

ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

Том 26 №4



Problems in medical mycology

Vol.26 №4

2024

EDITORIAL BOARD

Chief Editor: N.V. Vasilyeva – Honored Scientist of the Russian Federation, Ph.D., prof. (Russia)

Deputies Chief Editor:

K.I. Raznatovsky – M.D., prof. (Russia)

S.N. Khostelidi – M.D. (Russia)

A.E. Taraskina – Ph.D. (Russia)

Responsible secretary: T.S. Bogomolova – Ph.D. (Russia)

Manager of Editorial Office: E.S. Gukova

(elena.gukova@szgmu.ru)

SCIENTIFIC EDITORIAL BOARD

Bennett J. – M.D. (USA), Dupont B. – M.D. (France)

Gostev V.V. – M.D. (Russia)

Hurzilava O.G. – M.D., prof. (Russia)

Golubev V.I. – Ph.D. (Russia)

Kashkin K.P. – M.D., academician of RAMS, prof. (Russia)

Kolbin A.C. – M.D., prof. (Russia)

Kaftyreva L.A. – M.D., prof. (Russia)

Kotrekhova L.P. – M.D. (Russia)

Makarova M.A. – M.D. (Russia)

Mazurov V.I. – M.D., academician of RAMS, prof. (Russia)

Polachek I. – M.D. (Israel)

Samzov A.V. – M.D., prof. (Russia)

Sidorenko S.V. – Corresponding Member of the Russian

Academy of Medical Sciences, M.D., prof. (Russia)

Shadriviva O.V. – M.D. (Russia)

Shevyakov M.A. – M.D., prof. (Russia)

Shulgina M.V. – Ph.D. (Russia)

Tietz H.-J. – M.D. (Germany)

Viviani M.A. – M.D. (Italy)

Zinzerling V.A. – M.D., prof. (Russia)

Yamaguchi M. – Ph.D. (Japan)

Zhang F. – M.D.&Ph.D. (China)

PROBLEMS IN MEDICAL MYCOLOGY

Vol. 26, № 4, 2024

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

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

ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

Том 26, № 4, 2024

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор: Н.В. Васильева – Заслуженный деятель науки Российской Федерации, д.б.н., проф. (Россия)

Заместители главного редактора:

К.И. Разнатовский – д.м.н., проф. (Россия)

С.Н. Хостелиди – д.м.н. (Россия)

А.Е. Тараскина – к.б.н. (Россия)

Ответственный секретарь: Т.С. Богомолова – к.б.н. (Россия)

Заведующая редакцией: Е.С. Гукова

(elena.gukova@szgmu.ru)

НАУЧНО-РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Беннетт Дж. – доктор медицины (США)

Вивиани М.А. – доктор медицины (Италия)

Голубев В.И. – д.б.н. (Россия)

Гостев В.В. – к.б.н. (Россия)

Дюпон Б. – доктор медицины (Франция)

Кашкин К.П. – д.м.н., академик РАМН, проф. (Россия)

Кафтырева Л.А. – д.м.н., проф. (Россия)

Котрехова Л.П. – к.м.н. (Россия)

Колбин А.С. – д.м.н., проф. (Россия)

Мазуров В.И. – д.м.н., акад. РАМН, проф. (Россия)

Макарова М.А. – д.м.н. (Россия)

Полачек И. – доктор медицины (Израиль)

Самцов А.В. – д.м.н., проф. (Россия)

Сидоренко С.В. – член-корр. РАМН, д.м.н., проф. (Россия)

Титц Х.-Й. – доктор медицины (Германия)

Хурцилава О.Г. – д.м.н., проф. (Россия)

Цинзерлинг В.А. – д.м.н., проф. (Россия)

Чжан Ф. – доктор медицины (Китай)

Шадривова О.В. – к.м.н. (Россия)

Шевяков М.А. – д.м.н., проф. (Россия)

Шульгина М.В. – д.б.н. (Россия)

Ямагучи М. – доктор медицины (Япония)

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

СОДЕРЖАНИЕ

ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ И ОБЗОРЫ

<i>Богомолова Т.С., Ковыршин С.В., Выборнова И.В., Оганесян Э.Г., Козлова О.П., Гордеева С.А., Борзова Ю.В., Босак И.А., Чилина Г.А., Игнатъева С.М., Павлова И.Э., Орлова О.Е., Тараскина А.Е., Васильева Н.В.</i> Распространенность множественной устойчивости к противогрибковым лекарственным средствам среди возбудителей инвазивного кандидоза.....	3
<i>Хостелиди С.Н., Шадринова О.В., Шурпицкая О.А., Игнатъева С.М., Борзова Ю.В.</i> Фузариоз легких у иммунокомпетентной пациентки (обзор литературы и описание клинического случая).....	11

КЛИНИЧЕСКАЯ МИКОЛОГИЯ И ДЕРМАТОВЕНЕРОЛОГИЯ

<i>Хостелиди С.Н., Козлова О.П., Успенская О.С., Ружинская О.С., Рябыкина О.Е., Смирнов С.А., Апполова П.Н., Мошкевич И.Р., Выборнова И.В., Ковыршин С.В., Богомолова Т.С., Оганесян Э.Г., Тараскина А.Е., Васильева Н.В.</i> Кандидемия, обусловленная <i>Candida auris</i> , у пациентки с неходжкинской лимфомой (описание клинического случая).	22
<i>Васенова В.Ю., Цыганкова Е.И., Жуков Н.В., Полевщикова С.А.</i> Оценка противогрибкового действия фотодинамической терапии в эксперименте <i>in vitro</i> на колонии основных возбудителей онихомикоза	30
<i>Серебрякова И.С., Корнишева В.Г., Сулова И.Е., Фролова Е.В., Разнатовский К.И.</i> Клинический случай врожденного дискератоза у мальчика 13 лет.....	37

КЛИНИЧЕСКАЯ И МЕДИЦИНСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

<i>Игнатъева С.М., Шадринова О.В., Хостелиди С.Н., Козлова О.П., Десятник Е.А., Борзова Ю.В., Богомолова Т.С., Фролова Е.В., Учеваткина А.Е., Филиппова Л.В., Секретарева О.В., Климович А.В., Успенская О.С., Васильева Н.В.</i> Диагностическая значимость (1,3)- β -D-глюкана в различных видах биологического материала от онкогематологических больных с инвазивным аспергиллезом	43
<i>Рябинин И.А.</i> Адаптация метода линейной MALDI-TOF-масс-спектрометрии для исследования необработанной сыворотки крови.....	50
<i>Босак И.А., Ковыршин С.В., Выборнова И.В., Чилина Г.А., Богомолова Т.С., Канаева В.М., Тараскина А.Е., Васильева Н.В.</i> Экспериментальный инвазивный кандидоз, обусловленный штаммами <i>Candida tropicalis</i> с различной чувствительностью к противогрибковым лекарственным средствам.....	56
<i>Ковыршин С.В., Венчакова В.В., Выборнова И.В., Долго-Сабурова Ю.В., Жорж О.Н., Гусева А.О., Оганесян Э.Г., Богомолова Т.С., Тараскина А.Е., Чжан Ф., Васильева Н.В.</i> Рецидивирующий вульвовагинальный кандидоз: фокус на резистентность <i>Candida albicans</i> к противогрибковым лекарственным средствам.....	61

CONTENTS

PROBLEM ARTICLES AND REVIEWS

<i>Bogomolova T.S., Kovyrshin S.V., Vybornova I.V., Oganesyanyan E.G., Kozlova O.P., Gordeeva S.A., Borzova Yu.V., Bosak I.A., Chilina G.A., Ignatieva S.M., Pavlova I.E., Orlova O.E., Taraskina A.E., Vasilyeva N.V.</i> Prevalence of antifungal multidrug resistance among invasive candidiasis pathogens.....	3
<i>Khostelidi S.N., Shadrivova O.V., Shurpitskaya O.A., Ignatieva S.M., Borzova Yu.V.</i> Lung fusariosis in an immunocompetent patient (literature review and description of the clinical case).....	11

CLINICAL MYCOLOGY AND DERMATOVENERELOGY

<i>Khostelidi S.N., Kozlova O.P., Uspenskaya O.S., Ruzhinskaya O.S., Ryabykina O.E., Smirnov S.A., Appolova P.N., Moshkevich I.R., Vybornova I.V., Kovyrshin S.V., Bogomolova T.S., Oganesyanyan E.G., Taraskina A.E., Vasilyeva N.V.</i> Candidemia caused by <i>Candida auris</i> in a patient with non-Hodgkin's lymphoma (clinical case description).....	22
<i>Vasenova V.Yu., Tsygankova E.I., Zhukov N.V., Polevshchikova S.A.</i> Evaluation of the antifungal effect of photodynamic therapy in an <i>in vitro</i> experiment on colonies of the main pathogens of onychomycosis.....	30
<i>Serebryakova I.S., Kornisheva V.G., Suslova I.E., Frolova E.V., Raznatovsky K.I.</i> A clinical case of congenital dyskeratosis in a 13-year-old boy.....	37

CLINICAL AND MEDICAL MICROBIOLOGY

<i>Ignatieva S.M., Shadrivova O.V., Khostelidi S.N., Kozlova O.P., Desyatnik E.A., Borzova Yu.V., Bogomolova T.S., Frolova E.V., Uchevatkina A.E., Filippova L.V., Secretaryova O.V., Klimovich A.V., Uspenskaya O.S., Vasileva N.V.</i> Diagnostic significance of (1,3)- β -D-glucan in various types of biological material from oncohematological patients with invasive aspergillosis	43
<i>Ryabinin I.A.</i> Adaptation of the linear MALDI-TOF-mass-spectrometry method for the study of untreated blood serum	50
<i>Bosak I.A., Kovyrshin S.V., Vybornova I.V., Chilina G.A., Bogomolova T.S., Kanaeva V.M., Taraskina A.E., Vasilyeva N.V.</i> Experimental invasive candidiasis caused by <i>Candida tropicalis</i> strains with different antifungal susceptibility patterns.....	56
<i>Kovyrshin S.V., Venchakova V.V., Vybornova I.V., Dolgo-Saburova Yu.V., Zhorzh O.N., Guseva A.O., Oganesyanyan E.G., Bogomolova T.S., Taraskina A.E., Zhang F., Vasilyeva N.V.</i> Recurrent vulvovaginal candidiasis: focus on <i>Candida albicans</i> resistance to antifungal drugs	61



Для цитирования: Богомолова Т.С., Ковыршин С.В., Выборнова И.В., Оганесян Э.Г., Козлова О.П., Гордеева С.А., Борзова Ю.В., Босак И.А., Чилина Г.А., Игнатьева С.М., Павлова И.Э., Орлова О.Е., Тараскина А.Е., Васильева Н.В. Распространенность множественной устойчивости к противогрибковым лекарственным средствам среди возбудителей инвазивного кандидоза. Проблемы медицинской микологии. 2024; 26 (4): 3-10. DOI: 10.24412/1999-6780-2024-4-3-10

For citation: Bogomolova T.S., Kovyrshin S.V., Vybornova I.V., Oganesyanyan E.G., Kozlova O.P., Gordeeva S.A., Borzova Yu.V., Bosak I.A., Chilina G.A., Ignatieva S.M., Pavlova I.E., Orlova O.E., Taraskina A.E., Vasilyeva N.V. Prevalence of antifungal multidrug resistance among invasive candidiasis pathogens. Problems in Medical Mycology. 2024; 26 (4): 3-10. (In Russ). DOI: 10.24412/1999-6780-2024-4-3-10

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ МНОЖЕСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К ПРОТИВОГРИБКОВЫМ ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВАМ СРЕДИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНВАЗИВНОГО КАНДИДОЗА

¹Богомолова Т.С. (зав. лаб., доцент)*, ¹Ковыршин С.В. (м.н.с.), ¹Выборнова И.В. (н.с.), ¹Оганесян Э.Г. (ассистент кафедры), ¹Козлова О.П. (доцент), ¹Гордеева С.А. (ассистент кафедры), ¹Борзова Ю.В. (доцент, зав. клиникой), ¹Босак И.А. (с.н.с.), ¹Чилина Г.А. (зав. лаб.), ¹Игнатьева С.М. (в.н.с.), ¹Павлова И.Э. (н.с.), ²Орлова О.Е. (зав. лаб.), ¹Тараскина А.Е. (зам. директора, зав. лаб.), ¹Васильева Н.В. (директор института, зав. кафедрой)

¹Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина; кафедра медицинской микробиологии; кафедра клинической микологии, аллергологии и иммунологии), Санкт-Петербург; ²Городская клиническая больница №67 им. Л.А. Ворохобова, Москва, Россия

Изучена чувствительность к противогрибковым лекарственным средствам (ПГЛС) 893 штаммов *Candida spp.*, выделенных от пациентов с инвазивным кандидозом в 2023-2024 гг. Выявлена множественная устойчивость к двум классам ПГЛС – азолам и полиенам: у 57% штаммов *Candida auris*, 17,6% – *Pichia kudriavzevii*, 5,2% – *Nakaseomyces glabratus*, 0,5% – *Candida parapsilosis*, 0,4% – *Candida albicans*. Резистентность к эхинокандинам обнаружена у одного штамма редкого возбудителя инвазивного кандидоза – *Clavispora lusitaniae*.

Ключевые слова: инвазивный кандидоз, чувствительность, резистентность, множественная устойчивость, противогрибковые лекарственные средства, азола, амфотерицин В, эхинокандины

PREVALENCE OF ANTIFUNGAL MULTIDRUG RESISTANCE AMONG INVASIVE CANDIDIASIS PATHOGENS

¹Bogomolova T.S. (head of the laboratory, associate professor), ¹Kovyrshin S.V. (junior scientific researcher), ¹Vybornova I.V. (scientific researcher), ¹Oganesyanyan E.G. (assistant of the department), ¹Kozlova O.P. (associate professor), ¹Gordeeva S.A. (assistant of the department), ¹Borzova Yu.V. (head of the clinic, associate professor), ¹Bosak I.A. (senior scientific researcher), ¹Chilina G.A. (head of the laboratory), ¹Ignatieva S.M. (leading scientific researcher), ¹Pavlova I.E. (scientific researcher), ²Orlova O.E. (head of the laboratory), ¹Taraskina A.E. (deputy director, head of the laboratory), ¹Vasilyeva N.V. (director of the institute, head of the department)

¹North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov (Kashkin Research Institute of Medical Mycology; Department of Medical Microbiology; Department of Clinical Mycology, Allergology and Immunology), St. Petersburg; ²Vorokhobov City Clinical Hospital № 67, Moscow, Russia

Antifungal susceptibility profiles of 893 Candida spp. isolates from patients with invasive candidiasis obtained in 2023-2024 yrs. were determined. Multidrug resistance to azoles and polyenes was found in Candida auris (57%), Pichia kudriavzevii (17,6%), Nakaseomyces glabratus (5,2%), Candida parapsilosis (0,5%), Candida albicans (0,4%). One strain of rare yeasts Clavispora lusitaniae was resistant to echinocandins.

Key words: invasive candidiasis, susceptibility, resistance, multidrug resistance, antifungal agents, azoles, amphotericin B, echinocandins

* Контактное лицо: Богомолова Татьяна Сергеевна,
e-mail: tatiyana.bogomolova@szgmu.ru

ВВЕДЕНИЕ

Инвазивный кандидоз (ИК) – тяжелая внутрибольничная инфекция, возникающая преимущественно у пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ). По данным глобальной оценки, ежегодное количество случаев кандидемии, подтвержденных высевам возбудителей из крови, составляет около 626 тыс. с показателем летальности 35% [1]. Для лечения больных ИК существует ограниченное количество противогрибковых лекарственных средств (ПГЛС), применяемых в клинической практике и относящихся к 4 классам: азола (флуконазол, итраконазол, вориконазол, позаконазол, изавуконазол), полиены (амфотерицин В и его липидные формы), эхинокандины (каспофунгин, микафунгин, анидулафунгин) и пиримидины (флуцитозин). В настоящее время проходят клинические испытания несколько противогрибковых препаратов, в том числе относящихся к новым классам лекарственных средств: фосманогепикс (ингибитор фермента Gwt1), ибрексафунгерп (тритерпеноид), олорофим (новый ингибитор фермента дигирооротат дегидрогеназы), опельконазол (новый триазол, предназначенный для ингаляций) и резафунгин (эхинокандин, предназначенный для приема один раз в неделю) [2]. Для внедрения этих новых ПГЛС в широкую клиническую практику потребуется определенное время. В последние годы международные эксперты сообщают о нарастании резистентности среди возбудителей ИК, включая появление множественной устойчивости к нескольким классам ПГЛС [3, 4]. В Российской Федерации сведения о распространенности возбудителей ИК с множественной устойчивостью к ПГЛС ограничены.

Цель работы: установить распространенность множественной устойчивости к ПГЛС среди возбудителей ИК, выделенных от пациентов в Российской Федерации в 2023-2024 гг.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы грибов. В исследование включили 893 штамма грибов рода *Candida*, выделенных в 2023-2024 гг. из стерильных локусов пациентов с ИК, в том числе: из крови – 804 штамма, из перитонеальной жидкости – 65, спинномозговой жидкости – 13, других видов биоматериала – 11. Видовую идентификацию культур дрожжей проводили методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass-Spectrometry). Изученные штаммы *Candida* spp. депонированы в Российской коллекции патогенных грибов (РКПГ) на базе НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина СЗГМУ им. И.И. Мечникова.

Метод определения чувствительности к ПГЛС.

Определение чувствительности микромицетов к ПГЛС осуществляли методом серийных микроразведений в жидкой питательной среде согласно протоколу EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) E.DEF 7.4 (2023) [5] и в соответствии с Российскими рекомендациями «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (версия 2024-02) [6]. Использовали субстанции флуконазола, позаконазола, вориконазола, итраконазола, анидулафунгина, микафунгина и каспофунгина («Sigma-Aldrich», США), амфотерицина В («USP», США), питательную среду RPMI-1640 с глутамином, без бикарбоната (20,8 г/л), с 2% глюкозы (36 г/л) и MOPS (69,06 г/л) («Sigma-Aldrich», США), доведенную до pH=7,0. Культуры дрожжей выращивали в течение 24 часов на агаре Сабуро при температуре 37 °С. Затем клеточную массу снимали с поверхности агара бактериологической петлей, суспендировали в пробирке с 0,85% стерильным раствором натрия хлорида до достижения мутности инокулюма 0,5 ЕД по МакФарланду, после чего разбавляли в 10 раз. Диапазон концентраций в микропланшете для позаконазола, вориконазола, итраконазола, амфотерицина В, анидулафунгина, микафунгина и каспофунгина составлял 4-0,007 мг/л, для флуконазола – 32-0,125 мг/л. Учет результатов проводили с помощью измерения оптической плотности в плоскодонных лунках планшет для микроразведения, используя планшетный спектрофотометр «Multiskan GO» («Thermo Fisher Scientific Oy», Финляндия). Значение минимальной подавляющей концентрации (МПК) соответствовало концентрации препарата в лунке, в которой отмечали значительное снижение оптической плотности $\geq 50\%$ по сравнению с лункой, не содержащей ПГЛС (для амфотерицина В $\geq 90\%$). Для контроля качества использовали штамм *C. parapsilosis* ATCC 22019 (РКПГ-1245). Отнесение штаммов *Candida* spp. к той или иной категории чувствительности (чувствительный, промежуточный или резистентный) проводили согласно клинически значимым пороговым значениям МПК в соответствии с документом EUCAST (версия 4, 2023) [7].

К множественно устойчивым относили штаммы *Candida* spp., проявившие промежуточную чувствительность или резистентность к ПГЛС из двух различных классов [2].

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программы «STATISTICA for Windows» (версия 10).

Использованные сокращения. АМВ – амфотерицин В, FLU – флуконазол, VOR – вориконазол, POS – позаконазол, ITR – итраконазол, AND – анидулафунгин, MIC – микафунгин, CAS – каспофунгин.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Профили чувствительности возбудителей ИК к ПГЛС.

В настоящее время в документах EUCAST указаны клинически значимые пороговые значения МПК ПГЛС для 6 наиболее распространенных представителей рода *Candida*: *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *Nakaseomyces glabratus* (*C. glabrata*), *Pichia kudriavzevii* (*C. krusei*), *C. parapsilosis* и *C. tropicalis* [7]. Для редких видов дрожжевых грибов, включая *Candida* spp., в 2024 г. EUCAST был издан документ, позволяющий интерпретировать значения МПК ПГЛС для применения в клинической практике, несмотря на отсутствие

утвержденных пограничных значений [8]. В отношении патогена *C. auris* эксперты EUCAST выражают беспокойство о проблеме определения МПК амфотерицина В и ее интерпретации при использовании коммерческих тест-систем и микробиологических анализаторов [9]. В рамках проводимого исследования нами были использованы критерии CDC (Centers for Disease Control), согласно которым штамм *C. auris* считали резистентным к амфотерицину В при МПК >1 мг/л [10].

Полученные нами фенотипические профили резистентности *Candida* spp. приведены в таблице 1.

Таблица 1

Фенотипические профили резистентности возбудителей ИК

Вид, n	Уровень резистентности, %										
	AMB	FLU	VOR	POS	ITR	AND	MIC	CAS	Поли- (2 препарата)	Поли- (3 и более)	Мульти-
<i>C. parapsilosis</i> , 402	1,7	5,2	3,2	0,7	0	0	0	НД	1,7	0,7	0,5
<i>C. albicans</i> , 234	1,3	4,3	3	0	0,9	0	0	НД	1,7	0,9	0,4
<i>C. auris</i> , 116	57	100	НД	НД	НД	0	0	0	НД	НД	57
<i>Nakaseomyces glabratus</i> (<i>C. glabrata</i>), 76	7,9	58	31,6	14,5	10,5	0	0	НД	14,5	10,5	5,2
<i>C. tropicalis</i> , 34	0	17,6	2,9	2,9	5,9	0	НД	НД	5,9	2,9	0
<i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>C. krusei</i>), 17	17,6	100	НД	НД	НД	0	НД	НД	НД	НД	17,6
<i>Clavispora lusitanae</i> (<i>C. lusitanae</i>), 14	НД	НД	НД	НД	НД	7,1	7,1	7,1	НД	7,1	НД

Примечание: 1) НД – не утверждены критерии интерпретации МПК ПГЛС. 2) Поли- – полирезистентность к ПГЛС (резистентность к нескольким ПГЛС из одного класса), Мульти- – множественная устойчивость к ПГЛС.

Как видно из представленных данных, штаммы, резистентные к препаратам класса азолов – флуконазолу и вориконазолу, встречаются у всех видов *Candida* spp., для которых утверждены пороговые значения МПК. Среди 402 штаммов *C. parapsilosis* чувствительными к флуконазолу были 360 (89,6%), с промежуточной чувствительностью – 21 (5,2%), резистентными – 21 (5,2%). К вориконазолу были чувствительны 380 (94,5%) штаммов этого вида, промежуточную чувствительность проявили 9 (2,2%), резистентность – 13 (3,2%) штаммов. Полирезистентность к двум азоловым препаратам – флуконазолу и вориконазолу проявили 7 штаммов (1,7%), три штамма (0,7%) были полирезистентны к трем азолам: флуконазолу, вориконазолу и позаконазолу.

Чувствительными к флуконазолу были 211 (90%) штаммов *C. albicans*, 13 (5,6%) проявили промежуточную чувствительность, 10 (4,3%) штаммов были резистентны. Выявлено 7 штаммов (3%), резистентных к вориконазолу, и 4 штамма (1,7%) с промежуточной чувствительностью к этому ПГЛС. Полирезистентность к флуконазолу и вориконазолу обнаружена у 4-х штаммов *C. albicans* (1,7%). Выявлены 2 штамма (0,9%), полирезистентные к флуконазолу, во-

риконазолу и итраконазолу. Резистентность к позаконазолу среди изученных штаммов *C. albicans* не обнаружена.

Штаммы вида *C. tropicalis* (34 штамма) по чувствительности к флуконазолу распределились следующим образом: чувствительные – 24 (70,6%), промежуточные – 4 (11,8%), резистентные – 6 (17,6%). К вориконазолу чувствительными были 32 штамма (94%). Один штамм (2,9%) проявил промежуточную чувствительность и 1 штамм (2,9%) был полирезистентным к четырем азолам: флуконазолу, вориконазолу, итраконазолу и позаконазолу.

Изученные 76 штаммов *Nakaseomyces glabratus* (*C. glabrata*) проявили более высокий уровень резистентности к азолам в сравнении с *C. albicans* и *C. parapsilosis*. К флуконазолу резистентность выявлена у 58% штаммов, к вориконазолу – у 31,6%, к позаконазолу – у 14,5%, итраконазолу – у 10,5%. Полирезистентными к двум азолам были 14,5% штаммов, к трем/четырем препаратам – 10,5%.

Все изученные штаммы *C. auris* и *Pichia kudriavzevii* проявили резистентность к флуконазолу, что обусловлено их природной устойчивостью к этому ПГЛС.

Штаммы, резистентные к амфотерицину В, отмечены у всех видов *Candida spp.*, для которых существуют пороговые значения МПК, за исключением *C. tropicalis* (табл. 1). Наибольшая частота резистентности к этому препарату обнаружена у штаммов *C. auris* – 57%. Множественная устойчивость к двум классам ПГЛС (азолам и полиенам) для изученных 116 штаммов *C. auris* также составила 57%.

Среди штаммов *Pichia kudriavzevii* устойчивыми к амфотерицину В и мультирезистентными были 17,6%. Уровни устойчивости к амфотерицину В и множественной устойчивости к азолам и полиенам для штаммов *Nakaseomyces glabratus* составили 7,9% и 5,2% соответственно.

Более низкие уровни резистентности к амфотерицину В и мультирезистентности наблюдали у штаммов *C. parapsilosis* (1,7% и 0,5% соответственно), а также у *C. albicans* (1,3% и 0,4% соответственно).

Среди штаммов, относящихся к видам, для которых установлены клинически значимые пороговые

значения МПК эхинокандинов, резистентность к этому классу ПГЛС не обнаружена.

Впервые в России выявлен штамм *Clavispora lusitaniae* (*C. lusitaniae*), относящийся к редким дрожжам, который, согласно рекомендациям EUCAST [8], следует считать резистентным ко всем трем представителям классов эхинокандинов – препаратам выбора при системных грибковых инфекциях и кандидемии. Изолят был выделен из крови ребенка в отделении реанимации новорожденных.

Сравнительная характеристика распространенности резистентности для штаммов *Candida spp.*, выделенных из различных стерильных биосубстратов.

Результаты изучения профилей фенотипической резистентности культур, выделенных из различных в норме стерильных локусов, приведены в таблицах 2-4.

Таблица 2

Фенотипическая резистентность к ПГЛС штаммов *Candida spp.*, выделенных из крови

Вид, n	Уровень резистентности, %										
	AMB	FLU	VOR	POS	ITR	AND	MIC	CAS	Поли- (2 препарата)	Поли- (3 и более)	Мульти-
<i>C. parapsilosis</i> , 392	1,8	5,4	3,3	0,8	0,3	0	0	НД	1,8	0,8	0,5
<i>C. albicans</i> , 190	1	4,2	2,6	0	1	0	0	НД	1,6	1	0
<i>C. auris</i> , 106	38,7	100	НД	НД	НД	0	0	0	НД	НД	38,7
<i>Nakaseomyces glabratus</i> (<i>C. glabrata</i>), 60	10	58,3	33,3	13,3	10	0	0	НД	15	10	6,7
<i>C. tropicalis</i> , 32	0	18,8	3,1	3,1	6,3	0	НД	НД	0	3,1	0
<i>Clavispora lusitaniae</i> (<i>C. lusitaniae</i>), 13	НД	НД	НД	НД	НД	7,9	7,9	7,9	НД	7,9	НД
<i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>C. krusei</i>), 11	27,3	100	НД	НД	НД	0	НД	НД	НД	НД	27,3

Примечание: 1) НД – не утверждены критерии интерпретации МПК ПГЛС. 2) Поли- – полирезистентность к ПГЛС (резистентность к нескольким ПГЛС из одного класса), Мульти- – множественная устойчивость к ПГЛС.

Таблица 3

Фенотипическая резистентность к ПГЛС штаммов *Candida spp.*, выделенных из брюшной полости

Вид, n	Уровень резистентности, %										
	AMB	FLU	VOR	POS	ITR	AND	MIC	CAS	Поли- (2 препарата)	Поли- (3 и более)	Мульти-
<i>C. albicans</i> , 37	2,7	2,7	2,7	0	0	0	0	НД	0	0	2,7
<i>Nakaseomyces glabratus</i> (<i>C. glabrata</i>), 12	0	50	16,7	16,7	НД	0	0	НД	16,7	8,3	0
<i>C. auris</i> , 4	75	100	НД	НД	НД	0	0	0	НД	НД	75
<i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>C. krusei</i>), 4	0	100	НД	НД	НД	0	НД	НД	НД	НД	0
<i>C. parapsilosis</i> , 4	0	0	0	0	0	0	0	НД	0	0	0
<i>C. dubliniensis</i> , 2	0	0	0	0	0	НД	НД	НД	0	0	0
<i>Clavispora lusitaniae</i> (<i>C. lusitaniae</i>), 1	НД	НД	НД	НД	НД	НД	НД	НД	НД	НД	НД
<i>C. tropicalis</i> , 1	0	0	0	0	0	0	НД	НД	0	0	0

Примечание: 1) НД – не утверждены критерии интерпретации МПК ПГЛС. 2) Поли- – полирезистентность к ПГЛС (резистентность к нескольким ПГЛС из одного класса), Мульти- – множественная устойчивость к ПГЛС.

Фенотипическая резистентность к ПГЛС штаммов *Candida* spp., выделенных из ликвора

Вид, n	Уровень резистентности, %										
	AMB	FLU	VOR	POS	ITR	AND	MIC	CAS	Поли- (2 препарата)	Поли- (3 и более)	Мульти-
<i>C. albicans</i> , 5	0	20	20	0	0	0	0	НД	20	0	0
<i>C. parapsilosis</i> , 4	0	0	0	0	0	0	0	НД	0	0	0
<i>Nakaseomyces glabratus</i> (<i>C. glabrata</i>), 3	0	100	67	33,6	67	0	0	НД	33,6	67	0
<i>C. dubliniensis</i> , 1	0	0	0	0	0	НД	НД	НД	0	0	0

Примечание: 1) НД – не утверждены критерии интерпретации МПК ПГЛС, 2) Поли- – полирезистентность к ПГЛС (резистентность к нескольким ПГЛС из одного класса), Мульти- – множественная устойчивость к ПГЛС.

Большая часть (86%) резистентных, поли- и мультирезистентных к ПГЛС штаммов *Candida* spp. была выявлена при посеве крови. При сравнении уровней фенотипической резистентности для видов *C. albicans* и *Nakaseomyces glabratus* (*C. glabrata*), выделенных из крови, ликвора и брюшной полости, достоверных различий между штаммами из различных локализаций не обнаружено.

ОБСУЖДЕНИЕ

Распространение резистентности *Candida* spp. к ПГЛС, в том числе множественной устойчивости, представляет глобальную угрозу для общественного здравоохранения. Учащаются сообщения о штаммах с множественной резистентностью к азолам, эхинокандинам и полиенам у некоторых видов *Candida* spp., таких как *Nakaseomyces glabratus* и *C. auris*. В связи с отсутствием утвержденных пороговых значений МПК ПГЛС в отношении *C. auris* для оценки чувствительности штаммов этого вида используют временные критерии, предложенные CDC. Штаммы *C. auris*, относящиеся к Южно-Азиатской кладе I, резистентны к флуконазолу, проявляют переменную чувствительность к амфотерицину В и могут приобретать устойчивость к эхинокандинам [11]. О мультирезистентных к азолам и полиенам штаммах *C. auris* сообщали в США в 2019 г. При исследовании 277 штаммов *C. auris*, выделенных от пациентов в Нью-Йорке, резистентными к флуконазолу были 99,6%, к амфотерицину В – 61,3% [4]. Описан случай развития пан-резистентности к четырем классам ПГЛС у штаммов *C. auris*, выделенных от пациента, перенесшего множественную пересадку органов брюшной полости. Сравнение 19 штаммов, выделенных от больного в течение 72 дней методом полногеномного секвенирования, показало близкое родство штаммов и принадлежность их к отдельному субкластеру NY Южно-Азиатской клады I. Два из 19 штаммов были пан-резистентны к азолам, эхинокандинам, амфотерицину В и флуцитозину. При филогенетическом анализе ОНВ (однонуклеотидных вариантов) полногеномных данных отмечено, что эволюция штаммов *C.*

auris происходила внутри больницы и в организме пациента, без заноса новых штаммов извне [11]. В исследовании возбудителей кандидемии, проведенном в Европе в 2018-2022 гг., резистентность к амфотерицину В среди возбудителей ИК, включая *C. auris*, не выявлена, а устойчивость к эхинокандинам была обнаружена только у 10 штаммов *Candida* spp. из 399 изученных (2,5%). Штаммов со множественной устойчивостью к ПГЛС не наблюдали [12]. Возможно, это связано с принадлежностью штаммов *C. auris* к различным кладам, характеризующимся разными профилями чувствительности к ПГЛС. В проведенном нами исследовании выявлен высокий уровень множественной устойчивости к азолам и полиенам у штаммов *C. auris* (57%) при отсутствии резистентности к эхинокандинам. Изученные нами штаммы принадлежали к Южно-Азиатской кладе I.

Природной резистентностью к флуконазолу и потенциальной множественной устойчивостью обладают штаммы *P. kudriavzevii* [13]. Описаны случаи развития резистентности к эхинокандинам у штаммов этого вида в связи с мутациями в гене FKS1 [14], а также быстрое развитие резистентности к эхинокандинам в процессе лечения каспофунгином [15]. По многолетним наблюдениям, в различных странах мультирезистентность *P. kudriavzevii* к классам эхинокандинов и азолов составляет от 2,8% до 72% [16]. В нашем исследовании штаммы *P. kudriavzevii*, резистентные к эхинокандинам, не обнаружены. Нами выявлена множественная устойчивость к флуконазолу и амфотерицину В у 17,6% изученных штаммов *P. kudriavzevii*. В Японии, при ретроспективном анализе данных о возбудителях кандидемии в период 2010-2019 гг., установлено, что *P. kudriavzevii* составила 1,8% всех выделенных штаммов, а уровень резистентности к амфотерицину В и, соответственно, множественной устойчивости к азолам и полиенам, варьировался от 3,2% до 35,7% в разные годы наблюдения [17]. Сообщают о резистентности к амфотерицину В штаммов *P. kudriavzevii* в Индии (13%) и Иране (40%) [16].

Nakaseomyces glabratus характеризуется природной сниженной чувствительностью к флуконазолу и быстрым развитием приобретенной устойчивости на

фоне применения ПГЛС. *N. glabratus* обладает способностью быстро приобретать вторичную резистентность к флуконазолу и развивать устойчивость к эхинокандинам [3, 18-20], являющимся препаратами выбора при лечении больных ИК, особенно для терапии кандидозного перитонита, где данный вид занимает второе место в этиологической структуре [21]. Сообщения о мультирезистентности к азолам и эхинокандинам *N. glabratus* регистрируют преимущественно в Северной Америке, ее уровень в многоцентровых исследованиях 2010-2016 гг. достигал 3% [18, 22]. У штаммов *N. glabratus*, выделенных от пациентов в России, резистентность к эхинокандинам не выявлена [19], что подтверждает и проведенное нами исследование.

У 5,2% изученных нами штаммов *N. glabratus* обнаружена множественная устойчивость к азолам и амфотерицину В. По данным экспертов Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), штаммы *N. glabratus* обычно чувствительны к амфотерицину В, хотя имеются отдельные сообщения об уровнях резистентности для этого вида гриба от 2% до 10% [18].

Новой проблемой для глобального здравоохранения является появление множественной резистентности к азолам и эхинокандинам у ранее относившегося к чувствительным возбудителям вида *C. parapsilosis* [23]. Штаммы этого вида способны вызывать длительные внутрибольничные вспышки инвазивного кандидоза. В Испании уровень резистентности штаммов *C. parapsilosis* к препаратам азолового ряда во время пандемии COVID-19 достигал 60% [24]. В Турции зарегистрированы вспышки инвазивного кандидоза, обусловленные штаммами *C. parapsilosis* с множественной устойчивостью к азолам и эхинокандинам [25, 26]. В нашем исследовании уровень резистентности штаммов *C. parapsilosis* к флуконазолу составил 5,2%. Штаммы, резистентные к эхинокандинам, не обнаружены.

Согласно полученным нами результатам, уровни множественной устойчивости к азолам и амфотерицину В для штаммов *C. parapsilosis* и *C. albicans* были низкими: 0,5% и 0,4% соответственно. При мета-анализе опубликованных данных установлено, что глобальная распространенность резистентности *C. parapsilosis* к амфотерицину В составляет 1,3% [23, 27].

Сведения о распространенности штаммов *C. albicans*, резистентных к азолам, полученные в разных

странах, сопоставимы с результатами нашего исследования и варьируются от 0% до 5% при достаточно обширных выборках [28]. В Швейцарии выявлены 4 случая кандидемии, обусловленные штаммами *C. albicans*, резистентными к эхинокандинам, в том числе один штамм был множественно устойчив к эхинокандинам и флуконазолу. Резистентность к эхинокандинам развилась на фоне терапии препаратами из этого класса ПГЛС [29]. Среди изученных нами штаммов *C. albicans*, резистентные к эхинокандинам, не обнаружены.

В странах Азии, ближнего Востока и Латинской Америки исследователи фиксируют увеличение доли штаммов *C. tropicalis*, резистентных к препаратам азолового ряда [30]. Распространенность резистентности штаммов *C. tropicalis* к флуконазолу, по данным исследователей из Европы, составляет 3-5%, в Азиатской же части мира он достигает 20-40% [31-32], что соотносится с полученными в России результатами – 17,6%. Резистентность *C. tropicalis* к амфотерицину В и эхинокандинам встречается редко (<1%), хотя имеются сообщения о выделении таких штаммов от пациентов в США, Китае и Индии [33].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования установлено, что множественная устойчивость к двум классам ПГЛС (азолам и полиенам) среди возбудителей инвазивного кандидоза наиболее часто встречается у штаммов *Candida auris*. Множественная устойчивость выявлена также у штаммов *Pichia kudriavzevii* и *Nakaseomyces glabratus*. Учитывая глобальную тенденцию нарастания резистентности грибов рода *Candida* к ПГЛС, необходимо постоянно проводить локальный микробиологический мониторинг профилей чувствительности дрожжевых грибов в стационарах и, в перспективе, генетических детерминант резистентности возбудителей инвазивного кандидоза.

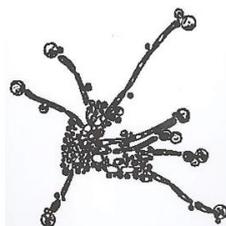
Исследование выполнено в рамках темы Государственного задания Минздрава России «Геномная эпидемиология множественно- и экстремально-устойчивых к антимикробным препаратам, бактериальных и грибковых возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи» НИОКТР № 124021400014-5.

