region of Chhattisgarh, India// Indian J. Dermatol. – 2009. – Vol. 54, №4. –С. 338-341.
 48. Кубанова А.А., Степанова Ж.В., Воробьева И.А. Альтернативный метод лечения онихомикозов Дифлюканом// Фарматека. – 2003. – №9. – 5 с.
 49. Федотов В.П., Дюдюн А.Д., Горбунцов В.В. и др. Особенности терапии осложненных форм онихомикозов у больных с ВИЧ инфекцией и другой сопутствующей патологией// Укр. журнал дерматол., венерол., косметол. – 2010. – № 2 (37). – С. 71-76.
 50. Сухов А.В., Горячкина М.В. Космецевтики в наружной терапии себорейного дерматита// Клин. дерматол. и венерол. – 2012. – №1. – С. 56-61.
 51. Корнишева В.Г., Могилева Е.Ю. Себорейный дерматит//Проблемы медицинской микологии. – 2012 – Т. 14, №3. – С. 3-9.
 52. Котрехова Л.П. Тербинафин в терапии дерматозов, вызванных и ассоциированных с *Malassezia species*// Клин. дерматол. и венерол. – 2010. – №2. – С. 90-95.
 53. Аравийский Р.А., Клишко Н.Н., Васильева Н.В. Диагностика микозов. – СПб.: СПбМАПО. – 2004. – 186 с.
 54. Яковлев А.Б., Суворова К.Н. Малассезия-инфекция кожи человека (учебно-методическое пособие). – М., 2005. – 20 с.
 55. Монахов С.А. Новое в местной терапии себорейного дерматита// Клин. дерматол. и венерол. – 2010. – №1. – С. 79-81.
 56. Gupta A.K., Bluhm R., Cooper E.A., et al. Seborrheic dermatitis. Skin diseases associated with *Malassezia species*// J. Am. Acad. Dermatol. – 2004. – Vol. 51, №5. – P. 785-798.
 57. Галлямова Ю.А. Отрубевидный лишай//Лечащий врач. Коллоквиум. – 2010. – №5. – С. 38-41.
 58. Rincón S., Celis A., Sopó L., et al. *Malassezia* yeast species isolated from patients with dermatologic lesions// Biomédica. – 2005. – Vol. 25. – P. 189-195.
 59. Chatzikokkinou P., Sotiropoulos K., Katoulis A. Seborrheic Dermatitis – An Early and Common Skin Manifestation in HIV Patients// Acta Dermatovenerol. Croat. – 2008. –Vol. 16, №4. – P. 226-230.
 60. Halder S., Banerjee S., Halder A., et al. Skin diseases in HIV-infected patients: Impact of immune status and histological correlation//Indian J. Sex. Transm. Dis. – 2012. – Vol. 33, №1. – P. 65-67.
 61. Vander Straten M.R., et al. Cutaneous infections Dermatophytosis, onychomycosis, and tinea versicolor. Elsevier Science (USA) 2003//Infect. Dis. Clin. of North America. – 2003. – Vol. 17, №1. – P. 87-112.
 62. Rigopoulos D., Paparizos V., Katsambas A. Cutaneous markers of HIV-infection// Clin. Dermatol. – 2004. –Vol. 22, №6. – P. 487-498.
 63. Moumita S., Chanchal K., Mihir S. et al. Popular pruritic eruptions: A marker of progressive HIV disease in children: Experience from eastern India// Indian J. Sex. Trans. Dis. and AIDS. – 2009. – №2. – P. 79-81.
 64. Ежова М.Н. Этиология, клиника и лечение себорейного дерматита// Эксперим. и клин. дерматокосметология. – 2004. – №4. – 19-22.
 65. De Luca C., Valacchi G. Surface lipids as multifunctional mediators of skin responses to environmental stimuli//Mediat. of Inflamm. – 2010. – Article ID 321494. – P. 1-11.
 66. Prohic A., Kasumagic-Halilovic E. Identification of *Malassezia* species from immunocompetent and immunocompromised patients with seborrheic dermatitis//Eur. Rev. for Med. and Pharmac. Sciences. – 2010. – Vol. 14. – P. 1019-1023.
 67. Левина Ю.В., Разнатовский К.И. Вегетативно-гормональные нарушения при себорейном дерматите и их коррекция методом транскраниальной электростимуляции ствола мозга//Росс. журнал кожных и венер. болезней. – 2010. – №2. – С. 30-32.
 68. Chatzikokkinou P., Sotiropoulos K., Katoulis A. Seborrheic Dermatitis – An Early and Common Skin Manifestation in HIV Patients//Acta Dermatovenerol. Croat. – 2008. –Vol. 16, № 4. – P. 226-230.
 69. Borgers M., Degreef H. The role of ketoconazole in seborrheic dermatitis// Therap. for the Clinician. – 2007. – Vol. 80. – P. 359-363.
 70. Meshkinpour A., Sun J., Weinstein G. An open pilot study using tacrolimus ointment in the treatment of seborrheic dermatitis// J. Am. Acad. Dermatol. – 2003. – Vol. 49. – P. 145-147.
 71. Brownell I., Quan L.T., Hsu S. Topical pimecrolimus in the treatment of seborrheic dermatitis// Dermatol. Online J. – 2003. – Vol. 9. – P. 13.
 72. Rigopoulos D., Ioannides D., Kalogeromitros D., et al. Pimecrolimus cream 1% betametazon vs.17-valerate 0.1% cream in

- the treatment of seborrheic dermatitis. A randomized open clinical trial// Br. J. Dermatol. – 2004. – Vol. 151. – С. 1071-1075.
73. Cömert A., Bekiroglu N., Gürbüz O., et al. Efficacy of oral fluconazole in the treatment of seborrheic dermatitis: a placebo-controlled study// Am. J. Clin. Dermatol. – 2007. – Vol. 8, №4. – С. 235-238.
 74. Shemer A., Kaplan B., Nathansohn N., et al. Treatment of moderate to severe facial seborrheic dermatitis with itraconazole: an open non-comparative study// Isr. Med. Assoc. J. – 2008. – Vol. 10, №6. – С. 417-418.
 75. Khondker L., Wahab M.A., Khan M.S., et al. Safety of oral itraconazole in the treatment of seborrheic dermatitis// J. of Pakistan Assoc. of Dermatol. – 2011. – Vol. 21. – С. 102-105.
 76. Das J., Majumdar M., Chakraborty U., et al. Oral itraconazole for the treatment of severe seborrheic dermatitis// Indian J. Dermatol. – 2011. – Vol. 56, №5. – С. 515-516.
 77. Geissler S.E., Michelsen S., Plewig G. Very low dose isotretinoin is effective in controlling seborrhea// J. Dtsch. Dermatol. Ges. – 2003. – Vol. 1, №12. – С. 952-958.
 78. Dunic I., Vesic S., Jevtovic D.J. Oral candidiasis and seborrheic dermatitis in HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy// HIV Med. – 2004. – Vol. 5, №1. – P. 50-54.
 79. Halder S., Banerjee S., Halder A., et al. Skin diseases in HIV-infected patients: Impact of immune status and histological correlation// Indian J. Sex. Transm. Dis. – 2012. – Vol. 33, №1. – С. 65-67.
 80. Moore D., Robson G., Trinci T. The 21st Century Guidebook to Fungi. – New York, 2011. – 628 p.
 81. Khawcharoenporn T., et al. Evaluation of *Cryptococcus laurentii* meningitis in a patient with HIV infection: a case report and review of the literature// Hawaii Med. J. – 2006. – Vol. 65, №9. – P. 260-263.
 82. Васильева Н.В. Факторы патогенности *Cryptococcus Neoformans* и их роль в патогенезе криптококкоза: Автореф. дисс... докт. биол. наук. – СПб., 2005.
 83. Столярова Л.Ю., Доброхотова В.Н., Федотова Т.Я. Случай генерализованного микоза (криптококкоза) в практике судебно-медицинского эксперта// Здравоохранение Чувашии: ежеквартальный научно-практический журнал. – 2011. – №1. – С. 86-89.
 84. Константинова А.М. Криптококкоз при ВИЧ-инфекции в стадии СПИД: анализ аутопсий// Проблемы медицинской микологии. – 2010. – Т. 12, №2. – С. 101.
 85. Parmar R., Sharma V., Thakkar C., et al. Prevalence of opportunistic fungal infections in HIV positive patients in tertiary care hospital in Rajkot// Natl. J. Med. Res. – 2012. – Vol. 2, №4. – С. 463-465.
 86. Bicanic T., Meintjes G., Wood R., et al. Fungal burden, early fungicidal activity, and outcome in cryptococcal meningitis in antiretroviral-naïve or antiretroviral-experienced patients treated with amphotericin B or fluconazole// Clin Infect Dis. – 2007. – Vol. 45. – С. 76-80.
 87. Рахманова А.Г., Степанова Е.В. и др. Случай успешного лечения инвазивного аспергиллеза у больного ВИЧ-инфекцией в стадии СПИД// Проблемы медицинской микологии. – 2005. – Т. 7, №2. – С. 21-23.
 88. Gedela, K., Nelson M., Francis N. Cutaneous aspergillosis associated with HIV infection// Int. J. of STD & AIDS. – 2012. – Vol. 23, № 9. – P. 679.
 89. Benson C., Kaplan J., Mazur H., Holmes K. Treating opportunistic infections among HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, National Institute of Health, and HIV Medical Associations //Infec. Dis. Society of America // Clin. Infect. Dis. – 2005. – Vol. 40. – P. 131-235.
 90. Baradkar V., Kumar S. Meningitis caused by *Rhodotorula mucilaginosa* in human immunodeficiency virus seropositive patient// Ann. of Indian Acad. of Neurol. – 2008. – Vol. 11, №4. – P. 245-247.
 91. Shinde R., Mantur B., Patil G., et al. Meningitis due to *Rhodotorula glutinis* in an HIV infected patient// Indian J. of Med. Microbiol. – 2008. – Vol. 26, №4. – P. 375-377.
 92. Thakur K., Singh G., Agarwal S., Rani L. Meningitis caused by *Rhodotorula mucilaginosa* in human immunodeficiency virus infected patient// Indian J. of Med. Microbiol. – 2007. – Vol. 25, №2. – P. 166-168.
 93. Аравийский Р.А., Васильева Н.В. и др. Пневмоцистоз. Учебное пособие. – СПб., 2012. – С. 24.
 94. Боровицкий В.С. Пневмоцистная пневмония. Этиология, патогенез, клиника, дифференциальная диагностика, лечение (лекция)// Проблемы медицинской микологии. – 2012. – Т. 14, №1. – С. 13-20.

Поступила в редакцию журнала 05.12.2013

Рецензент: К.И. Разнатовский



АЛЛЕРГИЧЕСКИЙ МИКОТИЧЕСКИЙ РИНОСИНУСИТ. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

**Козлова Я.И. (доцент)*, Климко Н.Н.
(заведующий кафедрой)**

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (кафедра клинической микологии, аллергологии и иммунологии), Санкт-Петербург, Россия

© Козлова Я.И., Климко Н.Н., 2013

Аллергический микотический риносинусит (АМРС) – это относительно новое заболевание, патогенез которого до настоящего времени является предметом многочисленных споров. Проявления АМРС варьируют от назальных полипов и незначительного количества аллергического муцина с включениями гифов грибов до интенсивного атопического процесса с массивной экспансией микромицета в соседние ткани с развитием соответствующих осложнений. В обзоре представлены современные данные о клинической картине и критериях диагностики, которые помогут практикующим врачам своевременно выявить АМРС и выбрать оптимальную тактику лечения.

Ключевые слова: аллергический микотический риносинусит, *Bipolaris* spp., микозы, микромицеты

ALLERGIC FUNGAL RHINOSINUSITIS. A REVIEW OF LITERATURE

**Kozlova Y.I. (associate professor of the
chair), Klimko N.N. (head of the chair)**

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov (Chair of Clinical Mycology, Allergology and Immunology), St. Petersburg, Russia

© Kozlova Y.I., Klimko N.N., 2013

Allergic fungal rhinosinusitis (AFRS) is a relatively new disease, the pathogenesis of which to date is the subject of much debate. Manifestations of AFRS range from nasal polyps and insignificant quantity of allergic mucin with inclusions of fungal hyphae to atopic intensive process with a massive expansion of micromycete to the surrounding tissue with the development of relevant complications. This review presents the current data about clinical presentation and diagnostic criteria that will help clinicians to quickly identify AFRS and select the optimal treatment strategy.

Key words: allergic fungal rhinosinusitis, *Bipolaris* spp., fungus, mycosis

Воспалительные заболевания околоносовых пазух занимают одно из ведущих мест в структуре ЛОР-заболеваний. Различными формами риносинуситов страдает свыше 20% населения нашей планеты [1]. Широкое применение мало инвазивных способов хирургических вмешательств, а также использование новых фармакологических препаратов обеспечили значительный прогресс в диагностике и лечении данной патологии, однако заболеваемость хроническим риносинуситом в последние десятилетия не снижается. Напротив, имеет место существенный рост частоты синуситов, вызванных нетипичными возбудителями - микромицетами [2].

Первые описания микотических поражений околоносовых пазух относят к концу XIX века. В 1883 году Shubert P., а затем в 1889 году Mackenzie J. и Siebermann H. опубликовали наблюдения поражений верхнечелюстных пазух, вызванных *Aspergillus* sp. Аспергиллез лобной пазухи был впервые описан в 1933 году Adams W. Все авторы характеризовали представленные случаи как исключительно редкие. За последнее десятилетие распространенность микотических риносинуситов значительно возросла. По данным Таху J.B. [1], у 6-12% пациентов, страдающих хроническим синуситом, при культуральном или гистологическом исследовании выявляют микромицеты. Отечественные авторы описывают выделение микромицетов или микромицетов в ассоциации с бактериями более чем у половины больных, страдающих разными формами хронических синуситов [3, 4].

Микотические риносинуситы – это воспалительные поражения полости носа и околоносовых пазух, связанные с присутствием микромицетов. Можно выделить две группы факторов, влияющих на рост частоты данного заболевания. Во-первых, увеличение популяции иммунокомпрометированных пациентов (широкое распространение новых медицинских технологий: интенсивная цитостатическая и иммуносупрессивная терапия, трансплантация органов и тканей; пандемия ВИЧ-инфекции; нерациональное использование антибактериальных препаратов и глюкокортикостероидов). Во-вторых, совершенствование методов диагностики поражений околоносовых пазух (более современные методы забора и лабораторного исследования материала, применение спиральной КТ и МРТ для диагностики мицетом) [5, 6].

На основании клинических и патоморфологических признаков поражения тканей микотические риносинуситы разделяют на две большие группы [2]:

1. Экстрамукозные (неинвазивные) микотические риносинуситы:

- поверхностный синопазальный микоз;
- мицетома или грибной шар (fungus ball);
- аллергический микотический риносинусит.

2. Интрамукозные (инвазивные) микотические

* Контактное лицо: Козлова Яна Игоревна, тел.: (812) 303-51-46

риносинуситы:

- острый (скоротечный);
- хронический гранулематозный.

Из всех форм синуситов грибковой этиологии чаще всего выявляют поверхностный синоназальный микоз, хроническую форму инвазивного микотического синусита и мицетому околоносовых пазух [7].

При поверхностном синоназальном микозе микромицеты обнаруживают на поверхности слизистой оболочки в составе корочек, которые по внешнему виду могут напоминать заплесневелый хлеб. Часто это является характерным симптомом присоединения грибковой инфекции после различных хирургических манипуляций, длительного присутствия тампона или интубационной трубки. Поверхностный синоназальный микоз может развиваться у больных сахарным диабетом. Мицетома (грибной шар) – это плотное экстрамукозное образование, состоящее из сплетенных гифов гриба в разных стадиях распада, при отсутствии внедрения в подлежащие ткани, а также без признаков эозинофильного муцина. Мицетома верхнечелюстной пазухи часто имеет одонтогенную природу и вызывается попаданием в пазуху пломбирочного материала. Хронический инвазивный микотический риносинусит характеризуется гиперпластическими, гранулематозными изменениями слизистой оболочки. Инвазия микотических масс вызывает разрушение костных стенок, приводит к распространению процесса в орбиту, щечную область, твердое небо, головной мозг. Часто пациент обращается за помощью уже тогда, когда имеют место визуальные проявления болезни [7, 8].

По сравнению с другими формами микотических риносинуситов установление диагноза АМРС наиболее затруднительно. АМРС и сейчас является предметом многочисленных споров в отношении патогенеза, диагностики, классификации и оптимального лечения. По результатам исследований, проведенным в настоящее время, АМРС – это хроническое, неинвазивное воспалительное заболевание околоносовых пазух, характеризующееся наличием микромицетов в аллергическом муцине и выявлением у больных специфических IgE к грибковым аллергенам [9].

Аллергический микотический риносинусит был впервые описан как клинический случай Safirstein В. в 1976 году. По данным современных авторов, этой патологией страдает от 5 до 10% больных хроническим риносинуситом. Предполагают, что заболеваемость АМРС зависит от географического региона. С наибольшей частотой АМРС выявляют в умеренных широтах, где относительно высокая влажность атмосферного воздуха [10].

Этиология.

Ранее считали, что основными возбудителями АМРС, так же как и аллергического бронхолегочного аспергиллеза (АБЛА), являются *Aspergillus* spp. Это

предположение было подтверждено в исследовании Katzenstein А. (1983), в котором у пациентов с АМРС было продемонстрировано повышение специфических IgE к *Aspergillus flavus*. При дальнейших культуральных исследованиях больных АМРС Cody D. с соавторами (1994) обнаружили, что в формировании этой патологии могут участвовать и другие микромицеты. На современном этапе ведущую роль исследователи отводят опако(фео)гифомицетам, в частности *Bipolaris* spp. [9, 10]. Manning S. и соавт. (1991) обследовали 263 пациентов с АМРС. При культуральном исследовании у 168 человек были выявлены микромицеты. Опако(фео)гифомицеты идентифицировали в 87% случаев, а *Aspergillus* spp. – только в 13%.

Опако(фео)гифомицеты широко распространены в природе [11], многие из них являются патогенами растений. Инфицирование происходит при ингаляции возбудителя. Также к темноокрашенным грибам принадлежат *Alternaria* spp., *Cladophialophora bantiana*, *Curvularia* spp. У иммунокомпрометированных пациентов опако(фео)гифомицеты могут вызывать диссеминированную инфекцию с формированием абсцессов головного мозга [5].

Патогенез.

Ранее АМРС рассматривали как инфекционное заболевание, сейчас большинство исследователей поддерживают иммунологическую теорию, согласно которой АМРС – это IgE-опосредованная аллергия. Существуют сторонники и противники компромиссной теории, объединяющей оба процесса в патогенезе этого заболевания.

Предполагают, что АМРС и АБЛА имеют сходные механизмы патогенеза, а именно – развитие I и III типов реакций гиперчувствительности по Gell и Cumbs в ответ на ингаляционные грибковые антигены. Эта иммунологическая теория опирается на работу Manning S. и Holman M. (1998), которые предложили цикл из начальной антигенной стимуляции, а затем реакции гиперчувствительности, в результате которой возникает воспаление. В своем эксперименте эти исследователи выявили у 82% больных АМРС специфические IgE к *Bipolaris* spp. Также у этих пациентов была положительная кожная проба с *Bipolaris* spp. Дополнительно авторы сравнивали слизистую оболочку 14 пациентов с АМРС и 10 – с хроническим риносинуситом. В результате, у больных АМРС преобладало эозинофильное воспаление, тогда как в контрольной группе количество эозинофилов и нейтрофилов было равным. На основании полученных данных сделан вывод, что АМРС не инфекционный, а аллергический процесс.

Однако в дальнейших исследованиях, направленных на изучение патогенеза АМРС, было отмечено, что у некоторых пациентов нет атопии. Альтернативная теория была предложена Ponikau J. с соавторами (1999), в которой продемонстрировано присутствие микромицетов в околоносовых пазухах у 93% боль-

ных после оперативного лечения по поводу любой формы хронического риносинусита. По данным этого исследования, микогенную сенсibilизацию наблюдали редко. Встал вопрос: почему у одних пациентов развивается АМРС, а у других нет?

Collins M. и соавторы предложили компромиссную теорию, в которой АМРС представлен как результат локальной, а не системной гиперчувствительности [12]. Данное исследование основывали на определении специфических IgE к грибковым антигенам в самом муцине. Выявили, что реакция может быть полностью локализована в носовой полости и околоносовых пазухах без системного участия. Эта теория объясняет, что не все пациенты АМРС имеют признаки системной аллергии. Наконец, Pant и соавторы в своем исследовании показали роль гуморального иммунитета в патогенезе АМРС [13]. Они отмечали повышение специфических IgG к грибковым антигенам в аллергическом муцине пациентов с хроническим риносинуситом.

Таким образом, наилучшим объяснением патогенеза АМРС представляется его многофакторность, а дальнейшие исследования в этой области актуальны и в настоящее время.

Диагностика.

Диагностику начинают с тщательно собранного анамнеза заболевания. АМРС страдают, в основном, молодые иммунокомпетентные люди (средний возраст – 22 года). Как правило, это пациенты с хроническим риносинуситом, у которых неэффективно стандартное медикаментозное лечение. В анамнезе возможны неоднократные хирургические вмешательства по поводу рецидивов полипоза носа. У 50-75% таких больных выявляют бронхиальную астму. При тяжелом течении заболевания возможно вовлечение в патологический процесс структур глазницы и полости черепа с развитием экзофтальма и других осложнений [9].

В 1994 году Bent J. и Kuhn E. опубликовали свои диагностические критерии, которые основывали по гистологическим, рентгенологическим и иммунологическим характеристикам заболевания.

Таблица

Диагностические критерии Bent и Kuhn, 1994

Большие критерии	Малые критерии
1. 1 тип аллергических реакций	1. Бронхиальная астма
2. Назальные полипы	2. Односторонний характер поражения
3. Характерные КТ признаки	3. Костные эрозии
4. Эозинофильный муцин без инвазии	4. Выделение культуры микромицетов
5. Положительная кожная проба с грибковым антигеном	5. Кристаллы Шарко-Лейдена
	6. Эозинофилия сыворотки крови

В настоящее время эти критерии можно использовать в качестве стандартов диагностики АМРС. Для постановки диагноза необходимо, чтобы у пациента присутствовали все большие критерии. Малые критерии служат для подтверждения диагноза и могут быть описаны в отдельных клинических случаях.

При осмотре больных АМРС обычно выявляют признаки хронического риносинусита с явлениями отека, гиперемии слизистой оболочки и наличие полипов. Далее для подтверждения критериев диагностики используют эндоскопические, гистологические, микологические (культуральные, микроскопические), рентгенографические (КТ и МРТ) и лабораторные методы.

При проведении эндоскопии полости носа и околоносовых пазух выявляют аллергический муцин (золотисто-коричневый секрет густой консистенции, напоминающей арахисовое масло). Слизистая оболочка околоносовых пазух гипертрофирована и полипозно изменена. При АМРС процесс часто односторонний. Отметим, что именно уникальный аллергический грибковый муцин, а не окружающая слизистая оболочка является надежным индикатором болезни. С помощью эндоскопии полости носа и околоносовых пазух можно также произвести прицельную биопсию патологически измененных тканей для дальнейшего гистологического исследования.

Решающее значение для подтверждения диагноза имеет гистологическая картина. Выявляют плотно спаянные грибковые гифы, окруженные слизью с обилием эозинофилов, и кристаллы Шарко-Лейдена, что формирует аллергический муцин. При АМРС не должно быть инвазии микромицетов под эпителий слизистой оболочки. Микроскопическое исследование мазка из полости носа и околоносовых пазух направлено на выявление мицелия грибов. При культуральном исследовании происходит окончательная верификация микромицетов.

Наиболее информативным методом лучевой диагностики для этой формы хронического риносинусита является рентген-компьютерная томография, с помощью которой наиболее точно можно идентифицировать массы высокой плотности в просвете пазух, а также обнаружить признаки эрозии и деформации кости (проптозы). При подозрении на вовлечение в процесс структур орбиты или полости черепа проводят МРТ-исследование. Участие костных структур в патологическом процессе в 10 раз выше при АМРС, чем при других формах хронического риносинусита. Ремоделирование и истончение костных стенок устанавливают в большом количестве случаев (до 56%), чаще на орбите, а затем – в передней, задней и средней черепной ямке [14]. Некоторые авторы зафиксировали высокий уровень экзофтальма, особенно, в педиатрической практике. По данным Campbell J., примерно 50% детей, страдающих АМРС, имели орбитальные эрозии [15].

Из лабораторных признаков АМРС основными являются увеличение количества эозинофилов в периферической крови, повышение уровня общего IgE, выявление специфических IgE и IgG к грибковым антигенам в сыворотке крови. Уровень общего IgE при АМРС обычно высокий и составляет более 1000 ЕД/мл [10]. В своих исследованиях Mabry R. и соавторы (1998; 2000) обнаружили у больных АМРС сенсibil-

лизацию к широкому спектру грибковых и негрибковых аллергенов и подчеркивали, что все больные, как правило, страдали атопией.

При проведении кожного тестирования для АМРС характерна положительная проба с *Bipolaris* spp., *Aspergillus* spp. и другими грибковыми аллергенами.

Лечение.

Для выбора правильной тактики лечения нужно учитывать все особенности патогенеза АМРС. Оптимальная терапия должна включать следующие этапы [9]:

- элиминацию аллергена;
- противоаллергическую терапию (назальные стероиды, антигистаминные препараты);
- оральные глюкокортикостероиды;
- хирургическое лечение (удаление аллергического муцина и дренаж синусов);
- иммунотерапию (направленную на грибковые, бытовые, пыльцевые, эпидермальные аллергены).

Применение комплексного лечения, а именно – активной лекарственной терапии в комбинации с хирургическим вмешательством, позволяет добиться наилучших результатов и является важным аспектом для предотвращения рецидивов заболевания. Лекарственная терапия чаще всего предполагает подготовку к операции.

Хирургическое лечение АМРС направлено на удаление аллергического муцина, как антиген-стимулирующего фактора. Ранее традиционные операции были более агрессивными, с удалением слизистой оболочки. В настоящее время широко применяют мало инвазивные способы оперативного лечения. Использование современных эндоскопических методов для удаления полипов позволяет сохранить целостность невовлеченной в патологический процесс слизистой оболочки [16]. К сожалению, даже, несмотря на проведение хирургического вмешательства в полном объеме, часто возможен рецидив заболевания. Медленное накопление аллергического муцина и грибковых гифов может имитировать инвазию и привести к сдавливанию жизненно-важных структур. Кроме того, развивающиеся носовые полипы способствуют искажению анатомии и увеличивают риск кровотечений в операционном поле.

Оральные кортикостероиды стали использовать для лечения АМРС после их успешного применения у больных аллергическим бронхолегочным аспергиллезом. Эффективность оральных кортикостероидов описана в литературе. На фоне их применения рецидивы заболевания протекают в более легкой форме, увеличивается время между ревизионными операциями, уменьшается слизистая оболочка, снижается уровень общего IgE в сыворотке крови [17]. Оптимальной дозы кортикостероидов для лечения АМРС нет. Обычно назначают преднизолон из расчета 0,5 мг/кг/сут. Рекомендуют предоперационную

терапию в течение недели для улучшения хирургического воздействия и уменьшения кровопотери, затем после операции – курс кортикостероидов, продолжительность которого, в среднем, составляет один месяц. Прерывистая терапия может быть использована, если пациент переносит ОРВИ. Применение топических кортикостероидов без хирургического вмешательства является малоэффективным. Обычно их назначают с целью длительной профилактики после завершения курса системных кортикостероидов [8-10].

В последние десятилетия иммунотерапию также считают эффективным методом лечения АМРС. Впервые Mabry R. и соавторы опубликовали результаты применения иммунотерапии у больных АМРС в 1993 году. Курс начинали через 4-6 недель после операции, которая включала полное удаление аллергического муцина для снижения антигенной нагрузки. На фоне лечения пациенты не нуждались в применении оральных кортикостероидов. Однако оптимальная продолжительность иммунотерапии в настоящее время не определена.

Результаты применения антимикотических препаратов для лечения АМРС в настоящее время многочисленны и противоречивы. Kennedy D. и соавторы не выявили улучшения состояния больных после перорального приема тербинафина в течение 6 недель [18]. Некоторые исследователи предлагали вводить препараты интраназально [19]. Таким образом, использование антимикотических препаратов при АМРС требует дальнейшего изучения и не может быть рекомендовано для широкого применения у данной категории больных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

АМРС является относительно новой формой хронического риносинусита. Возможность развития именно микотического поражения носа и околоносовых пазух нужно принимать во внимание при обследовании всех пациентов с трудно поддающимися лечению риносинуситами. Прогноз заболевания серьезный. Нераспознанный АМРС может вызывать значительные повреждения костной ткани, создавая изменения лицевого скелета. Присоединение бактериальной инфекции может способствовать развитию внутричерепных и орбитальных осложнений. В основе патогенеза лежат IgE-опосредованная реакция (тип I) и возникновение иммунных комплексов (тип III). Каскад воспалительных реакций может включать в себя ранее не распознаваемый ответ организма на грибковую инфекцию.

В настоящее время наиболее широко признанными диагностическими критериями являются критерии Bent J. и Kuhn F. Лечение состоит из комбинации хирургического вмешательства с оральными кортикостероидами. Антимикотические препараты в терапии АМРС не используют, хотя и здесь необходимы дальнейшие исследования.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. *Taxy J.B.* Paranasal Fungal Sinusitis: Contribution of Histopatology to Diagnosis. A Report of 60 Cases and Literature Review // *Am. J. Surg. Pathol.* – 2006. – Vol. 30. – P. 713-720.
2. *Лопатин А.С., Гамов В.П.* Острый и хронический риносинусит: этиология, патогенез, клиника, диагностика и принципы лечения. Учебное пособие. – М.: Мед. информ. агентство, 2011. – 72с.
3. *Заболотный Д.И., Волосевич Л.И., Карась А.Ф. и др.* Роль грибковой микрофлоры в развитии полипозного риносинусита. I съезд микологов России. Тез. докл. – М.: Нац. акад. микологии, 2002. – С. 81-82.
4. *Красножен В.Н., Хайритонова З.Х., Глушко Н.И.* Роль плесневых и дрожжевых грибов в формировании хронических риносинуситов // *Успехи медицинской микологии.* – 2003. – Т. 2. – С. 246-247.
5. *Климко Н.Н.* Микозы: диагностика и лечение. Руководство для врачей. 2-е изд. перераб. и доп. – М.: Ви Джи Групп, 2008. – 336 с.
6. *Пискунов Г.З.* Рецидивирующий риносинусит. Справочник поликлинического врача. – 2005. – №3. – С. 57-60.
7. *Морозова О.В.* Роль грибковой инфекции в этиологии риносинуситов // *Практическая медицина.* – 2012. – №2(57). – С. 201-203.
8. *Морозова О.В.* Особенности диагностики и лечения синуситов, ассоциированных с грибковой инфекцией // *Рос. Оториноларингология.* – 2011 – № 6(55). – С. 101-105.
9. *Glass D., Amedee R.G.* Allergic fungal rhinosinusitis. A Review // *The Ochsner J.* – 2011. – Vol. 11. – P. 271-275.
10. *Marple B.F.* Allergic fungal sinusitis: A review of clinical manifestations and current treatment strategies // *Medical Mycology.* – 2006. – Vol. 44. – S277-S284.
11. *Аравийский Р.А., Климко Н.Н., Васильева Н.В.* Диагностика микозов. – СПб.: СПбМАПО, 2004. – 186 с.
12. *Collins M., Nair S., Smith W., et al.* Role of local immunoglobulin E production in the pathophysiology of noninvasive fungal sinusitis // *Laryngoscope.* – 2004. – Vol. 114, №7. – P. 1242-1246.
13. *Pant H., Kette F.E., Smith W.B., et al.* Fungalspecific humoral response in eosinophilic mucus chronic rhinosinusitis // *Laryngoscope.* – 2005. – Vol. 115, №4. – P. 601-606.
14. *Ghegan M.D., Lee F.S., Schlosser R.J.* Incidence of skull base and orbital erosion in allergic fungal rhinosinusitis (AFRS) and non-AFRS // *Otolaryngol. Head Neck Surg.* – 2006. – Vol. 134, №4. – P. 592-595.
15. *Campbell J.M., Graham M., Gray H.C., et al.* Allergic fungal sinusitis in children // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* – 2006. – Vol. 96, N2. – P. 286-290.
16. *Schubert M.S.* Allergic fungal sinusitis: pathogenesis and management strategies // *Drugs.* – 2004. – Vol. 64, №4. – P. 363-374.
17. *Ryan M.W., Marple B.F.* Allergic fungal rhinosinusitis: diagnosis and management // *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* – 2007. – Vol. 15, №1. – P. 18-22.
18. *Kennedy D.W., Kuhn F.A., Hamilos D.L., et al.* Treatment of chronic rhinosinusitis with high-dose oral terbinafine: a double blind, placebo-controlled study // *Laryngoscope.* – 2005. – Vol. 115, №10. – P. 1793-1799.
19. *Stankiewicz J.A., Musgrave B.K., Scianna J.M.* Nasal amphotericin irrigation in chronic rhinosinusitis // *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* – 2008. – Vol. 16, №1. – P. 44-46.

Поступила в редакцию журнала 14.10.2013

Рецензент: А.В. Соболев



ХРОНИЧЕСКИЙ НЕКРОТИЗИРУЮЩИЙ АСПЕРГИЛЛЕЗ ЛЕГКИХ КАК ОСЛОЖНЕНИЕ САРКОИДОЗА ЛЕГКИХ. ОПИСАНИЕ КЛИНИЧЕСКОГО СЛУЧАЯ И ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Савостеева И.С. (клинической ординатор), Десятник Е.А. (аспирант)*, Чернопятава Р.М. (зав. отделением), Шадривова О.В. (аспирант), Одинцова Т.С. (клинический ординатор), Богомоллова Т.С. (зав. лаб.), Игнатъева С.М. (зав. лаб.), Васильева Н.В. (директор НИИ), Климко Н.Н. (зав. кафедрой)

НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина и кафедра клинической микологии, аллергологии и иммунологии, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2013

Хронический некротизирующий аспергиллез лёгких (ХНАЛ) – редкое заболевание, составляющее примерно 5% всех случаев аспергиллеза лёгких. Одним из факторов риска развития ХНАЛ являются хронические заболевания лёгких, в том числе – саркоидоз. Публикаций по этой теме недостаточно. Мы представляем клинический случай развития ХНАЛ у взрослого больного саркоидозом. Аспергиллез – наиболее частое инфекционное осложнение саркоидоза лёгких, раннее выявление которого влияет на прогноз заболевания и лечение.

Ключевые слова: аспергиллез, саркоидоз, хронический некротизирующий аспергиллез лёгких

CHRONIC NECROTIZING PULMONARY ASPERGILLOSIS COMPLICATING PULMONARY SARCOIDOSIS. A CLINICAL CASE AND REVIEW OF LITERATURE

Savostyeeva I.S. (clinical physician), Desyatnik E.A. (postgraduate student),

* Контактное лицо: Десятник Екатерина Александровна, Тел.: (812) 303-51-40

Chernopyatova R.M. (head of department), Shadryvova O.V. (postgraduate student), Odincova T.S. (clinical physician), Bogomolova T.S. (head of the laboratory), Ignatyeva S.M. (head of the laboratory), Vasilyeva N.V. (director of institute), Klimko N.N. (head of the chair)

Kashkin Research Institute of Medical Mycology and Chair of Clinical Mycology, Allergology and Immunology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2013

Chronic necrotizing pulmonary aspergillosis (CNPA) is a rare disease, constituting approximately 5% from all cases of pulmonary aspergillosis. One of the risk factors for the development of CNPA are chronic pulmonary diseases, including sarcoidosis. Publications on this topic is not enough. We present a clinical case of the CNPA development in adult patients with sarcoidosis. Aspergillosis is the most common complication of pulmonary sarcoidosis, early detection of which influences on the prognosis of the disease and treatment.

Key words: aspergillosis, chronic necrotizing pulmonary aspergillosis, sarcoidosis

ВВЕДЕНИЕ

Один из клинко-лабораторных вариантов аспергиллеза – хронический некротизирующий аспергиллез лёгких (ХНАЛ), который развивается преимущественно у больных с умеренными нарушениями клеточного иммунитета (функций фагоцитов и Т-клеток), а также может возникать у иммунокомпетентных людей [1-3]. Любые нарушения архитектоники легочной ткани – наличие полостей, бронхоэктазы, фиброз, эмфизема лёгкого, состояния после резекции лёгкого могут предрасполагать к формированию аспергиллеза. Публикаций, описывающих развитие аспергиллеза на фоне хронических заболеваний лёгких, недостаточно. Мы представляем клинический случай – развитие хронического некротизирующего аспергиллеза у взрослого больного саркоидозом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Представлен клинический случай хронического некротизирующего аспергиллеза лёгких, развившегося у пациента на фоне саркоидоза лёгких. Для постановки диагноза аспергиллеза лёгких использовали критерии, рекомендованные Denning и соавторами в качестве критериев диагностики ХНАЛ [4].

Определение галактоманна в сыворотке крови и промывной жидкости из бронхов (ПЖБ) выполняли двойным иммуноферментным методом (EIA) «Platelia *Aspergillus*». Диагностически значимым считали индекс оптической плотности $\geq 0,5$ для сыворотки крови и для ПЖБ $\geq 1,0$. Уровень IgG к антигенам *Aspergillus* устанавливали с помощью иммуноферментного анализа с применением тест-системы Аспергилл-IgG-ИФА-БЕСТ.

Также мы провели анализ научной литературы

(на ноябрь 2013 г.), представленной в электронных базах данных PubMed, Wiley Interscience и на сайте www.aspergillus.org.uk. При поиске информации использовали следующие ключевые слова: *aspergillosis*, *sarcoidosis*, *chronic necrotizing pulmonary aspergillosis*.

Описание клинического случая.

Больной К., 28 лет, госпитализирован в клинику НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина 12.02.2013 г. с жалобами на одышку инспираторного характера, возникающую при ходьбе и усиливающуюся при незначительной физической нагрузке, кашель в течение дня с большим количеством мокроты бело-желтого цвета и прожилками крови, снижение массы тела на 6 кг за последние 3 месяца, потерю аппетита, слабость, уменьшение работоспособности.

Из анамнеза заболевания известно, что в 2006 г. у пациента появились нарастающая общая слабость, снижение массы тела, кашель с мокротой желто-зеленого цвета, нарастающая одышка при физической нагрузке и ходьбе. 02.10.06 г. при амбулаторном обследовании, в связи с появлением острой боли в грудной клетке, выполнили рентгенографию органов грудной клетки, на которой выявили двустороннее очаговое поражение лёгких.

При обследовании в противотуберкулезном диспансере (ПТД) в октябре 2006 г. однократно выделили единичные кислотоустойчивые микобактерии, которые за весь период дальнейшего обследования и лечения в ПТД не определяли. В течение 8 месяцев пациенту проводили специфическую терапию туберкустатическими препаратами без клинического и рентгенологического эффекта. В диагностических целях в апреле 2010 г. выполнили биопсию периферического (шейного) лимфоузла. По результатам гистологического исследования лимфоузла был диагностирован саркоидоз лёгких.

В мае 2010 г. больной находился на стационарном лечении в отделении пульмонологии, где проводили дифференциальную диагностику между саркоидозом лёгких 4 стадии и гранулематозом Вегенера. Применяли глюкокортикостероиды (преднизолон – 30-60 мг в сутки, дексаметазон – 12 мг в сутки в течение 20 дней) и антибактериальные препараты широкого спектра действия. На фоне лечения отмечали положительную динамику – уменьшение одышки, слабости, нормализацию массы тела. Пациента выписали с диагнозом «гранулематоз неуточненной нозологической формы с поражением лёгких». Преднизолон в дозе 30 мг в сутки больной принимал до июня 2010 г. (2 месяца).

В июне 2010 г. при обследовании в этом же отделении методом РНГА 1 выявили титр антител к микобактериям туберкулеза: 16 (норма – до 1: 8), ИФА 0,610 (до 0,200), РПГ 45 (до 17). Однако, при многократном исследовании мокроты и промывной жидкости из бронхов, микобактерии туберкулеза не обнаружили, титр антител IgG к *Aspergillus* составил 1:100 (норма – до 1:100). На компьютерной томографии органов грудной клетки (КТ ОГК) от 10.06.2010 г. отмечали двусторонние интерстициальные изменения с признаками фиброзирования и уменьшения объема верхних долей лёгких. В лёгких с обеих сторон определялись полости неправильной формы. Наблюдалось изменение их размеров (некоторые полости увеличились, некоторые – уменьшились). В одной из полостей (аксилярный субсегмент слева) – содержимое мягкотканой плотности, округлой формы, размерами 17x14 мм. На основании проведенного исследования выставили диагноз: диссеминированный туберкулез лёгких в фазе распада, хроническое течение; вторичное грибковое поражение лёгких (мицетома в аксилярном субсегменте слева). Для дальнейшего лечения пациента направили в противотуберкулезный диспансер (ПТД) по месту жительства.

В июле 2010 г. в ПТД, на основании проведенного обследования, диагноз «туберкулез лёгких» не подтвердили. Учитывая появление положительной динамики на фоне приема высоких доз глюкокортикоидных гормонов, предположили наличие интерстициального заболевания лёгких (саркоидоза) и рекомендовали провести профилактический курс изониазидом. В последующие 2 года пациент в лечебные учреждения не обращался, лекарственные препараты не получал, но сохранялись слабость, повышение температуры до 37,5 °С, кашель с мокротой.

В сентябре 2012 г. в жалобами на выраженную одышку при незначительной физической нагрузке, повышение температуры до 37,5 °С, кашель с мокротой, кровохарканье больной поступил на отделение пульмонологии. При исследовании мокроты получили однократно рост *Aspergillus* spp., кислотоустойчивые микобактерии (КУМ) не выявили. На КТ органов грудной клетки от 04.10.12 г., на фоне интерстициальных изменений, определили полости распада. Пациент получал лечение вориконозолом (суточная доза не указана) внутривенно капельно, меронемом, левофлоксацином, с положительной динамикой в виде нормализации температуры тела и уменьшения кровохарканья. При выписке больному рекомендовали обратиться в НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина.

12.02.13 г. пациент поступил в клинику НИИ медицинской микологии с жалобами на выраженную одышку при незначительной нагрузке, повышение температуры до 37,5 °С, кашель с мокротой, кровохарканье. Общее состояние – средней степени тяжести. Обращала на себя внимание низкая масса тела (ИМТ = 18,28). Кожные покровы бледные, чистые, акроцианоз. Перкуторно над лёгкими – ясный лёгочный звук. Аускультативно дыхание жесткое, ослабленное, в левой верхней доле – бронхиальное, хрипов нет. Деформация грудной клетки, втяжение уступчивых мест грудной клетки. Частота дыхательных движений – 25 в мин, частота сердечных сокращений – 95 в мин. Артериальное давление – 120 и 80 мм рт. ст.

При обследовании в клиническом анализе крови выявили увеличение СОЭ до 36 мм/час. Анализ мочи – без патологии. В биохимическом анализе крови: повышенные уровни фибриногена до 5,48 (норма – 2-4 г/л), остальные показатели в пределах нормы. Антитела к ВИЧ 1, 2 не обнаружили. При спирометрии наблюдали снижение ЖЕЛ, крайне резкие нарушения бронхиальной проходимости. Проба с беродуалом парадоксальная (FVC = 2,96-59%, FEV1 = 1,96-46%, прирост FEV1 = -1, FVC / FEV1 = 80%, PEF = 3,95-41%). Фибробронхоскопия – правосторонний гнойный эндобронхит.

При многократном культуральном исследовании мокроты и промывной жидкости с бронхов (ПЖБ): микроскопия – септированный узкий мицелий, ветвящийся под острым углом; посев – рост *A. fumigatus*. Были выполнены тесты на галактоманнан *Aspergillus* ПЖБ методом Platelia (Bio-Rad) – положительный (I=3,35) и на галактоманнан *Aspergillus* в сыворотке крови методом Platelia (Bio-Rad) – отрицательный (I=0,16). IgG к антигену *A. fumigatus* в сыворотке крови – положительный, титр 1:800 (норма – до 1:100). На КТ ОГК от 19.02.13 г.: массивные фиброзные изменения, преимущественно верхних и задних отделов лёгких, с формированием воздушных полостей и цилиндрических бронхоэктазов. Аспергиллема S6 левого лёгкого. Компенсаторная эмфизема наддиафрагмальных отделов лёгких. Умеренная внутригрудная лимфоаденопатия (Рис.1).

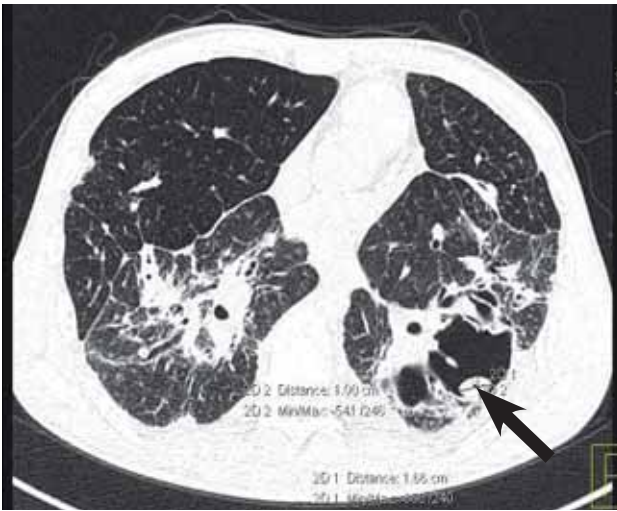


Рис. 1. КТ органов грудной клетки от 19.02.13 г.: на фоне деформации лёгочного рисунка определяются воздушные полости; в полости, расположенной в S6 левого лёгкого, сохраняется патологическое образование с прослойкой воздуха

С 25.02.13 г. пациент начал прием вориконазола (Vifend) в дозе 400 мг/сутки. Продолжительность антимикотической терапии – 10 месяцев. На фоне приема наблюдали положительную клиническую динамику – уменьшение кашля, мокроты, кровохарканья и положительную рентгенологическую динамику (Рис.2.).

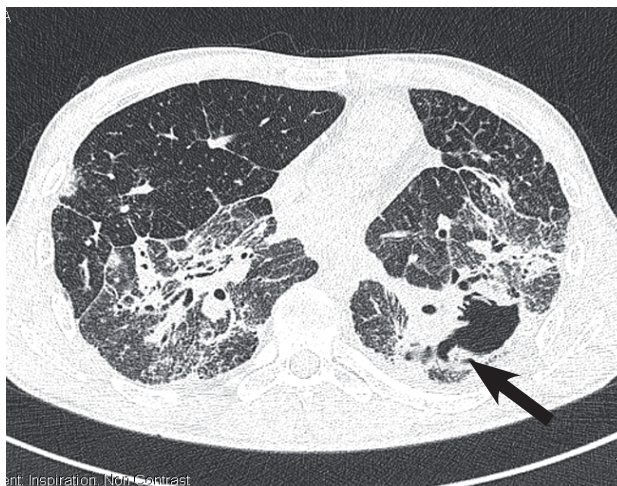


Рис. 2. КТ органов грудной клетки от 10.12.13 г.: незначительная положительная динамика; полость, расположенная в S6 левого лёгкого, с патологическим образованием с прослойкой воздуха сохраняется

ОБСУЖДЕНИЕ

Аспергиллёз – наиболее распространённый вариант микозов лёгких. Возбудители распространены повсеместно. *Aspergillus* spp. растут в почве, встречаются в строительных материалах, в системе вентиляции зданий, на некоторых пищевых продуктах, органических отбросах, гниющих растений и т.д. [1]. Спектр заболеваний легких, вызываемых *Aspergillus* spp., варьирует от инвазивного аспергиллеза легких у пациентов с выраженными нарушениями иммунного ответа до аллергического бронхолегочного аспергиллеза у пациентов с повышенной чувствительностью к антигенам *Aspergillus* и зависит от состояния

местной и системной иммунной защиты [1, 2, 4].

Хронический некротизирующий аспергиллез легких (ХНАЛ, Chronic Necrotizing Pulmonary Aspergillosis, CNPA) является хроническим прогрессирующим процессом с разрушением легочной ткани *Aspergillus* spp. и формированием полостей. В отличие от аспергиллемы, для развития ХНАЛ не имеет значения наличие уже существующей полости, кроме того, при этом виде аспергиллеза нет признаков сосудистой инвазии или диссеминации болезни в другие органы [2, 3].

