

ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

Том 22 № 1



Problems in medical mycology

Vol. 22 № 1

2020

EDITORIAL BOARD

Chief Editor —

N.V. Vasilyeva — Honored Scientist of the Russian Federation, Ph.D., prof. (Russia)

Deputies Chief Editor —

N.N. Klimko — M.D., prof. (Russia)

A.E. Taraskina — Ph.D. (Russia)

Responsible secretary —

T.S. Bogomolova — Ph.D. (Russia)

Manager of Editorial Office —

E.S. Gukova (elena.gukova@szgmu.ru)

SCIENTIFIC EDITORIAL BOARD

Bennett J. — M.D. (USA), Dupont B. — M.D. (France), 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), Mazurov V.I. — M.D., academician of RAMS, prof. (Russia), Ozerskaya S.M. — Ph.D. (Russia), Polachek I. — M.D. (Israel), Samzov A.V. — M.D., prof. (Russia), Sidorenko S.V. — 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. 22, № 1, 2020

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, иммунитет, терапия и профилактика инфекций, микроорганизмы-контаминанты в лабораторных, клинических и других условиях.

ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

Том 22, № 1, 2020

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., профессор (Россия)

Заместители главного редактора:

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

А.Е. Тараскина — к.б.н. (Россия)

Ответственный секретарь —

Т.С. Богомолова — к.б.н. (Россия)

Зав. 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), Б. Дюпон — доктор медицины (Франция), Кашкин К.П. — д.м.н., академик РАМН, профессор (Россия), Колбин А.С. — д.б.н., профессор (Россия), Мазуров В.И. — д.м.н., акад. РАМН, профессор (Россия), Озерская С.М. — д.б.н. (Россия), Полачек И. — доктор медицины (Израиль), Самцов А.В. — д.м.н., профессор (Россия), Сидоренко С.В. — д.м.н., профессор (Россия), Титц Х.-Й. — доктор медицины (Германия), Хурцилава О.Г. — д.м.н., проф. (Россия), Цинзерлинг В.А. — д.м.н., профессор (Россия), Чжан Ф. — доктор медицины (Китай), Шулгина 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, immunity, therapy and prophylaxis of infections, microorganisms — contaminants in laboratory, clinical and other conditions.

СОДЕРЖАНИЕ

ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ И ОБЗОРЫ

Тараскина А.Е., Васильева Н.В., Пчелин И.М., Игнатъева С.М., Спиридонова В.А., Учеваткина А.Е., Филиппова Л.В., Фролова Е.В., Молекулярно-генетические методы определения и видовой идентификации грибов порядка <i>Mucorales</i> в соответствии с глобальными рекомендациями по диагностике и терапии мукомикоза (обзор литературы).....	3
Шкарин В.В., Саперкин Н.В. Роль оппортунистических микозов в комплексной коморбидности (обзор литературы).....	15
Шевякова А.М., Шевяков М.А. Коммуникативный метод профилактики ноцебо-эффекта при назначении антифунгальных средств.....	24

КЛИНИЧЕСКАЯ МИКОЛОГИЯ

Кузнецов В.Д., Козлова Я.И., Борзова Ю.В., Митрофанов В.С., Николаева Н.Г., Лакеенков Н.М., Аак О.В., Богомоллова Т.С., Игнатъева С.М., Соболев А.В., Клишко Н.Н. Сочетание аллергического бронхолегочного аспергиллеза (<i>A. terreus</i>) и хронического аспергиллеза легких (<i>A. fumigatus</i>). Описание клинического случая и обзор литературы.....	28
Бурьгина Е.В., Мельникова А.В., Козлова Я.И., Митрофанов В.С., Фролова Е.В., Учеваткина А.Е., Филиппова Л.В., Аак О.В., Клишко Н.Н. Клинико-иммунологические характеристики больных хронической крапивницей: анализ данных регистра 2018-2019 года.....	36
Корнишева В.Г., Раводин Р.А., Авдеенко Ю.Л., Гулордава М.Д., Гринева Е.М. Редкий случай саркоидной гранулематозной реакции кожи, инициированной красным вином.....	43
Хисматуллина З.Р., Титова Т.Н., Альхашаш Субхи М.С., Титова А.А. К вопросу об оценке эффективности лечения зооантропонозной трихофитии.....	48

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МИКОЛОГИЯ

Васильева Н.В., Степанова А.А., Круглов А.Н., Генералова О.К., Орлова О.Е., Митрохин С.Д., Шкода А.С., Чилина Г.А., Босак И.А., Выборнова И.В., Мошкевич И.Р. Сканирующая электронная микроскопия дрожжевых клеток <i>Candida auris</i>	52
Степанова А.А., Чилина Г.А., Богомоллова Т.С., Авдеенко Ю.Л., Босак И.А., Выборнова И.В., Аак О.В., Соловьева Г.И., Павлова И.Э., Спиридонова В.А., Васильева Н.В. Сканирующая электронная микроскопия клеток культур <i>Lichtheimia corymbifera</i> и <i>Rhizopus arrhizus</i>	58
Васильева Н.В., Рябинин И.А., Выборнова И.В., Босак И.А., Канаева В.М., Пчелин И.М., Тараскина А.Е., Борзова Ю.В., Богданова Т.В., Алексеев А.Ю., Орлова О.Е., Физико-химические особенности модельного штамма <i>Candida auris</i> , выявляемые посредством MALDI-TOF-масс-спектрометрии.....	64
Быкова Л.П., Трапезников Я.П., Годовалов А.П., Бадьков И.И. Особенности роста <i>Candida albicans</i> в присутствии холестерина.....	73

ХРОНИКА И ИНФОРМАЦИЯ

Медведева Т.В., Лейна Л.М. XXVIII Конгресс Европейской Академии Дерматологии и Венерологии (EADV).....	77
--	----

CONTENTS

PROBLEM ARTICLES AND REVIEWS

Taraskina A.E., Vasilyeva N.V., Pchelin I.M., Ignatieva S.M., Spiridonova V.A., Uchevatkina A.E., Filippova L.V., Frolova E.V., Molecular genetic methods for detection and species identification of fungal order <i>Mucorales</i> in accordance with the global guideline for the diagnosis and management of mucoromycosis (literature review).....	3
Shkarin V.V., Saperkin N.V. A role of opportunistic mycoses in the complex comorbidity (literature review).....	15
Shevyakova A.M., Shevyakov M.A. Communicative method of the nocebo effect prevention when prescribing antifungal agents.....	24

CLINICAL MYCOLOGY

Kuznetsov V.D., Kozlova Y.I., Borzova Y.V., Mitrofanov V.S., Nikolaeva N.G., Lakeenkov N.M., Aak O.V., Bogomolova T.S., Ignatieva S.M., Sobolev A.V., Klimko N.N. Combination of allergic bronchopulmonary aspergillosis (<i>A. terreus</i>) and chronic pulmonary aspergillosis (<i>A. fumigatus</i>). Clinical case and review of literature.....	28
Burygina E.V., Melnikova A.V., Kozlova Y.I., Mitrofanov V.S., Frolova E.V., Uchevatkina A.E., Filippova L.V., Aak O.V., Klimko N.N. Clinical and immunological features of the patients with chronic urticaria: analysis of the register data 2018-2019.....	36
Kornisheva V.G., Ravodin R.A., Avdeenko Y.L., Gulordava M.D., Grineva E.M. Rare case of sarcoid granulomatous reaction of the skin initiated by red wine.....	43
Khismatullina Z.R., Titova T.N., Alhashash Subhi M.S., Titova A.A. To the question of estimating the effectiveness of zooantroponoze trichophytosis treatment.....	48

EXPERIMENTAL MYCOLOGY

Vasilyeva N.V., Stepanova A.A., Kруглов А.Н., Generalova O.K., Orlova O.E., Mitrochin S.D., Shkoda A.C., Chilina G.A., Bosak I.A., Vybornova I.V., Moshkevich I.R. Scanning electron microscopy of <i>Candida auris</i> yeast cells.....	52
Stepanova A.A., Chilina G.A., Bogomolova T.S., Avdeenko Y.L., Bosak I.A., Vybornova I.V., Aak O.V., Solovieva G.I., Pavlova I.E., Spiridonova V.A., Vasilyeva N.V. Scanning electron microscopy of the cultural cells of <i>Lichtheimia corymbifera</i> and <i>Rhizopus arrhizus</i>	58
Vasilyeva N.V., Ryabinin I.A., Vybornova I.V., Bosak I.A., Kanaeva V.M., Pchelin I.M., Taraskina A.E., Borzova Y.V., Bogdanova T.V., Alekseev A.Y., Orlova O.E., Physicochemical features of the <i>Candida auris</i> model strain detected by MALDI-TOF mass-spectrometry.....	64
Bykova L.P., Trapeznikov Y.P., Godovalov A.P., Badykov I.I. <i>Candida albicans</i> growth features in the presence of cholesterol.....	73

CHRONIC AND INFORMATION

Medvedeva T.V., Leina L.M. The 27th Congress of European Academy of Dermatology and Venerology (EADV).....	77
--	----

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГРИБОВ ПОРЯДКА *MUCORALES* В СООТВЕТСТВИИ С ГЛОБАЛЬНЫМИ РЕКОМЕНДАЦИЯМИ ПО ДИАГНОСТИКЕ И ТЕРАПИИ МУКОРМИКОЗА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Тараскина А.Е. (зав. лаб.)*, Пчелин И.М. (н.с.), Игнатъева С.М. (в.н.с.), Спиридонова В.А. (н.с.), Учеваткина А.Е. (с.н.с.), Филиппова Л.В. (с.н.с., ассистент кафедры), Фролова Е.В. (зав. лаб.), Васильева Н.В. (директор НИИ, зав. кафедрой)

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

В обзоре приведен анализ молекулярно-генетических методов, используемых для прямой диагностики в биологическом материале и видовой идентификации грибов порядка Mucorales в соответствии с Глобальными Рекомендациями по диагностике и терапии мукоормикоза, созданные под эгидой Европейской конфедерации медицинской микологии. Дана оценка современного состояния и перспектив развития.

Ключевые слова: грибы порядка *Mucorales*, мукоормикоз, глобальные рекомендации, диагностика, идентификация, методы на основе ПЦР, секвенирование, комплекс рибосомальных генов

MOLECULAR GENETIC METHODS FOR DETECTION AND SPECIES IDENTIFICATION OF FUNGAL ORDER

* Контактное лицо: Тараскина Анастасия Евгеньевна, e-mail: anastasiya.taraskina@sngmu.ru

MUCORALES IN ACCORDANCE WITH THE GLOBAL GUIDELINE FOR THE DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF MUCORMYCOSIS (LITERATURE REVIEW)

Taraskina A.E. (head of the laboratory), Pchelin I.M. (scientific collaborator), Ignatieva S.M. (leading scientific collaborator), Spiridonova V.A. (scientific collaborator), Uchevatkina A.E. (senior scientific collaborator), Filippova L.V. (senior scientific collaborator, assistant of the department), Frolova E.V. (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 and Department of Medical Microbiology, St. Petersburg, Russia

The review provides an analysis of molecular genetic methods used for direct detection in biological material and species identification of fungi of the order Mucorales in accordance with the Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis, created under the auspices of the European Confederation of Medical Mycology. Assessment of the current state and development prospects is given.

Key words: fungi of order *Mucorales*, mucormycosis, global guideline, diagnosis, identification, PCR-based methods, sequencing, ribosomal RNA genes

Зигомицеты как систематическая единица *Zygomycota* (des *Zygomycetes*) впервые были описаны Уиттакером в 1969 г. (Whittaker R.H. New concepts of kingdoms of organisms. Science. 1969. 163: 150-160). С внедрением молекулярно-генетических методов, способствующих революционному перевороту в систематике грибов, фила *Zygomycota* распалась на пять субфил: *Entomophthoromycotina*, *Kickxellomycotina*, *Mucoromycotina*, *Zoopagomycotina* и *Mortierellomycotina*, поднятых в дальнейшем до уровня фил. Среди зигомицетов выделяют два порядка, представители которых могут вызывать инфекционные поражения у человека: *Entomophthorales* и *Mucorales* – энтомофторомикоз и мукоормикоз соответственно. С систематической точки зрения

микровицеты порядка *Mucorales* представляют собой клинически самый значимый порядок среди зигоспорических грибов. Среди типичных возбудителей мукомикоза выделяют 25 видов родов *Actinomucor*, *Apophysomyces*, *Cokeromyces*, *Cunninghamella*, *Lichtheimia*, *Mucor*, *Mycotypha*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Saksenaea* и *Syncephalastrum*, что охватывает половину ветвей порядка [1, 2].

С экологической точки зрения грибы порядка *Mucorales* представляют собой гетерогенную группу нитевидных грибов – сапробионтов или факультативных паразитов, обычно встречающихся в почве, компосте, экскрементах животных, сельскохозяйственном мусоре или других органических веществах, которые часто себя ведут как оппортунистические патогены. Многие представители порядка являются космополитами биосферы, встречаясь повсеместно во всех климатических зонах Земного шара [1].

Широкое использование в современной медицине иммуносупрессивных препаратов, пандемия СПИД, возрастающая частота онкогематологических заболеваний и применение для их лечения высокодозной цитостатической химиотерапии, а также современные методы лечения бактериальных инфекций, привели к увеличению популяции иммунокомпрометированных пациентов с высоким риском развития инвазивных микозов. За последние два десятилетия на фоне достижений в области иммуносупрессивного лечения и трансплантаций резко возросло число инвазивных грибковых инфекций. Мукомикоз считают третьей по распространенности грибковой инфекцией у онкогематологических пациентов. *Rhizopus oryzae*, *Mucor circinelloides* и *Lichtheimia corymbifera* – наиболее часто встречаемые возбудители мукомикоза, на которые в совокупности приходится около 70% инфекционных случаев. Основной фактор риска развития микоза, вызванного муковыми грибами, – нарушение работы иммунной системы, ассоциированное с нейтропенией и лечением кортикостероидами [3]. Тем не менее иммунокомпетентные пациенты с дополнительными факторами риска, такими как сахарный диабет с кетоацидозом, тяжелой травмой и ожогами также подвержены риску развития мукомикоза. Однако в этом случае заболевание развивается чаще всего как кожная патология, а не инвазивный процесс. Кроме того, вспышки мукомикоза были связаны со стихийными бедствиями,

такими как цунами в Индийском океане 2004 г. и торнадо Джоплин, или с боевыми действиями (раны, полученные при взрывах).

Инфекционный процесс начинается при нитевидном росте гриба и ангиоинвазии (отличительный признак мукомикоза – гематогенное распространение патогена), что приводит к тромбозу и некрозу тканей. Уровень летальности при мукомикозе в целом (все формы) составляет примерно 50%. Но в определенных случаях, прежде всего, при диссеминированной патологии или поражении головного мозга на фоне нейтропении показатель возрастает почти до 100%. Быстрое прогрессирование заболевания, низкая эффективность противогрибковых препаратов и отсутствие ранних эффективных методов диагностики в настоящее время способствуют высокой частоте летальных случаев [3, 4].

Диагностика мукомикоза опирается в основном на микологическое культуральное и гистопатологическое исследования. Тесты на основе иммуноферментного анализа, наиболее широко используемые сегодня для диагностики инвазивного аспергиллеза и кандидоза, связанные с определением галактоманнана и β -D-глюкана в сыворотке крови, не применимы для диагностики мукомикоза. Культуральное исследование характеризуется чувствительностью (в 40% случаев, подтвержденных микроскопическим исследованием, грибы не вырастают) и специфичностью из-за возможной контаминации (мукоморлицеты являются частью сапрофитной биоты помещений). Кроме того, из-за медленного роста нитчатых грибов необходимо большее количество времени (от 10-15 дней до 3-4 недель) и дополнительных тестов. Гистологические исследования обладают высокой чувствительностью и специфичностью, но требуют также больше времени, что приводит к диагнозу микоза на поздней стадии и мешает своевременному терапевтическому вмешательству. Серьезным ограничением гистопатологических исследований является невозможность дифференциации вида возбудителя, что зачастую имеет решающее значение для выбора тактики терапии. Несвоевременное лечение амфотерицином В ассоциировано с двухкратным увеличением летальности от мукомикоза [4]. Таким образом, появление в клинической практике надежных, быстрых диагностических возможностей будет способствовать своевременному

назначению оптимальной противомикотической терапии.

В ноябре 2019 г. были опубликованы Глобальные Рекомендации по диагностике и терапии мукормикоза, созданные под эгидой Европейской конфедерации медицинской микологии (ЕСММ) (далее – Рекомендации), подготовленные авторами из 33 стран, основаны на собственном опыте исследователей и анализе опубликованных данных по эпидемиологии, диагностике и лечению мукормикоза [5]. Отдельный раздел Рекомендаций посвящен потенциально перспективным подходам для точной диагностики мукормикоза на ранних стадиях заболевания – молекулярно-генетическим на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Цель представляемого исследования – оценка современного состояния и перспектив развития молекулярно-генетических методов, исполь-

зуемых для диагностики мукормикоза и видовой идентификации грибов порядка *Mucorales* в соответствии с Глобальными Рекомендациями.

Прямое определение грибов порядка *Mucorales* в биологическом материале (диагностика мукормикоза).

В соответствии с Рекомендациями определение ДНК грибов порядка *Mucorales* молекулярными методами в различных биологических субстратах (в свежих и в парафинированных, фиксированных в формалине образцах тканей; периферической крови; бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) и спинномозговой жидкости) имеет клиническое значение: с установленной силой рекомендации (SoR) В и качеством доказательства (QuE) для большинства исследуемых биоматериалов II (табл. 1).

Таблица 1

Молекулярно-генетические методы определения муковых грибов в различном биологическом материале

Цель	Исследуемый биологический материал	Сила рекомендации (SoR)	Качество доказательства (QuE)	Кол-во ссылок	Недостатки
диагностика	свежие ткани	В	II	12	Отсутствуют коммерческие тесты, ограниченная стандартизация, различные мишени ДНК, методы и подходы
диагностика	фиксированные парафиновые блоки в формалине	В	II	16	Отсутствуют коммерческие тесты, ограниченность стандартизации, неоднородность ДНК мишеней и методов, переменная чувствительность
диагностика	сыворотка, плазма, цельная кровь	В	II	9	Малые объемы анализируемых выборок
диагностика	БАЛ, спинномозговая жидкость	В	II	4	Проанализированы преимущественно БАЛ онкогематологических пациентов, 1 случай церебрального мукормикоза
диагностика	моча	В	III	1	Апробация на модели мукормикоза на лабораторных животных

Невысокий уровень показателей представленных диагностических возможностей объясняется, прежде всего, отсутствием как коммерческих тест-систем (применением «домашних» технологий, не прошедших внешнюю валидацию), так и обширных многоцентровых клинических испытаний (малые объемы выборок), использованием различных ДНК мишеней, технологий и подходов [5]. Рабочая группа «Грибковая ПЦР Инициатива» (Fungal PCR Initiative (FPCRI)) Международного общества по медицинской и ветеринарной микологии (ISHAM) в настоящее время работает над решением данной проблемы.

Ключевым моментом при разработке диагностических тест систем для определения инфекционных агентов в биологическом материале

на основе молекулярно-генетических подходов является подбор оптимальной «мишени» (фрагмента гена) для анализа. Традиционно рибосомальные гены, включающие 18S и 28S субъединицы, локусы ITS1 и ITS2 (внутренние транскрибируемые спейсеры) являются молекулами, наиболее часто используемыми в молекулярных исследованиях [6]. Высокое число копий рДНК в грибковом геноме обеспечивает высокую чувствительность амплификации этого региона. Из-за сочетания в рибосомальной ДНК консервативных и высоко вариабельных участков, комплекс рибосомальных генов широко используют для молекулярной систематики на видовом и внутривидовом уровне, идентификации и прямого определения в биологическом материале

риале с привлечением различных молекулярно-генетических подходов.

Изначально при разработке молекулярных подходов на основе ПЦР для определения грибов порядка *Mucorales* в биологическом материале исследователи двигались по двум независи-

мым направлениям: разработке методик узкоспецифического анализа (табл. 2) и использованию пан-грибковых праймеров с последующим секвенированием намноженного фрагмента (табл. 3).

Таблица 2

Методы диагностики мукормикоза с использованием специфичных праймеров к грибам порядка *Mucorales*

Мишень	Метод (детекция)	Диагностические возможности	Праймер	Последовательность праймеров (5'-3') [оригинальный источник]	Источник
18S	Полу-гнездовая ПЦР (электрофорез)	Комплекс из 9 клинически значимых видов <i>Mucorales</i>	18S-1 ZM1 18S-2 ZM2 ZM3	ATTACCATGAGCAAATCAGA TCCGTC AATTCCTTTAAGTTTC CAATCCAAGAATTTTCACCTCTAG	[9] оригинал
18S	Полу-гнездовая ПЦР (электрофорез) + сиквенс	Комплекс из 9 клинически значимых видов <i>Mucorales</i> Точная видовая идентификация	-/-	-/- по Bialek et al., 2005 [9]	[15]
18S	Гнездовая ПЦР электрофорез	Расширение комплекса клинически значимых видов <i>Mucorales</i>	18S-1 Mucor1 18S-2 Mucor2 Mucor3 Mucor4	WTTACCRTGAGCAAATCAGA CAATCYAAGAATTTTCACCTCTAG AGCATGGAATAATRAAAYA AGCATGGGATAACGGAATA Модификация Bialek et al., 2005 [9]	[16]
18S	ПЦР-ПВ SYBRGreen + анализ HRM ¹	6 клинически значимых видов <i>Mucorales</i>	-/-	-/- по Bialek et al., 2005 [9]	[18]
18S	ПЦР-ПВ TaqMan + сиквенс	Широкий комплекс клинически значимые виды <i>Mucorales</i> Точная видовая идентификация	18S-1 Zm1mod 18S-2 ZM3mod p-ZM/LNA	TTACCRTGAGCAAATCAGARTG AATCYAAGAATTTTCACCTCTAGCG TYRR(G)G(G)B(A)T(T)T(G)T(A)TTT Модификация Bialek et al., 2005 [9]	[17]
18S	ПЦР + RFLP (электрофорез)	<i>Rhizopus</i> sp. <i>Rhizomucor</i> sp., <i>Mucor</i> sp., <i>Absidia</i> (=Lichtheimia) <i>corymbifera</i>	18S-3 RpL1 18S-3 RmL1 18S-3 MucL1 18S-3 AbsL1 18S-4 MR1	TGATCTACGTGACAAATTCT TGATCTACGCGAGCGAACAA TGATCTACGTGACATATTCT TGATCTACACCGCATCAAAT AGTAGTTTGTCTTCGGKCAA	[10] оригинал
18S	ПЦР + RFLP (электрофорез)	-/- + схема внутривидового типирования	-/-	-/- По Machouart et al., 2006 [10]	[19]
18S	ПЦР-ПВ TaqMan	<i>Absidia</i> (=Lichtheimia) <i>corymbifera</i> <i>Mucor</i> и <i>Rhizopus</i> комплекс видов <i>Rhizomucor meihei</i> / <i>pusillus/variabilis</i>	18S-5 NS92F 18S-6 AcoryR1 AcoryP1 18S-5 NS92F 18S-6 MucR1-1 MucP1 18S-5 NS92F 18S-6 RmucR1 RmucP1	CACCGCCCCTCGCTAC GCAAAGCGTCCGAAGGACA ATGGCACGAGCAAGCATTAGGGACG CACCGCCCCTCGCTAC CCTAGTTTGCCATAGTTCTCTGCAG CCGATTGAATGGTTATAGTGAGCAT- ATGGGATC CACCGCCCCTCGCTAC GTAGTTTGCCATAGTTCCGGCTA TTGAATGGCTATAGTGAGCATATGG- GAGGCT https://www.epa.gov/ [11]	[20]
ITS1 ITS2	ПЦР-ПВ TaqMan	<i>Rhizopus oryzae</i> <i>Rhizopus microsporus</i>	Oli Ror1 Oli Ror2 Ror-MBI Oli Rmic1 Oli Rmic2 Rmic-MBI	TCTGGGGTAAGTGATTGC GCGAGAACCAAGAGATCC CGCGATAACCAGGAGTGG- CATCGATCAAATCGCG CTTCTCAGTATTGTTTGC ATGGTATATGGTAAAGGG CGCGATCCTCTGGCGATGAAGGTCG-	[12] оригинал