ЛИТЕРАТУРА

1. Denning D.W. Global incidence and mortality of severe fungal disease. *The Lancet Infectious Diseases*. 2024; 24 (7): e428-438. /doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00692-8
2. Hoenigl M., Sprute R., Egger M., et al. The antifungal pipeline: fosmanogepix, ibrexafungerp, olorofim, opelconazole and rezafungin. *Drugs*. 2021; 81 (15): 1703-1729. doi: 10.1007/s40265-021-01611-0
3. Arendrup M.C., Patterson T. Multidrug-resistant candida: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. *J. Infect. Dis.* 2017; 216 (suppl_3): S445-S451. doi: 10.1093/infdis/jix131
4. Ostrowsky B., Greenko J., Adams E., et al. *Candida auris* isolates resistant to three classes of antifungal medications New-York, 2019. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2020; 69 (1): 6-9. doi.org/10.15585/mmwr.mm6901a2
5. Guinea J., Meletiadis J., Arikan-Akdagli S., et al. EUCAST Definitive Document E.Def 7.4 (2023). Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. www.eucast.org
6. *Российские рекомендации*. Определение чувствительности микроорганизмов к antimicrobным препаратам. Версия 2024-02. Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и antimicrobной химиотерапии. [Russian recommendations. Determination of the sensitivity of microorganisms to antimicrobial drugs. Version 2024-02. Interregional Association for Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. (In Russ.)].
7. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*. Overview of antifungal ECOFFs and clinical breakpoints for yeasts, moulds and dermatophytes using the EUCAST E.Def 7.4, E.Def 9.4 and E.Def 11.0 procedures. Version 4, 2023. www.eucast.org
8. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*. EUCAST guidance on Interpretation of MICs for rare yeast without breakpoints in breakpoint tables (2024-06-19). www.eucast.org
9. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*. Antifungal susceptibility testing of amphotericin B - problems detected with several commercially available products. 2024. https://www.eucast.org/ast-of-bacteria/warnings.
10. *Antifungal susceptibility testing for Candida auris*. April, 23, 2024 //cdc.gov/candida-auris/hcp/laboratories/antifungal-susceptibility-testing.html
11. Jacobs S.E., Jacobs J.L., Dennis E.K., Taimur S., et al. *Candida auris* pan-drug-resistant to four classes of antifungal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2022; 66 (7): e0005322. doi: 10.1128/aac.00053-22
12. Arendrup M.C., Arikan-Akdagli S., Jorgensen K.M., Barac A. et al. European candidaemia is characterized by notable differential epidemiology and susceptibility pattern: Results from the ECMM *Candida* III Study. *J. of Infection*. 2023; 87 (5): 428-437. doi.org/10.1016/j.jinf.2023.08.001
13. Jamiu A.T., Albertyn J., Sebolai O.M., Pohl C.H. Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. *Med Mycol*. 2021 Jan 4;59(1):14-30. doi: 10.1093/mmy/myaa031
14. Jensen R.H., Justesen U.S., Rewes A., et al. Echinocandin failure case due to a previously unreported FKS1 mutation in *Candida krusei*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2014; 58 (6): 3550-3552. doi: 10.1128/AAC.02367-14
15. Forastiero A., Garcia-Gil E., Rivero-Menendez O., et al. Rapid development of *Candida krusei* echinocandin resistance during caspofungin therapy. *Antimicrob. Agents. Chemother*. 2015; 59 (11): 6975-82. doi: 10.1128/AAC.01005-15
16. Nguyen A., Kim H.Y., Stocker S., et al. *Pichia kudriavzevii* (*Candida krusei*): A systematic review to inform the World Health Organisation priority list of fungal pathogens. *Medical Mycology*. 2024; 62 (6): myad132. doi.org/10.1093/mmy/myad132
17. Kajihara T., Yahara K., Nagi M., et al. Distribution, trends, and antifungal susceptibility of *Candida* species causing candidemia in Japan, 2010-2019: A retrospective observational study based on national surveillance data. *Medical Mycology*. 2022; 60: myac071. doi.org/10.1093/mmy/myac071
18. Beardsley J., Kim H.Y., Dao A., et al. *Candida glabrata* (*Nakaseomyces glabrata*): A systematic review of clinical and microbiological data from 2011 to 2021 to inform the World Health Organization Fungal Priority Pathogens List //Medical Mycology. 2024; 62: myae041. doi.org/10.1093/mmy/myae041
19. Веселов А.В. Резистентность *Candida glabrata* к эхинокандинам: некоторые аспекты проблемы. *Клиническая микробиология и antimicrobная химиотерапия*. 2019; 21 (4): 324-329. [Veselov A.V. Some issues of the resistance of *Candida glabrata* to echinocandins. *Clinical microbiology and antimicrobial chemotherapy*. 2019; 21 (4): 324-329. (In Russ.)]. doi.org/10.36488/cmac.2019.4.324-329
20. Alexander B.D., Johnson M., Pfeiffer C., et al. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clinical infectious diseases*. 2013; 56 (12): 1724-1732. doi.org/10.1093/cid/cit136
21. Vergidis P., Clancy C., Shields R.K., et al. Intra-abdominal candidiasis: the importance of early source control and antifungal treatment. *PLOS One*. 2016; 11 (4): e0153247. doi.org/10.1371/journal.pone.0153247

22. *Toda M.* Population-based active surveillance for culture-confirmed candidemia-four sites, United States, 2012-2016. *MMWR. Surveillance Summaries.* 2019; 68. doi.org/10.15585/mmwr.ss6808a1
23. *Yamin D., Akanmu M.H., Mutair A.A., et al.* Global prevalence of antifungal resistant *Candida parapsilosis*: a systematic review and meta-analysis. *Tropical Medicine and Infectious Diseases.* 2022; 7: 188. doi.org/10.3390/tropicalmed7080188
24. *Trevijano-Contador N., Torres-Cano A., Carballo-Gonzalez C., et al.* Global emergence of resistance to fluconazole and voriconazole in *Candida parapsilosis* in tertiary hospitals in Spain during the COVID-19 pandemic. *Open Forum Infectious Diseases.* 2022; 9 (11): ofac605. doi:10.1093/ofid/ofac605
25. *Daneshnia F., Junior J.N., Ilkit M., et al.* Worldwide emergence of fluconazole-resistant *Candida parapsilosis*: current framework and future research roadmap. *The Lancet Microbe.* 2023; 4 (6): e470-e480. doi.org/10.1016/S2666-5247(23)00067-8
26. *Daneshnia F., Floyd D.J., Ryan A.P., et al.* Evaluation of outbreak persistence caused by multidrug-resistant and echinocandin-resistant *Candida parapsilosis* using multidimensional experimental and epidemiological approaches. *Emerg. Microbes. Infect.* 2024; 13 (1): 2322655. doi: 10.1080/22221751.2024.2322655
27. *Desnos-Ollivier M., Lortholary O., Bretagne S., Dromer F.* Azole susceptibility profiles of more than 9,000 clinical yeast isolates belonging to 40 common and rare species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2021; 65 (6): e 02615-20. doi.org/10.1128/AAC.02615-20
28. *Guo L. N., Yu S.Y., Xiao M., et al.* Species distribution and antifungal susceptibility of invasive candidiasis: a 2016-2017 multicenter surveillance study in Beijing, China. *Infection and Drug Resistance.* 2020; 13: 2443-2452. doi.org/10.2147/IDR.S255843
29. *Coste A.T., Kritikos A., Li J., et al.* Emerging echinocandin-resistant *Candida albicans* and *glabrata* in Switzerland *Infection.* 2020; 48 (5): 761-766. doi: 10.1007/s15010-020-01475-8
30. *Arastehfar A., Hilmioglu-Polat S., Daneshnia F., et al.* Recent increase in the prevalence of fluconazole-non-susceptible *Candida tropicalis* blood isolates in Turkey: Clinical implication of azole-non-susceptible and fluconazole tolerant phenotypes and genotyping. *Frontiers in microbiology.* 2020; 11: 587278. doi.org/10.3389/fmicb.2020.587278
31. *Fan X., Xiao M., Liao K., et al.* Notable increasing trend in azole non-susceptible *Candida tropicalis* causing invasive candidiasis in China (August 2009 to July 2014): molecular epidemiology and clinical azole consumption. *Frontiers in microbiology.* 2017; 8: 464. doi.org/10.3389/fmicb.2017.00464
32. *Chong Y., Shimoda S., Yakushiji H., et al.* Fatal candidemia caused by azole-resistant *Candida tropicalis* in patients with hematological malignancies. *Journal of Infection and Chemotherapy.* 2012; 18 (5): 741-746. doi.org/10.1007/s10156-012-0412-9
33. *Lima R., Ribeiro F., Colombo A., de Almeida J.N.* The emerging threat antifungal-resistant *Candida tropicalis* in humans, animals and environment. *Frontiers in fungal biology.* 2022; 3: 957021. doi.org/10.3389/ffunb.2022.957021

Поступила в редакцию журнала 18.11.24
Принята к печати 28.11.24



Для цитирования: Хостелиди С.Н., Шадринова О.В., Шурпицкая О.А., Игнатьева С.М., Борзова Ю.В. Фузариоз легких у иммунокомпетентной пациентки (обзор литературы и описание клинического случая). Проблемы медицинской микологии. 2024; 26 (4): 11-21. DOI: 10.24412/1999-6780-2024-4-11-21

For citation: Khostelidi S.N., Shadrivova O.V., Shurpitskaya O.A., Ignatieva S.M., Borzova Yu.V. Lungs fusariosis in an immunocompetent patient (literature review and description of the clinical case). Problems in Medical Mycology. 2024; 26 (4):11-21. (In Russ). DOI: 10.24412/1999-6780-2024-4-11-21

ФУЗАРИОЗ ЛЕГКИХ У ИММУНОКОМПЕТЕНТНОЙ ПАЦИЕНТКИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ И ОПИСАНИЕ КЛИНИЧЕСКОГО СЛУЧАЯ)

Хостелиди С.Н. (доцент)*, Шадринова О.В. (доцент), Шурпицкая О.А. (зав. лаб.), Игнатьева С.М. (в.н.с.), Борзова Ю.В. (зав. клиникой)

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

Fusarium spp. вызывают у людей широкий спектр инфекций, включая поверхностные, локальные и диссеминированные микотические поражения. Клиническая форма фузариоза во многом зависит от иммунного статуса хозяина и входных ворот инфекции. При этом поверхностный и локальный фузариоз развивается преимущественно у иммунокомпетентных пациентов, а инвазивный и диссеминированный – у иммунокомпрометированных. Факторы риска инвазивного фузариоза включают длительную нейтропению и T-клеточный иммунодефицит, особенно у реципиентов трансплантатов гемопоэтических стволовых клеток с тяжелой реакцией «трансплантат против хозяина». Изолированное поражение легких встречается редко, наиболее часто оно развивается как вторичный очаг диссеминации. Прогноз при данном заболевании неблагоприятный и в значительной степени определяется степенью иммуносупрессии и распространенностью инфекции, при этом смертность среди пациентов с устойчивой нейтропенией и диссеминацией достигает 100%. При поражении легких летальность составляет от 12 до 50%. В статье представлен клинический случай микотической пневмонии, обусловленной *Fusarium spp.*, и анализ публикаций из баз данных PubMed, WoS, Wiley Interscience и e-library на октябрь 2024 г.

Ключевые слова: *Fusarium spp.*, антимикотическая терапия, вориконазол, микотическая пневмония, фузариоз легких, фузариоз

LUNGS FUSARIOSIS IN AN IMMUNOCOMPETENT PATIENT (LITERATURE REVIEW AND DESCRIPTION OF THE CLINICAL CASE)

Khostelidi S.N. (associate professor), Shadrivova O.V. (associate professor), Shurpitskaya O.A. (head of the laboratory), Ignatieva S.M. (leading scientific researcher), Borzova Yu.V. (head of the clinic)

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

Fusarium spp. cause a wide range of infections in humans, including superficial, local and disseminated mycotic lesions. The clinical form of fusariosis largely depends on the immune status of the host and the entrance gate of infection. At the same time, superficial and local fusariosis develops mainly in immunocompetent patients, while invasive and disseminated – in immunocompromised. Risk factors of invasive fusariosis include long-term neutropenia and T-cell immunodeficiency, especially in recipients of hematopoietic stem cell transplants with a severe graft-versus-host reaction. Isolated lung damage is rare, most often it develops as a secondary focus of dissemination. The prognosis for this disease is unfavorable and is largely determined by the degree of immunosuppression and the prevalence of infection, while mortality among patients with persistent neutropenia and dissemination reaches 100%. In case of lung damage, the mortality rate ranges from 12 to 50%. The article presents a clinical case of mycotic pneumonia caused by *Fusarium spp.*, and an analysis of publications from the databases PubMed, WoS, Wiley Interscience and e-library for October 2024.

Key words: *Fusarium spp.*, antimycotic therapy, voriconazole, mycotic pneumonia, pulmonary fusariosis, fusarium

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

ВВЕДЕНИЕ

Fusarium spp. распространены повсеместно и являются патогенами растений, участвующими в их разложении и вызывающими различные заболевания. У людей виды *Fusarium* приводят к развитию широкого спектра инфекций, включая поверхностные микозы (такие как кератит и онихомикоз), локальные инвазивные или диссеминированные инфекции, причем последние встречаются почти исключительно у пациентов с тяжелым иммунодефицитом [1]. Виды *Fusarium* могут также вызывать аллергические заболевания (синусит) у иммунокомпетентных лиц и микотоксикоз – у людей и животных после употребления в пищу продуктов, загрязненных токсин-продуцирующими *Fusarium* spp. [2].

Род *Fusarium* включает более 300 филогенетически различных видов, сгруппированных в более чем 20 видовых комплексов [3]. Однако виды *Fusarium*, вызывающие заболевания у людей, систематизированы в семь видовых комплексов: *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. fujikuroi*, *F. incarnatum-equiseti*, *F. chlamidosporum*, *F. dimerum* и *F. sporotrichioides*. Около 70% случаев инвазивных заболеваний, возникающих у иммунокомпрометированных пациентов, вызваны комплексами видов *F. solani* и *F. oxysporum*. *F. solani* также является наиболее частым возбудителем фузариум-кератита [4] и (вместе с *F. oxysporum*) причиной большинства случаев онихомикоза, вызванного видами *Fusarium* spp. [2]. Обнаружение роста этих грибов в клинических образцах не составляет трудности в обычной микологической лаборатории. Виды *Fusarium* быстро растут на многих средах без циклогексимида. Род легко идентифицируется по типичным макроконидиям, однако для установления вида требуются молекулярные методы или матрично-активированная лазерная ионизационно-десорбционная времяпролетная масс-спектрометрия (MALDI-TOF-MS). Обязательным условием успешной терапии является определение чувствительности микромицетов. Многие из видов *Fusarium* обладают природной резистентностью к отдельным видам антимикотиков. Все чаще выявляются штаммы, устойчивые к традиционно применяемому вориконазолу [5], хотя клинически значимые патогены на сегодняшний день не имеют стандартных значений (МПК).

В тканях гифы *Fusarium* гиалиновые, септированные, с ветвлением под острым углом, внешне очень похожи на *Aspergillus* spp. Поскольку внешний вид этих гиалиновых гифов в тканях довольно схож у разных родов грибов, термин «гиалогифомикоз» более уместен, когда род не идентифицирован. Тест на галактоманнан при фузариозе также может быть положительным [6]. Все это подчеркивает важность получения культуры из биосубстратов из очага поражения и определения ее чувствительности, т.к. ворико-

назол, являющийся препаратом выбора при инвазивном аспергиллезе, может быть неэффективен для лечения фузариоза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В статье представлен клинический случай микотической пневмонии, вызванной *Fusarium* sp., у иммунокомпетентной пациентки. Для постановки диагноза инвазивного микоза использовали клинические и лабораторные критерии, предлагаемые EORTC/MSGERC, 2020 (European Organization for Research and Treatment of Cancer/ Mycoses Study Group Education and Research Consortium) [3]. Авторы провели анализ данных, размещенных в базах PubMed, WoS, Wiley Interscience и e-library (на октябрь 2024 г.). Поиск информации осуществляли с помощью следующих ключевых слов: *Fusarium* spp., antifungal therapy, voriconazole, mycotic pneumonia, pulmonary fusariosis.

Клинический случай.

Пациентка А. (39 лет) обратилась в городскую больницу в марте 2024 г. с жалобами на лихорадку 38,5 °С, сухой кашель, выраженную общую слабость.

Из анамнеза выяснено, что считает себя больной с февраля 2024 г., когда перенесла вирусную инфекцию (COVID-19). Лечилась амбулаторно, без эффекта.

При обращении в поликлинику по месту жительства выявлена пневмония, в связи с чем назначена антибактериальная терапия (амоксциллин с клавулановой кислотой – 1 г 2 раза в сутки внутрь) в течение 10 дней амбулаторно. Лечение было неэффективным.

В связи с продолжающейся лихорадкой до 38,5°С бригадой скорой медицинской помощи пациентка доставлена в городскую больницу. Из анамнеза дополнительно выяснено, что женщина проживала в помещении с визуальным поражением стен микромицетами.

При поступлении на отделение состояние пациентки удовлетворительное, сознание ясное, кожные покровы обычной окраски, нормальной влажности, периферические лимфатические лимфоузлы не пальпируются, частота дыхательных движений (ЧДД) – 19 в минуту, уровень насыщения крови кислородом (SpO₂) – 96%. При аускультации: дыхание жесткое, разнокалиберные хрипы преимущественно в нижних отделах легких, тоны сердца без особенностей. Частота сердечных сокращений (ЧСС) – 82 уд/мин., артериальное давление (АД) на обеих руках – 120 и 82 мм рт. ст. Живот при пальпации мягкий, безболезненный. Симптом поколачивания отрицательный, дисурических расстройств нет.

При обследовании в клиническом анализе крови: лейкоциты – 11,3х10⁹/л, нейтрофилы – 71,8%, лимфоциты – 15,7%, моноциты – 6,7%, эозинофилы – 5,5%,

эритроциты – $4,53 \times 10^{12}/л$, гемоглобин – 117 г/л; в биохимическом анализе крови: общий белок – 74 г/л, глюкоза – 6,0 ммоль/л, креатинин – 79 мкмоль/л, аланинаминотрансфераза (АЛТ) – 48 ед/л, аспартатаминотрансфераза (АСТ) – 27 ед/л, билирубин – 4,5 ммоль/л, С-реактивный белок (СРБ) – 93,1 мг/л.

По данным компьютерной томографии (КТ) от 21.03.24 г.: в правом легком полисегментарно, а также в S6, S10 левого легкого определяются участки смешанной инфильтрации с видимыми просветами бронхов, S6 справа с симптомом «обратного гало»; ход и проходимость трахеи и бронхов 1-4 порядка не нарушены; в плевральных полостях жидкости нет (Рис.1)

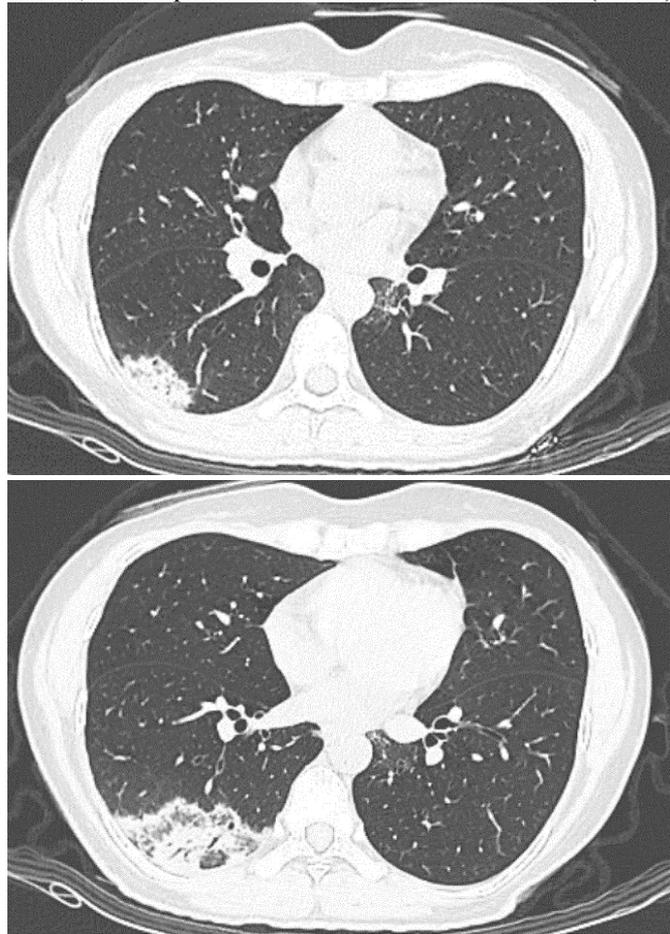


Рис. 1. КТ легких от 21.03.24 г.: картина двусторонней полисегментарной пневмонии (вероятно, смешанной вирусно-бактериальной этиологии).

Выполнена фибробронхоскопия, заключение: признаки катарального эндобронхита. В образцах бронхоальвеолярной жидкости (БАЛ) при посеве бактерии и микромицеты не обнаружены. При проведении тестов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) к вирусам гриппа, COVID-19, к микобактериям получены отрицательные результаты.

Продолжена антибактериальная терапия цефтриаксоном – 2 г в сутки внутривенно болюсно, без эффекта (сохранялась лихорадка до 38,6 °С, воспалительная активность в виде СРБ – 91,9 мг/л).

25.03.24 г. была скорректирована антибактериальная терапия: сульцеф – 2 г 2 раза в сутки с левофлоксацином – 500 мг 2 раза в сутки внутривенно капельно, без эффекта (сохранялась лихорадка до фебрильных цифр, СРБ – до 100 мг/л).

На повторной КТ легких 25.03.24 г.: по сравнению с КТ от 21.03.24 г. обнаружено увеличение участка инфильтрации в S6 правого легкого и появление новых субплевральных участков инфильтрации в S2, S3 правого легкого (Рис.2).

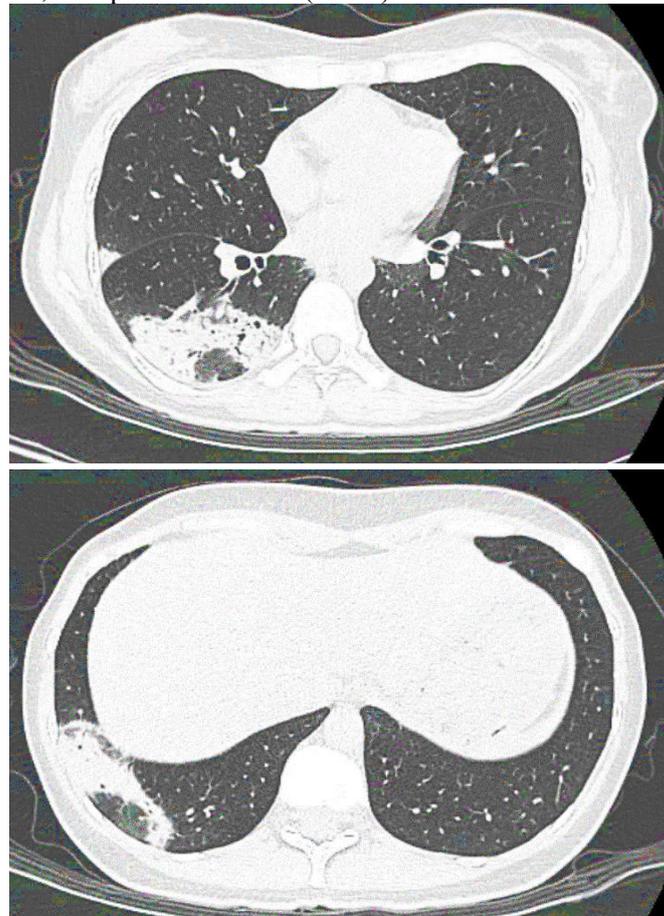


Рис. 2. КТ легких от 25.03.24 г.: картина двусторонней полисегментарной пневмонии.

Проведена очередная коррекция антибактериальной терапии: цефтаролина фосамил – 600 мг 2 раза в сутки и левофлоксацин – 500 мг 2 раза в сутки.

На фоне лечения наблюдали положительную клинико-лабораторную динамику в виде снижения температуры тела (субфебрильные цифры – 37,4-37,5°С), снижение воспалительной лабораторной активности (СРБ от 05.04.24 г. – 52 мг/л).

Через неделю у пациентки отмечали вновь повышение температуры тела до 38,3 °С.

06.04.24 г. была выполнена повторная КТ легких: при сравнении с исследованием от 29.03.24 г. в динамике выявлено появление участка инфильтрации в S3 левого легкого, а также увеличение области поражения ранее визуализируемых (Рис. 3).

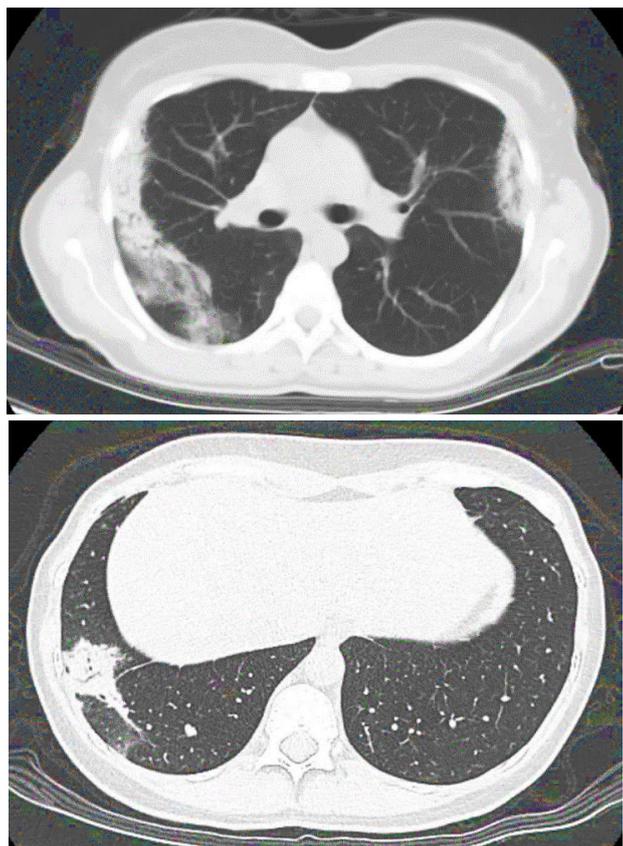


Рис. 3. КТ легких 06.04.24 г.: признаки двусторонней полисегментарной пневмонии.

При повторной фибробронхоскопии в посевах выделен *Streptococcus pyogenes* (10^3 КОЕ/мл), чувствительный к ванкомицину, линезолиду. В связи с чем был назначен меропенем – 1 г 3 раза в сутки, ванкомицин – 1 г 2 раза в сутки внутривенно капельно, без эффекта.

Пациентка проконсультирована пульмонологом. С учетом клиничко-лабораторных данных, результатов инструментальных методов исследования был заподозрен инвазивный аспергиллез легких. Рекомендовано выполнение фибробронхоскопии с исследованием промывных вод бронхов на грибы (микроскопия, посев, тест на галактоманнан) в НИИ им П.Н. Кашкина. Назначен флуконазол – 100 мг в сутки (выполнено 4 инфузии). Коррекция антимикотической терапии была запланирована по данным обследования.

По результатам дообследования из БАЛ был выделен антиген к *Aspergillus* spp., индекс оптической плотности – 1,67 (положительный). После чего флуконазол был отменен и назначен вориконазол – 12 мг/кг в сутки в первый день и далее – 8 мг/кг в сутки. На фоне лечения вориконазолом сохранялась фебрильная температура тела (38,1-38,0 °C).

Выполнена КТ легких в динамике (Рис. 3): учитывая длительное сохранение инфильтративных изменений в легких на фоне проводимой терапии (отсутствие ответа на антибиотики) и мигрирующий характер инфильтратов с симптомом «обратного гало»,

изменения следует дифференцировать между интерстициальной пневмонией по типу организующейся пневмонии, микотическим поражением.

При микроскопии БАЛ нитчатые и дрожжеподобные грибы не обнаружены. При посеве выделены мицелиальные грибы и *Candida dubliniensis* (10^4 КОЕ/мл).

Пациентка направлена на консультацию в НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина СЗГМУ им. И.И. Мечникова, где была проконсультирована сотрудниками кафедры клинической микологии, аллергологии и иммунологии. По результатам дополнительного обследования культура микромицетов была идентифицирована как *Fusarium* spp. (Рис. 4)



А



Б

Рис. 4. А) микроскопия культуры, Б) рост колонии *Fusarium* species.

На фоне проводимой терапии была купирована лихорадка, но изменения на КТ легких сохранялись в прежнем объеме. На основании полученной положительной клинической динамики состояния пациентки, но отсутствия рентгенологической динамики консилиумом врачей было принято решение об эффективности вориконазола и наличия чувствительности к нему возбудителя, но недостаточной. В связи с чем доза препарата была увеличена до 300 мг 2 раза в сутки.

На КТ легких в динамике через 1 месяц отмечены значимые уменьшения инфильтративных изменений (Рис. 5).

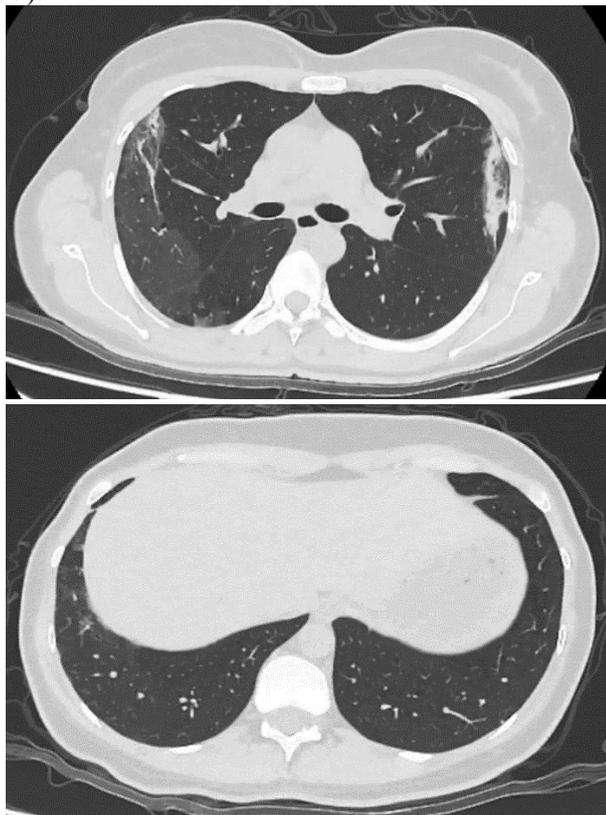


Рис. 5. КТ легких от 05.2024 г. Положительная динамика в виде уменьшения инфильтративных изменений.

Пациентка продолжила антимикотическую терапию еще 6 недель. В динамике: полный регресс инфильтративных изменений в обоих легких; признаки пневмофиброза.

Противогрибковое лечение было отменено. Общая продолжительность терапии фузариум-пневмонии составила 12 недель.

ОБСУЖДЕНИЕ

Инвазивный фузариоз относят к редким микотическим инфекциям. В настоящее время «редкими» считают инвазивные микозы, развивающиеся у 1 из 100 000 человек в год [7]. Виды *Fusarium* обычно вызывают локализованные инфекционные процессы у иммунокомпетентных пациентов, тогда как фузариоз легких развивается редко.

Основные возбудители фузариоза: *F. oxysporum*, *F. solani* (новое наименование – *Neocosmospora solani*), *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. equiseti* и *F. chlamydosporum*. Распространены микромицеты повсеместно, наибольшее число их обнаруживают в почве, а также на растениях, в том числе на зернах злаков. Представители рода *Fusarium* могут образовывать биопленки на внутривенных катетерах, а также на мягких контактных линзах. Известно, что фузариоз наиболее часто развивается у

лиц с гематологическими заболеваниями, в основном при остром лейкозе и после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). За 10-летний период в онкологическом центре в США 79% случаев инвазивного фузариоза были диагностированы у пациентов с острым лейкозом [2]. Nucci M. и Marr K. в более раннем исследовании продемонстрировали, что основные фоновые заболевания – это острый миелобластный и острый лимфобластный лейкоз (92%). В то же время 8% больных не имели гематологической природы фонового заболевания [8].

Основными факторами риска развития инвазивных микозов являются: нейтропения ($<0,5 \times 10^9/\text{л}$ в течение >10 дней); активное гематологическое заболевание; состояние после алло-ТГСК; состояние после трансплантации солидного органа; длительное применение кортикостероидов в терапевтической дозе $\geq 0,3$ мг/кг в течение ≥ 3 недель за последние 60 дней; лечение иммунодепрессантами Т-клеток, такими как ингибиторы кальциневрина, блокаторы фактора некроза опухоли- α , лимфоцитарно-специфические моноклональные антитела, иммуносупрессивные аналоги нуклеозидов за последние 90 дней; терапия В-клеточными иммунодепрессантами, такими как препарат Брутона, ингибиторы тирозинкиназы, (например, ибрутиниб); наследственный тяжелый иммунодефицит (например, хроническая гранулематозная болезнь или тяжелый комбинированный иммунодефицит); острая реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) III или IV степени с поражением кишечника, легких или печени, рефрактерная к терапии стероидами первой линии [3].

Все эти факторы риска применимы и для инвазивного фузариоза. Относительно новым фактором стало использование ибрутиниба. В дополнение к своему эффекту ингибирования киназы Брутона ибрутиниб ингибирует различные компоненты иммунной системы; фактически, он одобрен для лечения резистентной к кортикостероидам хронической РТПХ [9]. Эпидемиологические исследования демонстрируют увеличение распространенности инвазивных микозов у пациентов с хроническими лимфопролиферативными заболеваниями, получающих ибрутиниб, особенно инвазивного аспергиллеза (ИА) [10]. Было показано, что у большинства пациентов инвазивный фузариоз развивается на фоне нейтропении. В то же время известны случаи формирования инфекции без нейтропении, например, в Испании в 24% случаев диагностировали заболевание у лиц без данного фактора риска [11].

У иммунокомпетентных пациентов развитие фузариоза чаще всего было связано с травматической имплантацией возбудителя [4] или с вдыханием воздуха, содержащего повышенную концентрацию спор грибов [12]. Дыхательные пути являются наиболее частыми входными воротами для инвазивного фуза-

риоза. Другие возможные пути проникновения – желудочно-кишечный тракт и центральные венозные катетеры. Поверхностный онихомикоз, ассоциированный с *Fusarium* spp., у лиц с факторами риска может привести к диссеминированному заболеванию [13]. Микромицеты *Fusarium* spp. всегда присутствуют в воздухе внутри и вне помещений [14].

Локализация инфекционного процесса напрямую связана с входными воротами инфекции. Различают следующие клинические варианты: поражения роговицы глаза, кожи и ее производных, подкожной клетчатки у иммунокомпетентных пациентов и пневмонии, синуситы, поражение центральной нервной системы (ЦНС) и диссеминацию у иммунокомпрометированных пациентов [15, 16].

Пневмония при фузариозе может возникать как первичное поражение легких или как часть диссеминированного процесса. В обзоре 317 случаев инвазивного фузариоза у больных с иммунодефицитом пневмонии отмечены у 145 человек (46%), большинство поражений было двусторонним (73%) [12]. При этом в другом исследовании у 90% пациентов диагностировали фузариоз легких как вторичный очаг диссеминированной инфекции и только у 10% инфекция была первичной [2].

Патогенетические механизмы, как и клинические проявления фузариум-пневмонии у иммунокомпрометированных лиц, сходны с таковыми при инвазивном аспергиллезе. Однако фузариум-пневмония, чаще двусторонняя, в течение нескольких дней может переходить в диссеминированный вариант и редко приводит к формированию полостей [2] (табл. 1).

Таблица 1

Сходства и различия между инвазивным фузариозом и инвазивным аспергиллезом.

	Фузариоз	Аспергиллез
Наиболее распространенная настройка	Острый лейкоз, индукционная ремиссия и аллотГСК	Острый лейкоз, индукционная ремиссия и аллотГСК
Способ приобретения	Дыхательные пути и кожа в местах распада	Воздушные пути
Больничные резервуары	Воздух и вода	Воздух и вода
Клинические проявления		
Высокая температура	Да, 96%	Да, 64%
Пневмония	Да, 50%	Да, 89%
Узелки с признаком гало	Да, 23%	Да, 62%
Центрилобулярные микроузелки	Да, 54%	Да, 44%
Инфильтраты деревьев в почках	Да, 8%	Да, 12%
Синусит	Да, 38%	Да, 64%
Поражения кожи	Да, 73%	Нет
Положительные посевы крови	Частый	Редкий
Положительный сывороточный галактоманнан	Да, 73%	Да, 89%
Положительный (1-3)-β-D-глюкан	Да	Да

Кроме поражения легких, придаточных пазух носа и кожи, описаны также случаи перитонита, артрита, остеомиелита и т.д. [16-18].

На КТ легких, как правило, визуализируют очаги менее 3 см или инфильтраты с кавитацией и консолидацией [19]. В работе Sassi С. и соавторов мелкие очаги и инфильтраты типа «дерево в почках» чаще встречались при фузариозе (78%) [20].

Рентгенологическая симптоматика развивается аналогично инвазивному аспергиллезу: сначала формируются инфильтраты по типу «матового стекла», затем – центрилобулярные микроузелки и инфильтраты в виде почек деревьев. По мере прогрессирования заболевания происходят ангиоинвазия и формирование симптома «гало». Однако, если КТ грудной клетки проводится через несколько дней, признак гало исчезает, и преобладают неспецифические альвеолярные консолидации [21]. Могут появляться воздушные полунные поражения и полости, совпадающие с последующим восстановлением нейтрофилов [20]. На основании этих результатов рентгенологическая картина вряд ли позволит отличить фузариоз от аспергиллеза.

Прежде всего, подтверждение диагноза инвазивного фузариоза осуществляется за счет микологического обследования. Микологические методы диагностики включают в себя прямую микроскопию, посев и гистологическое исследование.

В настоящее время микроскопия – один из основных методов диагностики. Проводят микроскопию как нативных, так и окрашенных препаратов. Наиболее часто мазок окрашивают по Граму, гематоксилин-эозином, по Цилю-Нильсону, тушью, калькофлюором белым. Первые типы окраски используют для выполнения дифференциально-диагностических тестов, для исключения бактериальной инфекции. С учетом быстрого прогрессирования инфекции, прямая микроскопия с окраской калькофлюором белым и просмотром в люминесцентном микроскопе является наиболее оперативным методом диагностики. Культуральное исследование преимущественно актуально у пациентов с подозрением на фунгемию. Отметим, что хранение материала в холодильнике и гомогенизация его перед посевом могут уменьшать вероятность выделения микромицетов в культуре.

Fusarium spp. образуют пушистые, плоские или раскидистые колонии. Цвет колонии сверху белый, кремовый, рыжевато-коричневый, лососевый, желтый, красный, розовый или фиолетовый; на нижней стороне он может быть рыжевато-коричневым, красным, темно-фиолетовым. Микромицеты обычно производят как макроконидии, так и микроконидии из тонких фиалидов. Макроконидии бесцветные, от двух до нескольких клеток, от веретенообразной до серповидной формы, в основном с удлинённой апикальной клеткой и базальной клеткой на ножке; мик-

роконидии – от 1 до 2 клеток, гиалиновые, грушевидные, от веретенообразных до яйцевидных, прямые или изогнутые [22]. При получении культуры необходимо определение чувствительности микромицетов к антимикотическим препаратам, т.к. грибы рода *Fusarium* чувствительны к амфотерицину В, вориконазолу, позаконазолу, изавуконазолу и нечувствительны к другим триазолам и эхинокандинам [23].

Гистологическое исследование – «золотой стандарт» диагностики инвазивных микозов, вызванных редкими возбудителями. В препаратах обнаруживают некротизированные абсцессы и инфаркты, воспалительную инфильтрацию, а также элементы гиалиновых гифов, септированных и ветвящихся под острым углом. Обычное окрашивание гематоксилином и эозином может показать только клеточную стенку без структур внутри или иногда очень разрушенные гифы. Окрашивания, которые могут помочь выделить грибковую стенку: использование метенамин-серебра по Грокотту (GMS) и реактива Шиффа (ПАС-реакция) [24].

Серологическая диагностика для фузариоза может быть эффективной. Исследование галактоманнана (ГМ) в сыворотке крови, БАЛ и ликворе проводят с целью дифференциальной диагностики с инвазивным аспергиллёзом [25]. При фузариозе тест на ГМ допустимо применять в диагностических целях. Определяют галактоманнан методом «Platelia Aspergillus EIA BioRad» у иммунокомпрометированных пациентов в гематологических отделениях рутинно. У больных фузариозом определение ГМ в сыворотке крови имеет чувствительность 83% и специфичность 67%, причем 73% тестов были положительными еще до начала клинической манифестации заболевания [26]. При положительном результате теста рекомендуется дальнейшее определение ГМ в сыворотке крови для мониторинга эффективности лечения. Тест на (1-3)- β -D-глюкан обычно положительный у пациентов, страдающих от инвазивных микозов, вызванных редкими возбудителями [27]. Однако тест не в состоянии отличить, например, *Fusarium* spp. от других возбудителей, таких как *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Trichosporon* spp.

Молекулярные методы исследования пока не являются обычными для диагностики грибковых инфекций, вызванных редкими возбудителями. Диагностика мукормикоза методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в настоящее время активно разрабатывается. Опубликованы работы с использованием ПЦР ткани легкого с высоким уровнем чувствительности (100%). При этом в 2% случаев авторы отмечали ложноположительные результаты [28, 29].