Механизм развития ХНАЛ представлен следующим образом. У больных с умеренно выраженной иммуносупрессией после вдыхания спор может возникнуть инвазия в легочную паренхиму. Эта инвазия, в сочетании с действием эндотоксинов и протеолитических энзимов, переходит в некроз тканей. Некротизированная ткань и грибные элементы секвестрируются в новообразовавшуюся полость [1, 2, 4]. Хронический некротизирующий аспергиллез легких – относительно редкое заболевание, составляющее примерно 5% всех случаев аспергиллеза легких, обычно возникает у людей среднего возраста, мужчины болеет чаще женщин [1-3].

Любые нарушения архитектоники легочной ткани (наличие полостей, бронхоэктазы, фиброз, эмфизема легкого, состояния после резекции легкого) могут predispose к развитию аспергиллеза. Это подтверждается тем, что большинство больных с ХНАЛ имеют заболевания легких в анамнезе – туберкулез, ХОБЛ, пневмокониоз, интерстициальную болезнь легких, саркоидоз и другие гранулематозные болезни легких (пневмоторакс, буллезная болезнь легких, рак, инфаркт легких) [2-4].

Чаще всего (в 4-20% случаев) ХНАЛ развивается как последствия перенесенного туберкулеза [2]. Саркоидоз является вторым по частоте заболеванием, predisposing к возникновению хронического аспергиллеза легких [2, 3, 5].

Саркоидоз – системное воспалительное заболевание с преимущественным поражением легких [3], которое может осложняться присоединением грибковой инфекции и развитием ХНАЛ, особенно среди пациентов, получающих иммуносупрессивную терапию, что приводит к более тяжелому течению заболевания и возрастанию смертности [5-7]. Истинная частота развития аспергиллеза легких на фоне саркоидоза остается неизвестной и, по данным разных авторов, составляет от 2 до 12%.

Впервые сочетание аспергиллемы и саркоидоза было описано Fougner и Gjone в 1958 г. [6]. В 1984 г. Wollschlager С., Khan F. описали 12 случаев аспергиллеза легких (10 из которых были подтверждены серологическими методами) среди 100 больных саркоидозом, что составило 12% [2].

В исследовании, проведенном Репэ Т. в США за период с 2003 по 2010 гг. среди 427 больных с подтвержденным саркоидозом, было выявлено 10 пациентов с заболеваниями легких, вызванными

Aspergillus spp., что составило 2,3%. Во всех случаях диагноз ХНАЛ был подтвержден в соответствии с критериями, предложенными Denning D.W. [4].

В то же время, Dominique S. и соавторы показали, что, в соответствии с критериями в классификации аспергиллеза, случаи ХНАЛ, развившиеся на фоне саркоидоза, выявляют довольно редко. В проспективном исследовании за 7,5 лет среди 122 случаев саркоидоза легких отмечали только 3 случая аспергиллеза, что составило 2,5%. Такое различие, с одной стороны, можно объяснить влиянием генетических факторов окружающей среды в разных группах исследуемых лиц в различных странах, а с другой, быть следствием недостаточной диагностики аспергиллеза легких среди больных саркоидозом.

Denning D.W. и др. [5] при анализе более 1238000 случаев саркоидоза по всему миру с 1963 по 2011 гг. установили, что ХНАЛ осложнял течение саркоидоза в 3-12% случаев. Обобщая эти сведения, авторы оценивают частоту развития ХНАЛ среди больных саркоидозом равной 6% и предлагают формулу, по которой можно рассчитать приблизительное количество случаев аспергиллеза легких среди больных саркоидозом. В соответствии с этим показателем, учитывая заболеваемость инвазивным аспергиллезом у больных саркоидозом 1-10 случаев на 100 000 населения [8], в России должно быть приблизительно 60-600 случаев.

Некоторые исследователи отмечают, что курение может предрасполагать к развитию аспергиллеза легких на фоне саркоидоза, выступая в качестве дополнительного фактора, способствующего развитию фиброза легких за счет нарушения мукоцилиарного клиренса и снижению местной иммунной защиты [2, 3].

Точные механизмы, лежащие в основе развития заболеваний легких, вызванных *Aspergillus* spp., среди пациентов с саркоидозом остаются не ясными. Саркоидоз рассматривают как Т-хелпер (Th1)-опосредованное нарушение иммунитета, с увеличением выработки интерферона- γ (IFN- γ), и фактор некроза опухоли (TNF- α) в сыворотке крови и БАЛ [3]. Эти цитокины (IFN- γ и TNF- α) играют важную роль в иммунном ответе против грибковых патогенов, таких как *Aspergillus*. Пока не выяснили, имеется ли у пациентов с саркоидозом, у которых развивается аспергиллез легких, относительно низкий уровень IFN- γ для обеспечения местного иммунитета против вторжения грибковой инфекции, и какую роль играет локальное изменение цитокинов Th1 типа у этой группы пациентов в возникновении аспергиллеза. В научной литературе редко упоминают случаи развития инвазивного аспергиллеза, аллергического бронхолегочного аспергиллеза (АБЛА), кроме одного случая развития АБЛА после лечения препаратом инфлексимаб, что подтверждает нарушение только местного иммунного ответа при адекватном системном иммунном ответе [3, 9, 10]. Однако применение глюкокортикостероидов или других иммуносупрес-

сантов у таких пациентов может иметь неоднозначные последствия. С одной стороны, подавление воспалительного ответа при саркоидозе препятствует формированию фиброза и образованию полостей, с другой – способствует прогрессированию аспергиллеза легких и развитию инвазивного аспергиллеза легких [5, 11]. Помимо нарушений местной иммунной защиты, важную роль в формировании аспергиллеза играет выраженность нарушений архитектоники легочной ткани [3, 5]. В подавляющем большинстве случаев, аспергиллез легких развивается при IV стадии саркоидоза (основной признак – формирование фиброза) и, хотя формирование полостей не является характерным признаком саркоидоза легких, их наличие представляет позднюю необратимую стадию заболевания и высокий риск присоединения аспергиллеза [6, 7].

При саркоидозе легких, осложненном аспергиллезом, клинические проявления определяются формой аспергиллеза. Так, при развитии хронического некротизирующего аспергиллеза обычно появляется хронический продуктивный кашель, нередко – с умеренным или минимальным кровотечением [1], зачастую – общая слабость, снижение массы тела. Наиболее часто этот вариант аспергиллеза протекает хронически, с периодическими обострениями и прогрессирующим нарушением функции легких вследствие фиброза [1, 6, 7].

При развитии аспергиллемы имеет место длительный бессимптомный период, но, по мере прогрессирования, также появляются кашель, кровохарканье, субфебрилитет, снижение массы тела [3].

Кровохарканье развивается у 3,6% больных саркоидозом, и первый случай его возникновения должен быть поводом поиска инфекции, вызванной *Aspergillus* spp., так как основной причиной развития кровохарканья у больных саркоидозом является аспергиллез (формируется у 90% пациентов с саркоидозом, осложненным аспергиллезом легких) и может быть жизнеугрожающим состоянием. Смертность от легочного кровотечения у больных саркоидозом легких колеблется от 2 до 14% и достигает 26% в случае присоединения аспергиллеза [2, 3, 6].

Диагноз ХНАЛ подтверждают при наличии соответствующей клинической картины, данных рентгенологического исследования легких и результатов лабораторных тестов: серологического исследования о присутствии антигена *Aspergillus* в бронхиальном секрете (мокроте, ПЖБ, БАЛ), роста культуры *Aspergillus* в мокроте и ПЖБ, а также при гистологическом исследовании на обнаружение элементов мицелия гриба в биоптате легких [1, 3-7, 11].

В большинстве случаев возбудителем аспергиллеза у больных саркоидозом является *A. fumigatus*, реже – *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans* [2, 3, 5]. В мокроте и ПЖБ у пациента выявляли рост культуры *A. fumigatus*. При определении галактоманна в сыворотке крови получили отрицательные результаты, что подтверждено данными исследования Pena T.A.,

согласно которым в 100% случаев при определении антигена *Aspergillus* сыворотки крови были получены отрицательные результаты. Это проявляется в низком диагностическом значении определения галактоманна у пациентов с саркоидозом. Учитывая хронический характер инфекции и тот факт, что при саркоидозе не происходит нарушения синтеза антител, большее значение имеет определение антител к антигенам *Aspergillus*. По данным исследований, более чем в 90-95% случаев методы выявления антител в сыворотке являются положительными [2]. Однако результаты могут быть ложноотрицательными в случае иммуносупрессии или когда аспергиллез вызван видом, отличным от *A. fumigatus*. У пациента был обнаружен положительный титр антител Ig G = 1: 800 (норма – до 1: 100).

Среди методов рентгенологического исследования наиболее информативным является метод КТ ОГК, так как с его помощью можно точно установить степень поражения легких, выявить наличие таких осложнений, как развитие аспергиллеза легких на ранних стадиях, а также он необходим для определения тактики ведения пациента и оценки эффективности проводимого лечения в дальнейшем [7, 12]. Типичные поражения на КТ чаще отмечают в верхних отделах легких, поскольку у пациентов с саркоидозом аспергиллез легких развивается преимущественно в верхних отделах легких, чаще – справа, что связано с ингаляционным путем заражения, а также с характерным для саркоидоза формированием фиброза в верхних долях легких [1-3, 5,7].

Лечение больных аспергиллезом легких на фоне саркоидоза до сих пор представляет определенные трудности, поэтому необходимо его дальнейшее изучение. Лечение аспергиллеза может предупреждать деструкцию легочной ткани у больных, которые уже имеют нарушения легочной функции, и предупреждать развитие таких осложнений, как легочное кровотечение, спонтанный пневмоторакс [2, 3, 13-15]. Вориконазол является препаратом выбора при лечении хронического аспергиллеза в соответствии с рекомендациями общества инфекционных болезней Америки (IDSA) [2]. В нескольких исследованиях авторы подтвердили, что этот препарат хорошо переносится больными, и с его помощью можно достичь значительных результатов. Однако эффективность этого лечения, его продолжительность в подгруппе пациентов с саркоидозом не изучали. Предпо-

лительно, длительность приема этого препарата на протяжении 6-9 месяцев обеспечивает достаточную эффективность [3].

Pena с соавторами в 2011 г. отмечали эффективность применения вориконазола в сравнении с итраконазолом в группе пациентов с саркоидозом, осложненным аспергиллезом легких. В одном из исследований было показано, что антимикотическая терапия может уменьшать активность саркоидоза напрямую и может быть более эффективной, чем лечение кортикостероидами, что, возможно, связано со способностью вориконазола повышать уровень продукции TNF- α в организме и Т-хелперов 1 типа, моноцитов *in vitro*. Кроме того, на сегодняшний день обсуждают вопрос о роли микотической инфекции в развитии саркоидоза [5, 10, 16, 17].

Несмотря на лечение глюкокортикостероидами, прогрессирование саркоидоза может приводить к терминальной стадии фиброза легких, что выявляют в 10% случаев. Таким пациентам показано проведение трансплантации легких, и обычно проводят одностороннюю трансплантацию. Однако для пациентов с хронической инфекцией легких, такой как аспергиллез, а также в случае развития кистозного фиброза легких для снижения риска заражения в период проведения иммуносупрессивной терапии необходимо выполнение двусторонней трансплантации легких [15].

Таким образом, в случае выявления фиброзно-кистозной формы саркоидоза целесообразно проводить обследование на наличие присоединившейся инфекции, вызванной *Aspergillus* spp. [3, 5]. Определение IgG к *Aspergillus* у больных с фиброзно-кистозной формой саркоидоза может быть эффективным средством выявления хронического аспергиллеза легких и необходимо для принятия решений о возможности применения глюкокортикостероидной или другой иммуносупрессивной терапии, а также своевременного назначения антимикотиков [5].

ВЫВОДЫ

1. Легочный фиброзно-кавернозный саркоидоз является заболеванием, предрасполагающим к развитию аспергиллеза легких.
2. С помощью ранней диагностики и адекватной терапии аспергиллеза у пациентов с саркоидозом легких можно добиться устойчивой стабилизации патологического процесса.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Климко Н.Н. Диагностика и лечение оппортунистических микозов. – СПб., 2008. – С. 109-111.
2. Lachkar S, Dominique S, Thiberville L, et al. Aspergillosis and sarcoidosis// J. of Hospital Infect. – 2007. – Vol. 24, №8. – P. 943-953.
3. Pena T.A., Soubani A.O., Samavati L. Aspergillus lung disease in patients with sarcoidosis. A case series and review of the literature //Lung. – 2011. – Vol. 189. – P. 167-172.
4. Denning D.W., Riniotis K., Dobrashian R., Sambatakou H. Chronic cavitary and fibrosing pulmonary and pleural aspergillosis: case series, proposed nomenclature change and review// Clin. Infect. Dis. – 2003. – Vol. 37. – P. 265-280.
5. Denning D.W., Pleuvry A., Cole D.C. Global burden of chronic pulmonary aspergillosis complicating sarcoidosis// Eur. Respir. J. – 2013. – Vol. 41. – P. 1-7.
6. Chandramani P, Sandeep S, Ashok S. Aspergilloma formation in cavitary sarcoidosis//J. Bras. Pneumol. – 2009. – Vol. 35,

- №5. – P. 480-483.
7. *Kantartzis S.N., Dacic S., Diane C.* Pulmonary sarcoidosis complicated by aspergilloma formation// *RadioGraphics*. – 2012. – Vol. 32. – P. 469-473.
 8. *Визель И.Ю., Шмелев Е.И., Баранова О.П.* Состояние больных саркоидозом исходно и 10 лет спустя при различной тактике их ведения (мультицентровый анализ)// *Пульмонология*. – 2012. – №4. – С. 29- 34.
 9. *Rodland E.K., Ueland T., Bjornsen S., et al.* Systemic biomarkers of inflammation and haemostasis in patients with chronic necrotizing pulmonary aspergillosis//*BMC Infect. Dis.* –2012. – Vol. 12. – P. 144-150.
 10. *Tercej M., Stopinšek S., Ihan A., et al.* In vitro and in vivo reactivity to fungal cell wall agents in sarcoidosis // *Clin. and Experim. Immunol.* – 2011. – Vol. 166. – P. 87-93.
 11. *Hae-Seong Nam, Kyeongman Jeon, Sang-Won Um, et.al* Clinical characteristics and treatment outcomes of chronic necrotizing pulmonary aspergillosis: a review of 43 cases// *Int. J.of Infect. Dis.* – 2010. – Vol. 14, №6. – P. 479-482.
 12. *Camuset J., Nunes H., Dombret M.C., Bergeron A., et al.* Treatment of chronic pulmonary aspergillosis by Voriconazole in nonimmunocompromised patients//*CHEST*. – 2007. – Vol. 13. – P. 1435-1441.
 13. *Cadranel J., Philippe B., Hennequin C., et al.* Voriconazole for chronic pulmonary aspergillosis: a prospective multicenter trial//*Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 2012. – Vol. 31. – P. 3231-3239.
 14. *Carreira S., Lopes A., Pinto Basto R., et al.* Necrotizing pulmonary aspergillosis: regarding two clinical cases// *Pneumol.* – 2011. – Vol. 17, №2. – P. 80-84.
 15. *Minces L.R., Bhamra J.K., Abdel-Massih R., et al.* Successful double lung transplantation in a patient with bilateral pulmonary and sinus aspergillomas// *Transpl. Infect. Dis.* – 2011. – Vol. 12.
 16. *Simitsopoulou M., Roilides E., Paliogianni F., et al.* Immunomodulatory effects of voriconazole on monocytes challenged with *Aspergillus fumigatus*: differential role of Toll-like receptors // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2008. – Vol. 52. – P. 3301-3306.
 17. *Tercej M., Salobir B., Rylander R.* Antifungal medication is efficient in treatment of sarcoidosis // *Ther. Adv. Resp. Dis.* – 2011. – Vol. 5. – P. 157-162.

Поступила в редакцию журнала 16.12.13 г.

Рецензент: Я.И. Козлова



СЛУЧАЙ УСПЕШНОГО ЛЕЧЕНИЯ КРИПТОКОККОВОГО МЕНИНГОЭНЦЕФАЛИТА У ПАЦИЕНТА С ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЦИТАРНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

¹Хостелиди С.Н. (ассистент кафедры)*,
²Потапенко В.Г. (врач-гематолог),
²Шейдаева Э.Н. (врач-гематолог),
²Самородова И.А. (врач-гематолог),
²Котова Н.А. (врач-гематолог),
²Климович А.В. (зав. отд.), ¹Богомолова
Т.С. (зав. лаб.), ¹Игнатъева С.М. (в.н.с.),
²Медведева Н.В. (нач. мед.), ¹Климко Н.Н.
(зав. кафедрой)

¹НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина и кафедра клинической микологии, аллергологии и иммунологии, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова;
²Городская клиническая больница №31, Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2013

Криптококковый менингит – тяжелое заболевание, наиболее часто развивающееся у ВИЧ-инфицированных лиц. У больных с гемобластозами данную патологию наблюдают значительно реже. Летальность при криптококковом менингоэнцефалите у пациентов с хроническим лимфолейкозом, на фоне проведенной антимикотической терапии, составляет 20%. В статье представлен краткий обзор литературы и случай успешного лечения криптококкового менингоэнцефалита у больного хроническим лимфоцитарным лейкозом.

Ключевые слова: амфотерицин В, криптококкоз, менингоэнцефалит, флуконазол, хронический лимфоцитарный лейкоз

THE CASE OF CRYPTOCOCCOSIS MENINGITIS SUCCESSFUL TREATMENT IN A PATIENT WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

¹Khostelidi S.N. (assistant of the chair),
²Potapenko V.G. (hematologist),
²Sheydaeva E.N. (hematologist),

* Контактное лицо: Хостелиди Софья Николаевна,
тел.: (812) 303-51-46

²Samorodova I.A. (hematologist), ²Kotova
N.A. (hematologist), ²Klimovich A.V. (head
of the department), ¹Bogomolova T.S. (head
of the laboratory), ¹Ignatyeva S.M. (leading
scientific collaborator), ²Medvedeva N.V.
(head of the clinic), ¹Klimko N.N. (head of
the chair)

¹ Kashkin Research Institute of Medical Mycology and Chair of Clinical Mycology, Allergology and Immunology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov; ² City Clinical Hospital №31, Saint-Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2013

Cryptococcosis is a serious disease that mostly occurs in HIV-infected patients. In patients with hematological malignancies this pathology observed less frequently. Mortality in cryptococcal meningoencephalitis at patients with chronic limfoleukosis against the background of antimycotic therapy – 20%. A case of successful treatment of cryptococcosis meningoencephalitis in patients with chronic lymphocytic leukemia has been presented in the article.

Key words: amphotericin B, chronic lymphocytic leukemia, cryptococcosis, fluconazole, meningitis

ВВЕДЕНИЕ

Криптококкоз – тяжелая оппортунистическая инфекция, которая развивается преимущественно у больных с Т-клеточным иммунодефицитом. Основным фактором риска развития этого заболевания является СПИД, реже данное осложнение выявляют у пациентов, длительно получающих глюкокортикостероиды (ГКС) и иммуносупрессоры [1, 2], страдающих острым лейкозом, лимфопролиферативными заболеваниями, реципиентов органов и тканей. Клинические проявления криптококкоза зависят от характера и выраженности иммунодефицита. У больных СПИД наиболее часто изолированно поражаются ЦНС, легкие, кожа, и затем развиваются диссеминированные варианты инфекции с вовлечением костей, почек, надпочечников и т.д. [2-4]. Летальность среди таких пациентов очень высока (40-70%) и зависит от степени выраженности иммунодефицита [4]. У других категорий пациентов, как правило, выявляют криптококковый менингит, иные клинические варианты менее характерны [4, 5]. Течение данной патологии у больных без ВИЧ-инфекции изучено недостаточно, публикации немногочисленны.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Представлен клинический случай криптококкового менингита у пациента с хроническим лимфоцитарным лейкозом. Для постановки диагноза инвазивного микоза использовали клинические и лабораторные критерии, предлагаемые Европейской организацией по изучению и лечению рака (EORTC) и группой по изучению микозов (MSG) Национального института аллергологии и инфекционных заболеваний (NIAID) США [6].

Мы проанализировали данные из научной ли-

тературы, представленные в базах PubMed (июнь 2013 г.), Wiley Interscience (июнь 2013 г.) и Cochrane Library (июнь 2013 г.) за последние 20 лет. При поиске информации использовали следующие ключевые слова: *cryptococcosis, meningoencephalitis, chronic lymphocytic leukemia, non- AIDS, without HIV, fluconazole*.

Описание клинического случая.

Пациент Ц. 69 лет, болен с октября 2012 г. Из анамнеза заболевания известно, что летом 2012 г. появились частые рецидивирующие респираторные инфекции, также наблюдалось снижение массы тела на 5-6 кг за 2 месяца. С октября 2012 г. было зафиксировано повышение температуры тела до 38 °С. Тогда же впервые отмечалось нарушение координации.

Пациент обратился в поликлинику, где в клиническом анализе крови выявили абсолютный лимфоцитоз (общее количество лейкоцитов – $20 \cdot 10^9/\text{л}$, лимфоциты – 77%, пролимфоциты – 10%, тени Боткина-Гумпрехта). При компьютерной томографии обнаружили увеличенные лимфатические узлы шеи. На основании гистологического и иммуногистохимического исследований биоптата лимфатического узла и трепанобиоптата костного мозга диагностировали хронический В-клеточный лимфоцитарный лейкоз (стадия II – по Rai, B – по Binet). Был проведен 1 курс химиотерапии (ХИТ) ритуксимабом и лейкофаном.

Несмотря на значительную редукцию опухолевой массы, улучшения самочувствия после проведения ХИТ не отмечали. Только после назначения преднизолона по 10 мг/сутки наблюдали кратковременную тенденцию к регрессу неврологических расстройств. В дальнейшем вновь появились нарастание шаткости походки, нарушения координации, слуховых и зрительных галлюцинаций, участились фебрильные подъемы температуры.

На выполненной магнитно-резонансной томографии (МРТ) головного мозга: боковые желудочки расширены, симметричны; субарахноидальные пространства в конвексальных отделах (по лат. *convexus* – выпуклый) значительно, неравномерно расширены; мелкие очаги сосудистого генеза в субкортикальных отделах обоих полушарий головного мозга; очаг гиперинтенсивного сигнала в субкортикальных отделах левой затылочной доли до 4 мм. Изменения трактовали как лакунарный инфаркт в затылочной доле на фоне дисциркуляторной энцефалопатии.

Пациент был консультирован неврологом, который диагностировал дисциркуляторную энцефалопатию с психоорганическим компонентом. Назначенное лечение состояло из сосудисто-метаболических препаратов, галоперидола, продолжали прием преднизолона. Галлюциноз был частично купирован. При отмене преднизолона отмечали нарастание явлений энцефалопатии, полиурии. Для продолжения лечения пациент был направлен на стационарное лечение.

В городскую клиническую больницу №31 пациент впервые госпитализирован в декабре 2012 г. с сохраняющимися жалобами на выраженную общую слабость, шаткую походку, нарушение координации движений, снижение слуха, тактильные, слуховые и зрительные галлюцинации, рассеянность внимания.

При поступлении: общее состояние средней тяжести, температура тела – 36,6 °С. Кожа обычной окраски, чистая. Видимые слизистые оболочки обычной окраски, чистые. Небные миндалины не увеличены. Перкуторно над легкими – ясный легочный звук. Аускультативно – дыхание везикулярное, хрипов нет. Частота дыхательных движений 15 в минуту. Пульс ритмичный, единичные экстрасистолы. Тоны сердца звучные. Артериальное давление – 125 и 70 мм рт. ст. Частота сердечных сокращений – 84 в мин. Язык

чистый, влажный. Живот при пальпации безболезненный. Печень, селезенка и периферические узлы не увеличены. Сознание ясное. Ориентирован во времени и пространстве, несколько заторможен. Речь правильная. Очаговой симптоматики нет.

При обследовании в клиническом анализе крови от 6.12.2012 г.: Нб. – 90 г/л, эр. – $2,99 \cdot 10^{12}/\text{л}$, л. – $4,5 \cdot 10^9/\text{л}$, палочкояд. нейтроф. – 4%, сегментояд. нейтроф. – 9%, лимф. – 82%, мон. – 2%, тр. – $183 \cdot 10^9/\text{л}$.

В биохимическом анализе крови: АЛТ – 20 МЕ, АСТ – 17 МЕ, билирубин – 15 ммоль/л, глюкоза – 6,8 ммоль/л, креатинин – 74 ммоль/л.

Клинический анализ мочи – без патологии.

На рентгенограмме органов грудной клетки от 07.12.2012 г.: легочные поля эмфизематозны.

С учетом нарастающей неврологической симптоматики, была выполнена МРТ головного мозга, где повторно выявили признаки смешанной заместительной гидроцефалии, очаговые изменения головного мозга дистрофического и постишемического характера.

В связи с наличием симптомов поражения ЦНС, 06.12.2012 г. выполнена люмбальная пункция. Спинальная жидкость (СМЖ) прозрачная, белок – 0,77 г/л, цитоз – $25,0 \cdot 10^6/\text{л}$ (лимф. – 88%, мон. – 3%, макрофаги – 6%, нейтроф. – 3%), основной белок миелина – 3,1 нг/мл (норма до 1). Выявили ликворную гипертензию (27 см вод. ст. в положении лежа).

При микроскопии спинномозговой жидкости обнаружили дрожжеподобные клетки – грибы *Cryptococcus neoformans.*, криптококковый антиген (*Pastorex Crypto-Plus*, Bio-Rad).

На основании наличия признаков менингоэнцефалита, положительного теста «*Pastorex Crypto Plus*» со СМЖ, а также положительных данных при микроскопии и культуральном исследовании СМЖ, пациенту был выставлен диагноз: криптококкоз ЦНС (криптококковый менингоэнцефалит). Криптококковый менингоэнцефалит осложнился развитием метаболических нарушений (церебрального сольтеряющего синдрома), в связи с чем, в период антимикотической терапии, продолжили введение малых доз преднизолона до купирования гипонатриемии, стабилизации осмолярности крови. Начали противогрибковую терапию амфотерицином В в дозе 0,7 мг/кг/сутки. Выполнены повторные люмбальные пункции с целью коррекции внутричерепного давления. При повторных серологических исследованиях ВИЧ-инфекция была исключена.

По результатам иммунологического исследования установили снижение абсолютного числа лимфоцитов – $1,22 \cdot 10^9/\text{л}$ (норма – $1,27-3,26 \cdot 10^9/\text{л}$), снижение абсолютного числа Т-хелперов (CD4) – $0,453 \cdot 10^9/\text{л}$ (норма – $1,100 \cdot 10^9/\text{л}$) и естественных киллеров (CD16) – $0,171 \cdot 10^9/\text{л}$ (норма – $0,400 \cdot 10^9/\text{л}$).

Были выполнены неоднократно посевы крови и мочи на дрожжеподобные грибы – роста не обнаружили. Признаков наличия других инвазивных микозов и очагов диссеминации не отмечали.

Применение амфотерицина В осложнилось почечной недостаточностью, что потребовало коррекции дозы препарата (введение через день), после 2-х недель лечения амфотерицином В. В связи с персистенцией криптококка, был добавлен флуконазол в дозе 800 мг в сутки. Комбинированную терапию проводили 42 дня, до полной санации ликвора (отсутствие роста на питательной среде). Затем лечение продолжили флуконазолом в дозе 600 мг в сутки в течение 6 месяцев. Положительный тест «*Pastorex Crypto Plus*» со СМЖ определялся длительно до июня 2013 г. (первый отрицательный результат – в сентябре 2013). Общая продолжительность антимикотической терапии составила 222 дня; зафиксировали полную ремиссию криптококкового менингоэнцефалита.

ОБСУЖДЕНИЕ И ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Криптококкоз – тяжелая оппортунистическая инфекция, распространенность которой все более возрастает в последние десятилетия.

Возбудителем заболевания более чем у 95% пациентов являются *C. neoformans* var. *neoformans* и *C. neoformans* var. *grubii* (варианты А, D), которые распространены повсеместно, сапрофитируют в почве, в испражнениях птиц, на некоторых растениях [1, 7, 8]. Инфекции, обусловленные *C. neoformans* var. *gattii*, распространены преимущественно в эндемичных субтропических и тропических регионах, в основном, у иммунокомпетентных людей. Заражение обычно происходит ингаляционным путем. После инкубационного периода (от нескольких дней до нескольких месяцев) возникает поражение легких, затем – гематогенная диссеминация с поражением головного мозга и других органов [8, 9].

Основным фактором риска развития криптококкоза является СПИД [1, 7, 8]. Отметим, что *Cryptococcus* sp. проникают в макроорганизм через дыхательные пути, но у иммунокомпетентных пациентов происходит элиминация микроорганизма или возникает бессимптомная колонизация [9, 10]. При развитии иммунодефицитного состояния криптококки становятся патогенами. Так, среди пациентов с ВИЧ-инфекцией с низким уровнем CD4 (до 50-100 клеток / мкл), число заболевших криптококкозом резко возросло до 90% [11].

Кроме ВИЧ-инфекции, фактором риска возникновения криптококкоза является ятрогенная иммуносупрессия: применение высоких доз кортикостероидов, препаратов моноклональных антител (этанерцепт, инфликсимаб, алемтузумаб) [12]. Использование глюкокортикостероидов необходимо при целом ряде заболеваний (коллагенозы), у реципиентов органов и тканей и т.д. Доказано, что длительное (более трех недель) применение глюкокортикостероидов в высоких дозах (> 20 мг преднизолонa в сутки) приводит к снижению активности лимфоцитов [12, 13].

Эти данные подтверждены результатами исследования, проведенного в НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина. Так, в период 2002-2013 гг. в Санкт-Петербурге было выделено 118 изолятов *Cryptococcus neoformans*, из них 88% – из материала от больных СПИД, 7% – от больных с гемобластомами, 2% – от реципиентов почки (на фоне приема ГКС), у 3% – причина не была идентифицирована [14].

Заражение обычно происходит ингаляционным путем, значительно реже – при травматической имплантации возбудителя. Продолжительность инкубационного периода точно не установлена. Предполагают, что она также зависит от степени и скорости нарастания иммуносупрессии и может составлять от нескольких дней до нескольких месяцев. При этом

первично возникает поражение легких, которое зачастую не диагностируют, т.к. протекает данное состояние субклинически. Затем, в результате гематогенной диссеминации, развивается поражение ЦНС и других органов [1, 11, 13].

Основным клиническим вариантом криптококкоза является криптококковый менингоэнцефалит (70-90% случаев) [2, 3]. Обычно клинические признаки появляются постепенно, но при резко выраженном иммунодефиците, например, СПИД, возможно острое начало заболевания, сопровождающееся головной болью (75-90%), тошнотой и рвотой (30-50%), фотофобией и нарушением зрения (20-30%), очаговыми неврологическими симптомами и нарушением психики и сознания (10-30%). Для криптококкового менингоэнцефалита характерно подострое прогрессирующее течение с периодическими обострениями. У иммунокомпетентных пациентов это заболевание развивается медленно, его часто расценивают как идиопатическую гидроцефалию и диагностируют поздно [2, 3, 13]. Характерный признак криптококкового менингоэнцефалита – высокое внутричерепное давление. Например, у больных СПИД повышение давления СМЖ более 250 мм вод. ст. выявляют в 75% случаев. Высокое внутричерепное давление является основной причиной ранней летальности и сопровождается отеком зрительного нерва, нарушением зрения, нарушением слуха, сильной головной болью, нарушением сознания и патологическими рефлексами [11, 13, 15]. У наблюдаемого нами больного также признаки поражения ЦНС нарастали постепенно. В первые дни после диагностики отмечали высокие цифры давления СМЖ (до 270 мм вод. ст.), что потребовало проведения повторных «разгрузочных» люмбальных пункций.

Основным методом диагностики является выявление *Cryptococcus* sp. при микроскопии и посевах СМЖ, крови, БАЛ и других субстратах, а также определение криптококкового антигена в СМЖ, БАЛ, крови. Диагностическая чувствительность микроскопии биоматериала с окраской тушью составляет 40-70%, у больных СПИД вероятность выявления *Cryptococcus* sp. при микроскопии СМЖ выше, чем у пациентов без ВИЧ-инфекции [5, 8, 15, 16]. На стандартных микологических средах колонии *C. neoformans* обычно выявляют через 3-10 дней. Диагностическая чувствительность посева СМЖ – 50-70%, но этот метод диагностики требует дополнительного времени [15]. Определение криптококкового антигена в СМЖ, БАЛ и сыворотке крови имеет важное значение в ранней диагностике криптококкоза. Показатели специфичности и чувствительности стандартных тестов для определения криптококкового антигена (например, *Pastorex Crypto-Plus*, *Bio-Rad*) превышают 90% [15, 16].

Лечение проводят в стационаре, после стабилизации состояния больных его продолжают амбулаторно. Основными лечебными мероприятиями являются антифунгальная терапия (достижение ремиссии и

профилактика рецидива), коррекция внутричерепного давления и купирование или снижение выраженности факторов риска [17].

Выбор и продолжительность применения антимикотиков зависят от состояния больного и локализации процесса, а также фармакокинетики и фармакодинамики препарата. Амфотерицин В плохо проходит через ГЭБ, его клиническую эффективность при лечении криптококкового менингита объясняют высокой концентрацией в воспаленных менингеальных оболочках, а также фунгицидным действием. Липидный амфотерицин В создает низкую концентрацию в СМЖ и высокую концентрацию в веществе головного мозга. Флуцитозин, флуконазол и вориконазол хорошо проходят через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Уровень флуконазола в СМЖ у пациентов с грибковым менингитом составляет 52-85% концентрации в плазме крови, вориконазола – около 50%. Кроме того, вориконазол накапливается в высоких концентрациях в веществе головного мозга. Итраконазол плохо проходит через ГЭБ и создаются

очень низкие его концентрации в СМЖ [1, 18].

При криптококковом менингоэнцефалите в начале лечения назначают фунгицидный амфотерицин В в виде монотерапии или в сочетании с флуцитозинном, после стабилизации состояния больного, которое обычно наступает через 2 недели, – флуконазол. Применение липидного амфотерицина В способствует быстрой эрадикации возбудителя из СМЖ, а также менее нефротоксично по сравнению со стандартным амфотерицином В. Флуконазол в качестве начальной терапии используют только при невозможности применения стандартного или липидного амфотерицина В, поскольку при использовании флуконазола эрадикация возбудителя из СМЖ наступает медленнее [17]. Вориконазол назначают при неэффективности или токсичности других препаратов. При использовании азолов следует учитывать возможность лекарственных взаимодействий, в том числе снижения эффективности азолов на фоне применения рифампицина, а также повышение токсичности некоторых антиретровирусных препаратов

Таблица 1

Характеристики криптококкового менингоэнцефалита у разных пациентов с хроническим лимфолейкозом

Публикации	возраст, пол	Клиника	Лечение ХЛЛ	СМЖ лейкоциты / mm ³	СМЖ белок mg/dl	СМЖ глюкоза mg/dl	СМЖ м/с культура	Культура из крови	Лечение	Выживаемость
Leenders A., et al., 1995	47 лет, муж.	Пневмония, через 4 мес. головные боли и лихорадка.	флударабин, циклофосамид + преднизолон	64	–	–	микроскопия +, С. neoformans	тест положительный	Амфотерицин В с флуцитозинном, затем – флуконазол	ремиссия
Jégo P., et al., 2000	63 года, муж.	лихорадка, дезориентация	ПХТ+преднизолон	38	–	–	микроскопия +, С. neoformans	–	Амфотерицин В, затем – флуконазол всего 7 недель, после отмены препарата – рецидив, лечили липидным амфотерицином	жив, ремиссия
Assing K., et al., 2003	66 лет, муж.	общая слабость, головная боль, головокружение и двоение в глазах	хлорамбуцил + преднизолон 15 мг/сут.	53	14	13	микроскопия +, С. neoformans	–	Амфотерицин В, затем – флуконазол	жив, ремиссия
Ladislav Slovacek email, Ladislav Jebavy, 2007	74 года, муж.		ПХТ+преднизолон	–	–	–	микроскопия +, С. neoformans	тест положительный	Амфотерицин В	умер
Imdad Ahmed, et al., 2009	75 лет, муж.	эпизод синкопальных состояний, головные боли	ПХТ+преднизолон	38	72	N	микроскопия +, Crypto Plus +	–	Амфотерицин В с флуцитозинном, затем – флуконазол	жив, ремиссия
Reisfeld – Zadok, et al., 2009	78 лет, жен.	дезориентация, эйфория и эпизоды сомнамбулизма	Сочетание циклофосамида и преднизолона за предыдущие 6 мес.	175	161	40	микроскопия +, С. neoformans	–	Амфотерицин В (1 мг/кг) 2 недели, затем – флуконазол	жив, ремиссия
Reisfeld - Zadok et al. 2009	82 лет, муж.	головная боль и небольшое повышение температуры	длительно –лейкеран	36	186	7	микроскопия +, С. neoformans	–	Амфотерицин В, первая доза – липосомальный АмВ, затем – флуконазол	жив, ремиссия
Oguzhan Sitki Dizdar , at al., 2012	55 лет, муж.	головные боли, лихорадка, кашель	Нет. Преднизолон в течение двух недель (60 мг в первые 3 дня), затем - 30 мг в связи с развитием гемолитической анемии	20	36	26	тест положительный	тест положительный	Амфотерицин В	умер
Описываемый случай	69 лет, муж.	нарушение координации, тактильные, слуховые и зрительные галлюцинации	ритуксимаблейкеран, преднизолон	До 112 (лимф. - 86%)	179	7,4	микроскопия +, С. neoformans	–	Амфотерицин В, затем – флуконазол	жив, ремиссия

[18]. Антифунгальную терапию продолжают до стойкого купирования клинических признаков инфекции, устранения или стабилизации радиологических признаков, эрадикации возбудителя из СМЖ, крови и очагов поражения, а также завершения периода выраженной иммуносупрессии. Определение криптококкового антигена не является методом оценки эффективности лечения в связи с его длительным персистированием в СМЖ и сыворотке крови, даже, если оно было успешным. Через 2 недели адекватной антифунгальной терапии эрадикацию возбудителя из СМЖ отмечают у 60% больных, через 10 недель – у 70% [1, 17].

У наблюдаемого нами больного лечение также проводили в соответствии с международными стандартами [17, 19]. Первично был назначен амфотерицин В, однако в связи с развитием нефротоксичности, потребовалась коррекция дозы и назначение комбинированной терапии с флуконазолом, которую проводили до полной санации ликвора, что позволило добиться полного излечения микотического процесса.

Без терапии летальность при криптококковом менингоэнцефалите у больных СПИД достигает 100%, в период начального лечения умирает 10-25% больных, еще 30-60% – в течение первых 12 месяцев после лечения. У больных без ВИЧ летальность при криптококкозе составляет 20-30% и зависит от степени иммуносупрессии. Ухудшают прогноз у пациентов без ВИЧ-инфекции продолжение применения стероидов и иммуносупрессоров, прогрессирование гембластозов, онкологических процессов, почечная или печеночная недостаточность [1, 20, 21].

Мы провели обзор литературы, используя следующие ключевые слова: *cryptococcosis, meningoencephalitis, chronic lymphocytic leukemia, non- AIDS, without HIV, fluconazole*. За последние 20 лет мы обнаружили 8 статей, описывающих клинические случаи криптококкового энцефалита у больных хроническим лимфолейкозом (табл. 1).

Проведя анализ публикаций, мы выяснили, что все пациенты получали полихимиотерапию и/или глюкокортикостероиды. При исследовании СМЖ определяли высокое внутричерепное давление, высокий уровень белка и содержания лимфоцитов.

Диагноз ставили на основании данных микроскопии и культурального исследования. Неблагоприятными прогностическими факторами были: высокое внутричерепное давление, низкий уровень глюкозы в СМЖ, число лейкоцитов менее 20 в мл, выделение грибов при посеве крови и диссеминация патологического процесса. Также неблагоприятными факторами, влияющими на прогноз заболевания, наши зарубежные коллеги считали возраст старше 60 лет и наличие психических расстройств у больных.

У наблюдаемого нами пациента к моменту возникновения первых клинических признаков криптококкового менингоэнцефалита химиотерапии не проводили. Вероятнее всего, фактором риска, в данном случае, являлось само по себе лимфолиферативное заболевание. В диагностике криптококкового менингоэнцефалита мы использовали стандартные серологические и микологические методы диагностики. Было проведено обследование для исключения диссеминации микотического процесса. Согласно данным из научной литературы, эрадикация возбудителя протекала в первые 2-3 недели. У наблюдаемого нами больного впервые возбудитель перестал выделяться из ликвора спустя 5 недель от начала антимикотической терапии. Несмотря на наличие целого ряда прогностически неблагоприятных факторов (возраст старше 60 лет, абсолютный лимфоцитоз, высокое внутричерепное давление, низкий уровень глюкозы в СМЖ), своевременно начатая антимикотическая терапия, коррекция давления СМЖ, были достигнуты эрадикация возбудителя и полная клиническая ремиссия криптококкового менингоэнцефалита.

ВЫВОДЫ

1. Криптококковый менингоэнцефалит – одна из наиболее часто встречающихся клинических форм криптококкоза у не-ВИЧ инфицированных больных.
2. Хронический лимфоцитарный лейкоз может быть одним из факторов риска развития криптококкоза.
3. Проведение адекватной антифунгальной терапии, коррекция внутричерепного давления позволяют сохранить жизнь иммунокомпromетированным пациентам.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Климко Н.Н. Микозы: диагностика и лечение. 2-е изд. – М.: Ви Джи Групп, 2008. – 336 с.
2. Nguyen M.H., Husain S., Clancy C.J., et al. Outcomes of central nervous system cryptococcosis vary with host immune function: results from a multi-center, prospective study // J. Infect. – 2010. – Vol. 61, №5. – P. 419-426.
3. Mwaba P., Mwansa J., Chintu C., et al. Clinical presentation, natural history and cumulative death rates of 230 adults with primary cryptococcal meningitis in Zambian AIDS patients treated under local conditions // Postgrad. Med. – 2001. – Vol. 77. – P. 769-773.
4. Ramos-e-Silva M., Lima C.M., Schechtman R.C., et al. // Clin. Dermatol. – 2012. – Vol. 30, №6. – P. 616-627.
5. Аравийский Р.А., Васильева Н.В., Климко Н.Н. Диагностика микозов – СПб.: СПбМАПО, 2004. – с. 185.
6. 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 // CID. – 2008. – Vol. 46. – P. 1813-1821.
7. Chen S., Sorrell T., Nimmo G., et al. Epidemiology and Host and Variety-Dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand // Clin. Infect. Dis. – 2000. – Vol. 31. – P. 499-508.

8. Chayakulkeeree M., Perfect J.R. Cryptococcosis// Infect. Dis. Clin. North. Am. – 2006. – Vol. 203. – P.507-544.
9. Heitman J., Kozel T., Kwon-Chung K.J., et al. *Cryptococcus neoformans*: from Human pathogen to Model Yeast// J. Heitman ASM Press, Washington, DC., 2010. – p. 620.
10. Alvarez M., Casadevall A. Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages// Curr. Biol. – 2010. – Vol. 7. – P. 2161-2165.
11. Aberg J.A., Powderly W.G. Cryptococcosis and HIV// WebSite – HIV InSite is a project of the UCSF Center for HIV Information. Copyright 2013, Regents of the University of California. <http://hivinsite.ucsf.edu/InSite?page=kb-05-02-05>
12. Vilchez R.A., Fung J., Kusne S. Cryptococcosis in organ transplant recipients: an overview// Am. J. Transplant. – 2002. – Vol. 27. – P. 575-580.
13. Zhu L.P., Wu J.Q., Xu B., et al. Cryptococcal meningitis in non-HIV-infected patients in a Chinese tertiary care hospital, 1997-2007// Med Mycol. – 2010. – Vol. 48, №4. – P. 570-579.
14. Bogomolova T.S., Vasilyeva N.V., Vybornova I.V., et al. Susceptibility to fluconazole of *Cryptococcus neoformans* isolates from patients in Saint Petersburg, Russia // Mycoses: Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Dis. – 2013. – Vol. 56, №3. – P. 64.
15. Васильева Н.В., Клишко Н.Н., Цинзерлинг В.А. Диагностика и лечение инвазивных микозов: современные рекомендации // Вестник СПбМАПО. – 2010. – Т. 2, №4. – С. 5-18.
16. Lin T.Y., Yeh K.M., Lin J.C., et al. Cryptococcal disease in patients with or without human immunodeficiency virus: clinical presentation and monitoring of serum cryptococcal antigen titers// J. Microbiol. Immunol. Infect. – 2009. – Vol. 42, №3. – P. 220-226.
17. Perfect J.R., Dismukes W.E., Pappas P.G., et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of America// CID. – 2010. – Vol. 50, №3. – P. 291-322.
18. Колбин А.С., Клишко Н.Н., Карбельская И.В. Клинико экономические аспекты применения противогрибковых средств (обзор литературы) // Проблемы стандартизации в здравоохранении. – 2008. – №3. – С. 26-36.
19. Drgona L., Colita A., Klimko N., et al. Triggers for driving treatment of at-risk patients with invasive fungal disease// J. Antimicrob. Chemother. – 2013. – Vol.68, Suppl 3: iii17–iii24 doi:10.1093/jac/dkt391
20. Jongwutiwes U., Sungkanuparph S., Kiertiburanakul S. Comparison of clinical features and survival between cryptococcosis in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative patients// Jpn. J. Infect. Dis. – 2008. – Vol. 61, №2. – P. 111-115.
21. Xie S., Sao R., Braun A., Bottone E.J. Difference in *Cryptococcus neoformans* cellular and capsule size in sequential pulmonary and meningeal infection: a postmortem study // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. – 2012. – Vol. 73, №1. – P. 49-52.

Поступила в редакцию журнала 26.11.13

Рецензент: М.А. Шевяков



РОЛЬ *CANDIDA* SPP. В КЛИНИЧЕСКОМ ТЕЧЕНИИ ACNE VULGARIS

Мавлянова Ш.З. (зав. отделом)*,
Хакимов Д.Р. (докторант)

Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр дерматологии и венерологии МЗ РУз, Ташкент, Узбекистан

© Мавлянова Ш.З., Хакимов Д.Р., 2013

При изучении обсемененности Candida spp. у пациентов с acne vulgaris (AV) наблюдали высокую выявляемость патогенов этого рода – 69,05% (у 29 из 42 пациентов) с превалированием C. tropicalis – 33,4% и C. albicans – 19,4% соответственно, с высоким содержанием (от 14746,8±3958,9 до 40684,2±4465,3 КОЕ/г) Candida spp., что свидетельствовало о развитии дисбиоза кишечника. Подобная обсемененность отражает грибковую нагрузку в организме, что может служить индикатором прогрессирования заболевания.

Ключевые слова: Candida species, кишечник, клиника, микогенная сенсibilизация, субклассы IgG, угревая болезнь

THE ROLE OF *CANDIDA* SPP. IN THE PROGRESSING OF ACNE VULGARIS

Mavlyanova Sh.Z. (head of the department),
Khakimov D.R. (doctoral candidate)

Republican Specialized Scientific Practical Medical Center of Dermatology and Venereology of MH RUz, Tashkent, Uzbekistan

© Mavlyanova Sh.Z., Khakimov D.R., 2013

The condition of contamination by Candida spp. in the patients with acne vulgaris (AV) has been studied. As a result of mycological research organism in patients with acne vulgaris observed a high detection rate of Candida spp. - 69,05% (in 29 of 42 patients) prevailed of C. tropicalis – 33,4% and C. albicans – 19,4%, respectively. There was high colonization from 14746,8±3958,9 to 40684,2±4465,3 CFU/g, which was evidence of the development of intestinal dysbiosis caused by Candida spp. Infection of the Candida spp. in the intestine of patients with acne extent reflects fungal load in the body that can serve as an indicator of the progression of the disease.

Key words: acne vulgaris, Candida species, clinic, IgG subclasses, intestine, mycogenic sensibilization

ВВЕДЕНИЕ

Из-за неуклонного роста заболеваемости acne vulgaris (AV) среди лиц подросткового и молодого активного возрастов, хронического, тяжелого течения, резистентности к проводимой базисной терапии, способствующих косметическим дефектам, и снижения качества жизни пациентов, необходим глубокий подход к изучению патогенетических механизмов развития данной болезни. В ее патогенезе важное значение придают наследственно обусловленной гиперандрогении, фолликулярному кератозу, нарушениям кератинизации, активации микроорганизмов с последующим развитием инфильтративных воспалений [1-4].