		<i>Mucor</i> spp.	Oli Mucor1 Oli Mucor2 Mucor-MBI	TATCGCG GCCTGGTGCAAAAATTGCTTATC CTAAGACAAGTGTGTTTATGGTATTG CGCGATGCTGTTCTCCGCCAC- TTCCAATCGCG	
ITS1	ПЦР-PB Molecular beacons	Все зигомикеты (pan-zygomycetes)	ITS5 ITS2 PFM3	GGAAGTAAAAGTGGTAAACAAGG GCTGCGTTCTTCATCGATGC gcgcgcTCGCATCCAGGGGTCGTAC- CTTAGGGTTTCTCTGGGgcgcgc ITS no White et al., 1990 [8]	Proba оригинал [27]
28S	ПЦР-PB FRET	<i>Rhizopus</i> spp., <i>Mucor</i> spp., <i>Rhizomucor</i> spp. <i>Cunninghamella</i> spp.	Zygo F Zygo R Zygo FITC Zygo RD640 CU F CU R CU FITC CU RD640	TCAAAGAGTCAGGTTGTTGG CAGTCTGGCTCCAAACGGTTC GGCGAGAAACCGATAGCGAAC GTACCGTGAGGAAAAGATGAAAA- GAACTTTGAAA TAGTCAGCCAGGTAATAAGT TCGTCAATATTTAGCTTTAGG GCTTGAAACGAAGAGTCAGGTTG TGGAATGCAGCCTAAAATGGGAGTGA	[15] оригинал
28S	ПЦР-PB TaqMan	Клинически значимые виды <i>Mucorales</i>	WB28-1m WB28-2 p-WB28	TTTGGGAATGCAGCCT TCARAGTTCTTTCAWCTTTCCCT CGARARACCGATGCRAACAAGTACCGT Модификация Khot et al., 2009 [14]	Springer et al., 2016

Таблица 3

Методы диагностики мукормикоза с использованием пан-грибковых праймеров

Мишень	Метод	Диагностические возможности	Праймер	Последовательность праймеров (5'-3')	Источник
ITS1	ПЦР-PB SYBR Green + сиквенс	Широкий спектр грибов (pan-fungal) Точная видовая идентификация	ITS1 ITS2	TCCGTAGGTGAACCTGCGG GCTGCGTTCTTCATCGATGC	White et al., 1990 Bultrago et al., 2012
ITS1	ПЦР-PB SYBR Green + сиквенс	Широкий спектр грибов (pan-fungal) Точная видовая идентификация	-/-	-/-	White et al., 1990 Lau et al., 2007
ITS1 ITS2	ПЦР + сиквенс	Широкий спектр грибов (pan-fungal) Точная видовая идентификация	ITS5 ITS4	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al., 1990 Pamidimukkala et al., 2019
28S	ПЦР-PB TaqMan + сиквенс	56 видов грибов (из них 13 видов мукоровых грибов) Точная видовая идентификация	Fw1 Fw11 Rev1 Probell	GGGTGGTRARYTCCWCTAARGCTAA GGGWGGTAAATCYCWCCTAAAGCTAA CTCT[T]YCAAAGTKCTTTCA[T]C A[C]TT[G]T[T]C[G][C]TA[T]CG	Оригинал Landlinger et al., 2010
28S	ПЦР-PB SYBR Green + сиквенс	Широкий спектр грибов (pan-fungal) Точная видовая идентификация	28S-10F 28S-12R 28S-12F 28S-13R	GACATGGGTTAGTCGATCCTA CCTATCTACATTYTTCTATCAAC GTTGATAGAAYAATGTAGATAAGG GACAGTCAGATCCCCTTG	Модификация Khot et al., 2009 Springer et al., 2019

Анализируя вышеуказанные данные отметим, что при использовании молекулярно-генетической технологии каждый подход имеет как достоинства, так и недостатки. Применение низкоспецифичных пан-грибковых праймеров к консервативным участкам рДНК позволяет за один этап лабораторных исследований диагностировать микоз, однако для точной видовой идентификации этиологического агента, которая

зачастую необходима для назначения оптимального противогрибкового препарата, требуется проведение дополнительного анализа – секвенирования полученного в ходе реакции фрагмента. Тогда как применение специфичных праймеров (уровень специфичности устанавливает исследователь – родо- / видоспецифичные) ограничивает спектр определяемых микромицетов изначально заданными параметрами, но дает

возможность проводить сразу точную видовую идентификацию инфекционного агента в биологическом материале. Кроме того, узкоспецифичные праймеры применимы при более чувствительных методах молекулярно-генетического анализа, таких как ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием флуорогенного зонда TaqMan. При сравнении двух подходов ПЦР-РВ Спрингер с соавторами (Springer et al.) показали, что использование специфичных к грибам порядка *Mucorales* праймеров в сочетании с зондом TaqMan обладает большей чувствительностью в сравнении с пан-грибковыми праймерами и интеркалирующим красителем SYBR Green [7]. При этом тест-системы с низкоспецифичными праймерами к консервативным участкам рДНК позволяют определять микс-грибковые инфекции.

Несмотря на большое количество работ, посвященных детекции муковых грибов в биологическом материале и их видовой идентификации, можно выделить несколько ключевых публикаций с оригинальным дизайном праймеров [8-14], которые послужили основой для дальнейшего развития молекулярно-генетических подходов.

Один из наиболее удачных дизайнов праймеров, мишенью которых была молекула 18S субъединицы РНК, был предложен Bialek et al в 2005 г. в реализации полугнездовой (вложенной) ПЦР с электрофоретической детекцией результатов (табл. 2). Предложенная схема позволяла определять в клиническом материале комплекс из 9 клинически значимых видов *Mucorales* (*Absidia* (= *Lichtheimia*) *corymbifera*, *Rhizomucor pusillus*, *Cokeromyces recurvatus*, *Apophysomyces elegans*, *Saksenaea vasiformis*, *Mucor hiemalis*, *Rhizopus oryzae*, *Cunninghamella bertholletiae*, *Syncephalastrum racemosum*) [9]. В дальнейшем этот подход получил широкое использование, некоторые исследователи дополняли его секвенированием намноженного в ходе реакции фрагмента с целью точной видовой идентификации возбудителя [15]. С целью расширения диагностических возможностей разработанной схемы детекции было предложено использование вырожденных праймеров, что позволяло увеличить перечень определяемых видов (*Lichtheimia* spp., *Rhizomucor pusillus*, *Mucor* spp., *Actinomyces elegans*, *Cokeromyces recurvatus*, *Saksenaea* spp., *Apophysomyces* spp., *Rhizopus* spp., *Syncephalastrum racemosum*, *Cunning-*

hamella spp.) [16]. Оптимальное решение совершенствования данного подхода – перевод схемы типирования в формат ПЦР-РВ. Было предложено два независимых решения: применение вырожденных праймеров и зонда TaqMan [17], допускающее быструю детекцию в биологическом материале широкого спектра клинически значимых представителей порядка *Mucorales*, или использование красителя SYBR Green с анализом кривых плавления ПЦР-продуктов высокого разрешения, позволяющее определять по температуре плавления 6 видов: *Rhizopus microsporus* – 76,46 °С, *Rhizopus oryzae* – 76,59 °С, *Mucor racemosus* – 76,78 °С, *Mucor circinelloides* – 76,98 °С, *Rhizomucor pusillus* – 77,87 °С, *Lichtheimia corymbifera* – 78,56 °С [18].

В 2006 г. Мачоурт (Machouart) с соавторами предложил схему идентификации трех родов муковых грибов (*Rhizopus* spp., *Rhizomucor* spp., *Mucor* spp.) и вида *Absidia* (= *Lichtheimia*) *corymbifera* с использованием родо-/видоспецифичных прямых праймеров к 18S субъединицы (модифицированных по 3' концу) и одного обратного праймера с вырожденной структурой [10] (табл. 2). Схема была дополнена анализом длин рестрикционных фрагментов (RFLP) с использованием двух эндонуклеаз (ClaI и AseI), позволяющих определять следующие виды *Rhizopus* spp.: *R. stolonifer* – при наличии сайта для ClaI I; *R. microsporus*/ *R. azigosporus* – при наличии сайта для AseI и *R. oryzae* – в случае отсутствия сайта рестрикции. Данный набор праймеров в дальнейшем был эффективно использован в схеме внутривидового типирования с дополнением коротких малоспецифичных праймеров для фингерпринтинга [19].

На официальном сайте Американского Агентства по защите окружающей среды (US Environmental Protection Agency (EPA)) были опубликованы три схемы детекции ПЦР-РВ с одним стандартным прямым праймером и специфичными TaqMan зондами и обратными праймерами, позволяющие выделять либо отдельный вид, либо комплексы видов: (1) *Lichtheimia corymbifera* (assay name: Acory); (2) *Mucor amphibiorum* / *circinelloides* / *hiemalis* / *indicus* / *mucedo* / *racemosus* / *ramosissimus* и *Rhizopus azygosporus* / *homothalicus* / *microspores* / *oligosporus* / *oryzae* (assay name: Muc1); (3) *Rhizomucor meihei* / *pusillus* / *variabilis* (assay name: Rmuc) [20] (табл. 2). Представленные схемы эффективно используют для определения муковых

вых грибов в разных биологических материалах (сыворотке, БАЛ) различными авторами [21, 22].

Внимание исследователей было сосредоточено на оптимизации подходов молекулярно-генетического определения в формате ПЦР-РВ, в качестве мишени которых была выбрана 28S субъединица [14], дальнейшая модификация которых была использована как для разработки тест-системы для детекции широкого спектра клинически значимых видов *Mucorales* [17] (табл. 2), так и для постановки пан-грибковой реакции с дальнейшим секвенированием фрагмента [7, 23] (табл. 3). Параллельно Касаи с соавторами (Kasai) были разработаны два количественных ПЦР теста на 28S субъединицу: один из которых охватывал определяемые другими схемами ПЦР-анализа роды муковых (*Rhizopus*, *Mucor Rhizomucor*), другой был уникальный, специфичный к роду *Cunninghamella*, не диагностируемому ранее молекулярно-генетическими методами [13]. При апробации данных ПЦР-тестов на модели экспериментального мукомикоза на кроликах подтверждено, что детекция ДНК грибов в сыворотке инфицированных животных может быть независимым методом диагностики мукомикоза.

В 1990 г. вышла публикация, предлагающая в качестве универсального баркода для микромицетов последовательность рибосомальной ДНК (на настоящий момент публикация имеет более 15000 цитирований), в которой было предложено несколько вариаций праймеров, комплементарных к участку ITS, в качестве универсальных для идентификации всех микромицетов и построения их филогенетических отношений [8]. Различные вариации схем молекулярно-генетического анализа в формате ПЦР-РВ в настоящее время составляют основу большинства подходов для детекции грибов порядка *Mucorales* с использованием пан-грибковых праймеров с дальнейшим секвенированием региона [24-26] (табл. 3). Для специфичного анализа в биоматериале муковых грибов участок ITS используют крайне редко [12, 27] (табл. 2).

Достаточно новым, перспективным направлением диагностики мукомикоза молекулярно-генетическими методами является определение в биоматериале уникальных генов, присущих исключительно грибам порядка *Mucorales*. В качестве генов «мишеней» рассматривают гены, кодирующие факторы вирулентности муково-

вых грибов: *FTR1*, *CotH*, *Arp*, *ArF*, *CaN* и др [1], по которым можно судить не только о присутствии микромицета в исследованном материале, но и о развитии инфекционного процесса (инвазии гриба). Одни из генов – узковидоспецифичны и могут быть использованы для диагностики мукомикоза, вызванного определенными представителями порядка, другие универсальны – присутствуют в геноме всех грибов порядка *Mucorales*, как, например *CotH*, который вызывает наибольший интерес у исследователей [4]. CotH белок покрывает споры микромицета и позволяет проникать в ткани макроорганизма, преодолевая иммунную защиту «хозяина». На двух клинически релевантных моделях мукомикоза на мышах и тестировании ограниченного числа образцов от пациентов была показана целесообразность использования *CotH* в качестве «мишени» для ранней диагностики инфекционного процесса. Предварительные результаты апробации разработанной авторами ПЦР тест-системы на различном биологическом материале показали высокую эффективность данного подхода: при проведении анализа через 24 часа после экспериментального заражения чувствительность метода составляла 90% и специфичность – 100% [4].

Наиболее эффективной технологией определения грибов порядка *Mucorales* (как и всех других микромицетов) зарекомендовала себя система ПЦР/ электроспрей – ионизационная (ЭСИ) масс-спектрометрия (PCR/ESI-MS), коммерциализированная как система IRIDICA, ранее – PLEX-ID (Ibis Biosciences, Abbott, Des Plaines, США). Данная технология сочетает амплификацию нуклеиновых кислот с использованием 16 широкодиапазонных и специфических ПЦР-анализов (мишени 18S рибосомальная субъединица, митохондриальный цитохром b) с детекцией ЭСИ-масс-спектрометрией. IRIDICA Fungal позволяет тестировать биологические материалы (кровь, БАЛ) на более чем 200 видов клинически значимых микромицетов за 8 часов [28, 29]. Однако в апреле 2017 г., когда технология была на утверждении в Управлении по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA, США), Abbott останавливает ее обслуживание и отзывает приборы. Упадок системы IRIDICA произошел не из-за проблем с производительностью и качеством продукции, а был основан, главным образом, на финансовых, логистических и норматив-

ных соображениях. Практические проблемы с реализацией, которые способствовали малому количеству пользователей, включали в себя высокие затраты на оборудование и реагенты. Кроме того, не было клинических результатов исследований, показывающих явную выгоду использования технологии. Хотя система IRIDICA была коммерчески доступна в Европе более двух лет, она была внедрена в качестве диагностического теста только в трех европейских больницах. Этот поворот событий представляет собой не только потерю потенциально диагностического инструмента для инфекционных заболеваний, но и может быть предвестником подобных ситуаций с другими новыми и дорогостоящими диагностиками, особенно геномными технологиями [30].

Одним из недостатков, упомянутых в Рекомендациях, который необходимо учесть для повышения показателей диагностических возможностей методов прямого определения в биоматериале грибов порядка *Mucorales*, является стандартизация методики экстракции ДНК из биосубстратов. Отдельные исследовательские группы используют различные методики: «домашние» алгоритмы, построенные на классических подходах выделения ДНК (фенольная экстракция, использование сорбентов, солевой метод), и разнообразные коммерчески доступные платформы QiAmp Tissue DNA Mini Kit (Qiagen, Германия), MagNA Pure LC DNA Isolation Kit или High Pure Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Германия).

Особую сложность выделение ДНК представляет при работе с фиксированными в формалине (формальдегиде) тканями, заключенными в парафиновые блоки (FFPE ткани). Во-первых, формалин негативно влияет на качество ДНК для последующего анализа: происходит денатурация нуклеиновых кислот вследствие разрыва межцепочечных водородных связей, сильная фрагментация, образование перекрестных сшивок азотистых оснований с гистонами. Во-вторых, парафинирование тканей затрудняет саму экстракцию ДНК. Поэтому при работе с фиксированными формалином парафиновыми блоками перед исследователем стоит решение двух задач: добиться максимального выхода ДНК из исследуемого фрагмента и нейтрализация освобождающегося формальдегида и его производных. Поэтому первым необходимым этапом при работе с таким материалом является

депарафинизация образцов: наиболее распространенная стандартная методика – инкубация с 100% ксилолом с последующей обработкой в этиловом спирте [7, 9, 18]. Затем следует этап обработки депарафинированного образца денатурирующим буферным раствором (существуют коммерчески доступные реагенты, такие как, например, набор для восстановления поврежденной ДНК PreCR или смесь ферментов NEBNext для восстановления ДНК из фиксированных тканей (New England Biolabs, Англия)). Более стандартизованное, но дорогое решение (поэтому многие исследователи используют «домашние» методики) – воспользоваться готовыми коммерческими решениями для выделения ДНК из FFPE тканей – ISOLATE II (Bioline, Англия), Agencourt FormaPure DNA (Beckman Coulter, США), «ДНК-Ткань-Ф» (ООО «Тест Ген», Россия) и др.

Определение ДНК грибов порядка *Mucorales* в крови (сыворотке) и других жидкостях (спинномозговая жидкость, БАЛ) в настоящее время рассматривают как неинвазивный метод ранней диагностики и упреждающей терапии [5]. Одна из первых попыток определить ДНК *Mucorales* в сыворотке была выполнена на пациенте с легочной инфекцией *C. bertholletiae*. Ретроспективный анализ образцов сыворотки с использованием пан-фунгальной ПЦР показал, что ДНК детектируется позитивно за два дня до появления инфильтратов в легких [31]. В дальнейшем факт, что циркулирующая ДНК муконовых грибов может быть определена за несколько дней до постановки диагноза классическими методами, был подтвержден рядом независимых исследований как на экспериментальной животной модели мукормикоза [13], так и при диссеминированных формах у иммунокомпрометированных пациентов [20, 22] и у иммунокомпетентных лиц с ожогами при мукормикозе кожи [32].

Видовая идентификация грибов порядка *Mucorales*

Несмотря на то, что определение муконовых грибов в биосубстратах имеет ряд недостатков, которые сказываются на силе рекомендаций методов и качестве доказательств, видовая идентификация грибов порядка *Mucorales* молекулярно-генетическими методами имеет более высокие показатели диагностических возможностей (табл. 4). Авторы Глобальных Рекомендаций подчеркивают актуальность (лучшая эффек-

тивность) молекулярных методов для определения вида микромицета в сравнении со стандартными (классическими) микологическими методами, при использовании которых возникает ряд сложностей при видовой идентификации из-за неспособности некоторых видов спорулироваться на стандартных средах, сходных морфологических черт меж близкородственными видами, особых трудностей описания криптических видов. Высокий уровень соответствия (>90%)

между морфологической и молекулярной идентификацией отмечено только для референтных лабораторий [5]. В настоящее время для определения вида патогена и эпидемиологических исследований показана наивысшая сила рекомендаций А. Тогда как качество доказательств остается на уровне II, что требует дополнительных многоуровневых эпидемиологических исследований.

Таблица 4

Молекулярно-генетические методы для видовой идентификации грибов порядка *Mucorales*

Цель	Подход	Сила рекомендации (SoR)	Качество доказательства (QuE)	Кол-во ссылок	Комментарии
Эпидемиологические исследования	Молекулярная идентификация до вида по секвенированию ITS	A	II	6	ITS секвенирование – золотой стандарт идентификации
Определение вида	Молекулярно-генетический анализ vs морфология	A	II	4	Молекулярная идентификация превосходит морфологическую
Эпидемиологические исследования вспышек	Полногеномное секвенирование	A	II	2	Раневые инфекции Блок ожогов
Эпидемиологические исследования	Молекулярная идентификация до вида (использование других ДНК «мишеней»)	C	II	5	28S, цитохром В, FTR1

Описанные в первом разделе обзора ПЦР-анализы для грибов порядка *Mucorales* имеют ограниченное применение для идентификации вида, так как разработанные подходы в подавляющем большинстве случаев предназначены для детекции представителей мукоровых грибов в целом или отдельных родов, но не для определения видовой принадлежности. В 2008 г. опубликованы рекомендации Института Клинических и Лабораторных Стандартов (CLSI) США, согласно которым «золотым стандартом» видовой идентификации микромицетов является секвенирование ITS региона рибосомальных генов [33]. Основываясь на опубликованных результатах и мнениях экспертов, рабочая группа ISHAM также предложила секвенирование ITS в качестве метода первой линии для видовой идентификации *Mucorales*, а в качестве референтных Баз данных для определения последовательностей – использование Баз CBS (<http://www.westerdijkinstitute.nl/Collections/BioloMICSSequences.aspx>) или ISHAM (<http://its.mycologylab.org>). Полногеномное секвенирование рекомендуют для изучения эпидемиологии вспышек мукормикоза [34, 35], однако в настоящее время существует ограниченное количество подобных исследований.

В работе Валтера (Walther) при оценке биоразнообразия грибов порядка *Mucorales* (в исследование было включено 668 штаммов 203 таксонов) на основе нуклеотидного полиморфизма ITS и 28S (LSU) регионов установлено, что межвидовая изменчивость ITS достаточна для подтверждения видовой идентификации большинства видов, только для видовых комплексов *Mucor circinelloides*, *M. flavus*, *M. piriformis* и *Zygorhynchus moelleri* разрешающей способности ITS региона недостаточно, и требуется использование альтернативных «мишеней» (бар-кода) для анализа [2]. Внутривидовая изменчивость ITS региона была различной среди видов мукоровых грибов и колебалась в диапазоне от 0% (*Backusella circina*) до 13,3% для *Cunninghamella echinulata*. В результате проведенного филогенетического анализа внесены изменения в таксономию и номенклатуру: все виды *Mucor*, обладающие спорангиофорами, были перенесены в *Backusella*; род *Zygorhynchus* оказался полифилетическим, и все его виды были переклассифицированы в *Mucor*; *Rhizomucor endophyticus* был перенесен в *Mucor*, а *Rhizomucor chlamydosporus* оказался синонимом *Mucor indicus* [2].