Виды *Fusarium* демонстрируют *in vitro* высокие минимальные подавляющие концентрации (МПК) почти для всех противогрибковых препаратов. В целом МПК выше для вориконазола и позаконазола (по сравнению с амфотерицином (АМФ) В и выше для

комплекса *F. solani* (FSSC) (по сравнению с изолятами комплекса *F. oxysporum* (FOSC)). В многоцентровом исследовании 1150 изолятов, принадлежащих к различным комплексам видов *Fusarium*, были протестированы против различных антимикотиков с целью установления эпидемиологических пороговых значений. Для FSSC (608 изолятов) диапазоны МПК были $\leq 0,25$ -16 мкг/мл для АМФ В, 0,5->16 мкг/мл – для вориконазола и 1->16 мкг/мл – для позаконазола. Для FOSC диапазоны МПК составили $\leq 0,25$ -16 мкг/мл для АМФ В, 0,5->16 мкг/мл – для вориконазола и 0,5->16 мкг/мл – для позаконазола [30].

Была оценена активность изавуконазола против 14 изолятов видов *Fusarium*, включая 7 FSSC и 6 комплексов *F. fujikuroi* (FFSC). МПК-50 составила >4 мкг/мл (диапазон 2->8). При использовании тех же изолятов МПК 50 вориконазола была 8 мкг/мл (диапазон 2->8) [31]. В другом исследовании восприимчивость к изавуконазолу была проверена у 75 клинических изолятов. МПК 50 против 31 изолята FFSC, 22 FSSC и 17 изолятов FOSC составила >16 мкг/мл (диапазон – 4->16), >16 мкг/мл (диапазон – 4->16) и 8 мкг/мл (диапазон – 2->16) соответственно [32, 33].

Активность *in vitro* двух новых противогрибковых препаратов была оценена против изолятов видов *Fusarium*. Первый – олорофим, препарат, принадлежащий к классу препаратов оротомида. МПК-50 против 45 изолятов FOSC и 16 изолятов FSSC составила 0,5 мкг/мл (диапазон – 0,06->4) и >4 мкг/мл (диапазон – 1->4) соответственно. При тестировании против тех же изолятов МПК-50 для вориконазола и АМФ В была 8 мкг/мл (диапазон – 4-16) и 2 мкг/мл (диапазон – 1-4) соответственно против FOSC, >16 мкг/мл (диапазон – 2->16) и 1 мкг/мл (диапазон – 0,25-4) соответственно против FSSC [33]. Другим агентом является фосманогепикс (активное соединение маногепикс). Диапазон МПК против 49 изолятов FOSC и 19 FSSC составил $\leq 0,015$ -0,125 мкг/мл и $\leq 0,015$ -0,25 мкг/мл соответственно. Для сравнения, диапазоны МПК против вориконазола были 4-16 мкг/мл для FOSC и 2->16 мкг/мл для FSSC [34].

Ключевой вопрос, касающийся восприимчивости возбудителя к противогрибковым препаратам при инвазивном фузариозе, сосредоточен вокруг того, в какой степени результаты активности *in vitro* могут помочь в выборе подходящего лечения. Другими словами, какова корреляция между МПК и исходом? По данным Rodríguez P.N. с коллегами, никакой корреляции между МПК и исходом не обнаружено в мышинной модели инвазивного фузариоза *in vivo* [35]. Так, среди 22 человек, получавших монотерапию вориконазолом, МПК-50 среди лиц, которые выжили и умерли, составляли 4 мкг/мл и 8 мкг/мл соответственно ($p=0,68$). Аналогичным образом, никакой корреляции между МПК и клиническим исходом не наблюдали среди 21 пациента, получавшего лечение

амфотерицином В отдельно или в сочетании с вориконазолом (29 человек) [36]. Отсутствие корреляции между МПК и результатами согласуется с данными исследования, в котором представлены схожие показатели ответа с вориконазолом и АМФ В, несмотря на более высокие МПК для вориконазола, наблюдаемые в тестах на восприимчивость к противогрибковым препаратам [37]. Анализ чувствительности микромицетов к антимикотикам, проведенный в Бразилии, показал, что новые триазолы и АМФ В обладают наибольшей антифунгальной активностью против возбудителей фузариоза (табл. 2) [38]. Подобные исследования в Российской Федерации (РФ) ранее не проводили.

Таблица 2

Минимальная ингибирующая концентрация изолятов *Fusarium spp.*

Изолят	Минимальная ингибирующая концентрация (мкг мл ⁻¹)							
	АМФ В	ИТР	ВОР	ПОЗА	ИЗА	ДИФ	ТЭБ	ПРО
<i>F. keratoplasticum</i> (FSSC 2)	0,5-4	64	8-64	64	64	64	64	64
<i>F. petrophilum</i> (FSSC 1)	0,2-2	64	от 4 до 8	64	32-64	64	64	64
<i>Fusarium sp.</i> (FSSC 25)	0.5	64	32	64	64	64	32	64
<i>Fusarium sp.</i> (FSSC 25)	1	64	8	64	64	64	64	64
<i>F. solani sensu stricto</i> (FSSC 5)	2	64	8	64	64	64	64	64
<i>F. solani sensu stricto</i> (FSSC 5)	0.5	64	16	64	64	64	64	64
<i>Fusarium sp.</i> (FSSC 18)	2	64	8	64	64	64	32	64
<i>Fusarium sp.</i> (FSSC 35)	0.5	64	16	64	64	64	64	64
<i>Fusarium sp.</i>	1	64	4	64	32	64	64	64
<i>F. falciforme</i> (FSSC 3+4)	0.5	64	2	64	32	64	16	16
<i>Fusarium solani f. xanthoxyli</i>	1	64	64	64	64	64	64	64
<i>F. pseudensiforme</i>	1	64	8	64	32	64	16	64
<i>F. subglutinans</i>	1	64	2	0.5	4	8	4	2
<i>F. verticillioides</i>	2	64	4	1	4	8	4	8
<i>F. napiforme</i>	2	64	2	64	4	4	2	8

FSSC – комплекс видов *F. solani*; АМФ В – амфотерицин В; ИТР – итраконазол; ВОР – вориконазол; ПОЗА – позаконазол; ИЗА – изавуконазол; ДИФ – дифеноконазол; ТЭБ – тебуконазол; ПРО – пропиконазол.

Несмотря на проведение антимикотической терапии, инвазивный фузариоз связан с высоким уровнем смертности, составляя 22-57% [1, 11, 22]. При этом выживаемость пациентов в первую очередь зависит от наличия и степени выраженности факторов риска, а также формы заболевания. По данным Muhammed M. и соавторов, смертность при фузариозе кожи составляет 40% и 37,5% у лиц с поражением легких [26].

В другом исследовании смертность пациентов с диссеминированным, кожным и легочным фузариозом составила 30%, 18% и 0% соответственно [2]. Смертность при поражении легких при сохраняющихся факторах риска может достигать 75% [26]. При анализе прогностических факторов у гематологических больных с инвазивным фузариозом отмечена 90-дневная вероятность выживания 0%, если у пациентов была стойкая нейтропения, и они получали кортикостероиды; 4% – у тех, у кого была только стойкая нейтропения; 30% – у лиц, получавших кортикостероиды, но не страдавших нейтропенией, и 67% – у пациентов без любого из этих двух факторов [8, 39].

В РФ описаны единичные случаи фузариоза. Чаще всего заболевание развивалось на фоне онкогематологической патологии и было связано с высокой летальностью до 100% при сохраняющейся нейтропении. Описаны микотический синусит, поражение легких и диссеминированный инфекционный процесс, ассоциированный с *Fusarium spp.* [40-42].

При анализе литературных данных мы обнаружили только 3 статьи, описывающих первичное поражение легких у иммунокомпетентных пациентов (табл.3).

Таблица 3

Публикации случаев инвазивного фузариоза легких у иммунокомпетентных пациентов

Автор	Год	Пол	История болезни	Патология	Лечение	Исход
Gorman S.R., et al. [43]	2006	Ж	ХОБЛ	Пневмония	ГМ+	Вориконазол, 4 мес. жива
Sreeram S., et al. [44]	2017	Ж, 79 лет	нет	Пневмония	ГМ+	Вориконазол, 4 мес. жива
Seung Yoon Chae, et al. [45]	2020	Ж, 68 лет	ФР нет	Пневмония двухсторонняя	ГМ+ кровь	Вориконазол, АМФ В жива
Хостелиди С.Н. и др. (данная публикация)	2024	Ж, 39 лет	нет	Пневмония	ГМ+	Вориконазол, 4 мес. жива

Все описанные случаи были связаны с повреждением эпителия дыхательных путей (после вирусной инфекции или при хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ)) и массивной ингаляцией спор грибов. Пневмония развивалась через 2-3 недели после вирусной инфекции или обострения ХОБЛ. У всех пациентов был положительным тест на галактоманнан из БАЛ, и они получали лечение вориконазолом. В одном случае потребовалась комбинированная терапия с липосомальным амфотерицином В. В описанном нами случае дозировка вориконазола была выше стандартной. Все пациенты выжили. Средняя продолжительность лечения – 3 месяца.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В статье представлен редкий случай *Fusarium*-пневмонии у иммунокомпетентной пациентки. Данные клинического и рентгенологического обследования демонстрируют неспецифичность симптомов заболевания. Несмотря на отсутствие типичных факторов риска, диагностический поиск причины заболевания был продолжен, что привело к выявлению и идентификации возбудителя, назначению адекватной терапии. Повышенная настороженность врачей-пульмонологов помогла своевременно поставить диагноз и провести лечение.

Таким образом, пневмонию, ассоциированную с *Fusarium* spp., необходимо учитывать в плане дифференциально-диагностических мероприятий у пациентов без факторов риска инвазивных микозов. С учетом ограниченного спектра антимикотических препаратов, эффективно работающих против данного вида микромицетов, следует идентифицировать вид возбудителя и проводить тест на чувствительность для своевременного назначения таргетной антимикотической терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hassler A., Lieb A., Seidel D. et al. Disseminated fusariosis in immunocompromised children – analysis of recent cases identified in the global fungiscope registry. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2017; 36 (2): 230-231. doi:10.1097/INF.0000000000001396
2. Nucci M., Barreiros G., Akiti T., et al. Invasive fusariosis in patients with hematologic diseases. *J. Fungi (Basel)*. 2021; 7 (10): 815. doi:10.3390/jof7100815
3. O'Donnell K., Al-Hatmi A.M.S., Aoki T., et al. No to neocosmospora: phylogenomic and practical reasons for continued inclusion of the *Fusarium solani* species complex in the genus *Fusarium*. *mSphere*. 2020; 5 (5): e00810-20. doi:10.1128/mSphere.00810-20
4. Хостелиди С.Н., Харитоновна Н.Н., Шадривова О.В. и др. Микотический эндофтальмит (описание клинического случая и обзор литературы). *Проблемы медицинской микологии*, 2023; 25 (4): 29-38. [Khostelidi S.N., Kharitonova N.N., Shadrivova O.V., et al. Mycotic endophthalmitis (clinical case description and literature review). *Problems in Medical Mycology*. 2023; 25 (4): 29-38. (In Russ.)]. doi:10.24412/1999-6780-2023-4-29-38
5. Marinelli T., Kim H.Y., Halliday C.L., et al. *Fusarium* species, *Scedosporium* species, and *Lomentospora prolificans*: A systematic review to inform the World Health Organization priority list of fungal pathogens. *Med. Mycol.* 2024; 62 (6): myad128. doi:10.1093/mmy/myad128
6. Nucci M., Carlesse F., Cappellano P., et al. Earlier diagnosis of invasive fusariosis with *Aspergillus* serum galactomannan testing. *PLoS One*. 2014; 9 (1): e87784. doi: 10.1371/journal.pone.0087784
7. Seidel D., Durán Graeff L.A., Vehreschild M.J.G.T., et al. FungiScope™ -Global Emerging Fungal Infection Registry. *Mycoses*. 2017; 60 (8): 508-516. doi:10.1111/myc.12631
8. Nucci M., Marr K.A., Vehreschild M.J., et al. Improvement in the outcome of invasive fusariosis in the last decade. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014; 20 (6): 580-5. doi:10.1111/1469-0691.12409
9. Miklos D., Cutler C.S., Arora M., et al. Ibrutinib for chronic graft-versus-host disease after failure of prior therapy. *Blood*. 2017; 130 (21): 2243-2250. doi:10.1182/blood-2017-07-793786
10. Chan T.S., Au-Yeung R., Chim C.S., et al. Disseminated fusarium infection after ibrutinib therapy in chronic lymphocytic leukaemia. *Ann. Hematol.* 2017; 96 (5): 871-872. doi:10.1007/s00277-017-2944-7
11. Pérez-Nadales E., Alastruey-Izquierdo A., Linares-Sicilia M.J., et al. Invasive fusariosis in nonneutropenic patients, Spain, 2000-2015. *Emerg. Infect. Dis.* 2021; 27 (1): 26-35. doi:10.3201/eid2701.190782
12. Nucci F., Nouér S.A., Capone D., et al. Fusariosis. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2015; 36 (5): 706-14. doi:10.1055/s-0035-1562897
13. Varon A.G., Nouer S.A., Barreiros G., et al. Superficial skin lesions positive for *Fusarium* are associated with subsequent development of invasive fusariosis. *J. Infect.* 2014; 68 (1): 85-9. doi:10.1016/j.jinf.2013.08.011
14. Moretti M.L., Busso-Lopes A.F., Tararam C.A., et al. Airborne transmission of invasive fusariosis in patients with hematologic malignancies. *PLoS One*. 2018; 13 (4): e0196426. doi:10.1371/journal.pone.0196426
15. Delia M., Monno R., Giannelli G., et al. Fusariosis in a patient with acute myeloid leukemia: a case report and review of the literature. *Mycopathologia*. 2016; 181 (5-6): 457-463. doi.org/10.1007/s11046-016-9987-5
16. Chen Y.J., Chou C.L., Lai K.J., Lin Y.L. *Fusarium* brain abscess in a patient with diabetes mellitus and liver cirrhosis. *Acta Neurol. Taiwan*. 2017; 26 (3): 128-132. PMID: 29468621
17. Kawashima N., Yoshida N., Matsushita N., et al. Intra-articular injection of voriconazole for *Fusarium solani* arthritis after bone marrow transplantation. *J. Infect.* 2012; 65 (4): 366-367. doi:10.1016/j.jinf.2012.06.001
18. Koehler P., Tacke D., Cornely O. Bone and joint infections by *Mucorales*, *Scedosporium*, *Fusarium* and even rarer fungi. *Crit. Rev. Microbiol.* 2016; 42 (1): 158-71. doi: 10.3109/1040841X.2014.910749

19. Nucci M., Nouér S.A., Cappone D., Anaissie E. Early diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in hematologic patients: An opportunity to improve the outcome. *Haematology*. 2013; 98: 1657-1660. doi:10.3324/haematol.2013.094359
20. Sassi C., Stanzani M., Lewis R.E., et al. Radiologic findings of *Fusarium* pneumonia in neutropenic patients. *Mycoses*. 2017; 60: 73-78. doi:10.1111/myc.12538
21. Caillot D., Couaillier J.-F., Bernard A., et al. Increasing volume and changing characteristics of invasive pulmonary aspergillosis on sequential thoracic computed tomography scans in patients with neutropenia. *J. Clin. Oncol.* 2001; 19: 253-259. doi: 10.1200/JCO.2001.19.1.253
22. Tortorano A.M., Prigitano A., Esposto M.C., et al. European Confederation of Medical Mycology (ECMM) epidemiological survey on invasive infections due to *Fusarium* species in Europe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2014; 33: 1623-1630. doi: 10.1007/s10096-014-2111-1
23. Al-Hatmi A.M.S., Curfs-Breuker I., de Hoog G.S., et al. Antifungal susceptibility testing of *Fusarium*: a practical approach. *J. Fungi (Basel)*. 2017; 3 (2): 19. doi:10.3390/jof3020019
24. Lewis R.E., Cahyame-Zuniga L., Leventakos K., et al. Epidemiology and sites of involvement of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies: A 20-year autopsy study. *Mycoses*. 2013; 56: 638-645. doi:10.1111/myc.12081
25. Nucci F., Nouér S., Capone D., Nucci M. Invasive mould disease in haematologic patients: comparison between fusariosis and aspergillosis. *Clin. Microbiol. Infect.* 2018; 24: 1105.e1-1105.e4. doi:10.1016/j.cmi.2018.05.006
26. Muhammed M., Anagnostou T., Desalermos A., et al. *Fusarium* infection: report of 26 cases and review of 97 cases from the literature. *Medicine*. 2013; 92 (6): 305-316. doi.org/10.1097/MD.0000000000000008
27. Tortorano A.M., Richardson M., Roilides E., et al. ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. and others. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014; 20 (3): 27-46. doi: 10.1111/1469-0691.12465
28. Walsh T.J., McCarthy M.W. The expanding use of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectroscopy in the diagnosis of patients with mycotic diseases. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2019; 19: 241-248. doi:10.1080/14737159.2019.1574572
29. De Carolis E., Posteraro B., Lass-Flörl C., et al. Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012; 18: 475-484. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03599.x
30. Espinel-Ingroff A., Colombo A.L., Cordoba S., et al. International evaluation of MIC distributions and Epidemiological Cutoff Value (ECV) definitions for *Fusarium* species identified by molecular methods for the CLSI broth microdilution method. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016; 60: 1079-1084. doi:10.1128/AAC.02456-15
31. Messer S.A., Carvalhaes C.G., Castanheira M., Pfaller M.A. *In vitro* activity of isavuconazole versus opportunistic filamentous fungal pathogens from the SENTRY Antifungal Surveillance Program, 2017-2018. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2020; 97: 115007. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2020.115007
32. Broutin A., Bigot J., Senghor Y., et al. *In vitro* susceptibility of *Fusarium* to isavuconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2020; 64. doi:10.1128/AAC.01621-19
33. Badali H., Cañete-Gibas C., Patterson H., et al. *In vitro* activity of olorofim against clinical isolates of the *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* species complexes. *Mycoses*. 2021; 64: 748-752. doi:10.1111/myc.13273
34. Badali H., Patterson H.P., Sanders C.J., et al. Manogepix, the active moiety of the investigational agent fosmanogepix, demonstrates *in vitro* activity against members of the *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* species complexes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2021; 65. doi:10.1128/AAC.02343-20
35. Rodríguez P.N., Guevara-Suarez M., Paredes K., et al. Lack of correlation of ECV and outcome in an *in vivo* murine model of systemic fusariosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2018; 92: 124-126. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2018.05.019
36. Nucci M., Jenks J., Thompson G.R., et al. Do high MICs predict the outcome in invasive fusariosis? *J. Antimicrob. Chemother.* 2021; 76: 1063-1069. doi: 10.1093/jac/dkaa516
37. Nucci M., Marr K., Vehreschild M., et al. Improvement in the outcome of invasive fusariosis in the last decade. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014; 20: 580-585. doi: 10.1111/1469-0691.12409
38. Herkert P.F., Al-Hatmi A.M.S., de Oliveira Salvador G.L., et al. Molecular characterization and antifungal susceptibility of clinical *Fusarium* species from Brazil. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 737. doi:10.3389/fmicb.2019.00737
39. Demonchy J., Biard L., Clere-Jehl R., et al. Multicenter retrospective study of invasive fusariosis in intensive care units, France. *Emerg. Infect. Dis.* 2024; 30 (2): 215-24. doi: 10.3201/eid3002.231221
40. Пинегина О.Н., Попова М.О., Рогачева Ю.А. и др. Инвазивный фузариоз у пациентов с гематологическими и онкогематологическими заболеваниями на фоне химиотерапевтического лечения. Успехи медицинской микологии. 2022; 23: 88-91. [Pinagina O.N., Popova M.O., Rogacheva Yu.A., et al. Invasive fusarium in patients with hematological and oncohematological diseases on the background of chemotherapeutic treatment. *Successes of Medical Mycology*. 2022; 23: 88-91. (In Russ.)].

41. *Батманова Н.А., Багирова Н.С., Григорьевская З.В. и др.* Успешная диагностика и лечение фузариоза у больной острым лейкозом. Гематология и трансфузиология. 2022; 67 (1): 139-149. [Batmanova N.A., Bagirova N.S., Grigorievskaya Z.V., et al. Successful diagnosis and treatment of fusariosis in patient with acute leukemia. Russian journal of hematology and transfusiology. 2022; 67 (1): 139-149. (In Russ.)]. doi.org/10.35754/0234-5730-2022-67-1-139-149

42. *Хостелиди С.Н., Мошнина С.М., Мясников А.А. и др.* Острый диссеминированный фузариоз (обзор). Описание клинического случая. Проблемы медицинской микологии. 2012; 14 (4): 33-38. [Khostelidi S.N., Moshnina S.M., Myasnikov A.A., et al. Acute disseminated fusariosis (review). Clinical case. Problems in Medical Mycology. 2012; 14 (4): 33-38. (In Russ.)].

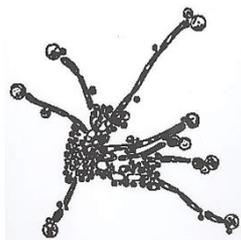
43. *Gorman S.R., Magiorakos A.P., Zimmerman S.K., et al.* *Fusarium oxysporum* pneumonia in an immunocompetent host. South Med. J. 2006; 99: 613-617. doi:10.1097/01.smj.0000217160.63313.63

44. *Sreeram S., Lobo F.D., Acharya V., et al.* A fortuitous turn of evidence in an elderly female – a case of pulmonary fusariosis. J. Clin. Diagn. Res. 2017; 11: ED04-ED05. doi:10.7860/JCDR/2017/24736.9191

45. *Chae S.Y., Park H.M., Oh T.H., et al.* *Fusarium* species causing invasive fungal pneumonia in an immunocompetent patient: a case report. J. Int. Med. Res. 2020; 48 (12): 300060520976475. doi:10.1177/0300060520976475

Поступила в редакцию журнала 30.10.24

Принята к печати 19.11.24



Для цитирования: Хостелиди С.Н., Козлова О.П., Успенская О.С., Ружинская О.С., Рябыкина О.Е., Смирнов С.А., Апполова П.Н., Мошкевич И.Р., Выборнова И.В., Ковыршин С. В., Богомолова Т.С., Оганесян Э.Г., Тараскина А.Е., Васильева Н.В. Кандидемия, обусловленная *Candida auris*, у пациентки с неходжкинской лимфомой (описание клинического случая). Проблемы медицинской микологии. 2024; 26 (4): 22-29. DOI: 10.24412/1999-6780-2024-4-22-29

For citation: Khostelidi S.N., Kozlova O.P., Uspenskaya O.S., Ruzhinskaya O.S., Ryabykina O.E., Smirnov S.A., Appolova P.N., Moshkevich I.R., Vybornova I.V., Kovyrshin S.V., Bogomolova T.S., Oganesyane E.G., Taraskina A.E., Vasilyeva N.V. Candidemia caused by *Candida auris* in a patient with non-Hodgkin's lymphoma (clinical case description). Problems in Medical Mycology. 2024; 26 (4):22-29. (In Russ). DOI: 10.24412/1999-6780-2024-4-22-29

КАНДИДЕМИЯ, ОБУСЛОВЛЕННАЯ *CANDIDA AURIS*, У ПАЦИЕНТКИ С НЕХОДЖКИНСКОЙ ЛИМФОМОЙ (ОПИСАНИЕ КЛИНИЧЕСКОГО СЛУЧАЯ)

^{1,2}Хостелиди С.Н. (доцент)*, ¹Козлова О.П. (доцент), ²Успенская О.С. (зав. отд.), ²Ружинская О.С. (врач-гематолог), ²Рябыкина О.Е. (врач-гематолог), ²Смирнов С.А. (зав. отд.), ²Апполова П.Н. (врач-реаниматолог), ^{1,2}Мошкевич И.Р. (ассистент кафедры, врач-микробиолог), ¹Выборнова И.В. (н.с.), ¹Ковыршин С.В. (м.н.с.), ¹Богомолова Т.С. (зав. лаб.), ¹Оганесян Э.Г. (ассистент кафедры), ¹Тараскина А.Е. (зам. директора, зав. лаб.), ¹Васильева Н.В. (директор института, зав. кафедрой)

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

Candida (Candidiozoma) auris – дрожжи, распространенные во всем мире. Более чем в 50 странах зарегистрированы случаи кандидемии, ассоциированной с данным возбудителем. Большинство описанных клинических наблюдений были связаны с хирургической реанимацией и интенсивной терапией. В единичных случаях *Candida auris*-кандидемия развивалась у гематологических больных на фоне цитопении.

В статье представлен клинический случай кандидемии, вызванной *Candida auris*, у пациентки с неходжкинской лимфомой. Несмотря на проводимую терапию эхинокандинами, пациентка умерла в результате прогрессирующей полиорганной недостаточности на фоне тяжело протекающего основного заболевания.

Ключевые слова: *Candida auris*, *Candidiozoma*, кандидемия, кандидозный сепсис, инвазивный кандидоз, кандидоз, флуконазол, резистентность, эхинокандины

CANDIDEMIA CAUSED BY *CANDIDA AURIS* IN A PATIENT WITH NON-HODGKIN'S LYMPHOMA (CLINICAL CASE DESCRIPTION)

¹Khostelidi S.N. (associate professor), ¹Kozlova O.P. (associate professor), ²Uspenskaya O.S. (head of the clinical department), ²Ruzhinskaya O.S. (hematologist), ²Ryabykina O.E. (hematologist), ²Smirnov S.A. (head of the clinical department), ²Appolova P.N. (reanimatologist), ^{1,2}Moshkevich I.R. (assistant of the department, microbiologist), ¹Vybornova I.V. (scientific researcher), ¹Kovyrshin S.V. (junior scientific researcher), ¹Bogomolova T.S. (head of the laboratory), ¹Oganesyane E.G. (assistant of the department), ¹Taraskina A.E. (deputy director, head of the laboratory), ¹Vasilyeva N.V. (director of institute, head of the department)

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

Candida (Candidiozoma) auris is a yeast distributed throughout the world. Cases of candidemia associated with this pathogen have been reported in more than 50 countries. Most of the described clinical cases were associated with surgical resuscitation and intensive care. In isolated cases, *Candida auris*-candidemia developed in hematological patients against the background of cytopenia.

We present a clinical case of candidemia caused by *Candida auris* in a patient with non-Hodgkin's lymphoma. Despite echinocandin therapy, the patient died as a result of progressive multiple organ failure against the background of a severe underlying disease.

Key words: *Candida auris*, *Candidiozoma*, candidemia, candidal sepsis, invasive candidiasis, candidiasis, fluconazole, resistance, echinocandins

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

ВВЕДЕНИЕ

В последнее десятилетие грибы *Candida auris* стали актуальной проблемой современного здравоохранения. Распространение этих микромицетов связано с возможностью длительно сохранять жизнеспособность в окружающей среде, контагиозностью, множественной лекарственной устойчивостью и нередко – ошибочной идентификацией. Все эти факторы, а также высокая летальность (23-67%) [1-2], способствовали тому, что в 2022 г. *Candida (Candidiozoma) auris* была внесена Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в список «критически значимых патогенов» [3].

Вид *Candida auris* был впервые выделен в Японии в 2009 г. из наружного слухового прохода госпитализированного пациента [4]. Впоследствии в Южной Корее возбудитель был выявлен у 15 человек с хроническим отитом [5]. Однако самым ранним случаем было ретроспективное обнаружение *C. auris* из первоначально ошибочно идентифицированного образца, взятого от пациента с грибковой инфекцией в Южной Корее в 1996 г. [6]. За последние несколько лет инвазивные микозы, вызванные *C. auris*, были зарегистрированы более чем в 50 странах мира [7]. В Российской Федерации (РФ) этот микромицет был впервые выделен в 2016 г. в Москве у пациента из Средней Азии, поступившего в отделение реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) с политравмой в результате дорожно-транспортного происшествия [8]. Число публикаций, посвященных инвазивным инфекциям, ассоциированным с *C. auris* у гематологических пациентов, в зарубежной и отечественной литературе ограничено.

Цель исследования: представить клинический случай кандидемии, вызванной *Candida auris*, у пациентки с неходжкинской лимфомой для привлечения внимания медицинского сообщества к данной проблеме.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В статье описан клинический случай *C. auris*-кандидемии, развившейся на фоне неходжкинской лимфомы с последующей полиорганной недостаточностью и летальным исходом, несмотря на проводимую терапию. Для постановки диагноза кандидемии использовали критерии EORTC/MSG, 2020 (European Organization for Research and Treatment of Cancer/ Mucosae Study Group) [9], основанные на выявлении возбудителя из крови.

Авторы провели анализ данных научной литературы в базах PubMed (на октябрь 2024 г.), ClinicalKey (на октябрь 2024 г.) и eLibrary (на октябрь 2024). Поиск информации осуществляли с помощью следующих ключевых слов: *Candida auris*, *candidemia*, *Candida-sepsis*, *invasive candidiasis*, *candidiasis*, *fluconazole*, *resistance*, *echinocandin*, *lymphoma*.

Описание клинического случая.

Пациентка Л., 78 лет, поступила в тяжёлом состоянии в онкогематологическое отделение областной клинической больницы с жалобами на нарушение сна, затруднение глотания, одышку при небольшой физической нагрузке, умеренную общую слабость, потерю веса (более 3 кг), потливость без связи с временем суток, периодически субфебрильную температуру до 37,0-37,4 °С.

При объективном осмотре: состояние тяжёлое, стабильное. Шея деформирована за счет увеличенных лимфоузлов и щитовидной железы. Периферические лимфоузлы подчелюстные справа – 15x20 мм, шейные справа – 15x20 и 20x20 мм, слева – 15x15 и 15x20 мм, надключичные справа – 20x20 мм. Плотное неподвижное новообразование на передней поверхности шеи асимметричное (больше вправо) – 15x20 см, безболезненное. Температура тела – 37,2 °С. Сознание ясное, адекватное. Кожные покровы бледные. Дыхание самостоятельное, частота дыхательных движений – 21 в 1 минуту. Над лёгочными полями дыхание жёсткое, проводится во все отделы. Гемодинамика стабильная. Тоны сердца приглушены, ритм правильный. Артериальное давление – 125/75 мм рт. ст. Частота сердечных сокращений – 100 в минуту. Живот не вздут. Симптом поколачивания отрицательный.

Из анамнеза выяснено, что около 10 лет пациентка наблюдалась у эндокринолога с диагнозом «аутоиммунный тиреоидит, узлы обеих долей щитовидной железы».

В ходе обследования в мае 2023 г. при выполнении магнитно-резонансной томографии (МРТ) позвоночника диагностированы: остеохондроз с грыжами дисков С6-С7 – до 4 мм, С4-5, С5-6 – до 3 мм, с протрузиями дисков С3-С4, С7-Th1, Th1-2 – до 1,5 мм, со вторичным стенозом позвоночного канала, выраженном в сегменте С6-С7; дегенеративные изменения замыкательных пластин в сегменте С6-С7 I-II типа Modic; деформирующий спондиллез; спондилоартроз; унко-verteбральный артроз; легкая асимметрия латеральных атланта-дентальных суставов D<S; нарушение статики по типу выпрямляемости лордоза. В поле сканирования: выраженное асимметричное увеличение щитовидной железы D>S до 90 мм – в краниокаудальном и до 40 мм – в передне-заднем направлениях. При МРТ головного мозга: данных за наличие объемных образований и очагов с ограничением диффузии не получено, единичные очаги глиоза в лобно-теменных долях. Умеренное расширение субарахноидального пространства и боковых желудочков заместительного характера, легкая асимметрия латеральных атланта-дентальных суставов D<S. Эндокринологом было рекомендовано продолжить прием левотироксина (100 мкг).

В апреле 2024 г. пациентка обратила внимание на появление образований в нижней трети шеи. Была

осмотрена терапевтом по месту жительства, назначены обследование и консультация онколога.

По данным МРТ шеи с контрастированием: объемное образование щитовидной железы (ЩЖ) с субтотальным поражением – Са ЩЖ с признаками микроинвазии в окружающие ткани на уровне правой доли. ЩЖ асимметрично увеличена: правая доля – 4,7х7,57 см, левая – 3,3х6,4 см, неоднородной структуры за счет множественных узловых образований правой и левой долей. Наружный контур образования с признаками микроинвазии в окружающие ткани. Шейная лимфоаденопатия (увеличены группы Па и Пб – до 2,6х1,3 см справа и 2,2х0,9 см слева)

При компьютерной томографии органов грудной полости (КТ ОГП) выявлено: увеличение щитовидной железы в видимых отделах (правой доли – до 43х34х27 мм, левой доли – до 43х44х76 мм), структура обеих долей неоднородная за счет гиповаскулярных узлов до 34х25 мм; увеличенный лимфатический узел правой надключичной группы – 25х25 мм. В легких без очаговых и инфильтративных изменений.

5.07.24 г. выполнена биопсия щитовидной железы (№ 10885/24), заключение: недифференцированная злокачественная опухоль. Консультация онколога по месту жительства: в нижней трети шеи плотноватое образование – увеличенная щитовидная железа. В надключичной области – увеличенные лимфатические узлы. Диагноз: новообразование неуточненного характера, иммуногистохимическое исследование в работе.

23.07.24 г. получен результат иммуногистохимического исследования: опухолевые клетки экспрессируют CD45, Ki67-67 80%; не экспрессируют TTF1, AE1/AE3, S100, HMB45. Заключение: лимфома; для уточнения гистологического типа необходимо дополнительное исследование в специализированной лаборатории.

Пересмотр гистологических препаратов в лечебно-диагностическом центре им. С. Березина (стекло №1, блок №1): №21963_24 столбики ткани ЩЖ с выраженным крупноклеточным инфильтратом, фокально стирающим структуры ЩЖ, образованным крупными клетками с умеренным ядерным полиморфизмом; при дополнительном исследовании клетки опухоли экспрессируют CD20, BCL6, негативным к PanCK, TTF1, тиреоглобулину, CD56, CK19, ChromograninA, Synaptophysin, HMBE-1, CD10, CD5, CD3, BCL2, MUM-1, CyclinD1 и CD23, индекс пролиферативной активности Ki67 98%. Заключение: морфологическая картина и иммунофенотип соответствуют диффузной В-крупноклеточной лимфоме, GCB подтип.

Учитывая большие размеры образования, одышку при небольшой нагрузке и в горизонтальном положении, согласована экстренная госпитализация.

При поступлении в клиническом анализе крови: лейкоциты – $7,0 \times 10^9/\text{л}$, нейтрофилы – $4,73 \times 10^9/\text{л}$, лимфоциты – $1,56 \times 10^9/\text{л}$, эритроциты – $3,81 \times 10^{12}/\text{л}$, гемоглобин – 118 г/л, тромбоциты – $309 \times 10^9/\text{л}$; в биохимическом анализе крови: аланинаминотрансфераза (АЛТ) – 138,1 Е/л, аспартатаминотрансфераза (АСТ) – 39,0 Е/л, билирубин – 16,4 мкмоль/л, глюкоза – 4,52 ммоль/л, общий белок – 65,22 г/л (гипопротеинемия), амилаза – 55 Е/л, С-реактивный белок (СРБ) – 29,3 мг/л.

Выполнена миелограмма: миелокарициты – $150 \times 10^9/\text{л}$ (бласты – 1,4%, лимфоциты – 13%).

На компьютерной томографии органов грудной и брюшной полости: инфильтрат мягких тканей шеи от входа в гортань до грудино-ключичного сочленения с вовлечением правой подчелюстной железы, правой доли щитовидной железы, умеренным стенозом гортаноглотки и трахеи (91х68 мм, отталкивающий и сужающий гортаноглотку, отталкивающий и сужающий трахею влево, просвет трахеи циркулярной сужен до 5 мм). Шейная (подчелюстные – до 15 мм) и аксиллярная лимфоаденопатия (справа – 15 мм). Кисты почек (Bosniak 1) – до 6 мм. Атеросклероз аорты и ее ветвей. Дегенеративные изменения позвоночника.

Диагностирована неходжкинская лимфома, диффузная крупноклеточная В-клеточная, GCB-подтип, IV A E ст. (инфильтрат мягких тканей шеи от входа в гортань до грудино-ключичного сочленения с вовлечением правой подчелюстной железы, правой доли щитовидной железы, умеренным стенозом гортаноглотки и трахеи, поражение шейных, подмышечных, надключичных лимфоузлов, центральной нервной системы (нейролейкоз), IPI 3 (High-intermediate), NCCN-IPI 5 (High-intermediate), IPI CNS 3 (Intermediate).

С 14.08.24 г. начат курс полихимиотерапии (1) CHOP+R (ритуксимаб 375 мг/м² внутривенно (вв) – 100 мг вв 0, 600 мг вв 1, циклофосамид 1350 мг вв 1, доксорубин 90 мг вв 1, винкристин 2 мг вв 1, преднизолон 100 мг внутрь (вн) 0-5, 10 мг вн 6), дополнительно метотрексат 15 мг, цитарабин 30 мг, дексаметазон 4 мг вн (в ликворе: цитоз – 3,3, бласты – 50%, нейролейкоз). На следующие сутки у пациентки купировано ощущение затруднения глотания, образование на шее уменьшилось в объеме.

16.08.24 г. дополнительно введены метотрексат (15 мг), цитарабин (30 мг), дексаметазон (4 мг) в связи с нейролейкозом. По данным МРТ головного мозга: немногочисленные очаговые изменения вещества мозга, сосудистого генеза; умеренное расширение наружных и внутренних ликворных пространств по заместительному типу; достоверных МР-данных за поражение оболочек головного мозга не получено. Проведены повторные введения иммуносупрессивных препаратов для лечения нейролейкоза 19.08.24 г. (в ликворе: цитоз – 0,6, бласты – 0%) и 21.08.24 г.

На следующие сутки пациентка консультирована неврологом, заключение: энцефалопатия смешанного генеза, постпункционный синдром, синдром карпального канала слева.

При осмотре появились начальные признаки стоматита, энтероколита. К терапии добавлены препараты колониестимулирующего фактора (КСФ), флуконазол, фолиевая кислота, метронидазол.

23.08.24 г. зафиксирована фебрильная лихорадка (общее число лейкоцитов – $1,08 \times 10^9/\text{л}$), старт цефепим внутривенно. На следующие сутки, в связи с сохраняющейся лихорадкой, проведена смена антибактериального препарата на меропенем. В клиническом анализе крови: лейкоциты – $0,1 \times 10^9/\text{л}$, нейтрофилы – $0,00 \times 10^9/\text{л}$, лимфоциты – $0,09 \times 10^9/\text{л}$, эритроциты – $3,15 \times 10^{12}/\text{л}$, гемоглобин – 99 г/л, тромбоциты – $109 \times 10^9/\text{л}$.

С учетом продолжающейся лихорадки к терапии добавлен ванкомицин, выполнен тест на токсины А и В *Clostridium difficile* в кале – результат отрицательный. С 26.08.24 г. отмечали усиление явлений мукозита (стоматит, энтеропатия), анорексию, в связи с чем пациентка переведена на энтеральное питание. Установлен центральный венозный катетер (ЦВК). Тест на SARS-CoV2 методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) – отрицательный. В последующие 3 дня состояние больной прогрессивно ухудшалось: сохранялось повышение температуры тела до фебрильных цифр, несмотря на смену антибактериальной терапии (ванкомицин на линезолид, далее – на тигециклин в сочетании с амикацином); сохранялась панцитопения; увеличился уровень СРБ до 185 мг/л. Была диагностирована бактериемия *Staphylococcus haemolyticus*. Для исключения наличия очагов диссеминации выполнена КТ: заместительная гидроцефалия по смешанному типу; уменьшение размеров контролируемого аксиллярного лимфоузла справа (8 мм, ранее – 15 мм); очаговых и инфильтративных изменений в легких нет; обызвествление стенок коронарных артерий и стенок аорты. К антибактериальному лечению добавлен колистин ингаляционно.

На следующие сутки из образца крови от 29.08.24 г. получен высеv *Klebsiella pneumoniae*, в связи с чем была вновь откорректирована антибактериальная терапия: отменен меропенем, начат цефтазидим/авибактам.

02.09.24 г. из образца крови от 30.08.24 г. получен высеv *Candida auris* (Рис.1). Рекомендовано начать лечение эхинокандинами (каспофунгин – 70 мг в 1 сутки, затем – 50 мг в сутки или микафунгин – 100 мг в сутки), смена ЦВК.