Важным маркером acne vulgaris являются благоприятные условия для размножения факультативных анаэробов *Propionibacterium acnes* и *P. granulosum*, которые обнаруживают примерно у 86-93% больных [2, 5-7]. Длительная колонизация и персистенция этих микроорганизмов на коже способствуют развитию сенсibilизации и рецидивов заболевания. Периодический прием антибиотиков (системного и местного действия), системных ароматических ретиноидов при тяжелых и упорно текущих формах acne vulgaris приводят к развитию оппортунистических инфекций или сенсibilизации, которые, в свою очередь, усугубляют хроническое течение заболевания [2, 6, 7].

Микогенная сенсibilизация у людей занимает одно из ведущих мест среди других сенсibilизаций микробного происхождения. Она может развиваться как на фоне инвазивного микотического процесса, миконосительства, так и при многократном поступлении в организм (особенно – через дыхательные пути) клеток гриба, их частиц и продуктов метаболизма [2, 7].

Микозы и микогенная сенсibilизация, появляясь на фоне затяжной и хронической патологии, осложняют основные заболевания кожи, способствуют их длительному течению, рецидивированию, порой – инвалидизации. В возникновении микотических осложнений важную роль играют ятрогенные факторы: применение инвазивных методов диагностики и лечения, а также назначение препаратов, снижающих функцию иммунной системы, таких как антибиотики широкого спектра действия, глюкокортикостероиды, цитостатики [2, 3].

В связи с этим, необходимо изучение частоты и характера возникновения микогенной сенсibilизации, особенностей ее клинического проявления и разработки комплексного лечения у пациентов с AV.

Цель исследования – изучить роль *Candida* spp. в клиническом течении acne vulgaris с учетом иммунологических и микологических данных.

* Контактное лицо: Мавлянова Шахноза Закировна, тел.: (99871) 214-50-01

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследовано 42 пациента с *acne vulgaris* в возрасте от 14 до 31 года (лиц женского пола – 9, мужского – 33). В анамнезе обследованных больных аллергические заболевания или аллергические реакции на пищевые продукты и/или лекарственные препараты не выявили. Все пациенты обследованы на глистную инвазию.

В клинические исследования входило определение степени тяжести заболевания с применением классификации, предложенной Plewig G. и Kligman A.M. в 1994 г. Количественное содержание специфических IgG, IgG к антигену *Candida albicans*, общего IgE в сыворотке крови выявляли с помощью иммуноферментных тест-систем «Вектор-Бест» (Новосибирск).

Микробиологические исследования заключались в микроскопировании биосубстратов (слизистой оболочки полости рта, кала, кожных чешуек) и культурального исследования с использованием среды Сабуро, на которую засеивали патологический материал, затем посеивали в термостате при +37 °С в течение 48 часов и проводили учет количества дрожжевой биоты (Караев З.О. и др., 1984).

Фекалии (1 г) переносили в пробирку с 9 мл физиологического раствора NaCl, размешивали, отстаивали в течение 5-10 минут для осаждения крупных частиц. Из полученного разведения 1:10 готовили разведения 1:100, высевая из них по 0,1 мл на агар Сабуро в чашках Петри. Затем распределяли нанесенную суспензию шпателем и помещали в термостат (37 °С). Учет количества колоний выросшей дрожжевой биоты производили в расчете на 1 г фекалий.

Статистическую обработку полученных результатов выполняли с помощью программы Statistika V.55A с использованием критерия Шапиро-Уилка.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Согласно классификации, предложенной Plewig G. и Kligman A. M. (1994), у 42 пациентов с AV выделили следующие ее формы: комедоны (*comedo seu acne comedonica*) – у 3 (7,1%), папуло-пустулезную форму (*acne papulosa et papulo pustulosa*) – у 26 (61,9%), флегманозную форму (*acne phlegmonosa*) – у 8 (19,04%), молниеносные угри (*acne fulminans*) – у 5 (11,9%).

По тяжести заболевания у 10 человек (23,8%) диагностировали легкую степень течения *acne vulgaris*, у 15 (35,7%) – среднюю и у 17 (40,5%) – тяжелую.

В результате микробиологических исследований установили высокую выявляемость *Candida spp.* – в 69,05% случаев (у 29 из 42 больных): в наибольших количествах из кишечника – в 54,7% (у 23 больных) и со слизистой оболочки полости рта – в 26,2% (у 11). На коже туловища микромицеты не обнаруживали.

При изучении морфобиологических особенностей *Candida spp.* у пациентов с *acne vulgaris* микро-

скопически наблюдали их почкующиеся формы на слизистой оболочке полости рта в 5 случаях. Были идентифицированы следующие виды *Candida spp.*: *C. tropicalis* – 33,4%, *C. albicans* – 19,4%, *C. krusei* – 6,7%, *C. glabrata* – 4,7%.

Иммуноферментным анализом (ИФА) титров подкласса IgG и IgG к *Candida* в сыворотке крови пациентов с AV обнаружили статистически достоверное повышение концентрации всех показателей иммуноглобулинов по сравнению с показателями в контроле ($P < 0,05$) (табл.). На наш взгляд, такое резкое повышение концентрации субклассов IgG обуславливает напряженность организма к инфильтративно-воспалительному процессу.

Таблица

Некоторые показатели гуморального звена иммунитета (субклассов IgG, IgG к *Candida*, общего IgE) в сыворотке крови и обсемененности кишечника *Candida spp.* у пациентов с *acne vulgaris* (М±м) мг/мл

подклассы	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgE	IgG <i>Candida</i>	кал
Здоровые N=15	2,4± 0,3	1,4± 0,3	0,6± 0,1	0,004± 0,002	27,5± 6,8	0,2±0,03	502±39,1
Легкая степень N=11	6,03± 0,1*	3,1± 0,08*	1,2± 0,07*	0,9± 0,05*	147,3± 9,7*	0,4±0,04*	14746,8± 3958,9*
Средняя ст. N=10	5,6± 0,3*	3,08± 0,1*	0,9± 0,07*	0,7± 0,08*	164,4± 12,2*	0,5±0,08*	36110± 8253,3*
Тяжелая ст. N=13	5,2± 0,3*	2,6± 0,1*	1,09± 0,06*	1,02 ±0,03*	142,6± 6,4*	0,3±0,07*	40684,2± 4465,3*

* - показатель достоверности по отношению к показателям контрольной здоровой группы ($P < 0,05$).

Для пациентов с тяжелой степенью течения *acne vulgaris* было характерным образование более 25 папулезных и пустулезных элементов на коже туловища, плотных узелковых элементов инфильтрированного характера; уровень IgG1 в 2,2 раза возрастал по сравнению с показателями, выявленными у здоровых лиц ($P < 0,05$).

У пациентов с легкой степенью течения заболевания отмечали наличие комедонов и узелков воспалительного характера в количестве менее 10; титр IgG1 возрастал в 2,5 раза, IgG2 – в 2,2 раза, IgG3 – в 2 раза и IgG4 – в 225 раз ($P < 0,05$). Такую же тенденцию наблюдали и в группе пациентов со средней степенью тяжести течения AV ($P < 0,05$).

При микробиологических исследованиях кала на наличие *Candida spp.* обнаружили его повышенную колонизацию. Так, у пациентов с легкой степенью течения AV обсемененность кишечника *Candida spp.* составила 14746,8±3958,9 КОЕ/г, что в 29,4 раза превышало показатели, выявленные у здоровых лиц ($P < 0,05$). Тогда как у больных со средней и тяжелой степенью AV обсемененность кишечника возрастала в 71,9 раз и 81,04 раз соответственно.

Отметим, что при исследовании уровня IgG к *Candida* у пациентов с AV отмечали его повышение в статистических достоверных показателях по сравнению с группой здоровых лиц ($P < 0,05$) (табл.).

Из полученных данных следует, что у пациентов с *acne vulgaris* развивался дисбиоз кишечника, обу-

словенный *Candida* spp., и имела место повышенная чувствительности организма к *Candida* spp. На основании высоких показателей IgG4 можно говорить о развитии грибковой сенсибилизации, что связано с высоким уровнем общего IgE ($P < 0,05$).

Для клинического течения AV с микогенной сенсибилизацией был характерен полиморфизм кожных высыпаний, т.е. на фоне угревых высыпаний отмечали наличие эритематозно-сквамозных и папулезных высыпаний на коже лица, грудной клетки, межлопаточной области, сопровождающиеся зудом.

Изучение количественной характеристики *Candida* spp. в кишечнике представляет большой интерес в плане прогнозирования степени тяжести

клинического течения acne vulgaris. Метод микологического исследования кала информативен, более специфичен, представляет состояние дисбиоза, обусловленного *Candida* spp. в кишечнике больного, обуславливает достоверную информацию о грибковой нагрузке организма и может являться как диагностическим, так и прогностическим критерием оценки степени тяжести клинического течения заболевания.

Таким образом, исследование содержания *Candida* spp. в кишечнике у пациентов с acne vulgaris отражает грибковую нагрузку в организме, что может служить индикатором прогрессирования заболевания и поводом к разработке своевременной тактики комплексного противогрибкового лечения.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Герасимчик Л.Ф., Серета Т.А. Роль *Candida* spp. в развитии дисбиоза кишечника у амбулаторных больных с патологией желудочно-кишечного тракта // Проблемы медицинской микологии. – 2006. – Т.8, №2. – С. 29-30.
2. Мавлянова Ш.З., Исмагилов А.И., Тилавбердыев Ш.А. Особенности клинического течения кандидоза слизистой оболочки полости рта у дерматологических больных // Проблемы медицинской микологии. – 2006. – Т.8, №2. – С. 59-60.
3. Мавлянова Ш.З., Тешабаева Д.А., Алимухамедова Ю.А. Субклассы иммуноглобулинов G - как критерии диагностики степени тяжести атопического дерматита // Дерматовенерология и эстетическая медицина. – 2010. – №3. – С. 14-16.
4. Bataille V., Snieder H., MacGregor A.J., et al. The influence of genetics and environmental factors in the pathogenesis of acne: a twin study of acne in women // Invest. Dermatol. – 2002. – Vol. 119. – P. 1317-1322.
5. Аравийская Е.Р. Современный взгляд на лечение акне: состояние проблемы и новые возможности // Лечащий врач. – 2003. – №4. – С. 4-6.
6. Багмет А.Н., Шаповалова О.В. Коррекция нарушения микробиоценоза кожи при легкой форме угревой болезни // Дерматология и венерология. – 2003. – №1(19). – С. 44-46.
7. Елинов Н.П. Токсигенные грибы в патологии человека // Проблемы медицинской микологии. – 2002. – Т.4, №4. – С. 3-4.

Поступила в редакцию журнала 09.10.2013

Рецензент: В.Г. Корнишева



КЛИНИКА И МИКРОБИОТА КИШЕЧНИКА У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ КРОНА

**¹Авалуева Е.Б. (профессор кафедры)*,
²Шевяков М.А. (профессор кафедры),
¹Ситкин С.И. (доцент кафедры),
¹Жигалова Т.Н. (доцент кафедры),
³Нилова Л.Ю. (с.н.с.), ¹Сказываева Е.В.
(доцент кафедры), ¹Иванов С.В.
(ассистент кафедры)**

Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова Минздрава:

¹кафедра пропедевтики внутренних болезней;
²кафедры клинической микологии, аллергологии и иммунологии, ³кафедра микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2013

Обследовали 60 пациентов (10 мужчин и 50 женщин) с болезнью Крона, средний возраст – 39,13±0,15 лет. Проанализировали клинические проявления заболевания, применяя стандартный опросник, рассчитывали индекс активности заболевания (индекс Беста), проводили микробиологический анализ кала на дисбиоз. Candida spp. идентифицировали с помощью хромогенных сред, изучали адгезивные свойства грибов с определением среднего индекса активности. У 24 пациентов с болезнью Крона выявили избыточный рост Candida spp. в кале, у всех больных форма существования дрожжевых микромицетов была определена как неинвазивный кандидоз кишечника. Наблюдали достоверно более частую встречаемость симптомов кишечной диспепсии и увеличение индекса Беста у пациентов с избыточным ростом грибов в кишечнике. Установлено, что у пациентов с болезнью Крона имеет место нарушение композиции фекальной биоты с угнетением облигатной микробиоты и ростом условно-патогенных микроорганизмов и их ассоциаций.

Ключевые слова: болезнь Крона, *Candida* spp., кишечная микробиота, неинвазивный кандидоз кишечника, условно-патогенные микроорганизмы

CLINIC AND MICROBIOTA OF INTESTINE IN PATIENTS WITH CROHN'S DISEASE

**¹Avaluyeva E.V. (professor of the chair),
²Shevyakov M.A. (professor of the chair),
¹Sitkin S.I. (associate professor of the chair),
¹Zhigalova T.N. (associate professor of
the chair), ³Nilova L.Yu. (senior scientific**

* Авалуева Елена Борисовна,
тел. (812)543-95-38

**collaborator), ¹ Skazyvayeva E.V. (associate
professor of the chair), ¹ Ivanov S.V.
(assistant of the chair)**

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov: ¹Chair of Propaedeutics of Internal Diseases; ²Chair of Clinical Mycology, Allergology and Immunology, ³Chair of Microbiology, St. Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2013

Examined 60 patients (10 men and 50 women) with Crohn's disease, with an average age 39,13±0,15 years. Analyzed the clinical manifestations of the disease using a standard questionnaire, calculated the index of disease activity index (Best), conducted microbiological fecal dysbiosis. Candida spp. identified using a chromogenic media, studied the adhesive properties of fungi with the definition of the index average activity. In 24 patients with Crohn's disease have revealed the overgrowth of Candida spp. in feces. In all patients form of existence of yeast micromycetes was defined as a non-invasive candidosis of intestine. Significantly more frequent occurrence of intestinal dyspepsia symptoms and the increase of the index Besta in patients with excessive growth of fungi in the intestine have been observed. It was found that at patients with Crohn's disease was a violation of the composition of the fecal biota with the oppression of obligate microbiota and rise of conditionally pathogenic microorganisms and their associations.

Key words: *Candida* spp., conditionally pathogenic microorganisms, Crohn's disease, intestinal microbiota, non-invasive candidosis of intestines

ВВЕДЕНИЕ

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) – язвенный колит (ЯК) и болезнь Крона (БК) протекают тяжело и характеризуются рецидивирующим течением.

В настоящее время полагают, что при ВЗК в патогенезе заболеваний имеют значение комплексные взаимоотношения между генетическими, микробными факторами, факторами окружающей среды, которые могут способствовать постоянной активации иммунной системы слизистых оболочек, при этом интестинальная микробиота является важным этиологическим звеном патогенеза при данных патологических состояниях [1]. Ныне концепцию о микробном факторе, как одном из факторов патогенеза ВЗК, поддерживают большинство исследователей [2-4]. Полагают, что изменения в микробиоте толстой кишки ухудшают течение основного заболевания, способствуют более частым рецидивам и развитию осложнений [5-7]. К сожалению, несмотря на все усилия, прилагаемые в этом направлении, и совершенствование методов идентификации микроорганизмов в последние годы, конкретный специфический агент или группа агентов, вызывающих заболевание, не идентифицированы.

В многочисленных экспериментальных работах на лабораторных животных ученые полностью поддерживают точку зрения о том, что при ВЗК имеет место генетически детерминированная нарушенная регуляция иммунного ответа слизистой оболочки кишечника на антигены нормальной микробиоты [2]. Доказано, что воспалительные изменения слизистой

оболочки при ВЗК у животных возникают только при наличии бактериобиоты в просвете кишки [8], а изъязвление слизистой оболочки невозможно в условиях стерильного пищеварительного тракта.

В ряде работ было установлено, что у больных с ВЗК уменьшается количество адгезированных представителей *Bifidobacterium* spp. в участках с измененной слизистой оболочкой [6, 9], а у пациентов с БК уменьшается и количество представителей *Lactobacillus* spp. как в измененных, так и в неизмененных участках, при этом количество адгезированных бактерий снижается при прогрессировании процесса [10]. Количество лактобацилл и бифидобактерий уменьшается при ВЗК и в составе «просветной» микробиоты. С. Neut и соавт. [11] при исследовании состава микробиоты толстой кишки у пациентов с БК выявили увеличенное количество агрессивных бактерий, таких как *Bacteroides* spp., *Escherichia coli*, с измененной ферментативной активностью, уменьшенное количество *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp. и возрастание представителей рода *Enterococcus* [6, 9].

Влияние усиленной пролиферации *Candida* spp. в кишечнике на течение ВЗК масштабно не изучали. Опубликованы работы как подтверждающие [7], так и опровергающие [12] факт более частого выявления этих грибов у больных с ВЗК, чем у пациентов группы контроля, и более частой колонизации *Candida* spp. слизистой оболочки кишечника в активной фазе болезни и при длительном течении заболевания. А. Kalkanci и соавт. [13] установили, что у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника, при исследовании ПЦР ДНК с праймерами PCon1, PCon2 и PspA2, в биоптатах кишечника чаще регистрировали данные гены (по сравнению с лицами в контрольной группе), но уровень специфических противокандидозных IgM и IgG антител в сыворотке крови в данных группах статистически значимо не различался. Другие авторы [14] выявили, что *Candida albicans* продуцирует маннозилтрансферазу – фермент, который катализирует реакцию синтеза олигоманнана у *Saccharomyces cerevisiae*, в зависимости от благоприятных условий роста колоний. Антитела к олигоманнозной последовательности α -1,3-маннана и терминальным дисахаридом в клетках *Saccharomyces cerevisiae* (ASCAs) являются маркером болезни Крона. Маннан *S. cerevisiae*, который экспрессирует эти гаптены, используется для определения ASCA, но точный иммуноген ASCA не известен. А. Standaert-Vitse и соавт. [15] обнаружили способность *C. albicans* экспрессировать ASCA эпитопы, подобные *S. cerevisiae*, на маннопротеинах. При улучшении условий для роста дрожжевых микроорганизмов, маннан *C. albicans* способен мимикрировать под маннан *S. cerevisiae*, который играет роль в патогенезе БК. Данным фактом подтверждена гипотеза, что *C. albicans* является одним из нескольких иммуногенов ASCA и, возможно, источником иммунного ответа при БК [14, 15]. В настоящее время авторы гипотез о развитии ВЗК не исключают, что данное за-

болевание является результатом дефектного иммунного ответа на микробиоту кишечника, в том числе – на персистирующие дрожжевые микроорганизмы.

С учетом вышеизложенного, мы изучали взаимосвязи клинических проявлений и микробиологических характеристик кишечной биоты при болезни Крона, оценили частоту выявления *Candida* spp. и их адгезивных свойств при данной патологии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Под наблюдением находились 60 пациентов с БК, средний возраст составил $39,13 \pm 0,15$ года, продолжительность болезни – $3,58 \pm 0,85$ года. Диагноз БК был подтвержден клиническими, инструментальными и гистологическими методами. У 14 (23,3%) пациентов процесс был локализован в тонкой кишке (терминальный илеит), у 45 (75%) – в тонкой и толстой кишках, у одного (1,7%) – только в толстой кишке. Внекишечные проявления БК отмечали у 24 (40%) больных. Наиболее часто имели место явления артрита – у 12 (20%) человек.

Были сформированы группы пациентов с БК Csp– и Csp+, в зависимости от уровня пролиферации *Candida* spp. в кишечнике, выявленных при бактериологическом исследовании фекалий. Группу Csp+ составили 24 больных (6 мужчин, 18 женщин), у которых пролиферация колоний *Candida* spp. в кале была более 3 –lg КОЕ/г фекалий. В группу Csp+ вошли 36 пациентов с БК (4 мужчины, 32 женщины), у которых при микробиологическом анализе кала *Candida* spp. не выявляли или они не превышали 3 –lg КОЕ/г фекалий.

Методы исследования пациентов: стандартный опрос, оценка индекса клинической активности болезни Крона (ИКАБК), клинический, биохимический и иммунологический анализы крови, анализы мочи и копрограммы, фиброколоноскопия, микробиологическое исследование кала на дисбиоз и выявление адгезивной способности *Candida* spp. к эпителию слизистой оболочки.

Материалом для исследования на дисбиоз и выделения *Candida* spp. были фекалии. Посевы на плотные среды проводили по методу Gold; на полужидкие среды однорядным титрационным методом [16]. Результаты оценивали в соответствии с нормативами отраслевого стандарта «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» [17]. *Candida* spp. до вида идентифицировали с помощью хромогенных сред HiCrome *Candida* Differential Agar Base, Modified M1456A производства «HiMedia» (Индия). Для определения адгезии *Candida* spp. к клеткам эпителия использовали методику А.Г. Бойцова [18]. Адгезию *Candida* spp. осуществляли на эпителиальные клетки больных, у которых и были выделены данные микроорганизмы. В каждом препарате анализировали не менее пяти эпителиальных клеток. Результат, называемый средним индексом адгезии

(СИА), выражали в виде среднеарифметического числа адгезированных микроорганизмов на одной эпителиальной клетке. Интенсивность адгезивной активности *Candida* spp. подразделяли на 3 степени. Низкой считали степень адгезии при прилипании 1-5 клеток гриба на одну эпителиальную клетку, СИА от 1 до 5 адгезированных клеток *Candida* (АКС); средней – при выявлении СИА от 5 до 10 АКС на одной эпителиальной клетке, высокой – при СИА > 10 АКС на одной эпителиальной клетке.

Для оценки клинических проявлений БК использовали ИАБК по Бесту (CDDAI) (1976) и производили по стандартной шкале с учетом таблиц идеального веса.

Все клинические и лабораторно-инструментальные показатели были адаптированы для математической обработки с применением методов статистического анализа. Использовали пакет прикладных программ StatSoft (версия Statistica 8.0) для Windows. Критический уровень значимости (p) нулевой статистической гипотезы принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

У пациентов группы Csp+ количество *Candida* spp. в посеве кала составило $5,83 \pm 0,67$ –lg КОЕ/г; преобладали *C. albicans* – у 14 (58,3%) из 24 человек, у 10 (41,2%) больных выявили не-*albicans* виды *Candida*. У пациентов с БК с избыточным ростом дрожжевых грибов в кишечнике наблюдали высокие уровни адгезии клеток грибов, выделенных из кала, к клеткам буккального эпителия и клеток грибов, выделенных из кала, к клеткам кишечного эпителия (табл. 1).

Таблица 1

Результаты микробиологического исследования фекалий на *Candida* spp. у пациентов группы Csp+

Показатель	Частота выявления, фекалии (n=60)	
Частота выявления <i>Candida</i> spp., абс. (%)	24 (40)	
Виды <i>Candida</i> spp., абс. (%)*	<i>C. albicans</i>	14 (58,3)
	<i>C. tropicalis</i>	6 (25)
	<i>C. glabrata</i>	4 (16,7)
	<i>C. krusei</i>	0
Выявление двух видов грибов	0	
Характеристика выявленных <i>Candida</i> spp. и их адгезии		
Количество <i>Candida</i> spp., –lg КОЕ/г, M±s	$5,83 \pm 0,67$	
СИА, буккальный эпителий, АКС	$12,28 \pm 0,17$	
СИА, кишечный эпителий, АКС	$13,25 \pm 0,17$	

Количество выявленных в кале *Candida* spp. в группе пациентов Csp– составило $1,76 \pm 0,59$ –lg КОЕ/г (различия между группами Csp+ и Csp– по количеству обнаруженных грибов статистически значимы, $p < 0,001$).

У пациентов группы Csp+ чаще, чем в группе Csp–, отмечали появление таких симптомов, как кожный зуд ($p < 0,01$), опрелости различной локализации (паховая зона, зона под грудными и молочными железами, зона анального сфинктера) ($p < 0,05$), ложные позывы на дефекацию ($p < 0,01$), патологические примеси в кале ($p < 0,05$), неполное опорожнение кишки ($p < 0,01$) (Рис. 1). В группе Csp+ больные отмечали более частый стул ($65,7 \pm 11,2$ раза в неделю), чем в

группе Csp– ($24,3 \pm 4,7$ раза в неделю, $p < 0,001$), и более частые эпизоды послаблений стула. Пациентов в группе Csp+ чаще беспокоили вздутие живота, урчание в животе, повышенное газообразование, чем в группе Csp–, но эти различия не были статистически значимы.



■ *Candida* ≤10³ КОЕ/г фекалий ■ *Candida* ≥10³ КОЕ/г фекалий

Рис. 1. Частота симптомов кишечной диспепсии у пациентов с болезнью Крона с низким и высоким уровнем *Candida* spp. в кале

У больных группы Csp+ ИАБК был статистически значимо выше, чем в группе Csp– ($297,2 \pm 30,6$ против $215,2 \pm 28,9$ балла соответственно, $p < 0,05$), при этом у лиц с БК выявили устойчивые и, в высшей степени, достоверные прямые корреляционные связи между величиной ИАБК и количеством *Candida* spp. в кишечнике ($r = 0,627$ $p = 0,004$), что представляло значимость клинических проявлений основного заболевания при диагностике кандидоза кишечника.

У всех пациентов с БК в микробиологическом анализе кала имели место признаки нарушений состава фекальной микробиоты, проявляющиеся глубоким угнетением представительства облигатной составляющей микробиоты и значительной пролиферации представителей-комменсалов. Изменения облигатной составляющей микробиоты характеризовались снижением количества бифидобактерий, лактобацилл, бактероидов, кишечной палочки с нормальной физиологической активностью. У пациентов с БК обнаружили признаки дисбаланса в составе *Escherichia coli*, увеличение представительства УПМ. У пациентов группы Csp+ чаще, чем в группе Csp–, отмечали снижение количества лактобацилл (у 54,7% человек в группе Csp+ и у 16,7% – в группе Csp–, $p < 0,01$) и энтерококков (у 33,3% – в группе Csp+ и у 11,1% – в группе Csp–, $p < 0,05$) (табл. 2). Были установлены обратные корреляции между степенью адгезии клеток грибов, выделенных из кала, к клеткам кишечного или буккального эпителия и количеством *Lactobacilli* ($r = -0,7458$, $p = 0,008$) и *Bifidobacteria* ($r = -0,9518$, $p = 0,001$).

Таблица 2

Частота нарушений микробиоты толстой кишки у пациентов с БК с разным уровнем пролиферации дрожжевых грибов

Показатель	Частота, абс. (%)		χ^2	p
	группа Csp- (n=36)	группа Csp+ (n=24)		
<i>Bifidobacterium</i> spp.	36 (100)	24 (100)	–	
<i>Lactobacterium</i> spp.	6 (16,7)	13 (54,7)	9,35	<0,01
<i>Bacteroides</i> spp.	36 (100)	24 (100)	–	
<i>E. coli</i> с норм. ФА	26 (72,2)	20 (83,3)	0,993	>0,05
<i>E. coli</i> со сниж. ФА	31 (86,1)	16 (66,7)	3,2	>0,05
<i>Enterococcus</i> spp.	4 (11,1)	8 (33,3)	4,44	<0,05
Гемолитические микроорганизмы	4 (11,1)	6 (25)	2	>0,05
<i>S. aureus</i>	4 (11,1)	3 (12,5)	0,027	>0,05
<i>Candida</i> spp.	0	24 (100)	–	–
<i>S. epiderm.</i> или <i>S. saproph.</i> C101	2 (5,56)	2 (8,33)	0,179	>0,05
УПМ (без дрожжевых грибов)	24 (66,7)	15 (62,5)	0,109	>0,05

По данным микробиологического исследования фекалий, у пациентов с БК более чем в 1/3 случаев наблюдали ассоциации представителей УПМ, в том числе устойчивые ассоциации *Enterobacter* spp. и *Candida* spp., *Staphylococcus* spp. и *Candida* spp.

Представители УПМ в кале и ассоциации различных представителей УПМ у пациентов с БК группы Csp+ обнаруживали статистически значимо чаще, чем у пациентов, у которых пролиферация дрожжевых грибов была низкой (p<0,01). Установлены прямые корреляции между количеством *Candida* spp. и количеством гемолитических микроорганизмов (r=0,9096, p<0,001), *Enterobacter agglomerans* (r=0,9099, p=0,02), *S. epidermalis* or *S. saprophytic C101* (r = 0,9980, p = 0,039). При этом величина адгезии *Candida* spp. зависела от наличия тех или иных патогенов в кишечнике – у пациентов с БК выявили прямую связь адгезивных свойств дрожжевых микромицетов с количеством *S. epidermalis* или *S. saprophytic C101* (r=0,9502, p=0,002), *S. aureus* (r=0,9952, p=0,009).

Обращало на себя внимание, то что адгезивные свойства не-*albicans* видов *Candida* не только были сходными с *C. albicans*, а возрастали в присутствии различных представителей УПМ, таких как *S. aureus*, *Enterobacter amnigenus*, *S. epidermalis* или *S. saprophytic C101* и др., а адгезия *C. glabrata* и *C. tropicalis* увеличивалась при наличии в составе *Corinebacter* spp.

Для наиболее полного объяснения статистического показателя дисперсии целевой переменной «содержание *Candida* spp. в кишечнике», по данным множественного регрессионного анализа, для БК на кафедре пропедевтики внутренних болезней СЗГМУ им. И.И. Мечникова была разработана следующая модель:

$$Y = -10,03 + 1,49X_1 + 0,06X_2 + 1,33X_3 - 1,43X_4 + 5,23X_5 - 0,53X_6 + 2,57X_7 + 1,32X_8 + 1,51X_9 + 0,77X_{10},$$

где: Y – содержание грибов рода *Candida* в кишечнике, –lg КОЕ/г;

X₁ – ложные позывы на дефекацию (0 – нет, 1 – есть);

X₂ – частота стула, количество раз в неделю;

X₃ – боли в животе (0 – нет, 1 – слабые, 2 – умеренные, 3 – сильные);

X₄ – количество эритроцитов в периферической крови, абс. (10¹²/л);

X₅ – количество моноцитов в периферической крови, абс. (10⁹/л);

X₆ – уровень α₂-глобулинов в периферической крови, г/л;

X₇ – уровень триглицеридов в периферической крови, ммоль/л;

X₈ – количество переваренных растительных волокон в кале (0 баллов, 1 балл, 2 балла, 3 балла);

X₉ – наличие лимфоидных фолликулов при гистологическом исследовании биоптатов (0 – нет, 1 – да), –lg КОЕ/г кала;

X₁₀ – содержание *Enterobacter agglomerans* в кале, –lg КОЕ/г.

Использование данной статистической модели необходимо для получения доказательства причинно-следственной связи между наличием микроорганизмов и клиническими признаками заболевания.

Согласно полученным данным, при возрастании частоты ложных позывов на дефекацию, повышении интенсивности болей в животе и частоты обнаружения лимфоидных фолликулов при гистологическом исследовании биоптатов из кишечника, увеличении частоты стула в неделю, количества моноцитов и триглицеридов в крови, переваренных волокон растительной клетчатки в кале и количества *Enterobacter agglomerans*, выявленных при микробиологическом исследовании кала, содержание *Candida* spp. в кишечнике у пациентов с БК возрастало, в то время как при повышении уровня эритроцитов и уровня α₂-глобулинов содержание дрожжевых микромицетов снижалось.

ОБСУЖДЕНИЕ

Кандидоз кишечника – поражение его слизистой оболочки *Candida* spp., протекающее чаще как неинвазивный дисбиотический процесс и реже – как инвазивное микотическое поражение. «Конфликт» между факторами патогенности гриба и факторами антифунгальной резистентности приводит к развитию той или иной формы кандидоза. По-видимому, развитию собственно патологического воздействия грибов предшествует колонизация слизистой оболочки. По результатам анализа кандидоза кишечника, проведенного у пациентов с БК, можно сделать заключение о неравнозначности вклада *Candida* spp. в развитие, течение и исход изучаемой патологии. Не вызывает сомнения, что сложные механизмы регуляции симбиоза прокариотических и эукариотических клеток оказывают существенное влияние на процессы размножения, существования и избыточного роста клеток-симбионтов. По данным, полученным в результате исследования спектра УПМ и их ассоциаций у пациентов с БК, установили, что роль коммуникаций микроорганизмов в кишечнике может быть более весомой и патогенетически

значимой, чем предполагают. При этом действие на эукариотические клетки оказывают не только живые активные клетки симбионтов. На процессы жизни могут влиять метаболиты микроорганизмов-симбионтов, в т.ч. *Candida* spp. Из этого следует, что микробиота хозяина и, прежде всего, микробиота пищеварительного тракта, может являться первичной мишенью воздействия физических, химических, биологических агентов, поэтому необходимо ее детальное изучение.

ВЫВОДЫ

1. Для пациентов с БК и нарушением состава микробиоты кишечника характерно увеличение пред-

ставительства условно-патогенных микроорганизмов и их консорциумов на фоне снижения облигатной составляющей микробиоты.

2. У пациентов с БК частота выявления избыточной пролиферации *Candida* spp. в кишечнике достигает 40%, при этом дрожжевые микромицеты обладают высокими агрессивными свойствами, и наиболее вероятной формой взаимодействия их с макроорганизмом является неинвазивный кандидоз кишечника.

3. При избыточной пролиферации *Candida* spp. в кишечнике у пациентов с БК имеет место усугубление клинической картины заболевания.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Endo K., Shiga H., Kinouchi Y., Shimosegawa T. Inflammatory bowel disease: IBD // Rinsho Byori. – 2009. – Vol. 57. – P. 527-532.
2. Farrell R.J. Microbial factors in inflammatory bowel disease // Gastroenterol. Clin. North. Am. – 2002. – Vol. 31, №1. – P. 41-62.
3. Perencevich M., Burakoff R. Use of antibiotics in the treatment of inflammatory bowel disease // Inflamm. Bowel Dis. – 2006. – Vol. 12, №7. – P. 651-64.
4. Tamboli C.P., Neut C., Desreumaux P., et al. Dysbiosis in inflammatory bowel disease // Gut. – 2004. – Vol. 53. – P. 1-4.
5. Sokol H., Seksik P., Rigottier-Gois L., et al. Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease // Inflamm. Bowel Dis. – 2006. – Vol. 12. – P. 106-111.
6. Seksik P., Sokol H., Lepage P., et al. Review article: the role of bacteria in onset and perpetuation of inflammatory bowel disease // Aliment. Pharmacol. Ther. – 2006. – Vol. 24, Suppl. 3. – P. 11-18.
7. Zwolinska-Wsilo M., Brozovski T., Budak A. Effect of *Candida* colonization on human ulcerative colitis and healing of inflammatory changes of the colon in experimental model of colitis ulcerosa // J. Physiol. and Pharmac. – 2009. – Vol. 60, №1. – P. 107-119.
8. Swidsinski A., Ladhoff A., Pernthaler A., et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease // Gastroenterology. – 2002. – Vol. 122. – P. 44-54.
9. Fyderek K., Strus M., Gosiewski T., et al. Mucosal bacterial microflora and mucus layer thickness in adolescents with inflammatory bowel disease // World J. Gastroenterol. – 2009. – Vol. 15, №42. – P. 5287-5294.
10. Guarner F., Casellas F., Borrueal N. Role of microecology in chronic inflammatory bowel diseases // Eur. J. Clin. Nutr. – 2002. – Vol. 56, Suppl 4. – S. 34-38.
11. Neut C., Bulois P., Desreumaux P., et al. Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease // Am. J. Gastroenterol. – 2002. – Vol. 97. – P. 939-946.
12. Ksiadzyna D., Semianow-Wejchert J., Nawrot U., et al. Serum concentration of interleukin 10, anti-mannan *Candida* antibodies and the fungal colonization of the gastrointestinal tract in patients with ulcerative colitis // Adv. Med. Sci. – 2009. – Vol. 54. – P. 170-176.
13. Kalkanci A., Tuncer C., Degertekin B. Detection of *Candida albicans* by culture, serology and PCR in clinical specimens from patients with ulcerative colitis: re-evaluation of an old hypothesis with a new perspective // Folia Microbiol (Praha). – 2005. – Vol. 50. – P. 263-267.
14. Sartor R.B. Microbial influences in inflammatory bowel diseases // Gastroenterology. – 2008. – Vol. 134, №2. – P. 577-594.
15. Standaert-Vitse A., Jouault T., Vandewalle P., et al. *Candida albicans* is an immunogen for anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibody markers of Crohn's disease // Gastroenterology. – 2006. – Vol. 130, №6. – P. 1764-1775.
16. Иванов В.П. Совершенствование методов диагностики дисбактериоза толстого кишечника: информационное письмо. – СПб., 2002. – 31 с.
17. ОСТ 91500. 11. 004-2003 (приложение). Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника. Утвержден приказом Минздрава РФ от 9 июня 2003. – № 231. – 82 с.
18. Бойцов А.Г., Рищук С.В., Ильясов Ю.Ю., Гречанинова Т.А. Адгезия лактобактерий к клеткам вагинального и буккального эпителия // Вестник СПбГМА им. И.И. Мечникова. – 2004. – №4(5). – С. 191-193.

Поступила в редакцию журнала 20.11.2013

Рецензент: В.Г. Радченко



ОСОБЕННОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГАЛАКТОМАННА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И БРОНХОАЛЬВЕОЛЯРНОМ ЛАВАЖЕ ОНКОГЕМАТО- ЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ С ИНВАЗИВНЫМ АСПЕРГИЛЛЕЗОМ. СОБСТВЕННЫЕ ДАННЫЕ И ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

¹ Игнатъева С.М. (в.н.с.)*, ¹ Спиридонова В.А. (н.с.), ¹ Богомолова Т.С. (зав. лаб.), ² Шадринова О.В. (аспирант), ¹ Десятник Е.А. (аспирант), ¹ Борзова Ю.В. (зав. микологической клиникой), ² Хостелиди С.Н. (ассистент кафедры), ³ Волкова А.Г. (пульмонолог), ³ Попова М.О. (врач-гематолог), ⁴ Зюзгин И.С. (зав. отд.), ⁵ Колбин А.С. (врач-гематолог), ⁴ Климович А.В. (зав. отд.), ³ Зубаровская Л.С. (зав. отд.), ³ Афанасьев Б.В. (директор), ¹ Васильева Н.В. (директор), ² Клишко Н.Н. (зав. кафедрой)

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова: ¹ НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина и ² Кафедра клинической микологии, аллергологии и иммунологии; ³ Институт детской гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова; ⁴ Ленинградская областная клиническая больница; ⁵ Детская городская больница №1, Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2013

Комплексное определение галактоманна (ГМ) в сыворотке крови и бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ-образцах) помогло увеличить чувствительность теста «Platelia Aspergillus EIA» с 65 до 89%. Положительные результаты данного теста коррелировали с позитивными результатами классических микологических исследований в 30% (культуральных) и в 60% (микроскопических) случаях. Показано, что чувствительность теста «Platelia Aspergillus EIA», определяющего галактоманн, зависит от типа биологического образца и варьирует у разных групп онкогематологических больных.

Ключевые слова: бронхоальвеолярный лаваж, галактоманн, инвазивный аспергиллез легких, онкогематологические заболевания

* Контактное лицо: Игнатъева Светлана Михайловна, тел.: (812) 303-51-44

PECULIARITIES OF GALACTOMANNAN DEFINITION IN BLOOD SERUM AND BRONCHO- ALVEOLAR LAVAGE AT ONCOHEMATOLOGICAL PATIENTS WITH INVASIVE ASPERGILLOSIS. OWN DATA AND REVIEW OF LITERATURE

¹ Ignatyeva S.M. (leading scientific collaborator), ¹ Spiridonova V.A. (scientific collaborator), ¹ Bogomolova T.S. (head of the laboratory), ² Shadrivova O.V. (postgraduate student), ¹ Desyatnik EA (postgraduate student), ¹ Borzova Ju.V. (head of the mycological clinic), ² Khostelidi S.N. (assistant of the chair), ³ Volkova, A.G. (pulmonologist), ³ Popov M.O. (hematologist), ⁴ Zjuzgin I.S. (head of the department), ⁵ Kolbin A.S. (hematologist), ⁴ Klimovich A.V. (head of the department), ³ Zubarovskaya P.S. (head of the department), ³ Afanasyev B.V. (director), ¹ Vasilieva N.V. (director), ² Klimko N.N. (head of the chair)

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov: ¹ Kashkin Research Institute of Medical Mycology and ² Chair of Clinical Mycology, Allergy and Immunology; ³ R.M. Gorbacheva Institute of Children's Hematology and Transplantation of I.P. Pavlov State Medical University; ⁴ Leningrad regional Clinical Hospital; ⁵ Children's City Hospital №1, St. Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2013

A comprehensive definition of galactomannan in the blood serum and samples of bronchoalveolar lavage allowed to increase the sensitivity of the test from 65 to 89%. Positive test results of «Platelia Aspergillus EIA» correlated with positive results of classical mycological researches in 30% (culturul) and 60 % of cases (microscopic). The sensitivity of «Platelia Aspergillus EIA» test, which determines the galactomannan, depends from the type of biological sample and varies at different groups of oncohematological patients.

Key words: bronchoalveolar lavage, galactomannan, invasive pulmonary aspergillosis, oncohematological diseases

ВВЕДЕНИЕ

Инвазивный аспергиллез (ИА) – одна из причин летальных исходов у иммунокомпрометированных больных. У онкогематологических пациентов в Санкт-Петербурге ИА составляет от 60 до 88% от всех инвазивных микозов [1, 2]. Прогноз заболевания зависит от ранней диагностики, а также своевременной и эффективной терапии. В настоящее время диагностика ИА основывается на оценке факторов риска и клинических признаков развития заболевания, а также результатов исследований: микологических (прямая микроскопия и посев биосубстратов больных на питательные среды), радиологических – в режиме высокого разрешения (компьютерная и магнитная резонансная томографии), цитологических и/или гистологических (биопсийного материала). Согласно рекомендациям EORTC/MSG 2008 [3] определение галактоманнового (ГМ) антигена *Aspergillus* spp. включено в состав микробиологических критериев диагностики ИА.

Цель данного исследования – оценить диагностическую значимость теста «Platelia-*Aspergillus* EIA» для определения галактоманна в биологическом материале у различных категорий онкогематологических больных в Санкт-Петербурге.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучали биологический материал, полученный в ходе первого в РФ крупного многоцентрового исследования пациентов из 19 многопрофильных стационаров Санкт-Петербурга (1998-2013 гг.). Для диагностики ИА использовали критерии EORTC/MSG 2008 [3]. Всем пациентам выполняли компьютерную томографию внутренних органов и магнитно-резонансную томографию головного мозга, а также фибробронхоскопию легких с взятием бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ). Осуществляли микроскопическое и культуральное исследования мокроты, БАЛ, спинномозговой жидкости (СМЖ), промывных вод придаточных пазух носа. Микроскопию образцов проводили в 10% КОН с глицерином с последующим окрашиванием флюоресцирующим реагентом – калькофлюором белым. Окрашенные препараты исследовали в люминесцентном микроскопе при увеличении $\times 400$ и $\times 200$ на наличие мицелия, ветвящегося под углом 45° . Для посева биологического материала применяли Сабуро агар с 2% глюкозы.

Определение ГМ в биологическом материале онкогематологических больных с ИА выполняли с помощью коммерческой иммуноферментной тест-системы «Platelia-*Aspergillus* EIA» («Bio-Rad Laboratories», США), основанной на «сэндвич»-варианте ИФА с использованием крысиных моноклональных антител ЕВА-2 к ГМ *Aspergillus* spp., сорбированных на микропланшете, а также меченных пероксидазой и входящих в состав конъюгата. Предобработку исследуемых образцов и постановку ИФА проводили согласно инструкции к набору. Учет результатов те-

ста осуществляли спектрофотометрически при длине волны 450 нм и 620/630 нм, подсчитывая индекс оптической плотности (ИОП) образцов по отношению к контрольному образцу cut-off, содержащему 1 нг/мл ГМ. Результаты теста считали положительными при ИОП $\geq 0,5$ для сыворотки крови и СМЖ, а также $\geq 1,0$ – для БАЛ-образцов.

Изучено 356 образцов – 177 сывороток крови, 164 образца БАЛ и 15 образцов СМЖ, взятых от 152 онкогематологических больных с «доказанным» и «вероятным» ИА, подтвержденным гистологическими или микологическими исследованиями. Из них 94% составляли взрослые пациенты (мужчины – 55% и женщины – 45%) в возрасте от 19 до 71 года (медиана – 46 лет) и 6% – дети (мальчики – 54% и девочки – 46%) в возрасте от 7 до 15 лет (медиана – 14,5 лет). Основными заболеваниями у гематологических пациентов с ИА были: острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) – 28%, неходжинская лимфома (НХЛ) – 19%, острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) – 18%, лимфома Ходжкина (ЛХ) – 8%, множественная миелома (ММ) – 7%, хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) – 6%, миелодиспластический синдром (МДС) – 6%, другие гемобластозы выявляли в 8% случаев.

В качестве контрольных использовали 200 образцов от онкогематологических пациентов без ИА. В контрольной группе больных гематологическими заболеваниями были: НХЛ – 37%, ОМЛ – 28%, ОЛЛ – 10%, ЛХ – 9%, МДС – 6%, ХЛЛ – 5% и ММ – 5%. Пациенты данной группы не отличались от больных с ИА по демографическим характеристикам.

Оценку чувствительности, специфичности, прогностических значений положительного и отрицательного результатов проводили по формулам:

$$\text{чувствительность (\%)} = \frac{\text{ИП} \times 100}{\text{ИП} + \text{ЛО}}$$

$$\text{специфичность (\%)} = \frac{\text{ИО} \times 100}{\text{ИО} + \text{ЛП}}$$

$$\text{прогностическая ценность положит. результата (\%)} = \frac{\text{ИП} \times 100}{\text{ИП} + \text{ЛП}}$$

$$\text{прогностическая ценность отрицат. результата (\%)} = \frac{\text{ИО} \times 100}{\text{ИО} + \text{ЛО}}$$

где ИП – количество положит. результатов у пациентов с ИА, подтвержденным гистологическими и/или микологическими исследованиями;

ИО – количество отриц. результатов у пациентов контрольных групп без ИА;

ЛП – количество ложноположительных результатов у пациентов контрольных групп больных без ИА;

ЛО – количество ложноотрицательных результатов у пациентов с подтвержденным ИА.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы STATISTICA 6,0; различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Среди пациентов с ИА 94% составляли больные с аспергиллезом легких, 7% – аспергиллезным синуситом, 6% – аспергиллезом ЦНС; поражение более 2 органов зарегистрировали у 12%.

При исследовании сыворотки крови онкогематологических пациентов с «доказанным» и «вероятным» ИА чувствительность теста «Platelia-Aspergillus EIA» составляла 65,0%, а специфичность – 79,0% (табл.1).

Таблица 1.

Характеристики теста «Platelia-Aspergillus EIA» при исследовании сыворотки крови онкогематологических больных ИА (95% ДИ)

Критерии ИА	Чувствительность	Специфичность	Прогностическое значение (+) результата	Прогностическое значение (-) результата
Доказанный ИА* (n=9)	0,51 (0,49-0,58)	0,81 (0,72-0,87)	0,67 (0,62-0,77)	0,91 (0,83-0,98)
Вероятный ИА** (n=143)	0,70 (0,59-0,77)	0,78 (0,69-0,84)	0,85 (0,78-0,97)	0,83 (0,78-0,91)
Доказанный и вероятный ИА (n=152)	0,65 (0,53-0,71)	0,79 (0,70-0,85)	0,75 (0,71-0,87)	0,86 (0,83-0,88)

Примечание: ДИ - доверительный интервал.

* - диагноз ИА подтвержден гистологическими исследованиями

** - диагноз ИА подтвержден классическими микологическими исследованиями.

Проведенными нами исследованиями показано, что чувствительность теста «Platelia Aspergillus EIA» в сыворотке крови онкогематологических больных зависела от клинических форм ИА, типа биологического материала, а также варьировала у групп пациентов с различными факторами риска развития ИА. При определении ГМ в сыворотке крови установили положительные результаты теста у 63% больных аспергиллезом легких, у 58% – аспергиллезным синуситом и у 73% – аспергиллезом ЦНС. Чувствительность ГМ-теста зависела от распространенности ИА, возрастая (p=0,032) при двух и более локализациях ИА до 83,3% (табл. 2).

Таблица 2

Влияние распространенности ИА на чувствительность ГМ-теста

Локализация ИА	Чувствительность теста, %
Легкие	62,8
ЦНС	73,0
Придаточные пазухи носа	57,7
Легкие + ЦНС	72,7
Легкие + Придаточные пазухи носа	70,0
> 2 органов	83,3

При сравнительном анализе определения ГМ в сыворотке крови детей и взрослых с ИА показано, что у детей с ИА легких ГМ выявляли достоверно чаще, чем у взрослых пациентов (78% vs. 67%) (p=0,024), в то время, как результаты теста при внелегочной локализации ИА (синусит, ЦНС) были сопоставимыми (Рис. 1).