В качестве альтернативных ДНК мишеней для видовой идентификации мукоровых грибов

предложены следующие: 18S, 28S, FTR1 и цитохром b. Однако они менее универсальны для видовой идентификации грибов порядка *Mucorales* [5].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Количество случаев мукормикоза прогрессивно растет во всем мире, но эффективность терапевтического лечения остается неприемлемо низким (на уровне 60-70%). В первую очередь, это связывают с недостатком методов ранней диагностики микоза. Среди перспективных подходов для быстрой эффективной диагностики заболевания выделяют молекулярно-генетические технологии. Сравнительный анализ современных методов на основе ПЦР определения грибов порядка *Mucorales* в различных биосубстратах и видовой идентификации показал, что:

1) ПЦР – оптимальный метод для определения грибов порядка *Mucorales* в биологических образцах;

2) 18S – оптимальная мишень, позволяющая определять *Mucor*, *Rhizopus*, *Lichthemia Rhizomucor*;

3) ПЦР амплификация целевого гена *CotH*, специфичного для *Mucorales*, – перспективный подход;

4) при работе с образцами тканей предпочтительно использование свежего материала (по сравнению с парафиновыми блоками);

5) обнаружение ДНК *Mucorales* в крови – дополнительный неинвазивный метод ранней диагностики (обнаружение ДНК гриба за два дня до появления легочных инфильтратов) для проведения превентивной терапии;

6) секвенирование ITS региона – «золотой» стандарт видовой идентификации для большинства представителей мукоровых грибов. Исключение составляют видовые комплексы *M. circinelloides*, *M. flavus*, *M. piriformis* и *Zygorhynchus moelleri*, для которых необходимо применение дополнительного бар-кода.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hassan M.I.A., Voigt K. Pathogenicity patterns of mucormycosis: epidemiology, interaction with immune cells and virulence factors. *Medical Mycology*. 2019; 57: S245-S256. doi: 10.1093/mmy/myz011
2. Walther G., Pawlowska J., Alastruey-Izquierdo A., et al. DNA barcoding in Mucorales: an inventory of biodiversity. *Persoonia*. 2013; 30: 11-47. doi: 10.3767/003158513X665070
3. Ghuman H., Voelz K. Innate and adaptive immunity to Mucorales. *J. Fungi*. 2017; 48 (3): 1-11. doi: 10.3390/jof3030048
4. Baldin C., Soliman S.S.M., Jeon H.H., et al. PCR-Based approach targeting mucorales-specific gene family for diagnosis of mucormycosis. *J. Clin. Microbiol.* 2018; 56 (Is.10): e00746-18. doi: 10.1128/JCM00746-18
5. Cornely O.A., Alastruey-Izquierdo A., Arenz D., et al. Mucormycosis ECMM MSG Global Guideline Writing Group. Global guideline for diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Lancet Infect. Dis.* 2019; 19 (12): e405-e421. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30312-3.
6. *Fundamental Medical Mycology*. 2010. Edited by Reiss E., Shadomy H.J., Lyon G.M. III Chapter 2. Laboratory diagnostic methods in medical mycology. Genetic identification of fungi. P. 64-69
7. Springer J., McCormick Smith I., et al. Identification of *Aspergillus* and *Mucorales* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples: Comparison of specific and broad-range fungal qPCR assays. *Med. Mycology*. 2019; 57: 308-313. doi: 10.1093/mmy/myy041
8. White T.J., Bruns S., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal genes for phylogenetics. In: Innis M.A., Gelfand J., Sninsky J., White T.J., eds. *PCR protocols. a guide to methods and applications*. San Diego, CA: Academic Press, 1990; 315–324.
9. Bialek R., Konrad F., Kern J., et al. PCR based identification and discrimination of agents of mucormycosis and aspergillosis in paraffin wax embedded tissue. *J. Clin. Pathol.* 2005; 58: 1180-1184. doi: 10.1136/jcp.2004.024703
10. Machouart M., Larche J., Burton K., et al. Genetic identification of the main opportunistic *Mucorales* by PCR-restriction fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44 (3): 805-810. doi: 10.1128/JCM.44.3.805-810.2006
11. Сайт Американского Агентства по защите окружающей среды (EPA) <https://www.epa.gov/> [Website of the American Environmental Protection Agency (EPA) <https://www.epa.gov/>]

12. *Bernal-Martinez L., Buitrago M.J., Castelli M.V., et al.* Development of a single tube multiplex-time PCR to detect the most clinically relevant Mucormycetes species. *Clin. Microbiol. Infect.* 2013; 19 (1): E1-E7. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03976.x
13. *Kasai M., Harrington S.M., Francesconi A., et al.* Detection of a molecular biomarker for Zygomycetes by quantitative PCR assay of plasma, bronchoalveolar lavage, and lung tissue in a rabbit model of experimental pulmonary Zygomycosis. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46 (11): 3690-3702. doi: 10.1128/JCM.00917-08
14. *Khot P.D., Ko D.L., Fredricks D.N.* Sequencing and analysis of fungal rRNA operons for development of broad-range fungal PCR assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75 (6): 1559-1565. doi: 10.1128/AEM.02383-08
15. *Hammond S.P., Bialek R., Milner D.A., et al.* Molecular methods to improve diagnosis and identification of mucormycosis. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49 (6): 2151-2153. doi: 10.1128/JCM.00256-11
16. *Hirano M., Ota Y., Koibuchi T., et al.* Nested polymerase chain reaction with specific primers for Mucorales in the serum of patients with hematological malignancies. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2019; 72 (3): 196-198. doi: 10.7883/yoken.JJID.2018.379
17. *Springer J., Goldenberger D., Schmidt F., et al.* Development and application of two independent real-time PCR assays to detect clinically relevant Mucorales species. *J. Med. Microbiol.* 2016; 65: 227-234. doi: 10.1099/jmm.0.000218
18. *Hrncirova K., Lengerova M., Kocmanova I., et al.* Rapid detection and identification of Mucormycetes from culture and tissue samples by use of high-resolution melt analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48 (9): 3392-3394. doi: 10.1128/JCM.01109-10
19. *Gamarra S., Chaves M.S., Cabeza M.S., et al.* Mucormycosis outbreak due to *Rhizopus microsporus* after arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction surgery evaluated by RAPD and MALDI-TOF Mass spectrometry. *J. Mycol. Med.* 2018; 28 (4): 617-622. doi: 10.1016/j.mycmed.2018.09.002
20. *Millon L., Larosa F., Lepiller Q., et al.* Quantitative polymerase chain reaction detection of circulating DNA in serum for early diagnosis of mucormycosis in immunocompromised patients. *Clin. Infect. Dis.* 2013; 56 (10): e95-e101. doi: 10.1093/cid/cit094
21. *Millon L., Herbrecht R., Grenouillet F., et al.* Early diagnosis and monitoring of mucormycosis by detection of circulating DNA in serum: retrospective analysis of 44 cases collected through the French Surveillance Network of Invasive Fungal Infections (RESSIF). *Clin. Microbiol. Infect.* 2016; 22: 810.e1-810.e8. doi: 10.1016/j.cmi.2015.12.006.
22. *Scherer E., Iriart X., Bellanger A.P., et al.* Quantitative PCR (qPCR) detection of Mucorales DNA in bronchoalveolar lavage fluid to diagnose pulmonary mucormycosis. *J. Clin. Microbiol.* 2018; 56 (Is.8): e00289-18. doi: 10.1128/JCM.00289-18
23. *Landlinger C., Preuner S., Baskova L., et al.* Diagnosis of invasive fungal infections by a real-time panfungal PCR assay in immunocompromised pediatric patients. *Leukemia.* 2010; 24 (12): 2032-2038. doi: 10.1038/leu.2010.209
24. *Buitrago M.J., Aguado J.M., Ballen A., et al.* Efficacy of DNA amplification in tissue biopsy samples to improve the detection of invasive fungal disease. *Clin Microbiol. Infect.* 2013; 19 (6): E271-7. doi: 10.1111/1469-0691.12110
25. *Lau A., Chen S., Sorrell T., et al.* Development and clinical application of a panfungal PCR assay to detect and identify fungal DNA in tissue specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45 (2): 380-385. doi: 10.1128/JCM.01862-06
26. *Pamidimukkala U., Sudhaharan S., Kancharla A., et al.* Mucormycosis due to *Apophysomyces* species complex- 25 years' experience at a tertiary care hospital in southern India. *Med. Mycol.* 2019; Jul 25. pii: myz081. doi: 10.1093/mmy/myz081
27. *Kumar C.M., Mugunthan M., Kapoor C.R., Pandalanghat C.S.* Speciation of fungi using real time PCR with molecular beacons: Can we solve the enigma of diagnosis of invasive fungal disease. *Med. J. Armed. Forces. India.* 2019; 75: 41-49. doi: 10.1016/j.mjafi.2017.12.003
28. *Alanio A., Garcia-Hermoso D., Mercier-Delarue S., et al.* Molecular identification of Mucorales in human tissues: contribution of PCR electrospray-ionization mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.* 2015; 21 (6): 594.e1-594.e5. doi: 10.1016/j.cmi.2015.01.017

29. Krifors A., Ozenci V., Ullberg M., et al. PCR with electrospray ionization-mass spectrometry on bronchoalveolar lavage for detection of invasive mold infections in hematological patients. PlosOne. 2019; 14 (2): e0212812. doi: 10.1371/journal.pone.0212812
30. Ozenci V., Patel R., Ullberg M., et al. Demise of polymerase chain reaction/electrospray ionization-mass spectrometry as an infectious diseases diagnostic tool. Clin. Infect. Dis. 2018; 66 (3): 452-5. doi: 10.1093/cid/cix743
31. Kobayashi M., Togitani K., Machida H., et al. Molecular polymerase chain reaction diagnosis of pulmonary mucormycosis caused by *Cunninghamella bertholletiae*. Respirology. 2004. 9 (3): 397-401. doi: 10.1111/j.1440-1843.2004.00582.x
32. Legrand M., Gits-Muselli M., Boutin L., et al. Detection of Circulating Mucorales DNA in Critically Ill Burn Patients: Preliminary Report of a Screening Strategy for Early Diagnosis and Treatment. Clin. Infect. Dis. 2016; 63 (10): 1312-1317. doi: 10.1093/cid/ciw563
33. CLSI. Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing; approved guideline. CLSI document MM18-A. - Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008; – 76 p.
34. Garcia-Hermoso D., Criscuolo A., Lee S.C., et al. Outbreak of Invasive Wound Mucormycosis in a Burn Unit Due to Multiple Strains of *Mucor circinelloides* f. *circinelloides* Resolved by Whole-Genome Sequencing. mBio. 2018; 9 (2): pii: e00573-18. doi: 10.1128/mBio.00573-18.
35. Etienne K.A., Gillece J., Hilsabeek R., et al. Whole genome sequence typing to investigate the *Apophysomyces* outbreak following a tornado in Joplin, Missouri, 2011. PlosOne. 2012; 7 (11): e49989. doi: 10.1371/journal.pone.0049989

Поступила в редакцию журнала 10.03.2020

Рецензент: Т.С. Богомолова

РОЛЬ ОППОРТУНИСТИЧЕСКИХ МИКОЗОВ В КОМПЛЕКСНОЙ КОМОРБИДНОСТИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Шкарин В.В. (профессор), Саперкин Н.В. (доцент)*

Приволжский исследовательский медицинский университет (кафедра эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины), Нижний Новгород, Россия

«Комплексная коморбидность» подразумевает сложное патологическое состояние человека, характеризующееся одновременным или последовательным сочетанием психосоматической и инфекционной патологии (т.е. комбинация одной или более инфекционных болезней в комплексе с одной и более единицами психосоматических нозологий).

Цель обзора – изучить, какой потенциал имеют сочетанные инфекции с микотическим компонентом в формировании комплексной коморбидности. Авторы продемонстрировали способность *Candida spp.*, *Cryptococcus spp.* и *Aspergillus spp.* участвовать в комплексной коморбидности не только у иммунокомпрометированных пациентов, но и у людей с нормальным состоянием иммунной системы. Несмотря на недостаточную изученность феномена сочетанности различных грибов с другими возбудителями, в литературе представлено немало ситуаций ассоциации грибов с бактериями, ЦМВ, ВИЧ, а также с другими микромицетами. Интерес представляет обнаружение микст-форм с возбудителями геогельминтозов. Можно говорить о небольшом уровне комплексной коморбидности с участием микозов по сравнению с вирусными и бактериальными. Возможно, это связано с небольшим числом работ по исследованию микозов как компонента сочетанной инфекции, неразвитой методологией и малым количеством данных о качестве имеющейся доказательной базы. Однако накопленные научные данные отражают клинко-эпидемиологический потенциал различных видов грибов к образованию комплексной коморбидности: дрожжеподобных грибов-сахаромицетов, базидиомицетов и аэробных плесневых грибов-аскомицетов. Если рассматривать сложные патогенетические связи грибов с микроорганизмами и паразитами через призму комплексной

коморбидности, у исследователей появляется возможность взглянуть на закономерности распространения, диагностику, этиотропное лечение и профилактику микозов несколько с иной точки зрения.

Ключевые слова: сочетанная инфекция, кандидоз, аспергиллез, криптококкоз, коморбидность

A ROLE OF OPPORTUNISTIC MYCOSES IN THE COMPLEX COMORBIDITY (LITERATURE REVIEW)

Shkarin V.V. (professor, academician), Saperkin N.V. (associate professor)

Privolzhskiy Research Medical University (Department of Epidemiology, Microbiology and Evidence-based Medicine), Nizhny Novgorod, Russia

The authors introduced a new term "complex comorbidity". They coined this term to refer to the complex pathological condition of a person, which is characterized by a simultaneous or sequential combination of psychosomatic and infectious pathologies (i.e., a combination of one or more infectious diseases in association with one or more units of psychosomatic nosologies).

*The purpose of this review was to study potential of co-infections with a mycotic component in the occurrence of the complex comorbidity. The authors demonstrated the ability of *Candida sp.*, *Cryptococcus sp.* and *Aspergillus sp.* to contribute to the complex comorbidity not only in immunocompromised patients, but also in people with a normal state of the immune system. Despite the insufficient studying a phenomenon of a combination of various fungi with other pathogens, scientific literature presents many situations of how fungi can be associated with bacteria, cytomegalovirus, HIV, as well as other micromycetes. Of interest was the discovery of mixed forms with pathogens of geohelminthiasis. We can talk about a small level of the complex comorbidity with participation of mycoses in comparison with viral and bacterial. This may be due to the small number of studies on mycoses as an explicit component of co-infection, an underdeveloped methodology, and a small amount of the synthesized evidence. However, the accumulated scientific data reflect a clinical and epidemiological potential of various species of fungi for the formation of the complex comorbidity: yeast-like saccharomycetes, basidiomycetes and aerobic ascomycetes. If we consider complex pathogenetic relationships between fungi and microorganisms and parasites with respect to the complex comorbidity, researchers are gained with the op-*

* Контактное лицо: Саперкин Николай Валентинович, e-mail: saperkinnv@mail.ru

portunity to look at patterns of morbidity distribution, diagnostic test accuracy, prognostication, etiotropic treatment and prevention of mycoses from a slightly different point of view.

Key words: mixed infection, candidosis, aspergillo-
sis, cryptococcosus, co-morbidity

ВВЕДЕНИЕ

Сочетанные инфекции неизменно остаются в фокусе повышенного внимания со стороны исследователей, что обусловлено рядом объективных причин. Этиопатогенетические особенности такой патологии, трудности лабораторной диагностики и дифференциального диагноза, необходимость обоснованной тактики лечения требуют настороженности со стороны врачей разного профиля. Возможность формирования комплексной коморбидности (КК), при которой существенно возрастает роль инфекционной и паразитарной патологии (в частности микозов), ставит дополнительные научно-практические вопросы в плане закономерностей формирования заболеваемости, изучения диагностической ценности лабораторно-инструментальных данных, а также прогнозирования течения заболевания в форме КК у пациентов разных групп. Более того, именно сочетанные инфекции и микозы приводят к появлению этого явления, при участии микроорганизмов различных родов и видов. В нашем понимании, КК есть сложное патологическое состояние человека, отличающееся одновременным или последовательным сочетанием психосоматической и инфекционной патологии (т.е. комбинация одной или более инфекционных болезней в комплексе с одной и более единицами психосоматических нозологий) [1]. Опортунистические микозы за последнее десятилетие стали важной проблемой здравоохранения как в нашей стране, так и за рубежом. При этом все больше становится публикаций, в которых отмечен рост сочетанности микозов, характеризующейся тяжестью клинических проявлений и неблагоприятным прогнозом [2-6].

Кандидоз – антропонозный микоз с высоким потенциалом КК – может выступать в виде суперинфекции, а также сочетанной патологии с многочисленными представителями условно-патогенной микробиоты. К настоящему моменту описана возможность *Candida* spp. к формированию сочетанной инфекции с некоторыми ви-

русами (в т.ч. ВИЧ), бактериями и в условиях биопленок. Микозы относят к числу наиболее часто регистрируемых заболеваний у людей, живущих с ВИЧ, как на ранних, так и на поздних стадиях [7, 8]. При кандидозе среди таких больных меняется эпидемиология вторичных заболеваний в зависимости от путей передачи и временного периода развития эпидемического процесса [9].

Иллюстрацией КК кандидозов могут быть следующие клинические ситуации. Отметим редкий случай сочетанной инфекции туберкулеза и легочного кандидоза у иммунокомпетентного пациента 22 лет [10]. Интересный случай КК в виде множественного глубокого поражения, вызванного *Candida albicans*, в сочетании с туберкулезным спондилитом был выявлен у раннее здорового молодого человека 19 лет [11]. Необычный вариант КК в виде кандидоза пищевода описан у ВИЧ-инфицированного пациента с репликацией вируса ниже детектируемого уровня, без приема антиретровирусных средств, с наличием гепатита С и компенсированного цирроза печени [12]. В литературе представлен случай КК с летальным исходом у мужчины 22 лет: ассоциированный с цитомегаловирусной инфекцией (ЦМВ) на фоне ВИЧ-инфекции и осложненный кандидозным сепсисом [2].

Имеются данные о распространенности кандид на низком уровне у больных с эндоцервицитом хламидийного генеза. При этом сочетанная инфекция с *C. albicans* была обнаружена в 9,2% случаев и в существенно меньшем количестве – *Candida tropicalis* (0,2%) [13].

Повышение частоты сочетанных инфекций *Helicobacter pylori* + *C. albicans*, по данным некоторых авторов, может зависеть от возраста (пожилые люди), пола, а также приема ингибиторов протонной помпы [13].

Сочетанные формы инфекции кровотока, когда одним из компонентов был *C. albicans*, а другими – коагулазонегативные стафилококки, энтерококки и клебсиеллы, наблюдали в 14% случаев, зарегистрированных в течение 16-летнего периода. Подобные микст-формы инфекции отличались увеличением длительности заболевания и трехкратным повышением летальности за счет осложнения КК [14]. У детей с паразитозами при дисбиозе 3-ей степени и сопутствующими изменениями местного иммунитета обнаружено сочетание двух микроорганизмов в 32,2% случаев от общего числа больных, а

сочетание трех возбудителей – у 25% пациентов (напр., *Proteus* spp. + *Staphylococcus aureus* + *Candida* spp., а также *Candida* spp. + *S. aureus* + *Pseudomonas aeruginosa*) [15].

В работе по стафилококковым инфекциям кровотока у пациентов с кандидемией выявлено 110 случаев (5,3%) сочетанных форм. При этом связь MRSA с кандидами (предшествующей или обнаруженной одновременно) отмечена в 60,9 и 20% случаев соответственно. В динамике наблюдали снижение заболеваемости с 1,12 до 0,53⁰/₀₀₀₀ [16].

Описан сочетанный характер инфекционного процесса при рефрактерном периодонтите и некрозе пульпы, когда в колонизации полости рта одновременно принимали участие два оппортунистических патогена – *C. albicans* и *Fusobacterium nucleatum* [12].

Обнаружен выраженный антагонизм между энтерококками и кандидами, что проявляется в подавлении последних на фоне нормальной или повышенной концентрации *Enterococcus* spp. на уровне биотопа. Антикандидозный эффект энтерококков в большей степени обусловлен ингибированием адгезии кандид на вагинальном эпителии, что может приводить к ускоренной элиминации *Candida* spp. из вагинальной полости [17].

В условиях полимикробных биопленок стафилококки способны прочно прикрепляться к гифам *C. albicans*, понижая чувствительность к антибиотикам. Это обстоятельство утяжеляет клиническое течение, способствует распространению инфекции и, в целом, является важным механизмом формирования КК [18].

Аспергиллез способен протекать с преимущественным поражением легких и представляет серьезную угрозу для лиц с иммунодефицитами. В последние годы отмечено увеличение частоты инвазивного аспергиллеза у больных без типичных факторов риска, особенно в отделениях реанимации и интенсивной терапии. К примерам КК аспергиллеза можно отнести документированный случай у пациента с хронической obstructивной болезнью легких, респираторным дистресс-синдромом, острой почечной недостаточностью, ожогами, тяжелой бактериальной инфекцией на фоне лечения антибиотиками широкого спектра действия, а также сочетанной инфекции у пациентов, страдающих хроническими синуситами и отитами [18-21].

Особый клинико-эпидемиологический интерес представляет сочетание *Aspergillus* spp. с вирусами, отличными от ВИЧ: в частности, развитие инвазивного легочного аспергиллеза на фоне гриппа (A/H1N1) с различными осложнениями, при этом КК обуславливала значительную летальность (47%) [22].

Описан случай пневмонии в Турции после трансплантации сердца на фоне иммуносупрессивной терапии ввиду сочетанной инфекции аспергилла с ЦМВ [23]. ЦМВ-инфекция, возникающая у людей после пересадки почки, может быть предрасполагающим фактором присоединения грибковой или бактериальной инфекции. Известен случай КК инвазивного легочного аспергиллеза и ЦМВ-пневмонита, возникший у реципиента почки, мужчины 68 лет, в Китае [24].

Тяжелое течение геморрагической лихорадки у пациента 40 лет, госпитализированного в отделение реанимации в Китае, осложнилось сочетанной инфекцией, обусловленной MRSA, *Acinetobacter baumannii*, аспергиллом и представителями порядка *Mucor* [25].

Интерес представляет случай инвазивного аспергиллеза как проявление суперинфекции на фоне тяжелой стафилококковой пневмонии, обусловленной MSSA. Условия труда пациентки способствовали попаданию избыточного количества спор грибов в дыхательные пути, имело место повторное заражение новым возбудителем аспергиллом в условиях незавершенного инфекционного процесса, вызванного другим микроорганизмом [19].

По данным ряда авторов, аспергиллез легких был диагностирован у 19,2% больных туберкулезом легких [26]. Предполагают, что аскаридоз может быть фактором риска развития аспергиллеза легких у больных туберкулезом. Случай сочетанной инфекции ЦНС, вызванной аспергиллом и *Mycobacterium tuberculosis*, был установлен в Турции у женщины, которая перенесла пересадку почки. Это заболевание можно расценивать как КК, которое закончилось летальным исходом [27].

В литературе представлен случай КК сочетанной бактериально-грибковой инфекции *Nocardia* spp. + *Aspergillus* spp. у пациента со стероид-зависимым язвенным колитом на фоне иммуносупрессивного лечения [28]. Вариант КК – пневмония *Aspergillus flavus* + *Nocardia* spp. – описан в Индии у больного с ювенильным рев-

матоидным артритом в форме болезни Стилла, который получал высокие дозы пероральных кортикостероидов [29]. Необычный случай сочетанной инфекции – *Legionella pneumophila* серогруппа 8 + *Aspergillus fumigatus* – выявлен во Франции у пациента реанимационного отделения. Было установлено одновременное развитие легионеллезной пневмонии и аспергиллезного абсцесса легких, закончившиеся летальным исходом [30].

Способность аспергилла колонизировать эхинококковую цисту (аспергиллема) отмечена у иммунокомпрометированных пациентов. В то же время наблюдали редкий случай такой сочетанной инфекции (легочный эхинококкоз и аспергиллез) в Гане у женщины 60 лет с нормальной функцией иммунной системы [31]. В систематическом обзоре приведены доказательства в отношении 22 подтвержденных случаев микстинфекции *Aspergillus niger* + *Echinococcus granulosus*, выявленных с 1995 по 2014 год [32]. В Китае описан случай сочетанной инфекции *Aspergillus* spp. и *Strongyloides stercoralis* как диссеминированная форма паразитоза у пожилого пациента с аутоиммунным панкреатитом в анамнезе [33].

Редкий случай КК, сформированной *Mucor* spp. + *A. fumigatus*, был обнаружен у больного с иммуносупрессией и сахарным диабетом 2 типа [34]. Похожая ситуация сочетанной формы инвазивного аспергиллеза выявлена у женщины в Индии, при этом наблюдали лишь минимальные изменения со стороны легких [35]. В той же стране описан аналогичный случай КК в виде двустороннего паралича голосовых связок, внебольничной пневмонии и сахарного диабета [36]. Еще один подобный случай зафиксирован

у пациента, проходившего курс химиотерапии по поводу острого миелолейкоза. Авторы подчеркивают важность своевременной диагностики подобных состояний у больных гематологического профиля [37].

Продемонстрирована КК, обусловленная легочным аспергиллезом (*A. niger*) и диссеминированным мукормикозом (*Rhizomucor pusillus*): «негематологический» иммунокомпетентный пациент 17 лет [38]. Сочетанность *A. flavus* и *Rhizopus arrhizus* также может приводить к патологии ЛОР-органов. Зарегистрирован случай острого риносинусита тяжелого течения с поражением глазницы и явлениями очагового менингита у мужчины 68 лет [39].

В литературе описана сочетанная грибковая форма склерокератита, вызванная двумя грибами из разных семейств – *Scedosporium apiospermum* и *Aspergillus cibarius*, что указывает на этиологическое значение последнего возбудителя в патологии человека [40].

Согласно имеющимся данным, показана способность *Aspergillus* spp. участвовать в КК не только у иммунокомпрометированных пациентов, но и у людей с нормальным состоянием иммунной системы. Несмотря на недостаточную изученность феномена сочетанности этого гриба с другими возбудителями, в литературе представлено немало ситуаций ассоциации *Aspergillus* spp. с бактериями, вирусами (ЦМВ, ВИЧ), а также с аскомицетами, мукоромицетами и др. (Рис.). Кроме того, интерес представляет обнаружение микст-форм, образованных *Aspergillus* spp. и возбудителями геогельминтозов (круглые и ленточные черви).