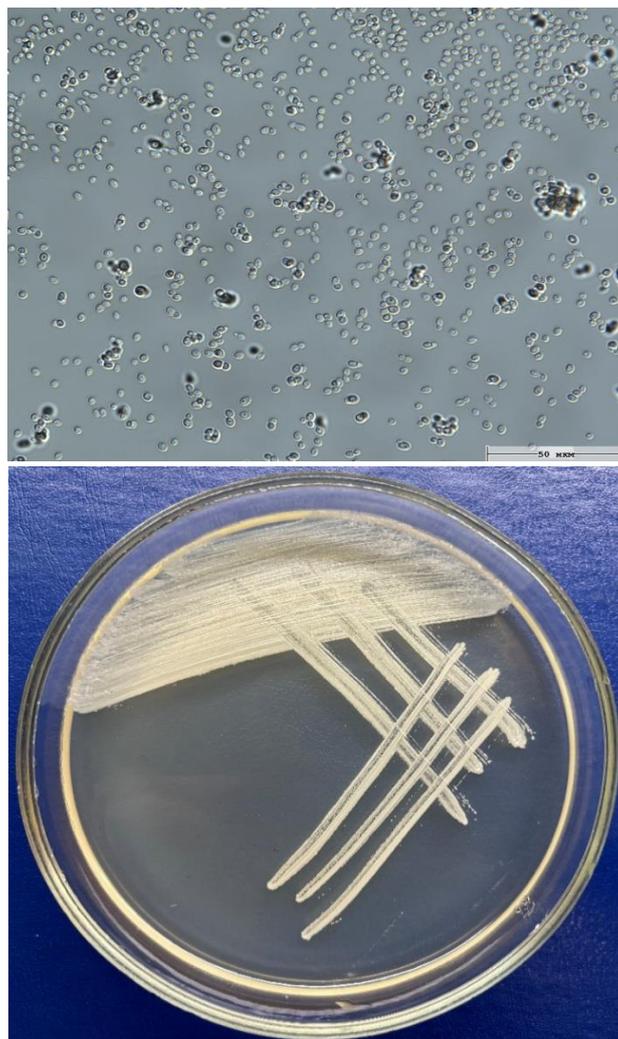


Рис. 1. Прямая микроскопия и рост *Candida auris* на среде Сабуро.

При смене ЦВК появилась напряженная гематома на шее слева. Пациентка была переведена в отделение реанимации и интенсивной терапии для дальнейшего наблюдения. Начата антимикотическая терапия каспофунгином в стандартной дозировке. Лихорадка купирована. В условиях ОРИТ повторно поставлен ЦВК (через бедренную вену).

05.09.24 г. получен результат чувствительности культуры *Candida auris* (минимальные подавляющие концентрации, МПК): амфотерицин В – 4, флуконазол – 128, вориконазол – 2, позаконазол – 0,25, микафунгин – 0,125, итраконазол – 2. В контрольном посеve крови от 03.09.24 г.: повторный высеv *C. auris* и *K. pneumoniae*. С учетом чувствительности возбудителя к эхинокандинам и повторного высева микромицетов рекомендовано увеличение дозы каспофунгина до 70 мг/сутки.

Выявлен рост лейкоцитов в периферической крови до $0,6 \times 10^9/\text{л}$, СРБ – 335 мг/л, прокальцитонин – 11 нг/мл. Общее состояние больной без ухудшения: явления мукозита в том же объеме, живот увеличен в объеме, при глубокой пальпации живота отмечала ощущение болезненности во всех отделах, стула за сутки не было.

Ультразвуковое исследование (УЗИ) органов брюшной полости: без очаговых изменений в печени, селезенке. Пациентка переведена на парентеральное питание.

В последующие сутки состояние больной ухудшилось, сознание – оглушение, нарастали признаки полиорганной недостаточности: развитие почечной недостаточности (клиренс креатинина – 23), гемодинамические нарушения с тенденцией к гипотонии, что потребовало вазопрессорной поддержки. В связи с развитием дыхательной недостаточности (ДН)-3 начали неинвазивную искусственную вентиляцию легких (ИВЛ), к вечеру этого же дня развился острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), по причине которого больная интубирована. В клиническом анализе крови: рост лейкоцитов до $1,31 \times 10^9/\text{л}$, уровень СРБ – 320 мг/л.

07.09.24 г. при очередных посевах крови получен высев *Candida auris*.

08.09.24 г. состояние пациентки прогрессивно ухудшалось, нарастали признаки сердечно-сосудистой, дыхательной недостаточности, азотемия и, несмотря на продолжающуюся интенсивную терапию, женщина умерла.

При исследовании гистологических препаратов тканей головного мозга, легких, селезенки в сосудах визуализированы дрожжеподобные микромицеты. При посеве аутопсийного материала выделены грибы *Candida auris*.

В НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина было выполнено секвенирование полученного в культуре возбудителя (*Candida auris*) при первичном положительном посеве крови пациентки и по результатам вскрытия. При выполнении секвенирования возбудитель был идентифицирован как *Candidozyma auris* (процент идентичности – 99,43%-100%, размер локуса, вошедшего в анализ: ITS4 – 320 п.о., ITS5 – 354 п.о.).

Для видовой идентификации штамма был использован подход, основанный на секвенировании таксономически информативного ITS-локуса рДНК. Амплификацию ITS-области осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью стандартных праймеров ITS4 (TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC) и ITS5 (GGA-AGT-AAA-AGT-CGT-AAC-AAG-G). Продукты ПЦР секвенировали по методу Сэнгера на генетическом анализаторе «ABI 3500» («Applied Biosystems», США) с применением набора «BrilliantDye Terminator Cycle Sequencing Kit V3.1» («NimaGen», Нидерланды). Очистку реакционной смеси проводили с использованием «BigDye X Terminator Purification Kit» («Thermo Fisher Scientific», США), что обеспечивало высокую чистоту ампликона для дальнейшего анализа. Для идентификации секвенированные последовательности выравнивались с последовательностями базы данных «GenBank» с помощью алгоритма «BLAST». Полученные результаты показали уровень идентичности последовательностей исследуемого штамма с видом

Candidozyma auris в диапазоне 99,43-100%, что подтверждает его видовую принадлежность.

ОБСУЖДЕНИЕ

За относительно короткий период времени *Candidozyma auris* стал одним из самых опасных патогенов в медицинских учреждениях. Несмотря на высокую частоту инвазивных микозов у гематологических больных, кандидемии, ассоциированную с *C. auris*, наблюдают редко у этой когорты пациентов. Большинство публикаций анализируют кандидемии в ОРИТ у больных с COVID-19 или в отделениях реанимации и интенсивной терапии хирургического профиля.

При анализе публикаций научной литературы в базах PubMed (на октябрь 2024 г.), ClinicalKey (на октябрь 2024 г.) и elibrary (на октябрь 2024) были выявлены несколько случаев инвазивного кандидоза, ассоциированного с *C. auris*, у пациентов с гемобластомами (табл.).

Таблица 1

Публикации случаев инвазивного кандидоза, ассоциированного с *C. auris*, у пациентов с гемобластомами

Авторы/ год публикации	Пол/возраст	Фоновое заболевание	Лечение	Исход
Lee W.G. и соавторы, 2011 (Южная Корея) [10]	М, 1 год	гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз, панцитопения	ФЛУ, АМФ В	Умер
Chowdhary A. и соавторы, 2013 (Индия) [11]	М, 10	острый лимфобластный лейкоз	нет	Умер
Vallabhaneni S. и соавторы, 2017 (США) [12]	2 пациента	гемобластоз + трансплантация	НД	Умер Умер
Mohd Tap R. и соавторы, 2018 (Малайзия) [13]	М, 63	миелодиспластический синдром	НД	Умер
Levy Y. и соавторы, 2020 (Австралия) [14]	М, 76	хронический лимфолейкоз	Нет	Умер
Gautam S. и соавторы, 2022 (Индия) [15]	М, 36	гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз, панцитопения	ФЛУ- 13 дней, КАСПО-1 день	Умер на 14 день
Corcione S. и соавторы, 2022 (Италия) [16]	Ж, 55	гематологическое заболевание (точный диагноз и фаза заболевания неизвестны)	АНИД + лип. АМФ В	Жива на 100 сутки
Feldman A. и соавторы, 2024 (Мексика) [17]	5 пациентов (НД)	Диагноз не указан	НД	НД
Pouloroulou A. и соавторы, 2024 (Греция) [18]	2 пациента (НД)	Диагноз не указан	НД	НД
Представленный в данной статье случай, 2024 (Россия)	Ж, 78	лимфома	КАСПО	Умерла

Примечание: НД – нет данных, ФЛУ – флуконазол, АНИД – анидулофунгин, АМФ В – амфотерицин В, КАСПО – каспофунгин

Интересно что во многих обзорах, посвященных инвазивному кандидозу в гематологических стационарах, в спектре возбудителей микромицет *C. auris* не указан. Следовательно, его не выявляли у этой когорты пациентов, хотя вспышки данной инфекции были описаны в других стационарах этих стран [19-23].

Можно предположить, что редкое обнаружение *C. auris* у гематологических больных связано с механизмами иммунного ответа на данный вид инфекции. В эксперименте обнаружено, что нейтрофилы человека менее активны в отношении *C. auris* по сравнению с *C. albicans*, что позволяет микромицетам длительно пребывать в макроорганизме и быть нераспознанным основными клетками, обеспечивающими фагоцитоз возбудителя [24].

C. auris, по-видимому, использует несколько механизмов для уклонения от иммунного ответа. Ученые отмечают, что клеточная стенка *C. auris* содержит больше маннана, чем у *C. albicans*. К тому же авторы ряда работ установили, что манан *C. auris* демонстрирует низкое сродство с мембранным рецептором маннозы Dectin-2 по сравнению с *C. albicans*. Показано, что внешний маннанный слой маскирует внутренний слой β -глюкана, а именно основной лиганд Dectin-1 – ключевой поверхностный рецептор для распознавания грибов рода *Candida* клетками врожденной иммунной системы [25].

Это помогает патогену уклоняться от распознавания, тем самым облегчая инвазию и более быстрое распространение. Также установлено, что в процессе своей репликации *C. auris* существенно истощает концентрации глюкозы в макрофагах и активирует их гибель без индукции реакции на инфламмосомы. В результате этого нарушается продукция ключевых продуктов инфламмосом, которыми являются провоспалительные цитокины: интерлейкин-1-бета (IL-1 β) и интерлейкин-18 (IL-18). При этом в клетке нарушается активация каспазы 1, что обуславливает гибель клетки путем пироптоза [26, 27]. Таким образом, *C. auris* может приводить к нарушению как фагоцитоза, так и воспалительной реакции в целом вследствие подавления выброса провоспалительных цитокинов. По данным Wang Y. и соавторов, в отношении *C. auris* нейтрофилы не только инертны относительно самого процесса фагоцитоза, но и значительно снижается их способность формировать нейтрофильные внеклеточные ловушки [28]. Точные механизмы взаимодействия клеток иммунной системы и *C. auris* в настоящее время остаются неизученными, что является поводом для дальнейших всесторонних исследований.

Онкогематологические пациенты часто сочетают в анамнезе несколько критериев иммунокомпрометированного больного, например, агранулоцитоз и лимфоцитопению, применение полихимиотерапии, генно-инженерной биологической терапии и глюкокортикостероидов, что в совокупности с необходимостью использовать ЦВК, парентеральное питание и

т.д. относит их в группу высокого риска развития микотических осложнений. При этом оставшееся число клеток, участвующих в иммунном ответе, отличается пониженной функциональной активностью. Все это приводит к отсутствию типичной клинической картины сепсиса у данных пациентов и позднему началу диагностического поиска в отношении возможных возбудителей инфекции. В связи с этим и была разработана стратегия лечения микотической инфекции (назначение первичной профилактики и эмпирической терапии) [29]. В условиях инфицирования особым патогеном, таким как *C. auris*, который искусно пользуется механизмами уклонения от иммунной системы и подавления процессов киллинга, еще и в условиях иммуносупрессии, клиническая картина может быть стертой. Переход от колонизации патогена до инвазии и диссеминации может протекать незаметно для наблюдающих пациентов специалистов и, соответственно, больные остаются недиагностированными. В представленном случае мы видим быстрое развитие полиорганной недостаточности у пациентки, что, несмотря на восстановление числа нейтрофилов, привело к летальному исходу. Отсутствие типичной клинической картины является причиной поздней диагностики заболевания, а сформировавшиеся в благоприятных условиях микромицеты могут быть идентифицированы ошибочно как другие виды. Точные механизмы этиопатогенеза *C. auris*-ассоциированной кандидемии у гематологических больных остаются неизученными в виду малого количества наблюдений. Представленный нами случай и опубликованные зарубежными коллегами данные свидетельствуют о высокой летальности в этой когорте больных (89%, выжила 1 пациентка из описанных 9 случаев с известными исходами).

ВЫВОДЫ

Кандидемия, ассоциированная с *C. auris*, у гематологических пациентов связана с высоким риском смерти, особенно у лиц с активным течением заболевания и пролонгированной цитопенией. *C. auris* – возбудитель с множественной устойчивостью, требующий обязательного исследования культуры микромицетов на чувствительность к антимикотикам, так как обладает резистентностью к триазолам и может быть нечувствительным к полиеновым антимикотикам, в частности к амфотерицину В. Наиболее эффективно лечение эхинокандинами. При прогрессировании цитопении и других факторов риска инвазивных микозов прогноз течения заболевания у пациентов гематологического профиля остается неблагоприятным.

Исследование выполнено в рамках темы Государственного задания Минздрава России «Генетические биомаркеры и биологические особенности Candida auris – возбудителя контагиозного инвазивного кандидоза» № НИОКТР 122012100283-8.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kozlova O., Burygina E., Khostelidi S., et al. Invasive candidiasis in adult patients with COVID-19: results of a multi-center study in St. Petersburg, Russia. *J. Fungi (Basel)*. 2023; 9 (9): 927. doi: 10.3390/jof9090927
2. Kim H.Y., Nguyen T.A., Kidd S., et al. *Candida auris*-a systematic review to inform the world health organization fungal priority pathogens list. *Med Mycol*. 2024; 62 (6): myae042. doi:10.1093/mmy/myae042
3. World Health Organization (WHO) Report. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. Oct 25, 2022. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241>
4. Satoh K., Makimura K., Hasumi Y., et al. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiol Immunol*. 2009; 53 (1): 41-4. doi: 10.1111/j.1348-0421.2008.00083.x
5. Kim M.N., Shin J.H., Sung H., et al. *Candida haemulonii* and closely related species at 5 university hospitals in Korea: identification, antifungal susceptibility, and clinical features. *Clin. Infect. Dis*. 2009; 48 (6): e57-61. doi: 10.1086/597108
6. Rhodes J., Fisher M.C. Global epidemiology of emerging *Candida auris*. *Curr. Opin. Microbiol*. 2019; 52: 84-89. doi: 10.1016/j.mib.2019.05.008
7. Rahman M.A., Victoros E., Shanjana Y., et al. The *Candida auris* infection after the COVID-19 pandemic seems to be an urgent public health emergency: a call to attention. *Health Sci. Rep*. 2024; 7 (11): e70160. doi:10.1002/hsr2.70160
8. Barantsevich N.E., Orlova O.E., Shlyakhto E.V., et al. Emergence of *Candida auris* in Russia. *J. Hosp. Infect*. 2019; 102 (4): 445-448. doi: 10.1016/j.jhin.2019.02.021
9. Donnelly J.P., Chen S.C., Kauffman C.A., et al. Revision and update of the consensus definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin. Infect. Dis*. 2020; 71: 1367-1376. doi:10.1093/cid/ciz1008
10. Lee W.G., Shin J.H., Uh Y., et al. First three reported cases of nosocomial fungemia caused by *Candida auris*. *J. Clin. Microbiol*. 2011; 49 (9): 3139-3142. doi:10.1128/JCM.00319-11
11. Chowdhary A., Sharma C., Duggal S., et al. New clonal strain of *Candida auris*, Delhi, India. *Emerg. Infect. Dis*. 2013; 19 (10): 1670-1673. doi:10.3201/eid1910.130393
12. Vallabhaneni S., Kallen A., Tsay S., et al. Investigation of the first seven reported cases of *Candida auris*, a Globally Emerging Invasive, Multidrug-Resistant Fungus-United States, May 2013-August 2016. *Am. J. Transplant*. 2017; 17 (1): 296-299. doi: 10.1111/ajt.14121
13. Mohd Tap R., Lim T.C., Kamarudin N.A., et al. A fatal case of *Candida auris* and *Candida tropicalis* candidemia in neutropenic patient. *Mycopathologia*. 2018; 183 (3): 559-564. doi: 10.1007/s11046-018-0244-y
14. Levy Y., Miltgen G., Rousseau A., et al. Case report: emergence of *Candida auris* in the Indian Ocean region. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2020; 104 (2): 739-743. doi:10.4269/ajtmh.20-0758
15. Gautam S., Sharma G., Singla S., Garg S. Case report: secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis (sHLH) and *Candida auris* fungemia in post-acute COVID-19 syndrome: a clinical challenge. *Front .Med. (Lausanne)*. 2022; 9: 835421. doi:10.3389/fmed.2022.835421
16. Corcione S., Montrucchio G., Shbaklo N., et al. First cases of *Candida auris* in a referral intensive care unit in Piedmont Region, Italy. *Microorganisms*. 2022; 10 (8): 1521. doi: 10.3390/microorganisms10081521
17. Feldman A., Bhatti M., Powell J., et al. Prevalence of *Candida auris* among high-risk patients at a comprehensive cancer center. *Antimicrobial Stewardship & Healthcare Epidemiology*. 2024; 4 (S1): s91-s92. doi:10.1017/ash.2024.232
18. Pouloupoulou A., Sidiropoulou A., Sarmourli T., et al. *Candida auris*: outbreak, surveillance and epidemiological monitoring in Northern Greece. *Medical Mycology*. 2024; 62 (7): myae062. doi.org/10.1093/mmy/myae062
19. Nishida R., Eriguchi Y., Miyake N., et al. Breakthrough candidemia with hematological disease: results from a single-center retrospective study in Japan, 2009-2020. *Med Mycol*. 2023; 61 (6): myad056. doi:10.1093/mmy/myad056
20. Otto C., Babady N.E. Epidemiology and outcomes of non-*albicans* *Candida* bloodstream infections in transplant recipients and cancer patients. *Mycopathologia*. 2023; 188 (6): 863-871. doi:10.1007/s11046-023-00765-7
21. Li Y., Gu C., Yang Y., et al. Epidemiology, antifungal susceptibility, risk factors, and mortality of persistent candidemia in adult patients in China: a 6-year multicenter retrospective study. *BMC Infect. Dis*. 2023; 23 (1): 369. doi:10.1186/s12879-023-08241-9
22. Козлова О.П., Шаталова М.В., Сандгартен Л.М. и др. *Candida auris*-ассоциированные инфекции у больных COVID-19. *Проблемы медицинской микологии*. 2023; 25 (2): 32-38. [Kozlova O.P., Shatalova M.V., Sandgarten L.M., et al. *Candida auris*-associated infections in COVID-19 patients. *Problems in Medical Mycology*. 2023; 25 (2): 32-38. (In Russ).]. doi:10.24412/1999-6780-2023-2-32-38
23. Морозова О.А., Серженко М.А., Сатушева Е.В., Романова О.А. Случаи лабораторного выделения *Candida auris* у 3 пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии Сеченовского Университета. *Проблемы медицинской микологии*. 2020; 22 (3): 107. [Morozova O.A., Serzhenko M.A., Satusheva E.V., Romanova O.A. Laboratory isolation

cases of *Candida auris* in 3 patients of the Sechenov university department of reanimation and intensive therapy. Problems in Medical Mycology. 2020; 22 (3): 107. (In Russ.)]. EDN EHQRGA

24. Johnson C.J., Davis J.M., Huttenlocher A., et al. Emerging fungal pathogen *Candida auris* evades neutrophil attack. mBio. 2018; 9. doi.org/10.1128/mbio.01403-18

25. Horton M.V., Holt A.M., Nett J.E. Mechanisms of pathogenicity for the emerging fungus *Candida auris*. PLoS Pathog. 2023; 19 (12): e1011843. doi:10.1371/journal.ppat.1011843

26. Horton M.V., Johnson C.J., Zarnowski R., et al. *Candida auris* cell wall mannosylation contributes to neutrophil evasion through pathways divergent from *Candida albicans* and *Candida glabrata*. mSphere. 2021; 6 (3): e0040621. doi:10.1128/mSphere.00406-21

27. Weerasinghe H., Simm C., Djajawi T.M., et al. *Candida auris* uses metabolic strategies to escape and kill macrophages while avoiding robust activation of the NLRP3 inflammasome response. Cell Rep. 2023; 42 (5): 112522. doi: 10.1016/j.celrep.2023.112522

28. Wang Y., Zou Y., Chen X., et al. Innate immune responses against the fungal pathogen *Candida auris*. Nat Commun. 2022; 13 (1): 3553. doi:10.1038/s41467-022-31201-x

29. Андреев С.С., Бронин Г.О., Епифанова Н.Ю. и др. Преимущества раннего назначения антимикотической терапии у гематологических пациентов. Онкогематология. 2024;19 (1): 99-112. [Andreev S.S., Bronin G.O., Epifanova N. Yu., et al. Benefits of early antifungal therapy in hematology patients. Oncohematology. 2024; 19 (1): 99-112. (In Russ.)]. doi.org/10.17650/1818-8346-2024-19-1-99-112

Поступила в редакцию журнала 11.11.24

Принята к печати 20.11.24



Для цитирования: Васенова В.Ю., Цыганкова Е.И., Жуков Н.В., Полевщикова С.А. Оценка противогрибкового действия фотодинамической терапии в эксперименте *in vitro* на колонии основных возбудителей онихомикоза. Проблемы медицинской микологии. 2024; 26 (4): 30-36. DOI: 10.24412/1999-6780-2024-4-30-36

For citation: Vasenova V.Yu., Tsygankova E.I., Zhukov N.V., Plevshchikova S.A. Evaluation of the antifungal effect of photodynamic therapy in an *in vitro* experiment on colonies of the main pathogens of onychomycosis. Problems in Medical Mycology. 2024; 26 (4): 30-36. (In Russ). DOI: 10.24412/1999-6780-2024-4-30-36

ОЦЕНКА ПРОТИВОГРИБКОВОГО ДЕЙСТВИЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VITRO* НА КОЛОНИИ ОСНОВНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОНИХОМИКОЗА

¹Васенова В.Ю. (профессор кафедры),
¹Цыганкова Е.И. (аспирант)*, ²Жуков Н.В. (инженер),
³Полевщикова С.А. (зав. центральным лаб. отд.)

¹Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова (кафедра кожных болезней и косметологии); ²Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН; ³Московский научно-практический центр дерматовенерологии и косметологии, Москва, Россия

Онихомикоз – грибковая инфекция ногтевых пластин. Применение топических и системных фармакологических препаратов бывает не всегда успешным и ограничено рядом противопоказаний у некоторых групп пациентов. В последние годы появились данные о противогрибковой эффективности фотодинамической терапии (ФДТ), в основе которой лежат фотохимические реакции, ведущие к выборочному разрушению тканей. ФДТ предполагает обязательное применение светочувствительных веществ – фотосенсибилизаторов (ФС), среди которых известны различные производные хлорина еб, обладающие высоким профилем безопасности.

Цель: оценить антимикотическое действие ФДТ *in vitro* на колонии основных возбудителей онихомикоза с использованием ФС на основе хлорина еб.

Материалы и методы. Исследование проведено в четырех независимых повторях на четырех культурах патогенных грибов из материала, взятого с ногтевых пластин пациентов с клиническими проявлениями онихомикоза: *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes var. interdigitale*, *Candida albicans*, плесневые грибы (*Aspergillus versicolor*, *Aspergillus fumigatus*). В качестве ФС использовали производное хлорина еб, а для лазерного облучения – аппарат фототерапевтический светодиодный «АФС» с длиной волны 660 нм.

Результаты. Апробирована методика ФДТ на колониях основных возбудителей онихомикоза с ФС как в форме геля, так и раствора; протестированы различные разведения оригинального препарата; подобрана оптимальная световая доза лазерного облучения и количество геля-пенетратора для максимально эффективного протокола ФДТ онихомикоза. В эксперименте доказан фунгицидный эффект ФДТ *in vitro* на колониях основных возбудителей онихомикоза. Противогрибковый эффект определен в схеме ФДТ при нанесении 0,4-0,5 г геля-фотосенсибилизатора на см² с экспозицией 20 минут при световой дозе 100 Дж/см². Рост микромицетов был остановлен при тех же условиях применения ФС в форме раствора с концентрацией, идентичной оригинальному препарату в форме геля.

Заключение. Полученные данные помогут с успехом использовать ФДТ в терапии онихомикоза и подобрать наиболее оптимальный протокол лечения грибковой инфекции ногтевых пластин.

Ключевые слова: онихомикоз, фотодинамическая терапия, фотосенсибилизатор, грибковые заболевания, эксперимент *in vitro*, хлорин еб

EVALUATION OF THE ANTIFUNGAL EFFECT OF PHOTODYNAMIC THERAPY IN AN *IN VITRO* EXPERIMENT ON COLONIES OF THE MAIN PATHOGENS OF ONYCHOMYCOSIS

¹Vasenova V.Yu. (professor of the department),
¹Tsygankova E.I. (postgraduate student), ²Zhukov N.V. (engineer), ³Plevshchikova S.A. (head of the central laboratory department)

¹N.I. Pirogov Russian National Research Medical University (Department of Skin Diseases and Cosmetology); ²Prokhorov General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences; ³Moscow Scientific and Practical Center of Dermatovenerology and Cosmetology, Moscow, Russia

Onychomycosis is a fungal infection of the nail plates. The use of topical and systemic pharmacological agents is not always successful and is limited by a number of contraindications

* Контактное лицо: Цыганкова Екатерина Игоревна,
e-mail: katrin0195@yandex.ru

in certain patient groups. In recent years, there has been data on the antifungal efficacy of photodynamic therapy (PDT), which is based on photochemical reactions leading to selective tissue destruction. PDT implies the mandatory use of photosensitive substances – photosensitizers (PS), among which various derivatives of chlorin e6 are known, possessing a high safety profile.

Objective: To evaluate the antifungal action of PDT *in vitro* on colonies of the main onychomycosis pathogens using PS based on chlorin e6.

Materials and Methods. The study was conducted in four independent repeats on four cultures of pathogenic fungi from material taken from the nail plates of patients with clinical manifestations of onychomycosis: *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes var. interdigitale*, *Candida albicans*, mold fungi (*Aspergillus versicolor*, *Aspergillus fumigatus*). As PS, a derivative of chlorin e6 was used, and for laser irradiation – the "AFC" phototherapeutic device.

Results. The PDT technique was tested on colonies of the main onychomycosis pathogens with PS in the form of a gel and a solution; various dilutions of the original drug were tested; the optimal light dose of laser irradiation and the amount of gel-penetrator for the most effective PDT protocol for onychomycosis were selected. The fungicidal effect of PDT *in vitro* on colonies of the main onychomycosis pathogens was proven. The antifungal effect was determined in the PDT scheme when applying 0,4-0,5 g of gel-photosensitizer per cm² with an exposure of 20 minutes at a light dose of 100 J/cm². The growth of fungi was stopped under the same conditions using PS in the form of a solution with a concentration identical to the original drug in gel form.

Conclusion. The obtained data will help to successfully apply PDT in the treatment of onychomycosis and select the most optimal protocol for treating fungal infections of the nail plates.

Key words: onychomycosis, photodynamic therapy, photosensitizer, fungal diseases, *in vitro* experiment, chlorine e6

ВВЕДЕНИЕ

Онихомикоз – грибковое инфекционное заболевание ногтей, вызываемое дерматофитами, недерматофитами и дрожжами, проявляющееся гиперкератозом или онихолизисом, изменением цвета и структуры ногтевой пластины [1].

Сейчас врачи нередко сталкиваются с недостаточной эффективностью системной антимикотической терапии. Это обусловлено низкой комплаентностью пациентов к лечению (нежелание принимать противогрибковые препараты в течение длительного срока) и ростом резистентности патогенных микроорганизмов к традиционным схемам [2]. Кроме того, у системных антимикотиков есть ряд противопоказаний и побочных эффектов [3].

Сравнительно новым и перспективным методом терапии грибковой инфекции ногтевых пластин может стать фотодинамическая терапия (ФДТ), основанная на способности введенного в организм фотосенсибилизатора (ФС) генерировать синглетный кислород, являющийся токсической средой для патогенных микроорганизмов, под воздействием света опреде-

ленной длины волны. ФДТ давно с успехом применяется в онкологии благодаря деструктивному действию метода на опухолевые клетки, в том числе при лечении кожных новообразований (базальноклеточного рака кожи, актинического кератоза) [4, 5].

В настоящее время опубликован ряд работ, описывающий противовирусный и антимикробный эффект ФДТ [6]. Так, в экспериментах Аполихиной И.А. и соавторов был доказан противовирусный эффект на примере ВПЧ-ассоциированных заболеваний с использованием ФДТ и ФС – 5-аминолевуленовой кислоты (АЛК) [7].

Макаровой О.В. с коллегами был оценен значительный противовирусный эффект ФДТ с применением хлорин е6-содержащего ФС *in vitro* на вирус простого герпеса и вирус-инфицированные клетки [8].

В эксперименте *in vitro* Шишкиной О.Е. с соавторами показано, что ФДТ с фотодитазином, метиленовым синим и хлорофиллином в качестве ФС с дальнейшим лазерным облучением оказывают выраженный фунгицидный эффект на грибы рода *Candida* [9]. Хороший противогрибковый эффект ФДТ как *in vitro*, так и *in vivo* продемонстрирован в некоторых клинических исследованиях [10, 11].

С учетом максимального действия на клетки грибов, спектральных характеристик и устойчивости при хранении активно ведутся поиски наиболее эффективных ФС. Для ФДТ онихомикоза применяют АЛК, метиламинолевулилат (МАЛ) и 5,10,15-трис (4-метилпиридиум)-20-фенил-[21Н,23Н]-порфин трихлорид (Sylsens В), толуидиновый синий, метиленовый синий, производные хлорина е6 [12].

В настоящее время для ФДТ онихомикоза активно используют хлорин е6-содержащие ФС. Применение различных производных хлорина е6 обусловлено высокой фотодинамической активностью (максимум поглощения находится в красном спектре света и составляет 662 нм), минимальной токсичностью и небольшой энергией активации [13]. Хлориновые ФС синтезируются двумя путями: извлечением из природного растительного сырья (морские микроводоросли) или химическим способом. Для топического нанесения и наилучшего проникновения через клеточную стенку грибов рекомендовано использовать липофильные формы. Среди наиболее известных ФС на основе хлорина е6 применяются препараты ди-N-метилглюкаминовой соли хлорина е6, которая является производным хлорофилла а и выпускается в форме концентрата для приготовления раствора для инфузий, а также 0,5%-ного геля-пенетратора. Основным сырьём для их производства является биомасса микроводоросли рода *Spirulina* [14]. В лечении дерматологических пациентов и в косметических целях широкое распространение получили гели с активными ингредиентами в виде смеси производных хлорофилла, выделенных из люцерны, крапивы, в сочета-

нии с другими компонентами, например, 1% гиалуроновой кислотой, 0,1% медным комплексом хлорофиллина [14, 15].

Цель настоящей работы: оценить антимикотическое действие ФДТ *in vitro* с использованием ФС на основе хлорина еб.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на четырех культурах патогенных грибов из материала, взятого с ногтевых пластин пациентов с онихомикозом: *Trichophyton rubrum* фиолетового (буро-красного) цвета с бархатистым белым налетом; *Trichophyton mentagrophytes var. interdigitale* (по новой номенклатуре – *Trichophyton mentagrophytes complex*) с белой бархатистой поверхностью и возвышением в центре; *Candida albicans* круглой четко ограниченной формы жемчужно-белого цвета; плесневые грибы (*Aspergillus versicolor*, *Aspergillus fumigatus*) с пушистой поверхностью бурого, коричневого, черного или зеленого цвета.

Каждую серию культур засеивали в 4-х независимых повторях на стандартную среду Сабуро с инкубацией в термостате при температуре 28-30 °С для дерматофитов и плесневых грибов, 30-36 °С – для дрожжей.

В качестве ФС применяли производное хлорина еб в форме геля-пенетратора и раствора с идентичным составом действующего вещества. Кроме того, водный раствор ФС разводили дистиллированной водой в разведениях 75%, 50% и 25% от оригинального состава препарата.

В качестве источника светового воздействия для лазерного облучения использовали аппарат физиотерапевтический светодиодный «АФС» (ООО «Полироник Девайс», РФ) с длиной волны 660 нм и максимальной мощностью излучения на выходе 700 мВт.

Эксперимент осуществляли по следующей схеме: культуры микроорганизмов засеивали на чашки Петри на стандартную среду Сабуро, при этом каждая чашка была разделена на две симметричные зоны с нанесением ФС в форме геля-пенетратора и последующим действием света на одну из сторон; вторая часть чашки Петри считалась контрольной без применения ФС и облучения. Дополнительные группы сравнения составили культуры грибов, подвергнутые облучению без нанесения ФС и подвергнутые нанесению ФС без последующего облучения.

ФС в форме раствора наносили на всю чашку Петри. В опыте моделировали наиболее оптимальные концентрации препарата ФС, различное время инкубации и дозы облучения.

Фунгицидное и фунгистатическое действие ФДТ определяли качественным и количественным методом на 3-и, 7-е и 14-е сутки инкубации: оценивали ви-

зуальное изменение внешнего вида колоний, характер роста патогенных грибов, измеряли площадь колоний и прирост площади колоний (разница между площадью колоний в день измерения и предыдущим измерением), сравнивали размеры обработанных методом ФДТ и необработанных колоний. Результаты (способность грибов после фототерапии к росту) измеряли в сравнении с контрольной группой и отмечали следующим образом: где – = полное ингибирование роста; + = рост 25% от контроля; ++ = рост 50% от контроля; +++ = рост 75% от контроля; ++++ = рост, как в контроле.

Статистический анализ проводили с помощью программ «Excel» и «Statistica 7.0». Для оценки достоверности различий между группами использовали непараметрический критерий Манна-Уитни с указанием значения вероятности – р. Статистически значимыми считали различия, уровень значимости которых был $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе оценивали токсическое действие ФДТ в отношении грибов с использованием хлорин еб-содержащего ФС в форме геля-пенетратора. В лечении онихомикоза липофильные формы ФС являются преимущественными ввиду наличия у микромицетов клеточной стенки. Время светового воздействия зависит от рекомендованной дозы облучения и размеров облучаемой поверхности.

С учетом размера облучаемой в эксперименте чашки Петри диаметр светового пятна был 9 см (d), а площадь – 63,6 см² (S). В результате, зная выходную мощность, указанную в паспорте на светодиодный аппарат, 0,7 Вт (Ф), можно установить плотность мощности или освещенность (Е) облучаемой поверхности: $E = \Phi/S = 0,7/63,6 = 0,011$ Дж/см²сек.

Время процедуры определяется дозой облучения (Д). Во многих случаях лечения онихомикоза составляет минимально $D=100$ Дж/см². Таким образом, минимальное время облучения всей поверхности чашки Петри: $t = D/E = 100/0,011 = 9091$ секунд или около 152 минут.

Оптимальное количество используемого геля-фотосенсибилизатора и время экспозиции перед облучением требуют подбора. В первой серии выросших колоний наносили 0,1 г геля-фотосенсибилизатора на см² с экспозицией 20 и 30 минут. Результатом было отсутствие ингибирования роста колоний во всех образцах; на 3-й, 7-й и 14-й день количество колоний достоверно визуально не отличалось от контрольных групп (культуры, не обработанные ФС, и не облучены; культуры, обработанные ФС, и не облучены; культуры, только облучены, без ФС) (Рис. 1, табл. 1).

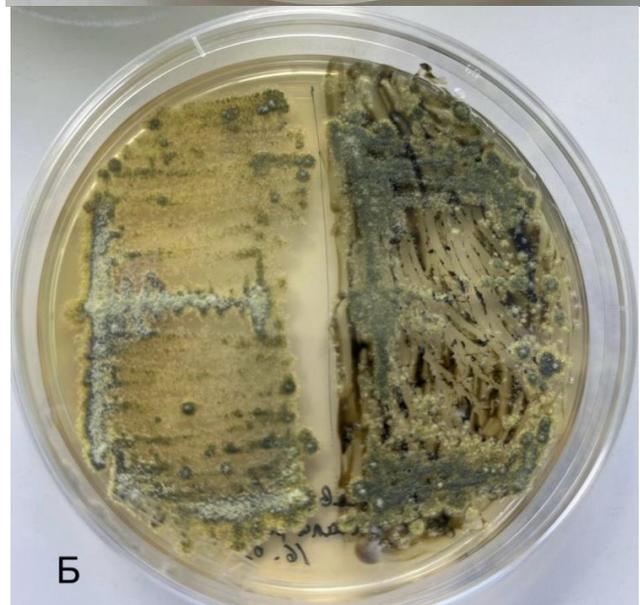
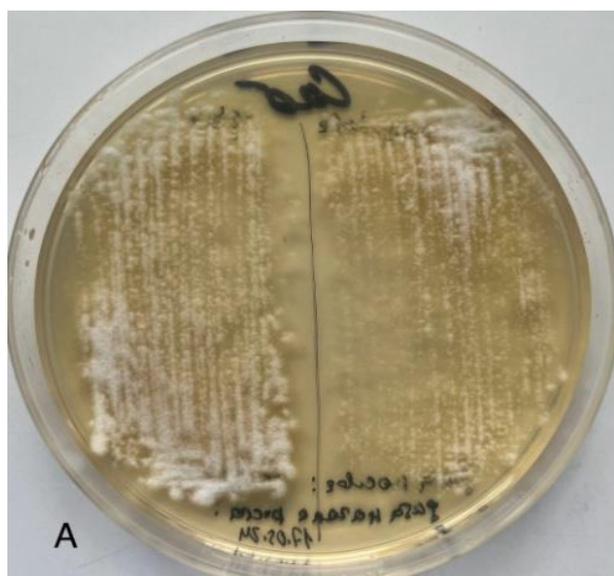


Рис. 1. Колонии плесневого гриба *Aspergillus versicolor* до облучения с предварительным нанесением на половину чашки Петри 0,1 геля-фотосенсибилизатора на см² (А) и на 7-й день после ФДТ с явным продолжением роста грибов (Б).

В следующей серии чашек Петри с начальным ростом колоний была апробирована схема ФДТ с нанесением 0,4-0,5 г геля-фотосенсибилизатора на см² с экспозицией 20 и 30 минут. В результате было получено достоверное отсутствие роста во всех образцах грибов в сравнении с контрольными группами на 3-й, 7-й и 14-й день ($p < 0,05$) (Рис. 2, табл. 1).