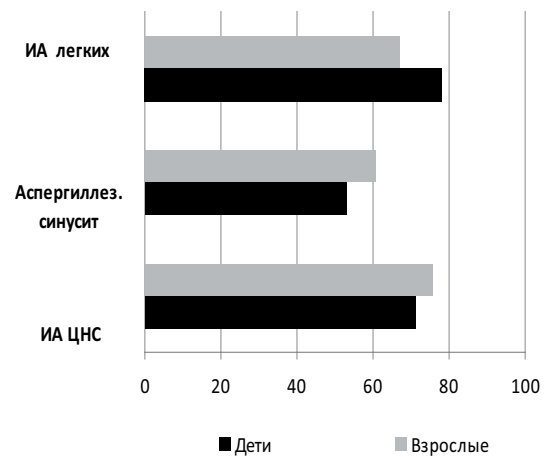


Рис.1. Определение галактоманна в сыворотке крови онкогематологических больных с различными локализациями ИА

При определении галактоманна в различных биосубстратах больных ИА тест имел различную чувствительностью в зависимости от типа образца. Величина ГМ-индекса составляла: для сыворотки крови – 0,5-2,7, СМЖ – 0,5-2,0 и БАЛ-образцов – 1,0-7,5. При сопоставлении положительных результатов теста в сыворотке крови и БАЛ выявили увеличение его чувствительности при исследовании БАЛ-образцов на 12,0% (табл. 3), а при комплексном определении ГМ в сыворотке крови и БАЛ-образцах чувствительность теста возросла до 89% (p=0,014).

Таблица 3.

Характеристики теста «Platelia-Aspergillus EIA» в различных биосубстратах от больных (95% ДИ)

Образцы	Чувствительность	Специфичность	Прогностическое значение (+) результата	Прогностическое значение (-) результата
Сыворотка крови (n=177)	0,65 (0,53-0,71)	0,79 (0,70-0,85)	0,77 (0,71-0,87)	0,86 (0,83-0,88)
БАЛ (n=164)	0,77 (0,69-0,89)	0,86 (0,74-0,88)	0,85 (0,79-0,94)	0,83 (0,79-0,96)
Сыворотка крови+БАЛ (n=341)	0,89 (0,82-0,93)	0,91 (0,88-0,95)	0,90 (0,86-0,96)	0,90 (0,87-0,94)

При микологическом исследовании биологического материала онкогематологических пациентов с ИА этиологическими агентами ИА у детей были: *A. fumigatus* – 55%, *A. niger* – 30%, *A. flavus* – 15% и *A. terreus* – 15%; у взрослых: *A. fumigatus* – 45%, *A. niger* – 35%, *A. flavus* – 17%, *A. ochraceus* – 2%, *A. versicolor* – 1%.

При сравнительном анализе результатов микологических методов диагностики ИА и ГМ теста была выявлена корреляция положительного результата микроскопической и культуральной диагностики БАЛ-образцов с положительным результатом ГМ-теста в БАЛ и сыворотке крови в 60% и 30%, соответственно. При этом у гематологических пациентов с ИА высокие значения ГМ-индекса (>2,0) обнаруживали в БАЛ-образцах с положительным результатом микроскопического исследования чаще, чем в

образцах с положительным высевом культуры гриба (Рис.2).

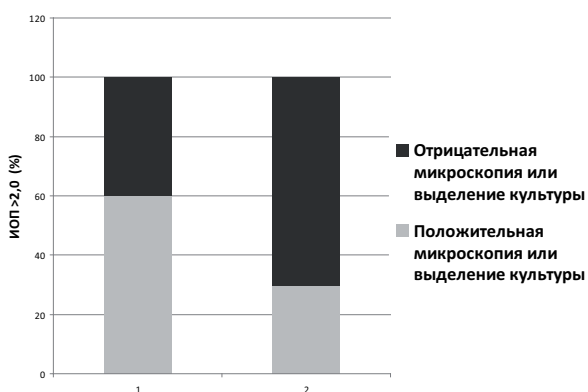


Рис. 2. Микологическое исследование ГМ-положительных БАЛ-образцов (n=164). 1 – результаты прямой микроскопии; 2 – результаты посева

При изучении чувствительности ГМ-теста у пациентов с ИА, получающих глюкокортикостероидную терапию (92,3% – взрослые и 7,7% – дети), обследовали 341 биосубстрат – 177 сывороток и 164 БАЛ-образца. В исследование были включены 175 образцов от больных ИА, получающих ГКС, и 166 образцов – от пациентов с ИА, не получающих гормоны. Установили, что галактоманнан в биосубстратах пациентов, получающих ГКС, регистрировали достоверно чаще, чем у лиц, не получающих гормоны (72% vs. 56%, $P=0,025$), особенно – у взрослых пациентов, по сравнению с детьми (82,4% vs. 64,2%, $P=0,005$). В то же время, высокие значения ГМ-индекса в БАЛ (>2,0) отмечали достоверно чаще у детей, чем у взрослых (55,3% vs. 24,6%, $P=0,001$). При микологическом исследовании мокроты или БАЛ-образцов пациентов с ИА, получающих и не получающих ГКС, количество положительных находок мицелия *Aspergillus* spp. при микроскопии не различалось, но, при этом, наблюдали достоверное возрастание числа положительных высевок грибов на питательных средах и у детей, и у взрослых (40,0% vs. 20,0% и 53,8% vs. 35,3%, соответственно). На фоне приема ГКС также значительно расширился спектр возбудителей инвазивного аспергиллеза (Рис. 3, 4).

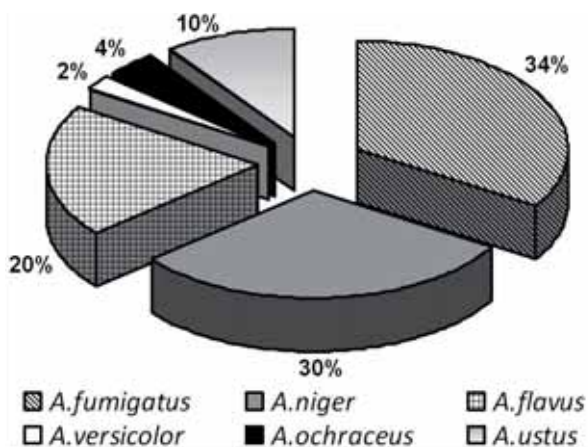


Рис. 3. Спектр возбудителей ИА у пациентов, получающих ГКС

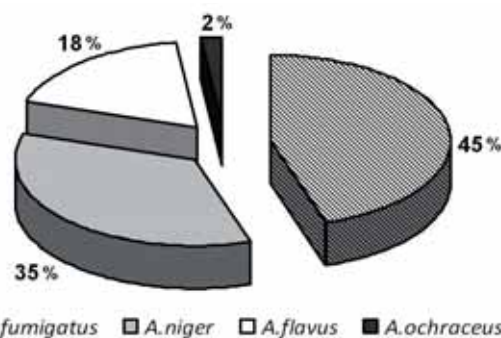


Рис. 4. Спектр возбудителей ИА у больных, не получающих ГКС

Среди включенных в исследование онкогематологических больных с ИА 58,7% составляли пациенты, получающие цитостатическую полихимиотерапию (ПХТ) и 42,3% – реципиенты ТГСК. Среди возбудителей ИА в группе пациентов с ПХТ были: *A. fumigatus* – 45%, *A. niger* – 45% и *A. flavus* – 10%, а у реципиентов ТГСК из биосубстратов выделяли культуры *A. fumigatus* – 45%, *A. flavus* – 45%, *A. niger* – 5% и *A. nidulans* – 5%. При определении галактоманна в 187 образцах больных ИА, получающих ПХТ, и 154 образцах больных ИА после ТГСК не выявили в сыворотке крови и БАЛ-образцах взрослого контингента пациентов статистически значимых различий (58% vs. 60% и 72% vs. 73%, соответственно) в чувствительности теста (Рис. 5, 6).

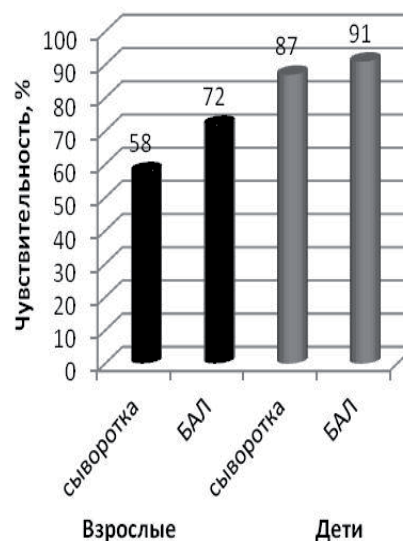


Рис.5. Определение галактоманна у онкогематологических больных ИА после ПХТ

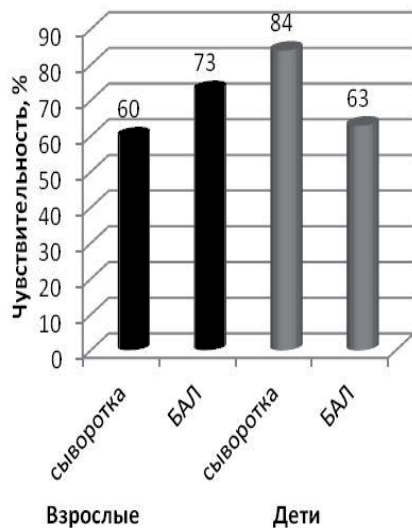


Рис.6. Определение галактоманна у онкогематологических больных после ТГСК

В то же время, позитивные результаты ГМ-теста в БАЛ-образцах детей с ИА после ПХТ обнаруживали чаще, чем в группе детей с ИА после ТГСК (91% vs. 63%, $P=0,002$). У больных с ПХТ высокий уровень ГМ индекса в БАЛ-образцах (2,0-7,5) регистрировали у детей достоверно чаще, чем у взрослых (60% vs. 23%, $P=0,012$), а у пациентов после ТГСК – с одинаковой частотой.

Специфичность теста составляла 81%. Прогностическое значение положительного и отрицательного результатов ГМ-теста у больных ИА после ПХТ и после ТГСК в сыворотке крови было 0,77 (95%ДИ 0,71-0,87) и 0,86 (95%ДИ 0,83-0,88), а для БАЛ-образцов – 0,85 (95%ДИ 0,79-0,94) и 0,84 (95%ДИ 0,78-0,96) соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

ИА наиболее часто выявляют у пациентов с нейтропенией или после приема иммунодепрессантов (трансплантация костного мозга), или кортикостероидов. Диагностика ИА, особенно на ранних стадиях заболевания, часто основана на неспецифических диагностических или рентгенологических признаках (клинические симптомы, данные КТ и МРТ и т.д.), посевы биоматериалов не всегда положительны, при этом тест на ГМ-антиген, представляющий собой иммунологический метод, может улучшить лабораторную диагностику ИА [4, 5]. В настоящее время определение ГМ *Aspergillus* spp. у онкогематологических больных включено в качестве микробиологического критерия в EORTC/MSG 2008 классификации ИА [3]. Совместно с другими диагностическими процедурами (компьютерная томография внутренних органов, классические микологические, цитологические и гистологические методы исследования биосубстратов и биоптатов больных), тест «*Platelia Aspergillus* EIA» широко используют в онкогематологических стационарах для диагностики ИА в сыворотке крови больных [4, 5].

Циркуляция ГМ в сыворотке крови является временной, поэтому тестирование образцов необходимо проводить не реже 2 раз в неделю для больных с высоким риском развития ИА. Индекс оптической плотности (ИОП) cut-off для положительных результатов в сыворотке крови составляет 0,5, и его измеряют в 2-х последовательных образцах [6]. При тестировании ГМ-антигена в сыворотке крови получили многообещающие результаты в нескольких клинических испытаниях [7, 8]. В них была получена 90-100% специфичность и 80-100% чувствительность теста у пациентов с гранулоцитопенией, при этом отрицательная прогностическая ценность теста для исключения ИА была очень высока (>90%). Анализ на наличие ГМ может быть полезен как при клиническом подозрении на грибковую инфекцию, так и для мониторинга терапевтического эффекта антимикотической терапии. Как было показано в ходе проспективных клинических испытаний [9, 10], рефрактерная антибактериальная лихорадка может быть признаком ИА, в этом случае регулярное назначение ГМ-теста в течение 3 дней, после 4 дней сохраняющейся лихорадки, вместе с клиническими и рентгенологическими обследованиями пациентов, признано эффективным [9, 11, 12].

ГМ *Aspergillus* spp. может быть обнаружен не только в сыворотке крови, но и в других биологических жидкостях, в том числе в БАЛ и в СМЖ, в которых определение антигена превосходит культуральную диагностику и некоторые ПЦР-тесты для выявления ИА [5]. В последние годы появились сообщения об эффективности выявления ГМ в бронхоальвеолярном лаваже у больных с трансплантацией костного мозга [13, 14]. Однако вопросы оценки результатов исследования БАЛ-образцов с помощью теста «*Platelia Aspergillus* EIA» широко обсуждают в научной литературе. Одни авторы считают, что при ИОП=0,5-1,0 тест имеет меньшую прогностическую ценность, чем при показателях, превышающих 1,0 [14, 15]. Другими исследователями в ходе мультицентрового исследования показано, что уровень cut-off $\geq 0,5$ для БАЛ является оптимальным у гематологических пациентов, при этом чувствительность и специфичность метода составляла 79,0 и 96%, соответственно [16]. Еще 2 мета-исследования [17, 18], включающих 13 и 30 клинических случаев, было проведено с целью оценки ГМ-теста для БАЛ-образцов в смешанной популяции пациентов (гематологические больные, пациенты с пересадкой органов, хронической обструктивной болезнью легких, опухолями солидных органов). В результате обоих исследований, ученые пришли к заключению о том, что определение ГМ в БАЛ имело большую чувствительность, чем в сыворотке крови, а с помощью бронхоскопии (полезной диагностической процедуры для оценки этиологии легочных инфильтратов) возможно тестирование ГМ в БАЛ у пациентов с высоким риском ИА. В 2013 г. была опубликована обзорная статья, посвященная мета-анализу 16 исследований, вклю-

чающих 783 взрослых пациентов только с гематологическими заболеваниями, для оценки точности ГМ-теста в БАЛ-образцах при диагностике ИА. Показано, что при ИОП >1,5 для доказанного и вероятного ИА тест имеет превосходную чувствительность (92%) и специфичность (98%) для того, чтобы при интерпретации результатов вместе с клиническими данными помочь в принятии решения в пользу подтверждения или исключения диагноза ИА. Авторы указывают также, что при комплексном использовании ГМ-теста в БАЛ и сыворотке крови или ПЦР в БАЛ можно дополнительно увеличить чувствительность метода, что согласуется с полученными нами данными [19]. В последнее время появилась перспектива использования новых технологий на основе иммунохроматографического метода – Aspergillus LFD kit (Olmmedical, Великобритания) – для определения антигена *Aspergillus* в биологических образцах от больных с подозрением на ИА. Данный тест относят к разряду тест-систем «у постели больного» и выполняют в течение 30 минут. В исследовании на 22 сыворотках крови больных показана более высокая специфичность теста по сравнению с тестом «Platelia *Aspergillus* EIA» [20]. В настоящее время тест проходит стадию мультицентрового испытания.

Учитывая разноречивость результатов клинических исследований и вариабельность оценки теста «Platelia *Aspergillus* EIA» в различных лабораториях мира, связанную с разнородностью анализируемых групп больных, различиями в методологиях исследований, а также отсутствием систематического анализа его точности, трудно оценить истинную клиническую полезность ГМ-теста в БАЛ-образцах в популяции гематологических пациентов. В связи с этим, мы предприняли попытку выявить особенности при определении галактоманна в разных биологических образцах различных групп гематологических

больных Санкт-Петербурга. В своем исследовании мы руководствовались рекомендациями рабочей группы 3rd European Conference on Infections in Leukemia (25-26 сентября 2009 г., Juan-les-Pins-France), в которых определены для сыворотки крови значения ИОП cut-off $\geq 0,5$ (в 2-х последовательных образцах) и ИОП cut-off $\geq 0,7$ (для единичных образцов), ИОП cut-off $\geq 0,5$ для СМЖ, а также cut-off $\geq 1,0$ для БАЛ-образцов. Полученными нами данными, которые согласуются с результатами других авторов [10, 11, 13, 19], показано, как в популяции онкогематологических больных выбор групп обследуемых пациентов и биологического материала влияет на характеристики ГМ-теста. Некоторые результаты выявлены нами впервые: установлены корреляционные зависимости чувствительности теста с микологическими методами диагностики ИА, а также с величиной ИОП галактоманна у различных категорий больных.

ВЫВОДЫ

1. Диагностические характеристики теста «Platelia *Aspergillus* EIA» (чувствительность, специфичность и прогностическое значение положительного результата) при исследовании БАЛ были выше, чем при исследовании сыворотки крови больных с ИА.

2. В период высокого риска развития ИА рекомендован мониторинг галактоманна в сыворотке крови больных, а для подтверждения диагноза – определение галактоманна в БАЛ.

3. Положительные результаты теста «Platelia *Aspergillus* EIA» коррелировали с положительными результатами классических микологических исследований в 30% (высев культуры) – 60% (прямая микроскопия) случаев. При положительном микроскопическом результате отмечали более высокие показатели ИОП в БАЛ и сывороточных образцах, чем при выделении культуры.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Попова М.О., Зубаровская Л.С., Климко Н.Н. и др. Инвазивные микозы при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток // Тер. архив. – 2012. – №7. – С. 50-57.
2. Васильева Н.В., Климко Н.Н., Цинзерлинг В.А. Диагностика и лечение инвазивных микозов: современные рекомендации // Вестник СПбМАПО. – 2010. – Т.2, №4. – С. 5-18.
3. 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 Groups and the National Institute of Allergy and Infection Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group // Clin. Infect. Dis. – 2008. – Vol. 46, №12. – P. 1813-21.
4. Erjavec Z. and Verweij P.E. Recent progress in the diagnosis of fungal infections in the immunocompromised host // Drug Resist. Updat. – 2002. – Vol. 5. – P. 3-10.
5. Yeo S.F. and Wong B. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections // Clin. Microbiol. Rev. – 2002. – Vol. 15. – P. 465-484.
6. Marr K.A., Balajee S.A., McLaughlin L., et al. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of Invasive aspergillosis: variables that affect performance // J. Infect. Dis. – 2004. – Vol. 190, №3. – P. 641-649.
7. Maertens J., Theunissen K., Verbeken E., et al. Prospective clinical evaluation of lower cut-offs for galactomannan detection in adult neutropenic cancer patients and hematological stem cell transplant recipients // Br. J. Haematol. – 2004. – Vol. 126, №6. – P. 852-860.
8. Mennink-Kersten M.A., Donnelly J.P., Verweij P.E. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis // Lancet. Infect. Dis. – 2004. – Vol. 4, №6. – P. 349-357.
9. Maertens J., Theunissen K., Verhoef G., et al. Galactomannan and computed tomography-based preemptive antifungal therapy in neutropenic patients at high risk for invasive fungal infection: a prospective feasibility study // Clin. Infect. Dis. – 2005. – Vol. 41, №9. – P. 1242-1250.
10. Maertens J., Buve K., Theunissen K., et al. Galactomannan serves as a surrogate endpoint for outcome of pulmonary invasive

- aspergillosis in neutropenic patients // *Cancer*. –2009. – Vol. 115, №2. – P. 355-362.
11. Pazos C., del PA. Early diagnosis of invasive aspergillosis in neutropenic patients with bi-weekly serial screening of circulating galactomannan by Platelia Aspergillus // *Rev. Iberoam. Micol.* – 2003. – Vol. 20, №3. – P. 99-102.
 12. Girmenia C., Micozzi A., Gentile G., et al. Clinically driven diagnostic antifungal approach in neutropenic patients: a prospective feasibility study // *J. Clin. Oncol.* – 2010. – Vol. 28, №4. – P. 667-674.
 13. Wheat L.J., Walsh T.J. Diagnosis of invasive aspergillosis by galactomannan antigenemia detection using an enzyme immunoassay // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 2008. – Vol. 27, №4. – P. 245-251.
 14. Hussain S., Paterson D.L., Studer S.M., et al. Aspergillus galactomannan antigen in the bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive aspergillosis in lung transplant recipients // *Transplantation*. – 2007. – Vol. 83, №10. – P. 1330-1336.
 15. Clancy C., Jaber R.A., Leater H.L., et al. Bronchoalveolar lavage galactomannan in diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis among solid-organ transplant recipients // *J. Clin. Microbiol.* – 2007. – Vol. 45, №6. – P. 1759-1765.
 16. Reinwald M., Spiess B., Heinz W.J., et al. Diagnosing pulmonary aspergillosis in patients with hematological malignancies: a multicenter prospective evaluation of an *Aspergillus* PCR assay and a galactomannan ELISA in bronchoalveolar lavage samples // *Eur. J. Haematol.* – 2012. – Vol. 89, №2. – P. 120-7.
 17. Guo Y.L., Chen Y.Q., Wang K., et al. Accuracy of BAL galactomannan in diagnosing invasive aspergillosis: a bivariate meta-analysis and systematic review // *Chest*. –2010. – Vol. 138. – P. 817-24.
 18. Zou M., Tang L., Zhao S., et al. Systematic review and metaanalysis of detecting galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing invasive aspergillosis // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7. – P. e43347.
 19. Siow Chin Heg, Orla Morrissey, Sharon C-A Chen, et al. Utility of bronchoalveolar lavage fluid galactomannan alone or in combination with PCR for the diagnosis of invasive aspergillosis in adult hematology patients: A systematic review and meta-analysis // *Crit. Rev. Microbiol.* – 2013. – Early Online:1-11.
 20. Persat F. New Aspergillus antigen detection LFD kit for the IPA diagnostic: What results with positive and negative galactomannan ELISA sera? // *Mycoses*. – 2013. – Vol. 56, Suppl. s4. – P. 85-86.

Поступила в редакцию журнала 18.12.2013

Рецензент: В.С. Митрофанов



МОЛЕКУЛЯРНОЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАТОГЕННЫХ МИКРОМИЦЕТОВ В МОКРОТЕ, БРОНХОАЛЬВЕОЛЯРНОМ ЛАВАЖЕ И АУТОПСИЙНОМ МАТЕРИАЛЕ

¹Михайлова Ю.В. (н.с.), ¹Белоцерковская Е.В. (н.с.), ¹Богомолова Т.С. (зав. лаб.), ¹Борзова Ю.В. (зав. клиникой), ²Волкова А.Г. (врач-эндоскопист), ^{3,4}Михайлов В.И. (врач-патологоанатом), ¹Полищук А.Г. (зав. лаб.)*

¹ НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина СЗГМУ им. И.И. Мечникова; ² Институт детской гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой СПб ГМУ им. И.П. Павлова; ³ Александровская больница; ⁴ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2013

Успех лечения больных микозами лёгких во многом зависит от ранней этиологической диагностики, которая часто проблематична при использовании традиционных методов анализа. Цель работы заключалась в разработке/модификации и апробации молекулярно-генетических методов для выявления и идентификации *Aspergillus* spp. и *Zygomycetes* у пациентов с микотической инфекцией лёгких. В работе представлена новая мультиплексная ПЦР в режиме реального времени (РВ) с анализом кривых плавления ПЦР продуктов высокого разрешения (HRM) для выявления и идентификации аспергиллов и зигомикетов. Представлены результаты применения молекулярных (два типа ПЦР-РВ, включая указанный выше, и ДНК-сиквенирование, в том числе – на прямую из клинического материала), микробиологических (микроскопия и посев) и серологического методов для анализа клинических образцов. Из результатов работы следует, что молекулярно-генетический анализ может предоставить важную информацию о видовой принадлежности возбудителя микотической инфекции лёгких.

Ключевые слова: аспергиллы, зигомикеты, идентификация, микоз лёгких, молекулярное выявление, HRM

MOLECULAR AND MICROBIOLOGICAL DETECTION AND IDENTIFICATION OF PATHOGENIC MICROMYCETES IN SPUTUM, BRONCHOALVEOLAR LAVAGE AND AUTOPSY MATERIAL

¹ Mikhaylova Y.V. (scientific collaborator), ¹ Belotcerkovskaya E.V. (scientific collaborator), ¹ Bogomolova T.S. (head of the laboratory), ¹ Borzova Y.V. (head of the clinic), ² Volkova A.G. (physician-endoscopist), ^{3,4} Mikhaylov V.I. (physician-pathologist), ¹ Polischouk A.G. (head of the laboratory)

¹ Kashkin Research Institute of Medical Mycology of North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov; ² R.M. Gorbacheva Institute of Children's Hematology and Transplantology of St. Petersburg State Medical University named after I.P. Pavlov; ³ Alexandrov's Hospital; ⁴ St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2013

The success of treatment of fungal infection of the lungs depends to a large extent on early etiological diagnostics, which is often problematic when conventional methods of analysis are used. The aim of the study was to establish/modify and test the molecular genetic methods for detection and identification of *Zygomycetes* and *Aspergillus* spp. In this paper we present a new multiplex PCR with High Resolution Melt (HRM) analysis for the detection and identification of *Zygomycetes* and *Aspergillus* spp. and the results of the analysis of clinical samples obtained from patients with mycotic infection of the lungs. Samples from the patients were analyzed using molecular (two kinds of real-time PCR, including one indicated above and DNA sequencing), microbiological (microscopy and culture), and serological methods. The results of the work indicate that the molecular genetic analysis can provide important information about species affiliation of the etiologic agent of mycotic infection of the lungs.

Key words: *Aspergillus* spp., HRM, identification, molecular detection, mycosis of lungs, *Zygomycetes*

ВВЕДЕНИЕ

Микозы лёгких (МЛ) – тяжелые заболевания, развивающиеся преимущественно у иммунокомпрометированных больных [1]. Основными этиологическими агентами МЛ являются грибы рода *Aspergillus* и порядка *Mucorales* (*Rhizopus*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Lichtheimia*, *Cunninghamella*), значительно реже – из родов *Fusarium*, *Scedosporium*, *Cryptococcus* и др. Известны также легочные формы эндемичных микро-

* Контактное лицо: Полищук Анна Генриховна, Тел.: (812) 303-51-40

зов, вызванных *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum* и *Coccidioides* spp. [2]. В последние 20 лет возросла частота заболеваемости мукозом (зигмикозом) среди онкологических больных и пациентов, перенесших трансплантацию органов. В 65% случаев мукоз вызывают *Rhizopus* spp. и *Mucor* spp. [3].

Успех лечения больных МЛ во многом зависит от ранней этиологической диагностики, для чего в настоящее время используют комплекс радиологических, микологических и серологических исследований [1]. Основным методом радиологической диагностики МЛ является компьютерная томография (КТ) в режиме высокого разрешения.

Традиционные микологические исследования состоят из микроскопии клинического материала и выделения культур при посеве на питательные среды. С помощью прямой микроскопии образцов можно быстро, в течение нескольких минут, выявить наличие возбудителей и дифференцировать их на основании морфологических признаков (септированный или несептированный мицелий, ветвление под прямым или острым углом, наличие псевдомицелия, дрожжевых клеток, цист). Наибольшей чувствительностью обладает люминесцентная микроскопия с применением флуоресцентных маркеров (калькофлюор белый). В случае диагностики аспергиллеза, при однократном исследовании, чувствительность микроскопии и посева составляет 30-80%, в зависимости от вида исследуемого образца – мокрота, промывные воды бронхов, биоптат (*Brakhage A.A., et al. – Basel: Karger. – 1999*).

Серологические тесты разработаны для диагностики аспергиллеза и эндемичных микозов, но отсутствуют для мукоза, фузариоза и сцедоспориоза [2, 4]. Аспергиллез диагностируют по наличию галактоманна (компонента полисахаридной клеточной стенки *Aspergillus* spp.) в сыворотке крови и промывных водах бронхов. Европейской организацией по изучению и лечению рака для постановки диагноза инвазивного аспергиллеза у иммунокомпрометированных больных рекомендован тест «Platelia *Aspergillus*» (BioRad, США), клиническая чувствительность которого составляет 71%, а специфичность – 89% [5, 6].

В последнее десятилетие происходит прогрессивное развитие новых технологий в области молекулярной диагностики микозов. За рубежом активно применяют ПЦР (полимеразная цепная реакция) и разрабатывают системы для обнаружения и идентификации возбудителей инвазивных микозов. Существенными преимуществами ПЦР, особенно ее варианта – ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ, англ. Real-time PCR, qPCR), являются: возможность напрямую, минуя этап культивирования, исследовать клинические образцы, высокая специфичность и скорость видовой идентификации возбудителей инфекции (5-12 часов с момента получения клинического образца).

Предложены научно-исследовательские тесты для ПЦР-РВ диагностики инвазивного аспергиллеза [ссылки в 7], мукоза [8, 9], сцедоспориоза [10] и др. Клиническая чувствительность созданных в отдельных научно-исследовательских лабораториях ПЦР тест-систем колеблется от 70 до 100%, а специфичность – от 90 до 100% [7]. Однако выбрать наиболее эффективную систему бывает проблематично из-за разнообразия применяемых видов ПЦР, оборудования и методов выделения грибной ДНК [11].

Цель данной работы – разработка мультиплексного ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) для обнаружения и идентификации аспергиллов и зигмицетов в клиническом материале и оценка возможностей данной ПЦР-РВ и других молекулярных методов для выявления и идентификации грибов у больных микозом лёгких.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали культуры грибов из Российской коллекции патогенных грибов, образцы мокроты, промывных вод бронхов и аутопсийный материал от пациентов с подозрением на микотическое поражение легких.

Выделение ДНК из культур микромицетов осуществляли согласно ранее описанному протоколу [12].

Выделение тотальной ДНК из промывной жидкости бронхов и аутопсийного материала. Аутопсийный материал промывали водой дважды. Промывную жидкость бронхов центрифугировали 15 минут при 6 000 g, надосадочную жидкость удаляли.

Очищенный материал (осадок из промывной жидкости, ткань) помещали в 500 мкл экстракционного буфера (Abbott, США) и измельчали в гомогенизаторе PreCellys (Bertin technologies, Франция) при 6200 обр/мин в течение 90 сек, 3 раза. Затем добавляли протеиназу К (конечная концентрация – 0,02 мг/мл) (Fermentas, Литва) и инкубировали на шейкере (BioSan, Латвия) при 400 об/мин 12 часов при +55 °С. Дальнейшие процедуры проводили по протоколу хлороформ-изоамиловой экстракции (*Doyle J.J., Doyle J.L. Phytochem. Bull. – 1987. – Vol. 19*). Количество ДНК определяли с помощью флуориметра Qubit (Invitrogen, США).

ПЦР-РВ.

«Taq-Asp»-ПЦР основана на технологии TaqMan. В работе использовали протокол ПЦР для обнаружения аспергиллов, рекомендованный EAPCRI (European *Aspergillus* PCR Initiative) [13] и модифицированный нами. В реакции, помимо аспергилл-специфичных праймеров ASF1 (5'-GCACGTGAAATTGTTGAAAGG-3') и ADR1 (5'-CAGGCTGGCCGCATTTG – 3'), применяли гибридационный зонд ASP28P (FAM-5'-CATTCGTGCCGGTGTACTTCCCCG-3' -BHQ1). Амплификацию выполняли в объеме 25 мкл с помощью набора реагентов для проведения ПЦР-РВ

(«Синтол», Россия). ПЦР-смесь содержала компоненты набора (250 мкМ нуклеотидов; ПЦР-буфер; 2,5 мМ MgCl₂; 0,9 ед. Таq-ДНК-полимеразы), 10 пмоль каждого праймера, 5 пмоль гибридизационной пробы и ДНК. Амплификацию осуществляли при следующем режиме: начальная денатурация – 95 °С, 5 мин; 40 двухстадийных циклов, включающих денатурацию, – 95 °С, 15 сек; отжиг и элонгацию – 60 °С, 40 сек. В качестве отрицательного контроля использовали реакцию смеси без добавления матрицы.

«HRM-Zygo-Asp»-ПЦР была разработана в НИЛ молекулярно-генетической микробиологии НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина. Это ПЦР-РВ с анализом кривых плавления ПЦР продуктов *высокого разрешения* (HRM от англ. high-resolution melting). С помощью этого метода можно детектировать зигомицеты и/или аспергиллы в образце, а также идентифицировать зигомицеты до рода или вида.

Амплификацию фрагментов ДНК осуществляли на приборе Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Life Science, Австралия).

Сиквенирование ДНК. Молекулярную идентификацию с использованием сиквенирования ДНК проводили согласно ранее описанному протоколу [12]. Для сиквенирования ДНК микромицетов, выделенных из клинических образцов, применяли праймеры ITS1F и ITS4 – к региону ITS1-5.8S рПНК-ITS2 или ZM1 и ZM2 – к фрагменту гена 18S рПНК, а микромицетов, выделенных из культур, праймеры ITS5 и ITS4 – к региону ITS1-5.8S рПНК -ITS2 (*Gardes M., Bruns T.D. // Molecular ecology. – 1993. – Vol. 2, №2; White T.J., et al. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. – 1990; [14]*).

Микроскопия клинического материала. Из мокроты, осадка промывных вод бронхов, измельченной ткани органов, взятых при аутопсии, готовили препараты, используя в качестве просветляющей жидкости 10% раствор КОН в 10%-ном водном растворе глицерина, и добавляли каплю раствора флуоресцирующего красителя – калькофлюора белого. Препараты просматривали в белом свете и ультрафиолетовых лучах при увеличениях микроскопа x100, x200, x400.

Культуральное исследование. Исследуемые образцы засеивали в чашки Петри с агаризованной средой Сабуро с добавлением левомицитина и инкубировали при 35 °С и 28 °С в течение 14 суток. Выделенные культуры грибов идентифицировали по морфологическим и физиологическим признакам согласно определителю [15].

Галактоманновый антиген аспергиллов выявляли с помощью коммерческой иммуноферментной тест-системы «Platelia-Aspergillus EIA» (Bio-Rad, США) в соответствии с инструкцией производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ПЦР-РВ для выявления и идентификации аспергиллов и зигомицетов. Тестирование на культурах грибов.

В работе были использованы две ПЦР-РВ-системы. Одна из них – «Таq-Asp» предназначена для обнаружения аспергиллов. Для модификации применяли ранее предложенный протокол [13]. Вторая – мультиплексная «HRM-Zygo-Asp» предназначена для обнаружения и идентификации аспергиллов и зигомицетов (одновременно) и представляет собой вариант ПЦР в режиме реального времени с анализом кривых плавления ПЦР продуктов *высокого разрешения*. Она разработана нами с использованием праймеров, нуклеотидные последовательности которых были опубликованы ранее [14, 16]. «HRM-Zygo-Asp» ПЦР-РВ идентифицирует до рода представителей *Aspergillus* и *Absidia* (без *Lichtheimia corymbifera*, ранее называвшейся *Absidia corymbifera*), до вида – микромицеты *Rhizomucor pusillus*, *Rhizopus microsporus*, *Mucor circinelloides*, *Cunninghamella echinulata*, *Syncephalastrum racemosum*, *Lichtheimia corymbifera*, до пары видов – *Rhizopus arrhizus*/*Rhizopus stolonifer* и *Mucor racemosus*/*Mucor plumbeus* (таблица).

«HRM-Zygo-Asp» ПЦР-РВ была протестирована на 64 культурах клинически значимых патогенных микромицетов. При разработке «HRM-Zygo-Asp» ПЦР-РВ использовали культуры 22 штаммов зигомицетов и 22 штаммов аспергиллов. Для проверки специфичности ПЦР-система была протестирована на 20 штаммах других микромицетов (табл. 1).

Таблица 1.

Культуры микромицетов, использованные для разработки / тестирования ПЦР-РВ

Микромицет	Код штамма в РКПГ*	Результат HRM-Zygo-Asp / TaqMan
Зигомицеты		
<i>Absidia coerulea</i>	РКПГФ60/4011, 63, 61/4009	Положительные на <i>Absidia</i> spp. / отрицательный
<i>Absidia cylindrospora</i>	РКПГФ 62/4000	Положительный на <i>Absidia</i> spp. / отрицательный
<i>Rhizomucor pusillus</i>	РКПГФ 30, 1341	Положительные на <i>R. pusillus</i> / отрицательный
<i>Rhizopus arrhizus</i>	РКПГФ 1048/ iNEM1164, 1379	Положительный на <i>R. arrhizus</i> и <i>R. stolonifer</i> / отрицательный
<i>Rhizopus stolonifer</i>	РКПГФ 845, 154	Положительные на <i>R. arrhizus</i> и <i>R. stolonifer</i> / отрицательный
<i>Rhizopus microsporus</i>	РКПГФ 158/3848, 1497	Положительные на <i>R. microsporus</i> / отрицательный
<i>Mucor racemosus</i> <i>M. racemosus f. chibinensis</i> <i>M. plumbeus</i>	РКПГФ 29 РКПГФ 31 РКПГФ 72	Положительные на <i>M. racemosus</i> и <i>M. plumbeus</i> / отрицательный
<i>Mucor circinelloides</i>	РКПГФ 35/283	Положительный на <i>M. circinelloides</i> / отрицательный
<i>Cunninghamella echinulata</i>	РКПГФ 178/4103	Положительный на <i>C. echinulata</i> / отрицательный
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	РКПГФ 37	Положительный на <i>S. racemosum</i> / отрицательный
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	РКПГФ 1456, 1493, 1507, Клинический изолят А-2013	Положительные на <i>L. corymbifera</i> / отрицательный
Аспергиллы*		
<i>Aspergillus fumigatus</i>	РКПГФ 1327, 1377, 1384	Положительные на аспергиллы
<i>Aspergillus flavus</i>	РКПГФ 1247/1094, 1375, 1388	Положительные на аспергиллы
<i>Aspergillus niger</i>	РКПГФ 1249/800, 1329, 1345	Положительные на аспергиллы
<i>Aspergillus tubingensis</i>	РКПГФ 1337, 1376	Положительные на аспергиллы
<i>Aspergillus terreus</i>	РКПГФ 111/67, 109/65, 850	Положительные на аспергиллы

<i>Aspergillus sydowii</i>	РКПГФ 1115, 1287/50, 1241	Положительные на аспергиллы
<i>Aspergillus repens</i>	РКПГФ 2	Положительный на аспергиллы
<i>Aspergillus calidoustus</i>	РКПГФ 11	Положительный на аспергиллы
<i>Aspergillus amstelodami</i>	РКПГФ 1250	Положительный на аспергиллы
<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	РКПГФ 1062	Положительный на аспергиллы
<i>Aspergillus ochraceus</i>	РКПГФ 10	Положительный на аспергиллы
Другие филаментирующие грибы*		
<i>Fusarium proliferatum</i>	РКПГФ 1083	Отрицательный
<i>Fusarium oxysporum</i>	РКПГФ 1391/566	Отрицательный
<i>Trichophyton tonsurans</i>	РКПГФ 212/122	Отрицательный
<i>Trichophyton interdigitale</i>	РКПГФ 1229	Отрицательный
<i>Trichophyton rubrum</i>	РКПГФ 974	Отрицательный
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	РКПГФ 1207	Отрицательный
<i>Pseudallescheria boydii</i>	Изолят Sc-65 (2012)	Отрицательный
Дрожжеподобные грибы*		
<i>Candida albicans</i>	РКПГФ 1353/1277	Отрицательный
<i>Candida guilliermondii</i>	РКПГФ 593/871	Отрицательный
<i>Candida krusei</i>	РКПГФ 1258/170	Отрицательный
<i>Candida dubliniensis</i>	РКПГФ 1207	Отрицательный
<i>Candida parapsilosis</i>	РКПГФ 1206	Отрицательный
<i>Candida utilis</i>	РКПГФ 1371	Отрицательный
<i>Candida tropicalis</i>	РКПГФ 1351/17	Отрицательный
<i>Trichosporon asachii</i>	РКПГФ 1367/52	Отрицательный
<i>Trichosporon mucoides</i>	РКПГФ 1364	Отрицательный
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Изолят 53 (2012)	Отрицательный
<i>Exophiala dermatitis</i>	Изолят Ex-66 (2012)	Отрицательный
<i>Malassezia</i> sp.	Изолят 124-11	Отрицательный
<i>Debaryomyces</i> sp.	РКПГФ 1374/5	Отрицательный

РКПГ – Российская Коллекция Патогенных грибов; * - одинаковые результаты для тест-систем «HRM-Zygo-Asp» и «Taq-Asp»

Как видно из таблицы, «HRM-Zygo-Asp» ПЦР-РВ специфична для аспергиллов и зигомикетов, поскольку кросс-реактивность с другими филаментирующими и дрожжевыми грибами отсутствует. Специфичность «Taq-Asp» ПЦР-РВ для выявления грибов рода *Aspergillus* также была подтверждена с использованием коллекционных культур грибов.

Анализ клинических образцов.

Пациент 1 (75 лет)

Больной находился на стационарном лечении с 02.10.12 г. с диагнозом «острый гнойный медиастенит с поражением всех отделов средостения». 10.10.12 г. на контрольной рентгенографии отмечали появление полости распада в левом лёгком и инфильтрации – в нижней доли правого лёгкого. При микроскопии мокроты от 16.10.12 г. обнаружили нить (единичную) широкого несептированного мицелия, ветвящуюся под прямым углом, морфологически сходную с мицелием муконовых грибов (Рис. 1А). Роста грибов при посеве не наблюдали.

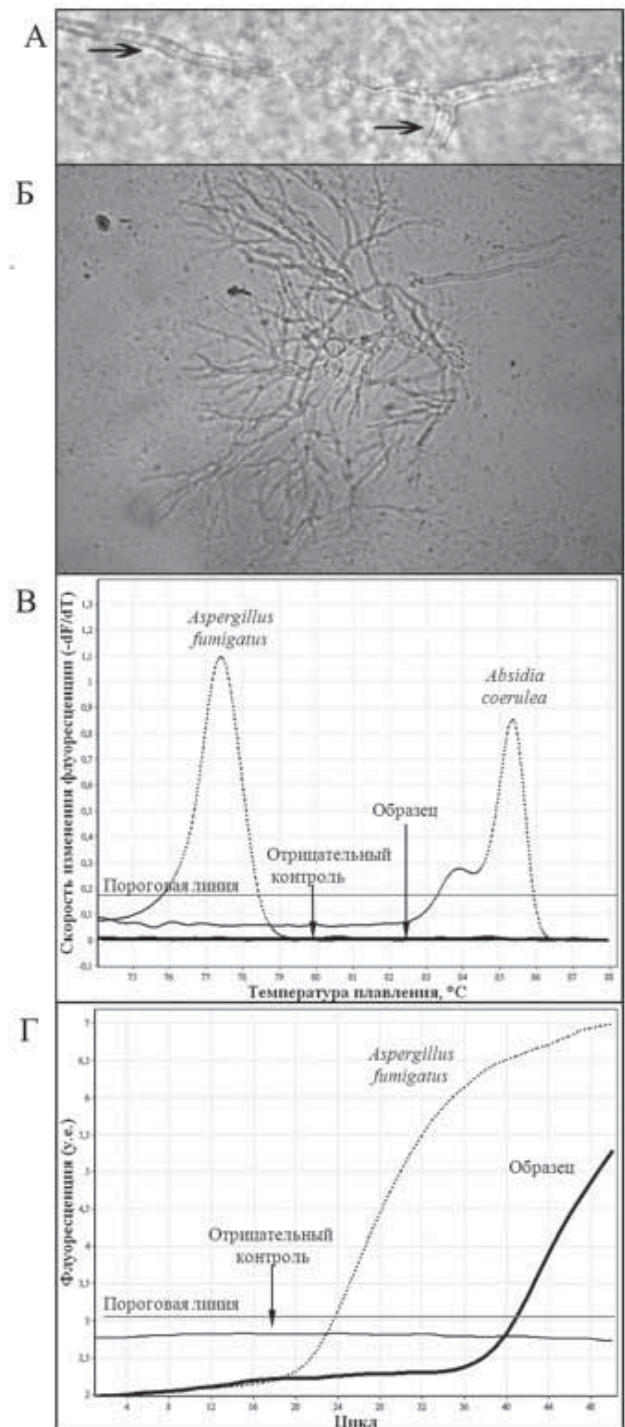


Рис. 1. Исследование клинического материала пациента 1. Световая микроскопия, х400. **А)** Нить несептированного мицелия в мокроте. Стрелками указаны нить и точка ветвления. **Б)** Септированный мицелий в промывных водах бронхов. **В)** ПЦР-РВ «HRM-Zygo-Asp» ДНК из промывных вод бронхов. Видны пики плавления ПЦР-продуктов положительных контролей. Кривая плавления образца совпадает с линией отрицательного контроля, что свидетельствует об отсутствии ДНК аспергиллов и зигомикетов. **Г)** ПЦР-РВ «Taq-Asp» ДНК из ткани легкого. Рост флуоресценции свидетельствует о наличии в ткани ДНК аспергилла. Пунктирные линии – положительные контроли

В образцах промывных вод бронхов от 19.10.12 г. отмечали несептированный мицелий (единичные нити в одном поле зрения) и септированный мицелий (единичные нити в нескольких полях зрения).

При посеве промывных вод бронхов роста грибов не было.

Результаты ПЦР-РВ «HRM-Zygo-Asp» промывных вод бронхов от 19.10.12 г. были отрицательными при всех использованных концентрациях ДНК (Рис. 1В). Возможным объяснением отрицательного результата посева и ПЦР-РВ является недостаточное количество мицелия (отдельные нити) в образце. Случаи отрицательного результата посева при положительной микроскопии, в том числе – для аспергиллов и зигомикетов, неоднократно описаны в научной литературе [9, 17, 18].

Аутопсийный материал. При микроскопии образца ткани правого легкого грибы не выявили. Методами ПЦР-РВ «Taq-Asp» и посева обнаружили аспергилл (Рис. 1Г). «HRM-Zygo-Asp» ПЦР не проводили.

Таким образом, в данном случае методом «Taq-Asp» ПЦР подтвержден результат посева, что может служить дополнительной информацией при постановке посмертного диагноза.

Пациент 2 (65 лет)

Больная находилась в стационаре с 12.10.12 г. с диагнозом «острый миелобластный лейкоз, М1 вариант». На рентгенограмме органов грудной клетки от 14.11.12 г. наблюдали инфильтрацию ткани лёгких и округлое образование диаметром 0,25 см.

В промывных водах бронхов от 14.11.12 г. при микроскопии обнаружили септированный мицелий, дихотомически ветвящийся под острым углом, морфологически сходный с мицелием грибов рода *Aspergillus* (рис. 2А). В посеве был получен рост трех видов *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*. В материале также выявили галактоманнан. ПЦР анализ пробы не проводили.

Аутопсийный материал. При микроскопическом исследовании ткани левого легкого отмечали обилие нитей септированного мицелия, дихотомически ветвящихся под острым углом (рис. 2Б и В), что доказывало наличие грибов рода *Aspergillus*. При посеве ткани легкого был выделен *A. flavus*. При сиквенировании ДНК из полученной культуры подтвержден вид аспергилла. Методами ПЦР-РВ – «HRM-Zygo-Asp» и «Taq-Asp» установили наличие ДНК аспергилла в ткани легкого (Рис. 2 Г и Д).

Таким образом, результаты, полученные всеми методами, согласовывались и дополняли друг друга.