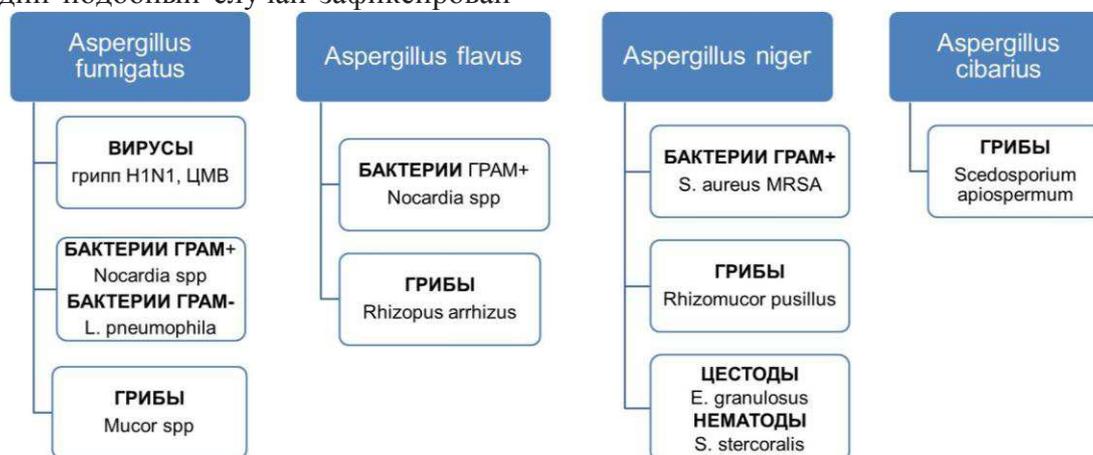


Рис. Потенциал комплексной коморбидности аспергиллезов.

Криптококкоз относят к микозам с аэрогенным механизмом передачи возбудителя. Все большее внимание ученых привлекает *Cryptococcus gattii*, который может вызывать инфекционный процесс у иммунокомпетентных людей, а также становится компонентом КК [41].

Важнейшим фактором риска является ВИЧ-инфекция. Начиная с 80-х гг. XX века, в мире отмечен рост числа заболеваний криптококкозом у лиц, живущих с ВИЧ. На их долю приходится 3-6% пациентов в европейских странах и 7-8% – в США [42, 43]. В настоящее время криптококкоз входит в число трех наиболее опасных для жизни оппортунистических инфекций у больных СПИДом [44-46].

У людей, живущих с ВИЧ, в отсутствии антиретровирусной терапии частота заболевания криптококкозом может достигать 30% [21, 47, 48]. Особенность заболевания – тяжесть клинических проявлений и очень высокая летальность. При криптококковом менингоэнцефалите у ВИЧ-инфицированных нелеченных пациентов она достигает 12%, а в странах Африки – 75-90% [2, 43]. По оценке международной благотворительной ассоциации AVERT, ежегодно от криптококковой инфекции умирает около 500 тыс. человек [47].

Исследованию сочетанности криптококкоза и ВИЧ-инфекции пока посвящено относительно немного публикаций. Показано, что диссеминированный криптококкоз у ВИЧ-инфицированных пациентов наблюдается при резко выраженном иммунодефиците с манифестным поражением ЦНС и других внутренних органов, характеризуется тяжелым прогрессирующим течением. Наличие легочной сочетанной инфекции подтверждено у больного с диагнозом «СПИД» в Китае путем выделения из бронхоальвеолярного лаважа *Cryptococcus neoformans* и *Pneumocystis jiroveci* [49].

Имеются сведения о восьми зарегистрированных во Вьетнаме случаях криптококкоза, сочетающегося с *Penicillium marneffeii*, у людей 23-29 лет, живущих с ВИЧ. Отметим, что указанные патогены считают одними из ведущих возбудителей оппортунистических инфекций у ВИЧ-инфицированных лиц в Юго-Восточной Азии, занимая после туберкулеза второе и третье ранговые места соответственно [50].

Необходимо подчеркнуть, что криптококки вызывают сочетанные инфекции не только при

ВИЧ-инфекции. Показательный случай КК описан у больного с ожоговым сепсисом, когда легочный криптококкоз сочетался с *Mycobacterium leprae* [51] на эндемичной по лепре территории в северной Австралии. В литературе описаны еще три аналогичных случая сочетанности криптококкоза с инфекцией *M. leprae*: в Бразилии и Японии [52, 53]. Сочетание *C. neoformans* и *M. tuberculosis* отмечают в редких случаях, когда их объединяет наличие иммуносупрессивных состояний, создающих реальный риск возникновения сочетанной инфекции с последующим формированием КК.

Безусловно, важна современная комплексная диагностика криптококкоза, в особенности, у людей, живущих с ВИЧ. Высказывается необходимость обязательного микологического исследования, обнаружения криптококкового антигена в ликворе и другом патологическом материале, в зависимости от локализации очага поражения, а также в новых тест-системах для иммунохроматографического анализа [54-56].

Немногочисленные научные факты, полученные в разных странах, позволяют допускать участие криптококков в формировании КК. Сочетанная инфекция, при которой оба компонента представлены грибами, может иметь в клинико-эпидемиологическом отношении особую важность для ВИЧ-инфицированных лиц. В то же время не всегда фактором риска развития криптококковой микст-инфекции становится наличие у человека явных признаков иммунодефицита, что требует дополнительного изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, по сравнению с вирусами и бактериями (включая оппортунистические), можно говорить о довольно «скромном» уровне КК с участием микромицетов. Этот факт, во многом, связан с небольшим числом работ по исследованию микозов как компонента сочетанной инфекции. Вместе с тем, имеющиеся научные данные отражают клинико-эпидемиологический потенциал к образованию КК у различных видов грибов: дрожжеподобных грибов-сахаромицетов и базидиомицетов, аэробных плесневых грибов-аскомицетов и мукромицетов. Кроме того, рассматривая сложные патогенетические связи грибов с микроорганизмами и паразитами через призму КК, у нас

появляется возможность несколько с иной точки зрения взглянуть на закономерности распро-

странения, диагностику, этиотропное лечение и профилактику микозов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шкарин В.В., Благодравова А.С. Эпидемиологические особенности сочетанных инфекций: монография. Н.Новгород; Изд-во НижГМА, 2017. – 396 с. [Shkarin V.V., Blagodarova A.S. Epidemiological features of combined infections: monografia. N. Novgorod; publishing house of Nizhny Novgorod state medical Academy, 2017. – 396 p. (In Russ)].
2. Юрасов В.В., Филатов А.И., Филиппенкова Е.И. Случай диагностики грибкового сепсиса и цитомегаловирусной инфекции на фоне ВИЧ-инфекции в судебно-медицинской практике. Проблемы экспертизы в медицине. 2012; 124: 53-54. [Yurasov V.V., Filatov A.I., Filippenkova E.I. Case of diagnosis of fungal sepsis and cytomegalovirus infection against the background of HIV-infection in forensic medical practice. Problems of Expertise in Medicine. 2012; 124: 53-54 (In Russ)].
3. Arvantitis M., Mylonakis E. Characteristics, clinical relevance, and the role of echinocandins in fungal-bacterial interactions. Clin. Infect. Dis. 2015; 61: 630-634. doi.org/10.1093/cid/civ816
4. Barbedo L.S., Vaz C., Pais C., et al. Different scenarios for *Candida parapsilosis* fungaemia reveal high numbers of mixed *C. parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* infections. J. Med. Microbiology. 2015; 64: 7-17. doi.org/10.1099/jmm.0.080655-0
5. Tati S., Davidow P., McCall A., et al. *Candida glabrata* binding to *Candida albicans* hyphae enables its development in oropharyngeal candidiasis. PLoS Pathogens. 2016; 2 (3): e1005522. doi.org/10.1371/journal.ppat.1005522
6. Безшапочный С.Б., Зачепило С.В., Полянская В.П. и др. Оппортунистические микозы ЛОР-органов. Сообщение 1. Вестник оториноларингологии. 2018; 83 (6): 67-71. [Bezshapochnyi S.B., Zachepilo S.V., Polyanskaya V.P., etc. Opportunistic fungal infections of ENT-organs. Message 1. Bulletin of Otorhinolaryngology. 2018; 83 (6): 67-71 (In Russ)].
7. Макарова Н.Ю., Кравченко А.В., Юрин О.Г. и др. Особенности этиологии грибковых инфекций у больных ВИЧ-инфекцией и лекарственная устойчивость выявленных грибковых патогенов к флуконазолу. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2003; 2: 33-35. [Makarova N.Yu., Kravchenko A.V., Yurin O.G., etc. Features of the etiology of fungal infections in patients with HIV-infection and drug resistance of identified fungal pathogens to fluconazole. Epidemiology and Infectious Diseases. 2003; 2: 33-35 (In Russ)].
8. Takahashi Y., Nagata N., Shimbo T., et al. Long-term trends in esophageal candidiasis prevalence and associated risk factors with or without HIV infection: lessons from an endoscopic study of 80,219 patients. PLoS One. 2015; 10: e0133589. doi.org/10.1371/journal.pone.0133589
9. Фазулзянова И.М. Характеристика периодов развития эпидемического процесса ВИЧ-инфекции в Республике Татарстан. Общественное здоровье и здравоохранение. 2007; 3: 66-68. [Fazulzyanova I.M. Characteristics of the periods of development of the epidemic process of HIV-infection in the Republic of Tatarstan. Public Health and Healthcare. 2007; 3: 66-68 (In Russ)].
10. Fontalvo D.M., Borré G., Camargo D.G., et al. Tuberculosis and pulmonary candidiasis co-infection present in a previously healthy patient. Colomb. Med. (Cali). 2016; 47 (2): 105-108. doi.org/10.25100/cm.v47i2.2271
11. Chen X.-H., Gao Y., Zhang Y., et al. Tuberculosis infection might increase the risk of invasive candidiasis in an immunocompetent patient. Revista do Instituto de medicina tropical de Sao Paulo. 2015; 57; 273-275. doi.org/10.1590/S0036-46652015000300016
12. Wu T., Cen L., Kaplan C., et al. Cellular components mediating coadherence of *Candida albicans* and *Fusobacterium nucleatum*. J. Dent. Res. 2015; 94: 1432-1438. doi.org/10.1177/0022034515593706
13. Massarrat S., Saniee P., Siavoshi F., et al. The effect of *Helicobacter pylori* infection, aging, and consumption of proton pump inhibitor on fungal colonization in the stomach of dyspeptic patients. Frontiers in Microbiology. 2016; 7: 801. doi.org/10.3389/fmicb.2016.00801
14. Pammi M., Zhong D., Johnson Y. Polymicrobial bloodstream infections in the neonatal intensive care unit are associated with increased mortality. BMC Infectious Diseases. 2014; 14: 90. doi.org/10.1186/1471-2334-14-390

15. Гурбанова Э.В. Микробиоценоз кишечника и особенности иммунного ответа у детей, больных паразитозами. *Детские инфекции*. 2010; 2: 34-37. [Gurbanova E.V. Intestinal microbiocenosis and features of the immune response in children with parasitosis. *Childhood Infections*. 2010; 2: 34-37 (In Russ)].
16. Reno J., Doshi S., Tunali A.K., et al. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* blood-stream coinfection among adults with candidemia in Atlanta, GA, 2008-2012. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 2015; 36 (11): 1298-1304. doi.org/10.1017/ice.2015.185
17. Александрова Н.А., Заславская М.И., Вахромова М.В. Антагонистические взаимоотношения энтерококков с кандидами на уровне вагинального биотопа и в эксперименте *in vitro*. *Медицинский альманах*. 2016; 5: 91-94. [Alexandrova N.A., Zaslavskaya M.I., Vakhromova M.V. Antagonistic relationships of enterococci with *Candida* at the level of the vaginal biotope and in an *in vitro* experiment. *Medical Almanac*. 2016; 5: 91-94 (In Russ)].
18. Scheres N., Krom B.P. Staphylococcus-Candida interaction models: antibiotic resistance testing and host interactions. *Methods in Mol Biol.* 2016; 1356: 153-161. doi.org/10.1007/978-1-4939-3052-4_11
19. Медицинская микология: руководство для врачей / Под ред. В.Б. Сбойчакова М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 208 с. [Medical Mycology: a guide for doctors / edited By V.B. Sboychakov M.: GEOTAR-Media, 2008. – 208 p. (In Russ)].
20. Ежов А.В., Шутова Н.Ю., Хусаинова Л.Ф. Инвазивный аспергиллез как проявление суперинфекции на фоне тяжелой стафилококковой пневмонии. *Клиницист*. 2012; 2: 59-63. [Ezhov A.V., Shutova N.Yu., Khusainova L.F. Invasive aspergillosis as a manifestation of superinfection against the background of severe staphylococcal pneumonia. *Klinicist*. 2012; 2: 59-63 (In Russ)].
21. Enoki E., Maenishi O., Chikugo T., et al. Coinfection of *Aspergillus* and *Cryptococcus* in post-tuberculosis pulmonary cavity. *Pathol. Int.* 2012; 62 (8): 574-576. doi.org/10.1111/j.1440-1827.2012.02839.x
22. Alshabani K., Haq A., Miyakawa R., et al. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with influenza infection: report of two cases and systematic review of the literature. *Expert Review of Respiratory Medicine*. 2015; 9 (1): 89-96. doi.org/10.1586/17476348.2015.996132
23. Tigen E., Tigen K., Karaahmet T., et al. Concomitant *Aspergillus* and *Cytomegalovirus* infection in heart transplant: early diagnosis is the key to successful treatment. *Exp. Clin. Transplantation*. 2009; 7 (3): 168-172. PMID: 19715527
24. Siu Y.-P., Leung K.-T., Tong M., et al. Fatal case of *Aspergillus* coinfection in a renal transplant recipient suffering from cytomegalovirus pneumonitis. *Nephrology*. 2005; 10 (6): 619-622. doi.org/10.1111/j.1440-1797.2005.00459.x
25. Zhang D., Wang X., Lu J., et al. Treatment of a patient with severe hemorrhagic fever accompanied by infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, aspergillus and mucor: a case report. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 2015; 53 (12): 1028-1034. doi.org/10.5414/CP202395
26. Давис Н.А., Бектимиров А.М., Бадалова Н.С. Кишечные паразиты у больных туберкулезом: влияние на интерлейкиновый статус и развитие аспергиллеза легких. *Мед. паразитология и паразитарные болезни*. 2016; 1: 29-33. [Davis N.A. Bektemirov A.M., Badalova N.S. Intestinal parasites in tuberculosis patients: impact on interleukines status and the development of pulmonary aspergillosis. *Medical Parasitology and Parasitic Diseases*. 2016; 1: 29-33 (In Russ)].
27. Petramfar P., Yousefian M., Ashraf M.H., et al. Meningoencephalitis with *Aspergillus* and mycobacterium tuberculosis in a renal transplant recipient. *Exp. Clin. Transplantation*. 2011; 9 (1): 68-71. PMID: 21605027
28. Alonso-Sierra M., Calvo M., Gonzalez-Lama Y. Nocardia and *Aspergillus* coinfection in a patient with ulcerative colitis during golimumab therapy. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2016; 10 (9): 1127-1128. doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw064
29. Misra D.P., Parida J.R., Chowdhury A.C., et al. Pulmonary co-infection with *Nocardia* and *Aspergillus* in a patient with adult-onset Still's disease receiving steroids and tacrolimus. *Case Reports*. 2014; 14 (1): bcr2014207335-bcr2014207335. doi.org/10.1136/bcr-2014-207335
30. Guillouzouic A., Bemmer P., Gay-Andrieu F., et al. Fatal coinfection with *Legionella pneumophila* serogroup 8 and *Aspergillus fumigatus*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 60 (2): 193-195. doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.09.005
31. Pandey P., Dixit A. K., Tanwar A. Pulmonary echinococcal cyst with a filamentous fungus co-infection. *Ghana Medical J.* 2013; 47 (3): 148-152. PMID: 24391230 PMID: PMC3875279

32. Aliyali M., Badali H., Shokohi T., et al. Coinfection of pulmonary hydatid cyst and aspergilloma: case report and systematic review. *Mycopathologia*. 2016; 181 (3-4): 255-265. doi.org/10.1007/s11046-015-9974-2
33. Jie Guo, Yi Sun, Yanru Man, et al. Coinfection of *Strongyloides stercoralis* and *Aspergillus* found in bronchoalveolar lavage fluid from a patient with stubborn pulmonary symptoms. *J. Thorac. Disease*. 2015; 7 (3): E43-6. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2014.10.26
34. Torres-Damas W., Yumpo-Cardenas D., Mota-Anaya I. Coinfection of rhinocerebral mucormycosis and sinus aspergillosis. *Revista peruana de medicina experimental y salud publica*. 2015; 32 (4): 813-817. doi.org/10.17843/rpmesp.2015.324.1777
35. Gupta V., Rajagopalan N., Patil M., et al. *Aspergillus* and mucormycosis presenting with normal chest X-ray in an immunocompromised host. *BMJ Case Reports*. 2014: bcr2014204022-bcr2014204022. doi.org/10.1136/bcr-2014-204022
36. Mahadevaiah A.H., Rajagopalan N., Patil M. Coinfection of pulmonary mucormycosis and aspergillosis presenting as bilateral vocal cord palsy. *BMJ Case Reports*. 2013: bcr2013009615-bcr2013009615. doi.org/10.1136/bcr-2013-009615
37. Bergantim R., Rios E., Trigo F., et al. Invasive coinfection with *Aspergillus* and *Mucor* in a patient with acute myeloid leukemia. *Clinical Drug Investigation*. 2013;33: S51-55. doi.org/10.1007/s40261-012-0022-4
38. Pozo-Laderas J.C., Pontes-Moreno A., Robles-Arista J.C., et al. Infeccion fungica invasiva mixta por *Rhizomucor pusillus* y *Aspergillus niger* en un paciente inmunocompetente. *Revista Iberoamericana de Micologia*. 2015; 32 (1): 46-50. doi.org/10.1016/j.riam.2013.03.002
39. Vaidya D., Shah P. Coinfection by *Aspergillus* and *Zygomycetes* species in a case of acute rhinosinusitis. *Case Reports in Otolaryngology*. 2011; 2: 1-5. doi.org/10.1155/2011/382473
40. Hayashi Y., Eguchi H., Toibana T., et al. Polymicrobial sclerokeratitis caused by *Scedosporium apiospermum* and *Aspergillus cibarius*. *Cornea*. 2013; 33 (8): 875-877. doi.org/10.1097/ICO.000000000000172
41. Hagen F. Autochthonous and dormant *Cryptococcus gattii* infections in Europe. *Emerg. Infect. Dis*. 2012; 18: 1618-1624. doi.org/10.3201/eid1810.120068
42. Елинов Н.П., Босак И.А. Прошлое и настоящее *Cryptococcus neoformans* как объекта изучения потенциально грозного патогена для человека. *Проблемы медицинской микологии*. 2006; 8 (4): 47-51. [Yelinov N.P., Bosak I.A. Past and present of *Cryptococcus neoformans* as an object of study of a potentially dangerous pathogen for humans. *Problems in Medical Mycology*. 2006; 8 (4): 47-51 (In Russ)].
43. Чарушина И.П., Воробьева Н.Н., Ляпустин С.Б. Диагностика и лечение криптококкового менигоэнцефалита у ВИЧ-инфицированных пациентов. *Лечение и профилактика*. 2013; 4 (8): 58-61. [Charushina I.P., Vorobyova N.N., Lyapustin S.B. Diagnosis and treatment of cryptococcal meningoencephalitis in HIV-infected patients. *Treatment and Prevention*. 2013; 4 (8): 58-61 (In Russ)].
44. Viviani M. A., Cogliati M., Esposto M.C., et al. Molecular analysis of 311 *Cryptococcus neoformans* isolates from a 30-month ECMM survey of cryptococcosis in Europe. *FEMS Yeast Res*. 2006; 6 (4): 614-619. doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00081.x
45. Филиппова Л.В., Фролова Е.В. *Cryptococcus neoformans* и врожденный иммунитет. *Проблемы медицинской микологии*. 2011; 13 (2): 10-12. [Filippova L.V., Frolova E.V. *Cryptococcus neoformans* and innate immunity. *Problems in Medical Mycology*. 2011; 13 (2): 10-12 (In Russ)].
46. Rajasingham R., Smith R.M., Park B.J., et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect. Dis*. 2017; 17(8):873-881. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30243-8
47. Senior K. Do we need to pay more attention to cryptococci? *NEWSDESK*. 2010; 10 (8): 516-517. doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70151-1
48. Nielsen K., Cox G.M., Litvintseva A.P., et al. *Cryptococcus neoformans* {alpha} strains preferentially disseminate to the central nervous system during coinfection. *Infect. Immun*. 2005; 73 (8): 4922-4933. Doi: 10.1128/IAI.73.8.4922-4933.2005
49. Bava Javier, Lloveras Susana, Garro Santiago, and Troncoso Alcides. Pulmonary coinfection by *Pneumocystis jiroveci* and *Cryptococcus neoformans*. *Asia Pac. J. Tropical. Biomed*. 2012; 2 (1): 80-82. doi: 10.1016/S2221-1691(11)60195-0
50. Le T., Hong Chau T.T., Kim Cuc N.T., et al. AIDS-associated *Cryptococcus neoformans* and *Penicillium marneffeii* coinfection: a therapeutic dilemma in resource-limited settings. *Clin. Infect. Dis*. 2010; 51(9):e65-8. doi: 10.1086/656685.

51. *Edwards L.J., Price R.N., Krause V.L., et al.* Detection of *Mycobacterium leprae* by PCR testing of sputa from a patient with pulmonary cryptococcus coinfection in Northern Australia. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(10): 3811-3812. doi: 10.1128/JCM.01060-14
52. *Furuta M., Obara A., Harada N., et al.* *Cryptococcus neoformans* can be misidentified as a microsporidian: studies of lung lesions in leprosy patients. *J. Protozool.* 1991; 38 (6): 95S-96S. PMID: 1818223
53. *Azulay R.D., Mendonca I.R., Santos C.M., et al.* Cutaneous cryptococcosis associated with lepromatous leprosy. *Int. J. Dermatol.* 2001; 40 (6): 412-4. doi: 10.1046/j.1365-4362.2001.01246-5.x
54. *Чарушина И.П., Зотова Н.В.* Клинико-морфологическая характеристика криптококкоза при ВИЧ-инфекции. *Журнал инфектологии.* 2012; 4: 65-70. [Charushina I.P., Zotova N.V. Clinical and morphological characteristics of cryptococcosis in HIV-infection. *Journal of Infectology.* 2012; 4: 65-70 (In Russ)].
55. *Rajasingham R., Wake R.M., Beyene T., et al.* Cryptococcal meningitis diagnostics and screening in the era of point-of-care laboratory testing. *J. Clin. Microbiol.* 2019; 57 (1): pii: e01238-18. doi: 10.1128/JCM.01238-18.
56. *Guidelines on the diagnosis, prevention and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children: supplement to the 2016 consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection / Geneva: World Health Organization; 2018. – 64 p. ISBN 978-92-4-155027-7.*

Поступила в редакцию журнала 27.12.2019

Рецензент: Н.Н. Климко

КОММУНИКАТИВНЫЙ МЕТОД ПРОФИЛАКТИКИ НОЦЕБО-ЭФФЕКТА ПРИ НАЗНАЧЕНИИ АНТИФУНГАЛЬНЫХ СРЕДСТВ

Шевякова А.М. (конфликтолог)*, Шевяков М.А. (профессор кафедры)

¹Некоммерческое партнерство «Лига медиаторов»;
²Северо-западный государственный медицинский университет имени И.И.Мечникова (кафедра клинической микологии, аллергологии и иммунологии), Санкт-Петербург, Россия

Ноцебо-эффект представляет собой актуальную проблему клинической медицины, т.к. может существенно снизить приверженность к лечению и приводить к конфликту в системе «врач-пациент» при назначении антифунгальных средств. Предрасположенность к ноцебо-эффекту зависит от определенных черт характера пациента, его ожиданий и высказываний лечащего врача. Коммуникативный метод профилактики ноцебо-эффекта включает такие рекомендации, как устранение исключительности, обезличивание высказывания, экстернализация высказывания, уточнение вероятности, оценка стоимости лечения, использование позитивных форм высказывания, рекомендации по профилактике тревожности и формирование позитивных ожиданий. В статье приведены примеры нецелесообразных и корректных высказываний врача.