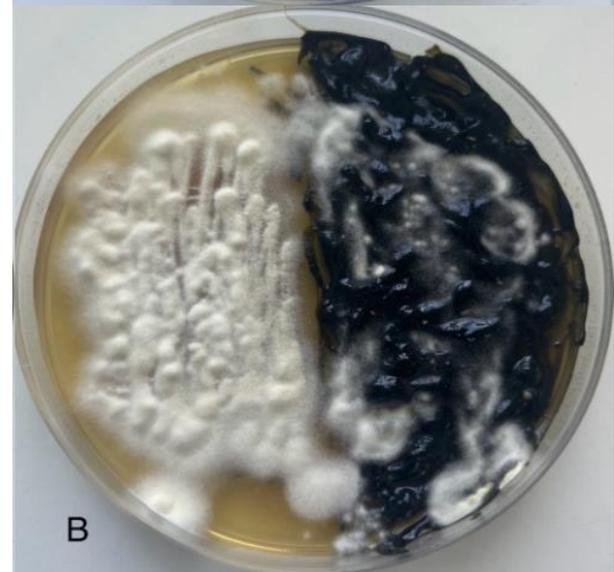
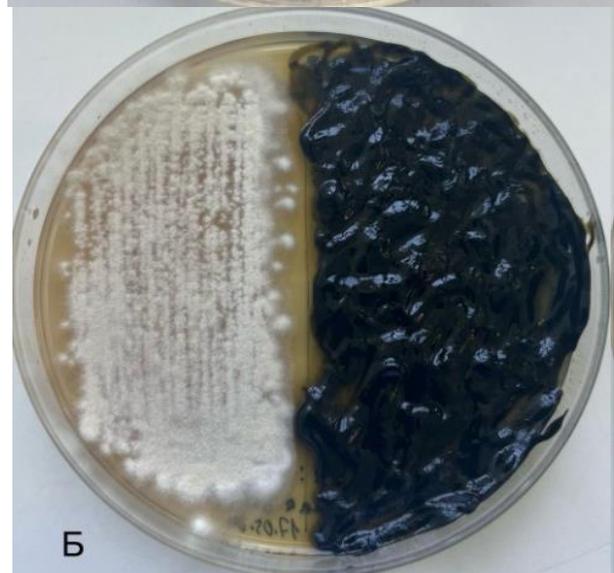


Рис. 2. Колонии *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* до облучения с предварительным нанесением на половину чашки Петри 0,4-0,5 геля-фотосенсибилизатора на см² (А) и на 7-й день после ФДТ с ингибированием роста грибов (Б); контрольный образец с нанесением ФС без облучения с явным ростом грибов на 7-й день сквозь гель (В)

Таблица 1
Оценка роста образцов на 14-й день после ФДТ с ФС при световой дозе 100 Дж/см²

Масса ФС в форме геля		<i>T. rubrum</i>	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>	<i>C. albicans</i>	Плесневые грибы
0,1 грам м на см ²	Экспозиция 20 минут	13,9 [9,9; 17,9] (++++)	15,0 [11,8; 18,2] (++++)	6,7 [3,5; 9,9] (++++)	7,5 [5,6; 9,4] (++++)
	Экспозиция 30 минут	15,9 [15,1; 16,7] (++++)	14,0 [11,6; 16,4] (++++)	8,0 [5,6; 10,4] (++++)	7,5 [4,2; 10,8] (++++)
	Контроль	13,0 [10,6; 15,4]	14,5 [12,1; 16,9]	10,0 [5,2; 14,8]	7,7 [5,3; 10,0]
0,4-0,5 грам м на см ²	Экспозиция 20 минут	0,0 [0,0; 0,0] (-)*	0,0 [0,0; 0,0] (-)*	0,0 [0,0; 0,0] (-)*	0,0 [0,0; 0,0] (-)*
	Экспозиция 30 минут	0,0 [0,0; 0,0] (-)*	0,0 [0,0; 0,0] (-)*	0,0 [0,0; 0,0] (-)*	0,0 [0,0; 0,0] (-)*
	Контроль	12,0 [9,1; 14,9]	15,2 [11,9; 18,5]	9,0 [5,8; 12,2]	6,9 [5,3; 8,5]

Примечание. Результаты (способность грибов после фототерапии к росту) измеряли в сравнении с контрольной группой и отмечали следующим образом: где - = полное ингибирование роста; + = рост 25% от контроля; ++ = рост 50% от контроля; +++ = рост 75% от контроля; ++++ = рост как в контроле. Также считали прирост площади колоний (см²) как разницу между площадью колоний в день измерения (14-ый день) и предыдущим измерением (7-ой день). *Достоверность различий (p < 0,05) при сравнении между основными и контрольными образцами.

Однократно на серии образцов протестировали схему ФДТ с нанесением 0,4-0,5 г геля-фотосенсибилизатора на см² с экспозицией 20 и 30 минут и попытались уменьшить световую дозу до 75 Дж/см² (соответствует времени облучения – 114 минут). Результатом было отсутствие ингибирования роста колоний во всех образцах; на 3-й, 7-й и 14-й день количество колоний достоверно визуально не отличалось от контрольных групп (культуры, не обработанные ФС, и не облучены; культуры, обработанные ФС, и не облучены; культуры, только облучены, без ФС).

На следующем этапе работы был проведен анализ фунгицидного действия хлорин еб-содержащего ФС в форме раствора с целью подбора оптимальной для ФДТ онихомикоза концентрации препарата при световой дозе в 100 Дж/см².

После нанесения раствора ФС и 20-мин. экспозиции грибковые клетки оказались уже окрашены в зеленый цвет при микроскопическом исследовании.

После тестирования различного диапазона разведений ФС (100%, 75%, 50% от оригинального состава препарата) при световой дозе в 100 Дж/см² были получены следующие данные: раствор ФС в отсутствии разведения продемонстрировал статистически значимую разницу (p < 0,05) по сравнению с контрольными группами (прекращение роста всех четырех штаммов грибов); раствор ФС в разведении 75% обладал ингибирующим действием на рост колоний (50% рост в

сравнении с контролем, а 50% разведение ФС было статистически не отличимым от контрольных групп (культуры, не обработанные ФС, и не облучены; культуры, обработанные ФС, и не облучены; культуры, только облучены, без ФС) (Рис. 3, табл. 2).

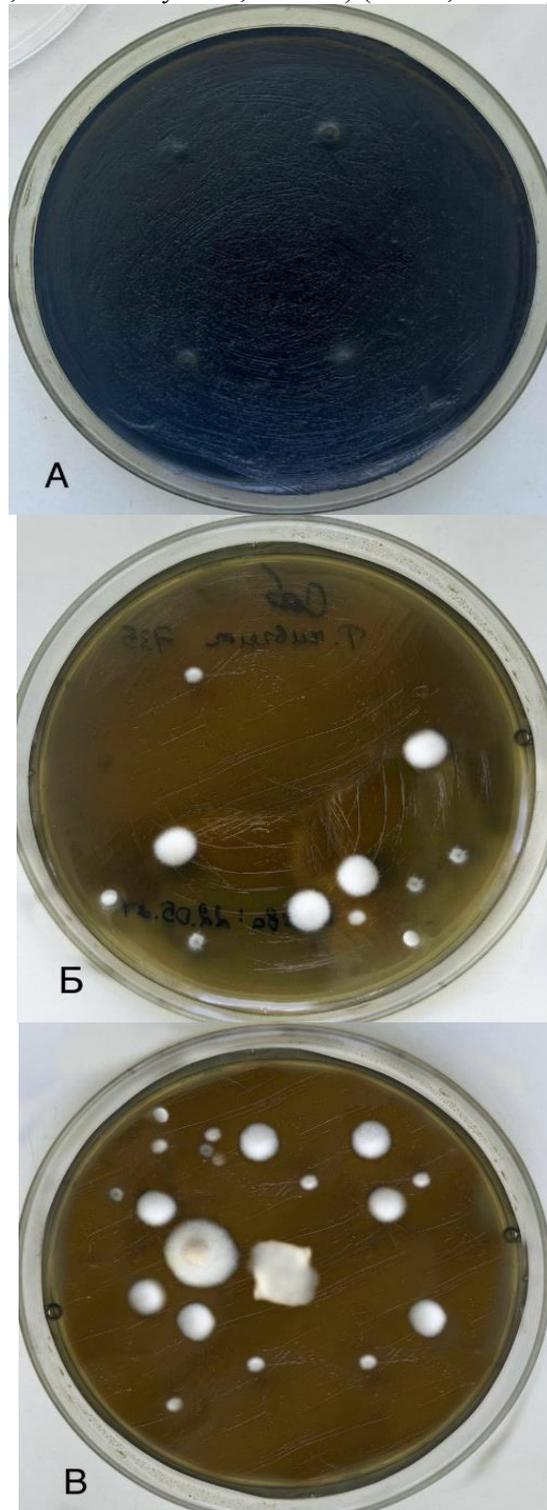


Рис. 3. Колонии *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* на 7-ой день после ФДТ с предварительным нанесением ФС в форме раствора без разведения с полным ингибированием роста грибов (А), ФС в форме раствора с разведением до 75% оригинального препарата с 50%-ным ростом в сравнении с контролем (Б), ФС в форме раствора с разведением до 50% оригинального препарата с явным ростом грибов, как в контроле (В).

Таблица 2

Оценка роста образцов после ФДТ с ФС в форме раствора в различных разведениях на 7-й день при световой дозе 100 Дж/см² с предварительной экспозицией ФС 20 минут

ФС в форме раствора	<i>T. rubrum</i>	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>	<i>C. albicans</i>	Плесневые грибы
100% оригинального препарата	0,0 [0,0; 0,0] (-)*	0,0 [0,0; 0,0] (-)*	0,0 [0,0; 0,0] (-)*	0,0 [0,0; 0,0] (-)*
75% оригинального препарата	7,5 [5,9; 9,1] (++)*	4,5 [2,1; 6,9] (++)*	6,25 [3,9; 8,6] (++)*	10,6 [8,2; 13,0] (++)*
50% оригинального препарата	13,8 [10,6; 17,0] (++++)	7,75 [6,1; 9,3] (++++)	11,9 [8,7; 15,0] (++++)	19,75 [19,3; 20,2] (++++)
Контроль	15,1 [11,9; 18,3]	7,5 [5,9; 9,0]	11,6 [8,4; 14,8]	19,6 [16,4; 22,8]

Примечание. Результаты (способность грибов после фототерапии к росту) измеряли в сравнении с контрольной группой и отмечали следующим образом: где - = полное ингибирование роста; + = рост 25% от контроля; ++ = рост 50% от контроля; +++ = рост 75% от контроля; ++++ = рост как в контроле. Также считали прирост площади колоний (см²) как разницу между площадью колоний в день измерения (7-ой день) и предыдущим измерением (перед световой обработкой). *Достоверность различий (p<0,05) при сравнении между основными и контрольными образцами.

Также при использовании статистических тестов не выявили существенной разницы между контрольными группами (культуры, не обработанные ФС, и не облучены; культуры, обработанные ФС, и не облучены). Таким образом, нанесение ФС или воздействие излучения само по себе не снижает жизнеспособность грибов.

ОБСУЖДЕНИЕ

В проведенной работе опытным путем доказано противогрибковое действие ФДТ с применением хлорин еб-содержащего ФС на четырех различных штаммах: *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, *C. albicans*, плесневые грибы.

В публикациях неоднократно продемонстрирована фоточувствительность микромицетов. В исследовании *in vitro* зарубежные коллеги доказали большую противогрибковую эффективность ФДТ с толуидиновым синим в сравнении с циклопироксоламином [11].

ЛИТЕРАТУРА

1. Липова Е.В., Сокольская А.А., Витвицкая Ю.Г. и др. Онихомикоз (обзор литературы). РМЖ. 2023; 6: 21-24. [Lipova E.V., Sokolskaya A.A., Vitvitskaya Yu.G., et al. Onychomycosis (literature review). RMJ. 2023; 6: 21-24. (In Russ.).]
2. Gupta A.K., Renaud H.J., Quinlan E.M., et al. The growing problem of antifungal resistance in onychomycosis and other superficial mycoses. Am. J. Clin. Dermatol. 2021; 22 (2): 149-157. doi.org/10.1007/s40257-020-00580-6
3. Ковалева Ю.С., Котрехова Л.П., Торшина И.Е. и др. Новые возможности в топической терапии онихомикоза: анализ результатов многоцентрового исследования. Клиническая дерматология и венерология. 2022; 21 (3): 369-376. [Kovaleva Yu.S., Kotrekova L.P., Torshina I.E., et al. New opportunities in topical therapy of onychomycosis:

Kamp H. и соавторы описали фунгистатический эффект АЛК с ингибированием роста *T. rubrum in vitro* на 50% и отметили, что улучшению проникновения ФС через клеточную стенку гриба может способствовать увеличение липофильности АЛК [16].

Фотодинамическую инактивацию нескольких представителей рода *Candida*, используя в качестве ФС российский «Фотодитазин», оценивали Dovigo L.N. с соавторами: ими описано значительное снижение жизнеспособности грибковых изолятов, опосредованное ФДТ [17].

Однако сведений в литературе о применении хлорин еб-содержащего ФС *in vitro* на различных группах возбудителей онихомикоза не было найдено. Представители хлоринового ряда обладают способностью под воздействием света генерировать синглетный кислород и другие его формы, которые окисляют клеточные мембраны и создают токсичную среду для микромицетов. По результатам проведенного нами исследования определены условия фунгицидного действия ФДТ с применением хлорин еб-содержащего ФС. Для противогрибкового эффекта необходимо нанесение 0,4-0,5 г (100%) геля-фотосенсибилизатора на см² с экспозицией 20 минут при световой дозе 100 Дж/см². Фунгистатический эффект получен при 75% разведении препарата. Большие разведения используемого нами ФС не обладали ингибирующим действием в отношении микромицетов.

Полученные данные помогут в дальнейшем подобрать оптимальную тактику ведения пациентов с онихомикозом, включающую апробированный *in vitro* протокол ФДТ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами оценен фунгицидный эффект ФДТ *in vitro* в отношении возбудителей онихомикоза с применением хлорин еб-содержащего ФС. Проведенные исследования способствуют дальнейшему изучению ФДТ и открывают новые подходы к разработке наиболее оптимальных протоколов терапии онихомикоза, расширению применения метода как в комбинированном лечении, так и в виде монотерапии.

analysis of the results of a multicenter study. *Clinical dermatology and venereology*. 2022; 21(3): 369-376. (In Russ.)). doi.org/10.17116/klinderma202221031369

4. Матвеева О.В., Сухова Т.Е. Результаты фотодинамической терапии базальноклеточного рака кожи с внутриочаговым применением фотосенсибилизатора. *Радиация и риск (Бюллетень НРЭР)*. 2014; 23 (2): 37-44. [Matveeva O.V., Sukhova T.E. The results of photodynamic therapy of basal cell skin cancer with intraocular photosensitizer application. *Radiation and Risk (NER Bulletin)*. 2014; 23 (2): 37-44. (in Russ.)].

5. Решетов И.В., Фатьянова А.С., Бабаева Ю.В. и др. Современные аспекты фотодинамической терапии актинического кератоза. *Biomedical Photonics*. 2019; 8 (2): 25-30. [Reshetov I.V., Fatyanova A.S., Babaeva Yu.V., et al. Modern aspects of photodynamic therapy of actinic keratosis. *Biomedical Photonics*. 2019; 8 (2): 25-30. (In Russ.)]. doi.org/10.24931/2413-9432-2019-8-2-25-30

6. Tao J.N., Duan S.M., Li J. Experimental studies on treatment of HSV infections with photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*. 2007; 21 (1): 79-82. PMID: 17429545

7. Аполихина И.А., Денисова Е.Д. Папилломавирусная инфекция гениталий: актуальная проблема современной гинекологии и пути ее решения. *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии*. 2007; 6 (6): 70-75. [Apolikhina I.A., Denisova E.D. Papillomavirus infection of the genitals: the actual problem of modern gynecology and ways to solve it. *Issues of gynecology, obstetrics and perinatology*. 2007; 6 (6): 70-75. (In Russ.)].

8. Макаров О.В., Хашукоева А.З., Свитич О.А. и др. Противогерпетический эффект фотодинамического действия в эксперименте *in vitro*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2014; 1: 48-55. [Makarov O.V., Khashukoeva A.Z., Svitich O.A., et al. The antiherpetic effect of photodynamic action in an *in vitro* experiment. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2014; 1: 48-55. (In Russ.)].

9. Шишкина О.Е., Бутакова Л.Ю., Иванченко Ю.О., Антонов С.С. Микробиологическое обоснование эффективности фотосенсибилизаторов при фотодинамической терапии. *Лазерная медицина*. 2013; 17 (1): 35-37. [Shishkina O.E., Butakova L.Yu., Ivanchenko Yu.O., Antonov S.S. Microbiological backgrounding of photosensitizer effectiveness in photodynamic therapy. *Laser medicine*. 2013; 17 (1): 35-37. (In Russ.)].

10. Smijs T.G., Pavel S. The susceptibility of dermatophytes to photodynamic treatment with special focus on *Trichophyton rubrum*. *Photochem. Photobiol.* 2011; 87 (1): 2-13. doi: 10.1111/j.1751-1097.2010.00848.x

11. de Matos Baltazar L., Soares B.M., Carneiro H.C.S., et al. Photodynamic inhibition of *Trichophyton rubrum*: *in vitro* activity and the role of oxidative and nitrosative bursts in fungal death. *J. of Antimicrobial Chemotherapy*. 2013; 68 (2): 354-361. doi.org/10.1093/jac/dks414

12. Корнишева В.Г. Фотодинамическая терапия при онихомикозе (обзор). *Проблемы медицинской микологии*. 2015; 17 (1): 3-6. [Kornisheva V.G. Photodynamic therapy for onychomycosis (review). *Problems of medical mycology*. 2015; 17 (1): 3-6. (In Russ.)].

13. Суркичин С.И., Круглова Л.С., Майоров Р.Ю. Перспектива фотодинамической терапии в лечении гипертрофической формы онихомикоза. *Эффективная фармакотерапия*. 2024; 20 (1): 72-76. [Surkichin S.I., Kruglova L.S., Mayorov R.Y. The prospect of photodynamic therapy in the treatment of hypertrophic onychomycosis. *Effective pharmacotherapy*. 2024; 20 (1): 72-76. (In Russ.)]. doi.org/10.33978/2307-3586-2024-20-1-72-76

14. Чан Тхи Хай Иен, Раменская Г.В., Оборотова Н.А. Фотосенсибилизаторы хлоридного ряда в ФДТ опухолей. *Российский биотерапевтический журнал*. 2009; 8 (4): 99-104. [Chan Thi Hai Yen, Ramenskaya G.V., Oborotova N.A. Photosensitizers of the chloride series in PDT tumors. *Russian Biotherapeutic Journal*. 2009; 8 (4): 99-104. (In Russ.)].

15. Николаева Е.В. Фотодинамическая терапия в лечении Acne vulgaris с учетом функциональных показателей кожи. Санкт-Петербургские дерматологические чтения: сборник тезисов X Юбилейной научно-практической конференции дерматовенерологов и косметологов. Санкт-Петербург: Санкт-Петербургская общественная организация «Человек и его здоровье». 2016: 89-90. [Nikolaeva E.V. Photodynamic therapy in the treatment of Acne vulgaris, taking into account the functional parameters of the skin. *St. Petersburg Dermatological readings: a collection of abstracts of the X Anniversary scientific and practical conference of dermatovenerologists and cosmetologists*. St. Petersburg: St. Petersburg public organization "Man and his health". 2016: 89-90. (In Russ.)].

16. Kamp H., Tietz H.J., Lutz M., et al. Antifungal effect of 5-aminolevulinic acid PDT in *Trichophyton rubrum*. *Mycoses*. 2005; 48 (2): 101-107. doi.org/10.1111/j.1439-0507.2004.01070.x

17. Dovigo L.N., Carmello J.C., Carvalho M.T., et al. Photodynamic inactivation of clinical isolates of *Candida* using Photodithazine®. *Biofouling*. 2013; 29 (9): 1057-67. doi.org/10.1080/08927014.2013.827668

Поступила в редакцию журнала 04.10.24

Принята к печати 08.11.24

Для цитирования: Серебрякова И.С., Корнишева В.Г., Сулова И.Е., Фролова Е.В., Разнатовский К.И. Клинический случай врожденного дискератоза у мальчика 13 лет. Проблемы медицинской микологии. 2024; 26 (4): 37-42. DOI: 10.24412/1999-6780-2024-4-37-42

For citation: Serebryakova I.S., Kornisheva V.G., Suslova I.E., Frolova E.V., Raznatovsky K.I. A clinical case of congenital dyskeratosis in a 13-year-old boy. Problems in Medical Mycology. 2024; 26 (4): 37-42. (In Russ). DOI: 10.24412/1999-6780-2024-4-37-42

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ ВРОЖДЕННОГО ДИСКЕРАТОЗА У МАЛЬЧИКА 13 ЛЕТ

Серебрякова И.С. (доцент)*, Корнишева В.Г. (профессор кафедры), Сулова И.Е. (врач-педиатр), Фролова Е.В. (зав. лаб.), Разнатовский К.И. (зав. кафедрой)

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

Врожденный дискератоз – редкий наследственный синдром недостаточности костного мозга и нарушения биологии теломер, обычно состоящий из триады: лейкоплакии полости рта, дистрофических ногтей, пойкилодермии кожи. В статье мы приводим клинический случай лейкоплакии языка, ониходистрофии кистей и стоп, сетчатой пойкилодермии, нормохромной анемии у 13-летнего мальчика. При молекулярно-генетическом исследовании диагностирован X-сцепленный рецессивно врожденный дискератоз из-за мутации с.1058C>T (p.Ala353Val) в гене дискерина (DKC1). В силу редкости этого заболевания, схожести его клинических проявлений с другими патологиями кожи (атопический дерматит, хронический кандидоз кожи и слизистых оболочек) возникают сложности в правильной постановке диагноза. Подозрение на заболевание может предотвратить фатальные последствия для пациента. Врожденный дискератоз стоит рассматривать при проведении диагностического поиска у детей с пойкилодермией, лейкоплакией языка, ониходистрофией в сочетании с анемией.

Ключевые слова: врожденный дискератоз, лейкоплакия языка, ониходистрофия, ретикулярная пойкилодермия, гиперпигментация

A CLINICAL CASE OF CONGENITAL DYSKERATOSIS IN A 13-YEAR-OLD BOY

Serebryakova I.S. (associate professor), Kornisheva V.G. (professor of the department), Suslova I.E. (pediatrician), Frolova E.V. (head of the laboratory), Raznatovsky K.I. (head of the department)

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov (Department of Dermatovenereology; Kashkin Research Institute of Medical Mycology), St. Petersburg, Russia

Congenital dyskeratosis is a rare hereditary syndrome of bone marrow insufficiency and telomere biology disorders, usually consisting of a triad: leukoplakia of the oral cavity, dystrophic nails, poikiloderma of the skin. In the article we present a clinical case of leukoplakia of the tongue, onychodystrophy of the hands and feet, reticular poikiloderma, normochromic anemia in a 13-year-old boy. A molecular genetic study diagnosed X-linked recessive congenital dyskeratosis due to mutation C.1058C>T (p.Ala353Val) in the dyskerine gene (DKC1). Due to the rarity of this disease, the similarity of its clinical manifestations with other skin pathologies (atopic dermatitis, chronic candidiasis of the skin and mucous membranes), difficulties arise in the correct diagnosis. Clinical suspicion can prevent fatal consequences for the patient. Congenital dyskeratosis should be considered when conducting a diagnostic search in children with poikiloderma, leukoplakia of the tongue, onychodystrophy in combination with anemia.

Key words: congenital dyskeratosis, leukoplakia of the tongue, onychodystrophy, reticular poikiloderma, hyperpigmentation

ВВЕДЕНИЕ

Одной из крайне редких генетических патологий является врожденный дискератоз (ВД), который проявляется недостаточностью костного мозга и отличается триадой патологических изменений: ониходистрофией, лейкоплакией, пойкилодермией.

* Контактное лицо: Серебрякова Ирина Сергеевна, e-mail: i.serebryakova.dok@mail.ru

Впервые клинический случай врожденного дискератоза был описан в 1910 г. немецким врачом-дерматологом Zinsser S. у двух братьев с дистрофией ногтей, лейкоплакией слизистой оболочки ротовой полости и аномалией пигментации кожи. Затем описание синдрома было дополнено американскими учеными Engman S. и Cole S. В последующем были опубликованы другие «недерматологические» симптомы, вследствие чего сформировалось представление о ВД как о мультисистемном заболевании [1]. Истинная заболеваемость ВД неизвестна и составляет приблизительно 1 случай на 1 млн. населения в год [2]. В Российской Федерации отсутствует регистр ВД. В отечественной литературе описаны единичные наблюдения [1-3].

В настоящее время приходит понимание генетической основы ВД, молекулярных механизмов и спектра расстройств, связанных с этим заболеванием [1-4]. Классическая триада ВД – это аномальная пигментация кожи, дистрофия ногтей и лейкоплакия полости рта. Однако эта триада не всегда наблюдается у пациентов. Для ВД характерен широкий спектр расстройств, затрагивающих все системы организма, и в первую очередь – костный мозг. До 1998 г. ничего не было известно о генетических мутациях, лежащих в основе заболевания. На данный момент выяснено, что существует три типа наследования ВД: сцепленный с X-хромосомой рецессивный (ОМIM #305000), аутосомно-доминантный (ОМIM #127550) и аутосомно-рецессивный (ОМIM #2245230) (табл.). Фенотип, связанный с каждой из этих генетических форм, широко варьируется [2, 4].

Таблица

Известные гены и типы наследования врожденного дискератоза [1]

Аутосомно-доминантный тип	Аутосомно-рецессивный тип	X-сцепленный рецессивный тип
RTEL1, TERT, TERC, TINF2	RTEL1, TERT, NOLA1/2/3, WRAP 53	DKC1

Клинические признаки дискератоза появляются в детстве. До 10 лет пигментация кожи и изменения ногтей – первые симптомы заболевания, затем до 20 лет развивается недостаточность костного мозга. К 30 годам около 90% пациентов демонстрируют признаки недостаточности костного мозга. Основными причинами смертности при дискератозе являются недостаточность костного мозга/иммунодефицит (60-70%), легочные осложнения (10-15%) и злокачественные новообразования (10%) [4]. Больные с ВД имеют высокий риск развития фиброза легких и печени, что является одной из ведущих причин инвалидизации и смертности (до 20%) [2]. Отдельно выделяют такие формы болезни, как синдром Hoyeraal Hreidasson, Revesz-синдром, Coats-plus-синдром. В отличие от «классического» ВД перечисленные варианты заболевания характеризуются ранним появлением симптоматики (чаще с первых лет жизни), прогрессирующим

течением костномозговой недостаточности и частыми врожденными аномалиями развития систем органов [1-5].

ВД – это системное заболевание, в основе развития которого лежит генетически детерминированное укорочение теломер и/или снижение активности теломеразы, что объясняет симптомокомплекс болезни: поражение костного мозга, кожи и слизистых оболочек, так как гомеостаз этих тканей обеспечивается интенсивной пролиферацией на протяжении всей жизни человека [1, 2]. Теломеры – концевые участки хромосом, которые характеризуются отсутствием способности к соединению с другими хромосомами или их фрагментами и выполняют защитную функцию [1, 2]. Фермент теломеразы, а также другие белковые структуры обеспечивают поддержание нормальной длины теломер. Соматические мутации в генах этих белковых структур ведут к развитию редкого заболевания – врожденного дискератоза [1-3]. В результате деятельности теломеразы длина теломерных участков хромосом клетки увеличивается или сохраняется на постоянном уровне. Теломеразы экспрессируются в стволовых, половых и некоторых других типах клеток организма (например, клетках эпителия), которым необходимо постоянно делиться для функционирования данных тканей [1, 5]. Обычные соматические клетки организма лишены теломеразной активности. Опухолевые клетки в 85% случаев обладают теломеразной активностью, поэтому считается, что активация теломеразы является одним из этапов пути клетки к злокачественному перерождению. После активации теломеразы некоторые виды клеток становятся бессмертными. Полагают, что этот механизм и является причиной развития злокачественных заболеваний у пациентов с ВД [5].

Описание клинического случая.

Пациент (13 лет) поступил в клинику НИИ микологии им. П.Н. Кашкина для обследования и уточнения диагноза с жалобами на поражение языка, ногтей и слезотечение. Диагноз направления: хронический кандидоз кожи и слизистых оболочек.

Из анамнеза жизни известно, что мальчик от 1 беременности, протекавшей на фоне анемии. С рождения ребенок наблюдается у нефролога с врожденной аномалией мочевыводящей системы и дисметаболической нефропатией. С 3 лет у пациента отмечены проявления atopического дерматита в виде сухости, гиперемии, мокнутия на фоне повышенного уровня иммуноглобулина E (IgE). После 5 лет содержание IgE было в пределах референтных значений (при последней госпитализации – 21 МЕ/мл). Применение топических кортикостероидов снимало обострение. С возрастом поражение распространилось на кожу туловища, конечностей. Обострения кожного процесса были 2-3 раза в год, без зависимости от времени года. Неоднократно лечился у педиатра и дерматолога по

месту жительства в Саратовской области. Для ухода за кожей использовали эмоленты и увлажняющие средства. Первые высыпания на слизистых оболочках полости рта у ребенка появились в 3 года (на языке, были расценены как афты). Местная обработка раствором клотримазола была малоэффективной. Со временем поражение языка стало приобретать распространенный характер, периодически стали возникать высыпания на слизистой оболочке щек. С 6,5 лет появилась деформация ногтевых пластинок. Лечился амбулаторно у дерматологов с диагнозом «онихокандидоз кистей». Получал антимикотические препараты местного и системного действия в зависимости от результатов микроскопии патологического материала (наличие дрожжевой биоты). Эффекта от терапии не отмечено. В марте 2019 г. консультирован гастроэнтерологом в связи с поражением языка, болями в животе. В результате обследования убедительных данных за болезнь Крона не получено. В мае 2019 г. больной консультирован дерматовенерологом, заключение: лейкоплакия слизистой оболочки полости рта, ониходистрофия; персистирующая панцитопения.

При дерматологическом обследовании наблюдали сухость кожных покровов. Кожа лица бледная. Хейлит с мелкопластинчатым шелушением в углах рта. В периорбитальных областях имелась эритема с незначительным шелушением, которая на щеках с переходом на кожу шеи сменялась комбинацией участков поверхностной атрофии, сетчатой гиперпигментацией серовато-коричневатого цвета, чередующейся с депигментацией и телеангиоэктазиями (пойкилодермия). На коже в области шеи, на груди, в подмышечных и паховых областях, на передней и внутренней поверхностях бедер, задней поверхности голени имелись очаги пойкилодермии (Рис. 1, 2).

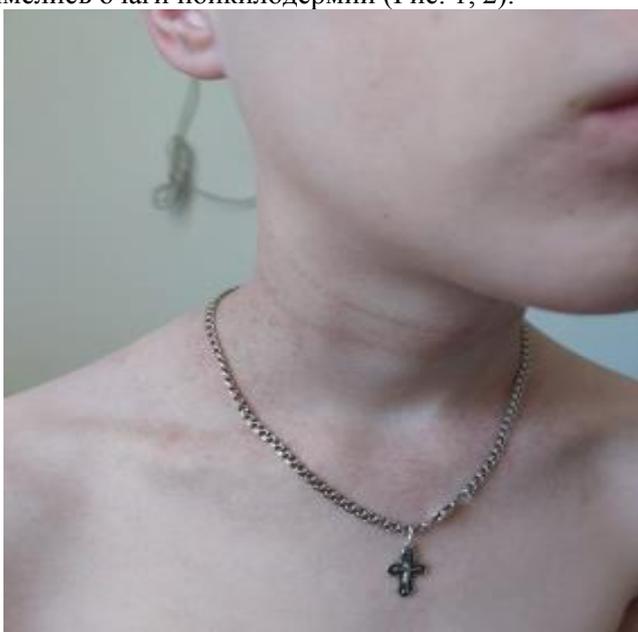


Рис.1. Очаги пойкилодермии в области шеи с переходом на грудь.



Рис. 2. Пойкилодермия на передней и внутренней поверхностях правого бедра.

При осмотре полости рта выявлено изменение слизистой оболочки языка в виде обширной лейкоплакии, занимающей правую передне-боковую сторону языка (Рис. 3). Слизистая оболочка языка напоминала «булыжную мостовую» с чередованием гладких ярко-розовых очагов, лишенных сосочков, и очагов лейкоплакии.



Рис. 3. Лейкоплакия слизистой оболочки языка.

Кожа кистей и стоп сухая, с незначительной эритемой и шелушением, без четких границ, с трещинами и гиперкератозом в пяточной области.

На пальцах кистей и стоп: явления врожденной ониходистрофии (трофические изменения ногтей, ногтевых валиков). Ногти тонкие, уплощенные, с продольной исчерченностью, только на 1/2-2/3 покрывают ногтевые ложа и со свободного края замещены гиперкератозом. Задние ногтевые валики уплощены. Эпонихиум частично отсутствует (Рис. 4, 5).



Рис. 4. Врожденная ониходистрофия правой стопы.



Рис. 5. Врожденная ониходистрофия правой кисти.

Родители пациента не находились в кровном родстве и не имели поражений слизистых оболочек полости рта или кожи.

Лабораторные анализы показали нормоцитарную анемию: эритроциты – $3,60 \times 10^{12}/л$ (нормальный диапазон – $4-5 \times 10^{12}/л$), гемоглобин – 110 г/л (нормальный диапазон – 117-155 г/л); количество лейкоцитов в крови (WBC) было на нижней границе нормы – $4,01 \times 10^9/л$ (нормальный диапазон – $4-9 \times 10^9/л$); выявлены тромбоцитопения (PLT) – $69 \times 10^9/л$ (нормальный диапазон – $150-400 \times 10^9/л$), нейтропения: нейтрофилы общие – 39,7% (нормальный диапазон – 46-76%), абсолютное количество – $1,60 \times 10^9/л$ (нормальный диапазон – $1,84-6,84 \times 10^9/л$); дефицит витамина 25 (ОН)D – 8,5 нг/мл (нормальный диапазон – 30-50 нг/мл).

По результатам проведенного микологического обследования данных за кандидоз кожи и слизистых оболочек не получено.

Выявлены изменения при иммунологическом исследовании: снижение способности Т-лимфоцитов дифференцироваться в Т-хелперы – 27% (нормальный диапазон – 33-41%), снижение абсолютного числа Т-хелперов – $0,386 \times 10^9/л$ (нормальный диапазон – $0,700-1,100 \times 10^9/л$), В-лимфоцитов – $0,026 \times 10^9/л$ (нормальный диапазон – $0,250-0,600 \times 10^9/л$) и естественных киллеров – $0,026 \times 10^9/л$ (нормальный диапазон – $0,200-0,400 \times 10^9/л$), что указывает на наличие иммунодефицитного состояния по клеточному типу.

Рекомендовано обследование в Санкт-Петербургском государственном педиатрическом медицинском университете (СПб ГПМУ), где было проведено молекулярно-генетическое исследование очищенной ДНК, полученной из лимфоцитов периферической крови. Клиническое секвенирование экзона выполнено с помощью системы «Illumina TruSightExome» с использованием коммерчески разработанных целевых наборов. Оценка патогенности была классифицирована в соответствии с руководствами ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics). Обнаружена мутация с.1058C>T(p.Ala353Val) в гене дискерина (DKC1). Гемизиготный вариант в DKC1 NM_001363.5:c.1058C>T(p.Ala353Val) был подтвержден как патогенный.

Мутация в гене DKC1 связана с врожденным дискератозом X-сцепленным (# 305000 DYSKERATOSIS CONGENITA, X-LINKED).

В заключение, на основании выявленных клинических признаков (лейкоплакия языка, ониходистрофия кистей и стоп, гиперкератоз подошв, сетчатая пойкилодермия), данных лабораторного обследования (нормохромная анемия, нейтропения, тромбоцитопения, иммунодефицитное состояние по клеточному типу) и молекулярно-генетического исследования пациенту был поставлен X-сцепленный рецессивно врожденный дискератоз из-за мутации с.1058C>T(p.Ala353Val) в гене дискерина (DKC1). Рекомендовано наблюдение врачей – педиатра, гематолога, дерматолога, стоматолога.

ОБСУЖДЕНИЕ

На основании данных анамнеза и проведенного генетического исследования пациенту был поставлен диагноз врожденного дискератоза.

С врожденным дискератозом связаны мутации в 19 генах, а пятая часть патогенных мутаций обнаружена в гене DKC1, кодирующем фермент дискерин, который принимает участие в поддержании теломер [6]. В 1998 г. ген DKC1 был идентифицирован как причина ВД, сцепленного с X-хромосомой, и были описаны первые мутации. Дальнейший скрининг на мутации в DKC1 предоставил первые доказательства того, что ВД не является однородным расстройством, и другие синдромы с перекрывающимся проявлением могут иметь одни и те же генетические мутации.

Согласно данным большого регистра ВД, 30 из 72 семей имели мутацию DKC1. Проведено исследование, в котором длина теломер сравнивалась с клиническими проявлениями. Показано, что наиболее тяжелый аллельный вариант X-сцепленного ВД – синдром Ноуераал Хрейдассон (НН) имел значительно более короткую длину теломер, чем у пациентов (старше 15 лет) с легкой клиникой и без апластической анемии. Синдром НН является тяжелым мультисистемным расстройством, в основном поражающим мужчин и характеризующимся задержкой роста в пренатальном периоде, микроцефалией, гипоплазией мозжечка, апластической анемией и ранней смертностью [5]. Предсказать проявление заболевания и прогрессирование при ВД не всегда возможно в соответствии с типом мутации и моделью наследования.

Согласно литературным данным, поздняя изолированная недостаточность костного мозга и легочный фиброз были зарегистрированы в основном при гетерозиготных мутациях в TERT, TERC, RTEL1 и PARN [5]. У представленного нами пациента 13 лет выявлены кожно-слизистая триада синдрома, анемия, иммунодефицитное состояние по клеточному типу, но патология легких не обнаружена, что косвенно указывает на медленное прогрессирование.

Врожденный дискератоз относится к группе генетических синдромов с пойкилодермией (ЕС10 МКБ-11). Пойкилодермия – это патологическое состояние кожи, сочетающее атрофию, телеангиэктазию, гипо- и гиперпигментацию. Врачи общей практики или специалисты недерматологи часто ошибочно принимают ее за пятнистую пигментацию. Пойкилодермия может быть ключевым симптомом синдрома Ротмунда-Томсона, врожденного дискератоза, наследственной склерозирующей пойкилодермии, наследственной фиброзирующей пойкилодермии с контрактурами сухожилий, миопатией и легочным фиброзом, пигментной ксеродермы, синдрома Блума, синдрома Киндлера и пойкилодермии типа Клерикучио с нейтропенией [7]. Врожденные пойкилодермии – наследственные заболевания, возникающие с рождения или в раннем дет-

ском возрасте. У представленного нами пациента кожные проявления отмечены с 3 лет. Они выражаются диффузной или пятнистой эритемой, к которой в дальнейшем присоединяются телеангиэктазии, сетчатая коричневая пигментация и легкая очаговая атрофия кожи. Пойкилодермия может указывать на наличие генетического заболевания и почти всегда предшествует более тяжелым проявлениям этих генодерматозов. Гистологическое исследование обнаруживает атрофию эпидермиса, неравномерное распределение меланина, дилатацию сосудов сосочкового слоя дермы, инфильтрацию дермы лимфоцитами и гистиоцитами, особенно – вокруг кровеносных сосудов. Лечение пойкилодермии в большинстве случаев симптоматическое, с использованием средств, улучшающих питание кожи [7]. Для профилактики этого состояния и предотвращения его прогрессирования следует ограничить воздействие на кожу ультрафиолетового облучения, низких и высоких температур, агрессивных химических веществ и тяжелых металлов.

Первичным проявлением врожденного дискератоза, как правило, является дистрофия ногтевых пластинок. Ногти становятся тонкими и ломкими, иногда приобретают ложкообразный вид, так называемые койлонихии. При койлонихии ногтевая пластинка прочно прикреплена к кости вертикальными дермальными соединительнотканными пучками в подногтевой области, которые связываются непосредственно с надкостницей. На ранних стадиях формирования койлонихии наблюдается уплощение ногтевой пластинки [8]. Истончение и уплощение ногтей отмечено у представленного нами пациента с 6,5 лет. Со свободного края ногтей может формироваться гиперкератоз, что имеется у нашего больного.

Лейкоплакия языка и слизистых оболочек полости рта у пациента появилась после 3 лет. Ребенок предъявлял жалобы на жжение языка после приема соленой пищи, цитрусовых. Лейкоплакия – воспалительный процесс, сопровождающийся ороговением слизистых оболочек ротовой полости, языка, может быть плоской, веррукозной, эрозивно-язвенной. На слизистой оболочке могут появляться трещины, язвы и эрозии, которые плохо заживают. Высок риск трансформации эрозивной лейкоплакии в злокачественную опухоль, поэтому пациенту показано наблюдение стоматолога и с профилактической целью – назначение витамина А или бета-каротина.

В общих анализах крови на ранних стадиях заболевания возможны лейкоцитоз, нейтропения, повышение СОЭ (скорость оседания эритроцитов). Далее развивается апластическая анемия, могут быть макроцитоз и повышение концентрации фетального гемоглобина. Стернальная пункция на поздних стадиях выявляет депрессию костного мозга [9].

Прогрессирующее снижение абсолютного числа Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и естественных киллеров характерно для врожденных дискератозов, относящихся к первичным иммунодефицитам (МКБ 82.8) [10].

Диагностика врожденного дискератоза затруднена. Заболевание встречается крайне редко. Диагноз выставляется на основании имеющихся кожно-слизистых симптомов. Пойкилодермия у ребенка указывает на наличие генетического заболевания и необходимость проведения генетического обследования [9]. Из-за разнообразия мутированных генов кожно-слизистая триада симптомов встречается не у всех пациентов с ВД (табл.).

Лечение врожденного дискератоза малоэффективно. Самым тяжелым проявлением ВД является прогрессирующая костно-мозговая недостаточность кроветворения [1-9]. Основная цель – борьба с угнетением функции костного мозга. Метод выбора – трансплантация костного мозга, хотя на фоне пересадки у большей части больных наблюдается реакция «трансплантат против хозяина». Единственная наиболее эффективная методика терапии ребенка с врожденным дискератозом – проведение аллогенной трансплантации стволовых гемопоэтических клеток. Это позволит вылечить костномозговую недостаточность [1-9]. При лейкоплакии используются ретиноиды и бета-каротин [9].