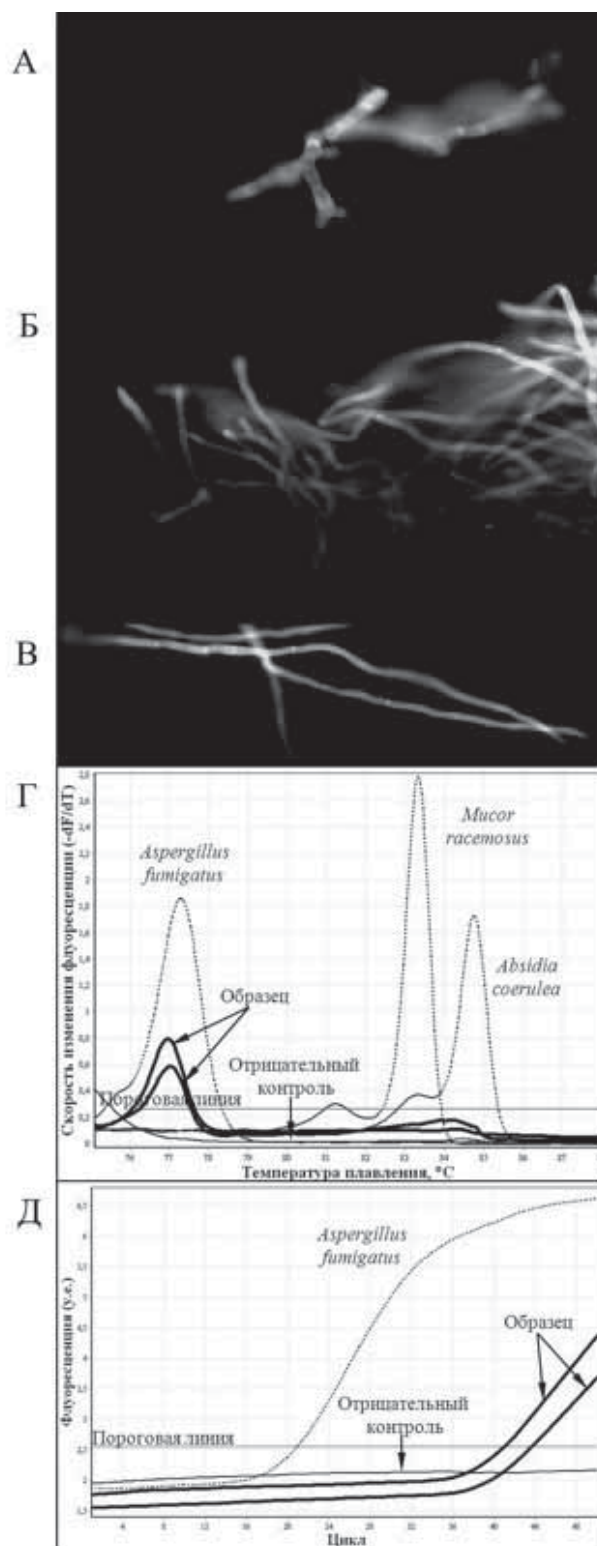


Рис. 2. Исследование клинического материала пациента 2. Люминесцентная микроскопия с калькофлуором белым, X400. Септированный мицелий в промывных водах бронхов (А) и в ткани легкого (Б, В). Г) ПЦР-РВ «HRM-Zygo-Asp» ДНК из ткани легкого. Кривая плавления ПЦР-продукта образца (две линии – две концентрации ДНК – 5 и 20 нг) имеет характерный для аспергиллов пик в районе 77 °С. Д) ПЦР-РВ «Taq-Asp» ДНК из ткани легкого (две концентрации ДНК – 5 и 20 нг). Рост флуоресценции свидетельствует о наличии в ткани ДНК аспергилла. Пунктирные линии – положительные контроли

Пациент 3 (10 лет)

Больная находилась в стационаре с 31.10.12 по 18.12.10 гг. В ноябре 2011 г. был установлен диагноз «острый миелобластный лейкоз, М4 вариант». 10.11.12 г. на рентгенограмме грудной клетки выявили диффузное усиление легочного рисунка преимущественно в прикорневых отделах обоих лёгких.

В промывных водах бронхов от 14.12.12 г. обнаружили обильный широкий несептированный мицелий, ветвящийся под прямым углом (Рис. 3А). При посеве получен рост *Rhizopus arrhizus*. Методами ПЦР анализа и сиквенирования ДНК установили наличие *Rhizopus* sp. в пробе. В результате ПЦР-РВ «HRM-Zygo-Asp» была получена кривая плавления, соответствующая таковой для видов *R. arrhizus* и *R. nigricans* (Рис. 3Б). Сиквенированием ДНК, выделенной напрямую из промывных вод бронхов, микромицет идентифицировали как *R. arrhizus*. В пробе от 12.12.12 г. обнаружили галактоманновый антиген.

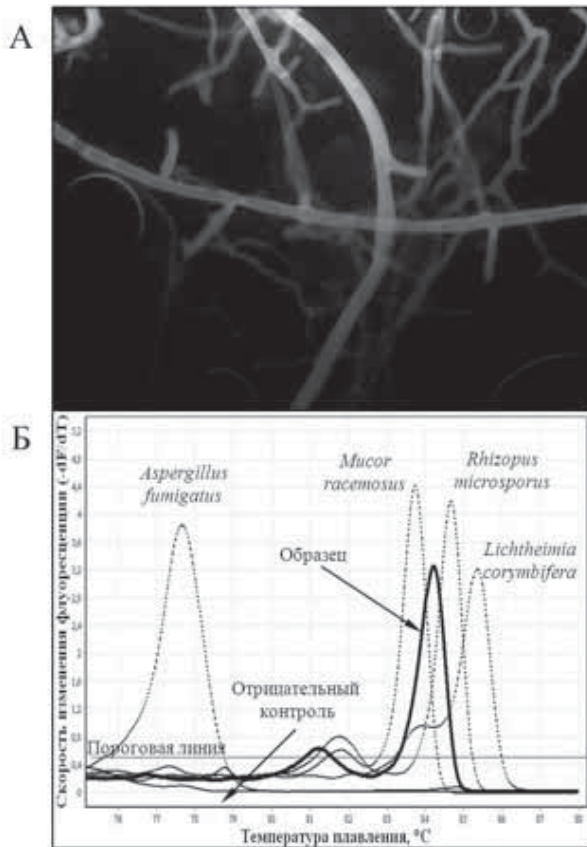


Рис. 3. Исследование промывных вод бронхов пациента 3. **А)** Люминесцентная микроскопия с калькофлуором белым, X400. Несептированный мицелий. **Б)** ПЦР-РВ «HRM-Zygo-Asp». Кривая плавления ПЦР-продукта образца имеет характерные для *R. arrhizus* и *R. nigricans* пики в районе 84°C и 81,5°C. Пунктирные линии – положительные контроли

Таким образом, полученные микробиологически и молекулярными методами результаты согласовывались друг с другом, тем самым подтверждая наличие *R. arrhizus* в пробе. Однако при выполнении теста на галактоманнан из промывных вод с бронхов от 14.12.12 г. были выявлены аспергиллы. Поскольку с помощью других четырех методов аспергиллы не

обнаружили, то его наличие в пробе маловероятно. Возможно, в пробе присутствовали другие грибы – фузариум и пеницилл, к которым тест на галактоманнан обладает кросс-реактивностью. Отметим также, что ложноположительные результаты теста на галактоманнан наблюдают у детей гораздо чаще, чем в других группах пациентов [19].

Пациент 4 (24 года)

Из анамнеза известно, что в декабре 2010 г. пациенту диагностировали острый лимфобластный лейкоз. На КТ органов грудной полости от 02.11.12 г. отмечали интерстициальные и деструктивные очаговые изменения и ателектаз S4 правого лёгкого. При посеве мокроты от 25.10.12 г. и 06.11.12 г. роста микромицетов не было. 28.11.12 г. была констатирована смерть.

Аутопсийный материал. Провели микроскопию образцов ткани легкого, тромба легкого, селезенки, печени, полученных при аутопсии 30.11.12 г. В ткани тромба обнаружили дрожжевые почкующиеся клетки, в других органах грибы не выявили. При посеве из ткани тромба были выделены *Candida glabrata*, из печени – *Candida* sp. В образцах из остальных органов роста грибов не наблюдали.

ПЦР-РВ проводили с образцами двух участков легкого, тромба легкого и печени. При исследовании методом ПЦР-РВ «Taq-Asp» образцов легкого и тромба был положительный результат на аспергиллы (Рис.4), а печени – отрицательный. Сиквенированием выявили в материале ДНК *Rhodotorula mucilaginosa*. Этот гриб мог оказаться в материале в результате контаминации при подготовке аутопсийного материала. В то же время, в научной литературе имеются данные о роли *Rhodotorula* в развитии микозов у иммунокомпрометированных пациентов [20].

Таким образом, обнаружить аспергиллы в аутопсийном материале возможно только методом ПЦР. Получение отрицательного ответа при посеве и микроскопии, вероятно, можно объяснить малым количеством грибного материала в образце ткани или повреждением гифальных элементов при взятии и хранении аутопсийного материала [18]. Предположение согласовывается с тем, как выглядит график накопления флуоресцентного сигнала на рисунке 4. Высокое значение порогового цикла Ct (Cycle of threshold) обычно связано с малым количеством целевой последовательности в образце.

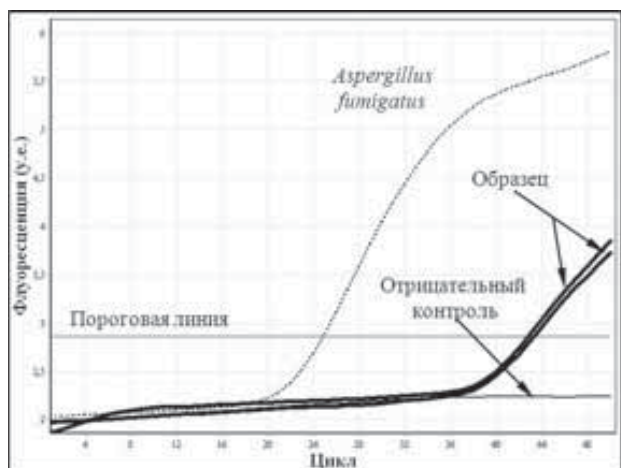


Рис. 4. Исследование образцов ткани лёгкого пациента 4 методом ПЦР-РВ «Taq-Asp». Видны кривые накопления флуоресценции в положительном контроле (*A. fumigatus*) и образцах ткани абсцесса и тромба легкого. Рост флуоресценции свидетельствует о наличии в тканях ДНК аспергилла. Ст-пороговый цикл

Пациент 5 (31 год)

В анамнезе у больного в 2005 г. установлен диагноз лимфомы Ходжкина IV А (с лимфоидным преобладанием) с поражением паховых лимфоузлов, лимфоузлов брюшной полости, селезёнки, мягких тканей правого бедра. 22.11.12 г. при КТ органов грудной клетки выявили единичный низкоплотный очаг 0,4 см в диаметре в S5 верхней доли правого лёгкого.

В промывных водах бронхов от 28.02.13 г. обнаружили мицелий мукора (широкие несептированные гифы, ветвящиеся под прямым углом) (Рис. 5А). В посеве был выделен *Rhizopus arrhizus*. Методом «HRM-Zygo-Asp» установили ДНК двух грибов – *R. arrhizus / nigricans* и *Aspergillus* sp. (Рис. 5Б). Наличие гриба и видовая идентификация *R. arrhizus* были подтверждены сиквенированием грибной ДНК напрямую из промывных вод бронхов. ПЦР-РВ «Taq-Asp» и тест на наличие галактоманнового антигена были положительными (Рис. 5В).

Таким образом, в данном случае с помощью микроскопии и посева в пробе выявили только зигомицет, с помощью HRM-Zygo-Asp ПЦР обнаружили микст-инфекцию зигомицетом и аспергиллом, с помощью Taq-Asp ПЦР подтвердили наличие аспергилла, а тест на галактоманнан согласовывался с результатами двух типов ПЦР. Интересно, что большая чувствительность ПЦР, по сравнению с посевом для выявления микст-инфекций, уже была замечена авторами других исследований [18].

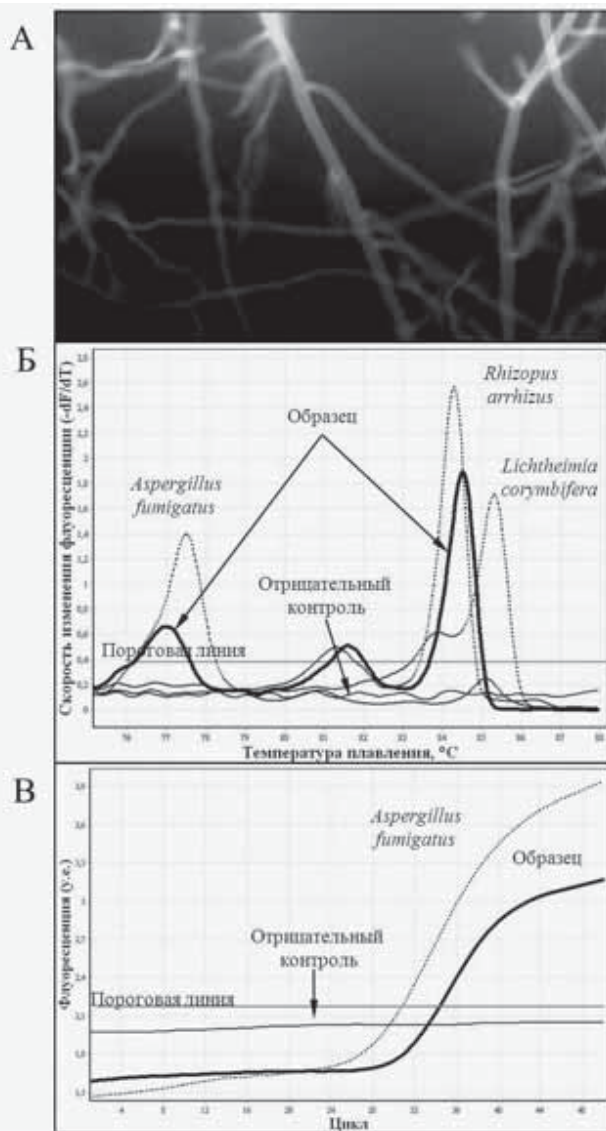


Рис. 5. Исследование промывных вод бронхов пациента 5. А) Люминесцентная микроскопия с калькофлуором белым, X400. Несептированный мицелий. Б) ПЦР-РВ «HRM-Zygo-Asp». Кривая плавления ПЦР-продукта образца имеет характерные пики для *R. arrhizus* и *R. nigricans* в районе 84 °С и 81,5 °С и для аспергиллов – в районе 77 °С. В) ПЦР-РВ «Taq-Asp». Рост флуоресценции в образце свидетельствует о наличии в образце ДНК аспергилла. Пунктирные линии – положительные контроли

ВЫВОДЫ

Методы молекулярной диагностики, основанные на ПЦР-РВ и сиквенировании ДНК гриба непосредственно из клинического материала, обеспечивают не только важные дополнительные сведения, но могут быть единственным методом выявления возбудителя микоза легких. Методом разработанной нами «HRM-Zygo-Asp» ПЦР-РВ можно выявлять одновременно аспергиллы и зигомицеты, при этом идентифицируя зигомицеты до рода или вида. Она может оказаться очень полезной для обнаружения случаев смешанной инфекции. Для внедрения в клиническую практику представленных в работе молекулярно-генетических методов необходимо продолжить их тестирование на клиническом материале.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность сотрудникам НИЛ

молекулярно-генетической микробиологии Игнатевой С.М. и Спиридоновой В.А. за выполнение теста на галактоманновый антиген аспергиллов.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Васильева Н.В., Климко Н.Н., Цинзерлинг В.А. Диагностика и лечение инвазивных микозов: современные рекомендации // Вестник СПб МАПО. – 2010. – Т. 2, №4. – С. 5-18.
2. Smith J.A., Kaufmann C.A. Pulmonary fungal infections // *Respirology*. – 2012. – Vol. 17. – P. 913-926.
3. Roden M.M., Zaoutis T.E., Buchanan W.L., et al. Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases // *Clin. Infect. Dis.* – 2005. – Vol. 41, №5. – P. 634-653.
4. Walsh T.J., Gamaletsou M.N., Hayden R.T., Kontoyiannis P. Early clinical and laboratory diagnosis of invasive pulmonary, extrapulmonary, and disseminated mucormycosis (zygomycosis) // *Clin. Infect. Dis.* – 2012. – Vol. 54, №1. – P. S55-60.
5. Pfeiffer C.D., Fine J.P., Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis // *Clin. Infect. Dis.* – 2006. – Vol. 42. – P. 1417-1427.
6. 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. – Vol. 46. – P. 1813-1821.
7. Wengenack N.L., Binnicker M.J. Fungal molecular diagnostics // *Clinics in Chest Medicine*. – 2009. – Vol. 30. – P. 391-408.
8. Hata D.J., Buckwalter S.P., Pritt B.S., et al. Real-time PCR method for detection of *Zygomycetes* // *J. of Clin. Microbiol.* – 2008. – Vol. 46, №7. – P. 2353-2358.
9. Hrnčirova K., Lengerova M., Kosmanova I. et al. Rapid detection and identification of *Mucormycetes* from culture and tissue samples by use of High-Resolution Melt analysis // *J. of Clin. Microbiology*. – 2010. – Vol. 48, № 9. – P.3392-3394
10. Castelli M.V., Buitrago M.J., Bernal-Martinez L. et al. Development and validation of a quantitative PCR assay for diagnosis of scedosporiosis // *J. Clin. Microbiol.* – 2008. – Vol. 46. – P. 3412-3416.
11. White P. L., Linton C. J., Perry M. D., et al. Aspergillus PCR: One Step Closer to Standardization // *J. of Clin. Microbiol.* – 2010. – Vol. 48, №4. – P.1231-1240.
12. Михайлова Ю.В., Чулина Г.А., Полищук А.Г. Молекулярная идентификация представителей *Aspergillus* spp. из Российской коллекции патогенных грибов по нуклеотидным последовательностям рДНК // Проблемы медицинской микологии. – 2012. – Т. 4. – С. 46-49.
13. White P.L., Bretagne S., Klingspor L., et al. The evolution and evaluation of whole blood polymerase chain reaction assay for the detection of invasive aspergillosis in hematology patients in a routine clinical setting // *Clin. Infect. Dis.* – 2006. – Vol. 42. – P.479-486.
14. Bialek R., Konrad E, Kern J., et al. PCR based identification and discrimination of agents of mucormycosis and aspergillosis in paraffin wax embedded tissue // *J. of Clin. Pathol.* – 2005. – Vol. 58, №11. – P. 1180-1184.
15. de Hoog G.S., Guarro J, Gene J, Figueras M.J. Atlas of Clinical Fungi. G.S. Electronic version 3.1. – CBS, The Netherlands. – 2011.
16. Gu Z., Hall T.A., Frinder M., et al. Evaluation of repetitive sequence PCR and PCR-mass spectrometry for the identification of clinically relevant *Candida* species // *Medical Mycology*. – 2012. – Vol. 20, №3. – P. 259-265.
17. Torelli R., Sanguinetti M., Moody A. et al. Diagnosis of invasive aspergillosis by a commercial real-time PCR assay for *Aspergillus* DNA in bronchoalveolar lavage fluid samples from high-risk patients compared to a galactomannan enzyme immunoassay // *J. of Clin. Microbiol.* – 2011. – Vol. 49, №12. – P. 4273-4278.
18. Richets V., Mousset S., Lambrecht E., et al. Comparison of histopathological analysis, culture, and polymerase chain reaction assays to detect invasive mold infections from biopsy specimens // *Clin. Infect. Dis.* – 2007. – Vol. 44. – P. 1078-1083.
19. Hope W.W., Walsh T.J., Denning D.W. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis // *The Lancet Infect. Dis.* – 2005. – Vol. 5, №10. – P. 609-622.
20. Tuon F.F., Costa S.F. *Rhodotorula* infection. A systematic review of 128 cases from literature // *Revista Iberoamericana de Micología*. – 2008. – Vol. 25. – P. 135-14.

Поступила в редакцию журнала 16.10.2013

Рецензент: И.О. Сучкова



ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ПРОИЗВОДНЫХ АЛЬГИНОВОЙ КИСЛОТЫ

**Серебренникова Е.С. (аспирант)*,
Давыдова В.Л. (студент), Гурина С.В.
(доцент кафедры), Иозеп А.А. (профессор
кафедры)**

Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2013

Изучена антимикробная активность некоторых производных альгиновой кислоты – аналогов химиотерапевтических препаратов ряда нитрофуранов: 5-нитрофурфурилиден- и 3-(5-нитро-2-фурил)-2-пропенилиденгидразидов сульфатированной, карбоксиметилированной и исходной альгиновой кислот.

Ключевые слова: альгиновая кислота, антимикробная активность, ацилгидразоны, карбоксиметилированная кислота, сульфатированная кислота

STUDYING OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SOME DERIVATIVES OF ALGINIC ACID

**Serebrennikova E.S. (postgraduate
student), Davydova V.L. (student), Gurina
S.V. (lecturer of the chair), Iozep A.A.
(professor of the chair)**

St. Petersburgs State Chemical Pharmaceutical
Academy, St. Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2013

Antimicrobial activity of some derivatives of alginic acid – analogues of chemotherapeutic drugs in the series of nitrofurans: 5-nitrofurfuriliden- and 3-(5-nitro-2-furyl)propenilidenhydrazides of sulfated, carboxymethylated and original alginic acid has been studied.

Key words: acylhydrazone, alginic acid, antimicrobial activity, carboxymethyl acid, sulfated acid

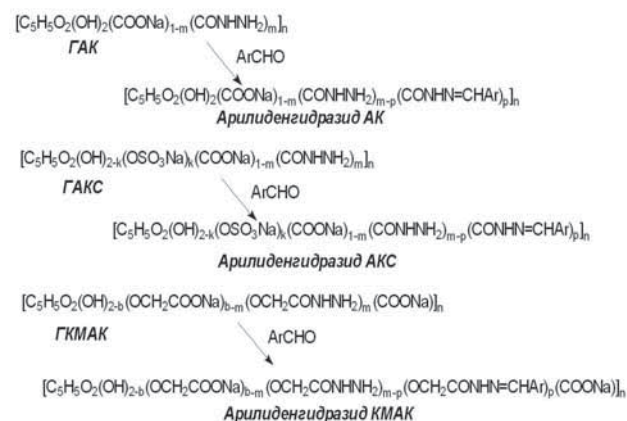
ВВЕДЕНИЕ

Создание полимерных аналогов противомикробных веществ является одним из путей преодоления возникающей резистентности микроорганизмов к действию существующих лекарственных препаратов. Это позволяет повысить локальную концентрацию и устойчивость действующего вещества к ферментам бактерий и грибов, а также снизить его токсичность и увеличить длительность действия. Среди веществ, обладающих противомикробной, противоопухолевой и другими видами биологической активности, нередко называют соединения, представляющие собой гидразоны альдегидов [1]. В связи с этим синтез полимерных гидразонов представляет большой интерес при создании новых и совершенствовании уже известных лекарственных веществ. По данным Платэ Н.А., Васильева А.Е. (1986), модификация лекарственных субстанций полимерами может привести как к сохранению, так и к частичной или полной потере биологической активности в зависимости от типа носителя и его связи с введённым фрагментом.

Цель работы – изучить противомикробную активность полимерных производных некоторых биологически активных альдегидов, синтезированных на основе сульфатированной, карбоксиметилированной и исходной альгиновой кислот.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами микробиологического исследования были синтезированные нами производные сульфатированной альгиновой кислоты (АКС), карбоксиметилированной кислоты (КМАК) и исходной альгиновой кислоты (АК): гидразиды, 5-нитрофурфурилиден- и 3-(5-нитро-2-фурил)-2-пропенилиденгидразиды.



Сульфатирование альгиновой кислоты проводили хлорсульфоновой кислотой в системе растворителей 1,2-дихлорэтан (ДХЭ) – формамид [2], а также растворами сульфотриоксида в ДХЭ [3]. Карбоксиметилирование альгината натрия осуществляли избытком хлоруксусной кислоты в изопропиловом спирте в присутствии раствора гидроксида натрия [4]. Н-формы сульфатированной и карбоксиметилированной альгиновой кислот получали с использо-

* Контактное лицо: Серебренникова Екатерина Сергеевна, тел.: (812) 234-19-38

Таблица

Результаты определения противомикробной активности производных альгиновой кислоты

Название и номер исследуемого образца	Штамм микроорганизма	МИК по отношению к микроорганизмам, мкг/мл (в пересчете на фурацилин)	
		Статическая	Цидная
1 Фурацилин	<i>S. aureus</i>	4,38	8,75
	<i>E. coli</i>	-	8,75
	<i>C. albicans</i>	500	-
2 Гидразиды КМАК	Не активны в отношении выбранных тест-культур		
3 Гидразиды АК, АКС	<i>S. aureus</i>	500	-
	<i>C. albicans</i>	500	-
4 5-нитрофурурил-иденгидразид АК	<i>S. aureus</i>	3,21	-
	<i>E. coli</i>	25,69	51,37
	<i>C. albicans</i>	51,37	-
5 5-нитрофурурил-иденгидразид КМАК №1	<i>S. aureus</i>	9,28	-
	<i>E. coli</i>	18,54	74,25
	<i>C. albicans</i>	37,12	-
6 5-нитрофурурил-иденгидразид КМАК №2	<i>S. aureus</i>	3,94	-
	<i>E. coli</i>	15,77	63,07
	<i>C. albicans</i>	31,54	-
7 5-нитрофурурил-иденгидразид АКС №1	<i>S. aureus</i>	2,01	-
	<i>E. coli</i>	32,21	-
	<i>C. albicans</i>	32,21	-
8 5-нитрофурурил-иденгидразид АКС №2	<i>S. aureus</i>	0,30	-
	<i>E. coli</i>	19,16	38,32
	<i>C. albicans</i>	38,32	-
9 3-(5-нитро-2-фурил)-2-пропенил-иденгидразид АК	<i>S. aureus</i>	3,47	27,73
	<i>E. coli</i>	6,93	13,86
	<i>C. albicans</i>	13,86	27,73
10 3-(5-нитро-2-фурил)-2-пропенилиденгидразид КМАК №1	<i>S. aureus</i>	10,88	43,50
	<i>E. coli</i>	-	43,50
	<i>C. albicans</i>	21,75	-
11 3-(5-нитро-2-фурил)-2-пропенилиденгидразид КМАК №2	<i>S. aureus</i>	2,22	35,56
	<i>E. coli</i>	4,45	8,89
	<i>C. albicans</i>	17,78	71,12
12 3-(5-нитро-2-фурил)-2-пропенилиденгидразид АКС	<i>S. aureus</i>	0,49	7,81
	<i>E. coli</i>	3,90	7,81
	<i>C. albicans</i>	3,90	7,81

ванием трихлоруксусной кислоты и ионообменной хроматографии либо в процессе сульфатирования полисахарида с выделением продукта без использования основания. Этерификацию полученных образцов проводили в избытке этилового спирта в условиях автокатализа или в присутствии кислого катализатора [4, 5]. Гидразиды синтезированных поликислот получали, нагревая Н-формы сульфатированной и исходной альгиновой кислоты с гидразингидратом (ГАКС, ГАК), и реакцией этилового эфира карбоксиметилальгиновой кислоты (ГКМАК) с гидразингидратом при комнатной температуре [6].

Ацилгидразоны альдегидов получали, добавляя к натриевой соли соответствующего гидразида в 0.2 н. растворе уксусной кислоты равный объем этанольного раствора альдегида и выдерживая при комнатной температуре 20 часов [6].

Противомикробную активность определяли методом двукратных серийных разведений полученных полимерных производных в жидких питательных средах. Для исследования антибактериального действия применяли мясопептонный бульон, а для изучения противогрибкового действия – среду Сабуро. В качестве тест-культур использовали грамположительные и грамотрицательные бактерии – *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и дрожжевые грибы *Candida albicans*. Микробная нагрузка составляла 10⁵ КОЕ на мл, время инкубации для *S. aureus*, *E. coli* – 18-24 ч при 37 °С, для *C. albicans* – при 24 °С. Наличие или отсутствие роста тест-микроорганизмов оценивали визуально по помутнению среды. Для определения микробицидного и микростатического действий проводили высеивание на плотные питательные среды. За минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) принимали наименьшую концентрацию препарата, вызывающего задержку размножения (МИКст) или гибель тест-культуры (МИКц). Активность производных альгиновой кислоты выражали в пересчете на содержание введенного фрагмента.

В качестве образца сравнения был использован химиотерапевтическое средство ряда производных нитрофурана – фурацилин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно полученным данным, исходные полисахариды (ГАК, ГАКС, ГКМАК) были малоактивны в отношении выбранных микробных культур. Гидразиды карбоксиметилальгиновой кислоты (таблица, соединения 2) не подавляют рост выбранных тест-культур, а гидразиды сульфатированной и исходной альгиновой кислоты (таблица, соединения 3) оказывают слабое статическое действие на *S. aureus* и *C. albicans* в концентрации 500 мкг/мл.

Введение в молекулы полимеров 5-нитро-2-фурильного фрагмента привело к появлению у них антимикробной активности и, прежде всего, микростатического действия в отношении культур тест-микроорганизмов.

Изучаемые ацилгидразоны 5-нитрофурурола и 3-(5-нитро-2-фурил)-2-пропеналя проявляли выраженный бактериостатический эффект в отношении *S. aureus*, за исключением соединений 5 и 10 (таблица) – их противостафилококковое действие превышало активность фурацилина, а производные сульфатированной альгиновой кислоты (таблица, соединения 12 и 8) были активнее фурацилина, более чем в 9 и 15 раз соответственно.

Все ацилгидразоны 3-(5-нитро-2-фурил)-2-пропеналя, помимо бактериостатического, оказывали и бактерицидное действие на *S. aureus*, но их бактерицидная активность была в 3-5 раз ниже, чем у препарата сравнения, за исключением N-3-(5-нитро-2-фурил)-2-пропенилиденгидразида сульфатированной альгиновой кислоты (таблица, соединение 12), противостафилококковый эффект которого сопоставим с активностью фурацилина.

Грамотрицательные бактерии *E. coli* оказались менее чувствительными к исследуемым соединениям. Полимерные ацилгидразоны 5-нитрофурурола проявляли примерно в 4-8 раз меньшее антимикробное действие в отношении *E. coli*, чем вещество сравнения. Однако бактерицидная активность производных 3-(5-нитро-2-фурил)-2-пропеналя (таблица,

соединения 9,11,12), за исключением соединения 10, сопоставима с активностью фурацилина.

Все синтезированные полимерные ацилгидразоны проявляли противогрибковое действие. Их фунгистатическая активность была на 1-2 порядка выше, чем фурацилина, а ацилгидразоны 3-(5-нитро-2-фурил)пропеналя (таблица, соединения 9,11,12), в отличие от фурацилина, проявили и фунгицидную активность. Наиболее выраженным противогрибковым действием обладал N-3-(5-нитро-2-фурил)-2-пропенилиденгидразид сульфатированной альгиновой кислоты (таблица, соединение 12), который оказывал ингибирующее действие на *S. albicans* при МИКст 3,9 мкг/мл, МИКц – 7,8 мкг/мл.

При сравнении антимикробного действия синтезированных веществ выявили, что полимерные производные 3-(5-нитро-2-фурил)-2-пропеналя имели более высокую активность, чем ацилгидразоны 5-нитрофурурола. Вполне вероятно, что повышение противогрибкового эффекта связано с увеличением размера вставки (углеродной цепи) между полимером и нитрофурановым фрагментом.

Также установили, что вещества, синтезированные на основе сульфатированной альгиновой кислоты, обладали большей антимикробной активностью, чем производные альгиновой и карбоксиметилированной альгиновой кислот.

Ранее полимерные ацилгидразоны 5-нитрофурурола были получены на основе карбоксиметилхитина [7]. При сравнении наших результатов с данными из научной литературы, обнаружили, что в случае арилиденгидразидов карбоксиметилхитина также имеет место некоторое снижение активности в отношении бактерий *S. aureus* и *E.coli* и усиливается

противогрибковый эффект по сравнению с фурацилином.

Таким образом, конструирование полимерных аналогов лекарственных средств ряда 5-нитрофурана по предложенной химической схеме на основе природной, сульфатированной и карбоксиметилированной альгиновой кислот представляет интерес для дальнейших исследований, так как от полученных веществ можно ожидать не только высокую биологическую активность, но и снижение токсичности, и повышение продолжительности действия, как у модифицированных полисахаридов.

ВЫВОДЫ

1. Альгиновая кислота, а также её сульфатированные и карбоксиметилированные производные в качестве носителя препаратов нитрофуранового ряда, в целом, не снижают противомикробный эффект, а в ряде случаев, увеличивают его в 10-100 раз.

2. Все исследуемые полимерные производные 5-нитрофурана проявляют фунгицидный и фунгистатический эффекты в отношении *S. albicans*.

3. Ацилгидразоны, синтезированные на основе сульфатированной альгиновой кислоты, обладают большей антимикробной активностью, чем производные альгиновой и карбоксиметилированной альгиновой кислот.

4. С помощью разработанной схемы синтеза полимерных аналогов лекарственных средств ряда 5-нитрофурана на основе природной, сульфатированной и карбоксиметилированной альгиновой кислот можно конструировать биологически активные полимеры, обладающие антимикробной активностью.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. *Sevim Rollas, S. Guniz Kucukzugel*. Biological activities of hydrazone derivatives //Molecules. – 2007. – Vol. 12. – P. 1910-1939.
2. *Серебренникова Е.С., Иозеп А.А.* Сульфатирование альгиновой кислоты хлорсульфоново́й кислотой в среде формамида и 1,2-дихлорэтана // Журнал общей химии. – 2012. – Т. 82, №2. – С. 340-342.
3. *Серебренникова Е.С., Иозеп А.А.* Сульфатирование альгиновой кислоты раствором серного ангидрида в 1,2-дихлорэтаноле // Химическая промышленность. – 2011. – Т. 88, №6. – С. 277-280.
4. *Серебренникова Е.С., Коломина Е.О., Иозеп А.А.* Карбоксиметилальгиновая кислота и ее реакции со спиртами // Бутлеровские сообщения. – 2012. – Т. 30, №6. – С. 57-62.
5. *Серебренникова Е.С., Иозеп А.А.* Сложные эфиры сульфатированной альгиновой кислоты // Бутлеровские сообщения. – 2011. – Т. 28, №19. – С. 41-44.
6. *Серебренникова Е.С., Щенникова О.Б., Иозеп А.А.* Гидразиды и бензилиденгидразиды сульфатированной альгиновой кислоты // Химическая промышленность. – 2012. – Т. 89, №2. – С. 80-85.
7. *Дударев В.Г., Тихомирова О.М., Иозеп А.А.* Синтез и противомикробная активность производных карбоксиметилхитина // Хим.фарм. журнал. – 2013. – Т. 47, №1. – С. 32-35.

Поступила в редакцию журнала 16.10.2013

Рецензент: Н.П. Елинов



ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ШТАММА LS 1-06 *LAETIPORUS SULPHUREUS* (BULL.) MURRIL L. И ОЦЕНКА ПЕРСПЕКТИВ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

¹ Громовых Т.И. (профессор)*, ¹ Иванова И.Е. (аспирант), ² Шнырева А.В. (профессор), ³ Барсегян Г.Г. (в.н.с.), ¹ Данильчук Т.Н. (докторант), ³ Левин М.А. (в.н.с.)

¹ ФГБОУ ВПО Московский государственный университет пищевых производств; ² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; ³ ГБУЗ г. Москвы «Московский НИИ здравоохранения и медицинской экологии департамента здравоохранения г. Москвы», Москва, Россия

© Коллектив авторов, 2013

В статье рассмотрены результаты по изучению микроморфологических особенностей штамма *Ls 1-06 Laetiporus* sp. и его генетической оценки принадлежности к виду *Laetiporus sulphureus*. Приведены результаты оценки токсичности мицелия штамма. Установлено, что водные и спиртовые экстракты штамма *L. sulphureus Ls 1-06* не обладают токсичным действием на жизнедеятельность простейших инфузорий *Paramecium caudatum* и *Tetrahymena pyriformis*. Результатами по изучению острого токсического эффекта на экспериментальных животных (крысах) подтверждено его отсутствие, что позволяет отнести экстракты биомассы штамма *L. sulphureus Ls 1-06* к V классу токсичности веществ, т.е. к нетоксичным.

Ключевые слова: грибы, *Laetiporus sulphureus*, мицелий, тестирование на токсичность, токсичность

INVESTIGATION OF THE TOXIC PROPERTIES OF STRAIN LS 1-06 *LAETIPORUS SULPHUREUS* (BULL.) MURRIL L. AND EVALUATION OF ITS USE PERSPECTIVES

¹ Gromovykh T.I. (professor), ¹ Ivanova I.E. (postgraduate student), ² Shnyrjova A.V. (professor), ³ Bargesjan G.G. (leading scientific collaborator), ¹ Danilchuk T.N.

* Контактное лицо: Громовых Татьяна Ильинична, e-mail: tigromovykh@rambler.ru

(candidate for PhD rank), ³Levin M.A. (leading scientific collaborator)

¹Moscow State University of Food Production; ²M.V. Lomonosov Moscow State University; ³Moscow Scientific Institute of Health and Medical Ecology of Moscow Department of Health, Moscow, Russia

© Collective of authors, 2013

We consider in this article the results of the study of micromorphological features of strain *Ls 1-06 Laetiporus* sp. and its genetic evaluation of belonging to species *Laetiporus sulphureus*. The results of evaluation of the strain mycelium toxicity have been showed. It is established that the aqueous and ethanol extracts of the mycelium strain *L. sulphureus Ls 1-06* do not have toxic effects on the life of the simplest ciliates *Paramecium caudatum* and *Tetrahymena pyriformis*. The results of study of acute toxicity in experimental animals (rats) confirmed the absence and allow to relate biomass extracts of strain *L. sulphureus Ls 1-06* to Class V toxicity of substances, that is non-toxic.

Key words: fungi, *Laetiporus sulphureus*, mycelium, testing for toxicity, toxicity

В настоящее время необходимы новые ресурсы лекарственных препаратов и антибиотиков. Одним из направлений поиска новых природных биологически активных соединений является использование мицелия и плодовых тел различных видов базидиальных грибов. Одним из перспективных в этом направлении является вид *Laetiporus sulphureus* – серно-желтый трутовик, плодовые тела которого уже давно применяют в народной медицине в качестве лекарственного средства, обладающего антисептическими свойствами [1-4]. Известно, что не только плодовые тела, но и мицелий штаммов этого вида имеют в составе биологически активные соединения. В результате исследований Тихоновой О.В., Ершовой Е.Ю. и др. (2001 г.) показано, что при поверхностном и глубинном культивировании штамма *L. sulphureus* проявляют антибиотическую активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, но не оказывают действия в отношении патогенных грибов [2].

Другие авторы выявили антимикробную [1, 3], антиоксидантную [5, 6] противоопухолевую [7, 8] и противовирусную [9] активности у штаммов *L. sulphureus*. Исследователи связывают антимикробные свойства с образованием и выделением в культуральную жидкость штаммами *L. sulphureus* органических кислот, а антиоксидантные, противовирусные и противоопухолевые – с биосинтезом каротиноидных соединений.

Доказано, что этанольные экстракты мицелия *L. sulphureus*, выращенного в глубинной культуре, обладают антиоксидантными свойствами [6]. Антиоксидантная активность липокаротиноидного экстракта мицелия *L. sulphureus* была подтверждена и в экспериментах *in vivo* теми же исследователями. Радиозащитное и антиоксидантное действие одни авторы связывают, скорее всего, с присутствием в мицелии *L. sulphureus* липофильных биоантиоксидантов каротиноидной природы [10], другие - с присутствием в мицелии данного вида экзополисахаридов [11, 12].

По сравнению с каротинообразующими дрожжами и микромицетами, базидиальный ксилотроф *L. sulphureus* обладает определенными преимуществами. Растущая популярность вида *L. sulphureus* делает актуальной разработку технологии его выращивания с использованием сырьевой базы и отходов растениеводства.

Несмотря на то, что общий объем публикаций, посвященных базидиомицету *L. sulphureus*, чрезвычайно велик, все сведения относятся только к представителям вида, паразитирующим на листовых породах деревьев. Подобная информация о штаммах, поражающих древостой хвойных, практически отсутствует. Известно лишь, что они распространены, в основном, в Северной Америке, некоторых странах Европы и обладают токсичными свойствами. Кроме того, в настоящее время все исследования штаммов, изолированных из древостоев хвойных, проводили только в Северной Америке. Установлено, что выделенные с хвойных растений изоляты относятся к виду *Laetiporus conifericola* [13]. Известно, что данный вид распространен в Северной Америке – от Калифорнии до Аляски, развивается часто на красной пихте, кедрах, также как и *L. sulphureus*, вызывая бурую гниль как живых, так и уже мертвых деревьев.

Однако на сегодняшний день нет источников с информацией о свойствах и составе штаммов, паразитирующих на хвойных породах на территории России, как нет достоверного подтверждения, к какому виду относить такие штаммы, и действительно ли они токсичны? Это обосновывает необходимость исследования изолятов рода *Laetiporus*, выделенных с хвойных древостоев: подтверждения или опровержения их принадлежности к виду, изучению их биологически активных свойств и токсичности.

В период с 2006 г. были выделены штаммы из плодовых тел пораженных хвойных древостоев Республики Тыва. В результате изучения культуральных признаков, биологической активности и продуктивности был отобран наиболее продуктивный штамм Ls 1-06, способный к биосинтезу каротиноидов и белка, в составе которого имеется большое количество незаменимых аминокислот [14]. Штамм *L. sulphureus* Ls 1-06 депонирован во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов как продуцент белка и каротиноидов (ВКПМ F-982). Однако для его использования в качестве продуцента биологически активных соединений, пищевых и кормовых добавок требовалось проведение идентификации и исследования биологической активности и токсичности штамма.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение видовой принадлежности.

Видовую принадлежность определяли на основании морфологических признаков плодовых тел, описывавшихся при сборе грибов, спор и морфолого-культуральных признаков (тип колоний, характер

роста, цвет мицелия, запах, наличие экзопигмента), для чего мицелий наращивали на капустном агаре (200 г капусты, 2% агара, 2% глюкозы).

Результаты всех исследований были сопоставлены с данными в определителе [15]. Видовую принадлежность подтверждали молекулярно-генетическими исследованиями. Изучали участок ядерной рДНК, содержащий транскрибируемый спейсерный участок ITS. Хроматограммы, полученные после секвенирования, анализировали с помощью программы Chromas_Pro_Sequens_Scanner. Поиск гомологичных последовательностей в Генбанке осуществляли с применением программы BLAST (www.ncbi.nih.gov).

Изучение микроморфологических свойств штаммов.

Микроморфологические особенности штамма исследовали в живом состоянии путем выращивания культуры гриба в камерах Ван-Тигема. Для этого на стерильное предметное стекло фиксировали камеру Ван-Тигема, в центр которой наносили каплю расплавленного питательного сусло-агара. После застывания среды, в центр капли иглой вносили посевной материал и сверху накрывали покровным стеклом, предварительно смазанным вазелином. Камеры с посевами помещали в стерильные чашки Петри и инкубировали при 25 ± 1 °С. Каждые вторые сутки культивирования наблюдали за микроморфологией при помощи светового микроскопа марки LWScientific (США).

Люминесцентную микроскопию применяли для окрашивания ядерного вещества. Материал для исследования готовили следующим образом: выросший на покровные стекла 7, 14 и 21-суточный мицелий фиксировали в модифицированном растворе Карнуа с последующим окрашиванием реактивом ДАПИ (4',6-диамидино-2-фенилиндола, SIGMA) в концентрации 500 нг/мл; в работе использовали микроскоп Axioskop 40 FL, фильтр 02 (Zeiss).

Сканирующую электронную микроскопию проводили для изучения морфологии конидий и мицелия. Для чего агаровые блоки с выросшим 7, 14 и 21-суточным мицелием фиксировали в парах осмия. После высушивания образцы закрепляли, напыляли смесь платины и палладия (IB-3 IonCoater) и просматривали с помощью сканирующего электронного микроскопа «Hitachi» S-405A в лаборатории электронной микроскопии МГУ им. М.В. Ломоносова.

Исследование токсичности экстрактов мицелия на простейших.

Для оценки токсичности мицелий наращивали на капустной среде в колбах Эрленмейера на качалке в режиме 150 об/мин, затем высушивали в сушильном шкафу при 40 °С в течение 3 суток. Высушенную биомассу измельчали и проводили водную горячую экстракцию и этанольную экстракцию [15].

Водные экстракты из биомассы мицелия получали путем смешивания дистиллированной воды и измельченной биомассы при 60 ± 1 °С встряхиванием на качалке в режиме 120 об./мин в течение пяти часов.

Таблица 2

Критерии оценки степени токсичности водного экстракта тест-культуры на инфузории *T. pyriformis*

Коэффициент прироста инфузорий <i>T. pyriformis</i> за 24 ч экспозиции, K2		Оценка степени токсичности или решение о продолжении исследования
>=0,9	>=0,9	объект нетоксичен
<=0,5	<=0,5	объект токсичен

Примечание: Все остальные варианты значений коэффициента прироста учитываются при вычислении комплексной оценки после третьего этапа

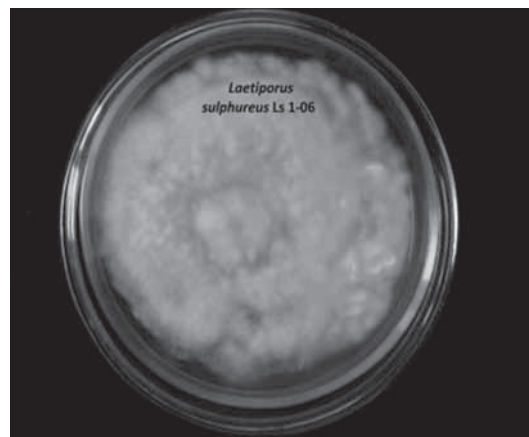
Изучение острой токсичности образцов мицелия на крысах.

Для исследований использовали особей обеих полов линии белых крыс *Wistar*. Определяли величину средне-смертельной дозы (LD_{50}) в условиях дробного многократного внутрижелудочного введения водного экстракта мицелия штамма, полученного в воде при нагреве и ультразвуковой обработке суспензии. Экстракт вводили каждой особи в объеме 2,0 мл многократно через каждый час. Внутрижелудочное введение крысам испытуемого насыщенного раствора в пересчете на суммарную дозу составляло 7 г/кг.

Оценку результатов действия экстрактов проводили по следующим показателям: поведение животных, выживаемость, изменение массы тела крыс, массовый индекс органов (по данным некропсии).

Результаты исследований идентификации штамма *Ls1-06*.

При изучении микроморфологии штамма обнаружили, что мицелий имеет оранжево-розовый цвет, состоит из длинных гиф с простым ветвлением, без образования пружек, также отмечали образование овальных, шарообразных и грушевидных структур, расположенных на гифах терминально или интеркалярно. При окраске ядер выявили, что мицелий дикариотный, ядра расположены тесно друг к другу (Рис. 1).



А

Соотношение исследуемого образца к экстрагенту составляло 1:30 соответственно. Спиртовые экстракты получали путем экстрагирования образца 96%-м этанолом с соотношением образца к экстрагенту – 1:10. Для исследований на инфузориях полученный экстракт доводили до концентрации спирта 1%.

На первом этапе оценивали выживаемость тест-объектов инфузорий *Paramecium caudatum* в водных экстрактах мицелия и культуральных фильтратах. Культуру тест-организма – *P. caudatum* готовили с титром не менее 500-100 клеток/мл в чашке Петри путем выращивания на среде Лозина-Лозинского [16]. Первый этап биотестирования на инфузориях *P. caudatum* осуществляли в соответствии с техническим описанием с помощью прибора БиоЛаТ-3, компьютера с программой AutoCiliataXP, разработанной автором Черемных Е.Г. Оценку токсичности по первому этапу биотестирования проводили на основании критериев, указанных в таблице 1 [17].

Расчет коэффициента токсичности K_1 выполняли по формуле:

$$K_1 = \frac{N_1}{N_2},$$

где N_1 – количество живых инфузорий после экспозиции в пробе; N_2 – количество живых инфузорий до начала опыта.