Ключевые слова: ноцебо, антифунгальные средства, коммуникативный метод, конфликт

COMMUNICATIVE METHOD OF THE NOCEBO EFFECT PREVENTION WHEN PRESCRIBING ANTIFUNGAL AGENTS

Shevyakova A.M. (conflictologist),
Shevyakov M.A. (professor of the
department)

* Контактное лицо: Шевякова Ангелина Михайловна,
e-mail: angel-shev@mail.ru

¹Non-commercial partnership "League of mediators";
²North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov (Department of Clinical Mycology, Allergology and Immunology), St. Petersburg, Russia

The nocebo effect is an urgent problem in clinical medicine, since it can significantly reduce adherence to treatment and lead to conflict in the "physician-patient" system when prescribing antifungal agents. Predisposition to the nocebo effect depends on certain traits of the patient's character, his expectations and statements of the attending physician. The communicative method of preventing the nocebo effect includes recommendations such as eliminating exclusivity, depersonalizing the statement, externalizing the statement, clarifying the probability, estimating the cost of treatment, using positive forms of the statement, recommendations for the prevention of anxiety, and forming positive expectations. The article provides examples of inappropriate and correct statements of a physician.

Key words: nocebo, antifungal agents, communicative method, conflict

Согласно одному из определений термин «ноцебо» означает неактивное вещество или неэффективную процедуру, оказывающую неспецифический негативный эффект на пациента. Этот термин был введен как антитеза плацебо и описывал аналогичный механизм с противоположным действием. Термин «эффект ноцебо» охватывает появление новых и развитие имеющихся симптомов, вызванных отрицательными ожиданиями со стороны пациента и/или отрицательными вербальными и невербальными сообщениями со стороны лечащего врача [1]. Ноцебо-эффект может привести к снижению приверженности к лечению и конфликту в системе «врач-пациент».

Согласно Федеральному закону от 21.11.2011 №323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации», врач обязан полноценно и доступно информировать своего пациента, в том числе относительно возможного побочного действия лекарства и взаимодействия с другими лекарственными препаратами [2].

Однако у части пациентов такая информация провоцирует появление жалоб на непереносимость лекарственного средства, которые обусловлены негативными и эмоциональными ожиданиями больного, а не реальными клинико-морфологическими изменениями в его организ-

ме: иными словами, запускает реализацию ноцебо-эффекта.

Все современные антимикотики имеют в «инструкции по применению лекарственного препарата для медицинского применения» определенный перечень возможного побочного действия. Таким образом, в практике клинического миколога имеет место ситуация, в которой обязанность информировать пациента о возможных побочных эффектах одновременно является фактором ухудшения его состояния, потенциального отказа от лечения и, как следствие, возникновения конфликта. В этой связи проблема профилактики ноцебо-эффекта актуальна в практике клинического миколога.

В данной статье предпринята попытка разработки коммуникативного метода профилактики ноцебо-эффекта при назначении антифунгальных средств. С учетом этической и юридической значимости полноценного информирования пациента и, как следствие, невозможности пренебречь данной обязанностью, перед врачом становится задача подбора формулировок, снижающих вероятность наступления ноцебо-эффекта.

В систематическом обзоре 2020 г. отмечено, что некоторые пациенты, в зависимости от индивидуальных черт характера, могут быть более склонны к плацебо- и ноцебо-эффекту на врачебные высказывания. Контент-анализ различных исследований не позволяет однозначно утверждать о влиянии на ноцебо-эффект таких характеристик личности, как открытость к новому опыту (*openness to experience*), нейротизм (*neuroticism*), экстраверсия (*extraversion*), конформность (*agreeableness*) и добросовестность (*conscientiousness*). Однако несколько исследователей обнаружили положительную связь между оптимизмом и реакцией в виде плацебо-ответа. Напротив, пессимизм, а также повышенная тревожность были связаны со склонностью к реакции в виде ноцебо [3].

Согласно другому исследованию [4], условиями возникновения эффекта ноцебо являются: уверенность в определенном исходе воздействия; активность ожидания результата (предвкушение); сила эмоции, способствующей процессу (в случае плацебо это сила мотивации, в случае ноцебо – страха).

Также представляют практический интерес результаты исследования Университетской клиники Гамбург-Эппендорф, согласно которым

установлена связь между силой ноцебо-эффекта и оценкой стоимости препарата. Эксперимент проводили с двумя группами, одна из которых принимала «дорогой», а другая – «дешевый» препарат, хотя оба были идентичны по составу и не содержали активных компонентов. В процессе эксперимента авторы проводили магнитно-резонансную томографию головного и спинного мозга пациентов. В результате участники из группы, получавшие «дорогой» препарат, активнее жаловались на побочный эффект (боль), а результаты томографии позволили установить, что в головном мозге с эффектом ноцебо связаны передняя поясная кора (rACC) и центральное серое вещество (PAG). Авторы исследования сделали вывод, что ось «rACC-PAG-спинной мозг» управляет влиянием цены на повышенную болевую чувствительность. Модуляция связей вдоль этой оси представляет собой гибкий механизм, посредством чего когнитивные представления, такие как стоимость, взаимодействуют с нисходящим болевым путём [5].

Обобщив результаты этих разносторонних исследований, мы полагаем, что вероятность наступления побочного эффекта у пациента, принимающего антифунгальные препараты, выше, если он:

- 1) склонен к пессимизму;
- 2) испытывает повышенную тревожность, страх;
- 3) уверен в проявлении побочного эффекта;
- 4) эмоционально предвкушает негативные последствия;
- 5) оценивает назначенный препарат как сравнительно дорогой.

Основываясь на перечисленных факторах, представляется возможным предложить ряд рекомендаций к построению высказываний врача при информировании пациента, снижающих вероятность возникновения ноцебо-эффекта.

Таковыми рекомендациями, на наш взгляд, являются:

1. Устранение исключительности. Это означает, что при информировании больного о возможных побочных эффектах препарата следует подчеркнуть стандартность данной ситуации. Таким способом врач поможет пациенту справиться с общей тревожностью, зачастую основанной на таких ассоциативных рядах, как «исключительное = непредсказуемое = опасное», «типичное = предсказуемое = безопасное».

Пример нецелесообразного высказывания: *«Предупреждаю: этот препарат имеет побочные эффекты».*

Пример корректного высказывания: *«В инструкции любого лекарственного препарата указываются возможные побочные эффекты, по стандартам я обязан об этом проинформировать».*

2. Обезличивание высказывания. Это означает, что при описании возможных негативных последствий необходимо избегать использования местоимений второго лица: «Вы», «Ваш», «у Вас», объединяющих в сознании пациента образы нежелательного симптома и собственной личности.

Пример нецелесообразного высказывания: *«Я должен предупредить, что при приеме тербинафина у Вас может появиться тошнота, головная боль, а на Вашей коже может возникнуть сыпь».*

Пример корректного высказывания: *«Я должен предупредить, что при приеме тербинафина может возникнуть тошнота, головная боли или сыпь».*

3. Экстернализация высказывания. Это означает, что при перечислении возможных побочных эффектов необходимо вербально отделить их от организма пациента, описывая симптомы при помощи существительных, но не глаголов.

Пример нецелесообразного высказывания: *«Должен предупредить, что от этого лекарства может тошнить, может начать чесаться кожа или болеть голова».*

Пример корректного высказывания: *«Должен предупредить о том, что от этого лекарства возможно возникновение тошноты, головной боли или сыпи».*

4. Уточнение вероятности.

Современные требования к информированию пациента о вероятности побочного действия обязывают, опираясь на результаты исследований, расставить побочные эффекты по частоте возникновения случая: очень часто (более 1/10), часто (более 1/100, но реже чем 1/10), нечасто (более 1/1.000, но реже чем 1/100), редко (более 1/10.000, но реже чем 1/1.000), очень редко (менее 1/10.000, включая отдельные сообщения).

Например, относительно таблеток тербинафина, одного из самых часто назначаемых антифунгальных средств для лечения микозов кожи

и ее придатков, инструкция содержит следующее: «со стороны пищеварительной системы: очень часто – чувство переполнения желудка, снижение аппетита, диспепсия, тошнота, абдоминальная боль, диарея; редко – нарушение функции печени; очень редко – печеночная недостаточность, вплоть до летального исхода. Со стороны органов кроветворения: очень редко – нейтропения, агранулоцитоз, тромбоцитопения, панцитопения. Аллергические реакции: очень редко – анафилактикоидные реакции (включая ангионевротический отек). Со стороны нервной системы: часто – головная боль; нечасто – нарушение вкуса, включая агевзию. Со стороны кожных покровов: очень часто – кожные реакции (в т.ч. сыпь, крапивница); очень редко – синдром Стивенса-Джонсона, токсический эпидермальный некролиз, псориазоподобная сыпь, обострение имеющегося псориаза, алопеция. Со стороны опорно-двигательного аппарата: очень часто – артралгия, миалгия» [6].

Рекомендация уточнения вероятности подразумевает, что сообщая пациенту о вероятности наступления побочного эффекта, следует использовать цифровые значения, избегая таких эмоциональных оценок, как «часто» или «очень часто». Таким способом врач воспрепятствует формированию уверенности в наступлении побочного эффекта и соответствующих негативных ожиданий у пациента.

Пример нецелесообразного высказывания: *«Я назначил Вам таблетки тербинафина, однако должен предупредить, что очень часто пациентов начинает тошнить или чесаться кожа».*

Пример корректного высказывания: *«Я назначил Вам таблетки тербинафина, однако должен предупредить о том, что в одном из десяти случаев возможно возникновение тошноты или сыпи».*

5. Оценка стоимости лечения. При назначении конкретного препарата следует подчеркнуть, что он не является самым дорогим на рынке лекарственных средств.

Пример нецелесообразного высказывания: *«Это качественный, дорогой препарат».*

Пример корректного высказывания: *«Это качественный и доступный по цене препарат».*

6. Использование позитивных форм высказывания. Формулируя фразу, врачу следует избегать слов «не» и «нет», отдавая предпочтение позитивным синонимам. Это связано с тем,

что бессознательное, ответственное за ноцебо-эффект не подчиняется бинарной логике и реагирует непосредственно на ключевые слова.

Пример нецелесообразного высказывания: «Скорее всего, чесаться не будете». Или: «Это не дорогой препарат».

Пример корректного высказывания: «Скорее всего, у Вас будет чистая, здоровая кожа». Или: «Это доступный по цене препарат».

7. Рекомендации по профилактике тревожности. При наблюдении у пациента признаков пессимизма или страха врачу следует рекомендовать сопроводить лечение такими мероприятиями, как: регулярные прогулки на свежем воздухе, занятия физкультурой, снижение потребления кофеин-содержащих напитков, возможны дыхательные упражнения и медитация, приём седативных фитопрепаратов.

8. Формирование позитивных ожиданий. После обсуждения побочных эффектов, врачу

следует проговорить с пациентом ожидаемые положительные результаты от приёма препарата, создать конкретные образы хорошего самочувствия. В формулировках следует использовать позитивные высказывания, рассмотренные ранее в пункте 6.

В заключение, опираясь на вышеизложенное, приведем пример высказывания, профилирующего ноцебо-эффект:

«Я назначил Вам таблетки тербинафина, это качественный и доступный по цене препарат. В инструкции любого лекарственного препарата указываются возможные побочные эффекты, и я обязан проинформировать каждого пациента, что в одном из десяти случаев возможно возникновение тошноты или сыпи. Однако, с вероятностью 9 к 1, у Вас будет чистая кожа и комфортное пищеварение. Будет еще лучше, если Вы будете принимать травяной сбор».

ЛИТЕРАТУРА

1. Винфрид Хаусер, Эрнил Хансен, Пол Энк. Феномен ноцебо в медицине. Пер. с англ. Н. Д. Фирсовой. 2017. [Winfried Hauser, Ernil Hansen, Paul Enk. The nocebo phenomenon in medicine. Translated from English by N.D. Firsova. 2017 (In Russ)].
2. Федеральный закон от 21.11.2011 №323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации». [Federal law №323-FZ of 21.11.2011 "About the basics of public health protection in the Russian Federation (In Russ)].
3. Kern A., Kramm C., Witt C.M., Bart J. The influence of personality traits on the placebo\nocebo response. A systematic review. Journal of Psychosomatic research. 2020; 128: 109866. doi.org/10.1016/j.jpsychores.2019.109866
4. Хайкин А.В. Психосоматические механизмы, эффект плацебо, гипнотерапия и эволюция. Медицинская психология в России: электрон. науч. журн. 2018; 10 (2): 5. [Haikin A.V. Psychosomatic mechanisms, placebo effect, hypnotherapy and evolution. Medical psychology in Russia: electron science journal. 2018; 10 (2): 5 (In Russ)].
5. Обзор новостей нейротехнологий. Дайджест. Журнал фундаментальной медицины и биологии. 2017; 4: 54-60. [Review of Neurotechnology news. Digest. Journal of Fundamental Medicine and Biology. 2017; 4 : 54-60 (In Russ)].
6. Справочник Видаль «Лекарственные препараты в России», 2019. [Vidal reference book «Medicines in Russia», 2019 (In Russ)].

Поступила в редакцию журнала 0302.2020

Рецензент: Н.Н. Климко

СОЧЕТАНИЕ АЛЛЕРГИЧЕСКОГО БРОНХОЛЕГОЧНОГО АСПЕРГИЛЛЕЗА (*A. TERREUS*) И ХРОНИЧЕСКОГО АСПЕРГИЛЛЕЗА ЛЕГКИХ (*A. FUMIGATUS*). ОПИСАНИЕ КЛИНИЧЕСКОГО СЛУЧАЯ И ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

¹Кузнецов В.Д. (аспирант)*, ¹Козлова Я.И. (доцент), ²Борзова Ю.В. (зав. клиникой), ²Митрофанов В.С. (зав. отд.), ³Николаева Н.Г. (аспирант), ¹Лакеенков Н.М. (студент), ²Аак О.В. (в.н.с.), ²Богомолова Т.С. (зав. лаб.), Игнатьева С.М. (в.н.с.), Соболев А.В. (профессор кафедры), ¹Климко Н.Н. (зав. кафедрой)

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова: ¹кафедра клинической микологии, аллергологии и иммунологии; ²НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина; ³кафедра лучевой диагностики и лучевой терапии, Санкт-Петербург, Россия

Аллергический бронхолегочный аспергиллез (АБЛА) и хронический аспергиллез легких (ХАЛ) – два разных микоза, вызванных Aspergillus spp. Согласно экспертным оценкам, в мире около 5 млн. больных АБЛА и 3 млн. больных ХАЛ. Известно, что у части больных может быть сочетание АБЛА и ХАЛ. Расчетное количество таких пациентов составляет около 400 000 человек. В статье представлены клинический случай сочетания АБЛА и ХАЛ у больной бронхиальной астмой и обзор литературы. Своевременное выявление сочетания различных вариантов аспергиллеза легких необходимо для выбора антимикотической терапии и назначения хирургического лечения.

Ключевые слова: аллергический бронхолегочный аспергиллез, хронический аспергиллез легких, бронхиальная астма, *Aspergillus* spp.

COMBINATION OF ALLERGIC BRONCHOPULMONARY ASPERGILLOSIS (*A. TERREUS*) AND CHRONIC PULMONARY ASPERGILLOSIS (*A. FUMIGATUS*). CLINICAL CASE AND REVIEW OF LITERATURE

¹Kuznetsov V.D. (postgraduate student), ¹Kozlova Y.I. (associate professor), ²Borzova Y.V. (head of the mycological clinic), ²Mitrofanov V.S. (head of the clinical department), ³Nikolaeva N.G. (postgraduate student), ⁴Lakeenkov N.M. (student), ²Aak O.V. (leading scientific collaborator), Bogomolova T.S. (head of the laboratory), Ignatieva S.M. (leading scientific collaborator), ¹Sobolev A.V. (professor of the department), ¹Klimko N.N. (head of the department)

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov: ¹Department of Clinical Mycology, Allergy and Immunology; ²Kashkin Research Institute of Medical Mycology; ³Department of Radiation Diagnostics and Radiation Therapy, St. Petersburg, Russia

Allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) and chronic pulmonary aspergillosis (CPA) – two different mycoses caused by Aspergillus spp. According to expert estimates, there are about 5 million patients with ABPA and 3 million patients with CPA in the world. It's known that some patients may have a combination of ABPA and CPA. The estimated number of such patients is about 400,000 people. The article presents a clinical case of the development of ABPA in a patient with asthma complicated by CPA and a review of the literature. Timely identification of a combination of different variants for pulmonary aspergillosis is necessary for the choice of antimycotic therapy and the appointment of surgical treatment.

Key words: allergic bronchopulmonary aspergillosis, chronic lung aspergillosis, asthma, *Aspergillus* spp.

ВВЕДЕНИЕ

Aspergillus spp. широко распространены в окружающей среде и могут быть не только инфекционными агентами, но и источником большого количества аллергенов. Принято выделять три обусловленных *Aspergillus* spp. заболевания легких: инвазивный аспергиллез, хронический

* Контактное лицо: Кузнецов Валерий Дмитриевич,
e-mail: valeriy_smith@inbox.ru

аспергиллез легких, а также аллергический бронхолегочный аспергиллез [1, 2].

Аллергический бронхолегочный аспергиллез (АБЛА) – возникающее у больных бронхиальной астмой или муковисцидозом хроническое заболевание легких, вызванное гиперчувствительностью к антигенам *Aspergillus* spp. [1-4]. По оценкам экспертов, расчетное количество больных АБЛА – около пяти миллионов человек, а в Российской Федерации – 175 тысяч [5]. Хронический аспергиллез легких (ХАЛ) – заболевание, которое включает одиночную аспергиллему, хронический кавернозный аспергиллез, хронический фиброзирующий аспергиллез, нодулярный аспергиллез, а также подострый инвазивный аспергиллез. Как правило, ХАЛ выявляют у больных с предшествующими или существующими легочными заболеваниями (туберкулез лёгких, ХОБЛ, саркоидоз, диффузная паренхиматозная болезнь лёгких и др.) [1, 6, 7]. В мире около 3 млн. больных ХАЛ, из них около 1,2 млн. больных туберкулезом, расчетное количество больных ХАЛ в нашей стране составляет 52 311 человек [8].

По мнению международных экспертов, количество пациентов, у которых ХАЛ развился на фоне АБЛА, намного больше, чем считали ранее, и может составлять около 400 000 [5]. При сочетании АБЛА и ХАЛ отмечают более тяжелое, рецидивирующее течение заболевания, при котором могут быть необходимы более продолжительные курсы антимикотических терапии в сочетании с хирургическим удалением очага поражения ХАЛ. Эпидемиологические исследования распространенности сочетания АБЛА и ХАЛ не проводили, клинико-иммунологические особенности таких больных изучены недостаточно.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовали клинические, аллергологические, иммунологические и инструментальные методы исследования. Особое внимание уделяли данным анамнеза (первые симптомы заболевания и время их появления, динамика развития, возможный контакт с плесневыми грибами дома или на работе, наличие аллергических реакций, наследственность по атопии, наличие хронических заболеваний лёгких в анамнезе, предшествующая терапия и ее эффективность).

Проводили кожное тестирование с грибковым аллергеном *Aspergillus* («Allergopharma»,

Германия, разрешение этического комитета СЗГМУ им. И.И. Мечникова от 24.06.2014). С помощью иммуноферментного анализа определяли уровень общего IgE, (ООО «Полигност», Россия) и специфических IgE к грибковым, бытовым и эпидермальным аллергенам (панель биотинилированных аллергенов «Алкор Био», Россия) в сыворотке крови.

Лабораторная диагностика аспергиллеза включала серологические, микроскопические, культуральные и гистологические исследования. Материал для культурального исследования (бронхоальвеолярный лаваж, мокроту) засеивали на среду Сабуро, посевы инкубировали при 37 °С в течение 10 дней. Полученные культуры *Aspergillus* spp. идентифицировали по морфологическим признакам. При микроскопии использовали нативный препарат или окраску калькофлюором белым, отмечали наличие септированного мицелия, ветвящегося под углом 45°.

Наличие галактоманна в сыворотке крови и БАЛ оценивали иммуноферментным методом с использованием специфической диагностической тест-системы PLATELIA® *Aspergillus* (BIO-RAD Laboratories, США). Диагностически значимым считали индекс оптической плотности (ИОП) выше «0,5» в сыворотке крови и БАЛ [10]. Всем пациентам определяли уровень IgG к *Aspergillus fumigatus* с помощью иммуноферментной системы «Аспергилл-IgG-ИФА-Бест (ЗАО «Вектор Бест»).

Для изучения функции внешнего дыхания использовали спирометрию методом выполнения петли «объем-поток» с компьютерной обработкой результатов исследования. Учитывали следующие показатели: объем форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ1), форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ). По показаниям выполняли компьютерную томографию (КТ) легких в режиме высокого разрешения.

Диагноз АБЛА устанавливали на основании критериев Agarwal R. et al, 2013 г. [11], диагноз ХАЛ – на основании критериев Denning et al, 2016 г. [16].

Также проанализировали данные из научной литературы в базе PubMed и www.aspergillus.org.uk. При поиске информации использовали следующие ключевые слова: allergic bronchopulmonary aspergillosis, ABPA, bronchiectasis, *Aspergillus* spp., chronic pulmonary aspergillosis, CPA.

Описание клинического случая.

В сентябре 2014 г. пациентка Ш., 41 год, поступила в микологическую клинику СЗГМУ им. И.И. Мечникова. Проживает в г. Коломна Московской области. При поступлении предъявляла жалобы на приступы затрудненного дыхания, кашель с трудноотделяемой мокротой, общую слабость.

Анамнез заболевания:

Пациентка более 10 лет страдала атопической бронхиальной астмой. В течение последнего года отмечала повышение температуры тела до субфебрильных значений, ухудшение течения бронхиальной астмы, появление кашля с мокротой. Обратилась к пульмонологу по месту жительства, при обследовании в мокроте выявлен рост плесневых грибов. Работала ветеринарным врачом, на рабочем месте отмечала сырость, визуальные признаки плесневого поражения, характерный «плесневой запах». Было рекомендовано обследование в НИИ медицинской микологии для установления диагноза и лечения.

При объективном осмотре общее состояние удовлетворительное. Сознание ясное. Кожные покровы чистые, без видимых высыпаний. Видимые слизистые оболочки и склеры обычной окраски, чистые. Пульс ритмичный, тоны сердца звучные, шумов нет, ритм правильный. Дыхание жесткое, определяются сухие свистящие хрипы в верхней доле правого лёгкого и в нижних отделах лёгких. ЧДД – 17 в минуту, ЧСС – 76 в минуту, АД — 125/75 мм рт. ст. Язык чистый, влажный. Живот мягкий, безболезненный. Печень не увеличена. Селезенка: пальпируется нижний конец у края реберной дуги. Периферических отеков нет.