Прогноз при врожденном дискератозе неблагоприятный. К смерти приводят злокачественные новообразования, присоединение вторичной инфекции,

пневмонии, желудочно-кишечные или другие внутренние кровотечения. Чаще всего пациенты умирают от плоскоклеточного рака ротовой полости, гортаноглотки, который может развиться даже у детей младшего возраста [9, 11]. Степень выраженности гематологических и негематологических проявлений заболевания и скорость их прогрессии не зависят от возраста начала клинических проявлений ВД [1].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, врожденный дискератоз – это редкое заболевание из группы генетических синдромов с пойкилодермией (ЕС10 МКБ-11). В силу редкости ВД, схожести его клинических проявлений с другими патологиями кожи возникают сложности в правильной постановке диагноза. Подозрение на ВД может предотвратить фатальные последствия для пациента. Данное заболевание стоит рассматривать при проведении диагностического поиска у детей с пойкилодермией, лейкоплакией полости рта, ониходистрофией в сочетании с анемией. Молекулярно-генетическое исследование способствует более быстрой и правильной диагностике врожденного дискератоза.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ершов Н.М., Овсянникова Г.С., Хачатрян Л.А. и др.* Врожденный дискератоз: анализ клинических случаев. Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. 2014; 93 (6): 90-95. [Ershov N.M., Ovsyannikova G.S., Khachatryan L.A. et al. Congenital dyskeratosis: an analysis of clinical cases. Pediatrics. The magazine named after G.N. Speransky. 2014; 93 (6): 90-95. (In Russ.)].
2. *Лучкин А.В., Михайлова Е.А., Фидарова З.Т. и др.* Семейный случай врожденного дискератоза. Клиническое наблюдение. Тер. архив. 2021; 93 (7): 818-825. [Luchkin A.V., Mikhailova E.A., Fidarova Z.T., et al. A case report of familial dyskeratosis congenital. Case report. Ter. Arkh. 2021; 93 (7): 818-825. (In Russ.)]. doi:10.26442/00403660.2021.07.200955
3. *Емельянова Т.А., Хмелевская И.Г., Миненкова Т.А. и др.* Врожденный дискератоз: клиническое наблюдение. Курский науч.-практ. вестн. «Человек и его здоровье». 2018; (2): 44-48. [Emelianova T.A., Khmelevskaya I.G., Minenkova T.A., et al. Congenital dyskeratosis: clinical observation. Kursk scientific and practical. vestn. "Man and his health." 2018; (2): 44-48. (In Russ.)]. doi:10.21626/vestnik/2018-2/07
4. *Walne A.J., Dokal I.* Advances in the understanding of dyskeratosis congenital. Br. J. Haematol. 2009; 145 (2): 164-172. doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07598.x
5. *Vulliamy T.J., Marrone A., Knight S.W., et al.* Mutations in dyskeratosis congenita: their impact on telomere length and the diversity of clinical presentation. Blood. 2006; 107 (7): 2680-2685. doi.org/10.1182/blood-2005-07-2622
6. *Al Sabbagh M.M.* Dyskeratosis congenita: A literature review. J. Dtsch. Dermatol. Ges. 2020;18: 943-967. doi: 10.1111/ddg. 14268
7. *Rayinda T., van Steensel M., Danarti R.* Inherited skin disorders presenting with poikiloderma. Int. J. Dermatol. 2021; 60 (11): 1343-1353. doi: 10.1111/ijd.15498
8. *Baran R., Dawber R.P., et al.* A text atlas of nail disorders techniques in investigation and diagnosis. London and New York, 2003: 345 p.
9. *Елагина И.Л.* Врожденный дискератоз. <https://www.krasotaimedicina.ru/diseases/children/dyskeratosis-congenita>
10. *Тузанкина И.А., Дерябина С.С., Болков М.А. и др.* Первичные иммунодефициты в раннем возрасте. М., 2018: 176 с. [Tuzankina I.A., Deryabina S.S., Bokov M.A. and others. Primary immunodeficiency at an early age. М., 2018: 176 p. (In Russ.)].
11. *Jh K., Cs K.* Squamous cell carcinoma of the tongue in 5-year-old girl with dyskeratosis congenita. Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 2021; 50 (12): 1546-1549. doi: 10.1016/j.ijom.2021.02.027

Поступила в редакцию журнала 20.11.24

Принята к печати 27.11.24

Для цитирования: Игнатьева С.М., Шадринова О.В., Хостелиди С.Н., Козлова О.П., Десятник Е.А., Борзова Ю.В., Богомолова Т.С., Фролова Е.В., Учеваткина А.Е., Филиппова Л.В., Секретарева О.В., Климович А.В., Успенская О.С., Васильева Н.В. Диагностическая значимость (1,3)-β-D-глюкана в различных видах биологического материала от онкогематологических больных с инвазивным аспергиллезом. Проблемы медицинской микологии. 2024; 26 (4): 43-49. DOI: 10.24412/1999-6780-2024-4-43-49

For citation: Ignatieva S.M., Shadrivova O.V., Khostelidi S.N., Kozlova O.P., Desyatnik E.A., Borzova Yu.V., Bogomolova T.S., Frolova E.V., Uchevatkina A.E., Filippova L.V., Secretaryova O.V., Klimovich A.V., Uspenskaya O.S., Vasileva N.V. Diagnostic significance of (1,3)-β-D-glucan in various types of biological material from oncohematological patients with invasive aspergillosis. Problems in Medical Mycology. 2024; 26 (4): 43-49. (In Russ). DOI: 10.24412/1999-6780-2024-4-43-49

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ (1,3)-β-D-ГЛЮКАНА В РАЗЛИЧНЫХ ВИДАХ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ОТ ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ С ИНВАЗИВНЫМ АСПЕРГИЛЛЕЗОМ

¹Игнатьева С.М. (в.н.с.)*, ¹Шадринова О.В. (доцент), ¹Хостелиди С.Н. (доцент), ¹Козлова О.П. (доцент), ¹Десятник Е.А. (врач-миколог), ¹Борзова Ю.В. (зав. клиникой), ¹Богомолова Т.С. (зав. лаб.), ¹Фролова Е.В. (зав. лаб.), ¹Учеваткина А.Е. (с.н.с.), ¹Филиппова Л.В. (с.н.с.), ¹Секретарева О.В. (н.с.), ²Климович А.В. (зав. отд.), ³Успенская О.С. (зав. отд.), ¹Васильева Н.В. (директор института, зав. кафедрой)

¹Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина и кафедра клинической микологии, аллергологии и иммунологии); ²Городская больница №31; ³Ленинградская областная больница, Санкт-Петербург, Россия

Цель работы заключалась в оценке диагностической значимости метода определения (1,3)-β-D-глюкана (БДГ) в различных биологических образцах онкогематологических пациентов с инвазивным аспергиллезом (ИА). Исследовали 112 клинических образцов от 50 онкогематологических больных ИА и 24 онкогематологических пациентов без ИА. Показано, что диагностические характеристики БДГ зависят от типа биологического образца и варьируют у разных групп больных ИА. Выявлены высокие показатели специфичности (82%) и прогностического значения положительного результата БДГ в сыворотке крови (87%) и низкие диагностические характеристики в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ). Отмечена перспективность комплексного определения БДГ в сыворотке крови и галактоманна в сыворотке крови и БАЛ, повышающую чувствительность диагностики до 76% и 89% соответственно.

Ключевые слова: (1,3)-β-D-глюкан, галактоманнан, бронхоальвеолярный лаваж, вероятный инвазивный аспергиллез, возможный инвазивный аспергиллез, биологические образцы, онкогематологические пациенты

DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF (1,3)-β-D-GLUCAN IN VARIOUS TYPES OF BIOLOGICAL MATERIAL FROM ONCOHEMATOLOGICAL PATIENTS WITH INVASIVE ASPERGILLOSIS

¹Ignatieva S.M. (leading scientific researcher), ¹Shadrivova O.V. (associate professor), ¹Khostelidi S.N. (associate professor), ¹Kozlova O.P. (associate professor), ¹Desyatnik E.A. (doctor-mycologist), ¹Borzova Yu.V. (head of the clinic), ¹Bogomolova T.S. (head of the laboratory), ¹Frolova E.V. (head of the laboratory), ¹Uchevatkina A.E. (senior scientific researcher), ¹Filippova L.V. (senior scientific researcher), ¹Secretaryova O.V. (scientific researcher), ²Klimovich A.V. (head of the clinical department), ³Uspenskaya O.S. (head of the clinical department), ¹Vasileva N.V. (director of the institute, head of the department)

¹North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov (Kashkin Research Institute of Medical Mycology and Department of Clinical Mycology, Allergology and Immunology); ²City Hospital №31; ³Leningrad Regional Clinical Hospital, St. Petersburg, Russia

The purpose of the work was to assess the diagnostic significance of the method for determining (1,3)-β-D-glucan (BDG) in biological samples of oncohematological patients with invasive aspergillosis (IA).

We studied 112 clinical samples from 50 oncohematological patients with IA and 24 oncohematological patients without IA. It has been shown that the diagnostic characteristics of BDG depend on the type of biological sample and vary in different groups of patients with IA. High rates of specificity (82%) and predictive value of a positive BDG result in blood serum (87%) and low diagnostic characteristics in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid were revealed. The promise of a comprehensive determination of BDG in blood serum and galactomannan in blood serum and BAL fluid was noted, increasing diagnostic sensitivity to 76% and 89%, respectively.

Key words: (1,3)-β-D-glucan, galactomannan, bronchoalveolar lavage, probable invasive aspergillosis, possible invasive aspergillosis, biological samples, oncohematological patients

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

ВВЕДЕНИЕ

Инвазивный аспергиллез (ИА) является одной из причин летальных исходов у иммунокомпрометированных пациентов, среди которых 60-80% составляют онкогематологические больные, получающие цитостатическую полихимиотерапию (ПХТ) и реципиенты трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) [1-3]. Прогноз заболевания зависит от ранней диагностики и своевременной эффективной противогрибковой терапии. Микологическая диагностика ИА включает в себя микроскопические, культуральные методы исследования биосубстратов больных и гистологического биопсийного/аутопсийного материала, а также определение специфических грибковых биомаркеров, таких как галактоманнан (ГМ) и ДНК *Aspergillus* spp. В соответствии с ESCMID-ECMM-ERS, 2017 (European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases, the European Confederation of Medical Mycology and the European Respiratory Society) [4], впервые при диагностике ИА был рекомендован новый биомаркер – пангрибковый (1,3)- β -D-глюкан (БДГ) – в качестве «дополнительного» с силой рекомендации С II. БДГ входит в состав клеточной стенки многих возбудителей инвазивных микозов (ИМ), в том числе и *Aspergillus* spp., но не обнаружен у *Cryptococcus* spp. и грибов порядка *Mucorales*. Наибольшая эффективность БДГ-теста отмечена при сочетании с ГМ-тестом или полимеразной цепной реакцией (ПЦР) *Aspergillus* spp., а также в скрининговых исследованиях при мониторинге противогрибковой терапии у пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) с инвазивным кандидозом (ИК) и иммунокомпрометированных больных с ИА и пневмоцистной пневмонией [5, 6].

Цель исследования: оценить диагностическую значимость метода определения БДГ в биологическом материале онкогематологических пациентов с инвазивным аспергиллезом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 50 онкогематологических пациентов с ИА из различных стационаров г. Санкт-Петербурга в период 2017-2024 гг.: мужчины – 53% (возраст – 19÷89 лет), женщины – 47% (возраст – 18÷76 лет). Среди больных ИА у 39 человек установлен диагноз «вероятного» ИА, у 11 – «возможного» ИА. Контрольную группу составили 24 пациента без ИА; мужчины – 58%, женщины – 42% (возраст – 19÷74 лет). Диагноз «инвазивный аспергиллез» устанавливали на основании критериев, предложенных Европейской организацией по изучению и лечению рака (EORTC) и группы изучения микозов (MSG) Национального института аллергологии и инфекционных заболеваний (NIAID), США (2020

г.) [7]. Микологический диагноз ставили на основании обнаружения микромицетов при прямой микроскопии образцов с калькофлюором белым и/или высева грибов рода *Aspergillus*, а также положительного результата при определении ГМ *Aspergillus* spp. в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) (ИОП \geq 1,0) или сыворотке/плазме крови (ИОП \geq 0,5) с помощью тест-системы «Platelia *Aspergillus* Ag» («Bio-Rad Laboratories»).

В работе исследовали 77 образцов крови и 35 образцов БАЛ от онкогематологических больных ИА и контрольных лиц.

Определение БДГ осуществляли с использованием набора «Goldsteam» на спектрофотометре «Multiskan GO» («Thermo Fisher Scientific», Финляндия) в кинетическом режиме измерения оптической плотности при длине волны 405 нм и инкубации при 37 °С в соответствии с инструкцией производителя. Результаты считали отрицательными при концентрации БДГ <60 пг/мл, сомнительными – от 60 до 79 пг/мл и положительными \geq 80 пг/мл для сыворотки/плазмы крови, а также отрицательными при концентрации БДГ <400 пг/мл, сомнительными – от 400 до 449 пг/мл и положительными \geq 450 пг/мл для БАЛ. Тестирование биосубстратов на БДГ проводили либо одновременно, либо не позднее 7 дней после тестирования на ГМ.

Оценку чувствительности, специфичности, прогностического значения положительного и отрицательного результатов выполняли по общепринятым формулам.

Полученные данные обрабатывали с применением программной системы «STATISTICA for Windows» (версия 10), которые представляли в виде медианы (Me) нижнего и верхнего квартилей (25-го и 75-го процентилей, Lq и Hq). Оценку различий между независимыми выборками осуществляли с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Достоверными различиями сравниваемых параметров считали значения $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Основными заболеваниями у 39 онкогематологических пациентов с «вероятным» ИА были: острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) – 29%, лимфома – 26%, неходжкинская лимфома (НХЛ) – 12%, хронический лимфолейкоз (ХЛЛ), острый лимфолейкоз (ОЛЛ), лимфома Ходжкина (ЛХ) – по 9%, хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ), множественная миелома (ММ) и миелодиспластический синдром (МДС) – по 3% (Рис. 1).

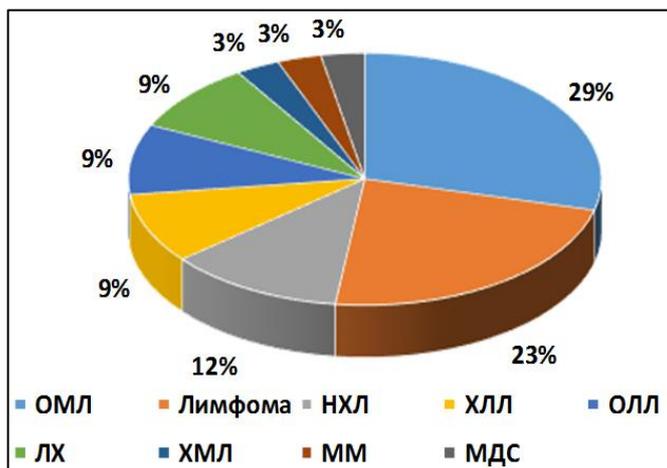


Рис.1. Гематологические заболевания у пациентов с «вероятным» ИА.

У 11 онкогематологических больных с «возможным» ИА диагностированы следующие заболевания: ОМЛ – 55%, лимфома – 18%, ОЛЛ – 18% и НХЛ – 9% (Рис. 2).

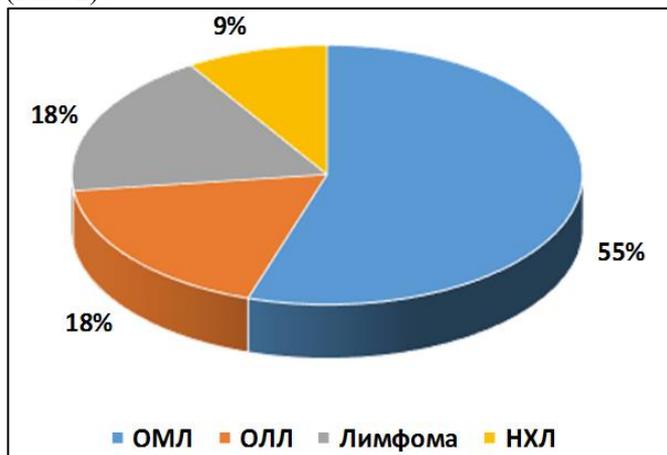


Рис. 2. Гематологические заболевания у пациентов с «возможным» ИА.

Контрольная группа состояла из 24 онкогематологических пациентов без ИА со следующими гематологическими заболеваниями: ОМЛ – 50%, ОЛЛ, лимфома, ХМЛ, ММ – по 10%, НХЛ и МДС – по 5%. В группах больных ИА и контрольной преобладали пациенты с ОМЛ.

При микроскопическом изучении 35 респираторных биосубстратов в 25% случаев были выявлены морфологические элементы грибов, характерные для *Aspergillus* spp. При посеве биосубстратов на питательные среды получено 11 культур *Aspergillus* spp. (31%): 7 штаммов *A. fumigatus*, 2 штамма *A. niger* и по 1 штамму *A. nidulans* и *A. versicolor*. Среди выделенных культур преобладали штаммы *A. fumigatus* (Рис.3).

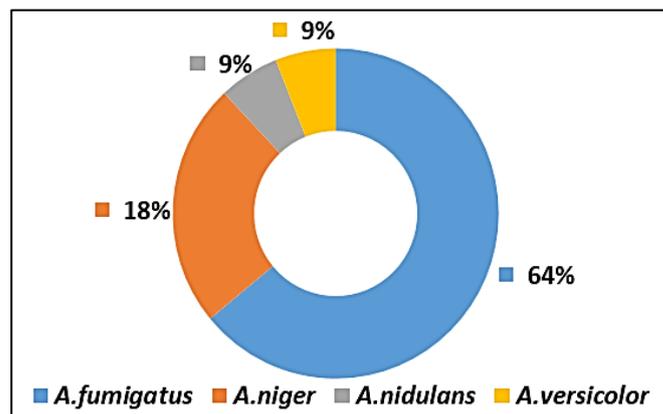


Рис. 3. Культуры *Aspergillus* spp. от больных ИА.

Во всех образцах крови и БАЛ определяли грибковые биомаркеры ИА – ГМ *Aspergillus* spp. и БДГ. Среди больных с «вероятным» ИА сывороточный БДГ обнаруживали достоверно чаще ($p=0,0015$) у лиц с положительным высевом *Aspergillus* spp. из БАЛ – 11 человек (82%), чем у пациентов с отрицательным результатом посева, но с положительным результатом ГМ-теста – 14 человек (64%) (табл.1).

Таблица 1

Сывороточный БДГ у пациентов с «вероятным» ИА

Пациенты с «вероятным» ИА	Количество сывороток	БДГ			
		(+)	%	(-)	%
Пациенты с (+) высевом <i>Aspergillus</i> spp., n=11	11	9	82	2	18
Пациенты с (-) высевом <i>Aspergillus</i> spp. (+) ГМ, n=14	14	9	64	10	36

Уровень БДГ в сыворотке крови различался у больных с «вероятным» и «возможным» ИА, а также у контрольных лиц. Концентрация БДГ в образцах пациентов с «вероятным» ИА колебалась в широком диапазоне от 60 pg/ml до 960 pg/ml (медиана –147 pg/ml); средние значения уровня БДГ (291 pg/ml) были достоверно выше ($p=0,0160$), чем у лиц с «возможным» ИА (52 pg/ml). Низкие значения сывороточного БДГ при «возможном» ИА практически не отличались ($p=0,386$) от аналогичного показателя в контрольной группе (Рис.4), что указывает на нецелесообразность диагностического применения данного теста у больных с «возможным» ИА.

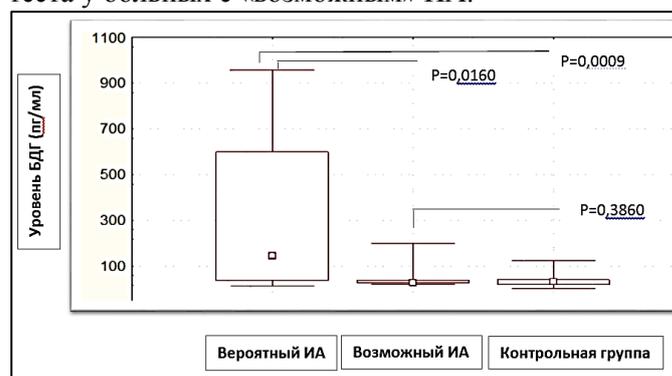


Рис. 4. Уровень БДГ в крови больных ИА и контрольной группе, Ме (Q25-Q75).

На следующем этапе работы мы изучили возможность определения БДГ в разных биосубстратах. С этой целью были протестированы образцы 33 сывороток крови, 17 плазмы крови и 25 БАЛ от больных с «вероятным» ИА, а также по 27 образцов сыворотки/плазмы и 10 БАЛ от контрольных лиц. В ходе исследования не выявили статистически значимых различий ($p=0,7720$) в концентрациях БДГ в сыворотке и плазме крови у пациентов с «вероятным» ИА, что позволяет равноценно использовать эти биосубстраты при постановке данного теста. Уровень БДГ в БАЛ больных ИА достоверно ($p=0,0094$) превышал (среднее значение – 773 pg/ml, медиана – 822 pg/ml) уровни БДГ в сыворотке и плазме крови и контрольных образцов (Рис.5).

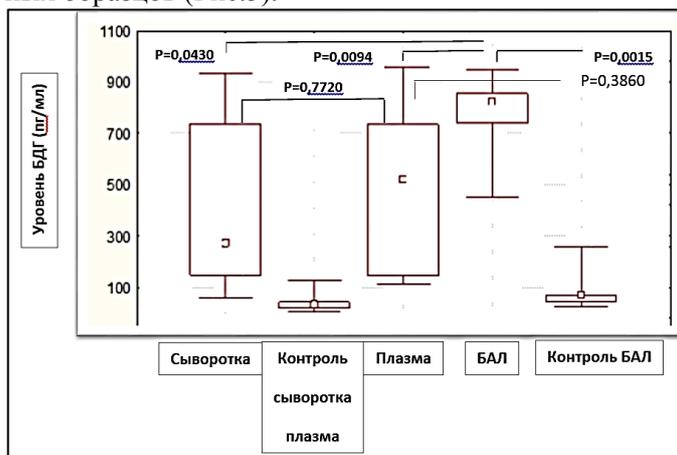


Рис. 5. Уровень БДГ в различных биосубстратах больных ИА и контрольных групп, Ме (Q25-Q75).

Далее была проведена оценка диагностических характеристик БДГ-теста в сыворотке крови и БАЛ пациентов с ИА (табл.2). При тестировании 50 сывороточных образцов от больных ИА и 27 сывороток от контрольных лиц получены высокие значения специфичности (82%) и прогностического показателя положительного результата теста (ПЗПР) (87%). В то же время отмечены низкая прогностическая ценность отрицательного результата (ПЗОР) (55%) и чувствительность БДГ (64%).

Таблица 2
Диагностические характеристики БДГ в различных биосубстратах больных ИА

Биосубстрат	Количество	Чувствительность (%)	Специфичность (%)	ПЗПР (%)	ПЗОР (%)
Сыворотка крови	77	64	82	87	55
БАЛ	35	52	70	75	37

При определении БДГ в 25 образцах БАЛ онкогематологических пациентов с ИА и в 10 образцах от больных без ИА выявлены низкие диагностические показатели чувствительности (52%), специфичности (70%) и прогностической ценности положительного

(75%) и отрицательного (37%) результатов, не позволяющие рекомендовать данный биомаркер для исследования БАЛ в лабораторной диагностике инвазивного аспергиллеза легких (ИАЛ).

Респираторные образцы являются наиболее подходящим биосубстратом для обнаружения другого биомаркера ИАЛ – ГМ *Aspergillus* spp. (ЕОРТС-MSG, 2020) [7]. Оценку диагностических параметров ГМ проводили в аналогичных когортах пациентов с ИА и контрольной группе больных без ИА (табл.3).

Таблица 3
Диагностические характеристики ГМ в различных биосубстратах пациентов с ИА

Биосубстрат	Количество	Чувствительность (%)	Специфичность (%)	ПЗПР (%)	ПЗОР (%)
Сыворотка крови	77	42	85	84	56
БАЛ	35	71	86	85	73

Как видно из таблицы, получены высокие показатели специфичности (85-86%) и ПЗПР (84-85%) ГМ для обоих биосубстратов, что обеспечивает надежность положительного результата ГМ-теста при ИА. Кроме того, чувствительность ГМ и величина ПЗОР в БАЛ были существенно выше, чем в сыворотке крови. Поэтому для диагностики ИАЛ предпочтительнее использование ГМ *Aspergillus* spp. в респираторных образцах больных. Сывороточные показатели ГМ не отличались от аналогичных при определении БДГ, за исключением чувствительности, которая была у ГМ достоверно ниже, чем у БДГ-теста (42% vs 64%, $p=0,0002$). Как отмечают некоторые исследователи [8], в тех случаях, когда по клиническим данным (тромбоцитопения и др.) пациенту не показана бронхоскопия, для уточнения диагноза и увеличения чувствительности диагностики рекомендовано комплексное использование нескольких биомаркеров ИА. В своем эксперименте мы апробировали комбинацию БДГ-теста и ГМ при исследовании 50 образцов сывороток крови и 25 образцов БАЛ для определения чувствительности диагностики при ИА (Рис.6).

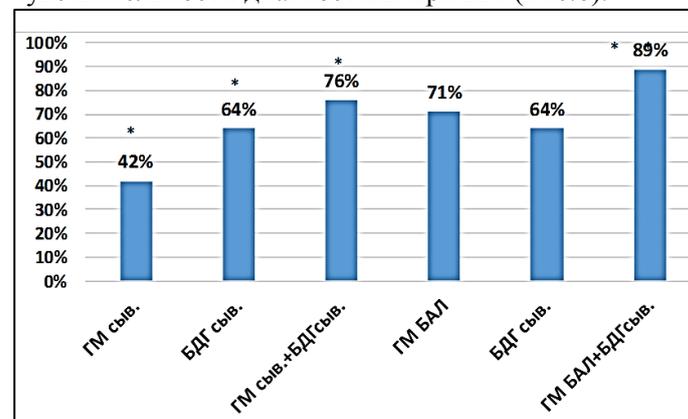


Рис. 6. Чувствительность ГМ *Aspergillus* spp. в сыворотке крови и БАЛ и БДГ в сыворотке крови больных «вероятным» ИА (%). * $p,0<0,05$.

Полученные результаты показывают эффективность БДГ-теста в качестве дополнительного к специфичному ГМ-тесту при диагностике ИА. Сочетанное использование нескольких биомаркеров (ГМ сыворотки + БДГ сыворотки и ГМ БАЛ+ БДГ сыворотки) способствует увеличению чувствительности диагностики ИА как в сывороточных образцах (с 42% до 76%), так и в БАЛ (с 71% до 89%).

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование БДГ в сыворотке крови одобрено в Международных рекомендациях EORTC/MSG, 2020 [7] в качестве дополнительного теста к микологическим методам при диагностике инвазивных грибковых инфекций (сила рекомендации СИ) у больных с гематологическими злокачественными новообразованиями с нейтропенией и без нее, нейтропенией после ТГСК, а также пациентов ОРИТ, имеющих высокий риск (>10%) развития ИК в результате хирургического вмешательства на желудочно-кишечном тракте. Анализ эффективности применения этого теста при кандидемии и абдоминальном ИК была посвящена и наша публикация [9]. Согласно заключениям рабочей группы EORTC/MSG, 2020 [7], БДГ-тест следует использовать только для образцов сыворотки, хотя он с некоторым успехом применялся для образцов спинномозговой жидкости для подтверждения диагноза ИМ центральной нервной системы при обстоятельствах, когда другие диагностические тесты были отрицательными или неубедительными [10]. На основании мета-анализа когортных и «случай-контроль» 16 исследований определена чувствительность 55-88% и специфичность 90-98% БДГ-теста в сыворотке крови при ИА у онкогематологических и негематологических пациентов ОРИТ и больных с ТГСК [11], при этом особенно высокие показатели получены у гематологических пациентов с нейтропенией. Как показывают некоторые исследователи [11, 12], уверенность в истинно положительных результатах в сыворотке крови возрастает при повторных положительных показателях и для значений, которые значительно превышают порог положительности. Результаты наших исследований 43 сывороток онкогематологических больных соответствовали зарубежным данным, а чувствительность и специфичность БДГ-теста составляли 64 и 82% соответственно. В ходе нашей работы выявлено, что чувствительность теста не зависела от вида образца периферической крови, т.к. концентрации БДГ в сыворотке и плазме крови одних и тех же пациентов статистически не различались ($p=0,7720$). Кроме того, наряду с высокой специфичностью БДГ-теста в сыворотке крови, были получены высокие прогностические значения положительного результата (87%), что делает этот тест надежным диагностическим маркером ИА, и может

быть убедительным основанием для начала противогрибковой терапии. В то же время низкая чувствительность (64%) и прогностическое значение отрицательного результата теста (55%) БДГ не исключают постановку диагноза ИА, а могут способствовать более углубленному обследованию пациента с подозрением на грибковую инфекцию с помощью традиционных микологических и инструментальных методов диагностики.

Как показано группой исследователей, определение БДГ в сыворотке крови является полезным неинвазивным методом мониторинга ответа на антифунгальную терапию у больных ИА [13-15]. Установлено, что снижение уровня БДГ наблюдалось у пациентов, выздоровевших от ИА, в то время как у лиц, не ответивших на противогрибковое лечение, отмечался непрерывный рост уровня БДГ в крови.

В то время как в зарубежной литературе чаще представлены данные о результатах определения БДГ в образцах крови, информация о его диагностической ценности в других биологических образцах (БАЛ, цереброспинальная жидкость, биопсийные образцы тканей) ограничена [16-18]. Mutschlechner, W. И соавторы в проспективном многоцентровом исследовании выявили низкую положительную прогностическую ценность БДГ для образцов БАЛ при ИА у пациентов с трансплантацией органов [19]. В другой публикации [11] показано, что эффективность теста БДГ в этом биосубстрате от иммунокомпрометированных лиц была ограничена его низкой специфичностью. Vochl T. с коллегами [20] в рамках многоцентрового проспективного исследования БАЛ и периферической крови 99 гематологических пациентов с подозрением на ИА также отмечали низкую специфичность БДГ в БАЛ. В нашем эксперименте при оценке уровня БДГ в образцах БАЛ от больных ИА выявили более высокие показатели, чем в сыворотках крови, однако все диагностические характеристики БДГ в БАЛ были значительно ниже сывороточных. Таким образом, для диагностики ИА тестирование БДГ в БАЛ нецелесообразно. Предпочтительным биомаркером ИА в БАЛ является ГМ *Aspergillus* spp., рекомендованный EORTC/MSG, 2020 [7]. Сравнительные результаты наших исследований БДГ и ГМ в биологических образцах от больных ИА и контрольных лиц показали преимущество чувствительности ГМ в БАЛ над БДГ в сыворотке крови (77% vs 64%, $p=0,013$).

В последние годы наблюдается увеличение количества публикаций, посвященных комплексному использованию в диагностике ИА нескольких тестов, таких как ПЦР *Aspergillus*, LFD (Lateral Flow Device), ГМ и БДГ, при этом сочетание 2-х и более биомаркеров позволяет провести более чувствительную и специфичную диагностику ИАЛ [20]. Например, комплексное применение БДГ-теста в сыворотке крови и ГМ в БАЛ увеличивало все диагностические характе-

ристик до 90-94% [21]. В нашей работе мы исследовали комбинации ГМ-теста в сыворотке крови или БАЛ с БДГ-тестом в сыворотке крови и обнаружили повышение чувствительности диагностики до 76% для сывороточных образцов и до 89% – при сочетанном определении ГМ в БАЛ и БДГ в сыворотке крови. Однако результаты немногих исследований, сравнивающих или комбинирующих уровень БДГ в крови с другими грибковыми биомаркерами, не позволяют сделать какой-либо вывод о превосходстве одного теста или комбинации тестов. Проспективных рандомизированных исследований, оценивающих роль стратегии скрининга, включающей один или несколько грибковых биомаркеров в сочетании с клиническими, радиологическими и микробиологическими данными для начала превентивной противогрибковой терапии, пока недостаточно [22-24].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Диагностическая чувствительность и специфичность БДГ зависят от вида биологического материала от онкогематологических пациентов с инвазивным аспергиллезом. Исследование БДГ можно проводить в сыворотке и плазме крови, но оно неинформативно в БАЛ.

2. Применение БДГ-теста эффективно при диагностике «вероятного» ИА и неэффективно при «возможном» ИА.

3. БДГ-тест является высокоспецифичным, а положительный результат с высокой долей вероятности констатирует развитие ИА.

4. Комплексное определение БДГ в сыворотке крови и ГМ в сыворотке крови или БАЛ повышает чувствительность диагностики ИА до 76% и 89% соответственно.

*Исследование выполнено в рамках темы Государственного задания Минздрава России «Молекулярно-генетические и иммунологические аспекты микозов легких, вызванных грибами рода *Aspergillus*. Фокус на адаптивный иммунный ответ и механизмы иммунной толерантности». Рег. номер ЕГИСУ: 122012100294-4*

ЛИТЕРАТУРА

1. Шадривова О.В., Хостелиди С.Н., Чудиновских Ю.А. и др. Инвазивный аспергиллез и мукормикоз у онкогематологических больных. Онкогематология. 2018; 13 (2): 39-47. [Shadrivova O.V., Khostelidi S.N., Chudinovskikh Y.A., et al. Invasive aspergillosis and mucormycosis in oncohematological patients. Oncohematology. 2018;13 (2): 39-47. (In Russ.)]. doi.org/10.17650/1818-8346-2018-13-2-39-47
2. Шадривова О.В., Фролова Е.В., Филиппова Л.В. и др. Клинико-иммунологические особенности инвазивного аспергиллеза у больных с лимфомой Ходжкина. Клиническая онкогематология. 2014; 7 (2): 233-238. [Shadrivova O.V., Frolova Ye.V., Filippova L.V. Clinico-immunological features of invasive aspergillosis in patients with Hodgkin's disease. Clinical Oncohematology. 2014; 7 (2): 233-238. (In Russ.)].
3. Шадривова О.В., Фролова Е.В., Тараскина А.Е., Клишко Н.Н. Молекулярно-генетические и иммунологические аспекты инвазивного аспергиллеза. Журнал инфектологии. 2017; 9 (1): 47-54. [Shadrivova O.V., Frolova E.V., Taraskina A.E., Klimko N.N. Molecular genetic and immunological aspects of invasive aspergillosis. Journal Infectology. 2017; 9 (1): 47-54. (In Russ.)]. doi.org/10.22625/2072-6732-2017-9-1-47-54
4. Ullmann A.J., Aguado J.M., Arikian-Akdagli S., et al. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. Clin. Microbiol. Infect. 2018; 24 (1): 1E1-E38. doi:10.1016/j.cmi.2018.01.002
5. Koo S., Baden L.R., Marty F.M. Post-diagnostic kinetics of the (1 → 3)-β-D-glucan assay in invasive aspergillosis, invasive candidiasis and *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. Clin. Microbiol. Infect. 2012; 18 (5): E122-7. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03777.x
6. Onishi A., Sugiyama D., Kogata Y., et al. Diagnostic accuracy of serum 1,3-β-D-glucan for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia, invasive candidiasis, and invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. J. Clin. Microbiol. 2012; 50 (1): 7-15. doi:10.1128/JCM.05267-11
7. Donnelly J.P., Chen S.C., Kauffman C.A., et al. Revision and update of the consensus definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. Clin. Infect. Dis. 2020; 71 (6): 1367-1376. doi:10.1093/cid/ciz1008
8. Hoenigl M., Prattes J., Spiess B., et al. Performance of galactomannan, beta-d-glucan, *Aspergillus* lateral-flow device, conventional culture, and PCR tests with bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. J. Clin. Microbiol. 2014, 52 (6): 2039-45. doi:10.1128/JCM.00467-14

9. *Игнатьева С.М., Козлова О.П., Хостелиди С.Н. и др.* Определение (1,3)- β -D-глюкана в сыворотках крови больных инвазивным кандидозом в ОРИТ. Проблемы медицинской микологии. 2023; 25 (4): 39-45. [Ignatieva S.M., Kozlova O.P., Khostelidi S.N., et al. Determination of (1,3)- β -D-glucan in the blood serum of patients with invasive candidiasis in the ICU. Problems in Medical Mycology. 2023; 25 (4): 39-45. (In Russ.)]. doi:10.24412/1999-6780-2023-4-39-45
10. *Stevens D.A., Zhang Y., Finkelman M.A., et al.* Cerebrospinal fluid (1,3)-beta-d-glucan testing is useful in diagnosis of coccidioidal meningitis. J. Clin. Microbiol. 2016; 54 (11): 2707-2710. doi:10.1128/JCM.01224-16
11. *Karageorgopoulos D.E., Vouloumanou E.K.* β -D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. Clin. Infect. Dis. 2011; 52: 750-770. doi:10.1093/cid/ciq206
12. *Hanson K.E., Pfeiffer C.D., Lease E.D., et al.* β -D-glucan surveillance with preemptive anidulafungin for invasive candidiasis in intensive care unit patients: a randomized pilot study. PLoS One. 2012; 7 (8): e42282. doi:10.1371/journal.pone.0042282
13. *McCarthy M.W., Petraitiene R. and Walsh T.J.* Translational development and application of (1,3)- β -D-glucan for diagnosis and therapeutic monitoring of invasive mycoses. Int. J. Mol. Sci. 2017; 18: 1124. doi:10.3390/ijms18061124
14. *Senn L., Robinson J.O., Schmidt S., et al.* 1,3- β -D-glucan antigenemia for early diagnosis of invasive fungal infections in neutropenic patients with acute leukemia. Clin Infect Dis. 2008; 46 (6): 878-85. doi:10.1086/527382
15. *Ellis M., Al-Ramadi B., Finkelman M., et al.* Assessment of the clinical utility of serial beta-D-glucan concentrations in patients with persistent neutropenic fever. J. Med. Microbiol. 2008; 57 (Pt 3): 287-295. doi:10.1099/jmm.0.47479-0.
16. *Lamoth F., Calandra T.* Early diagnosis of invasive mould infections and disease. J. Antimicrob. Chemother. 2017; 72 (suppl_1): i19-i28. doi:10.1093/jac/dkx030
17. *Guo Y.L., Chen Y.Q., Wang K., et al.* Accuracy of BAL galactomannan in diagnosing invasive aspergillosis: a bivariate metaanalysis and systematic review. Chest. 2010; 138 (4): 817-24. doi:10.1378/chest.10-0488
18. *Rose S.R., Vallabhajosyula S., Velez M.G., et al.* The utility of bronchoalveolar lavage β -D-glucan testing for the diagnosis of invasive fungal infections. J. Infect. 2014; 69 (3): 278-83. doi:10.1016/j.jinf.2014.04.008
19. *Mutschlechner W., Risslegger B., Willinger B., et al.* Bronchoalveolar lavage fluid (1,3)- β -D-glucan for the diagnosis of invasive fungal infections in solid organ transplantation: a prospective multicenter study. Transplantation. 2015; 99 (9): e140-4. doi:10.1097/TP.0000000000000635
20. *Boch T., Spiess B., Cornely O.A., et al.* Diagnosis of invasive fungal infections in haematological patients by combined use of galactomannan, 1,3- β -D-glucan, *Aspergillus* PCR, multifungal DNA-microarray, and *Aspergillus* azole resistance PCRs in blood and bronchoalveolar lavage samples: Results of a prospective multicentre study. Clin. Microbiol. Infect. 2016; 22 (10): 862-868. doi:10.1016/j.cmi.2016.06.021
21. *Sulahian A., Porcher R., Bergeron A., et al.* Use and limits of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan assay (Fungitell), compared to galactomannan determination (Platelia *Aspergillus*), for diagnosis of invasive aspergillosis. J. Clin. Microbiol. 2014; 52 (7): 2328-33. doi:10.1128/JCM.03567-13
22. *White S.K., Walker B.S., Hanson K.E., Schmidt R.L.* Diagnostic accuracy of beta-d-glucan (Fungitell) testing among patients with hematologic malignancies or solid organ tumors: a systematic review and meta-analysis. Am J Clin Pathol 2019; 151 (3): 275-285. doi:10.1093/ajcp/aqy135
23. *Lamoth F., Cruciani M., Mengoli C., et al.* β -Glucan antigenemia assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a systematic review and meta-analysis of cohort studies from the Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3). Clin. Infect. Dis. 2012; 54 (5): 633-43. doi:10.1093/cid/cir897
24. *Lehrnbecher T., Robinson P.D., Fisher B.T., et al.* Galactomannan, β -D-glucan, and polymerase chain reaction-based assays for the diagnosis of invasive fungal disease in pediatric cancer and hematopoietic stem cell transplantation: a systematic review and meta-analysis. Clin. Infect. Dis. 2016; 63 (10): 1340-1348. doi:10.1093/cid/ciw592

Поступила в редакцию журнала 07.11.24

Принята к печати 18.11.24



Для цитирования: Рябинин И.А. Адаптация метода линейной MALDI-TOF-масс-спектрометрии для исследования необработанной сыворотки крови. Проблемы медицинской микологии. 2024; 26 (4): 50-55. DOI: 10.24412/1999-6780-2024-4-50-55

For citation: Ryabinin I.A. Adaptation of the linear MALDI-TOF-mass-spectrometry method for the study of untreated blood serum. Problems in Medical Mycology. 2024; 26 (4): 50-55. (In Russ). DOI: 10.24412/1999-6780-2024-4-50-55

АДАПТАЦИЯ МЕТОДА ЛИНЕЙНОЙ MALDI-TOF-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ НЕОБРАБОТАННОЙ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Рябинин И.А. (н.с.)*

НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО "Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова", Санкт-Петербург, Россия

В сообщении кратко представлены методические приемы подготовки образцов сыворотки крови для исследования методом матрично-активированной лазерной ионизационно-десорбционной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF-MS), а также собственный опыт подбора оптимальных способов масс-спектрометрической съемки. Нарботанная практика в данной области касается в основном диагностики неинфекционных заболеваний, прежде всего – злокачественных новообразований, в то же время инфекционные, в том числе микотические патологии, остаются малоизученными. В большинстве ранее опубликованных статей основное внимание уделено методам обработки сыворотки крови, а настройка масс-спектрометра анализируется неопредельно. Данное сообщение представляет пилотный опыт сравнительного анализа способов масс-спектрометрического исследования для небольшой выборки проб сыворотки крови пациентов с инвазивным аспергиллезом легких и некоторыми другими патологиями (вирусными и бактериальными инфекциями, аллергическими и иммунологическими заболеваниями). Предложены режимы настройки масс-спектрометра для визуализации физико-химических свойств сыворотки крови. Автор полагает, что дальнейшее развитие предложенных приемов позволит получать дополнительную информацию, представляющую ценность в комплексной диагностике инвазивных микозов, включая инвазивный аспергиллез.