Таблица 1

Критерии оценки токсичности на *P. caudatum*

Коэффициент выживаемости <i>P. caudatum</i> , K1	Оценка токсичности
Тест-культуры водного экстракта	
>=0,9	Нетоксичная проба
<=0,50	Токсичная проба

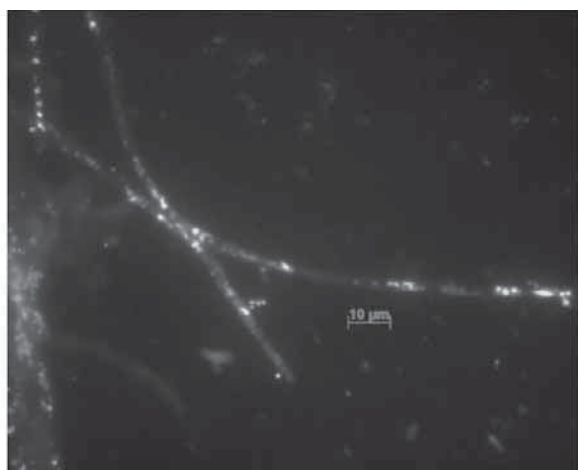
Все остальные варианты значений коэффициента выживаемости учитываются при вычислении комплексной оценки после второго и третьего этапов

На втором этапе проводили оценку токсичности на тест-объектах *Tetrahymena pyriformis*. Для этого наращивали культуру на среде Лозина-Лозинского в течение от 3 до 14 суток с титром не менее $5 \cdot 10^4 \pm 10^3$ клеток/мл. Исследуемые пробы помещали во флаконы, в которые вносили по 10 мкл культуры инфузорий *T. pyriformis*. Инфузории культивировали в течение 24 час. В качестве контроля использовали исходную питательную среду для инфузорий без добавления фильтратов и экстрактов. Заключение производили на основе критериев, указанных в таблице 2, вычисленных по формулам 2 и 3:

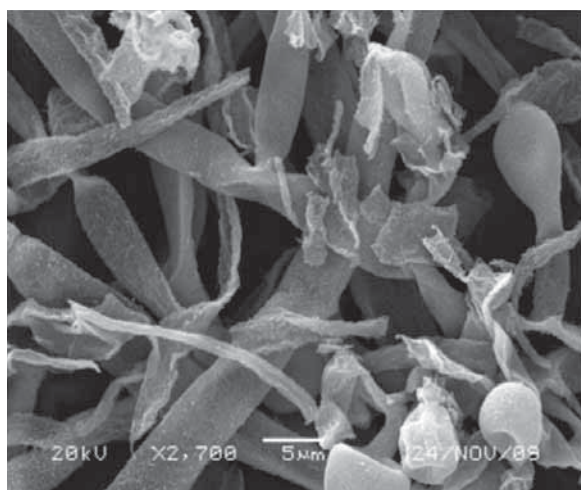
$$K_2 = \frac{N_2}{N_1 * K_{контр}} \quad (2);$$

$$K_{контр} = \frac{N_{1контр}}{N_{2контр}} \quad (3)$$

где $N_1, N_{1контр}$ – количество инфузорий до начала экспозиции в пробе и контроле, $N_2, N_{2контр}$ – количество живых инфузорий по окончании второго этапа опыта [17].



Б



В

Рис. 1. Микроморфология штамма Ls1-06 *Laetiporus* sp.: А – морфология колонии на питательном капустном агаре; Б – окраска ядер, В – морфология мицелия (сканирующая электронная микроскопия мицелия)

При изучении микроморфологии в режиме световой микроскопии было установлено, что мицелий штамма *Laetiporus* sp. имеет гифы различного диаметра (от 3,5 до 6,5 мкм). Шарообразные структуры воздушного мицелия являются хламидоспорами, а грушевидные структуры субстратного мицелия – бластоконидиями, которые на мицелии формиру-



А

ются апикально (Рис. 2). На основании микроморфологических и культуральных признаков штаммов на агаризованных средах выявили их сходство с видом *L. sulphureus*.

При исследовании генетической принадлежности штаммов сиквенированием переменных участков ITS рДНК подтверждена степень сходства с видом *L. sulphureus* на 99%.

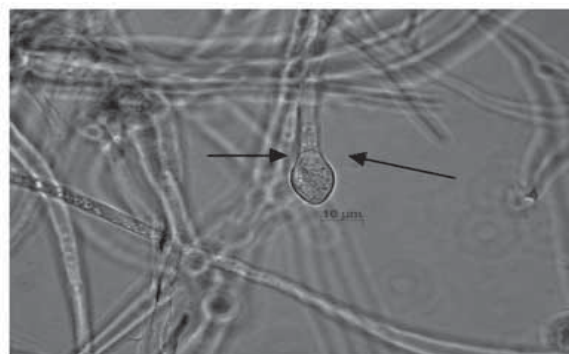
Последовательность ITS рДНК переменных участков штамма 1-06 представлена ниже:

```

GAAAAANGGGTTCGCCCCTNGTCACAACAC
ACCCCTGNTGCACGTTGAAGGCCCGGCTCGTT
GAGTGGGTGGGCGACCGCCCAGGATTCGTAGC
CTCGCTTTCTTACACAAACTTCGGAATGTACAT
CAGAATGTCTTACGCGTGTAAACGCATCGTAATAT
AACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCAT
CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCT
TTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGCATCCGAG
GAGCATGCCTGTTTGAAGTGTATGAAACTCTCA
ACCCCTGCCATCTTTCGGGATGAGCGTCGGTTG
GATTTTGGAGGTGCGCGACTCGTTCCGGCTCCT
CTTGAAGCATAGTGAAGCTTGGACCTGACCGA
CCGAGTGGACGTGATAGAAAGTCACCGTCGACT
GAAGGGTCCGTCGTTGAACGGTTCAAGCTTTGT
TTCATCGTCTTCGGACGAAACATCTCTGACCTC
TGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAAC
TTAAGCATATCAATAAGCCGGAGGAA
    
```

Таким образом, было установлено, что штамм, выделенный из плодового тела, паразитирующего на *Larix sibirica* L., принадлежит к виду *Laetiporus sulphureus*. В связи с чем, утверждение авторов Бурдсала Ж. и Банника М. о том, что на древостоях хвойных паразитирует только вид *L. conifericola* неправомерно, так как полученные нами данные этому противоречат.

При исследовании токсичности водных экстрактов мицелия штамма Ls 1-06 на простейших *P. caudatum* выявили, что они не являются токсичными при соотношении экстракт: вода - 1:5 (табл. 3). Коэффициент выживаемости клеток *P. caudatum* составил не менее 1,0, что свидетельствует о нетоксичности такой концентрации экстракта. Спиртовые экстракты мицелия штамма Ls 1-06 *L. sulphureus* (1% этанол)



Б

Рис. 2. Микроморфология мицелия штамма Ls1-06 *Laetiporus* sp. (указано стрелками): А – утолщение клетки мицелия при образовании хламидоспор; Б – вздутия в мицелии при образовании бластоконидий

нетоксичны при исходной концентрации исследуемого экстракта для *P. caudatum*.

Таблица 3.

Влияние экстрактов мицелия штамма *L. sulphureus* на коэффициент выживаемости *P. caudatum*

	Разведение исходного экстракта			
	Исх. экстракт	1:1	1:5	1:10
Концентрация сухого вещества в исходном водном экстракте мицелия, 0,33±0,01%				
штамм Ls 1-06	0,3	0,3	1,0	1,5
Контроль вода	2,24			
Концентрация сухого вещества в исходном водном экстракте, 0,019±0,001%				
штамм Ls 1-06				
К1 выживаемости клеток в спиртовых экстрактах мицелия				
штамм Ls 1-06	3,15	3,17	2,90	-
Контроль 1% спирт	1,82			

При оценке на простейших *Tetrahymena pyriformis* установили, что экстракты штаммов не обладают токсичным действием на культуру простейших *T. pyriformis*, т.к. имеет место прирост клеток через 24 часа (табл. 4). По коэффициенту прироста *T. pyriformis*, который составил 13 – для водных экстрактов и 11 – для спиртовых, можно утверждать об их биологической активности, влияющей на жизне-способность инфузорий.

Таблица 4.

Влияние экстракта мицелия штамма Ls 1-06 *L. sulphureus* на численность культуры *T. pyriformis*

Штамм	Кол-во исходных, клеток/ 300 мкл	Кол-во клеток через 24 ч, клеток/300 мкл	Коэффициент прироста
Ls 1-06	109	1010	13
Спиртовой экстракт			
Ls 1-06	104	1190	11
Вода (контроль)	102	216	2
1% спирт (контроль)	90	182	2

Таким образом, при изучении экстрактов штамма Ls 1-06 *L. sulphureus* выявили, что они не вызывают токсического эффекта в отношении простейших.

Результаты оценки токсичности на крысах.

Множественное дробное внутрижелудочное введение крысам экстракта мицелия штамма Ls 1-06 *L. sulphureus* во всех испытанных дозах (4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг), в том числе – максимальной дозе – 7,0 г/кг, на протяжении всего периода наблюдений не сопровождалось летальностью вне зависимости от пола животных (табл. 5).

Таблица 5

Влияние экстракта мицелия штамма Ls 1-06 *L. sulphureus* на выживаемость белых крыс Wistar после многократного дробного внутрижелудочного введения

Доза, г/кг	Множественное введение экстракта Ls 1-06 <i>L. sulphureus</i>				Расчетные показатели токсичности (г/кг)
	4,0	5,0	6,0	7,0	
Самцы					
Эффект: пало/ всего	0/10	0/10	0/10	0/10	ЛД50>7,0 г/кг

Самки					
Эффект: пало/ всего	0/10	0/10	0/10	0/10	ЛД50>7,0 г/кг
Однократное контрольное введение физ.раствора					
Доза, 8 мл/крыса	5,0			Расчетные показатели токсичности (мг/крыса)	
Самцы					
Эффект, пало/ всего	0/7			Нет павших	
Самки					
Эффект, пало/ всего	0/7			Нет павших	

На 2-е, 7-е и 14-е сутки животных взвешивали и определяли влияние экстракта мицелия штамма Ls 1-06 *L. sulphureus* на состояние, поведение, динамику изменения массы тела крыс (табл. 6). Выявили, что животные переносили введённые количества веществ хорошо, без выраженных токсических проявлений, как в период введения, так и на протяжении 14 суток последующих наблюдений.

Таблица 6.

Изменение массы тела крыс после однократного внутрижелудочного (в/ж) введения испытуемых препаратов

Препарат, доза	Изменение массы тела, % (исходная масса принята за 100 %) на:		
	2 сут.	7 сут.	14 сут.
Внутрижелудочное введение экстракта мицелия штамма Ls 1-06 <i>L. sulphureus</i>			
5 г/кг, самцы (n=10)	101,8	107,6	110,9
5г/кг, самки (n=10)	103,5	109,3	116,0
7г/кг, самцы (n=10)	102,7	107,8	113,3
7г/кг, самки (n=10)	103,3	109,1	117,2
Контрольное внутрижелудочное введение физиологического раствора			
8 мл, самцы (n=7)	103,5	108,0	112,0
8 мл, самки (n=7)	104,5	109,5	115,8

Поведение и состояние животных опытных и контрольных групп не различались. При анализе полученных данных, по которым определяли динамику изменения массы тела, наблюдали положительную динамику роста массы тела у крыс во всех испытуемых группах. Достоверных различий в динамике массы тела в группах животных, получавших раствор экстракта мицелия штамма Ls 1-06 *L. sulphureus*, не выявили, кроме того, она практически не отличалась от показателей в контрольной группе.

После заключительного взвешивания, животных подвергали эвтаназии и производили вскрытие, морфометрический анализ органов и тканей, вычисляли массовые коэффициенты крыс опытных и контрольных групп (табл. 7).

Таблица 7.

Массовые индексы органов белых крыс после внутрижелудочного введения экстракта мицелия штамма Ls 1-06 *L. sulphureus* (M ± m)

Органы	Группы и дозы (г/кг)					
	Экстракт мицелия штамма Ls 1-06 <i>L. sulphureus</i>				Контроль физ.раствор 8 мл/кг	
	5 г/кг		7г/кг		♂	♀
Сердце	♂ 3,85±0,1	♀ 3,73±0,1	♂ 3,91±0,1	♀ 3,78±0,1	♂ 3,85±0,1	♀ 3,61±0,05
Легкие с трахеей	9,32±0,3	9,03±0,2	9,04±0,1	8,85±0,3	9,13±0,1	8,87±0,5
Тимус	1,41±0,09	1,49±0,07	1,47±0,08	1,39±0,08	1,37±0,11	1,32±0,08
Печень	41,7±1,3	39,9±2,1	40,9±2,7	38,8±2,4	39,7±0,9	39,1±2,5

Селезенка	6,1±0,3	6,2±0,4	5,9±0,5	6,0±0,3	6,3±0,5	6,1±0,3
Почка (лев)	4,2±0,1	4,2±0,1	4,2±0,1	4,4±0,2	4,1±0,1	4,3±0,2
Надпочечник (лев)	0,18±0,03	0,20±0,03	0,21±0,05	0,23±0,02	0,17±0,05	0,20±0,03
Головной мозг	7,25±0,02	7,33±0,09	7,47±0,11	7,38±0,15	7,26±0,10	7,22±0,13
Яички/яичники	13,4±0,21	0,65±0,06	14,2±0,3	0,72±0,08	14,0±0,3	0,78±0,09

Результаты вскрытия (некропии) крыс.

На вскрытии крыс, умерщвленных в конце токсикометрического эксперимента (через 14 суток), а также на вскрытии контрольных животных, умерщвленных в тот же срок, различий не установлено. Крысы правильного телосложения, удовлетворительной упитанности. Состояние волосяного и кожного покровов нормальное. Шерсть – блестящая, опрятного вида, без очагов облысения.

При осмотре грудной и брюшной полостей нарушений в расположении внутренних органов не отмечали. Желудок имел обычную форму и размеры, просвет заполнен плотным пищевым содержимым. Слизистая оболочка тела желудка – бледно-розовая, блестящая, складчатая, без раздражений, а тонкой и толстой кишок – блестящая, гладкая.

Подчелюстные лимфатические узлы и слюнные железы имели овальную или округлую форму, однородный розоватый или желтоватый цвет и умеренную плотность.

Щитовидная железа плотно прилежала к гортани, имела обычные размеры и плотность, розовато-красноватый цвет. Тимус – треугольной формы, беловатого цвета и умеренно плотной консистенции.

Величина и форма сердца изменений не представляли. Мышца сердца – коричневатая, плотная. Поверхность легких бледно-розовой окраски; легкие спадались при вскрытии грудной клетки. Ткань на разрезе также имела однородную бледно-розовую окраску. Слизистая оболочка внелегочных бронхов – гладкая, блестящая, бледно-розовая. Величина и форма печени без изменений. Капсула печени была тонкой, прозрачной. Ткань печени имела коричневатый цвет и умеренно плотную консистенцию. Поджелудочная железа – бледно-розовая, дольчатая.

Величина и форма почек не отличались от таковых в контроле, капсула легко снималась. Поверхность органа – гладкая, однородной коричневато-серооливковой окраски. На разрезе почек отчетливо различались корковое и мозговое вещества. Форма, размеры и плотность надпочечников, яичников или яичек были такими же, как в контроле.

Селезенка имела темно-вишневый цвет, гладкую поверхность и плотноватую консистенцию. Оболочки головного мозга – тонкие, прозрачные. Вещество

головного мозга умеренной плотности. Расширения желудочков мозга не наблюдали.

Таким образом, по данным вскрытия и макроскопического исследования, однократное внутрижелудочное введение экстрактов мицелия штамма Ls 1-06 *L. sulphureus* в исследованных дозах белым крысам Wistar обоих полов не вызывает макроскопических изменений внутренних и эндокринных органов, головного мозга, а также слизистой оболочки желудка, кишечника, кожи, подкожной клетчатки и мышц.

При оценке показателя массового индекса органов у крыс обоих полов также выявили отсутствие достоверных различий при введении экстрактов мицелия и физиологического раствора (табл. 7).

Из приведённых в таблице 7 данных следует, что достоверных отличий массовых индексов органов крыс, получавших экстракт мицелия штамма Ls 1-06 *L. sulphureus* в разных дозах, от показателей массовых индексов в соответствующих контрольных группах нет. При испытании экстрактов мицелия штамма Ls 1-06 *L. sulphureus* показано, что многократное внутрижелудочное дробное введение крысам обоих полов в объёме, многократно превышающем максимальный разовый объём, рекомендованный для данного вида, в максимальной дозе 7 г/кг не сопровождалось летальностью, не вызывало существенных изменений общего состояния и поведения животных.

Результаты определения острого токсического действия, данные наблюдений за экспериментальными животными на протяжении 14 суток после острого внутрижелудочного введения, а также данные вскрытия и морфометрического анализа являются основанием для отнесения экстракта мицелия штамма к V классу практически нетоксичных веществ, для которых значение средне-смертельной дозы, находится в пределах $5000 \text{ г} < LD_{50} < 15000 \text{ г}$ (по Hodgeetal H. «Clinical Toxicology of Commercial Products. Acute Poisoning». Ed. IV, Baltimore, 1975; Сидоров К.К., 1977). В пересчёте на человека, по правилам межвидового переноса, полученная величина составит около 1,17 г/кг, т.е. по выявленным данным, для человека весом 70 кг безопасно потребление 81,7 г препарата мицелия одномоментно.

Из результатов проведенных исследований следует, что штамм Ls 1-06, выделенный из древостоев хвойных, относится к виду *L. sulphureus*, который используют как источник пищевых ресурсов. Биомасса мицелия штамма не является токсичной, что служит основанием для применения её в качестве продуцента биологически активных веществ и пищевых добавок.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Ефременкова О.В., Тихонова О.В., Ершова Е.Ю. и др. Антимикробные свойства базидиального гриба *Laetiporus sulphureus* в условиях глубинного культивирования // Успехи медицинской микологии. – 2006. – Т. 7. – С. 280-282.
2. Тихонова О.В., Лурье Л.М., Ершова Е.Ю. и др. Изучение глубинной культуры *Laetiporus sulphureus* (Fr) Bond, et Sing. – М.: Национальная академия микологии. – 2002. – С. 257.
3. Turkoglu A., Duru M.E., Mercan N., et al. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill

- // Food Chemistry. – 2007 – Vol. 101, №1. – P. 267-273.
4. *Феофилова Е.П., Терешина В.М., Меморская А.С.* Достижения и проблемы новой области биотехнологии: получение медицинских препаратов на основе биологически активных веществ мицелиальных грибов // *Успехи медицинской микологии.* – 2001. – Т. 1. – С. 254-256.
 5. *Ким И.В.* Антиоксидантная активность ЗЦМ // *Молочная промышленность.* – 2011. – №4. – С. 81.
 6. *Капич А.Н., Гвоздкова Т.С., Квачева З.Б. и др.* Антиоксидантные, радиозащитные и противовирусные свойства экстрактов мицелия гриба *Laetiporus sulphureus* в условиях глубинного культивирования // *Успехи медицинской микологии.* – 2004. – Т. 3. – С. 146-148.
 7. *Теплякова Т.В., Косогова Т.А., Мазуркова Н.А. и др.* Ингибитор репродукции вируса гриппа А на основе экстракта базидиального гриба *Laetiporus sulphureus*. Патент № 2475530 С2 РФ. № 2011110826/10. Заявлено 22.03.2011. опубл. 20.02.2013 г. Бюлл. № 12. – 11 с.
 8. *Yoshikawa K., Bando S., Arihara S., et al.* Benzofuran glycoside and acetylenic acid from the fungus *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus*// *A Chem Pharm. Bull.* – 2001. – №3. – P. 327-329.
 9. *Квачева З.Б., Капич А.Н., Вотяков В.И., Николаева С.Н.* Противовирусная активность экстрактов мицелия базидиального гриба *Laetiporus sulphureus* // *Успехи медицинской микологии.* – 2005. – Т. 5. – С. 272-274.
 10. *Капич А.Н.* Новый метод определения антиоксидантной активности // *Успехи медицинской микологии.* 2006. – Т. 7. – С. 243-245.
 11. *Daba A.S., Ezeronye O.U.* Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms // *African J. of Biotechnol.* - 2003. - Vol. 2. - P. 672-678.
 12. *Hwang H.S., Hak Lee Sung, Yu Mi Baek.* Production of extracellular polysaccharides by submerged mycelial culture of *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus* and their insulinotropic properties// *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2008. – P. 419-429.
 13. *Linder D.L., Banik M.T.* Molecular phylogeny of *Laetiporus* and other brown rot polypore genera in North America // *Mycologia.* - 2008.- Vol. 100, №3. - P. 417-430.
 14. *Громовых Т.И., Иванова И.Е., Торкова А.А.* Культивирование мицелия штаммов *Laetiporus sulphureus* для получения кормовой добавки для птиц // *Вестник РАСХН.* – 2012. – №6. – С. 53-55.
 15. *Ушанова В.М., Ченцова А.И., Шайхутдинова М.Н. и др.* Массообменные процессы: учеб. пособие. – Красноярск, 2004. – Ч. 1. – 207 с.
 16. *Черемных Е.Г., Симбирева Е.И.* Инфузории пробуют пищу // *Химия жизни.* – 2009. – №1. – С. 28-31.
 17. *Черемных Е.Г.* Применение в токсикологических исследованиях автоматического прибора биотестирования // *Партнеры и конкуренты.* – 2003. – №11.

Поступила в редакцию журнала 15.09.2013

Рецензент: Т.В. Теплякова



ИОНЫ ЖЕЛЕЗА И ГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ *CANDIDA* *ALBICANS*

¹Леонов В.В. (доцент кафедры)*,
²Курлович Н.А. (зав. клинико-
диагностическим отделением),
¹Соколова Т.Н. (доцент кафедры),
³Тимохина Т.Х. (зав. кафедрой),
⁴Фатеева Н.М. (профессор кафедры)

¹ ГБОУ ВПО ХМАО-ЮГРЫ Ханты-Мансийская государственная медицинская академия (кафедра биологии с курсом микробиологии), Ханты-Мансийск; ²Консультативно-диагностическая поликлиника им. Е.М. Нигинского, Тюмень, ³ ГБОУ ВПО Тюменская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития (кафедра микробиологии), Тюмень, ⁴ ГБОУ ВПО Тюменский государственный университет (кафедра медико-биологических дисциплин и безопасной жизнедеятельности), Тюмень, Россия

© Коллектив авторов, 2013

Установлено, что гемолитическая активность и активность фосфолипазы *Candida albicans* зависят от содержания ионов железа в питательной среде. Наличие в среде ионов Fe^{2+} в концентрации 4 мкМ индуцирует гемолитическую активность *C. albicans* и увеличивает активность фосфолипазы *C.* Избыточная концентрация ионов Fe^{2+} 50 мкМ уменьшает гемолитическую активность и активность фосфолипазы *C.* Выявленные эффекты железозависимости гемолитической активности и активности фосфолипазы *C.* можно рассматривать как важный инфектологический механизм, определяющий исход взаимодействия *C. albicans* с организмом хозяина.

Ключевые слова: гемолизины, гемолитическая активность, ионы железа, *Candida albicans*, фосфолипаза *C*

IRON IONS AND HAEMOLYTIC ACTIVITY OF *CANDIDA ALBICANS*

¹Leonov V.V. (associated professor of the chair), ²Kurlovich N.A. (head of the department of clinical and diagnostic), ¹Sokolova T.N. (associated professor of the chair), ³Timokhina T.H. (head of the chair), ⁴Fateeva N.M. (professor of the chair)

¹Khanty-Mansiysk State Medical Academy (chair of biology with a course of microbiology); ²Consultative-Diagnostic Polyclinic named after E.M. Niginsky,

* Контактное лицо: Леонов Вадим Вячеславович, тел. (3467) 393-442

Tyumen; ³Tyumen State Medical Academy (chair of microbiology); ⁴Tyumen State University (chair of biomedical disciplines and life safety), Russia

© Collective of authors, 2013

It has been found that the haemolytic activity of the phospholipase *C* activity and *C. albicans* depends on the iron ions content in the medium. The presence in the environment of Fe^{2+} ions at a concentration of 4 μ M induces haemolytic activity of *C. albicans* and increases the activity of phospholipase *C.* The excess concentration of Fe^{2+} ions 50 μ M reduced the haemolytic activity and the activity of phospholipase *C.* Identified effects of haemolytic activity and the activity of phospholipase *C* depending on iron ions can be considered as an important infectological mechanism which determines the outcome of the interaction between *C. albicans* with a host organism.

Key words: *Candida albicans*, haemolysins, haemolytic activity, iron ions, phospholipase *C*

В научной литературе активно обсуждают роль гемолизина как «микробных стратегий добычи» железа. С одной стороны, гемолизины могут являться важным фактором вирулентности, приводя к разрушению клеток организма хозяина, с другой стороны, гемолизины можно рассматривать как микробную стратегию добычи ионов железа из гемоглобина разрушенных эритроцитов. Исходя из известных фактов о роли железа как универсального регулятора вирулентности, вполне логично предположить, что синтез гемолизина микроорганизмами является железозависимым. Однако сведения в литературе о влиянии ионов железа на экскрецию гемолизина ограничиваются данными по менингококкам и холерным вибрионам [1, 2].

Интересным объектом для такого исследования является оппортунистический патоген *Candida* spp. В литературе практически отсутствует информация о патогенетической роли гемолитической активности *Candida* spp. в развитии инфекционных заболеваний, и, в целом, ее существование вызывает много споров, за некоторым исключением (Елинов Н.П. «Патогенные дрожжеподобные микроорганизмы, 1964 г. и «Химическая микробиология», 1989 г.).

Считали, что гемолизин является важным фактором патогенности *C. albicans*, обуславливающим патогенез кандидоза, так как его секреция сопровождается интенсивным гиообразованием. Однако зависимость гемолитической активности от гиообразования не была подтверждена в опытах на гиоотрицательном виде *C. glabrata* (Odds F.C. London: Bailliere Tindall, 1998).

В исследовании гемолитической активности на кровяном агаре показано, что *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. zeylanoides*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* и *C. lusitaniae* после 24 часов инкубации приводят к α -, а через 48 ч – к β -гемолизу эритроцитов. По данным Luo G. с соавторами (2001), *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. rugosa* и *C. utilis*, даже после 48 ч, давали только β -гемолиз, что позволило предположить наличие у *Candida* spp. двух гемолитических субстанций. Однако природа гемолизина так и не была выяснена. Danley D.L., et al (1983) высказывали предположение, что причиной α -гемолиза

является перекись водорода, а Watanabe T., et al (1999), что причиной б-гемолиза – маннопротеин клеточной стенки. Однако, по данным Luo G. с соавторами (2001), 6 из 14 видов *Candida* spp., протестированных на наличие б-гемолитической активности, не дали характерных б-гемолитических зон на кровяном агаре, хотя маннопротеин является обязательным компонентом клеточной стенки *Candida* spp.

Цель настоящей работы – изучение влияния ионов Fe^{2+} на гемолитическую активность *C. albicans*. Проведение подобного исследования важно для понимания природы гемолитической активности *C. albicans* и ее инфектологических функций в организме хозяина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные исследования проводили с использованием эталонного штамма *C. albicans* ATCC 24433 и 2 штаммов, выделенных из крови (9708) и кишечника (147) больных ОКБ г. Ханты-Мансийска.

Все растворы и питательные среды готовили на деионизированной воде. Изучение влияния ионов Fe^{2+} на гемолитическую активность (ГА) и активность фосфолипазы С (A_{plc}) *C. albicans* выполняли на железодефицитной питательной среде (ЖДС), приготовленной на основе бульона Сабуро (НПО «Питательные среды», г. Махачкала) на основании «Справочника биохимика» (Досон Р, Эллиот Д. и др. – М.: Мир, 1991). Содержание железа в исходной ЖДС принимали равным нулю. Эксперимент проводили при следующих концентрациях ионов Fe^{2+} – 0; 4,0 (оптимальная для роста) и 50,0 мкМ (избыточная), которые вносили в питательную среду в виде сульфата железа (II).

ГА определяли с помощью фотоэлектроколориметрического метода через 0; 6; 12; 24; 48 и 72 ч сокультивирования *C. albicans* с эритроцитами человека 0 (I) группы Rh (+) при определенной концентрации ионов Fe^{2+} [3].

A_{plc} выявляли с применением метода кислотно-основного титрования по количеству кислот, образующихся в результате гидролиза лецитина [4]. В 20 мл стерильной ЖДС вносили железа сульфит (II) до требуемой концентрации, 0,1 мл 0,6% раствора кальция хлорида, раствор лецитина до конечной концентрации 5% и 0,1 мл микробной взвеси в физиологическом растворе (0,500-0,510 опт. ед.). В контрольные пробирки вместо раствора железа сульфита (II) вносили стерильный физиологический раствор. Посевы культивировали при 37 °С в течение 48 ч, добавляли 5 мл 95% раствора этанола для остановки реакции, центрифугировали 15 мин при 3000 g, полученные супернатанты титровали из микробюретки 0,002М раствором натрия гидроксида в присутствии 1% раствора фенолфталеина в качестве индикатора. A_{plc} рассчитывали по формуле:

$$A_{plc} = V_0 - V_k,$$

где A_{plc} – активность фосфолипазы С, ЕД; V_0 и V_k – объемы щелочи (мл), используемой для титрования опытной и контрольной проб соответственно.

Все результаты обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По характеру действия можно выделить три типа гемолизинов микроорганизмов – порообразующие, поверхностно-активные и ферментативные (Welch R.A., 1991). К порообразующим гемолизинам относят микробные токсины, которые формируют посредством вставки в плазматическую мембрану хозяина трансмембранные поры (каналы), приводящие клетку к лизису (Tablot J.A., et al., 1991). К поверхностно-активным гемолизинам относят вещества, продуцируемые микроорганизмами, способные встраиваться и дезинтегрировать клеточную мембрану. Этот тип гемолизинов является веществами – детергентами, не имеющими избирательного механизма действия. К ферментативным гемолизинам относят ферменты, которые повреждают фосфолипидный бислой в мембране клеток хозяина. Субстратом при этом часто служит фосфолипид лецитин (фосфатидилхолин), такие ферменты называют лецитиназами или фосфолипазами С. Таким образом, суммарная ГА, выявляемая на кровяном агаре, является кажущейся, так как представляет результат действия разных типов гемолитических субстанций. Поэтому на первом этапе исследования была определена суммарная ГА испытуемых штаммов *C. albicans* в зависимости от концентрации ионов Fe^{2+} в питательной среде. Все использованные для нашего эксперимента штаммы *C. albicans* не давали зоны гемолиза при культивировании в течение 48 ч на 5% кровяном агаре Сабуро.

На рисунках 1 и 2 приведены кривые гемолиза для штаммов *C. albicans* 24433 и 147 при разных концентрациях ионов Fe^{2+} соответственно.

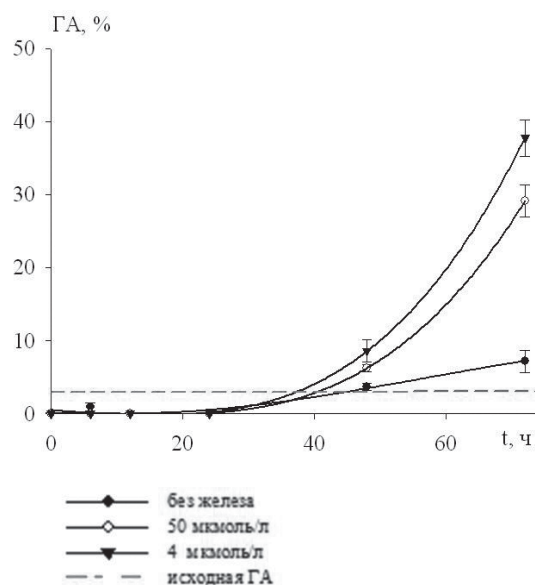


Рис. 1. Кривые гемолиза для штамма *C. albicans* ATCC 24433 при различных концентрациях ионов Fe^{2+}

Как видно из рисунка 1, для штамма 24433, при отсутствии ионов Fe^{2+} в питательной среде, уровень ГА практически не изменялся до 48 ч инкубации и соответствовал 2,0%. Добавление в питательную среду ионов Fe^{2+} до концентрации 4 мкМ приводило к существенному увеличению ГА по сравнению с контролем. Максимальная ГА, выявленная через 72 ч инкубации, составила 38%. Избыточная концентрация ионов Fe^{2+} 50 мкМ приводила к снижению ГА до 29%. Для штамма *C. albicans* 147, выделенного из кишечника, наблюдали аналогичную тенденцию (Рис.2), однако, даже после 72 ч инкубации в ЖДС, уровень ГА достоверно не отличался от контрольного. Максимальная ГА, установленная через 72 ч культивирования при концентрации ионов Fe^{2+} 4 мкМ, составила 24,0%.

Для штамма *C. albicans* 9708, выделенного из крови, также как и для 24433 и 147, ионы Fe^{2+} в концентрации 4 мкМ индуцировали ГА. Максимальная ГА, наблюдаемая через 72 ч культивирования, составила 33%. Избыточная концентрация ионов Fe^{2+} 50 мкМ приводила к снижению ГА до 24%.

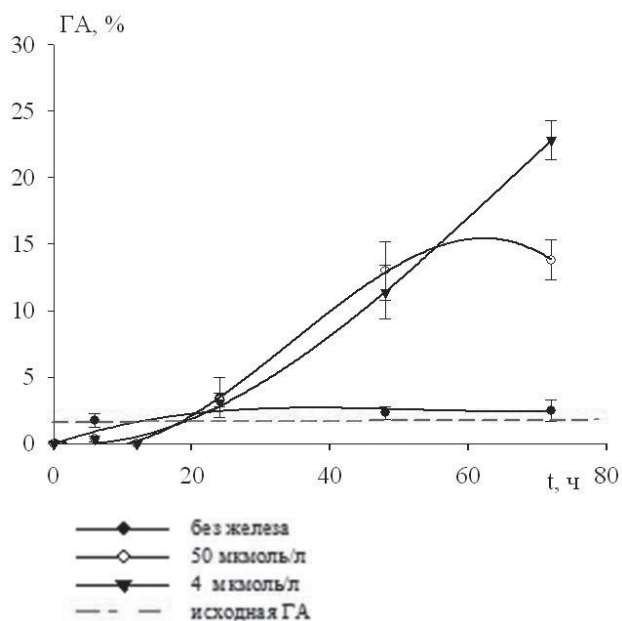


Рис 2. Кривые гемолита для штамма *C. albicans* 147 при различных концентрациях ионов Fe^{2+}

При сравнительном анализе полученных результатов обнаружили, что при культивировании эталонного штамма *C. albicans* ATCC 24433 и штаммов, выделенных из крови и кишечника на ЖДС, уровень ГА практически не отличается от контрольного. Увеличение концентрации ионов Fe^{2+} до 4 мкМ индуцирует ГА эталонного штамма 24433 через 48 ч культивирования, а штаммов 147 и 9708 – через 24 ч культивирования. Избыточная концентрация ионов Fe^{2+} 50 мкМ приводит к ингибированию ГА всех исследованных штаммов *C. albicans*. Таким образом, добавление в питательную среду ионов Fe^{2+} индуцирует ГА, исследованных нами штаммов *C. albicans*, которые изначально были отнесены нами к негемолитическим.

На втором этапе исследования для понимания природы железозависимых гемолитических субстанций провели определение A_{plc} в зависимости от концентрации железа. Результаты приведены в таблице.

Таблица

Результаты определения активности фосфолипазы *C. albicans* при разных концентрациях ионов Fe^{2+} ($[Fe^{2+}]$)

Штамм <i>C. albicans</i>	Активность фосфолипазы <i>C. albicans</i> , ЕД		
	$[Fe^{2+}] = 0$ мкМ	$[Fe^{2+}] = 4$ мкМ	$[Fe^{2+}] = 50$ мкМ
24433	0,15±0,01	0,64±0,03	0,53±0,03
147	0,15±0,03	0,44±0,03	0,22±0,04
9708	0,18±0,02	0,93±0,02	0,25±0,01

Исходный уровень A_{plc} штаммов *C. albicans*, выращенных на бульоне Сабуро, приготовленном стандартным способом, составлял 0,16-0,20 ЕД. При выращивании штаммов *C. albicans* на ЖДС без добавления ионов Fe^{2+} A_{plc} достоверно не отличалась от исходной A_{plc} . Добавление ионов Fe^{2+} до концентрации 4 мкМ приводило к увеличению A_{plc} в 4,3 (24433), 2,9 (147) и 5,1 раз (9708), а дальнейшее увеличение концентрации ионов Fe^{2+} до 50 мкМ – к уменьшению A_{plc} клинических штаммов *C. albicans* в 2,0 (147) и 3,7 раз (9708); A_{plc} эталонного штамма 24433 уменьшалась лишь в 1,2 раза. При сопоставлении результатов проведенных экспериментов выявили, что тенденции в изменении ГА и A_{plc} , в зависимости от содержания ионов Fe^{2+} в питательной среде, совпадают. При дефиците железа ГА и A_{plc} не проявляется или имеет минимальные значения. При оптимальной для роста концентрации ионов Fe^{2+} – 4 мкМ ГА и A_{plc} достигает максимального значения и при избыточной концентрации ионов Fe^{2+} – 50 мкМ ГА и A_{plc} ингибируется или не изменяется с течением времени.

Согласно полученным результатам можно предположить, что единственной гемолитической субстанцией *Candida* spp. является фосфолипаза *C. albicans*. Действительно, в геноме *C. albicans* обнаружили семь фосфолипазных генов (*pla*, *plb1*, *plb2*, *plc1*, *plc2*, *plc3* и *pld1*), только четыре из них хорошо изучены и описаны (*plb1*, *plb2*, *plc* и *pld1*) [5, 6], роль остальных в патогенезе кандидозов остается неясной. Очевидно, что транскрипция фосфолипазных генов, ответственных за синтез гемолитически активной фосфолипазы, происходит в определенных условиях окружающей среды и зависит от концентрации ионов Fe^{2+} .

Выявленные закономерности можно использовать для объяснения инфектологических функций ГА в зависимости от условий существования. Гомеостаз железа в организме человека направлен на лишение микроорганизмов доступного для усвоения железа, что необходимо для сдерживания их патогенного потенциала. Нарушения в гомеостазе железа, приводящие к избыточному накоплению железа или появлению в окружающей среде доступного для усвоения железа, очевидно, способствуют проявлению вирулентности оппортунистических патогенов. В связи с этим выявленный эффект железозависимости A_{plc} можно рассматривать как важный инфекто-

логический механизм, определяющий исход взаимодействия *Candida* с организмом хозяина.

можно рекомендовать для определения ГА *C. albicans* традиционным методом использовать кровяной агар Сабуро с добавлением экзогенного железа не ниже 4 мкМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных нами результатов,

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. *Меньшикова Е.А., Миронова А.В., Подосинникова Л.С. и др.* Роль ионов железа в продукции гемолизина токсигенными и нетоксигенными холерными вибрионами различных серогрупп // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии – 2004. – №3. – С. 78-81.
2. *Баснакьян И.А.* Стресс у бактерий. – М.: Медицина, 2003. – 136 с.
3. *Леонов В.В., Костерина В.В., Варницына В.В. и др.* Железозависимый синтез гемолизинов *Staphylococcus aureus* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – Т.153, №1. – С. 49-51.
4. *Сулотов С.Н., Журавлева Т.Д.* Адаптация человека к авиаполетам. Липопероксидация в эритроцитах и ее регуляция. Методы лабораторной диагностики. – Тюмень: ООО «Печатник», 2009. – 104 с.
5. *Samaranayake Y.H., Dassanayake R.S., Cheung B.P.K., et al.* Differential phospholipase gene expression by *Candida albicans* in artificial media and cultured human oral epithelium // APMIS. – 2006. – Vol. 114, №12. – P. 857-866.
6. *Tsang C.S.P., Chu F.C.S., Leung W.K., et al.* Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus // J. of Medical Microbiology. – 2007. – Vol. 56, №10 – P. 1393-1398.

Поступила в редакцию журнала 15.10.2013

Рецензент: О.В. Аак



СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИБИОТИКОРЕЗИС- ТЕНТНОСТИ НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА И ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ

¹Оришак Е.А. (доцент кафедры)*, ²Щеглов В.С. (зав. бак. отд.), ¹Нилова Л.Ю. (старший преподаватель кафедры)

¹ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (кафедра медицинской микробиологии); ² ЗАО «Ситилаб», Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2013

С использованием метода серийных разведений определены минимальные ингибирующие концентрации (МИК) 16 антибактериальных препаратов в отношении 147 штаммов лактобацилл и 114 штаммов энтерококков, выделенных из кишечника людей, и 52 пробиотических штаммов. Провели сравнение МИК₅₀ и МИК₉₀ антибактериальных препаратов в отношении пробиотических штаммов и штаммов микробиоты кишечника.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, метод серийных разведений, минимальная ингибирующая концентрация (МИК), пробиотики

THE COMPARATIVE CHARACTERISTIC OF ANTIBIOTIC RESISTANCE OF SOME REPRESENTATIVES OF THE INTESTINAL MICROBIOTA AND PROBIOTIC STRAINS

¹Orishak E.A. (associate professor), ²Shcheglov V.S. (head of bacteriological department), ¹Nilova L.Ju. (senior teacher of the chair)

¹ North-Western Medical University named after I.I. Mechnikov (Chair of Medical Microbiology); ² ЗАО «CITILAB», St. Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2013

* Контактное лицо: Оришак Елена Александровна, тел. (812) 543-19-20

Using the serial dilutions method were determined the minimal inhibitory concentrations (MIC) of 16 antibacterial preparations against 147 strains of lactobacilli and 114 enterococci strains, isolated from the human intestines, and 52 probiotic strains. We have compared MIC₅₀ and MIC₉₀ of antibacterial preparations in respect of probiotic strains and strains of microbiota of intestine.

Key words: antibiotic resistance, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, MIC, probiotics, serial dilution method

ВВЕДЕНИЕ

Бесконтрольное применение антимикробных препаратов в последние десятилетия привело к быстрым темпам роста устойчивости микроорганизмов к антибактериальным препаратам (АБП). В связи со снижением эффективности антибиотиков и химиопрепаратов, а также увеличением частоты побочных реакций при использовании антибиотиков широкого спектра, включая развитие дисбиозов и диарей, большой интерес у специалистов вызывает применение пробиотиков для коррекции дисбиозов, лечения кишечных инфекций и антибиотикоассоциированных диарей [1, 2]. Одним из достоинств данной группы препаратов является антибиотикорезистентность входящих в их состав пробиотических штаммов и возможность, в случае необходимости, совместного применения антибиотиков и пробиотиков [3]. Однако в отдельных публикациях авторы высказывают настороженное отношение к подобному применению пробиотических штаммов и озабоченность возможной ролью молочнокислых бактерий в распространении генов лекарственной устойчивости как при конъюгации, так и другими механизмами (трансформацией или трансдукцией), которые трудны для изучения в контролируемых лабораторных условиях [4]. Известны исследования, в которых зафиксированы наличие и экспрессия генов вирулентности и/или генов устойчивости к антибиотикам, находящихся на мобильных генетических элементах (конъюгативных плазмидах и транспозонах) лактобацилл, используемых в пищевых продуктах [5-7]. Применение полирезистентных штаммов может способствовать распространению антибиотикорезистентности среди индигенных микроорганизмов биоценоза кишечника, условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, попадающих в кишечный биотоп. Известно, что лактобациллы, выделяемые от детей грудного возраста, имеют от 8 до 15 маркеров резистентности [8]. Доказана возможность передачи R-плазмид от диких и пробиотических культур *Lactobacillus* spp. различным видам грамположительных бактерий в условиях *in vitro* и *in vivo*, а также возможность обмена генами резистентности между грамположительными и грамотрицательными микроорганизмами [9-12]. В работах, проводимых в данном направлении, до настоящего момента не дан однозначный ответ на вопрос о безопасности штаммов, применяемых в фармацевтической и пищевой промышленности. Описано изучение антибиотикорезистентности 187 культур, выделенных из различных йогуртов, производимых в 8 странах Европейского Союза, при этом

68,4% штаммов характеризовались множественной лекарственной устойчивостью [13]. В связи с важностью данной проблемы, был создан специальный проект ЕС «Biosafety Evaluation of Probiotic Lactic Acid Bacteria Used for Human Consumption». В рамках этого проекта было изучено 473 штамма родов *Lactobacillus* и *Pediosoccus*, однако прямых доказательств конъюгативной передачи генов резистентности к антимикробным препаратам получено не было [4]. Несмотря на многолетний опыт использования пробиотических штаммов, значительный объем имеющейся информации о свойствах бифидобактерий и лактобацилл, вопросы о вероятности передачи генов резистентности в условиях биотопа кишечника и безопасности пробиотических штаммов, с точки зрения распространения генов антибиотикорезистентности, остаются не вполне изученными. Сопоставление устойчивости к антибактериальным препаратам микроорганизмов кишечного биоценоза и пробиотических штаммов является важной информацией для оценки их значения как резервуара генов резистентности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для оценки частоты встречаемости устойчивых к антибактериальным препаратам штаммов среди индигенных представителей кишечной микробиоты и пробиотических штаммов, протестировали 314 штаммов микроорганизмов, в том числе: выделенных из фекалий (лактобацилл – 147 и энтерококков – 114) и выделенных из пробиотических препаратов (лактобацилл – 27, бифидобактерий – 22 и энтерококков – 3). Определяли антимикробную активность в отношении штаммов лактобацилл и бифидобактерий следующих антибактериальных препаратов (АБП): бензилпенициллина, ампициллина, цефтриаксона, цефтазидима, канамицина, амикацина, цефазолина, азтреонама, тетрациклина, ванкомицина, гентамицина, стрептомицина, линкомицина, офлоксацина, ципрофлоксацина, фурадонина. Использовали метод серийных разведений в агаре с диапазоном концентраций от 0,015 мкг/мл до 128 мкг/мл с последующим определением минимальной ингибирующей концентрации (МИК), а также МИК₅₀ (для 50% исследованных штаммов) и МИК₉₀ (для 90%). Определение категорий чувствительности на основании полученных МИК выполняли в соответствии с рекомендациями European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2013) [14], а штаммов бифидобактерий – в соответствии с разделом «Gram-positive anaerobes except *Clostridium difficile*». В данном руководстве отсутствует раздел интерпретации МИК и зон задержки роста штаммов *Lactobacillus*, поэтому результаты интерпретировали согласно разделу «Non-species related breakpoints». Интерпретацию результатов тестирования к антибактериальным препаратам, отсутствующим в этом разделе, проводили на основании значений МИК, одинаковых для различных групп микроорганизмов.

Таким образом, штаммы лактобацилл и бифидобактерий рассматривали как устойчивые при значениях МИК: для офлоксацина и ципрофлоксацина – более 1 мкг/мл, для бензилпенициллина, цефазолина, цефотаксима, цефтриаксона и тетрациклина – более 2 мкг/мл, для ванкомицина, гентамицина, стрептомицина, канамицина и линкомицина – более 4 мкг/мл, для ампициллина и азтреонама – более 8 мкг/мл, амикацина – более 16 мкг/мл, для фурадонина – более 64 мкг/мл. Рассчитывали долю устойчивых штаммов и ошибку доли.

Антимикробную активность антибиотиков в отношении энтерококков определяли на микробиологическом анализаторе VITEK 2 Compact bioMérieux® (Франция) с использованием карт VITEK® 2 Antimicrobial Susceptibility Tests (AST) с установлением МИК, категорий чувствительности, МИК₅₀ и МИК₉₀, а также маркировкой генов и ферментов антибиотикорезистентности в соответствии с фенотипом резистентности каждого штамма. Результаты интерпретировали согласно European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2013) [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Интерпретация результатов определения резистентности лакто- и бифидобактерий к АБП сопряжена с определенными трудностями. Многочисленные противоречия в отношении оценки частоты находок антибиотикорезистентных штаммов лактобацилл могут быть обусловлены как естественными причинами, так и методическими – отсутствием стандартных методов тестирования и общепризнанных пограничных значений МИК.

В научной литературе представлены данные, значительно различающиеся в значениях МИК₅₀ для антибактериальных препаратов в отношении бифидобактерий. Так, по данным разных авторов, МИК₅₀ для тетрациклина составляет от 2 мкг/мл до 32 мкг/мл, по нашим данным – 8 мкг/мл; для ампициллина – от 0,06 мкг/мл до 2 мкг/мл, по нашим данным – 2 мкг/мл (табл. 1, 2).

Таблица 1

Резистентность бифидобактерий, выделенных из пищевых продуктов и пробиотических препаратов (по данным из научной литературы)

АБП	Диапазон МИК мкг/мл	МИК ₅₀ , мкг/мл	МИК ₉₀ , мкг/мл
Бензилпенициллин	0,01-0,5 ^[15]	0,01	0,5
Ампициллин	1-2 ^[15]	2	2
	0,06-1 ^[16]	0,06	0,25
Цефазолин	н.д.	н.д.	н.д.
Цефтриаксон	0,06-4 ^[16]	0,125	0,5
Цефотаксим	н.д.	н.д.	н.д.
Азтреонам	128-1000 ^[15]	1000	1000
	0,25-1 ^[16]	0,5	1
Ванкомицин	≤0,125-1 ^[11]	н.д.	0,25
	0,25-2 ^[17]	0,5	1
	16-32 ^[15]	32	32
Тетрациклин	0,5-64 ^[17]	2	16
	0,5-32 ^[11]	н.д.	н.д.
Стрептомицин	32-64 ^[15]	64	64
Гентамицин	64-128 ^[15]	64	128

Амикацин	н.д.	н.д.	н.д.
Канамицин	500-1000 ^[15]	500	1000
Линкомицин	0,5-2 ^[15]	1	1
Офлоксацин	н.д.	н.д.	н.д.
Ципрофлоксацин	1-16 ^[11]	н.д.	н.д.
Фурадонин	н.д.	н.д.	н.д.