Результаты обследования в микологической клинике СЗГМУ им. И.И. Мечникова. Клинический анализ крови: лейкоциты – $10 \cdot 10^9/\text{л}$, абсолютное количество эозинофилов – $0,63 \cdot 10^9/\text{л}$. Кожная проба с *A. fumigatus* – положительная. Уровень специфических IgE к 10 ингаляционным аллергенам: *Alternaria* – 0,2 МЕ/мл, *Aspergillus* – 3,07 МЕ/мл, береза – 0,02 МЕ/мл, тимофеевка – 0,01 МЕ/мл, полынь – 0,35 МЕ/мл, собака – 0,20 МЕ/мл, кошка – 0,50 МЕ/мл, домашняя пыль – 0,03 МЕ/мл, клещ птерониссинус – 0,04 МЕ/мл, клещ farina – 0,40 МЕ/мл (норма < 0,35 МЕ/мл). Уровень общего IgE в сыворотке крови – 854 МЕ/мл (норма до 100 МЕ/мл). Титр IgG к *A. fumigatus* – 1:400 (норма $\leq 1:100$). По

данным функции внешнего дыхания: ЖЕЛ в пределах нормы, умеренные нарушения бронхиальной проходимости, проба с бронхолитиком положительная (прирост ОФВ1=25%).

КТ ОГК: в верхней доле правого легкого в проекции S2 определяется участок уплотнения легочной ткани в виде неправильной округлой формы, однородной структуры и выраженной интенсивности. Субплеврально и перифокально, а также по ходу бронхиального дерева отмечены очаги диссеминации размером до 2-4 мм с тенденцией к слиянию и уплотнению. Признаков отсева в верхние отделы левого легкого не выявлено. При микроскопии промывных вод из бронхов элементов микромицета не обнаружено, при посеве – роста микромицетов нет. При посеве мокроты – рост *A. terreus* в 3-х точках посева.

Таким образом, у больной выявлен бронхообструктивный синдром, подтверждена сенсibilизация к *Aspergillus* spp., обнаружен повышенный уровень общего IgE и повышенный титр IgG к *A. fumigatus*, на КТ органов грудной клетки наблюдали характерные инфильтративные изменения, а также при посеве респираторных биосубстратов получен рост *A. terreus*. Согласно международным рекомендациям, у больной есть все обязательные и все дополнительные критерии АБЛА.

После установления диагноза пациентке назначили итраконазол в дозе 400 мг/сут в течение 3 месяцев, после которого рекомендовано контрольное обследование (клинический анализ крови, мониторинг уровня общего IgE в сыворотке крови). Были даны рекомендации по устранению факторов риска развития микогенной сенсibilизации и соблюдению гипоаллергенного быта.

В феврале 2015 г. – повторная госпитализация в микологическую клинику для контрольного обследования. У больной сохранялись общая слабость, затруднение дыхания. Побочных эффектов антимикотической терапии не отмечала. Результаты обследования: абсолютное количество эозинофилов в периферической крови снизилось до $0,27 \cdot 10^9/\text{л}$. Сохранялся высокий уровень общего IgE в сыворотке крови – 714 МЕ/мл, sIgE к *Aspergillus* – 4,58 МЕ/мл, нараст титр IgG к *A. fumigatus* – 1:800. По данным ФВД – значительные нарушения бронхиальной проходимости. На КТ ОГК: по сравнению с исследованием от сентября 2014 г. без динамики. Бы-

ло рекомендовано продолжить приём итраконазола в суточной дозе 400 мкг в течение 3 месяцев.

После прекращения антимикотической терапии пациентка продолжала предъявлять жалобы на продуктивный кашель. В сентябре 2015 г. обратилась в ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии», где диагноз «туберкулез» не был подтвержден. На КТ ОГК от 14.10.2015: в S2 правого легкого определяется сливное многофокусное образование, распространяющееся от уровня субсегментарных бронхов в периферические отделы. Состоит из плотного неоднородного образования в прикорневом отделе 10 18 12 мм, у медиального полюса которого обтурируются бронхи. Единичные перибронховаскулярные мелкие очаги в пределах верхушки S1и S2 правого легкого. Бронхи в пределах верхней доли деформированы, умеренно расширены с маловыраженными бронхоэктазами. Заключение: КТ картина может соответствовать проявлениям аллергического бронхолегочного аспергиллеза. Плотное образование (мицетома?) в прикорневом отделе S2 правого легкого с ретенционными бронхиальными кистами, нарастание объема кист в динамике. (Рис.).



Рис. Больная Ш. КТ органов грудной клетки от 14.10.2015. Сочетание аллергического бронхолегочного аспергиллеза и хронического аспергиллеза легких.

Пациентка направлена на консультацию торакального хирурга. Рекомендовано оперативное лечение. В ноябре 2015 г. была выполнена видеоторакоскопическая верхняя лобэктомия справа. При гистологическом исследовании операционного материала – морфологическая картина хронического продуктивного воспаления. Биопсийный материал был направлен в НИИ медицинской микологии, при посеве обнаружен рост *A. fumigatus*.

В декабре 2015 г. пациентка повторно консультирована в микологической клинике, установлен диагноз: аллергический бронхолегочный аспергиллез, хронический аспергиллез легких. Назначена антимикотическая терапия – вориконазол 400 мг/сутки в течение 3 месяцев. При контрольном обследовании в марте 2016 г. больная отметила значительное улучшение общего состояния. Выявлено значительное снижение уровня общего IgE до 95 МЕ/мл, а также снижение титра IgG к *A. fumigatus* до 1:400. На КТ: состояние после верхнедолевой лобэктомии справа. Легкие расправлены. Культя бронха герметична. В легких без очагов и инфильтрации. Внутригрудные лимфатические узлы не увеличены. Заключение: данных за рецидив в области операции не получено. Косвенные признаки хронического бронхита. В настоящее время больная находится под наблюдением в НИИ медицинской микологии, рецидивов АБЛА и ХАЛ отмечено не было.

ОБСУЖДЕНИЕ

Аллергический бронхолегочный аспергиллез – заболевание легких, обусловленное гиперчувствительностью к *Aspergillus* spp., которое осложняет течение бронхиальной астмы (БА) и муковисцидоза. Для больных из этих групп характерны нарушения защитных механизмов слизистых оболочек дыхательных путей, в том числе дефекты мукоцилиарного клиренса и функции эпителиальных клеток [9, 10]. Все это облегчает колонизацию дыхательных путей грибковыми спорами. Инвазивного поражения тканей легких при АБЛА обычно не происходит [8]. АБЛА был впервые описан К. Hinson и соавторами в 1952 г. С тех пор выявление случаев АБЛА возрастает с каждым годом во всех странах.

Для АБЛА характерны разнообразные клинические и рентгенологические проявления, ко-

торые обычно сопровождаются неконтролируемой БА, рецидивирующими легочными инфильтратами, бронхоэктазами и прогрессирующей дыхательной недостаточностью. Больные могут отмечать повышение температуры тела, потерю веса, недомогание, кашель, иногда кровохарканье. У 31-69% пациентов наблюдают отделение мокроты, содержащей коричневато-черные включения [2, 10, 11].

Диагноз АБЛА основан на сочетании клинических, рентгенологических и иммунологических критериев, предложенных рабочей группой International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM). У пациента должны быть все обязательные критерии: астма, специфичный к *A. fumigatus* IgE ($>0,35$ МЕ/мл), повышение уровня общего IgE (>1000 МЕ/мл); и два из дополнительных критериев: положительный IgG к *A. fumigatus*, абсолютное количество эозинофилов >500 клеток/мкл и характерные рентгенографические признаки АБЛА [11].

В качестве противовоспалительной терапии АБЛА используют системные глюкокортикостероиды (ГКС), а для уменьшения грибковой нагрузки в дыхательных путях – антимикотические препараты. Назначение специфических антимикотических препаратов при АБЛА позволяет ослабить иммунный ответ в связи с уменьшением антигенной стимуляции и таким образом избежать или снизить потребность в стероидной терапии.

ХАЛ впервые описан как фатальное заболевание в 1842 г. в Эдинбурге (Великобритания) [12], а первый опыт терапии амфотерицином опубликован в 1957 г. у больного ХАЛ на фоне туберкулеза [13]. Наиболее распространенный вариант ХАЛ – хронический кавернозный аспергиллез. К менее частым проявлениям ХАЛ относят аспергиллезные узлы и одиночную аспергиллему [7].

В отличие от инвазивного аспергиллеза, ХАЛ возникает преимущественно у пульмонологических больных без выраженного иммунодефицита. ХАЛ чаще всего развивается в существовавшей ранее полости в легком или плевральной полости, но нередко сам приводит к формированию и распространению новых полостей или узлов, иногда – к консолидации легочной ткани. В качестве фоновых могут выступать различные заболевания [14]. Преобладающими факторами риска являются туберкулез, нетуберкулезный микобактериоз, АБЛА; также часто

встречаются ХОБЛ, предшествующие пневмоторакс или леченый рак легкого [14, 15], саркоидоз в стадии фиброза [16], анкилозирующий спондилит, пневмокозиоз [17] и силикоз с прогрессирующим массивным фиброзом [18-25].

ХАЛ протекает как медленно прогрессирующее деструктивное заболевание, которое обычно начинается с верхних долей легких. Клиническая картина ХАЛ сходна с АБЛА. Больные также могут отмечать субфебрилитет, общую слабость, кашель и кровохарканье. Для установления диагноза ХАЛ необходимо сочетание следующих признаков: одна или несколько полостей с грибковым конгломератом внутри или без такового либо узлы при лучевом обследовании легких; прямое подтверждение аспергиллезной инфекции (микроскопия или посев биопсийного материала) или иммунологическая реакция на *Aspergillus* spp.; исключение альтернативного диагноза. Все признаки должны присутствовать в течение ≥ 3 месяцев. Уровень антител к *Aspergillus* (преципитины) повышен у $> 90\%$ больных [7].

При ХАЛ необходима длительная пероральная противогрибковая терапия для улучшения состояния в целом и устранения респираторных симптомов, прекращения кровохарканья и предотвращения прогрессирования заболевания. В случае технической возможности рекомендовано хирургическое удаление аспергиллемы.

Известно, что АБЛА может быть «фоновым заболеванием» для развития ХАЛ. [11]. В ранних работах, посвященных АБЛА, описаны пациенты с легочным фиброзом и поражением преимущественно верхней доли легкого [26-28]. Эти данные соответствуют современным публикациям о формировании ХАЛ у больных АБЛА [14].

В 2015 г. Lowers и соавт. исследовали развитие ХАЛ у больных АБЛА на фоне бронхиальной астмы. Из 407 пациентов, у которых диагноз АБЛА был установлен на основании повышения уровней общего IgE и sIgE к *Aspergillus*, у 22 (5%) – были выявлены критерии как АБЛА, так и ХАЛ. В сыворотке крови отмечали повышение общего IgE, sIgE к *Aspergillus*, IgG к *Aspergillus*, на КТ легких – бронхоэктазы, утолщения плевры, часто двустороннее, апикальные тонкостенные полости, некоторые из которых содержали аспергиллемы. [29].

Возможно одновременное наличие АБЛА и ХАЛ в начальных стадиях болезни. Это, как правило, свидетельствует об иммунологически тяжелой форме АБЛА с высоким риском частых рецидивов [30]. В данной ситуации системные глюкокортикостероиды не противопоказаны, и их назначение облегчает течение бронхиальной астмы, уменьшая продукцию мокроты [31].

Появление аспергиллемы в поздних стадиях АБЛА может свидетельствовать о развитии ХАЛ с прогрессирующей дыхательной недостаточностью и риском легочного кровотечения [32-36]. В этом случае антимикотическая терапия в сочетании с ГКС способствует стабилизации заболевания и снижению частоты возникновения рецидивов. Однако, так как многим пациентам может потребоваться длительное лечение азолами, возможно увеличение потенциального риска развития побочных эффектов [11].

В 2012 г. Agarwal и соавт. включили в исследование 179 больных АБЛА, установленным на основании повышенного общего IgE и sIgE к *Aspergillus*. У 8 пациентов была выявлена сопутствующая аспергиллема лёгких, из которых одиночная аспергиллема обнаружена у 6, парная аспергиллема – у 2. У больных АБЛА и сопутствующей аспергиллемой титры общего и специфического IgE к *Aspergillus* были значительно выше, чем у больных АБЛА без аспергиллемы. Частота выявления бронхоэктазов также была выше в группы больных АБЛА с аспергиллемой. Из 179 больных АБЛА у 50% в течение 27 месяцев наблюдения отмечали рецидив заболевания. Количество рецидивов было выше в группе больных АБЛА с аспергиллемой и составило 70% [30].

Диагноз ХАЛ может предшествовать диагнозу АБЛА [31, 37]. Продолжительное высвобождение антигенов *Aspergillus* может приводить к иммунологической активации, характеризующейся появлением серологических маркеров АБЛА. В случае возникновения аспергиллемы в полости легкого возможно увеличение уровней общего и специфического IgE, что отражает развитие реакции гиперчувствительности I типа вследствие колонизации *Aspergillus* spp. [31, 33].

В 2003 г. Denning и соавт. опубликовали результаты исследования, в котором участвовали

18 больных ХАЛ. У всех пациентов ранее были установлены хронические пульмонологические заболевания с формированием различных полостей. При обследовании у 14 из 18 человек был выявлен повышенный уровень общего IgE (от 180 до 17000 МЕ/mL), у 11 из 18 пациентов – положительные sIgE к *Aspergillus*, что может свидетельствовать о возможном перекресте иммунного ответа у больных ХАЛ и АБЛА [38].

В 2019 г. Sehgal и соавт. обследовали 269 человек с подтверждённым диагнозом ХАЛ. Наиболее частым фоновым заболеванием был туберкулёз лёгких. Уровень общего IgE был повышен у 34,6% больных, sIgE к *A. fumigatus* – у 41,6%. Все обязательные критерии, необходимые для АБЛА, выявлены у 59 (21,9%) больных. В этой группе пациентов, кроме повышенных уровней общего и специфического IgE, были значительно выше показатели эозинофилов, чаще встречались положительные кожные пробы с аллергеном *Aspergillus*. По мнению авторов, необходимо разработать отдельный протокол лечения с синдромом перекреста АБЛА и ХАЛ. Предложена комбинация низких доз системных ГКС и пероральных азолов, однако продолжительность терапии не определена [39].

Отметим, что в представленном нами клиническом случае возбудителем АБЛА был *A. terreus*, а возбудителем ХАЛ – *A. fumigatus*. Сочетание этих двух видов *Aspergillus* у больной с синдромом перекреста АБЛА и ХАЛ описано впервые. Определение вида возбудителей аспергиллеза лёгких имеет большое клиническое значение и необходимо для предотвращения развития резистентности к антимикотическим препаратам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время выделена группа пациентов с сочетанием АБЛА и ХАЛ. В этих случаях возможно более тяжелое течение заболевания с высоким риском рецидивов и развитием осложнений. Необходимы дальнейшие исследования клинико-иммунологических характеристик больных с сочетанием АБЛА и ХАЛ для разработки эффективной схемы терапии. Больные с сочетанием АБЛА и ХАЛ должны быть под динамическим наблюдением в специализированных микологических клиниках.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ullmann A.J., Aguado J.M., Arikan-Akdoglu S., et al.* Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin. Microbiol. Infect.* 2018; 24 (1): E.1-38. doi: 10.1016/j.cmi.2018.01.002
2. *Denning D.W., Pleuvry A., Cole D.C.* Global burden of allergic bronchopulmonary aspergillosis with asthma and its complication chronic pulmonary aspergillosis in adults. *Med. Mycol.* 2013; 51: 361-370. doi: 10.3109/13693786.2012.738312
3. *Козлова Я.И., Соболев А.В., Фролова Е.В. и др.* Аллергический бронхолегочный аспергиллез у больных бронхиальной астмой. *Российский аллергологический журнал.* 2015; 2: 37-46. [Kozlova Ya.I., Sobolev A.V., Frolova E.V., et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with bronchial asthma. *Russian allergological journal.* 2015; 2: 37-46 (In Russ)].
4. *Козлова Я.И., Учеваткина А.Е., Бычкова Н.В. и др.* Тест активации базофилов в диагностике аллергического бронхолегочного аспергиллеза. *Проблемы медицинской микологии.* 2016; 18 (3): 7-11. [Kozlova Ya.I., Uchevatkina A.E., Bychkova N.V., et al. Basophil activation test in the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Problems in Medical Mycology.* 2016; 18 (3): 7-11 (In Russ)].
5. *Климко Н.Н., Козлова Я.И., Хостелиди С.Н. и др.* Распространенность тяжелых и хронических микотических заболеваний в Российской Федерации по модели LIFE program. *Проблемы медицинской микологии.* 2014; 16 (1): 3-9. [Klimko N.N., Kozlova Y.I., Khostelidi S.N., et al. The prevalence of serious and chronic fungal diseases in Russian Federation on LIFE program model. *Problems in Medical Mycology.* 2014; 16 (1): 3-9 (In Russ)].
6. *Patterson T.F., Thompson G.R., Denning D.W., et al.* Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 2016; 63: E.1-60. doi: 10.1093/cid/ciw326
7. *Denning D.W., Cadranet J., Beigelman-Aubry C., et al.* Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. *Eur. Respir. J.* 2016; 47: 45-68. doi: 10.1183/13993003.00583-2015
8. *Климко Н.Н.* Микозы: диагностика и лечение. Руководство для врачей. 3-е изд. перераб. и доп. (учебное пособие). М.: Фармтек, 2017. – 272 с. [Klimko N.N. *Mycoses: diagnosis and treatment. A guide for physicians.* 3rd ed. (tutorial). Moscow: Farmtek, 2017. – 272 p. (In Russ)].
9. *Chaudhary N., Datta K., Askin F.B., et al.* Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator regulates epithelial cell response to *Aspergillus* and resultant pulmonary inflammation. *J. Respir. Crit. Care Med.* 2012; 185: 301-310. doi: 10.1164/rccm.201106-1027OC
10. *Hogan C., Denning D.W.* Allergic bronchopulmonary aspergillosis and related allergic syndromes. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2011; 32: 682-692. doi: 10.1016/j.hgmx.2017.05.001
11. *Agarwal R., Chakrabarti A., Shah A., et al.* Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clin. Exp. Allergy.* 2013; 43: 850-73. doi: 10.4168/air.2016.8.4.282
12. *Bennett J.* On the parasitic vegetable structures found growing in living animals. *Trans Royal Soc. Edinburgh.* 1844; 15 (2): 277-294. doi: 10.1017/S0080456800029963
13. *Kelmenson V.A.* Treatment of pulmonary aspergillosis. *Dis. Chest.* 1959; 36: 442-443. doi: 10.1378/chest.36.4.442
14. *Smith N.L., Denning D.W.* Underlying conditions in chronic pulmonary aspergillosis including simple aspergilloma. *Eur. Respir. J.* 2011; 37: 865-872. doi: 10.1183/09031936.00054810
15. *Kosmidis C., Denning D.W.* The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Thorax.* 2015; 70: 270-277. doi: 10.1136/thoraxjnl-2014-206291
16. *Denning D.W., Pleuvry A., Cole D.C.* Global burden of chronic pulmonary aspergillosis complicating sarcoidosis. *Eur. Respir. J.* 2013; 41: 621-626. doi: 10.1183/09031936.00226911
17. *Kato T., Usami I., Morita H., et al.* Chronic necrotizing pulmonary aspergillosis in pneumoconiosis: clinical and radiologic findings in 10 patients. *Chest.* 2002; 121: 118-127. doi: 10.1378/chest.121.1.118
18. *Franquet T., Maller N.L., Gimenez A., et al.* Spectrum of pulmonary aspergillosis: histologic, clinical, and radiologic findings. *Radiographics.* 2001; 21: 825-837. doi: 10.1148/radiographics.21.4.g01j103825

19. *Greene R.* The radiological spectrum of pulmonary aspergillosis. *Med. Mycol.* 2005; 43: 147-154. doi: 10.1080/13693780500064771
20. *Parakh U.K., Sinha R., Bhatnagar A.K., et al.* Chronic necrotising pulmonary aspergillosis: a rare complication in a case of silicosis. *Indian. J. Chest Dis. Allied. Sci.* 2005; 47: 199-203.
21. *Blanco J.J., Barcala F.J.G., Moure M.A.A., et al.* Aspergilosis pulmonar necrotizante crónica como complicación de silicosis [Chronic necrotising pulmonary aspergillosis as a complication of silicosis]. *An. Sist. Sanit. Navar.* 2011; 34: 109-114. doi.org/10.4321/S1137-66272011000100013
22. *Lachkar S., Dominique S., Thiberville L., et al.* Aspergillose et sarcoïdose [Aspergillosis and sarcoidosis]. *Rev. Mal. Respir.* 2007; 24: 943-953. doi.org/10.1016/S0761-8425(07)92760-6
23. *Soubani A.O., Chandrasekar P.H.* The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Chest.* 2002; 121: 1988-1999. doi: 10.1378/chest.121.6.1988
24. *Huang C.W., Lee M.A., Lu R.H., et al.* A case of pulmonary aspergilloma and actinomycosis. *J. Med. Microbiol.* 2011; 60: 543-546. doi.org/10.1099/jmm.0.026427-0
25. *Bal A., Bagai M., Mohan H., et al.* Aspergilloma in a pulmonary hydatid cyst: a case report. *Mycoses.* 2008; 51: 357-359. doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01495.x
26. *McCarthy D.S., Simon G., Hargreave F.E.* The radiological appearances in allergic broncho-pulmonary aspergillosis. *Clin. Radiol.* 1970; 21: 366-75. doi.org/10.1016/S0009-9260(70)80070-8
27. *Phelan M.S., Kerr I.H.* Allergic bronchopulmonary aspergillosis: the radiological appearance during long-term follow-up. *Clin. Radiol.* 1984; 35: 385-92. doi: 10.5005/jp/books/10519_76
28. *Gefter W.B., Epstein D.M., Miller W.T.* Allergic bronchopulmonary aspergillosis: less common patterns. *Radiology.* 1981; 140: 307-12. doi.org/10.1148/radiology.140.2.307
29. *Lowes D., Chishimba L., Greaves M., Denning D.W.* Development of chronic pulmonary aspergillosis in adult asthmatics with ABPA. *Respir. Med.* 2015; 109: 1509-15. doi.org/10.1016/j.rmed.2015.09.007
30. *Agarwal R., Aggarwal A.N., Garg M., et al.* Allergic bronchopulmonary aspergillosis with aspergilloma: an immunologically severe disease with poor outcome. *Mycopathologia.* 2012; 174: 193-201. doi.org/10.1007/s11046-012-9535-x
31. *Ein M.E., Wallace R.J.Jr., Williams T.W.Jr.* Allergic bronchopulmonary aspergillosis-like syndrome consequent to aspergilloma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1979; 119 (5): 811-20. doi: 10.1164/arrd.1979.119.5.811
32. *Shah A.* Concurrent allergic bronchopulmonary aspergillosis and aspergilloma: is it a more severe form of the disease? *Eur. Respir. Rev.* 2010; 19: 261-3. doi.org/10.1183/09059180.00009010
33. *Safirstein B.H.* Aspergilloma consequent to allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1973;108 (4): 940-3. doi: 10.1164/arrd.1973.108.4.940
34. *Israel R.H., Poe R.H., Bomba P.A., Gross R.A.* The rapid development of an aspergilloma secondary to allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Am. J. Med. Sci.* 1980; 280: 41-4. doi.org/10.1097/00000441-198007000-00007
35. *Sharma P., Agarwal A.K., Shah A.* Formation of an aspergilloma in a patient with allergic bronchopulmonary aspergillosis on corticosteroid therapy. *Indian J. Chest. Dis. Allied. Sci.* 1998; 40 (4): 269-73. PMID: 10091467
36. *Shah A., Panjabi C.* Contemporaneous occurrence of allergic bronchopulmonary aspergillosis, allergic *Aspergillus* sinusitis, and aspergilloma. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2006; 96: 874-8. doi.org/10.1016/S1081-1206(10)61353-1
37. *Rosenberg I.L., Greenberger P.A.* Allergic bronchopulmonary aspergillosis and aspergilloma. Long-term followup without enlargement of a large multiloculated cavity. *Chest.* 1984; 85: 123-5. doi.org/10.1378/chest.85.1.123
38. *Denning D.W., Riniotis K., Dobrashian R., Sambatakou H.* Chronic cavitory and fibrosing pulmonary and pleural aspergillosis: case series, proposed nomenclature change, and review. *Clin. Infect. Dis.* 2003; 37: 265-80. doi.org/10.1086/376526
39. *Sehgal I.S., Choudhary H., Dhooria S., et al.* Is there an overlap in immune response between allergic bronchopulmonary and chronic pulmonary aspergillosis? *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 2019; 7: 969-974. doi: 10.1016/j.jaip.2018.08.034

Поступила в редакцию журнала 20.02.2020

Рецензент: М.А. Шевяков

КЛИНИКО- ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ КРАПИВНИЦЕЙ: АНАЛИЗ ДАННЫХ РЕГИСТРА 2018-2019 ГОДА

Бурыгина Е.В. (аспирант)*, Мельникова А.В. (студент), Козлова Я.И. (доцент), Митрофанов В.С. (зав. отд.), Фролова Е.В. (зав. лаб.), Учеваткина А.Е. (с.н.с.), Филиппова Л.В. (с.н.с., ассистент кафедры), Аак О.В. (в.н.с.), Клишко Н.Н. (зав. кафедрой)

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

*Медико-социальное значение хронической крапивницы (ХК) обусловлено широкой распространенностью, развитием преимущественно у лиц трудоспособного возраста, выраженным снижением качества жизни пациентов и высоким уровнем затрат на лечение. В статье представлен анализ регистра больных, которые проходили обследование и лечение в микологической клинике СЗГМУ им. И.И. Мечникова в течение 2018-2019 гг. Хронической крапивницей болели преимущественно женщины (84%), средний возраст пациентов – 45 лет. Самая распространенная форма – хроническая спонтанная крапивница выявлена у 81% больных. Частота индуцируемой крапивницы составила 19%: симптоматический дермографизм – 8%, холинергическая – 4%, индуцируемая холодом – 4%, крапивница от давления – 3%, сочетание двух и более форм крапивницы – 15%. Наиболее распространенная сопутствующая патология – заболевания ЖКТ (69%) и щитовидной железы (30%). Тест с аутологичной сывороткой был положительным у 29 больных (32%). Непрямой тест активации базофилов *in vitro* – перспективный метод диагностики хронической аутоиммунной крапивницы, который в комплексе с тестом с ауто-сывороткой позволяет*

определить дальнейшую терапевтическую тактику.