Ключевые слова: инвазивный аспергиллез, лабораторная диагностика, MALDI-TOF-масс-спектрометрия, сыворотка крови

ADAPTATION OF THE LINEAR MALDI-TOF-MASS-SPECTROMETRY METHOD FOR THE STUDY OF UNTREATED BLOOD SERUM

Ryabinin I.A. (scientific researcher)

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

The report briefly presents the methods of preparing blood serum samples for the study by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS), as well as own experience in selecting of the optimal methods for mass-spectrometric measurement. The accumulated practice in this area mainly concerns in the diagnosis of non-infectious diseases, primarily malignant neoplasms, while infectious pathologies, including mycotic ones, remain poorly studied. Most previously published reports focus on the methods of processing blood serum, and the mass-spectrometer setup is not analyzed in detail. This report presents a pilot experience in comparative analysis of mass-spectrometric studying methods for small selection of blood serum samples from patients with invasive pulmonary aspergillosis and some other pathologies (viral and bacterial infections, allergic and immunological diseases). As a result of the study, modes of mass-spectrometer adjustment for visualization of physicochemical properties of blood serum are proposed. The author believes that further development of the proposed techniques will allow obtaining additional information of value in the complex diagnostics of invasive mycoses, including invasive aspergillosis.

Key words: invasive aspergillosis, laboratory diagnostics, MALDI-TOF-mass-spectrometry, blood serum

ВВЕДЕНИЕ

Сыворотка крови как биоматериал является богатым источником молекулярных (в том числе антигенных) маркеров инфекционных заболеваний, а также, если учитывать ее полную биохимическую композицию, универсальным индикатором патологических изменений в организме человека. Разработано множество методов и протоколов для комплексного исследова-

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

дования сыворотки. В последние десятилетия появились сообщения об успешном использовании метода матрично-активированной лазерной ионизационно-десорбционной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF-MS) сыворотки крови для диагностики заболеваний [1-4]. Большинство таких подходов подразумевает предварительную обработку пробы сыворотки для (насколько возможно более) селективного выделения анализируемой фракции соединений и придания образцу свойств, оптимальных для взаимодействия с MALDI-матрицей и последующей ионизации. Так, Li J. с соавторами применили MALDI-TOF-MS для обнаружения в сыворотке миеломного белка. В данном случае использовали промышленно производимый комплект для очистки сыворотки от альбумина, а затем разрушали дисульфидные связи в молекулах иммуноглобулинов путем обработки дитиотреитолом. Применена традиционная матрица – 2,5-дигидробензойная кислота [5]. Часто для исследования пептидной композиции сыворотки крови методом MALDI проводят очистку с помощью специальных наконечников для микродозатора с так называемой смолой C18. В данном случае наконечник трансформирован в хроматографическую мини-колонку. Такой наконечник, как и колонку, смачивают 0,1% раствором трифторуксусной кислоты и уравнивают абсолютным ацетонитрилом. После пипетирования пробы сыворотки пептиды из смолы C18 также элюируют абсолютным ацетонитрилом. Метод имеет небольшие модификации [6, 7]. Проблема данного способа связана с дороговизной применяемых наконечников. Иногда выполняют и более селективное фракционирование пробы сыворотки, для этой цели наработан длительный опыт применения магнитных микрочастиц с модифицированной поверхностью. Такие микрочастицы сорбируют на своей поверхности пептиды с определенными химическими свойствами; манипуляции осуществляют с помощью роботизированного оборудования [3, 8, 9].

С другой стороны, не уделено достаточного внимания возможности исследования проб нативной сыворотки без ее предварительной обработки. Данный прием интересен своей простотой и скоростью подготовки образцов, а также, в фундаментальном аспекте, результатом MALDI-ионизации настолько сложной субстанции. Здесь следует предполагать не только конкурентное взаимоотношение аналитов за взаимодействие с ионами матрицы, но также и возможность частичного экранирования действия лазера, связывания относительно легких ионов крупными биополимерами и молекулярными агрегатами из образца. В то же время в данном направлении исследований первостепенное значение имеет возможность получения диагностической информации. А для реализации такой возможности необходимы подбор режимов работы MALDI-TOF-масс-спектрометра и оценка свойств проб сыворотки в них, поскольку изначально

разработчиками оборудования не были предусмотрены протоколы для работы с этим материалом. Определенные успехи в этом направлении были достигнуты в отношении неинфекционных заболеваний. Например, в работе Park H.-G. и коллеги [10] использовали очень простую пробоподготовку: сыворотку крови пациентов разводили дистиллированной водой и капельно наносили на мишень масс-спектрометра. Авторы предложили масс-спектрометрическое исследование в качестве нового непрямого метода диагностики рака печени. К сожалению, эта публикация не размещена в открытом доступе, поэтому невозможно ознакомиться с типом матрицы и режимом ионизации.

Цель исследования: определить особенности сыворотки крови при различных методах ионизации и детекции в ходе линейной MALDI-TOF-масс-спектрометрии и предложить оптимальные параметры настройки MALDI-TOF-масс-спектрометра, позволяющие получать наиболее информативные результаты съемки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включили образцы сыворотки крови пациентов различного профиля с диагнозами: инвазивный аспергиллез легких (ИАЛ; состояние после проведенного курса противогрибковой терапии), поллиноз, идиопатическая крапивница, аутоиммунная крапивница, астма неуточненная, смешанная астма, аллергия неуточненная, герпетическая инфекция, пиодермия, хронический простатит, возрастной иммунодефицит. Поступило 2 пробы от больных ИАЛ, от пациентов с другими диагнозами – по одной, всего 12. Образцы предоставлены НИЛ иммунологии и аллергологии НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина. Переданные образцы поступили в НИЛ для выполнения стандартных диагностических тестов *in vitro*; специально для данного исследования забор биоматериала не проводили. Пробы сыворотки исследовали сразу после получения, без замораживания. Для MALDI-TOF-масс-спектрометрии использовали инструмент «Autoflex speed TOF/TOF» («Bruker Daltonik») с мишенью «MTP 384 target plate polished steel BC», MALDI-матрицами в виде насыщенных при комнатной температуре растворов 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (DHB, в растворителе «ТА30») и α -циано-4-гидроксициннамовой кислоты (HCCA, в растворителе «OS»), а также программным обеспечением «flexControl» и «flexAnalysis» версии 3.4. В качестве вспомогательного (катионирующего) реагента для некоторых режимов съемки применяли 0,9% раствор NaCl. Нативную сыворотку готовили к масс-спектрометрической съемке различными способами: цельной или в виде серии двоичных разведений в деионизованной воде, с добавлением раствора NaCl и

без него, с наслоением матриц на высушенные образцы либо путем смешения матрицы с жидкими образцами. Стандартный объем нанесения исследуемых образцов и реагентов на позиции мишени – 1 мкл. Для ионизации использовали встроенные режимы работы лазера для линейной масс-спектрометрии, адаптированные для ионов веществ с массой 700-2000 Da (полярности + и -), 5000-20000 Da (полярность +), 20000-50000 Da (полярность +), а также режим для идентификации микроорганизмов («МВТ»). Параметры детектора («окно съемки») изменяли в зависимости от получаемого сигнала, работой лазера управляли в «ручном режиме». Для аннотирования масс-спектров (где возможно) применяли режимы «Amino acids – TDS», «Amino acids including exotic», «Sugars», «Polymers», «Common neutral losses», «Adduct positive mode» и «Adduct negative mode».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты масс-спектрометрии и анализа приведены в соответствии с использованными режимами съемки.

Режим съемки – 0,7-2 kDa (+), матрица – DHB (детекция – от 500 Da). Данный режим съемки оказался для образцов сыворотки неоптимальным: масс-спектры имели интенсивность порядка $X \cdot 10^3$ условных единиц, пики (до 20 при ручном аннотировании) сложно отличить от уровня «шума», большинство сигналов сосредоточено в области до 900 Da. Лучшее качество съемки наблюдали для пациента с возрастным иммунодефицитом, здесь удалось определить, что обнаруженные пики представлены ионами пептидов, которые различаются концевыми аминокислотами: аланином, триптофаном, треонином, лейцином (изолейцином), глицином, аргинином, тирозином, гистидином, пролином, глутаматом.

Режим съемки – 0,7-2 kDa (+), матрица – НССА (детекция – 0,5-3 kDa). В этом режиме масс-спектры изучаемых образцов сыворотки оказались также сходными, пики в масс-спектрах сосредоточены в виде двух основных комплексов – 0,5-0,55 kDa и 0,7-8,5 kDa. Расположение пиков в комплексах очень близкое, так что при аннотировании определяются различия в виде очень простых молекул или радикалов: катионов калия и натрия, фтороводорода, хлороводорода, радикалов – метильного, этильного, бутильного. По-видимому, здесь вместо пептидов сыворотки видны низкомолекулярные соединения. Свыше 1 kDa сигналы в оставшемся сегменте масс-спектров недостоверны. При использовании этого режима провели сравнительное исследование образцов, к которым при сушке перед нанесением матрицы добавляли 1 мкл 0,9% раствора NaCl в качестве катионирующего агента, но заметного влияния на результат съемки такой прием не оказал. Интересно, что

матрица НССА в этом режиме ионизации в отсутствие образца дает значительно более сильный комплекс сигналов, чем матрица DHB.

Режим съемки – 0,7-2 kDa (-), матрица – НССА (детекция – 0,5-3 kDa). Этот режим от предыдущего отличается полярностью детектируемых ионов. При этом он оказался практически неэффективным для исследуемых образцов: интенсивность сигнала в спектрах не превышала сотен (!) условных единиц. Удалось обнаружить единичные пики, разница m/z между которыми не поддается аннотированию.

Режим съемки – 0,7-2 kDa (полярность ионов +, детекция – 0-1000 Da) (Рис. 1). Это несравнительный фрагмент исследования, который провели с образцом сыворотки крови от пациента с атопией. Съемку выполнили с серией двукратных разведений сыворотки в деионизированной воде (10 последовательных разведений). В качестве матриц использовали DHB и НССА в двух сериях экспериментов. В качестве катионирующего агента применяли добавку раствора 0,9% NaCl после сушки разведений на мишени масс-спектрометра и перед добавлением матрицы. Обработку образцов матрицей осуществляли двумя способами: когда образец оставался на мишени влажным путем смешения пипетированием либо когда он был полностью высушен. Установлено, что наиболее качественную съемку удается получить без использования NaCl при нанесении матрицы на полностью высохший образец. Добавление NaCl и/или внесение матрицы в невысохший образец создавало на позиции мишени пленчатые осадки, которые почти не удавалось ионизировать лазером даже в случае высокоэнергетического воздействия. При использовании обеих матриц масс-спектр образцов (разведений сыворотки) и чистой матрицы имело место не прямое проявление свойств исследуемых образцов путем влияния на характер образования ионов матрицы. Сыворотка сильно снижала ионный ток от матрицы DHB (примерно в порядок): по интенсивности сильно подавлялись пики 32, 131, 210, 226, 240, 250, 270, 302, 318, 324, 330, 344 и 346 Da, полностью исчезли пики 88, 287 и 360 Da. На интервале выше 360 Da матрица DHB дает «осциллирующий» сигнал, который в присутствии сыворотки не прослеживается. Пики 149,022 и 149,851, которые в матрице почти сливаются, в присутствии сыворотки оказались хорошо различимы и несколько смещены по m/z в меньшую сторону. В случае применения матрицы НССА сыворотка существенно не препятствовала образованию ее ионов. Во всех случаях доминантные пики достигали интенсивности сотен тысяч условных единиц. Отметили «мягкое» подавление образования пиков 249, 286, 321, 322, 323, 344 Da; комплекса доминантных пиков 373 и 376 Da с сателитными пиками. Сильное подавление сигнала прослеживалось для пиков 475 и 477 Da. Практически только в образцах сыворотки имелись сигналы 527 и 528 Da.

Десятичные разведения сыворотки крови с наложением матрицы DHB вид в камеру масс-спектрометра

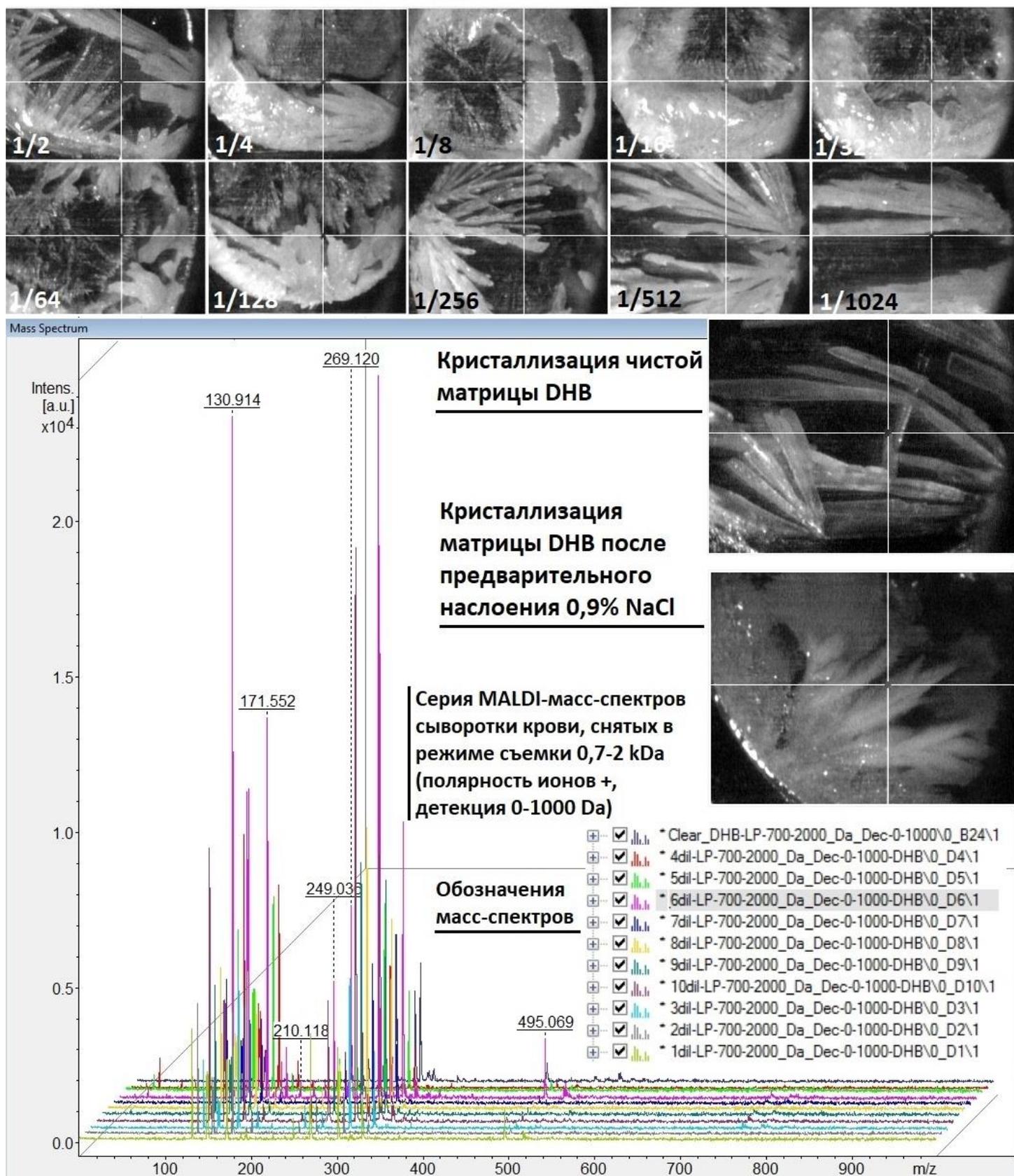


Рис. 1. Результат масс-спектрометрического исследования образца сыворотки в режиме съемки 0,7-2 Da (полярность «+», детекция – 0-1000 Da).

Режим съемки – 5-20 kDa (+), матрица – DHB (детекция – от 3,9 kDa). Масс-спектры в этом режиме собирали суммарно с 5-6 позиций, на которые были последовательно нанесены двукратные разведения исследуемых сывороток. В целом наблюдаемые образцы сывороток в данном диапазоне съемки имели очень консервативный вид по своим масс-спектрам, и различия проявились главным образом в интенсивности спектров по базовой линии (уровне базовой линии). Композиция масс-спектров построена однотипно: резкий подъем интенсивности от базовой линии, который завершается пиком 3,8 kDa (в этом подразделе данные приведены для пробы из случая ИАЛ); затем некоторое убывание интенсивности с несколькими невыраженными пиками за исключением одного 5,9 kDa; комплекс из «дуплета» 6,4 и 6,6 kDa; далее продолжается убывание интенсивности; в следующем сегменте виден доминантный пик 7,7, иногда также 8,1 kDa (в случаях ИАЛ этих двух пиков не прослеживается) и «триплет» 8,6, 8,9 и 9,4 kDa; далее отчетливые сигналы отсутствуют. Интенсивность ионного тока по уровню базовой линии MALDI-масс-спектров при съемке в выбранном режиме убывала в следующем ряду наблюдений в соответствии с диагнозами пациентов: герпетическая инфекция > полиноз > аутоиммунная крапивница > ИАЛ (после терапии, случай №1) > ИАЛ (после терапии, случай №2) > идиопатическая крапивница = аллергия неуточненная = астма неуточненная > хронический простатит > смешанная астма = пиодермия > возрастной иммунодефицит.

В MALDI-масс-спектре сыворотки крови пациента с ИАЛ (случай №1) детализировка оказалась лучше, чем у пациента из случая №2, такой масс-спектр включил 19 пиков с величинами m/z 3895,057; 3925,468; 3969,508; 4069,292; 4102,223; 4223,206; 4241,834; 4293,28; 4309,246; 4479,196; 4640, 786; 5348,947; 5915,727; 6444,488; 6642,267; 8615,120; 8721,112; 8945,952 и 9432,299. Некоторые различия также касались детализировки спектров. Так, для сравнения, в пробе сыворотки крови от пациента с герпетической инфекцией при ручном редактировании масс-листа удается определить до 24 пиков. Между тем большая часть пиков не определяется в автоматическом режиме аннотирования из-за низкого значения показателя отношения интенсивности «сигнал/шум»; как правило, только 2 пика (в случае ИАЛ 6444,488 и 6642,267) соответствуют такому критерию. После программного подавления шума и субтрактирования масс-спектров до условной базовой линии генерация масс-листов происходит значительно лучше: автоматически определяется от 18 (в случае смешанной астмы) до 48 пиков (в случае герпетической инфекции). В MALDI-масс-спектрах сыворотки крови от больных ИАЛ после ручного редактирования масс-листа определили до 47 пиков, при редактировании для поиска отличий истинных пиков

от интенсивного шума использовали наложение на другие масс-спектры выборки. Получаемая картина масс-спектра в этом режиме обусловлена множественным наложением сигналов от нескольких десятков различных белков, так что итоговый «контур» формируют лишь (1) наиболее высоко концентрированные в образце и (2) лидирующие в конкурентном взаимодействии между белками сыворотки с MALDI-матрицей. Примечательно, что по результатам аннотирования MALDI-масс-спектров у больных ИАЛ удалось установить, что ряд спектрообразующих белков представлены гликопротеидами. Так, благодаря идентификации $\Delta m/z$ обнаружили остатки гексоз, пентоз, сиаловой кислоты, глюкуроновой кислоты и N-ацетилгексозамина. В режиме съемки «МВТ» масс-спектры имеют сходный вид, но в целом результат съемки несколько хуже.

Режим съемки – 20-50 kDa (+), матрицы – DHB, HCCA. В данном режиме во всех образцах виден только шум детектора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что для исследования проб необработанной сыворотки крови методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии оптимальными режимами являются:

- 1) настройка лазера для ионов – 5-20 kDa (+), матрица – DHB, детекция – от 3,9-20 kDa;
- 2) настройка лазера для ионов – 0,7-2 kDa (+), матрицы – DHB или HCCA, детекция – 0-1000 Da.

Первый режим оказался наиболее информативным, он позволяет отобразить «профиль» белков и гликопротеидов сыворотки, а также до некоторой степени проводить сравнительное исследование образцов сыворотки крови при различных патологических состояниях. Второй режим, напротив, отражает неспецифическое взаимодействие компонентов сыворотки с MALDI-матрицей. Такой режим в дальнейшем можно использовать для оценки пригодности высоких разведений сыворотки к MALDI-TOF-масс-спектрометрии в первом из подобранных режимов, поскольку во втором режиме требуется меньшее по энергии лазерное воздействие. Показано, что добавление натрия хлорида в качестве катионирующего агента для углеводов и гликопротеидов, гликолипидов не улучшает качество масс-спектрометрической съемки. MALDI-масс-спектр пробы оказывается наиболее информативным при суммарной съемке с нескольких двукратных разведений образца, поскольку в крайних разведениях кристаллизация матрицы становится более «чистой», перестают образовываться грубые белковые депозиты, которые почти не поддаются MALDI-ионизации. Для образцов сыворотки крови пациентов с инвазивным аспергиллезом легких установлена композиция масс-листов а также положение углеводных фрагментов, видимых как

$\Delta m/z$ между пиками гликозилированных и негликозилированных белков. Желая использовать предложенные режимы работы масс-спектрометра следует обратить внимание, что для конкретного оборудования могут потребоваться дополнительные более тонкие настройки, зависящие от текущего состояния лазера и детектора, для их выполнения следует обратиться в сервисную службу поставщика оборудования.

Автор благодарит сотрудников НИЛ иммунологии и аллергологии (Е.В. Фролову, А.Е. Учеваткину, Л.В. Филиппову) за предоставление для исследова-

ния образцов сывороток крови и клинических данных, а также за оценку предварительной рукописи статьи.

*Работа выполнена в рамках темы НИР Государственного задания Минздрава России «Молекулярно-генетические и иммунологические аспекты микозов легких, вызванных грибами рода *Aspergillus*. Фокус на адаптивный иммунный ответ и механизмы иммунной толерантности» № НИОКТР 122012100294-4.*

ЛИТЕРАТУРА

1. *Barceló F., Gomila R., de Paul I., et al.* MALDI-TOF analysis of blood serum proteome can predict the presence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *PLoS One*. 2018; 13 (8): e0201793. doi: 10.1371/journal.pone.0201793
2. *Wölter M., Russ M., Okai C.A., et al.* Comparison of blood serum protein analysis by MALDI-MS from either conventional frozen samples or storage disc-deposited samples: A study with human serum from pregnant donors and from patients with intrauterine growth restriction. *Eur. J. Mass Spectrom.* (Chichester). 2019; 25 (4): 381-390. doi: 10.1177/1469066718820991
3. *Ivanova O.M., Ziganshin R.H., Arapidi G.P., et al.* Scope and limitations of MALDI-TOF MS blood serum peptide profiling in cancer diagnostics. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2016; 42: 497-505. doi: 10.1134/S1068162016050071
4. *Mery A., Jawhara S., François N., et al.* Identification of fungal trehalose for the diagnosis of invasive candidiasis by mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 2022; 1866 (4): 130083. doi: 10.1016/j.bbagen.2022.130083
5. *Li J., Xu A., Xie W., et al.* MALDI-TOF-MS for rapid screening analysis of M-protein in serum. *Front Oncol.* 2022; 12: 1073479. doi: 10.3389/fonc.2022.1073479
6. *Rungkamoltip P., Roytrakul S., Navakanitworakul R.* MALDI-TOF MS analysis of serum peptidome patterns in cervical cancer. *Biomedicines*. 2023; 11 (8): 2327. doi: 10.3390/biomedicines11082327
7. *Swiatly A., Horala A., Hajduk J., et al.* MALDI-TOF-MS analysis in discovery and identification of serum proteomic patterns of ovarian cancer. *BMC Cancer*. 2017; 17 (1): 472. doi: 10.1186/s12885-017-3467-2
8. *Зиганшин Р.Х., Алексеев Д.Г., Арапиди Г.П. и др.* Протеомное профилирование сыворотки для диагностики рака яичника с использованием технологии магнитных гранул ClinProt и MALDI-TOF-масс-спектрометрии. *Биомедицинская химия*. 2008; 54 (4): 408-419. [*Ziganshin R.Kh., Alekseev D.G., Arapidi G.P. et al.* Serum proteome profiling for ovarian cancer diagnosis using ClinProt magnetic bead technique and MALDI-TOF-mass-spectrometry. *Biomed Khim.* 2008; 54 (4): 408-419. (In Russ)].
9. *Сорокина А.В., Радзинский В.Е., Зиганшин Р.Х., Арапиди Г.П.* Поиск пептидных маркеров гинекологических заболеваний в сыворотке крови с использованием МАЛДИ масс-спектрометрии. *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина*. 2011; 6: 122-130. [*Sorokina A.V., Radzinsky V.E., Ziganshin R.Kh., Arapidi G.P.* Search for peptide markers of gynecological diseases in blood serum using MALDI mass spectrometry. *Bulletin of Peoples' Friendship University of Russia. Series: Medicine*. 2011; 6: 122-130. (In Russ)].
10. *Park H.G., Jang K.S., Park H.M., et al.* MALDI-TOF MS-based total serum protein fingerprinting for liver cancer diagnosis. *Analyst*. 2019; 144 (7): 2231-2238. doi: 10.1039/c8an02241k

Поступила в редакцию журнала 24.10.24

Принята к печати 06.11.24



Для цитирования: Босак И.А., Ковыршин С.В., Выборнова И.В., Чилина Г.А., Богомолова Т.С., Канаева В.М., Тараскина А.Е., Васильева Н.В. Экспериментальный инвазивный кандидоз, обусловленный штаммами *Candida tropicalis* с различной чувствительностью к противогрибковым лекарственным средствам. Проблемы медицинской микологии. 2024; 26 (4): 56-58. DOI: 10.24412/1999-6780-2024-4-56-60

For citation: Bosak I.A., Kovyrshin S.V., Vybornova I.V., Chilina G.A., Bogomolova T.S., Kanaeva V.M., Taraskina A.E., Vasilyeva N.V. Experimental invasive candidiasis caused by *Candida tropicalis* strains with different antifungal susceptibility patterns. Problems in Medical Mycology. 2024; 26 (4): 56-58. (In Russ). DOI: 10.24412/1999-6780-2024-4-56-60

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ИНВАЗИВНЫЙ КАНДИДОЗ, ОБУСЛОВЛЕННЫЙ ШТАММАМИ *CANDIDA TROPICALIS* С РАЗЛИЧНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ ПРОТИВОГРИБКОВЫМ ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВАМ

**Босак И.А. (с.н.с.)*, Ковыршин С.В. (м.н.с.),
Выборнова И.В. (н.с.), Чилина Г.А. (зав. лаб.),
Богомолова Т.С. (зав. лаб., доцент), Канаева
В.М. (лаборант-исследователь), Тараскина
А.Е. (зам. директора, зав. лаб.), Васильева
Н.В. (директор института, зав. кафедрой)**

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

*Проведено сравнительное исследование вирулентности штаммов *Candida tropicalis* – возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), различающихся по чувствительности к противогрибковым лекарственным средствам (ПГЛС), на модели внутривенного заражения линейных (DBA/2J и BALB/c) и беспородных мышей на фоне нейтропении. Для мышей линии BALB/c средняя летальная доза штамма с множественной устойчивостью к ПГЛС была вдвое ниже, чем LD₅₀ чувствительного штамма.*

Ключевые слова: вирулентность, экспериментальная модель, *Candida tropicalis*, чувствительность, резистентность, противогрибковые лекарственные средства

EXPERIMENTAL INVASIVE CANDIDIASIS CAUSED BY *CANDIDA TROPICALIS* STRAINS WITH DIFFERENT ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY PATTERNS

Bosak I.A. (senior scientific researcher), Kovyrshin S.V. (junior scientific researcher), Vybornova I.V. (scientific researcher), Chilina G.A. (head of the laboratory), Bogomolova T.S. (head of the laboratory, associate professor), Kanaeva V.M. (laboratory researcher), Taraskina A.E. (deputy director, head of the laboratory), Vasilyeva N.V. (director of the institute, head of the department)

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov (Kashkin Research Institute of Medical Mycology; Department of Medical Microbiology), St. Petersburg, Russia

*Comparative virulence study of *Candida tropicalis* isolates from patients with health-care associated infections and different antifungal susceptibility patterns was conducted using the neutropenic murine model after intravenous inoculation of inbred DBA/2J, BALB/c and outbred mice. LD₅₀ of the multi-drug resistant strain was twice lower in comparison with the susceptible isolate for BALB/c mice.*

Key words: virulence, experimental model, *Candida tropicalis*, susceptibility, resistance, antifungal drugs

ВВЕДЕНИЕ

Candida tropicalis – один из основных возбудителей инвазивного кандидоза (ИК), включенный Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в 2022 г. в список грибковых патогенов высокого приоритета. ИК, вызванный *C. tropicalis*, характеризуется повышенной летальностью – до 60% [1-2]. Доля *C. tropicalis* в структуре возбудителей ИК различается в разных регионах мира. В странах Юго-Восточной

* Контактное лицо: Босак Илья Алексеевич,
e-mail: Пуа.Bosak@szgmu.ru

Азии и Южной Америки этот вид занимает среди возбудителей кандидемии 1-е или 2-е место [3]. В Российской Федерации, по данным многоцентрового исследования, проведенного в 2011-2014 гг., *C. tropicalis* на 4-ом месте среди возбудителей ИК (10%) [4]. В последние годы сообщают о нарастании резистентности *C. tropicalis* к противогрибковым лекарственным средствам (ПГЛС): уровни резистентности к флуконазолу, итраконазолу, вориконазолу, позаконазолу достигают 40-80% [5-7]. Имеются сообщения о появлении штаммов *C. tropicalis*, резистентных не только к азолам, но и к другим классам ПГЛС [8]. В связи с вышеизложенным, исследования вирулентности штаммов *C. tropicalis*, различающихся по профилям чувствительности к ПГЛС, *in vivo* на экспериментальных моделях важны для понимания причин повышенной патогенности этого возбудителя ИК, а также для разработки новых лекарственных средств и терапевтических подходов к лечению пациентов с ИК.

Цель работы: сравнить вирулентность двух штаммов *C. tropicalis* (чувствительного к ПГЛС и с множественной устойчивостью к азолам и полиенам) при внутривенном заражении линейных (DBA/2J и BALB/c) и беспородных мышей и выбрать оптимальную категорию животных для дальнейших исследований патогенности гриба.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Лабораторные животные.

В экспериментах по заражению использовали самцов мышей линии DBA/2J, линии BALB/c и беспородных с массой тела 18-20 г.

Штаммы *C. tropicalis*.

В исследование включили 2 штамма *C. tropicalis*, выделенные из крови пациентов с ИК, депонированные в Российскую коллекцию патогенных грибов (РКПГ). Штаммы различались по фенотипическим профилям чувствительности к ПГЛС (табл. 1): *C. tropicalis* РКПГ 1351 – резистентный к амфотерицину В, вориконазолу, позаконазолу и флуконазолу; *C. tropicalis* РКПГ 2390 – чувствительный ко всем вышеперечисленным ПГЛС.

Таблица 1

Минимальные подавляющие концентрации* (МПК) ПГЛС для изучаемых штаммов *C. tropicalis*

Штамм	МПК (мг/л) / категория чувствительности			
	FLU	VOR	POS	AMB
<i>C. tropicalis</i> РКПГ Y 1351	16/R	4/R	4/R	2/R
<i>C. tropicalis</i> РКПГ Y 2390	0,25/S	0,06/S	0,015/S	1/S

FLU – флуконазол, VOR – вориконазол, POS – позаконазол, AMB – амфотерицин В. R – резистентный; S – чувствительный.

*- значения МПК получены и интерпретированы согласно документам EUCAST [9, 10] и в соответствии с Российскими рекомендациями «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» версия 2024-02 [11].

Подготовка животных к заражению.

Для введения животных в состояние нейтропении внутривенно вводили Эндоксан (циклофосфан) в дозе 150 мг/кг двукратно в -3 и 0 дни эксперимента.

Процедура заражения животных.

Из суточных культур *C. tropicalis* готовили взвеси дрожжевых клеток в 0,9% растворе NaCl концентрацией 1×10^7 КОЕ/мл с подсчетом количества клеток в камере Горяева и последующей серией десятикратных разведений до концентрации 1×10^3 КОЕ/мл. Всего испытано 5 заражающих доз каждого штамма гриба для трех категорий мышей. Каждая экспериментальная группа животных (1 линия, 1 штамм, 1 доза гриба) состояла из 8 особей. Таким образом, было сформировано 30 экспериментальных групп мышей. Заражение животных проводили путем внутривенного введения 0,5 мл приготовленных взвесей микромицетов через латеральную хвостовую вену. Для определения количества жизнеспособных клеток в приготовленных взвесах грибов производили количественные высевы на агар Сабуро с последующим подсчетом количества колоний после инкубации в термостате в течение 24 часов. В качестве контроля была сформирована группа мышей в состоянии нейтропении без заражения.

Учет результатов эксперимента.

Наблюдение за животными осуществляли в течение 21 суток после заражения. Ежедневно отмечали количество погибших мышей. Для контроля наличия инфекции выполняли посев срезов почек погибших животных на агаризованную среду Сабуро.

На основании данных о выживаемости мышей в группах проводили расчет LD_{50} методом пробит анализа при помощи специализированного программного обеспечения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выживаемость экспериментальных животных после заражения.

При оценке количества жизнеспособных клеток *C. tropicalis* РКПГ 1351 во вводимой суспензии при посеве на агар Сабуро максимальной заражающей дозой была концентрация 2×10^6 КОЕ/мышь, а *C. tropicalis* РКПГ 2390 – 4×10^6 КОЕ/мышь.

Выживаемость животных в зависимости от заражающей дозы возбудителя.

Выживаемость животных как линейных, так и беспородных снижалась при увеличении заражающей дозы обоих штаммов *C. tropicalis* (Рис. 1-4).

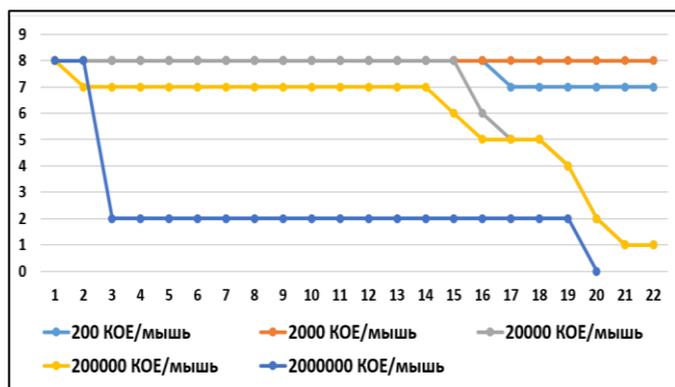


Рис. 1 Выживаемость линейных мышей BALB/c, зараженных различными концентрациями *C. tropicalis* РКПГ 1351. По оси абсцисс – дни наблюдения, по оси ординат – количество выживших животных в группе. Цветом обозначены различные введенные дозы гриба.

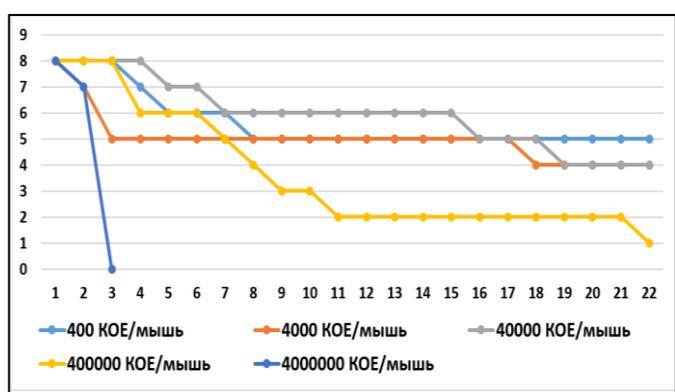


Рис. 2 Выживаемость линейных мышей BALB/c, зараженных различными концентрациями *C. tropicalis* РКПГ 2390. По оси абсцисс – дни наблюдения, по оси ординат – количество выживших животных в группе. Цветом обозначены различные введенные дозы гриба.

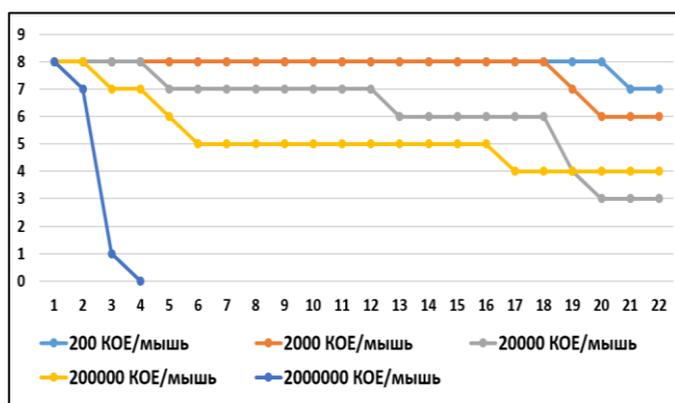


Рис. 3 Выживаемость беспородных мышей, зараженных различными концентрациями *C. tropicalis* РКПГ 1351. По оси абсцисс – дни наблюдения, по оси ординат – количество выживших животных в группе. Цветом обозначены различные введенные дозы гриба.

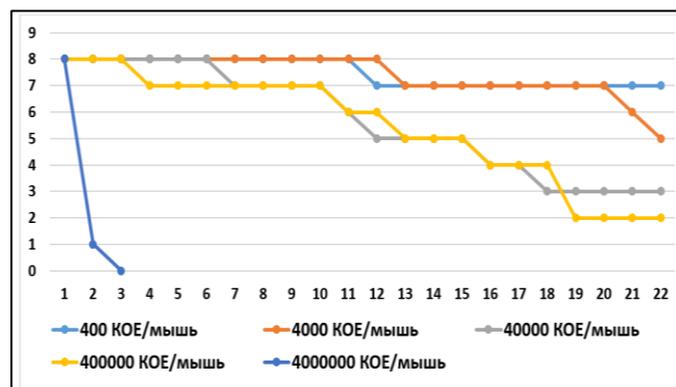


Рис. 4 Выживаемость беспородных мышей, зараженных различными концентрациями *C. tropicalis* РКПГ 2390. По оси абсцисс – дни наблюдения, по оси ординат – количество выживших животных в группе. Цветом обозначены различные введенные дозы гриба.