Примечание: АБП – антибактериальные препараты; н.д. – нет данных.

Данные, полученные нами при тестировании пробиотических штаммов бифидобактерий, представлены в таблице 2.

Таблица 2

МИК антибактериальных препаратов в отношении пробиотических штаммов *Bifidobacterium* spp. (мкг/мл)

АБП	Диапазон МИК	МИК ₅₀	МИК ₉₀
Бензилпенициллин	0,015 -> 128	8	> 128
Ампициллин	0,06 -> 128	2	> 128
Цефазолин	0,015 -> 128	64	> 128
Цефтриаксон	0,015 - 128	> 128	> 128
Цефотаксим	0,03 -> 128	64	> 128
Азтреонам	0,015 -> 128	64	> 128
Ванкомицин	0,03 -> 128	> 128	> 128
Тетрациклин	0,015 -> 128	8	128
Стрептомицин	0,015 -> 128	16	128
Гентамицин	0,03 -> 32	0,5	8
Амикацин	0,015 -> 128	32	> 128
Канамицин	0,015 - 128	32	128
Линкомицин	0,015 -> 128	8	64
Офлоксацин	0,06 - 32	8	16
Ципрофлоксацин	0,015 -> 128	8	> 128
Фурадонин	0,06 -> 128	128	> 128

МИК бензилпенициллина более 2 мкг/мл, при которой тестируемые штаммы бифидобактерий рассматривали как устойчивые, была определена для 72,8±4,5% изолятов (Рис. 1).

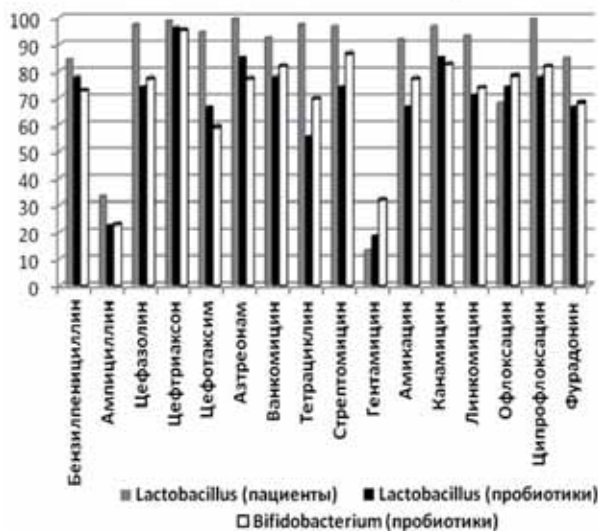


Рис. 1. Частота встречаемости устойчивых штаммов лактобацилл, выделенных из фекалий, и пробиотических штаммов лактобацилл и бифидобактерий (%)

МИК ампициллина более 8 мкг/мл установили у 22,7±4,2% штаммов пробиотических бифидобактерий. МИК цефазолина и цефотаксима более 2 мкг/мл выявили для подавляющего большинства пробиотических штаммов бифидобактерий (табл. 2). МИК цефтриаксона более 2 мкг/мл зарегистрирова-

ли практически у всех тестируемых пробиотических штаммов бифидобактерий, при этом МИК₅₀ и МИК₉₀ совпали. Аналогичный феномен обнаружили в отношении ванкомицина – совпадение значений МИК₅₀ и МИК₉₀, а также устойчивость бифидобактерий к концентрации ванкомицина более 128 мкг/мл.

МИК тетрациклина более 2 мкг/мл отмечали при тестировании 69,6±4,6% пробиотических штаммов бифидобактерий. МИК амикацина более 16 мкг/мл наблюдали у 77,3±4,2% штаммов бифидобактерий. МИК гентамицина 8 мкг/мл была превышена при тестировании 31,9±4,7% пробиотических бифидобактерий. МИК стрептомицина более 4 мкг/мл выявили для 86,6±3,4% пробиотических бифидобактерий. МИК канамицина более 4 мкг/мл установили в отношении 82,6±3,8% пробиотических бифидобактерий.

Для пробиотических изолятов бифидобактерий МИК линкомицина более 8 мкг/мл отмечали для 73,9±4,1% штаммов.

МИК офлоксацина и ципрофлоксацина более 2 мкг/мл наблюдали у 78,3±4,1% и 81,8±3,9% пробиотических бифидобактерий соответственно.

МИК фурадонина более 64 мкг/мл выявили для 68,2±4,7% пробиотических бифидобактерий. Устойчивость к фурадонину была распространена среди протестированных штаммов пробиотических бифидобактерий, с разницей в «один шаг» между МИК₅₀ и МИК₉₀.

Данные о резистентности пробиотических лактобактерий, представленные в научной литературе, существенно различаются, в зависимости от вида тестируемого микроорганизма: например, для бензилпенициллина МИК₅₀ варьирует от 0,01 мкг/мл – у *L. bulgaricus* до 1 мкг/мл – у *L. plantarum* и *L. casei* (табл. 3).

Нами зафиксированы значения МИК₅₀ для бензилпенициллина в отношении штаммов, выделенных из фекалий – 8 мкг/мл, в отношении пробиотических штаммов – 4 мкг/мл (табл.4). В отдельных случаях имеют место полярные значения МИК₅₀. Так, МИК₅₀ для ванкомицина для *L. acidophilus* и *L. bulgaricus* составила 0,5 мкг/мл, для видов *L. plantarum* и *L. reuteri* – 256 мкг/мл, а для вида *L. casei* – 1000 мкг/мл (табл. 3). Мы зафиксировали МИК₅₀ для ванкомицина против тестируемых штаммов лактобацилл >128 мкг/мл (табл.4).

МИК бензилпенициллина более 2 мкг/мл, при которой тестируемые микроорганизмы рассматривали как устойчивые, была определена для 84,4±3,6% штаммов лактобацилл, изолированных из фекалий пациентов и для 77,8±4,2% штаммов пробиотических лактобацилл (Рис. 1). МИК ампициллина более 8 мкг/мл установили у 33,3±4,7% кишечных и 22,2±4,2% штаммов пробиотических лактобацилл. МИК цефазолина более 2 мкг/мл выявили для подавляющего большинства кишечных и пробиотических штаммов лактобацилл – 97,3±1,6% и 74,1±4,4% соответственно, МИК цефотаксима более 8 мкг/мл – для 94,6±2,3% и 66,7±4,7% соответственно, МИК цефтриаксона более

Таблица 3

Резистентность лактобацилл, выделенных из пробиотических препаратов (по данным из научной литературы)

АБП	<i>L. plantarum</i>			<i>L. acidophilus</i>			<i>L. reuteri</i>			<i>L. bulgaricus</i>			<i>L. casei</i>		
	Диапазон МИК мкг/мл	МИК ₅₀	МИК ₉₀	Диапазон МИК мкг/мл	МИК ₅₀	МИК ₉₀	Диапазон МИК мкг/мл	МИК ₅₀	МИК ₉₀	Диапазон МИК мкг/мл	МИК ₅₀	МИК ₉₀	Диапазон МИК мкг/мл	МИК ₅₀	МИК ₉₀
Бензилпенициллин	0,5–2 ^[4]	1	2	≤0,032–0,125 ^[4]	0,125	0,125	0,063–16 ^[4]	1	4	0,01–0,01 ^[15]	0	0	0,01–1 ^[15]	1	1
Ампициллин	0,125–2 ^[4]	0,3	1	0,125–0,5 ^[4]	0	1	0,125–4 ^[4]	1	4	0,5–0,5 ^[15]	0,5	1	2–2 ^[15]	2	2
Цефазолин	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Цефтриаксон	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Цефотаксим	0,125–32 ^[19]	0,3	8	0,25–1 ^[19]	1	1	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Азтреонам	н.д.	н.д.	н.д.	500–1000 ^[15]	500	500	н.д.	н.д.	н.д.	128–256 ^[15]	128	256	1000–1000 ^[15]	1000	1000
Ванкомицин	≥256≥256 ^[4]	≥256	≥256	0,25–0,5 ^[4]	1	1	128–256 ^[4]	256	256	0,5–1 ^[15]	0,5	1	1000–1000 ^[15]	1000	1000
Тетрациклин	0,5–128 ^[19]	8	64	4–16 ^[16]	4	4	н.д.	н.д.	н.д.	16–16 ^[15]	16	16	16–16 ^[15]	16	16
Стрептомицин	4–128 ^[4]	16	32	≤2–8 ^[4]	2	4	≤2–16 ^[4]	4	8	16–64 ^[15]	32	64	16–16 ^[15]	16	16
Гентамицин	≤1–8 ^[4]	1	2	≤1–2 ^[4]	1	2	≤1–1 ^[4]	1	1	4–32 ^[15]	16	32	4–16 ^[15]	4	16
Амикацин	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	4–64 ^[18]	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Канамицин	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Линкомицин	0,125–8 ^[19]	0,5	1	4–8 ^[15]	8	8	н.д.	н.д.	н.д.	0,5–0,5 ^[15]	0,5	1	0,5–1 ^[15]	1	0,5
Офлоксацин	8–32 ^[19]	16	16	8–64 ^[19]	32	32	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Ципрофлоксацин	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Фурадонин	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.

Таблица 4

МИК антибактериальных препаратов в отношении пробиотических штаммов *Lactobacillus* spp. и штаммов *Lactobacillus* spp., выделенных из фекалий (мкг/мл)

АБП	Источники выделенных штаммов	Диапазон МИК	МИК ₅₀	МИК ₉₀
Бензилпенициллин	фекалии пациентов	0,015 - > 128	8	> 128
	пробиотики	0,015 - > 128	4	> 128
Ампициллин	фекалии пациентов	0,015 - 128	2	128
	пробиотики	0,03 - 128	2	32
Цефазолин	фекалии пациентов	0,015 - > 128	128	> 128
	пробиотики	0,03 - > 128	64	> 128
Цефтриаксон	фекалии пациентов	0,06 - > 128	> 128	>128
	пробиотики	0,12 - > 128	> 128	> 128
Цефотаксим	фекалии пациентов	0,015 - > 128	> 128	> 128
	пробиотики	0,03 - > 128	128	> 128
Азтреонам	фекалии пациентов	0,03 - > 128	> 128	> 128
	пробиотики	0,03 - > 128	> 128	> 128
Ванкомицин	фекалии пациентов	0,03 - > 128	>128	> 128
	пробиотики	0,03 - > 128	> 128	> 128
Тетрациклин	фекалии пациентов	0,015 - > 128	64	128
	пробиотики	0,015 - > 128	4	64
Стрептомицин	фекалии пациентов	0,015 - > 128	64	128
	пробиотики	0,015 - > 128	16	128
Гентамицин	фекалии пациентов	0,03 - > 128	1	32
	пробиотики	0,03 - > 128	0,5	4
Амикацин	фекалии пациентов	0,12 - > 128	32	64
	пробиотики	0,015 - > 128	32	> 128
Канамицин	фекалии пациентов	0,015 - > 128	128	> 128
	пробиотики	0,015 - > 128	32	128
Линкомицин	фекалии пациентов	0,015 - > 128	32	> 128
	пробиотики	0,03 - > 128	8	32
Офлоксацин	фекалии пациентов	0,03 - > 128	8	> 128
	пробиотики	0,015 - > 128	8	> 128
Ципрофлоксацин	фекалии пациентов	0,015 - > 128	16	> 128
	пробиотики	0,015 - > 128	8	> 128
Фурадонин	фекалии пациентов	0,06 - > 128	> 128	> 128
	пробиотики	0,06 - > 128	64	> 128

2 мкг/мл – для 98,6±1,2% и 96,3±1,9% соответственно. В большинстве случаев значения МИК₅₀ и МИК₉₀ в отношении цефалоспоринов совпадали либо отличались на один шаг (табл. 4). Принято считать, что те-

сты для определения МИК воспроизводимы в пределах одного двойного разведения реальной конечной точки, т.е. значения МИК с разницей в одно двойное разведение можно считать идентичными. Следова-

тельно, подавляющее большинство тестированных штаммов лактобацилл имеют высокие значения МИК, т.е. присутствует тенденция накопления детерминант резистентности к цефалоспорином среди лактобацилл разного происхождения. Аналогичные результаты отмечали в отношении азтреонама и ванкомицина. Совпадение значений МИК₅₀ и МИК₉₀, а также устойчивость к концентрации данных антибиотиков более 128 мкг/мл указывает на использование в промышленных целях лишь устойчивых к данным антибиотикам штаммов.

МИК тетрациклина более 2 мкг/мл обнаружили при тестировании лактобацилл, выделенных из фекалий, в 97,3±1,6% случаев, пробиотических штаммов – в 55,6±5,0% (Рис. 1). МИК амикацина более 16 мкг/мл выявили для 91,8±2,8% лактобацилл, выделенных из фекалий, и 66,7±4,9% пробиотических лактобацилл. МИК гентамицина 8 мкг/мл была превышена при тестировании 12,9±3,4% штаммов из кишечника и 18,5±3,9% пробиотических лактобацилл. МИК стрептомицина более 4 мкг/мл установили для 96,6±1,8% лактобацилл из кишечника и 74,1±4,4% пробиотических лактобацилл, МИК канамицина более 4 мкг/мл – для 96,6±1,8% и 85,2±3,6% соответственно

В результате определения категорий чувствительности на основании полученных МИК показана значительная частота встречаемости устойчивых штаммов лактобацилл и бифидобактерий (Рис. 1).

МИК линкомицина более 8 мкг/мл наблюдали у 93,2% штаммов из кишечника и 70,8% пробиотических лактобацилл (Рис. 1).

МИК для офлоксацина и цiproфлоксацина более 2 мкг/мл отмечали для большинства тестируемых штаммов. Так, МИК офлоксацина 2 мкг/мл и более определили для 68±4,7% штаммов лактобацилл из кишечника и 74,1±4,1% пробиотических штаммов лактобацилл, а МИК цiproфлоксацина 2 мкг/мл и более – для 99,3±0,8% штаммов из кишечника и 77,8±4,2% пробиотических штаммов лактобацилл. МИК₅₀ – 8-16 мкг/мл и МИК₉₀ – более 128 мкг/мл для фторхинолонов в отношении индигенных микроорганизмов биоценоза кишечника – это показатель передачи генов резистентности в популяции. Данную группу препаратов обычно не назначают пациентам до 18 лет, поэтому фактором распространения резистентности могут являться, по-видимому, некоторые продукты животного происхождения, на что есть указания в литературе [20].

МИК фурадонина более 64 мкг/мл выявили для 85±3,6% лактобацилл из кишечника и 66,7±4,7% пробиотических лактобацилл. Устойчивость к фурадонину была наиболее распространена среди штаммов лактобацилл из кишечника, на что указывает совпадение МИК₅₀ и МИК₉₀, а также среди протестированных штаммов, что обусловлено совпадением МИК₅₀ и МИК₉₀ в группе штаммов, изолированных от пациентов.

Среди лактобацилл, выделенных из кишечника и

пробиотиков, а также среди пробиотических бифидобактерий не установили штаммов, чувствительных ко всем антибактериальным препаратам. Большинство изученных изолятов лактобацилл и бифидобактерий проявляли ассоциативную устойчивость к различным классам антибактериальных препаратов (Рис. 2).

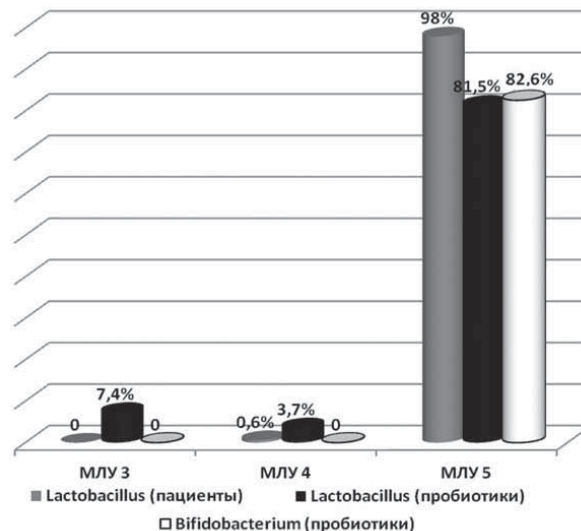


Рис. 2. Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) штаммов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*

При тестировании штаммов лактобацилл разного происхождения обнаружили, что фенотипически выраженная антибиотикорезистентность часто имеет место среди штаммов лактобацилл, выделенных из фекалий, и пробиотических штаммов лактобацилл и бифидобактерий.

В отличие от лактобацилл и бифидобактерий, для создания пробиотических препаратов энтерококки используют сравнительно недавно, в связи с чем количество препаратов, содержащих данный микроорганизм на рынке, ограничено. Вопрос о безопасности таких препаратов широко дискутируют, т.к. энтерококки – нередкий возбудитель гнойно-септических инфекций. Для характеристики спектра антибиотикорезистентности штаммов энтерококков протестировали 114 штаммов *Enterococcus faecium*, выделенных при исследовании на дисбиоз кишечника, из них 74 штамма обладали гемолитической активностью.

При определении МИК антибактериальных препаратов для изолятов *E. faecium*, выделенных от людей, и пробиотических штаммов было выявлено, что МИК₅₀ для хинолонов, линезолида, тейкопланина, ванкомицина, тайгезициклина находились в пределах ≤ 0,12-2 мкг/мл, что свидетельствует о низкой частоте выявления антибиотикорезистентных штаммов *E. faecium* к данным препаратам (табл. 3).

МИК эритромицина, клиндамицина и тетрациклина превышали концентрации, предлагаемые производителем карт «VITEK® 2 AST» (bioMérieux®, Франция), для определения МИК антибиотиков в отношении энтерококков, т.е. составляли >8 мкг/мл для эритромицина и клиндамицина и > 6 мкг/мл –

для тетрациклина. При этом МИК₅₀ и МИК₉₀ для эритромицина, в отношении пробиотических штаммов *E. faecium*, совпадали. МИК₅₀ и МИК₉₀ для клиндамицина были одинаковыми для штаммов, полученных от пациентов и из пробиотиков, что свидетельствует о высоких значениях МИК для подавляющего большинства изученных штаммов *E. faecium* (табл.5).

Таблица 5

МИК для штаммов *E. faecium*, выделенных при обследовании на дисбиоз кишечника и из пробиотиков (мкг/мл)

Антибиотик	источники выделенных штаммов	диапазон МИК	МИК ₅₀	МИК ₉₀
Левифлоксацин	фекалии пациентов	0,12 - 4	1	4
	пробиотики	0,25 - 2	2	2
Моксифлоксацин	фекалии пациентов	0,25 - > 8	0,25	1
	пробиотики	≤ 0,25-05	≤ 0,25	0,5
Эритромицин	фекалии пациентов	0,25 - > 8	1	> 8
	пробиотики	1 - > 8	> 8	> 8
Клиндамицин	фекалии пациентов	0,25 - > 8	> 8	> 8
	пробиотики	≤ 0,2->8	> 8	> 8
Линезолид	фекалии пациентов	1 - > 8	2	4
	пробиотики	2 - > 8	2	> 8
Тейкопланин	фекалии пациентов	≤ 0,5 - 1	≤ 0,5	≤ 0,5
	пробиотики	≤ 0,5 - > 32	≤ 0,5	> 32
Ванкомицин	фекалии пациентов	≤ 0,5 - > 32	1	8
	пробиотики	≤ 0,5 - > 32	1	>32
Тетрациклин	фекалии пациентов	≤ 1 - > 16	> 16	> 16
	пробиотики	≤ 1 - ≤ 1	≤ 1	≤ 1
Тайгегциклин	фекалии пациентов	≤ 0,12 - ≤ 0,12	≤ 0,12	≤ 0,12
	пробиотики	≤ 0,12 - ≤ 0,12	≤ 0,12	≤ 0,12
Нитрофурантоин	фекалии пациентов	≤ 16 - 128	32	128
	пробиотики	≤ 16 - 128	64	128

В целом, уровень резистентности в разных группах штаммов имеет тенденцию к совпадению, что указывает на накопление генов резистентности в популяции. Детерминанты устойчивости к эритромицину, тетрациклину, ванкомицину могут быть локализованы на плазмидах и передаваться не только в пределах семейства *Enterococcaceae*, но и представителям родов *Lactococcus* и *Lactobacillus* [21]. Экспериментально доказана возможность передачи плазмиды резистентности к эритромицину от *Lactobacillus plantarum* к *E. fecalis* в условиях *in vivo* [22].

Кишечник человека колонизирован широким спектром микробиоты, динамично меняющейся в зависимости от возраста, гормонального фона, диеты, состояния здоровья пациентов. Такое разнообразие микроорганизмов представляет собой оптимальные возможности для передачи детерминант резистентности, в качестве резервуара которых может выступать микробиота кишечника человека. Прессингом антибиотиков во всех сферах жизнедеятельности человека инициируется накопление детерминант

резистентности и последующий обмен ими среди представителей индигенных, условно-патогенных и патогенных микроорганизмов. Поскольку уровень резистентности в разных группах штаммов нередко совпадает, это указывает на потенциальный риск передачи генов резистентности представителям микробиоты кишечного биотопа, прежде всего, лактобациллам и бифидобактериям, при контакте с антибиотикорезистентными пробиотическими штаммами. Изучение данной проблемы является важным шагом к разработке критериев безопасности пробиотиков, их применение чрезвычайно широко распространено как при коррекции дисбиотических состояний, так и при лечении кишечных инфекций, что обуславливает искусственное формирование резервуара генов антибиотикорезистентности.

ВЫВОДЫ

1. Выявили устойчивость к бензилпенициллину, цефазолину, цефтриаксону, цефотаксиму, азтреонаму, ванкомицину, тетрациклину, стрептомицину, амикацину, канамицину, линкомицину, ципрофлоксацину, фурадонину у 84% штаммов *Lactobacillus*, выделенных из фекалий; из них 98% штаммов обладали множественной лекарственной устойчивостью к 5 и более группам препаратов. Полученные данные актуальны в случаях назначения антибактериальной терапии при кишечных инфекциях либо коррекции дисбиотических состояний для минимизации отрицательного влияния на микробиоту кишечника пациента.

2. Определили устойчивость к бензилпенициллину, цефазолину, цефтриаксону, азтреонаму, ванкомицину, стрептомицину, канамицину, офлоксацину, ципрофлоксацину у 74% штаммов *Lactobacillus* spp., входящих в состав пробиотических препаратов. Из них доля штаммов, обладающих множественной лекарственной устойчивостью к 5 и более группам препаратов, составила 81%, что означает необходимость дальнейшего изучения пробиотических штаммов *Lactobacillus* spp. с использованием молекулярно-биологических подходов для обоснованного безопасного использования лишь тех штаммов, которые не будут являться потенциальным источником генов трансмиссивной антибиотикорезистентности для микробиоты человека.

3. Доказали устойчивость к бензилпенициллину, цефазолину, цефтриаксону, азтреонаму, ванкомицину, стрептомицину, амикацину, канамицину, линкомицину, офлоксацину, ципрофлоксацину у 73,9% штаммов *Bifidobacterium* spp., входящих в состав пробиотических препаратов. Из них доля штаммов, обладающих множественной лекарственной устойчивостью к 5 и более группам препаратов, составила 83%, что является основанием для поиска мобильных генетических элементов, несущих гены антибиотикорезистентности, с целью дальнейшего безопасного применения пробиотических препаратов.

4. Обнаружили устойчивость штаммов *E. faecium*,

выделенных из кишечника, к клиндамицину (80% штаммов) и тетрациклину (53%). Резистентность к эритромицину отмечали у 35% штаммов *E. faecium*. Полученная информация может быть использована

при назначении антибактериальной терапии с целью щадящего воздействия на микробиоту кишечника пациента.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. McFarland L.V. Alternative treatments for *Clostridium difficile* disease: what really works? // J. of Medical Microbiology. – 2005. – Vol. 54. – P. 101-111.
2. Imhoff A., Karpa K. Is There a future for probiotics in preventing *Clostridium difficile* – associated disease and treatment of recurrent episodes? // Nutr Clin Pract. – 2009. – Vol. 24, № 1. – P. 15-32.
3. Филиппова Е.С., Забокрицкий Н.А., Молдованов А.В. Изучение антибиотикорезистентности некоторых пробиотических штаммов // Биомедицина. – 2010. – №5. – С. 142-144.
4. Klare I, Konstabel C., Werner G., et al. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use // J. of Antimicrob. Chemotherapy. – 2007. – Vol. 59, №5. – P. 900-912.
5. Borriello S.P., Hammes W.P., Holzapfel W., et al. Valtonen safety of probiotics that contain *Lactobacilli* or *Bifidobacteria* // Oxford J. Medicine Clin. Infect. Dis. – 2003. – Vol. 36, № 6. – P. 775-780.
6. Danielsen M., Wind A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents // Int. J. of Food Microbiol. – 2003. – Vol. 82, № 1. – P. 1-11.
7. Gevers D., Danielsen M., Huys G. Jean swings molecular characterization of tet(m) genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – Vol. 69, № 2. – P. 1270-1275.
8. Николаева И.В., Шабанова Н.А., Бондаренко В.М. и др. Видовой состав и антибиотикорезистентность лактобацилл у детей грудного возраста // Журнал микробиол., эпидемиол. и иммунол. – 2010. – № 6. – С. 70-75.
9. Gueimonde M., Salminen S., Isolauri E. Presence of specific antibiotic resistance genes in infant faecal microbiota // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 2006. – № 48. – P. 21-25.
10. Huys G., D'Haene K., Swings J. Genetic basis of tetracycline and minocycline resistance in potentially probiotic *Lactobacillus plantarum* strain CCUG 43738 // Antimicrob. Agents Chemother. – 2006. – № 50, №4. – P. 1550-1551.
11. Masco L., Van Hoorde K., De Brandt E., et al. Antimicrobial susceptibility of *Bifidobacterium* strains from humans, animals and probiotic products // J. of Antimicrob. Chemotherapy. – 2006. – Vol. 58, № 1. – P. 85-94.
12. Nawaz M. E., Wang J., Zhou A., et al. Characterization and transfer of antibiotic resistance in lactic acid bacteria from fermented food products // Curr. Microbiol. – 2011. – Vol. 62, №3. – P. 1081-1089.
13. Temmerman R. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products // Int. J. Food Microbiol. – 2003. – Vol. 25. – P. 1-10.
14. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, Version 3.1, valid from 2013-02-11 [Электронный ресурс]. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints
15. D'Aimmo M.R., Modesto M., Biavati B. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products // Int. J. of Food Microbiol. – 2007. – Vol. 115. – P. 35-42.
16. Citron D.M., Tyrrell K.L., Merriam C.V., Goldstein E.J.C. Comparative in vitro activities of LFF571 against *Clostridium difficile* and 630 other intestinal strains of aerobic and anaerobic bacteria // Antimicrob. Agents Chemother. – 2012. – Vol. 56, №5. – P. 2493-2503.
17. Moubareck C., Gavini F., Vaugien L., et al. Antimicrobial susceptibility of *Bifidobacteria* // J. of Antimicrob. Chemotherapy. – 2005. – Vol. 55, №1. – P. 38-44.
18. Egervärn M. Antibiotic resistance in *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus plantarum* [Электронный ресурс]: http://pub.epsilon.slu.se/2017/1/Acta_Thesis_Egerv%C3%A4rn_090508.pdf.
19. Gfeller K.Y. Molecular analysis of antimicrobial resistance determinants of commensal *Lactobacilli* [Электронный ресурс]: <http://e-collection.library.ethz.ch/eserv/eth:26303/eth-26303-02.pdf>.
20. Qin X., Razia Y., Johnson J.R., et al. Ciprofloxacin-resistant gram-negative bacilli in the fecal microflora of children // Antimicrob. Agents Chemother. – 2006. – Vol. 50. – P. 3325-3329.
21. Werner G., Freitas A.R., Coque T.M., et al. Host range of enterococcal vanA plasmids among Gram-positive intestinal bacteria // J. Antimicrob. Chemother. – 2011. – Vol. 66, №2. – P. 273-82.
22. Feld L., Schjorring S., Hammer K., et al. Selective pressure affects transfer and establishment of a *Lactobacillus plantarum* resistance plasmid in the gastrointestinal environment // J. Antimicrob. Chemother. – 2008. – Vol. 61, №4. – P. 845-52.

Поступила в редакцию журнала 20.11.2013

Рецензент: Е.И. Ермоленко



ВИДОВОЙ СОСТАВ МИКРООРГАНИЗМОВ, ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЕНОК И КОЛОНИЗАЦИЯ ЦЕНТРАЛЬНЫХ ВЕНОЗНЫХ И УРЕТРАЛЬНЫХ КАТЕТЕРОВ

¹Пинегина О.Н. (ассистент кафедры)*,
¹Васильева Н.В., (директор института),
²Сатурнов А.В. (зав. отделением)

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

© Коллектив авторов, 2013

Использование центральных венозных и уретральных катетеров при оказании медицинской помощи сопряжено со значительным риском развития инфекционных осложнений. Микроорганизмы, взаимодействуя с поверхностью катетера, формируют биопленки – сообщества микробных клеток, погруженных во внеклеточный полисахаридный матрикс и проявляющих высокую резистентность к факторам окружающей среды. Изучен видовой состав микроорганизмов, образующих биопленки на центральных венозных и уретральных катетерах, у пациентов в отделениях реанимации и интенсивной терапии.

Ключевые слова: биопленки, *Candida species*, катетер-ассоциированные инфекции

SPECIES COMPOSITION OF MICROORGANISMS, FORMATION OF BIOFILMS AND COLONIZATION OF CENTRAL VENOUS AND URINARY CATHETERS

¹Pinagina O.N. (assistant lecturer of the chair), ¹Vasilyeva N.V. (director of Institute),
²Saturnov A.V. (head of department)

¹ Kashkin Research Institute of Medical Mycology and Chair of Medical Microbiology, North-western State Medical University named after I.I. Mechnikov;
² Leningrad Regional Clinical Hospital, St. Petersburg, Russia

* Контактное лицо: Пинегина Ольга Николаевна, тел.: (812) 303-51-40

© Collective of authors, 2013

The using of central venous and urinary catheters in health care is associated with a significant risk of infectious complications. Microorganisms interacting with catheter surface, form biofilm - communities microbial cells embedded in a matrix of extracellular polysaccharide and exhibiting high resistance to environmental factors. We have studied the species composition of microorganisms that form biofilms in central venous and urinary catheters at patients in intensive care units.

Key words: biofilm, *Candida species*, catheter-associated infections

ВВЕДЕНИЕ

При использовании изделий медицинского назначения, таких как катетеры, шунты, протезы клапаны сердца, трахеостомы и пр., возникают предпосылки для формирования дополнительных экологических ниш для микроорганизмов, способных адгезироваться, вырастать и размножаться на вновь возникших поверхностях. Микроорганизмы в кооперации формируют биопленки – микробные сообщества, относительно изолированные от внешней среды и, как следствие, резистентные к антимикробным агентам [1-8]. Полагают, что 65% всех хронических инфекционных заболеваний человека ассоциированы с биопленками [9, 10].

Использование центральных венозных катетеров связано со значительным риском развития инфекционных осложнений, самыми тяжелыми из которых являются инфекции кровотока. Как правило, они сопряжены с высокой летальностью и значительно увеличивают пребывание пациента в стационаре и рост затрат на его лечение. В соответствии с данными, полученными Европейской группой по сепсису (European Sepsis Group) у пациентов в ОРИТ, 28% катетер-ассоциированных инфекций относят к сепсису, 24% – к тяжелому сепсису, 30% – к септическому шоку [1]. Объединенные в кластеры микроорганизмы, в свою очередь, могут быть причиной септической эмболии, внутрибольничного эндокардита и пр. [11].

Инфекции мочевыводящих путей – наиболее распространенный тип внутрибольничных инфекций, хотя и не сопряженный со столь высокой летальностью, как катетер-ассоциированные инфекции кровотока. В США катетер-ассоциированные инфекции мочевыводящих путей регистрируют у 449 334 пациентов в год [12].

По данным Европейского центра по профилактике и контролю заболеваний (European Center for Disease Prevention and Control), ежегодно у 4 миллионов пациентов в Евросоюзе возникают инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи, и 37 000 из них умирают непосредственно от этих инфекций. Наиболее распространенные типы инфекций: возникающие в ходе хирургических операций, мочевыводящих путей, кровотока, желудочно-кишечные и пневмонии [13].

К сожалению, сведения о катетер-ассоциированных инфекциях в Российской Федерации ограниче-

ны. В стационарах далеко не всегда осуществляют микробиологическое исследование удаленных катетеров, и публикаций, отражающих данные этих исследований, крайне мало. Отчасти это связано с отсутствием нормативной документации, предписывающей адекватную микробиологическую оценку обсемененности катетера, а также интерпретацию результатов посева.

Бережанский Б.В. с соавторами упоминают о прохождении в нашей стране с 2004 г. многоцентрового клинико-микробиологического исследования катетер-ассоциированных инфекций кровотока в отделениях реанимации и интенсивной терапии (CASCAT), посвященного катетер-ассоциированным инфекциям кровотока, согласно которым эти инфекции составили 5,7 случаев на 1000 дней катетеризации, а колонизация центрального венозного катетера (ЦВК) имела место в 16,4% случаев [14].

В связи с этим является актуальным микробиологическое исследование сосудистых и уретральных катетеров (УК), которые удаляли либо по причине отсутствия необходимости в венозном доступе, в ходе плановой замены катетера, либо в случае подозрения на катетер-ассоциированную инфекцию. Особое внимание уделяли выделению грибов, поскольку, на наш взгляд, значение этой группы микроорганизмов часто недооценивают в практической медицине.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование микробной обсемененности фрагмента катетера (сосудистого или уретрального) проводили количественным методом, предложенным Brun-Buisson (1987). Дистальный фрагмент катетера помещали в стерильную пробирку, содержащую 1 мл физиологического раствора. Затем пробирку встряхивали на вортексе «Heidolph» (Германия) в течение 1 минуты; полученную суспензию высевали количественно на кровяной агар и агар Сабуро. Оставшийся материал засеивали в среду накопления на основе триптиказо-соевого бульона (bioMerieux).

Бактерии идентифицировали при помощи анализатора «Vitek 2 Compact» (bioMerieux), а также методом MALDI-ToF-MS на аппарате «Biotyper» (Bruker Daltonik GmbH).

Дрожжи идентифицировали на основании физиологических свойств микромицетов (тест на образование ростковых трубок в сыворотке крови крупного рогатого скота при 37 °С), с помощью тест-системы «Ауксаколор 2» (BioRad), а также методом MALDI-ToF-MS чистую 24 часовую культуру дрожжей (1-3 колонии) суспендировали в 300 мкл деионизированной воды, встряхивали на вортексе в течение 1 минуты, а затем добавляли 900 мкл этанола (95%) и повторно встряхивали на вортексе 1 минуту. Образцы центрифугировали дважды в течение 2 минут при 13000 об/мин и удаляли надосадочную жидкость. Затем к осадку добавляли 50 мкл муравьиной кислоты, тщательно перемешивали и прибавляли 50 мкл аце-

тонитрила. Образцы центрифугировали в течение двух минут при 13000 об/мин. В лунки планшета вносили по 1 мкл надосадочной жидкости, высушивали при 23 °С в течение 5 мин, добавляли 1 мкл матрицы (α -циано-4-гидроксикоричная кислота) и высушивали повторно при тех же условиях. Для идентификации использовали базу данных Biotyper 3.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Было проведено микробиологическое исследование 157 центральных венозных и 60 уретральных катетеров, из которых подавляющее большинство было получено от пациентов, находящихся в отделениях реанимации и интенсивной терапии. Все сосудистые и уретральные катетеры были удалены на 7-10 сутки после установки.

При посеве материала из сосудистых катетеров рост микроорганизмов наблюдали в 39% случаев. Частота встречаемости различных микроорганизмов представлена в таблице 1.

Таблица 1

Частота встречаемости микроорганизмов, выделенных с/из сосудистых катетеров

Группы микроорганизмов	Частота встречаемости (%)	Виды микроорганизмов	Частота встречаемости (%)
Грам (+) бактерии	55,74	Коагулазонегативные стафилококки	31,15%
		<i>Staphylococcus aureus</i>	9,84
		<i>Enterococcus faecalis</i>	8,20
		<i>Enterococcus faecium</i>	1,64
		<i>Micrococcus luteus</i>	1,64
		<i>Bacillus sp.</i>	1,64
		<i>Corynebacterium</i>	1,64
Грам (-) бактерии	27,87	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9,84
		<i>Acinetobacter baumannii</i>	9,84
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,64
		<i>Escherichia coli</i>	3,28
		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1,64
		<i>Delftia acidovorans</i>	1,64
Candida spp	14,75	<i>Candida parapsilosis</i>	4,92
		<i>Candida albicans</i>	3,28
		<i>Candida tropicalis</i>	1,64
		<i>Candida glabrata</i>	1,64
		<i>Candida famata</i>	1,64
Миксты	1,64	<i>Candida parapsilosis</i> + <i>Staphylococcus aureus</i>	1,64

Наиболее часто выделяли коагулазонегативные стафилококки (*S. epidermidis* – в подавляющем большинстве случаев), грамотрицательные палочки (*K. pneumoniae* и *A. baumannii*), энтерококки и *Candida* spp. Эти микроорганизмы могут представлять нормальную микробиоту кожи пациента и медицинского персонала и чаще колонизируют наружную поверхность катетера [15]. Поскольку катетер находится в прямом контакте с кровью, его поверхность быстро покрывается тромбоцитами, плазмой и белками крови – альбумином, фибриногеном, фибронектином и ламинином, что способствует прочной адгезии микроорганизмов и формированию ими биопленки [1, 2].

При посеве УК рост микроорганизмов был получен в 100% случаев (табл. 2).

Таблица 2

Видовой состав микроорганизмов в/на уретральных катетерах

Выделенные микроорганизмы	Частота встречаемости (%)
<i>Candida</i> spp.	30,0
<i>Candida</i> spp. + грамотрицательные бактерии	30,0
<i>Candida</i> spp. + грамположительные бактерии	3,33
Ассоциации <i>Candida</i> spp. и 2-х и более видов бактерий	3,33
Грамотрицательные бактерии (чистая культура одного вида)	8,33
Грамположительные бактерии (чистая культура одного вида)	6,67
Ассоциации 2-х и более видов бактерий	18,33

В более чем 60% случаев с УК выделяли *Candida* spp. в монокультуре или в ассоциации с бактериями (*K. pneumoniae*, *A. baumannii* и др). Этиологическая структура микроорганизмов, выделенных с УК, представлена на рисунках 1-3.

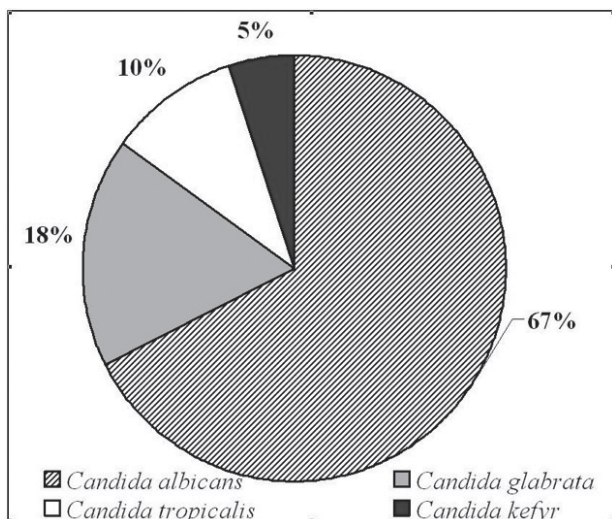


Рис.1. *Candida* spp., выделенные с/из УК

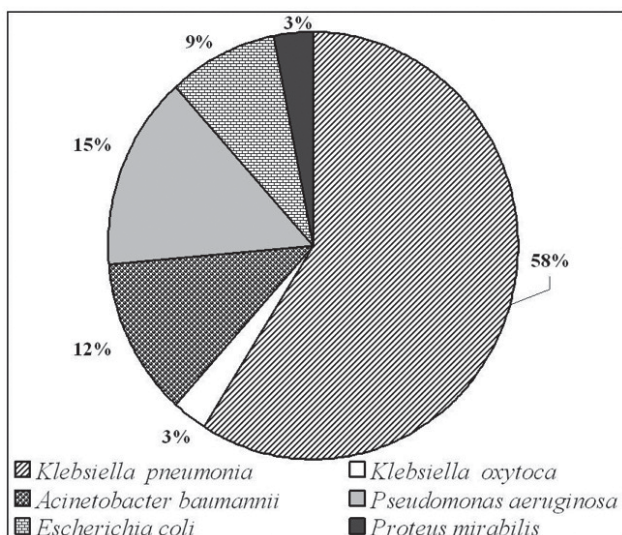


Рис. 2. Грамотрицательные бактерии, выделенные с/из УК

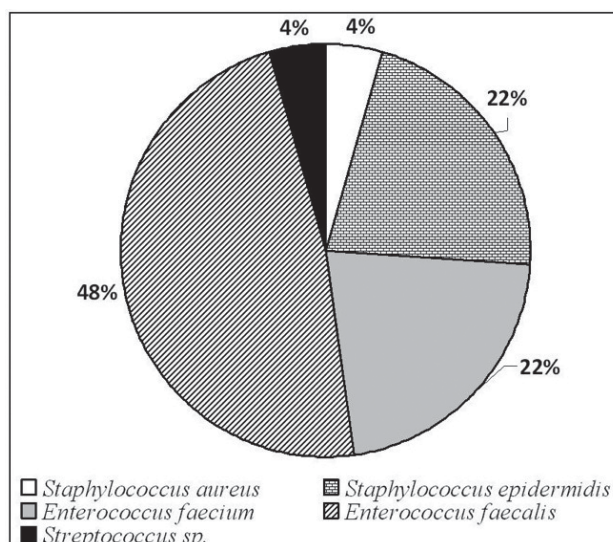
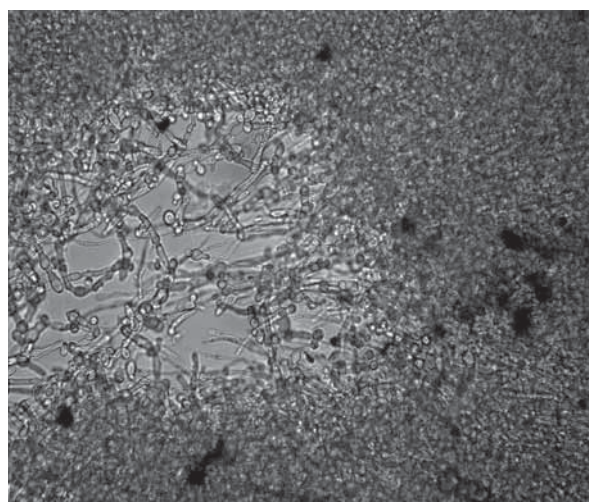


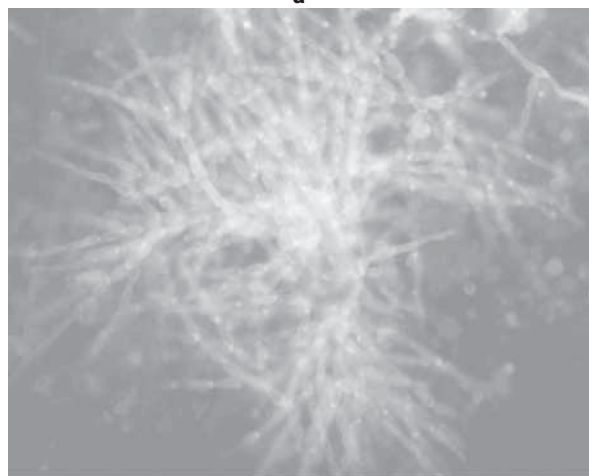
Рис. 3. Грамположительные бактерии, выделенные с/из УК

Отличительной особенностью биопленки на уретральных катетерах является то, что некоторые микроорганизмы могут изменять pH окружающей среды за счет продукции уреазы – фермента, расщепляющего мочевины с образованием свободного аммиака. Аммиак, в свою очередь, повышает pH среды и способствует осаждению минералов, таких как кальций фосфат (гидроксиапатит), магния фосфата и аммония (струвита). Эти минералы, накапливаясь в биопленке катетера, образуют так называемые минеральные инкрустации. Было показано, что в течение 4-5 дней просвет катетера может быть полностью заблокирован микробной биопленкой. При рентгенологическом микроанализе биопленки в этом катетере выявили, что в ней содержался повышенный уровень кальция, магния и фосфора. Отметим, что уреазу образуют *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *K. pneumoniae* [1].

Различие в видовом составе микроорганизмов, выделенных с/из уретральных и сосудистых катетеров, можно объяснить отличием микробного окружения и материала катетера, т.к. полиуретан, используемый для изготовления сосудистых катетеров, в большей степени препятствует адгезии микроорганизмов, чем силикон, из которого изготавливают УК.



а



б

Рис. 4. Микробные биопленки, полученные с/из УК: а) прямая световая микроскопия ув. 400, *C. albicans* и *P. aeruginosa*, б) флуоресцентная микроскопия ув. 400 *C. albicans*

Характерной особенностью микробных биопленок является их резистентность к антимикробным препаратам. К механизмам, участвующим в повышенной устойчивости биопленок к антимикробным агентам, предположительно, относят:

- 1) медленное или неполное проникновение (за счет полисахаридного матрикса) антимикробных препаратов внутрь биопленки;
- 2) замедление темпов роста микроорганизмов, приводящее к значительному уменьшению мишеней для антимикробных веществ;
- 3) возникновение субпопуляции покоящихся не-деляющихся форм (персистеров) [16], составляющих около 1% всей популяции биопленки [17].

Было показано, что персистеры биопленок *P. aeruginosa* менее чувствительны к тобрамицину и ионам серебра. С другой стороны, в недавних исследованиях биопленок *Candida* spp. авторы [18] отмечали, что персистеры не могут обеспечить полной резистентности к антимикотикам.

Дополнительные преимущества могут создавать друг другу участники многовидовых сообществ. Так, на биопленках, сформированных *in vivo* *C. albicans* и *S. epidermidis*, выявили сниженную чувствительность к антибиотикам, включая антимикотики: внеклеточный полисахаридный матрикс, вырабатываемый стафилококком, тормозит проникновение флуконазола, тогда как *C. albicans* защищает бактерии от ванкомицина [19, 20].

Установлено, что *Candida* spp. в биопленках проявляют выраженную резистентность к флуконазолу и вориконазолу (МИК, подавляющая рост биопленок, в 1000 раз превышает МИК, подавляющую рост планктонных микроорганизмов) [21, 22].

ВЫВОДЫ

1. При посеве материала с/из центральных венозных катетеров микроорганизмы выделяли преимущественно в монокультуре, тогда как биопленки на/в уретральных катетерах были сформированы несколькими видами микроорганизмов в более чем половине случаев. Частота образования микробных биопленок на/в сосудистых катетерах составила 39%, на уретральных – 100%.
2. Чаще всего сосудистые катетеры колонизируются коагулазонегативными и позитивными стафилококками (41%), *Candida* spp. (15%), энтерококками (9,8%), *K. pneumonia* (9,8%) и *A. baumannii* (9,8%).
3. При посеве материала с/из уретральных катетеров *Candida* spp. выделяли в 66% (в ассоциациях и в монокультуре). Среди бактерий наиболее распространенными агентами были *Klebsiella* spp. (61%), *P. aeruginosa* (15%) *A. baumannii* (12%).
4. Образование биопленок на имплантируемых биоматериалах придает им клиническую значимость, поскольку инфицированное устройство выступает в качестве резервуара патогенных микроорганизмов, резистентных к компонентам иммунной системы и антимикробным агентам [23].
5. Возрастание осведомленности врачей о роли микробных биопленок, формирующихся на/в катетерах, должно оказать положительное влияние на процесс принятия решений о тактике ведения пациентов с имплантируемыми медицинскими устройствами.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Romeo T. Bacterial Biofilms // Springer. – 2008. – P. 295.
2. Lynch A.S. & Robertson G.T. Bacterial and fungal biofilm Infections // Ann. Rev. Med. – 2008. – Vol. 59. – P. 415-428.
3. Francolini I, Donelli G. Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 2010. – Vol. 59. – P. 227-238.
4. Andes D, Nett J, Oschel P, et al. Development and characterization of an *in vivo* central venous catheter *Candida albicans* biofilm model // Infect. and Immun. – 2004. – Vol. 72, №10. – P. 6023-6031.
5. Pannanusorn S, Fernandez V. & Romling U. Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species causing bloodstream infection // Mycoses. – 2012. – Vol. 56. – P. 264-272.