Учитывая гетерогенность хронической крапивницы, изучение клинико-иммунологических характеристик больных является актуальной задачей и способствует назначению адекватной терапии в соответствии с современными клиническими рекомендациями.

Ключевые слова: хроническая крапивница, хроническая спонтанная крапивница, аутоиммунная крапивница, проба с ауто-сывороткой

CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL FEATURES OF THE PATIENTS WITH CHRONIC URTICARIA: ANALYSIS OF THE REGISTER DATA 2018-2019

Burygina E.V. (postgraduate student), Melnikova A.V. (student), Kozlova Y.I. (associate professor), Mitrofanov V.S. (head of the clinical department), Frolova E.V. (head of the laboratory), Uchevatkina A.E. (senior scientific collaborator), Filippova L.V. (senior scientific collaborator, assistant of the department), Aak O.V. (leading scientific collaborator), Klimko N.N. (head of the department)

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

Medical and social significance of chronic urticaria (CU) is conditioned by its wide distribution and development mainly in able-bodied persons, impaired quality of patients' life and high costs for treatment. The article presents the analysis of the register of the patients who underwent examination and were treated at the Mycological Clinic of the NWSMU named after I.I. Mechnikov in 2018-2019 yy. Chronic urticaria was predominantly revealed in women (84%), median age of patients – 45 years. The most common form of CU was chronic spontaneous urticaria which was diagnosed in 81% of patients. The frequency of chronic inducible urticaria was 19%: symptomatic dermographism – 8%, cholinergic urticaria – 4%, cold urticaria – 4%, pressure urticarial – 3%, coexistence of two or more forms of urticaria – 23% of patients. The most common concomitant pathology were gastrointestinal diseases

* Контактное лицо: Бурыгина Екатерина Васильевна, e-mail: Ekaterina.Burygina@szgmu.ru

(69%) and thyroid diseases (30%). Autologous serum skin test was positive in 29 patients (32%). Indirect basophil activation test in vitro is a promising method for the diagnosis of chronic autoimmune urticaria, which in combination with an autoserum test allows determining further therapeutic tactics.

Regarding on CU heterogeneity, the investigation of clinical and immunological features of the patients is a crucial task which can help with adequate treatment according to actual clinical recommendations.

Key words: chronic urticaria, chronic spontaneous urticaria, autoimmune urticaria, autologous serum skin test

ВВЕДЕНИЕ

Хроническая крапивница (ХК) – заболевание, которое характеризуется появлением волдырей и/или ангиоотечков, сохраняющихся до 24 часов в течение 6 недель и более [1, 2]. ХК нарушает сон, дневную активность и психоэмоциональное состояние пациентов.

Хроническая крапивница поражает до 1% населения в общей популяции по всему миру [3]. В настоящее время эксперты отмечают тенденцию к увеличению распространенности этого заболевания [4]. Дебют ХК чаще наблюдают в возрасте от 30 до 50 лет, преимущественно у женщин [3]. В большинстве случаев средняя продолжительность заболевания составляет 2-5 лет [5], однако у 10-20% пациентов зудящие уртикарные высыпания сохраняются на многие годы [6, 7]. Таким образом, ХК поражает лиц трудоспособного возраста, значительно снижая качество жизни [2, 3].

Несмотря на то, что внешние проявления крапивницы не имеют различий, стратегия лечения ХК различной этиологии и патогенеза существенно варьирует. Хроническую крапивницу могут индуцировать физические триггеры, различные хронические бактериальные и вирусные инфекции, аллергены [1, 2, 5]. Среди основных патогенетических механизмов ХК выделяют накопление функциональных гистамин-либерирующих аутоантител. Для аутоиммунной хронической крапивницы характерно тяжелое, длительное течение, резистентность к антигистаминным препаратам.

Дальнейшее изучение клинико-патогенетических особенностей заболевания позволит оптимизировать ведение больных с учетом активности, прогноза заболевания и по-

высит эффективность дифференциальной диагностики и терапии.

Цель работы – оценка клинико-иммунологической характеристики и сопутствующей патологии больных хронической крапивницей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В проспективное исследование включили 161 больного с хронической крапивницей. Проводили сбор анамнестических данных, объективный осмотр, изучали данные направительной документации и амбулаторных карт наблюдения по месту жительства. Диагноз крапивницы устанавливали согласно критериям федеральных клинических рекомендаций (Российская ассоциация аллергологов и клинических иммунологов – РААКИ, 2018) [8] и международных согласительных документов EAACI/GA2LEN/EDF/WAO (Европейская академия аллергологии и клинической иммунологии/Европейская глобальная сеть по аллергии и бронхиальной астме/Европейский дерматологический форум/Всемирная организация по аллергии) 2018 г. [1].

Лабораторное обследование включало общий анализ крови и мочи, биохимический анализ крови (билирубин, функциональные пробы печени, креатинин, мочевины, глюкоза), определение ревматоидного фактора и С-реактивного белка. Выполняли исследование сыворотки крови на ВИЧ, RW и HBsAg. устанавливали уровень гормонов щитовидной железы ТТГ, Т3, Т4, антитела к тиреопероксидазе и тиреоглобулину. Кроме того, больным проводили специфическое аллергологическое обследование: определяли уровень общего IgE в сыворотке крови (иммуноферментный анализ, «Полигност» Россия). При необходимости выявляли уровень специфических IgE к бытовым, пыльцевым, эпидермальным и грибковым аллергенам (иммуноферментный анализ с использованием панели биотинилированных аллергенов «Алкор-Био», Россия). По показаниям проводили инструментальные методы изучения: ультразвуковое исследование органов брюшной полости и щитовидной железы, фиброгастроуденоскопию. В случае выявления сопутствующей патологии больного направляли на консультацию врачей-специалистов: эндокринолога, гастроэнтеролога, ревматолога, гинеколога и оториноларинголога.

При подозрении на наличие физической формы хронической крапивницы использовали стандартные провокационные тесты: холодовую аппликационную пробу, определение уртикарного дермаграфизма и пробу с физической нагрузкой. Для диагностики аутоиммунной формы хронической крапивницы проводили тест с аутологичной сывороткой крови.

Изучение активации базофилов осуществляли методом проточной цитометрии с использованием набора Allergenicity kit (Beckman Coulter, США). Идентификацию степени активации базофилов определяли по количеству клеток с высокой экспрессией CD203c. Подсчитывали индекс стимуляции (ИС) как отношение активированных базофилов донора после инкубации с сывороткой крови пациента к числу базофилов, инкубированных с сывороткой другого здорового донора.

Для определения активности крапивницы и оценки эффективности терапии применяли бальную систему Urticaria Activity Score 7 (UAS 7), согласно которой пациенты каждые 24 часа в течение 7 последовательных дней проводили суммарную оценку основных симптомов заболевания (количество волдырей и интенсивность зуда).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Больные крапивницей обращаются за медицинской помощью не только к аллергологам-иммунологам, но и к дерматологам, терапевтам, педиатрам и врачам других специальностей. Остается актуальной проблема оптимизации терапии хронической крапивницы с учетом длительности, степени тяжести заболевания и побочных эффектов применяемых препаратов.

В регистр был включен 161 больной хронической крапивницей в возрасте 18 до 85 лет. Средний возраст больных составил 45 ± 17 лет, женщин – 136 (84%), мужчин – 25 (16%). Демографические характеристики обследованных больных совпадают с результатами других исследований [3, 4].

Согласно данным международных экспертов, большую часть больных ХК составляют больные хронической спонтанной крапивницей (ХСК), при которой триггер заболевания отсутствует [1, 2, 5]. Также выделяют хроническую индуцируемую крапивницу (ХиндК), симптомы которой возникают при воздействии холода, солнечного излучения, давления, физической

нагрузки и других провоцирующих факторов [1 2, 8].

На основании проведенного обследования установлено, что самой распространенной формой ХК у больных нашего регистра также была хроническая спонтанная крапивница, которую наблюдали у 81% обследованных. Частота индуцируемой крапивницы составила 19%: симптоматический дермографизм – 8%, холинергическая – 4%, индуцируемая холодом – 4%, крапивница от давления – 3%. Сочетание двух и более форм крапивницы выявлено у 15% больных (Рис. 1).

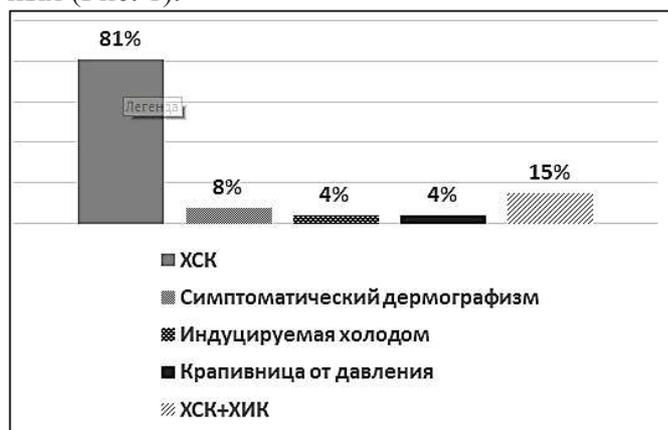


Рис. 1. Частота форм хронической крапивницы.

Анализ данных анамнеза обследованных больных показал, что продолжительность варьировала от 0,5 до 25 лет (медиана – $6 \pm 2,5$ лет). Продолжительность заболевания от 0,5 до 3 лет отмечена у 27% пациентов, от 3 до 5 лет – у 32%, более 5 лет – у 41% (Рис. 2.) У всех больных ХК течение заболевания было средней тяжести и тяжелое. Средний балл по шкале UAS7 при поступлении составил 24 ± 7 балла.

Полученные результаты согласуются с данными других исследований, в которых большинство пациентов ХК отмечали уртикарные высыпания более пяти лет [9].

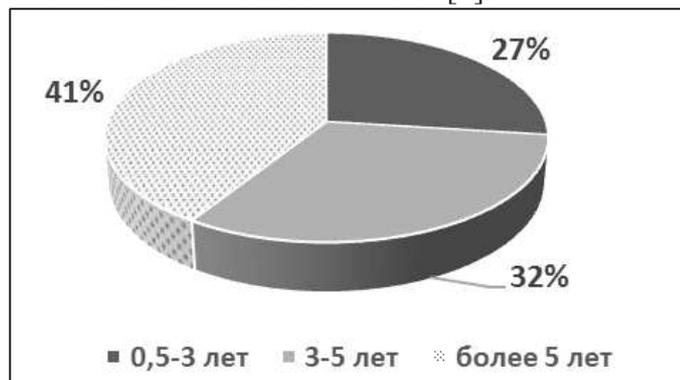


Рис. 2. Продолжительность хронической крапивницы.

Распространено мнение, что возможными триггерами ХК могут выступать псевдоаллергические реакции на пищевые продукты и лекарства, острые или хронические вирусные, бактериальные или паразитарные инфекции (например, *Helicobacter pylori*, гельминтозы). Поэтому выявление сопутствующих заболеваний у больных ХК имеет большое значение для идентификации возможных провокационных факторов и иммунопатогенетических механизмов развития болезни.

Среди сопутствующих заболеваний у больных ХК наиболее часто обнаруживали хронические заболевания желудочно-кишечного тракта (69%): дискинезия желчевыводящих путей (ДЖВП) – у 81 пациента (53%), желчекаменная болезнь (ЖКБ) – у 16 (10%), хронический гастрит – у 25 (16%); инфицирование *Helicobacter pylori* было подтверждено у 6 (4%).

Хронические заболевания ЛОР-органов (хронический фарингит, тонзиллит, синусит, вазомоторный ринит) установили у 19 человек (12%). Заболевания щитовидной железы выявили у 46 пациентов (30%): аутоиммунный тиреоидит – у 28 (17%), узловой зоб – у 18 (12%); у 5 (3%) ранее была выполнена резекция щитовидной железы. Аутоиммунные заболевания были у 9 больных ХК (6%): системная красная волчанка (СКВ) (1,3%), ревматоидный артрит (РА) (1,3%), миастения (1,3%) и витилиго (2%). В анамнезе у 4 пациентов (3%) были онкологические заболевания, а у 2 человек (1%) – хронический вирусный гепатит С.



Рис. 3. Сопутствующие заболевания у больных хронической крапивницей.

Известно, что применение препаратов из группы ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) и нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) может быть триггером развития отеков и уртикарных высыпаний. Замена этих лекар-

ственных средств на препараты из других фармакологических групп является важным этапом терапии больных ХК.

Анализ данных регистра свидетельствует, что ингибиторы АПФ для лечения гипертонической болезни принимали 40 пациентов (25%), НПВП для терапии сопутствующих дегенеративно-дистрофических заболеваний позвоночника и артрозов различной локализации – 16 человек (10%).

Всем больным определяли уровень общего IgE в сыворотке крови, который варьировал от 1 до 4704 МЕ/мл. Повышенный уровень IgE выявили у 15% больных. Хотя часто при диагностике ХК многие специалисты подразумевают её аллергический генез, патогенез этого заболевания редко связан с реакцией гиперчувствительности I типа. При углубленном аллергологическом обследовании повышение уровней специфических IgE к бытовым, пыльцевым, эпидермальным, грибковым аллергенам было выявлено лишь у 1% пациентов.

На сегодняшний день крапивницу считают гетерогенным заболеванием и рассматривают несколько теорий патогенеза, описывающих возможные гистамин-высвобождающие факторы. Среди основных патогенетических механизмов ХК выделяют накопление функциональных аутоантител к высоко-аффинному рецептору для IgE и к IgE на поверхности тучных клеток и базофилов [1, 2, 8, 10] и функциональные нарушения базофилов, обусловленные дефектами в сигнальных механизмах активации [11]. ХК, опосредованную накоплением функциональных гистамин-либерирующих аутоантител, считают аутоиммунной. В 2012 г. проблемная комиссия по номенклатуре Европейской академии аллергологии и клинической иммунологии пришла к согласию, что аутоиммунную хроническую крапивницу действительно можно рассматривать как самостоятельную нозологическую форму [12]. По мнению различных авторов, аутоиммунная крапивница составляет до 45% случаев ХК [13, 14].

Для аутоиммунной крапивницы характерно более тяжелое течение. Больные часто резистентны к применению антигистаминных препаратов, в том числе и в повышенных дозах. Лечение аутоиммунной крапивницы включает применение препаратов третьей и четвертой степени (омализумаб и циклоспорин).

Тест с аутологичной сывороткой (ТАС) является наиболее распространенным методом выявления аутореактивности, однако он прямо не подтверждает аутоиммунную природу крапивницы [1, 15]. Его можно рассматривать как метод скрининга. Отрицательный результат ТАС указывает на низкую вероятность участия аутоиммунных механизмов в патогенезе ХК [15]. Подтвердить наличие аутоантител к FcεRIα и/или IgE возможно с помощью иммуноферментного анализа (ИФА), теста высвобождения гистамина из базофилов и непрямого теста активации базофилов (ТАБ) [1, 12]. Коммерческие наборы для определения данных аутоантител методом ИФА в настоящее время отсутствуют, а тест высвобождения гистамина из базофилов достаточно трудоемкий и затратный. Наиболее доступным и перспективным для клинической практики является тест активации базофилов здоровых доноров под действием сыворотки больных ХК методом точной цитометрии [16, 17].

Непрямой тест активации базофилов выполнили 26 больным ХК (медиана возраста – 42 года), у 14 из которых тест с аутосывороткой был положительным. Высокое число базофилов с активационными маркерами CD203c установлено у 10 пациентов. Процент активированных базофилов составил $26,44 \pm 6,89\%$, ИС – $9,56 \pm 2,94$. У 12 больных ХК с отрицательной кожной пробой результаты БАТ были достоверно ниже: процент активированных базофилов составил $2,98 \pm 0,98\%$ ($p < 0,001$), ИС – $0,72 \pm 0,11$ ($p = 0,01$). Результаты внутрикожного тестирования и положительная корреляция со степенью выраженности активации базофилов позволили у 10 человек установить аутоиммунную форму хронической крапивницы.

Основным принципом фармакологического лечения ХК является контроль и полное купирование симптомов [1, 2]. Действующие согласительные документы рекомендуют в терапии крапивницы ступенчатый подход. Лечение начинают с применения антигистаминных препаратов второго поколения в стандартных дозах. Однако у 50% пациентов симптомы заболевания могут сохраняться ссылка [13]. В настоящее время эксперты при отсутствии положительной динамики рекомендуют увеличивать дозу в четыре раза [1, 2, 8]. При этом следует увеличивать дозу одного антигистаминного препарата, а не добавлять другие. Эффектив-

ность оценивают в течение двух-четырех недель. Если больного на фоне проводимой терапии продолжают беспокоить уртикарные высыпания, рекомендован переход на третью ступень терапии, которая предусматривает добавление к H1-АГ II поколения омализумаба. При неадекватном контроле симптомов на фоне терапии H1-АГ II и омализумабом (если симптомы сохраняются в течение 6 месяцев или ранее, если симптомы нестерпимы либо в отсутствие омализумаба) возможно назначение циклоспорина А в дополнение к H1-АГ II.

Современная концепция терапии хронической крапивницы по-прежнему предусматривает возможность назначения короткого курса (3-7 дней) системных глюкокортикостероидов в случае выраженного обострения заболевания [1, 8].

Всем больным после установления формы крапивницы были даны рекомендации по устранению триггеров заболевания (если возможно) и назначена терапия. На выбор препарата влияли его безопасность и эффективность, клиническая картина и тяжесть заболевания.

Большинство пациентов (61%) получали препараты второй и третьей степени терапии. У 10% больных отметили обострение заболевания, им провели курс системных ГКС. В клинику в основном поступали больные с большой продолжительностью и высокой активностью крапивницы, лечение по месту жительства которых было неэффективным. Этим можно объяснить, что у большинства пациентов использовали препараты второй и третьей степени. Используемые для лечения ХК лекарственные средства представлены в таблице.

Таблица
Терапия больных хронической крапивницей

Препараты	Количество пациентов
Неседативные H1-антигистаминные препараты в стандартной дозе	48 (30%)
Неседативные H1-антигистаминные препараты – увеличение до 2-4-кратной дозы	88 (55%)
Неседативные H1-антигистаминные препараты + глюкокортикостероиды	16 (10%)
Омализумаб	10 (6%)
Циклоспорин А	2 (1%)

ВЫВОДЫ

1. Хронической крапивницей болеют преимущественно женщины (84%), средний возраст пациентов – 45 лет.

2. Самая распространенная форма – хроническая спонтанная крапивница выявлена у 81% больных. Частота индуцируемой крапивницы составила 19%: симптоматический дермографизм – 8%, холинергическая – 4%, индуцируемая холодом – 4%, крапивница от давления – 3%.

3. Наиболее распространенная сопутствующая патология – заболевания ЖКТ(69%) и щитовидной железы (30%).

4. Непрямой тест активации базофилов *in vitro* – перспективный метод диагностики хронической аутоиммунной крапивницы, который в комплексе с тестом с аутосывороткой позволяет определить дальнейшую терапевтическую тактику.