Средние летальные дозы штаммов *C. tropicalis* для линейных и беспородных мышей.

Для линейных мышей DBA/2J не удалось определить LD₅₀ в связи с полной гибелью животных в период 8-12 суток после заражения.

При использовании линейных мышей BALB/c LD₅₀ мультирезистентного штамма *C. tropicalis* РКПГ Y 1351 составила $2,5 \times 10^4$ КОЕ/мышь и была в два раза ниже, чем у чувствительного к ПГЛС штамма *C. tropicalis* РКПГ Y 2390. Для беспородных мышей LD₅₀ изученных штаммов были сопоставимы и превышали таковые для линейных мышей BALB/c. (табл. 2).

Таблица 2

Средние летальные дозы штаммов *C. tropicalis* для линейных и беспородных мышей (21 сутки после заражения)

Штамм	LD ₅₀ (КОЕ/мышь)	
	BALB/c	беспородные
<i>C. tropicalis</i> РКПГ Y 1351	$2,5 \times 10^4$	$1,8 \times 10^5$
<i>C. tropicalis</i> РКПГ Y 2390	5×10^4	$1,4 \times 10^5$

Выживаемость линейных и беспородных животных при заражении двумя штаммами *C. tropicalis* в дозе 10^5 КОЕ/мышь.

Все мыши линии DBA/2J, зараженные *C. tropicalis* РКПГ Y 1351, погибли через три дня после заражения, а после заражения штаммом *C. tropicalis* РКПГ Y 2390 гибель всех животных отмечали через четыре дня после заражения.

Среди беспородных белых мышей, зараженных *C. tropicalis* РКПГ Y 1351, к концу эксперимента выжило 50% животных (медиана выживаемости – 17 суток), а после заражения *C. tropicalis* РКПГ Y 2390, при схожей медиане выживаемости (16 суток), к концу наблюдения выжило 25% животных.

Медиана выживаемости линейных мышей BALB/c, зараженных *C. tropicalis* РКПГ Y 1351 и *C. tropicalis* РКПГ Y 2390, составила 19 дней и 8 дней соответственно, а к концу наблюдения выжило по одному животному (12,5%) (Рис. 5-6).

Аналогичную картину наблюдали при заражении другими концентрациями возбудителей. В группах контроля мышей различных линий в состоянии нейтропении без заражения гибель животных в период наблюдения отмечена не была.

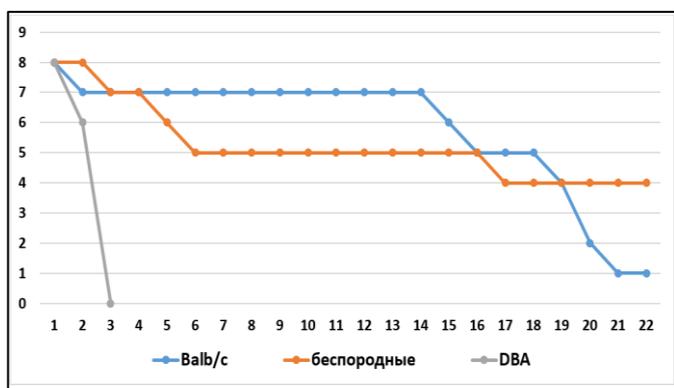


Рис. 5. Выживаемость животных различных линий на примере заражения *C. tropicalis* РКПГ 1351 в концентрации 2×10^5 КОЕ/мышь, по оси абсцисс – дни наблюдения, по оси ординат – количество животных в группе.

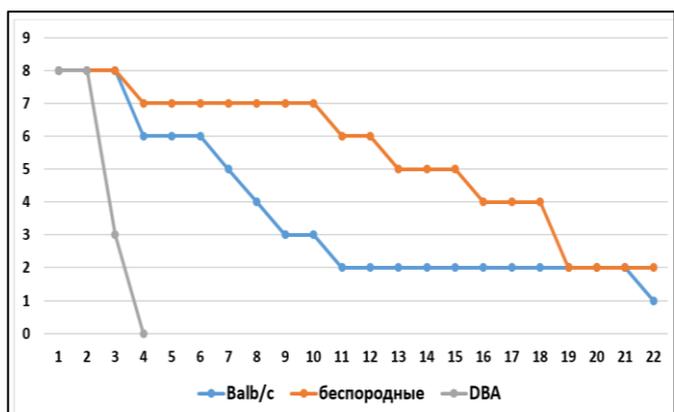


Рис. 6. Выживаемость животных различных линий на примере заражения *C. tropicalis* РКПГ 2390 в концентрации 4×10^5 КОЕ/мышь, по оси абсцисс – дни наблюдения, по оси ординат – количество животных в группе.

ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения патогенности *Candida* spp. *in vivo* используют различные модели на лабораторных животных, чаще всего эксперименты проводят на мышах. Заражение обычно осуществляют внутривенным путем введения возбудителя [12, 13]. В последнее время также применяют интрагастральный путь заражения с последующей транслокацией грибов в слизистую оболочку кишечника, инвазией в сосуды и диссеминацией во внутренние органы [13]. Для моделирования ИК используют как иммунокомпетентных животных [12], так и введенных в состояние нейтропении [13]. Ранее мы применяли модель внутривенного заражения мышей в состоянии нейтропении для изучения вирулентности *Candida auris* [14]. В настоящем исследовании с помощью модели ИК при внутривенном введении возбудителя мышам линии BALB/c в состоянии нейтропении мы выявили различия в вирулентности чувствительного к ПГЛС и мультирезистентного штаммов *C. tropicalis*. Нам не удалось определить средние летальные дозы этих штаммов для мышей линии DBA/2J из-за 100%-ной гибели животных на ранних сроках после заражения. В работе японских авторов мыши этой линии в состоянии нейтропении были успешно применены для моделирования ИК при интрагастральном пути заражения [13].

ВЫВОДЫ

1. Изученные штаммы *C. tropicalis*, отличающиеся по чувствительности к ПГЛС, обладают различной вирулентностью в отношении мышей разных линий при данной схеме индукции нейтропении.
2. Для изучения вирулентности штаммов *C. tropicalis* целесообразно использовать экспериментальную модель инвазивного кандидоза на линейных мышах BALB/c.

Исследование выполнено в рамках темы Государственного задания Минздрава России «Геномная эпидемиология множественно- и экстремально-устойчивых к антимикробным препаратам, бактериальных и грибковых возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи» НИОКТР № 124021400014-5.

ЛИТЕРАТУРА

1. Keighley C., Kim H.Y., Kidd S., et al. *Candida tropicalis* – A systematic review to inform the World Health Organization of a fungal priority pathogens list. *Medical Mycology*. 2024; 62: mya e040. doi.org/10.1093/mmy/mya e040
2. Hoenigl M., Salmanton-García J., Egger M., et al. Guideline adherence and survival of patients with candidaemia in Europe: results from the ECMM Candida III multinational European observational cohort study. *Lancet Infect. Dis.* 2023; 23 (6): 751-761. doi: 10.1016/S1473-3099(22)00872-6
3. Chakrabarti A., Sood P., Rudramurthy S.M., et al. Incidence, characteristics and outcome of ICU-acquired candidemia in India. *Intensive Care Med.* 2015; 41: 285-295. doi.org/10.1007/s00134-014-3603-2
4. Vasilyeva N.V., Raush E.R., Rudneva M.V., et al. Etiology of invasive candidosis agents in Russia: a multicenter epidemiological survey. *Frontiers of Medicine*. 2018; 12 (1): 84-91. doi:10.1007/s11684-017-0612-x

5. *Kajihara T., et al.* Distribution, trends, and antifungal susceptibility of *Candida* species causing candidemia in Japan, 2010-2019: A retrospective observational study based on national surveillance data. *Medical Mycology*. 2022; 60 (9): myac071. doi.org/10.1093/mmy/myac071
6. *Ortiz B., et al.* *Candida* species isolated from clinical samples in a tertiary hospital in Honduras: Where is *Candida auris*? *Current. Medical Mycology*. 2022; 8 (3): 1. doi.org/10.18502/cmm.8.3.11212
7. *Desnos-Ollivier M., et al.* Azole susceptibility profiles of more than 9,000 clinical yeast isolates belonging to 40 common and rare species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2021; 65 (6):10. doi.org/10.1128/AAC.02615-20
8. *Lima R., Ribeiro F., Colombo A., de Almeida J.N.* The emerging threat antifungal-resistant *Candida tropicalis* in humans, animals and environment. *Frontiers in fungal biology*. 2022; 3: 957021. doi.org/10.3389/ffunb.2022.957021
9. *Guinea J, Meletiadis J., Arikian-Akdagli S., et al.* EUCAST Definitive Document E.Def 7.4 (2023). Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. www.eucast.org
10. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.* Overview of antifungal ECOFFs and clinical breakpoints for yeasts, moulds and dermatophytes using the EUCAST E.Def 7.4, E.Def 9.4 and E.Def 11.0 procedures. Version 4, 2023. www.eucast.org
11. *Российские рекомендации.* Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Версия 2024 - 02. Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии. [Russian recommendations. Determination of the sensitivity of microorganisms to antimicrobial drugs. Version 2024 - 02. Interregional Association for Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. (In Russ.)].
12. *Arendrup M., Horn T., Frimodt-Moller B.N.* *In vivo* pathogenicity of eight medically relevant *Candida* species in an animal model. *Infection* 2002; 30: 286-291. doi.org/10.1007/s15010-002-2131-0
13. *Hirayama T., Miyazaki T., Ito Y., T al.* Virulence assessment of six major pathogenic *Candida* species in the mouse model of invasive candidiasis caused by fungal translocation. *Scientific Reports*. 2020; 10: 3814. doi.org/10.1038/s41598-020-60792-y
14. *Босак И.А., Выборнова И.В., Чилина Г.А. и др.* Вирулентность и особенности патогенеза диссеминированного кандидоза, обусловленного штаммами *Candida auris* с различной фосфолипазной активностью, в экспериментальной модели. *Проблемы медицинской микологии*. 2023; 25 (4): 52-58. [Bosak I.A., Vybornova I.V., Chilina G.A., et al. Virulence and pathogenesis features of disseminated candidiasis caused by *Candida auris* strains with different phospholipase activities in an experimental model. *Problems in Medical Mycology*. 2023; 25 (4): 52-58. (In Russ.)]. doi:10.24412/1999-6780-2023-4-52-58

Поступила в редакцию журнала 22.11.24

Принята к печати 28.11.24



Для цитирования: Ковыршин С.В., Венчакова В.В., Выборнова И.В., Долго-Сабурова Ю.В., Жорж О.Н., Гусева А.О., Оганесян Э.Г., Богомолова Т.С., Тараскина А.Е., Чжан Ф., Васильева Н.В. Рецидивирующий вульвовагинальный кандидоз: фокус на резистентность *Candida albicans* к противогрибковым лекарственным средствам. Проблемы медицинской микологии. 2024; 26 (4): 61-66. DOI: 10.24412/1999-6780-2024-4-61-66

For citation: Kovyrshin S.V., Venchakova V.V., Vybornova I.V., Dolgo-Saburova Yu.V., Zhorzh O.N., Guseva A.O., Oganesyanyan E.G., Bogomolova T.S., Taraskina A.E., Zhang F., Vasilyeva N.V. Recurrent vulvovaginal candidiasis: focus on *Candida albicans* resistance to antifungal drugs. Problems in Medical Mycology. 2024; 26 (4): 61-66. (In Russ). DOI: 10.24412/1999-6780-2024-4-61-66

РЕЦИДИВИРУЮЩИЙ ВУЛЬВОАГИНАЛЬНЫЙ КАНДИДОЗ: ФОКУС НА РЕЗИСТЕНТНОСТЬ CANDIDA ALBICANS К ПРОТИВОГРИБКОВЫМ ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВАМ

¹Ковыршин С.В. (м.н.с.)*, ¹Венчакова В.В. (аспирант), ¹Выборнова И.В. (н.с.), ¹Долго-Сабурова Ю.В. (акушер-гинеколог), ¹Жорж О.Н. (акушер-гинеколог), ¹Гусева А.О. (лаборант-исследователь), ¹Оганесян Э.Г. (ассистент кафедры), ¹Богомолова Т.С. (зав. лаб.), ¹Тараскина А.Е. (зам. директора, зав. лаб.), ²Чжан Ф. (профессор), ¹Васильева Н.В. (директор института, зав. кафедрой)

¹Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина; кафедра медицинской микробиологии), Санкт-Петербург, Россия; ²Харбинский Медицинский Университет, Харбин, Китай

*В статье рассмотрены клинико-лабораторные и микробиологические аспекты рецидивирующего вульвовагинального кандидоза (РВБК) по данным, полученным за период с 2007 по 2024 гг. Установлены основные факторы риска, жалобы и фоновые состояния у пациенток с РВБК. Основным этиологическим агентом РВБК является вид *Candida albicans*, его доля в структуре возросла с 89 до 98%. Выявлены уровни резистентности к флуконазолу и вориконазолу, которые на 2024 г. составляют 48,8% и 44,8% соответственно, что доказывает неэффективность терапевтических стратегий РВБК на сегодняшний день.*

Ключевые слова: рецидивирующий вульвовагинальный кандидоз, резистентность, вульвовагинальный кандидоз, *Candida albicans*

RECURRENT VULVOVAGINAL CANDIDIASIS: FOCUS ON CANDIDA ALBICANS RESISTANCE TO ANTIFUNGAL DRUGS

¹Kovyrshin S.V. (junior scientific researcher), ¹Venchakova V.V. (postgraduate student), ¹Vybornova I.V. (scientific researcher), ¹Dolgo-Saburova Yu.V. (obstetrician-gynecologist), ¹Zhorzh O.N. (obstetrician-gynecologist), ¹Guseva A.O. (laboratory assistant), ¹Oganesyanyan E.G. (assistant of the department), ¹Bogomolova T.S. (head of the laboratory), ¹Taraskina A.E. (deputy director, head of the laboratory), ²Zhang F. (professor), ¹Vasilyeva N.V. (director of the Institute, head of the department)

¹North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov (Kashkin Research Institute of Medical Mycology; Department of Medical Microbiology), St. Petersburg, Russia; ²Harbin Medical University, Harbin China

*The article examines the clinical, laboratory and microbiological aspects of recurrent vulvovaginal candidiasis (RVVC) according to data obtained from 2007 to 2024. The main risk factors, complaints and background conditions in patients with RVVC have been established. The main etiological agent of RVVC is the *Candida albicans* species, its ratio in the structure has increased from 89 to 98%. The levels of resistance to fluconazole and voriconazole have been revealed, which in 2024 amount to 48,8% and 44,8%, respectively, which proves the ineffectiveness of therapeutic strategies for RVVC today.*

Key words: recurrent vulvovaginal candidiasis, resistance, vulvovaginal candidiasis, *Candida albicans*

ВВЕДЕНИЕ

Вульвовагинальный кандидоз (ВБК) – инфекционно-воспалительное заболевание вульвы, наружного

* Контактное лицо: Ковыршин Сергей Валерьевич, e-mail: Sergei.Kovyrshin@szgmu.ru

отдела уретры, влагалища, влагалищной части шейки матки. Этиологический агент ВВК – дрожжевые грибы рода *Candida*. Заболевание относят к поверхностным микозам, в большинстве случаев оно протекает в форме вульвовагинита. Проявления: зуд, отечность, покраснение слизистых оболочек, боли в покое, болезненность при половых контактах. Рецидивы воспаления, происходящие трижды и более раз в год, свидетельствуют о рецидивирующем вульвовагинальном кандидозе (РВВК). Частота РВВК составляет 5-15% среди женщин детородного возраста [1, 2].

Кандидоз, как правило, развивается в репродуктивном периоде, так как жизненный цикл грибов связан с эстрогенизацией вагинального эпителия. Пик заболеваемости РВВК приходится на 25-35 лет. У беременных женщин сообщают об РВВК в 35-40% случаев, что может привести к послеродовым осложнениям у родильниц и новорожденных [2]. По данным литературы, в 2018 г. в мире заболеваемость РВВК оценивали в 3871 случай на 100 000 женщин [3]. В России в 2015 г. частота составила 3481 случай на 100 000 женщин [4]. Прогнозируют, что к 2030 г. рецидивирующим кандидозом будут болеть 158 миллионов женщин [3].

Сегодня ведущим патогенетическим механизмом РВВК считают дисбиоз – стойкое нарушение количественного и качественного состава вагинальной микробиоты, в основном бактерий семейства *Lactobacilliacae* [5]. К экзогенным факторам риска относят: прием лекарственных препаратов (антибиотиков широкого спектра действия, глюкокортикостероидов, цитостатиков); инфекции, передаваемые половым путем (ИППП); особенности половой жизни, контрацепции, личной гигиены. Эндогенные факторы связаны с дисбалансом гормонального фона: нарушениями менструального цикла, такими как синдром поликистозных яичников, гипопункция яичников, гиперпролактинемия, гипотиреоз, ожирение, метаболический синдром. Также значение имеют соматические заболевания (анемия, заболевания желудочно-кишечного тракта, системные заболевания соединительной ткани), хронический стресс. Происходит нарушение местного иммунитета, что в купе с дисбиозом способствует развитию грибковой инфекции [1, 2, 6].

Ведущая этиологическая роль в РВВК принадлежит виду *Candida albicans*, однако в 2-30% случаев встречаются другие виды грибов *Candida* spp., а их видовой спектр зависит от географической принадлежности пациенток [6-9]. Эффективное лечение РВВК – самый актуальный вопрос, поскольку накопилось много сообщений о резистентности дрожжеподобных грибов к противогрибковым лекарственным средствам (ПГЛС) азолового ряда. В Великобритании в 2018-2021 гг. устойчивость грибов к флуконазолу возросла с 3,5% до 9,6% [9]. В Китае в 2017-

2022 гг. только 55,7% *C. albicans* были чувствительны к вориконазолу, 35,8% – к флуконазолу и 25,6% – к итраконазолу [10]. По данным российских авторов, резистентность к азолам у грибов, выделенных из мочеполовых путей женщин, колебалась от 3 до 92% [11, 12].

Цель исследования: оценить клинико-лабораторные и микробиологические особенности рецидивирующего вульвовагинального кандидоза в Северо-Западном федеральном округе Российской Федерации в 2024 г.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы грибов/пациенты. С 2007 по 2024 гг. обследовано 2743 женщины в возрасте 18-71 года (медиана – 34 года). Диагноз РВВК устанавливали при наличии трех и более рецидивов ВВК в течение года. Также изучено 2743 штамма грибов рода *Candida*, выделенных от данных пациенток с РВВК. Видовую идентификацию культур дрожжей проводили с помощью метода MALDI-TOF масс-спектрометрии (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass-Spectrometry) и коммерческой тест-системы «AuxaColor2» («BIO-RAD», США).

Метод определения чувствительности к ПГЛС. Определение чувствительности к ПГЛС осуществляли диско-диффузионным методом согласно протоколу CLSI M44A3 (Clinical and Laboratory Standards Institute) и в соответствии с Российскими рекомендациями «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (версия 2024-02). Чувствительность определяли на среде Мюллер-Хинтон, модифицированной метиленовым синим, используя диски стандартной нагрузки: флуконазол – 25 мкг, вориконазол – 1 мкг. Определение чувствительности микромицетов к ПГЛС методом серийных микроразведений в жидкой питательной среде выполняли согласно протоколу EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) E.DEF 7.4 (2023) [13] и в соответствии с Российскими рекомендациями «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (версия 2024-02) [14] с применением субстанций флуконазола, позаконазола, вориконазола, итраконазола («Sigma-Aldrich», США). Отнесение штаммов *Candida* spp. к той или иной категории чувствительности (чувствительный, промежуточный или резистентный) проводили согласно клинически значимым пороговым значениям минимальных подавляющих концентраций (МПК) в соответствии с документом EUCAST (версия 4, 2023) и с Российскими рекомендациями «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (версия 2024-02).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Штаммы грибов/пациенты. Обследовано 2743 женщины в возрасте 18-71 года (медиана – 34 года). Диагноз РВБК устанавливали при наличии трех и более рецидивов ВВК в течение года. Длительность заболевания у обследованных больных составила от 4 до 96 месяцев (медиана – 32 месяца), частота рецидивов – от 4 до 12 в течение года (медиана – 7); комплексная оценка качества жизни – 2-6 баллов (медиана – 3,6). Были выявлены фоновые состояния: обильные менструальные кровотечения – у 34% пациенток, аномальные маточные кровотечения (межменструальные) – у 14%, хроническая постгеморрагическая анемия – у 38%, дефицит и недостаточность витамина D – у 39%, нарушение функции желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) (запоры, неустойчивый стул, метеоризм) – у 28%, рецидивирующая герпетическая инфекция – у 21% (Рис.1)

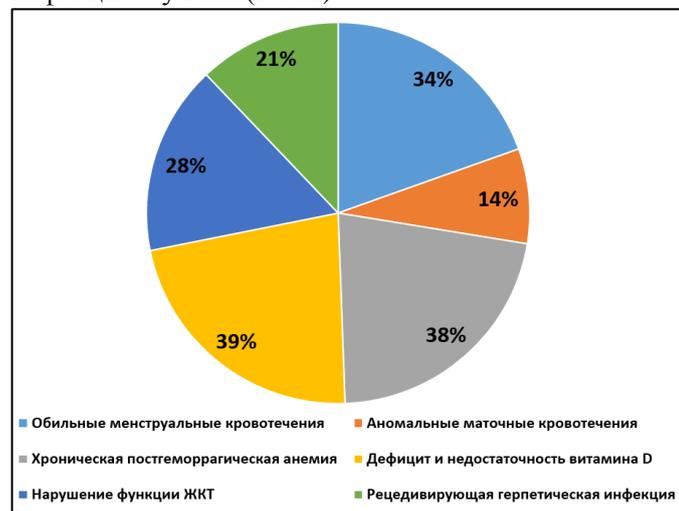


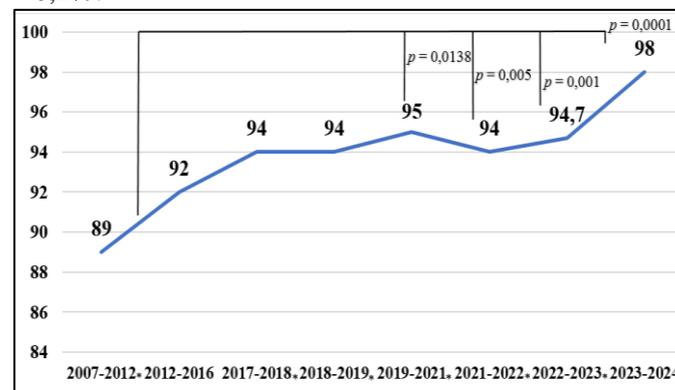
Рис.1. Фоновые состояния пациенток с РВБК.

Стойкий вагинальный дисбиоз наблюдали у 78% женщин с РВБК. Начало заболевания было связано с антибактериальной терапией (по поводу выявления ИППП, уреaplазмы, бактериального вагиноза, обострения хронического тонзиллита, одонтогенной инфекции, хеликобактер-эрадикации) у 57% обследованных пациенток, сменой полового партнёра – у 22%, перенесённым COVID-19 – у 5%, началом приёма или отменой комбинированных гормональных контрацептивов (КГК) – у 7%.

Этиологическая структура и чувствительность к ПГЛС возбудителей РВБК.

При динамическом исследовании этиологической структуры возбудителей рецидивирующего вульвовагинального кандидоза установлено, что за весь изучаемый период самым частым этиологическим агентом был вид *C. albicans*, причем отмечено достоверное увеличение его доли в общей структуре в сравнении с данными за 2007-2012 гг. и 2019-2024 гг. (Рис. 2). Более редкие представители *Candida* spp.

были представлены видами *Nakaseomyces glabratus* (*C. glabrata*) – 1,1-5,2%, *Pichia kudriavzevii* (*C. krusei*) – 0,6-4,8%, *C. dubliniensis* – 0,2-0,6%, *C. tropicalis* – 0,6%, *C. parapsilosis* – 0,6%, *Pichia cactophila* (*C. inconspicua*) – 0,2%, *Kluyveromyces marxianus* (*C. kefyri*) – 0,2%.



* - приводятся данные на либо на 1 квартал, либо на 2-4 кварталы изучаемого года.

Рис. 2. Доля (%) *C. albicans* в этиологии РВБК.

Помимо нарастания доли *C. albicans*, в этиологии РВБК наблюдали значительное увеличение резистентности возбудителя к противогрибковым препаратам азолового ряда – флуконазолу и вориконазолу. Первый резистентный изолят на территории г. Санкт-Петербурга был выявлен в 2011 г., далее же их число ежегодно стало возрастать, достигая высоких показателей к 2020 г., когда уровень резистентности *C. albicans* к флуконазолу составил 47,5%, чего не отмечалось для данного вида при выделении стерильных и нестерильных в норме биосубстратов. Начиная с 2020 г., уровень фенотипической резистентности к препаратам азолового ряда не опускался ниже 41%, составляя в среднем 48,4% за 5 лет (с 2020 по 2024 гг.). Аналогичная ситуация прослеживается в отношении чувствительности *C. albicans* к вориконазолу, для которого средний уровень резистентности за 5 лет составил 44,5%. Графическое отображение уровня резистентности *C. albicans* к флуконазолу и вориконазолу представлено на рисунке 3.

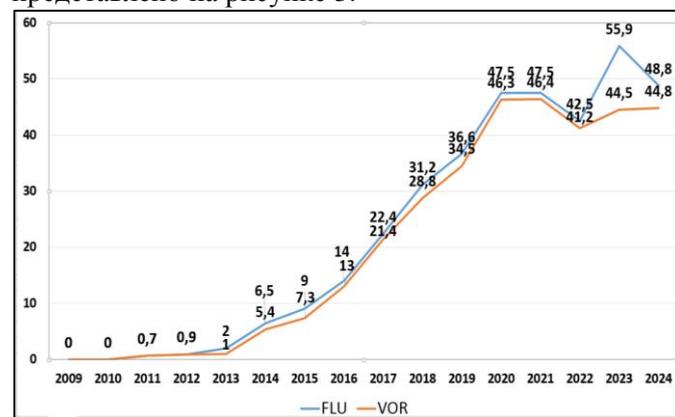


Рис. 3. Динамика резистентности к флуконазолу (FLU) и вориконазолу (VOR) штаммов *C. albicans*, выделенных от пациенток с ВВК.

Для оценки профиля резистентности возбудителей РВБК, выделенных от пациенток в 2024 г., к препаратам азолового ряда изучена чувствительность 30 штаммов. Установленная ранее резистентность к флуконазолу и вориконазолу при помощи диско-диффузионного метода также была подтверждена при использовании референтного метода серийных разведений. Помимо этого, выявлено, что 100% штаммов *C. albicans* от пациенток с установленным диагнозом РВБК были не чувствительны к итраконазолу, однако сохраняли чувствительность к другому препарату азолового ряда – позаконазолу. Описание профилей резистентности штаммов *C. albicans* представлено в таблице.

Таблица

Профиль резистентности азолов для штаммов *C. albicans*, выделенных от пациенток с РВБК

Вид	N	Профиль резистентности							
		Уровень резистентности, %	Диапазон МПК, мг/л						
		Флуконазол		Вориконазол		Позаконазол		Итраконазол	
<i>C. albicans</i>	30	100	8-32	100	0,5-2	0	0,015-0,06	100	0,125-0,5

ОБСУЖДЕНИЕ

Рецидивирующий вульвовагинальный кандидоз (РВБК) представляет собой патологическое состояние, ассоциированное с оказанием медицинской помощи. Наиболее частым триггерным фактором (более чем в 50% случаев) является применение антибактериальных препаратов. Существенную роль в манифестации заболевания играет также использование системных кортикостероидов, цитостатической терапии, системной и локальной менопаузальной гормональной терапии, а также различных методов контрацепции, включая комбинированные гормональные контрацептивы, внутриматочные системы с левоноргестрелом, барьерные методы [1-4].

Патогенез заболевания тесно связан с наличием коморбидных состояний, таких как декомпенсированный сахарный диабет, метаболический синдром, ожирение, гипотиреоз, различные нарушения репродуктивной системы, обусловленные гипо- и гиперэстрогенными состояниями. Существенное значение имеют также железодефицитная анемия, дефицит витамина D, хронические интоксикации, стрессовые состояния, постковидный синдром, хронические воспалительные и аутоиммунные заболевания, в том числе патологии желудочно-кишечного тракта, сопровождающиеся ферментопатиями, диспепсическими явлениями и дисбиотическими нарушениями [1, 2, 8].

Имеются определенные разногласия в экспертном сообществе относительно необходимости расширенного диагностического поиска при РВБК, однако результаты нашего исследования демонстрируют высокую частоту коморбидных состояний у пациенток с данной патологией, что обосновывает целесообразность применения комплексного междисциплинарного подхода к диагностике и лечению заболевания.

Современная концепция патогенеза РВБК претерпела существенные изменения благодаря расшифровке микробиома человека. Если ранее основное значение придавали дефициту локальных факторов противогрибковой защиты вследствие врожденной или адаптивной иммунной дисфункции, то в настоящее время ключевая роль отводится первичным дисбиотическим нарушениям, затрагивающим как количественные, так и качественные характеристики вагинальной лактобиоты. Нарушение функциональной активности лактобактерий, являющихся основными антагонистами грибов рода *Candida*, приводит к повреждению вагинального эпителия, снижению синтеза противовоспалительных цитокинов и других факторов иммунной защиты эпителиоцитами [6-8]. В нашем исследовании вагинальный дисбиоз выявлен у 78% обследованных женщин, что свидетельствует о значимости этого фактора в развитии РВБК.

Такие патологические изменения создают благоприятные условия для пролиферации, адгезии и инвазии грибов, что сопровождается развитием избыточной воспалительной реакции на протеолитические ферменты и компоненты клеточной стенки грибов со стороны нейтрофилов, макрофагов и лимфоцитов по Th1- и Th17-зависимому пути. Формирование устойчивого каскада иммунологических реакций обуславливает рецидивирующий характер воспалительного процесса, который активизируется при физиологическом повышении пролиферации грибов, связанным с гормональными флуктуациями в организме женщины [15].

Основная проблема, ассоциированная с РВБК, в настоящее время сопряжена с эффективностью профилактики рецидивов. К сожалению, все попытки патогенетического лечения оказываются недостаточно успешными. Эффективность пробиотиков до настоящего времени не доказана. Единственным действенным способом контролировать РВБК остается противорецидивная этиотропная терапия. Для лечения используют противогрибковые препараты азолового ряда, полиены, антисептики, борную кислоту [1, 2]. В связи с ростом резистентности к азолам, которые остаются самыми распространенными препаратами в клинической практике, выбор средства для поддерживающей терапии РВБК затруднен. Исследование чувствительности клинических изолятов грибов к ПГЛС дает возможность предложить пациентам оптимальный противогрибковый препарат или альтернативное лечение.

Полученные нами данные свидетельствуют о изменении этиологической структуры возбудителей РВБК в сторону увеличения доли *C. albicans*. В то же время аналогичную динамику наблюдали в возрастании уровня резистентности данного этиологического агента к флуконазолу и вориконазолу, достигая 44-47%. Согласно зарубежным публикациям, видовая структура возбудителей РВБК неоднородна. Так, по данным авторов из Йемена, вид *C. albicans* также занимает лидирующую позицию в этиологии, однако его доля составила 55%, что значительно ниже показателей, полученных в нашем исследовании. Уровень резистентности к флуконазолу данного патогена составил менее 2,5%. [16]. В Гане доля *C. albicans* была соотносимой Йемену – 58%, однако уровень резистентности к противогрибковым препаратам был значительно выше: 70% – к флуконазолу и 69,2% – к вориконазолу [17]. Для Пакистана доля *C. albicans* у пациенток с РВБК была выше и соотносилась с данными нашего исследования за 2007-2012 гг. – 88%, устойчивость к флуконазолу выявлена у 57% выделенных изолятов, что также соотносится с нашими результатами [18]. Согласно Европейским исследованиям, вид *C. albicans* выделялся в среднем у 89% пациенток с РВБК, однако для данного вида уровень фенотипической резистентности к флуконазолу составлял 5% и менее, что на порядок ниже показателя в России [19]. Как отмечалось ранее, для изолятов, выделенных в Китае, доля *C. albicans* составила 70%, однако уровень резистентности к флуконазолу составил 64%, к вориконазолу – 58,5% [10]. В США при

изучении чувствительности *C. albicans*, изолированных от пациенток с РВБК за 10 лет (с 2011 по 2021 гг.), выявлен уровень резистентности в 50% [20]. Полученные нами показатели и литературные данные о резистентности возбудителей РВБК свидетельствуют о снижении эффективности азолов в схемах терапии данной патологии и необходимости альтернативных схем лечения.

ВЫВОДЫ

1. Клинические и лабораторные данные свидетельствуют о полирезистентности возбудителя РВБК *C. albicans* к азолам. Перед началом лечения рекомендовано исследование чувствительности возбудителя РВБК к противогрибковым лекарственным средствам.

2. Лечение РВБК представляет сложности в связи с высокой резистентностью *C. albicans* к ПЛГС азолового ряда. Необходим поиск способов коррекции вагинального микробиома – самого частого фона для поддержания хронического воспаления на слизистой оболочке влагалища.

Исследование выполнено в рамках темы гранта РНФ совместно с фондом фундаментальных исследований Китая № 24-45-00050 «Противогрибковый эффект малых РНК пробиотиков, молекулярный механизм их переноса в царство Fungi и гибели патогенных грибов».

ЛИТЕРАТУРА

1. *Vieira-Baptista P., Stockdale C.K., Sobel J., et al.* International Society for the Study of Vulvovaginal Disease recommendations for the diagnosis and treatment of vaginitis. Lisbon: Admedic, 2023
2. *Прилепская В.Н., Кира Е.Ф., Аполихина И.А. и др.* Клинические рекомендации по диагностике и лечению заболеваний, сопровождающихся патологическими выделениями из половых путей женщин. М.: РОАГ; 2019. 56 с. [Prilepskaya V.N., Kira E.F., Apolikhina I.A., et al. Clinical guidelines for the diagnosis and treatment of diseases accompanied by abnormal genital-tract discharge in women. М.: Russian Society of Obstetricians and Gynecologists; 2019. 56 p. (In Russ.)].
3. *Батракова Т.В., Долго-Сабурова Ю.В.* Рецидивирующий вульвовагинальный кандидоз у беременных женщин в Санкт-Петербурге: клинико-лабораторные особенности. Тезисы IX Общероссийского конференц-марафона «Перинатальная медицина: от прегравидарной подготовки к здоровому материнству и детству» и II Научно-практической конференции «Педиатрия XXI века: новые парадигмы в современных реалиях». 2023: 12. [Batrakova T.V., Dolgo-Saburova Yu.V. Recurrent vulvovaginal candidiasis in pregnant women in St. Petersburg: clinical and laboratory features. Abstracts of the IX All-Russian Conference Marathon "Perinatal medicine: from pre-hospital preparation to healthy motherhood and childhood" and the II Scientific and Practical Conference "Pediatrics of the XXI century: new paradigms in modern realities". 2023: 12. (In Russ.)].
4. *Denning D.W., Kneale M., Sobel J.D., Rautemaa-Richardson R.* Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review. The Lancet infectious diseases. 2018; 18 (11): e339-e347. doi:10.1016/S1473-3099(18)30103-8
5. *Klimko N., Kozlova Y., Khostelidi S., et al.* The burden of serious fungal diseases in Russia. Mycoses. 2015; 58 (S5): 58-62. doi:10.1111/myc.12388
6. *Jang S.J., Lee K., Kwon B., et al.* Vaginal lactobacilli inhibit growth and hyphae formation of *Candida albicans*. Sci. Rep. 2019; 9 (1): 8121. doi:10.1038/s41598-019-44579-4
7. *Tarry W., Fisher M., Shen S., Mawhinney M.* *Candida albicans*: the estrogen target for vaginal colonization. J. Surg. Res. 2005; 129 (2): 278-282. doi:10.1016/j.jss.2005.05.019

8. *Рахматулина М.Р.* Современные представления об этиопатогенезе и подходах к терапии рецидивирующего кандидозного вульвовагинита. Вестник дерматологии и венерологии. 2023; 99 (4): 124-135. [Rakhmatulina M.R. Modern concepts of etiopathogenesis and approaches to the treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. Vestnik Dermatologii i Venerologii. 2023; 99 (4): 124-135. (In Russ.)]. doi.org/10.25208/vdv11879
9. *Ratner J.C., Wilson J., Roberts K., et al.* Increasing rate of non-*Candida albicans* yeasts and fluconazole resistance in yeast isolates from women with recurrent vulvovaginal candidiasis in Leeds, United Kingdom. Sex Transm Infect. 2024; sextrans-2024-056186. doi: 10.1136/sextrans-2024-056186
10. *Li L., Zhang X., Li Q., et al.* The increasing trend of triazole-resistant *Candida* from vulvovaginal candidiasis. Infection and Drug Resistance. 2024;17: 4301-4310. doi.org/10.2147/IDR.S474304
11. *Новикова В.В., Езов С.Г.* Оценка видового состава изолятов *Candida species*, выделенных из различных биотопов, и их чувствительности к антифунгальным препаратам. РМЖ. 2019; 4: 67-71. [Novikova V.V., Ezov S.G. Assessment of the *Candida* spp. composition isolated from various biotopes and their sensitivity to antifungal drugs. RMJ. 2019; 4: 67-71. (In Russ.)].
12. *Рахматулина М.Р., Тарасенко Э.Н.* Частота выявления грибов рода *Candida* у пациентов с урогенитальным кандидозом и анализ показателей их антимикотической резистентности за десятилетний период (2010–2020 гг.). Акушерство и гинекология. 2020; 7: 159-165. [Rakhmatulina M.R., Tarasenko E.N. The frequency of detection of *Candida* fungi in patients with uro-genital candidiasis and analysis of indicators of their antimycotic resistance over a ten-year period (2010-2020). Obstetrics and gynecology. 2020; 7: 159-165. (In Russ.)]. https://dx.doi.org/10.18565/aig.2020.7.159-165
13. *Guinea J., Meletiadis J., Arikian-Akdagli S., et al.* EUCAST Definitive Document E.Def 7.4 (2023). Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. www.eucast.org
14. *Российские рекомендации.* Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Версия 2024-02. Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии. [Russian recommendations. Determination of the sensitivity of microorganisms to antimicrobial drugs. Version 2024-02. Interregional Association for Clinical Microbiology and Antimicrobial Chiropractic. (In Russ.)].
15. *Rosati D., Bruno M., Jaeger M., et al.* Recurrent vulvovaginal candidiasis: an immunological perspective. microorganisms. 2020; 8 (2): 144. doi: 10.3390/microorganisms8020144
16. *Gubran A.N.M., Al-Baghdadi M.A.A., Al-Haidary N.M.* Vulvovaginal Candidiasis and antifungal susceptibility pattern among women in Aden Governorate, Yemen. 2024.
17. *Sarpong, A.K., Odoi, H., Boakye, Y.D. et al.* Resistant *C. albicans* implicated in recurrent vulvovaginal candidiasis (RVVC) among women in a tertiary healthcare facility in Kumasi, Ghana. BMC Women's Health. 2024; 24 (412). doi.org/10.1186/s12905-024-03217-6
18. *Syed S., Khan M.I., Kumar M., et al.* Vulvovaginal candidiasis in pregnant women and susceptibility profile to fluconazole and voriconazole. Journal of The Society of Obstetricians and Gynaecologists of Pakistan. 2024; 14 (3): 341-345.
19. *Donders G., Sziller I.O., Paavonen J., et al.* Management of recurrent vulvovaginal candidosis: Narrative review of the literature and European expert panel opinion. Front Cell Infect Microbiol. 2022; 12: 934353. doi: 10.3389/fcimb.2022.934353
20. *Sobel J.D., Sebastian S., Boikov D.A.* A longitudinal study on fluconazole resistance in *Candida albicans* vaginal isolates. Mycoses. 2023; 66 (7): 563-565. doi: 10.1111/myc.13582

Поступила в редакцию журнала 25.11.24

Принята к печати 28.11.24



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

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

Address of Editorial Office: Santiago-de-Cuba str., 1/28, Saint-Petersburg, 194291, RUSSIA.
Tel.: (812) 303-51-45

E-mail: mycobiota@szgmu.ru, elena.gukova@szgmu.ru. Manager of Editorial Office: E.S. Gukova

«ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ»

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

Журнал зарегистрирован ВАК, с 2005 г. включен в Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), 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 02.12.2024 г.