6. *Donlan R.M. and Costerton J. W.* Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms // *J. Clin. Microbiol.* – 2002. – Vol. 15, №2. – P. 167-193.
7. *Chandra J., Mukherjee P.K. Ghannoum M.A.* Candida biofilms associated with CVC and medical devices // *Mycoses.* – 2011. – Vol. 55. – P. 46-57.
8. *Елинов Н.П.* Структурированные и неструктурированные формы существования микромицетов в искусственных и естественных условиях // *Проблемы медицинской микологии.* – 2009. – Т. 11, №3. – С. 3-9.
9. *Ramage G., Martinez J.P., Lopez-Ribot J.L.* Candida biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2006. – Vol. 6. – P. 979-983.
10. *Lebeaux D., Chauhan A., Rendueles O., Beloin C.* From in vitro to in vivo models of bacterial biofilm – related infections // *Pathogens.* – 2013. – Vol. 2. – P. 288-356.
11. *Corey G. R., Lalani T.* Risk of intravascular cardiac device infections in patients with bacteraemia: impact on device removal // *Int. J. Antimicrob. Ag.* – 2008. – Vol. 32. – P. 26-29.
12. *Klevens R.M. Edwards J.R., Richards C.L., et al.* Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002 // *Public Health Rep.* – 2007. – Vol. 122. – P. 160-166.
13. http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/Healthcare-associated_infections/Pages/news.aspx
14. *Бережанский Б.В., Жевнерев А.А.* Катетер-ассоциированные инфекции кровотока // *Клин. микробиол. антимикроб. химиотер.* – 2006. – Т. 8, №2. – С. 130-144.
15. *Valles J., Ferrer R.* Bloodstream infections in the ICU // *Infect. Dis. Clin. N. Am.* – 2009. – Vol. 23. – P. 557-569.
16. *Lewis K.* Persister cells, dormancy and infectious disease // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2007. – Vol. 5. – P. 48-56.
17. *Seneviratne C.J., Jin L., Samaranyake L.P.* Biofilm lifestyle of Candida: a mini review // *Oral Diseases.* – 2008. – Vol. 14. – P. 582-590.
18. *Al-Dhaheeri P.S., Douglas L.J.* Absence of amphotericin B – tolerant persister cells in biofilm of some Candida species // *Antimicrob. Agents Ch.* – 2008. – Vol. 52. – P. 1884-1887.
19. *Harriott M.M., Noverr M.C.* Candida albicans and Staphylococcus aureus form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance // *Antimicrob. Agents Ch.* – 2009. – Vol. 53. – P. 3914-3922.
20. *Pantti M., Liang R., Hicks J., et al.* Biofilm extracellular DNA enhances mixed species biofilms of Staphylococcus epidermidis and Candida albicans // *VMC Microbiology.* – 2013. – Vol. 13. – P. 257.
21. *Пинегина О.Н., Выборнова И.В.* Определение чувствительности биопленок Candida spp. к антимикотикам // *Проблемы медицинской микологии.* – 2013. – Т. 15, №2. – С. 112.
22. *Tobudic S., Kratzer C., Lassnigg A., Presterl E.* Antifungal susceptibility of Candida albicans in biofilms // *Mycoses.* – 2011. – Vol. 55. – P. 199-204.
23. *Hall-Stoodley L., Stoodley P.* Evolving concepts in biofilm infections // *Cell Microbiol.* – 2009. – Vol. 11, №7. – P. 1034-1043.

Поступила в редакцию журнала 20.12.2013

Рецензент: Н.П. Елинов



09 – 11 июня 2014 г. в Санкт-Петербурге состоится

**ВСЕРОССИЙСКАЯ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ
КОНФЕРЕНЦИЯ
ПО МЕДИЦИНСКОЙ
МИКРОБИОЛОГИИ
И КЛИНИЧЕСКОЙ
МИКОЛОГИИ**

XVII Кашкинские чтения



Проблема конференции:

**«Медицинская микробиология и клиническая микология:
вектор развития – новые технологии в практику»**

**В рамках конференции состоится конкурс молодых ученых
и студентов**

В конкурсе принимают участие постерные доклады студентов и молодых ученых до 35 лет. Требования к оформлению постеров размещены на сайте оргкомитета. Авторы постеров, прошедших конкурсный отбор, будут иметь возможность представить свои постерные доклады на выставочной сессии конференции.

Публикация тезисов

Тезисы участников конференции будут опубликованы в журнале «Проблемы медицинской микологии».

Журнал входит в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий. С порядком оформления тезисов можно ознакомиться на сайте www.mycology.szgmu.ru



Оргкомитет Конференции:

**НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина
СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России**

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

e-mail: mycoconference@szgmu.ru

тел./факс: +7 (812) 303-51-40

194291, Россия, Санкт-Петербург, ул. Сантьяго-де-Куба, 1/28

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНВАЗИВНОГО КАНДИДОЗА: В ПОИСКЕ БЫСТРЫХ РЕШЕНИЙ

Рауш Е.Р. (аспирант)*, Васильева Н.В. (директор института), Полищук А.Г. (зав. лаб.), Шагдилеева Е.В. (аспирант), Лавникевич Д.М. (аспирант), Руднева М.В. (н.с.), Михайлова Ю.В. (н.с.), Климко Н.Н. (зав. кафедрой)

НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, кафедра медицинской микробиологии; кафедра клинической микологии, аллергологии и иммунологии, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2013

Проведено сравнительное определение видов *Candida* spp. биохимическими (тест-система AUXACOLOR2), физико-химическими (MALDI-TOF масс-спектрометрия), молекулярными (ДНК-сиквенирование) методами. Исследовано 95 клинических изолятов *Candida* spp., выделенных от пациентов с инвазивным кандидозом в период 2011-2013 гг. Установлено, что совпадение между результатами ДНК-сиквенирования и MALDI-TOF масс-спектрометрии составило 98,95%, а между результатами ДНК-сиквенирования и AUXACOLOR2 – 89,4%. Достоверных различий между результатами видовой идентификации возбудителей инвазивного кандидоза при использовании вышеуказанных методов не выявили. Время, необходимое для определения видов возбудителей инвазивного кандидоза, составило: 48 часов – тест-система AUXACOLOR2, 15 минут – MALDI-TOF масс-спектрометрия, от 5 дней до 2 недель – ДНК-сиквенирование. При использовании вышеуказанных методов обнаружили достоверные различия.

Ключевые слова: AUXACOLOR2, ДНК-сиквенирование, *Candida* spp., MALDI-TOF масс-спектрометрия, определение видов

SPECIES IDENTIFICATION OF ETIOLOGIC AGENTS OF INVASIVE CANDIDOSIS: IN SEARCH OF QUICK DECISIONS

Raush E.R. (postgraduate student), Vasilyeva N.V. (director of institute), Shagdilyyeva E.V. (postgraduate student), Polischouk A.G. (head of the laboratory), Lavnikovich D.M. (postgraduate student), Rudneva M.V. (scientific collaborator),

* Контактное лицо: Рауш Екатерина Рудольфовна, тел.: (812) 303-51-40

Mikhaylova Yu.V. (scientific collaborator), Klimko N.N. (head of the chair)

Kashkin Research Institute of Medical Mycology, Chair of Medical Microbiology, Chair of Clinical Mycology, Allergology and Immunology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2013

Results of Candida species identification with several methods: biochemical – AUXACOLOR2, physicochemical – MALDI-TOF mass-spectrometry and molecular – DNA-sequencing have been compared. Ninety five clinical strains of Candida spp. Isolated from invasive candidosis patients during 2011-2013 have been studied. Agreement of results between DNA-sequencing and MALDI-TOF mass-spectrometry was 98,95%, between DNA-sequencing and AUXACOLOR2 – 89,4%. The significant differences were not found among three methods.

Key words: AUXACOLOR2, *Candida* spp., DNA-sequencing, MALDI-TOF mass-spectrometry, species identification

ВВЕДЕНИЕ

Инвазивный кандидоз (ИК) – жизнеугрожающее заболевание, вызываемое *Candida* spp. и сопровождающееся высокой летальностью (до 40%) [1], одной из причин которой является поздняя диагностика его возбудителей. По данным зарубежных исследователей, продолжительность видовой идентификации от 12 до 48 часов с момента получения культуры гриба увеличивает летальность от ИК, поэтому применение только классических методов диагностики возбудителей инвазивного кандидоза недостаточно, т.к. диагностика занимает свыше 48 часов [2]. В последние годы имеет место тенденция к сдвигу спектра возбудителей ИК в сторону не-*albicans* видов *Candida*, для которых характерна сниженная чувствительность к антимикотикам [3]. В связи с этим, для успешного лечения ИК важно использование методов быстрой и точной видовой идентификации *Candida* spp.

Цель настоящей работы – сравнить традиционные и молекулярные методы видовой идентификации *Candida* spp. и выявить наиболее быстрый и точный.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

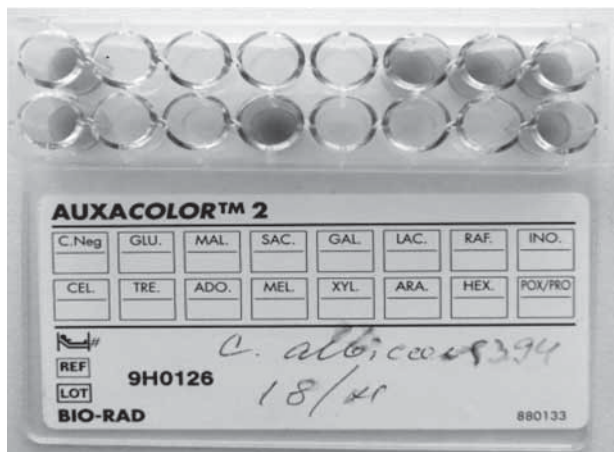
Исследовано 95 культур *Candida* spp., выделенных от пациентов с ИК в период 2011-2013 гг. из биосубстратов: периферической крови – 74 образца, СМЖ – 3, плевральной жидкости – 3, перитонеальной жидкости – 7, желчи – 3, содержимого абсцесса – 4, пунктата суставной жидкости – 1.

Видовую идентификацию проводили с помощью тест-системы AUXACOLOR2 (BioRad, США), MALDI-TOF масс-спектрометрии, ДНК-сиквенирования.

AUXACOLOR2

Принцип функционирования тест-системы AUXACOLOR2 основан на ассимиляции сахаров. Для постановки теста использовали суточную культуру *Candida* spp. Рост дрожжей визуализировали по изменению цвета индикатора pH (с синего на жел-

тый) через 48-72 часа при 28-30 °С.



MALDI-TOF масс-спектрометрия

Исследование изолятов проводили методом полной экстракции белка. Три колонии каждой суточной культуры *Candida* spp. суспендировали в 300 мкл деионизированной воды, затем добавляли 900 мкл этанола и смешивали с помощью вортекса (Bio-San, Латвия) в течение 1 минуты, центрифугировали при 13000 об/мин. – 2 минуты. Получившуюся надосадочную жидкость удаляли и добавляли к осадку 50 мкл 70% муравьиной кислоты, снова смешивали с помощью вортекса. Затем добавляли 50 мкл ацетонитрила, смешивали и снова центрифугировали при 13000 об/мин – 2 минуты.

1 мкл надосадочной жидкости наносили на 384-луночную стальную мишень в двух повторах, сушили при комнатной температуре (23 °С, 5 минут) и затем наносили 1 мкл матрицы (α -циано-4-гидроксикоричной кислоты). В качестве калибранта использовали тест-стандарт белкового экстракта *E.coli*. Процедуру калибровки и проверки выполняют на ячейке планшета MALDI, содержащей образец Bruker бактериального тест-стандарта (Bruker № # 255343). Этот стандарт представляет собой *E. coli* DH5 альфа с закрепленными на ней двумя дополнительными белками в верхнем диапазоне масс, что позволяет калибровать в диапазоне масс от 4 до 17 кДа. Является универсальным калибрantom и для грибов, и для бактерий.

Масс-спектр определяли с помощью прибора «Autoflex Speed» (Bruker, Германия) и анализировали на основе базы данных идентификации микроорганизмов MALDI Biotyper. Результат учитывали по данным значения коэффициента видовой идентификации. Таким образом, суммарное время анализа одной культуры составило приблизительно 15 минут.

Использовали следующие критерии оценки результата MALDI-TOF масс-спектрометрии: коэффициент ≤ 2 – вид и род определены с точностью 100%; 1,8-1,99 – 100% определение рода, неуверенное определение вида; $\geq 1,79$ – сомнительное определение рода [4].

ДНК-сиквенирование

Данный метод рекомендован как референсный

для определения видов микроорганизмов, в том числе – *Candida* spp. [5].

Сиквенирование проводили по D1/D2 регионам гена 28S субъединицы рРНК. Для выделения геномной ДНК использовали реагент PrepManUltra (Applied Biosystems, USA). Для амплификации района D1/D2 применяли праймеры NL-1 и NL-4. ПЦР продукты очищали с помощью набора для очистки ДНК «Омникс» (Омникс, Санкт-Петербург). Сиквенирование ДНК выполняли на генетическом анализаторе ABI Prism 3500 (Applied Biosystems, USA). Реакцию осуществляли с помощью набора BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA). Видовую идентификацию проводили путем сравнения сиквенированных последовательностей с D1/D2 последовательностями *Candida* spp. с помощью алгоритма BLAST. Идентификацию считали достоверной при совпадении исследуемой последовательности и последовательности GenBank более чем на 99%. Время анализа составляло 2 суток в расчете на 1 культуру [6-8].

Статистические методы

Полученные в процессе исследования результаты обрабатывали с помощью программной системы STATISTICA for Windows ver. 6.0. Критерием статистической достоверности получаемых данных считали общепринятую в медицине величину $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Методом AUXACOLOR2 для 95 штаммов *Candida* spp. было выявлено 8 видов *Candida* spp., 7 видов – методом ДНК сиквенирования и 6 – MALDI-TOF MS.

Видовой спектр, определенный вышеуказанными методами, представлен в таблице 1.

Среди 95 штаммов большинство *C. albicans* идентифицировали методами MALDI-TOF MS и ДНК-сиквенирования – 51,6% (49), с помощью тест-системы AUXACOLOR2 – 46,3% (44).

Таблица 1

Идентификация штаммов *Candida* spp. методами ДНК - сиквенирования, AUXACOLOR2 и MALDI-TOF масс - спектрометрии, полученных от пациентов с инвазивным кандидозом, 2011-2013 гг. (n=95)

Вид <i>Candida</i>	Метод идентификации		
	ДНК - сиквенирование	AUXACOLOR2	MALDI-TOF MS (коэфф. видовой идентиф. < 2)
<i>albicans</i>	49	44	49
<i>parapsilosis</i>	14	13	14
<i>tropicalis</i>	12	12	12
<i>glabrata</i>	11	12	12
<i>krusei</i>	7	7	7
<i>dubliniensis</i>	0	5	0
<i>lipolytica</i>	1	1	1
<i>guillemondii</i>	0	1	0
<i>bracarensis</i>	1	0	0

По результатам ДНК-сиквенирования и MALDI-TOF MS определены 49 изолятов *C. albicans*, однако среди них 8 штаммов (ДНК-сиквенирование) и 1 штамм (MALDI-TOF MS) имели обозначение *C. albicans /africana*.

Молекулярными исследованиями, в частности мультилокусным сиквенированием, показано, что уровень различий между двумя видами очень низкий, чтобы утверждать, что *C. africana* является новым видом *Candida*. Сходство по некоторым локусам гена, кодирующего соответствующие белки, позволяет склоняться к мнению о том, что *C. africana* скорее является вариантом *C. albicans* [9].

Тест-системой AUXACOLOR2 выявлено 44 изолята *C. albicans* и 5 штаммов *C. dubliniensis*, штаммов *C. albicans /africana* не обнаружено. *C. dubliniensis* также является близкородственным видом *C. albicans*.

При идентификации видов 12 штаммов *C. tropicalis*, 7 – *C. krusei* и 1 – *C. lipolytica* тремя методами различий не наблюдали.

Среди 14 штаммов *C. parapsilosis* 1 штамм с помощью AUXACOLOR2 был ошибочно определен как *C. guilliermondii*, так как данные, представленные MALDI-TOF MS, полностью совпали с результатами ДНК-сиквенирования.

Из 12 штаммов, которые с помощью AUXACOLOR2 и MALDI-TOF MS были выявлены как *C. glabrata*, методом ДНК-сиквенирования установлены как *C. glabrata* – 11 штаммов и *C. bracarensis* – 1.

C. bracarensis: на CHROMagar – колонии белого цвета, на агаре Сабура – белые и сливочные, на кукурузном агаре – гифы или псевдогифы не образуются. Тест на ростовые трубки – отрицательный. При идентификации с помощью системы AUX API 20C (bioMérieux Inc., Северная Каролина) – низкий процент совпадения с *C. glabrata* (< 50%). *C. bracarensis* можно отличить от *C. glabrata* с помощью ДНК-сиквенирования с использованием D1/D2. Анализом последовательности гена D1/D2 варибельной области 26S рДНК показано, что изолят *C. bracarensis* тесно связан филогенетически с *C. glabrata*, но отличаются достаточно, чтобы оправдать свое назначение в качестве представителей отдельного вида. Название *Candida bracarensis* sp. nov. предлагают для новых видов штаммов 153MT типа (= CBS 10154T = NCYC D3853T = CECT 12000T). Чувствительность к антимикотикам (МИК): каспофунгин – 0,03 мкг/мл, амфотерицин В – 1 мкг/мл, флуконазол – 2 мкг/мл, микафунгин – 0,015 мкг/мл [10].

C. bracarensis является трудно определяемым видом при использовании обычных методов идентификации из-за перекрывающихся признаков. И *C. bracarensis*, и *C. glabrata* ассимилируют узкий перечень углеводов, в том числе трегалозу. Однако, на питательной среде CHROMagar, *C. bracarensis* дает белые колонии, а *C. glabrata* – розовые. Различить эти близкородственные виды можно только либо с помощью ДНК-сиквенирования D1/D2 области в 26S рРНК; фингерпринтинга, используя GTG5 и M13 праймеры, либо пиросиквенированием региона ITS2 [10].

Таким образом, при определении исследуемых 95 штаммов *Candida* spp. методом ДНК-

сиквенирования было выявлено 52% (49) штаммов *C. albicans*, 15% (14) – *C. parapsilosis*, 13% (12) – *C. tropicalis*, 11% (11) – *C. glabrata*, 7% (7) – *C. krusei* и по 1 штамму *C. lipolytica* и *C. bracarensis* (1%).

Методом MALDI-TOF масс-спектрометрии 95 штаммов *Candida* spp. было определено 52% (49) штаммов *C. albicans*, 15% (14) – *C. parapsilosis*, 13% (12) – *C. tropicalis*, 12% (12) – *C. glabrata*, 7% (7) – *C. krusei* и 1% (1) штамм *C. lipolytica*.

Тест-системой AUXACOLOR2 95 штаммов *Candida* spp. были идентифицированы как *C. albicans* – 46% (44), *C. parapsilosis* – 14% (14), *C. tropicalis* – 13% (12), *C. glabrata* – 13% (12), *C. krusei* – 7% (7), *C. dubliniensis* – 5% (5), *C. lipolytica* – 1% (1) и *C. guilliermondii* – 1% (1) штамм.

ДНК-сиквенирование является референсным методом для определения видов *Candida* spp. [5], поэтому все используемые методы видовой идентификации сравнивали с ним и определяли процент правильных результатов. Полученные данные приведены в таблице 2.

Таблица 2

Результаты видовой идентификации штаммов *Candida* spp. методами AUXACOLOR2 и MALDI-TOF масс-спектрометрии в сравнении с референсным молекулярно-генетическим методом

Референс-идентификация (n изолятов)	Метод исследования	n(%) правильных результатов	Особенности (N изолятов)
<i>C. albicans</i> (49)	AUXACOLOR2	44 (89,8)	
	MALDI-TOF MS	49 (100,0)	
<i>C. glabrata</i> (11)*	AUXACOLOR2	12	*За счет отнесения 1 штамма <i>C. glabrata</i> к <i>C. bracarensis</i>
	MALDI-TOF MS	12	
<i>C. dubliniensis</i> (0)*	AUXACOLOR2	5	*определены как <i>Candida albicans</i>
	MALDI-TOF MS	0 (100,0)	
<i>C. guilliermondii</i> (0)	AUXACOLOR2	1	Ошибка теста
	MALDI-TOF MS	0 (100,0)	
<i>C. bracarensis</i> (1)	AUXACOLOR2	0 (0,0)	Определяется только молекулярно - генетическими методами
	MALDI-TOF MS	0 (0,0)	
<i>C. krusei</i> (7)	AUXACOLOR2	7 (100,0)	
	MALDI-TOF MS	7 (100,0)	
<i>C. parapsilosis</i> (14)	AUXACOLOR2	13 (92,8)	
	MALDI-TOF MS	14 (100,0)	
<i>C. tropicalis</i> (12)	AUXACOLOR2	12 (100,0)	
	MALDI-TOF MS	12 (100,0)	
<i>C. lipolytica</i> (1)	AUXACOLOR2	1 (100,0)	
	MALDI-TOF MS	1 (100,0)	

На основании полученных результатов отмечено, что с помощью биохимической тест-системы AUXACOLOR2 определено правильно 89,8% штаммов (44/49) *C. albicans*, остальные 5 штаммов были идентифицированы как *C. dubliniensis*. Одна из причин ложноположительного результата с использованием тест-системы AUXACOLOR2, вероятно, связана с варибельностью ассимиляции некоторых сахаров *C. dubliniensis* и *C. albicans*. В этом случае требуются

дополнительные тесты для уточнения вида или использование других методов видовой идентификации. 92,8% штаммов (13/14) верно установлены как *C. parapsilosis*, однако выявили ошибку идентификации при диагностике 1 штамма, который был определен как *C. guilliermondii* в результате ошибочной реакции ассимиляции в лунке, содержащей целлобиозу. Штаммов *C. glabrata* было обнаружено 12 из 11, по данным ДНК-сиквенирования, поскольку тест-система AUXACOLOR2 не определяет близкородственный вид *C. glabrata* – *C. bracarensis*, обнаруживаемый только молекулярно-генетическими методами. Результаты идентификации 12 изолятов *C. tropicalis*, 7 – *C. krusei* и 1 – *C. lipolytica* с использованием AUXACOLOR2 полностью совпали с таковыми, полученными методом ДНК-сиквенирования.

Данные видовой идентификации методом MALDI-TOF масс-спектрометрии и ДНК-сиквенирования полностью совпали при определении видов: *C. albicans* – 49/49 (100%), *C. parapsilosis* – 14/14 (100%), *C. tropicalis* – 12/12 (100%), *C. krusei* – 7/7 (100%) и *C. lipolytica* – 1/1 (100%). По данным ДНК-сиквенирования, штаммов *C. glabrata* было выявлено 12 из 11; MALDI-TOF масс-спектрометрия также не определила близкородственный вид *C. glabrata* – *C. bracarensis*.

Таким образом, 98,95% штаммов (94/95) *Candida* spp. были верно определены методом MALDI-TOF MS 95 и 89,4% (85/95) – AUXACOLOR2 в сравнении с «золотым стандартом» видовой идентификации – ДНК-сиквенированием.

На основании статистической обработки данных с помощью программы STATISTICA ver.6.0 не обнаружили отличий между тремя методами видовой идентификации. (Рис. 2).

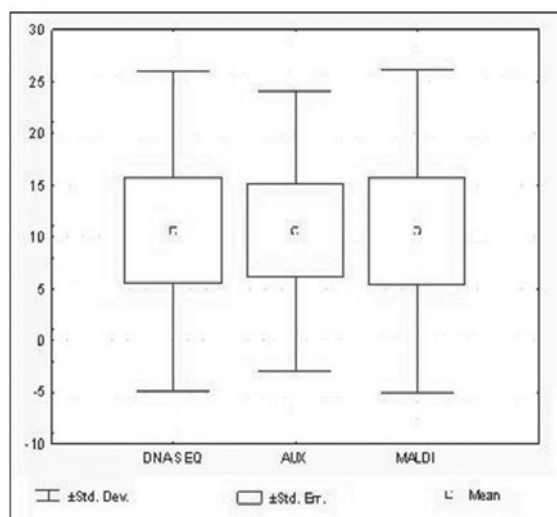


Рис. 2. Сравнение трех методов видовой идентификации DNA-SEQ (ДНК-сиквенирование), AUX (AUXACOLOR2), MALDI (MALDI-TOF масс-спектрометрия) (n=95)

Исследование видовой идентификации штаммов *Candida* spp. методами ДНК-сиквенирования, MALDI-TOF масс-спектрометрии и тест-системой

AUXACOLOR2 с последующим сравнением полученных результатов в России проведено впервые. Согласно данным международных исследователей, летальность от инвазивного кандидоза возрастает до 40%, спустя 48 часов от момента выделения изолята *Candida* spp., поэтому первостепенной задачей является быстрое определение вида *Candida* spp. для назначения эмпирической терапии. Существующие классические методы не могут обеспечить необходимую скорость выявления вида. В 2011 г. во Франции было проведено исследование с включением видовой идентификации 103 изолятов *Candida* spp. Предварительно штаммы были проверены тест-системой AUXACOLOR2. Исследование выполняли с использованием методов ДНК-сиквенирования и MALDI-TOF масс-спектрометрии. Результатом данного исследования явились рекомендации по применению метода MALDI-TOF масс-спектрометрии с полной белковой экстракцией [11]. Таким образом, полученные нами данные коррелируют с результатами мировых исследований.

ВЫВОДЫ

1. Среди 95 исследованных штаммов возбудителей инвазивного кандидоза методами ДНК-сиквенирования и MALDI-TOF масс-спектрометрии было выявлено 51,9% (49) штаммов *C. albicans*, тест-системой AUXACOLOR2 – 46,3% (44), на втором месте – *C. parapsilosis* 14,73% /13,7% (14/13), далее *C. tropicalis* – 12,6% (12) тремя методами и на 4 позиции – *C. glabrata* – 11,57%/12,63% (11/12).

2. Совпадение между результатами ДНК-сиквенирования и MALDI-TOF масс-спектрометрии составило 98,95%, а между результатами ДНК-сиквенирования и AUXACOLOR2 – 89,4%.

3. При использовании тест-системы AUXACOLOR2, MALDI-TOF масс-спектрометрии, ДНК-сиквенирования отмечали достоверные различия во времени, необходимом для определения видов возбудителей инвазивного кандидоза – 48 часов, 15 минут и 48 часов соответственно.

4. Высокий процент совпадения между результатами ДНК-сиквенирования и MALDI-TOF масс-спектрометрии, а также высокую скорость определения видов возбудителей инвазивного кандидоза методом последним из них (15 минут против 48 часов методом ДНК-сиквенирования), служит основой для рекомендации метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для рутинного использования в лабораторной практике.

В заключение мы выражаем благодарность руководству ГБОУ ВПО СЗГМУ им. И.И.Мечникова за финансовую поддержку через грант им. профессора Э.Э. Эйхвальда.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. *Национальные рекомендации «Диагностика и лечение микозов в отделениях реанимации и интенсивной терапии»*. – М., 2010. – 92 с.
2. *Morrell et al.* Treatment strategies for invasive fungal infection // *Antimicrob. Ag. Chemother.* – 2005. – Vol. 49. – P. 3640-45.
3. *Aiketerini Flevari* Treatment of invasive candidiasis in the elderly: a review// *Clin. Interv. Aging.* – 2013. – Vol. 8. – P. 1199-1208.
4. *Bruker Daltonics* MALDI-TOF biotyper operating procedure- OP for sample preparation using formic acid extraction method. – 12/15/2010.
5. *Edited by Dongyou Liu* Molecular detection of human fungal pathogens//CRC Press Taylor & Francis Group, 2011
6. *CLSI*. Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by dna target sequencing. approved guideline MM18-A // *Clin. and Lab. Standards Institute, Wayne, PA.* – 2008.
7. *CLSI*. Molecular diagnostic methods for infectious diseases. approved guideline, 2d ed. MM03-A2 // *Clin. and Lab. Standards Institute, Wayne, PA.* – 2008.
8. *CLSI*. Nucleic acid sequencing methods in diagnostic laboratory medicine. approved guideline MM09-A// *Clin. and Lab. Standards Institute, Wayne, PA.* – 2008.
9. *Romeo O., Tietz H-J., Criseo G.* *Candida africana*: Is It a Fungal Pathogen? // *Curr. Fungal Infect. Reports.* – 2013. – Vol. 7, Issue 3. – P. 192-197.
10. *Esposito M.C., Prigitano A., Romeo O., et al.* FIMUA Working Group Looking for *Candida nivariensis* and *C. braccarensis* among a large Italian collection of *C. glabrata* isolates: results of the FIMUA working group// *Mycoses.* – 2013. – Vol. 56, Issue 3. – P. 394-396.
11. *Cassagne C., Cella A-L., Suchon P., et al.* Evaluation of four pretreatment procedures for MALDI-TOF MS yeast identification in the routine clinical laboratory// *Medical Mycology.* – 2012. – Early Online: 1-7.

Поступила в редакцию журнала 18.12.2013

Рецензент: Н.П. Елинов



ОСОБЕННОСТИ РОСТА, БИОЛОГИИ И ПРОДУКЦИИ МИКОТОКСИНОВ *CHAETOMIUM* spp. – МИКРОМИЦЕТАМИ-БИОДЕСТРУКТОРАМИ

Доршакова Е.В. (н.с.)*

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

© Доршакова Е.В., 2013

Chaetomium spp. – широко распространенные в природе сапробные организмы, нередко контаминирующие стены зданий. Микромицеты рода *Chaetomium*, растущие в помещениях, создают риск развития микозов у иммунокомпрометированных больных, аллергию, а также микотоксикоз.

Ключевые слова: микотоксины, хетоглобозины, *Chaetomium* spp.

PECULIARITIES OF GROWTH, BIOLOGY AND PRODUCTION OF MYCOTOXINS WITH *CHAETOMIUM* spp. – MICROMYCETES -BIODESTRUCTORS

Dorshakova Ye.V. (scientific collaborator)

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

© Dorshakova E.V., 2013

Chaetomium spp. – widespread in nature saprobe organisms, which often contaminate walls of buildings. Micromycetes *Chaetomium* spp., growing indoors, create a risk of the fungal infections development in immunocompromised patients, allergy and mycotoxicosis.

Key words: *Chaetomium* spp., chaetoglobosines, mycotoxins

Современный таксономический статус и особенности биологии *Chaetomium* spp.

Надцарство: Эукариоты (*Eucaryota*)

Царство: Грибы (*Fungi*)

Отдел: Аскомицеты (*Ascomycetes*)

Класс: Эуаскомицеты (*Euascomycetes*)

Порядок: Сордариевые (*Sordariales*)

Семейство: Хетомиевые (*Chaetomiaceae*)

Род: Хетомиум (*Chaetomium*)

Микромицеты рода *Chaetomium*, согласно «Определителю низших растений» (М., 1954), как и другие представители Аскомицетов имеют септированные гифы, а также специфические органы полового спороношения – аски. Сумки у *Chaetomium* spp. образуются в плодовых телах – аскокарпах, развивающихся по аскогимениальному типу. Образование перидия (оболочки) аскокарпа происходит после плазмогамии. При этом гаплоидные вегетативные гифы оплетают развивающиеся аскогенные гифы и сумки, образуя плотную покровную ткань. Тип плодового тела *Chaetomium* spp. – перитеций – полузамкнутое плодовое тело, грушевидной формы. Перитеции у *Chaetomium* spp. крупные, на поверхности имеют придатки, похожие на волоски. Окраска их темно-коричневого или черного цвета. Аски грушевидной или цилиндрической формы. После созревания аска аскоспоры, окруженные слизью, выходят из перитеция через остиолу во вне [1]. В настоящее время известно более 80 видов рода *Chaetomium*. Наиболее известными представителями рода являются *Chaetomium atrobrunneum*, *C. funicola*, *C. globosum* и *C. strumarium*.

Культуральные и морфологические признаки микромицетов рода *Chaetomium*.

В лабораторных условиях *Chaetomium* spp. растут быстро, на питательных средах молодые колонии белого цвета имеют пушистую поверхность. Зрелые колонии, в основном, приобретают более темную окраску – от серой до оливковой. С обратной стороны колонии микромицетов имеют, как правило, красноватую или коричневатую окраску [1].

Биологическая активность *Chaetomium* spp.

Микромицеты рода *Chaetomium*, обладающие высокой целлюлазной активностью, широко распространены в природе и, в частности, в антропогенной среде. *Chaetomium* spp. нередко можно обнаружить на гниющих растительных остатках, помете животных, семенах растений. В помещениях они часто контаминируют материалы, содержащие целлюлозу: гипсокартон, обои, плитуса, оконные рамы. Исследователи выявляют *Chaetomium* spp. в сырых помещениях в различных регионах Земного шара [2, 3]. Fogle V.R. с соавторами [1] было проведено обследование 794 сырых помещений Северной Америки, из них в 49% случаев были обнаружены *Chaetomium* spp., которые в очагах биоповреждения нередко вы-

* Контактное лицо: Доршакова Евгения Владимировна, тел.: (812) 303-51-40

являют совместно с *Stachybotrys* spp. [2, 3].

Влияние *Chaetomium* spp. на здоровье людей.

Большинство грибов-контаминантов строительных и отделочных материалов рода *Chaetomium* способно вызывать аллергическую реакцию, симптомами которой являются кашель и насморк, нередко – развитие бронхиальной астмы (Andersen B., Nissen A. T., 2000). По данным Woods G.L. et al (1988) и Abbott S.P., et al (1995), некоторые виды *Chaetomium* spp., как, например *C. atrobrunneum*, могут способствовать возникновению глубоких микозов у иммунокомпromетированных больных. Известны случаи развития внутрибольничных микозов у пациентов после трансплантации костного мозга. Иногда *Chaetomium* spp. являются причиной появления ониомикоза [4].

Важно отметить, что *Chaetomium* spp. представляет опасность для здоровья людей в связи с его способностью синтезировать экзотоксины [1, 4].

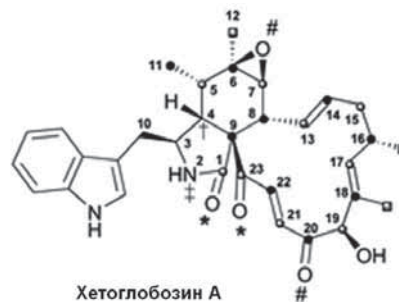
Микотоксины *Chaetomium* spp.

Chaetomium spp. продуцируют микотоксины при контаминации пищевых продуктов, а также стен сырых помещений. *C. globosum* – наиболее частый контаминант стен зданий в Европе и Северной Америке [1, 5], является потенциальным продуцентом хетоглобозина А и С., которые обладают цитотоксическим действием, подавляя деление клеток, благодаря высокому сродству к нитям актина, а также блокируют транспорт глюкозы.

Химическое строение хетоглобозинов.

Хетоглобозины являются производными цитохалазина, что обеспечивает их сродство к нитям актина.

Атом углерода в 18 положении у хетоглобозинов связан с аминокислотой триптофаном. У хетоглобозина А атом кислорода в 19 положении связан с -ОН группой, а у хетоглобозина С – с атомом кислорода =О (Natori S., et al, 1977). У живых организмов под воздействием хетоглобозинов наблюдают атаксию, нарушение координации движений, тремор мышц, парезы [5]. У умерших особей крупного рогатого скота при вскрытии черепной коробки была обнаружена дегенерация миелиновых волокон в белом веще-



Хетоглобозин А

- [1-¹³C]-ацетат, [2-¹⁴C]-пропионат
- [2-¹³C]-ацетат
- † [1-¹³C]-пропионат, [1-¹⁴C]-L-триптофан
- [¹³C, ²H₃-CH₃]-L-метионин
- * [1-¹³C, ¹⁸O₂]-ацетат
- # ¹⁸O₂ - газ
- ‡ [2-¹⁵N]-L-триптофан

стве мозжечка. Токсичное действие хетоглобозинов было изучено в отношении мышей, которым вводили микотоксин подкожно в количестве 5 мг / кг массы тела. В течение нескольких часов после инъекции у животных появлялась отечность в месте введения хетоглобозина А. По истечении эксперимента, через несколько дней наступала гибель мышей. При вскрытии у животных был выявлен некроз тимуса и селезенки.

Известно, что *Chaetomium* spp. в наибольших количествах синтезирует хетоглобозины при росте на гипсокартоне. В образцах гипсокартона были обнаружены хетоглобозины в количестве 7-50 нг/см² (Nielsen K.F., et al., 1999).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, *Chaetomium* spp., обладающий целлюлазной активностью, нередко встречается на отделочных материалах, содержащих целлюлозу.

Как условные патогены и потенциальные продуценты микотоксинов и аллергенов, *Chaetomium* spp. способны оказывать неблагоприятные воздействия на здоровье людей.

Хетоглобозины, продуцируемые *Chaetomium* spp., являются цитотоксичными соединениями, способными нарушить функциональную активность мозжечка, а также индуцировать другие изменения in vivo у разных животных.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Fogle M.R., Douglas D.R., Jumper C.A., Straus D.C. Growth and mycotoxin production by *Chaetomium globosum* // Mycopathologia. – 2007. – Vol. 164, №1. – P. 49-56.
2. Straus D.C. The possible role of fungal contamination in sick building syndrome // Front. Biosci. (Elite Ed). – 2011. – Vol. 3. – P. 562-580.
3. Jarvis B.B., Miller J.D. Mycotoxins as harmful indoor air contaminants // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2005. – Vol. 66, №4. – P. 367-372.
4. Latha R., Sasikala R., Muruganandam N., Shiva Prakash M.R. Onychomycosis due to ascomycete *Chaetomium globosum*: a case report // Indian J. Pathol. Microbiol. – 2010. – Vol. 53, №3. – P. 566-567.
5. Nielsen K.F. Mycotoxin production by indoor molds // Fungal Genet. Biol. – 2003. – Vol. 39. – P.103-117.

Поступила в редакцию журнала 23.12.2013

Рецензент: И.А. Босак

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ В ЖУРНАЛ «ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ»

Журнал «Проблемы медицинской микологии» нацелен на публикацию оригинальных, ранее не опубликованных в других изданиях в России или за рубежом, статей, научных обзоров, дискуссий, рецензий на книги, методических разработок, хроники и информации. Предварительные сообщения не принимаются. Статьи необходимо сопровождать направлением от учреждения (-й), в котором (-ых) выполнена работа.

Статьи представляются на русском языке с обязательным расширенным резюме на английском языке объемом не более 20 строк. Можно представлять статьи на английском языке с рефератом на русском языке в объеме до 20 строк.

Статьи представляются в редакцию по почте с приложением диска (с распечаткой текста на бумаге в 2-х экземплярах) или по электронной почте (mycobiota@szgmu.ru), подготовленными в текстовом редакторе Win Word. Статьи должны быть напечатаны шрифтом № 12 через 1,5 интервала. Все страницы должны быть пронумерованы.

Размер рукописей не должен превышать 12 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы, фотографии и подписи к ним, список цитированной литературы, представляемые на отдельных листах. Количество иллюстраций не должно превышать двух страниц при их плотном размещении друг к другу.

Рукопись статьи подписывается автором (соавторами), на отдельной странице написать ф.и.о. (полностью) одного из авторов, его должность, адрес электронной почты (для связи) и номер телефона.

Авторское право.

Согласно статье 1228 (глава 69) Гражданского Кодекса РФ часть 4, раздел VII (Права на результаты интеллектуальной деятельности и средства индивидуализации), автором результата интеллектуальной деятельности признается гражданин, творческим трудом которого создан такой результат.

Не признаются авторами результата интеллектуальной деятельности граждане, не внесшие личного творческого вклада в создание такого результата, в том числе оказавшие его автору только техническое, консультационное, организационное или материальное содействие или помощь либо только способствовавшие оформлению прав на такой результат или его использованию, а также граждане, осуществлявшие контроль за выполнением соответствующих работ.

Правила оформления статей:

Сначала пишется **название статьи** заглавными буквами (шрифт 12 – жирный). Затем через 2 интер-

вала указываются **фамилии авторов, инициалы и должности** (шрифт 12 – жирный). Далее через 2 интервала пишется **название учреждения**, в котором выполнена работа. Затем через 2 интервала печатать **резюме на русском языке** (без написания слова «резюме»). Через 2 интервала указать до 7 **ключевых слов**. Затем через 2 интервала (шрифт – 12) пишется **заголовок на английском языке, фамилии, инициалы и должности автора (-ов), резюме** (без написания слов «abstract, summary») **и ключевые слова** (не более 7).

Затем через 3 интервала и с красной строки печатать **текст статьи** в следующем порядке: краткое **введение, материалы и методы, результаты и их обсуждение, выводы, цитированная литература.**

Латинские названия грибов необходимо писать курсивом; если в заголовке названы род и вид гриба, то после него следует указывать автора, впервые писавшего вид (например, *Aspergillus fumigatus* Fres.); в тексте такая форма уже не повторяется и при повторном упоминании гриба название рода сокращают до первой буквы (например, при первом написании в тексте *Aspergillus fumigatus*, при повторениях - *A. fumigatus*).

Автор (-ы) вида должен (-ны) быть указан (-ы) не только в заголовке к статье, но и при первом упоминании в тексте (если нет этого в заголовке) и в возможном списке видов. В подписях к рисункам и в надписях к таблицам полные названия рода и вида приводятся один раз.

Названия учреждений при первом упоминании в тексте даются полностью, и сразу же в скобках приводят их принятые сокращения, которыми пользуются в последующем тексте статьи, например, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (ГБОУ ВПО СЗГМУ), Московская государственная медицинская академия им. И.М. Сеченова (ММА им. Сеченова) и т.д.

Четко писать и различать О, о, и 0 (нуль), 1 и I (единицу и заглавную латинскую И), I и J, q и g, заглавные буквы О по-русски и Q по-английски. Подстрочные примечания должны иметь сквозную нумерацию по всей статье. Содержание таблиц не должно дублировать текст. Таблицы должны иметь порядковые номера, если их больше одной. Текст таблиц печатать через 2 интервала.

Все термины, употребляемые в статье, должны строго соответствовать действующим номенклатурам (анатомической, гистологической и т.д.), названия лекарственных средств - Государственной Фармакопее, единицы физических величин - международной системе единиц (СИ).

В тексте при ссылке на работу иностранных авторов их фамилии приводятся в русском написании и рядом в скобках - в оригинальном написании с указанием года опубликования работы, например: «Штайб (Staub, 1992) наблюдал...». Ссылки на работы располагать в хронологическом порядке годов опубликования работ.

Литература, упоминаемая в тексте (не должна быть старше 10 лет), приводится списком в конце статьи **в том порядке, в котором она цитирована в тексте работы;** соответствующие номера статей проставляются в тексте в квадратных скобках.

Рисунки (фото) должны иметь порядковые номера, на которые следует сослаться в тексте статьи. Рисунки (фото) прилагаются в отдельном конверте (фотоснимки - в двух экземплярах) или в электронном виде. На микрофотографиях изображается масштаб, в подписях к ним необходимо указывать собственные увеличения объектива и окуляра, и, возможно, коэффициент усиления увеличения за счет дополнительных оптических приспособлений (например, для некоторых бинокулярных микроскопов $\times 1,5$). На обороте рисунка указываются мягким карандашом без нажима фамилия автора, номер и желательное уменьшение рисунка (фото), верх рисунка.

Оформление списка литературы.

1. Для книг указываются фамилии и инициалы авторов, название книги, место издания (город), издательство, год, общее количество страниц, например: *Васильева Н.В., Елинов Н.П.* Микроорганизмы - контаминанты и патогены - индукторы процессов старения больничных зданий и помещений медицинского назначения, а также возбудители некоторых заболеваний людей (учебное пособие) / Под ред. Н. П. Елинова. - СПб.: КОСТА, 2009. - 224 с.

2. Для статей, опубликованных в журналах, указываются фамилии и инициалы авторов, название статьи, название журнала, год, том, номер, первая и последняя страницы статьи, например: *Brinkman C., Vergidis P., Uhl J.* PCR-electrospray ionization mass spectrometry for direct detection of pathogens and

antimicrobial resistance from heart valves in patients with infective endocarditis // J.of Clin. Microbiol. - 2013. - Vol. 51, №7. - P. 2040-2046.

3. Для статей, опубликованных в сборниках, указываются фамилии и инициалы авторов, название статьи, название сборника, место издания (город), издательство, год, первая и последняя страницы статьи, например: *Елинов Н.П.* Низшие микромицеты и вызываемые ими микозы - беспокойная проблема будущего // Материалы 3-го Всеросс. конгресса по мед. микологии. - М., 2005. - Т. VI. - С. 44-46.

Для авторефератов диссертаций, например: *Хабидулина Ф.М.* Почвенная микобиота естественных и антропогенно нарушенных экосистем северо-востока европейской части России: Автореф. дисс... док. биол. наук. - Сыктывкар, 2009. - 40 с.

Редакция оставляет за собой право сокращать статьи и вносить редакционные исправления.

В случае возвращения автору рукописи статьи на переработку дата ее поступления сохраняется в течение 4 месяцев. При отклонении работы статья не подлежит возвращению автору. В конце статьи, принятой к публикации, приводится фамилия рецензента. Частота выпуска журнала: 1 номер в квартал, 1 том в год. Все статьи публикуются БЕСПЛАТНО.

По вопросам размещения рекламы обращаться по адресу редакции (см. ниже).

Вся корреспонденция направляется по адресу: 194291, Санкт-Петербург, ул. Сантьяго-де-Куба, 1/28, НИИ ММ им.П.Н.Кашкина СЗГМУ им. И.И. Мечникова. Тел: (812) 303-51-45; тел./факс: (812) 510-62-77

E-mail: mycobiota@szgmu.ru; egukova@mail.ru

Заведующая редакцией: Гукова Елена Станиславовна

ВНИМАНИЮ АВТОРОВ СТАТЕЙ!

Направляя статью для размещения в журнале ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И.Мечникова» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (далее – Университет) «Проблемы медицинской микологии» автор статьи предоставляет Академии право использовать статью в любой форме и любым способом, предусмотренными п. 2 ст. 1270 Гражданского Кодекса Российской Федерации, в том числе: воспроизведение статьи; распространение статьи путем продажи или иного отчуждения его оригинала или экземпляров; сообщение в эфир; сообщение по кабелю; перевод или другая переработка статьи; доведение статьи до всеобщего сведения; передача права использования статьи третьим лицам (сублицензионный договор); извлечение и обработка метаданных статьи.

Автор статьи гарантирует, что он является обладателем передаваемых Университету прав (правообладателем). Территория, на которой допускается использование прав на статью, не ограничена. Передача прав на статью осуществляется без выплаты автору статьи вознаграждения. Университет вправе использовать статью в течение срока действия исключительного права правообладателя на статью. Автор предоставляет Университету право обработки своих персональных данных.

В связи с вышеизложенным, редакционная коллегия журнала «Проблемы медицинской микологии» просит авторов, **вместе с сопроводительным письмом от организации, присылать документ с текстом следующего содержания:**

«Направляя статью для размещения в журнале ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И.Мечникова» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (далее – Университет) «Проблемы медицинской микологии» я (мы) _____ (указать ФИО) предоставляю (ем) Университету право использовать мою (нашу) статью _____ (название статьи) в любой форме и любым способом, указанным в «Правилах предоставления рукописей авторами» журнала «Проблемы медицинской микологии».

Сопроводительное письмо к статье должно быть написано и подписано собственноручно автором (авторами) статьи.

*Читателям нашего журнала
Поздравление с Новым годом и Рождеством, а также пожела-
ния здоровья, успехов в труде и радостей (малых и больших) в
повседневной жизни в течение многих предстоящих лет!*



**Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (СЗГМУ)
Научно-исследовательский институт медицинской микологии им. П.Н.Кашкина (НИИ ММ) СЗГМИ 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@spbmapo.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@spbmapo.ru. Manager of Editorial Office: E.S.Gukova

«ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ»
Пер. № 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 27.12.2013. Формат 60×90 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Times. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 11.5. Тираж 999 экз.