5. Изучение клинико-иммунологических характеристик больных необходимо для выбора тактики лечения в соответствии с современными клиническими рекомендациями.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zuberbier T., Aberer W., Asero R., et al. The EAACI/GA2LEN/EDF/ WAO guideline for the definition, classification, diagnosis and management of urticaria. *Allergy Eur. J. Allergy Clin Immunol.* 2018; 73: 1393-1414. doi:10.1111/all.13397
2. Данилычева И.В. Новый европейский согласительный документ по диагностике и ведению хронической крапивницы. Что нового? Российский аллергологический журнал. 2018; 15 (4): 54-61. [Danilicheva I.V. New European consensus document on the diagnosis and management of chronic urticaria. What's new? *Russian Allergological Journal.* 2018; 15 (4): 54-61 (In Russ)].
3. Lapi F., Cassano N., Pegoraro V., et al. Epidemiology of chronic spontaneous urticaria: results from a nationwide, population-based study in Italy. *Br. J. Dermatol.* 2016; 174: 996-1004. doi:10.1111/bjd.14470
4. Lee N., Lee J.D., Lee H.Y., et al. Epidemiology of chronic urticaria in Korea using the korean health insurance database, 2010-2014. *Allergy Asthma Immunol. Res.* 2017; 9 (5): 438-445. <https://doi.org/10.4168/aair.2017.9.5.438>
5. Colgecen E., Kemal O., Gul A.I., Utas S. Evaluation of etiological factors in patients with chronic urticaria. *Acta Dermatovenerol. Croat.* 2015; 23 (1): 36-42. PMID: 25969911
6. Saini S.S. Chronic spontaneous urticaria: etiology and pathogenesis. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 2014; 34 (1): 33-52. doi.org/10.1016/j.iac.2013.09.012
7. Rabelo-Filardi R., Daltro-Oliveira R., Campos R.A. Parameters associated with chronic spontaneous urticaria duration and severity: a systematic review. *Int. Arch Allergy Immunol.* 2013; 161 (3): 197-204. doi.org/10.1159/000346896
8. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению крапивницы. М.: Российская ассоциация аллергологов и клинических иммунологов, 2019. – 32 с. [Federal clinical guidelines for the diagnosis and treatment of urticaria. Moscow: Russian Association of allergists and clinical immunologists, 2019. – 32 p. (In Russ)].
9. Kaplan A.P. What the first 10 000 patients with chronic urticarial have taught me. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009; 123: 713-720. doi.org/10.1016/j.jaci.2008.10.050
10. Rauber M.M., Pickert J., Holiangu L., et al. Functional and phenotypic analysis of basophils allows determining distinct subtypes in patients with chronic urticaria. *Allergy.* 2017; 72: 1904-1911. doi: 10.1111/all.13215
11. Kolkhir P., Church M.K., Weller K., et al. Autoimmune chronic spontaneous urticaria: what we know and what we do not know. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2017; 139: 1772-1781.e1. doi:10.1016/j.jaci.2016.08.050
12. Konstantinou G.N., Asero R., Ferrer M., et al. EAACI task force position paper: evidence for autoimmune urticaria and proposal for defining diagnostic criteria. *Allergy.* 2013; 68 (1): 27-36. doi.org/10.1111/all.12056
13. Kaplan A.P. Diagnosis, pathogenesis, and treatment of chronic spontaneous urticaria. *Allergy Asthma Proc.* 2018; 39 (3):184-190. doi:10.2500/aap.2018.39.4121
14. Hide M., Francis D.M., Grattan C.E., et al. Autoantibodies against the high-affinity IgE receptor as a cause of histamine release in chronic urticaria. *N. Engl. J. Med.* 1993; 328: 1599-1604. doi.org/10.1056/NEJM199306033282204

15. *Konstantinou G.N., Asero R., Maurer M., et al.* EAACI/GA(2)LEN task force consensus report: the autologous serum skin test in urticaria. *Allergy*. 2009; 64 (9): 1256-1268. doi.org/10.1111/j.1398-9995.2009.02132.x
16. *Козлова Я.И., Фролова Е.В., Учеваткина А.Е. и др.* Тест активации базофилов для диагностики микогенной сенсибилизации у больных муковисцидозом. *Медицинская иммунология*. 2019; 21 (5): 919-928. [Kozlova Ya.I., Frolova E.V., Uchevatkina A.E., et al. basophil activation Test for the diagnosis of mycogenic sensitization in patients with cystic fibrosis. *Medical immunology*. 2019; 21 (5): 919-928 (In Russ)].
17. *Козлова Я.И., Бурьгина Е.В., Соболев А.В., Клишко Н.Н.* Тест активации базофилов в диагностике хронической крапивницы. *Российский иммунологический журнал*. 2019; 13 (4): 1482-1484. [Kozlova Ya.I., Burygina E.V., Sobolev A.V., Klimko N.N. Basophil activation test in the diagnosis of chronic urticaria. *Russian Journal of Immunology*. 2019; 13 (4): 1482-1484 (In Russ)].

Поступила в редакцию журнала 25.02.2020

Рецензент: А.В. Соболев

РЕДКИЙ СЛУЧАЙ САРКОИДНОЙ ГРАНУЛЕМАТОЗНОЙ РЕАКЦИИ КОЖИ, ИНИЦИИРОВАННОЙ КРАСНЫМ ВИНОМ

¹Корнишева В.Г. (профессор кафедры)*, ¹Раводин Р.А. (доцент), ²Авдеенко Ю.Л. (с.н.с.), ²Гулордава М.Д. (зав. отделением), ^{1,2}Гринева Е.М. (врач-дерматолог, аспирант кафедры)

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова: ¹кафедра дерматовенерологии; ²НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, Санкт-Петербург, Россия

Гранулематозное воспаление в коже – редкая патология, при постановке диагноза которой могут возникнуть трудности. В статье описан случай саркоидной гранулематозной реакции кожи, вызванной приемом красного вина, у пациента 55 лет, который болел около 4 месяцев. Из-за неэффективности амбулаторного лечения пациент был госпитализирован. При гистологическом исследовании выявлена картина хронического гранулематозного дерматита с наличием гранул «саркоидного типа». На фоне проведения дезинтоксикационной терапии и курса гидроксихлорохина сульфата (200 мг x 2 раза в день) высыпания стали быстро разрешаться. Пациент выписан на 22-й день с выздоровлением и рекомендациями по соблюдению гипоаллергенной диеты с исключением употребления красного вина.

Ключевые слова: саркоидная гранулематозная реакция кожи, красное вино

RARE CASE OF SARCOID GRANULOMATOUS REACTION OF THE SKIN INITIATED BY RED WINE

Kornisheva V.G. (professor of the department)¹, Ravodin R.A. (associate professor), Avdeenko Y.L. (senior scientific collaborator)², Gulordava M.D. (head of the

clinical department)², Grineva E.M. (dermatologist, postgraduate student of the department)^{1,2}

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov: ¹Department of Dermatovenerology; ²Kashkin Research Institute of Medical Mycology, St. Petersburg, Russia

Granulomatous inflammation of the skin is a rare pathology that causes difficulty in making a diagnosis. The article describes the case of a sarcoid granulomatous skin reaction caused by taking red wine in a 55-year-old patient who has been ill for about 4 months. Due to the inefficiency of outpatient treatment, the patient was hospitalized. Histological examination revealed a picture of chronic granulomatous dermatitis with the presence of granulomas of the "sarcoid type". Against the background of detoxification therapy and a course of hydroxychloroquine sulfate (200 mg x 2 times a day), rashes quickly resolved. The patient was discharged on the 22nd day with recovery and recommendations for adhering to a hypoallergenic diet with the exception of drinking red wine

Key words: sarcoid granulomatous reaction, red wine

ВВЕДЕНИЕ

Гранулематозное воспаление в коже в практике врача-дерматовенеролога встречается достаточно редко, но при этом включают в себя широкий спектр патологических состояний, которые необходимо дифференцировать друг с другом, что представляет трудности в постановке диагноза. Различают неинфекционные и инфекционные заболевания кожи, протекающие с формированием гранул (Рис.1), [1].

Гранулематозные заболевания кожи	
Неинфекционные	Инфекционные
палисадообразная гранулема:	гранулёмы с казеозным некрозом:
- кольцевидная гранулёма	- туберкулёз
- эластолитическая гиганто-кл. гранулёма	- лепра
- липоидный некробиоз	- поражения кожи атипичными микобактериями
- ревматические узелки	- лейшманиоз
- реактивные гранулематозные заболевания	
эпителиоидно-клеточные гранулёмы:	гнойные гранулёмы:
- саркоидоз	- глубокие микозы
- кожные проявления болезни Крона	- пиодермии
- орофациальный гранулематоз (гранулематозный хейлит Мишера, синдром Мелькерсона-Розенталя)	- гранулематозные ЗППП (паховая гранулёма, венерический лимфогранулематоз, сифилис)
- гранулематозная розацеа	
- периоральный дерматит	
ксантоматозные гранулёмы:	
- ксантогранулёма взрослых	
- некробиотическая ксантогранулёма	
- мультицентрический ретикулогистиоцитоз	
- болезнь Розаи-Дорфмана	
- диссеминированная ксантома	
другие гранулёмы:	
- гранулематозный васкулит (гранулематоз Вегенера)	
- гранулематозные лимфолипролиферативные заболевания	
- саркоидные реакции	

Рис.1. Заболевания кожи, протекающие с формированием гранул [1].

* Контактное лицо: Корнишева Вера Гавриловна, e-mail: v.g.kornisheva@gmail.com

Если инфекционные заболевания, протекающие с формированием гранулем, достаточно известны и могут быть относительно легко диагностированы, то неинфекционные – нередко вызывают диагностические сложности.

Описание клинического случая

Пациент Т., 55 лет, поступил в клинику НИИ микологии им. П.Н. Кашкина 08.02.19 г. с жалобами на распространённые высыпания на коже туловища и конечностей, сопровождающиеся зудом и незначительной болезненностью. Из анамнеза известно, что первые высыпания появились на коже спины в конце сентября 2018 г. после употребления красного вина во время отдыха в Турции. На фоне соблюдения диеты сыпь самостоятельно разрешилась. В октябре 2018 г., после повторного употребления красного вина, вновь появилась обильная сыпь на коже груди и живота. Больной был проконсультирован в КВД с предварительным диагнозом «красный плоский лишай». Назначенная терапия была неэффективной, кожный процесс неуклонно прогрессировал, высыпания распространились на кожу верхних и нижних конечностей. В декабре 2018 г. выполнено гистологическое исследование, по результатам которого с диагнозом «саркоидоз кожи» пациент направлен на госпитализацию.

Дерматологический статус: процесс поражения кожи носил распространенный симметричный характер с локализацией на туловище, проксимальных отделах верхних и нижних конечностей. Высыпания были представлены полушаровидными папулами синюшно-красного цвета с гладкой блестящей поверхностью, плотными при пальпации, местами сливающимися в небольшие бляшки до 3 см в диаметре (Рис.2). При диаскопии симптом «запыленности» четко не определялся.

При поступлении в клинику состояние больного было удовлетворительным, видимые слизистые оболочки обычного цвета, периферические лимфоузлы не увеличены. Движения в суставах в полном объеме. Мышечная система – без патологии. Дыхание везикулярное, хрипов нет. Тоны сердца ясные, звучные, ритмичные. Артериальное давление – 130/80 мм рт. ст. Живот мягкий, безболезненный. Печень – у края реберной дуги, селезенка не увеличена. Симптом «поколачивания» по поясничной области – отрицательный.



Рис. 2. Первичный осмотр: множественные полушаровидные папулы синюшно-красного цвета, местами сливающиеся в небольшие бляшки до 3 см в диаметре.

Данные лабораторных исследований: Нв – 151 г/л, лейкоциты – $6,97 \cdot 10^9$ /л, нейтрофилы – 87%, лимфоциты – 9,8%, СОЭ – 4 мм/ч, АлАТ – 30 ед/л (0-42 ед/л), АсАТ – 22 ед/л (0-42 ед/л), креатинин – 120 мкмоль/л (44-97 мкмоль/л), мочевины – 8,7 ммоль/л (1,8-8,3 ммоль/л), холестерин – 7,9 ммоль/л (3,1-6,5 ммоль/л), триглицериды – 0,77 ммоль/л (0,14-2,29 ммоль/л), холестерин ЛПНП – 5,9 ммоль/л (3,1-6,5 ммоль/л), глюкоза – 5,19 ммоль/л (4,22-6,11 ммоль/л), билирубин – 25,5 ммоль/л (8,5-20,5 ммоль/л), кальций общий – 2,42 ммоль/л (2,3-2,75 ммоль/л), кальций ионизированный – 1,14 ммоль/л (1,05-1,3 ммоль/л). Маркеры гепатитов (HBSAg, anti – HCV), вируса иммунодефицита человека не обнаружены. Микрореакция преципитации – отрицательна. В общем анализе мочи патологии не выявлено.

Электрокардиография: синусовый ритм, ЧСС – 74 в минуту. Нормальное положение ЭОС. Неполная блокада правой ножки пучка Гиса.

На обзорной рентгенограмме органов грудной клетки очагово-инфильтративных изменений не наблюдали. Легочный рисунок не изменён. Корни легких не расширены, структурны.

Диафрагма расположена обычно. Латеральные синусы свободны. Сердце и аорта – без особенностей. Заключение: органы грудной клетки без патологических изменений.

УЗИ органов брюшной полости: эхографические признаки хронического холецистита. Косвенные признаки дискинезии желчевыводящих путей. Диффузные изменения печени, поджелудочной железы. По данным ФГДС – хронический гастрит в стадии ремиссии.

Гистологическое исследование (окраска гематоксилин-эозин и PAS): эпидермис неравномерной толщины с очаговым умеренным акантозом, паракератозом. В дерме хроническое гранулематозное воспаление с множеством хорошо очерченных небольших эпителиоидноклеточных гранул «саркоидного типа» с гигантскими многоядерными клетками типа Лангханса и инородных тел, окруженных скудным лимфоплазмочитарным инфильтратом, разрастание фиброзной ткани. Картина хронического гранулематозного дерматита с наличием гранул «саркоидного типа» (Рис. 3). При окраске по PAS в препарате присутствовали отложения муцина.

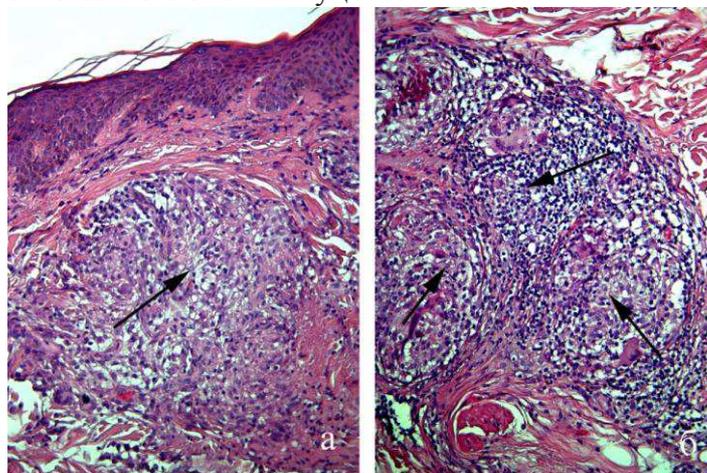


Рис. 3. Фрагменты кожи с гранулемами (стрелки) саркоидного типа в дерме. Г-Э. Ув.: а, б – х 200.

Пациент проконсультирован специалистами – фтизиатром, пульмонологом, терапевтом. Исключены туберкулёз (диаскин-тест – отрицательный) и саркоидоз (отсутствуют специфические изменения на рентгенограмме органов грудной клетки). Исключена болезнь Крона.

Сопутствующие заболевания: Гипертоническая болезнь 2. Артериальная гипертензия 2. Риск 3. Двусторонний гонартроз ст 2. Артроскопическая резекция мениска. Состояние после нефрэктомии слева (гидронефроз 3, вторич-

но сморщенная почка) от 04.17 г. Хронический эрозивный гастрит, ремиссия. Хронический холецистит, вне обострения. Диффузно-токсический зоб (тиреотоксикоз – ноябрь 2015 г).

Проведенное лечение: дезинтоксикационная терапия (Sol. Rheopolyglucini 200,0 в/в кап. №7, Sol. Natrii thiosulfatis 30% – 10 ml + Sol. Natrii chloride 0,9% – 100 ml в/в кап., №10, Sol. Pentoxifylline 2% – 5 ml + Sol. Natrii chloride 0,9%-250 ml в/в кап., медленно, №10), Tab hydroxychloroquine sulfate 200 mg по 1 таб. x 2 раза в день после еды. Наружно: 0,05% Ung. Betamethasone – 2 раза в день.

На фоне проведенной терапии высыпания стали быстро разрешаться, оставляя на месте бывших бляшек и папулезных элементов вторичные пигментированные пятна и едва заметную поверхностную атрофию (Рис. 4).



Рис. 4. Высыпания разрешились, оставив на месте бывших бляшек и папул пигментированные пятна (осмотр через неделю после выписки из клиники).

Выписан на 22-й день с выздоровлением и рекомендациями по соблюдению гипоаллергенной диеты с исключением употребления красного вина.

ОБСУЖДЕНИЕ

На основании данных анамнеза и проведенного обследования исключена группа ин-

фекционных заболеваний кожи, протекающих с формированием гранулём (Рис.1). Из группы неинфекционных заболеваний наибольшего внимания заслуживали болезни, гистологическая картина которых представлена эпителиоидноклеточными гранулёмами: саркоидоз, кожные проявления болезни Крона, орофациальный гранулематоз, гранулематозная розацеа, периоральный дерматит. Последние четыре заболевания исключены в виду отсутствия данных анамнеза и патологического процесса на лице, слизистой оболочке полости рта и специфического поражения желудочно-кишечного тракта.

Саркоидоз является системным воспалительным заболеванием неизвестной природы, характеризующимся образованием неказеифицирующихся гранулём, мультисистемным поражением с определённой частотой вовлечения различных органов, преимущественным поражением лёгких, внутригрудных лимфатических узлов, при этом вторично может поражаться кожа. Поражение кожных покровов отмечают в 25-30% случаев и обычно наблюдают у больных с висцеральным саркоидозом [2]. Для гистологической картины саркоидоза кожи характерно наличие эпителиоидноклеточной гранулемы без воспалительной реакции вокруг и внутри гранулемы [1, 3]. При гистологическом обследовании у нашего пациента выявлена эпителиоидноклеточная гранулема, окруженная скудным лимфоплазмочитарным инфильтратом (Рис.3), что не характерно для саркоидоза. При этом не обнаружено поражения лёгких или внутригрудных лимфатических узлов, и содержание кальция в сыворотке крови было в пределах нормы, что позволило исключить диагноз саркоидоза.

Кольцевидная гранулёма и липоидный некробиоз были исключены на основании клинико-патоморфологических данных – отсутствия кольцевидных высыпаний, а также бляшек желтовато-розового цвета с атрофией в центральной части, которые чаще локализуются на нижних конечностях. Патоморфологически для кольцевидной гранулемы характерно обнаружение палисадообразных гистиоцитов, окружающих зону некробиоза с примесью муцина, а для липоидного некробиоза – выраженные и обширные зоны некробиоза дермы, окружённые частоклом гистиоцитов с примесью клеток Пирогова-Лангханса. [1,3].

Реактивный гранулематозный дерматит был исключён на основании патоморфологических данных [3]: в микропрепарате отсутствовали палисадообразные гистиоциты с примесью лимфоцитов и эозинофилов, не было очагов некробиоза в дерме, не определялись вакуолизация клеток базального слоя эпидермиса и лихеноидный инфильтрат в дерме, в то же время у данного пациента присутствовали гранулёмы саркоидного типа с отложениями муцина.

Группа заболеваний, характеризующихся наличием ксантоматозных гранулём, была исключена на основании отсутствия в микропрепаратах пенистых клеток. Гранулематозные лимфопролиферативные заболевания исключены патоморфологически ввиду отсутствия атипичных Т-лимфоцитов.

На основании имеющейся клинической картины: распространённые папулезные высыпания, бляшки синюшно-красного цвета, дающие при диаскопии слабый симптом «запыленности» и анамнестически связанные с употреблением красного вина, разрешающиеся после его исключения, а также особенностей патоморфологической картины (наличие гранулём саркоидного типа в дерме, окруженных скудным лимфоплазмочитарным инфильтратом), был выставлен диагноз саркоидной гранулематозной реакции кожи. Выявление при гистологическом исследовании гранулематозного воспаления саркоидного типа явилось показанием для назначения гидроксихлорохина, обладающего противовоспалительным и умеренным иммуносупрессивным действием. Быстрота разрешения высыпаний, которую ускорила проводимая терапия, также подтверждает диагноз саркоидной реакции. Основной тактикой ведения этих больных является исключение предполагаемого фактора, индуцировавшего саркоидную реакцию, и активное наблюдение за больным.

Саркоидные реакции возможны в ответ на инородные тела различного происхождения, лекарства, на инфильтративные процессы, главным образом, при злокачественных опухолях, встречаются при длительном лечении фторсодержащими кортикостероидными мазями, при вульгарных угрях и микротравмах [3-6].

Биологическое значение гранулематозного ответа остается неизвестным. Предполагают, что гранулематозное воспаление может пред-

ставлять собой иммунологический ответ на антигены. Можно допустить, что красное вино было потенциальным фактором, который явился триггером в развитии клеточного иммунного ответа и гранулематозной реакции у генетически предрасположенного пациента, имеющего хронические гастрит и холецистит.

Красное вино может быть экзогенным фактором, полифенолы которого стимулируют интерферон-альфа и который инициирует начало формирования гранулём. В появлении гранулематозных высыпаний принимают участие интерферон-гамма, CD4+ Т-лимфоциты [7, 8]. Известно, что введённый извне интерферон стимулирует Th-1 клеточный ответ, который играет ведущую роль в образовании гранулём. Зна-

чение применения интерферона в формировании гранулематозной реакции подтверждается ее развитием не только при гепатите С, но и при лечении множественной миеломы и миелогенной лейкемии. В большинстве случаев ИНФ-индуцированной саркоидной реакции кожи болезнь стихала после отмены интерферона [8].

Подтверждением роли красного вина в развитии саркоидной гранулематозной реакции кожи у нашего пациента является отсутствие высыпаний в течение года после выписки больного из стационара. В этот период, выполняя наши рекомендации, пациент полностью исключил употребление красного вина.

ЛИТЕРАТУРА

1. English J.C. 3rd. Granulomatous disorders of the adult skin: Twenty-First Century. *Dermatol Clin.* 2015; 33 (3): xiii. doi: 10.1016/j.det.2015.05.001
2. Сычева Н.А., Фаустов Л.А., Осмоловская П.С. Трудности клинической диагностики атипично протекающего саркоидоза кожи. *Клиническая дерматология.* 2016; 2: 19-24. [Sycheva N.A., Faustov L.A., Osmolovskaya P.S. Difficulties in clinical diagnosis of atypical skin sarcoidosis. *Clinical Dermatology.* 2016; 2: 19-24 (In Russ)].
3. Родионов А.Н. Дерматовенерология. Полное руководство для врачей. СПб: Наука и Техника. 2014: 1200 с. [Rodionov A. N. *Dermatovenerology. Complete guide for doctors.* Saint Petersburg: Science and Technology. 2014: 1200 p. (In Russ)].
4. Tchernev G., Tana C., Schiavone C., et al. Sarcoidosis vs. Sarcoid-like reactions: The Two Sides of the same Coin? *Wien Med. Wochenschr.* 2014; 164: 247-259. doi.org/10.1007/s10354-014-0269-x
5. Labib S.M., Labib M.M. Cutaneous sarcoid reaction in a case of acute lymphoblastic leukemia. *Indian J. Dermatopathol. Diagn. Dermatol.* 2018; 5: 57-9. doi.org/10.4103/ijdpdd.ijdpdd_28_17
6. Rosenbach M., English J.C. 3rd Reactive granulomatous dermatitis: A Review of palisaded neutrophilic and granulomatous dermatitis, interstitial granulomatous dermatitis, interstitial granulomatous drug reaction, and a proposed reclassification. *Dermatol. Clin.* 2015; 33: 373-87. doi.org/10.1016/j.det.2015.03.005
7. Cueva C., Gil-Sánchez I., Ayuda-Durán B., et al. An integrated view of the effects of wine polyphenols and their relevant metabolites on gut and host health. *Molecules.* 2017; 22 (1): 99. doi.org/10.3390/molecules22010099
8. Визель А.А., Созинов А.С., Визель Е.А. Саркоидное гранулематозное воспаление при проведении противовирусной терапии. *Пульмонология.* 2009; 3: 119-123. [Wiesel A.A., Sozinov A.S., Wiesel E.A. Sarcoid granulomatous inflammation during antiviral therapy. *Pulmonology.* 2009; 3: 119-123 (In Russ)].

Поступила в редакцию журнала 04.02.2020

Рецензент: Л.П. Котрехова

К ВОПРОСУ ОБ ОЦЕНКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ЗООАНТРОПОНОЗНОЙ ТРИХОФИТИИ

**Хисматуллина З.Р. (зав. кафедрой),
Титова Т.Н. (доцент)*, Альхашаш Субхи
М.С. (аспирант), Титова А.А. (ассистент)**

Башкирский государственный медицинский
университет, Уфа, Россия

Представлен новый подход к оценке эффективности лечения трихофитии, включающий определение содержания интерлейкина-4 (ИЛ-4) в венозной крови, в сравнении с микроскопическим и культуральными методами исследования. Применение последних способствовало установлению видовой принадлежности дерматомицетов с характерными фенотипическими признаками в клиническом материале от пациентов с низкой эффективностью лечения трихофитии, что коррелировало с результатами иммунологического обследования. В частности, значение концентрации ИЛ-4 превышало 160 пг/мл. Определение концентрации этого цитокина может быть использовано для точной оценки эффективности терапии трихофитии.

Ключевые слова: трихофития, микологическая диагностика, оценка эффективности лечения, интерлейкин-4

TO THE QUESTION OF ESTI- MATING THE EFFECTIVENESS OF ZOOANTROPONOZE TRI- CHOPHYTOSIS TREATMENT

**Khismatullina Z.R. (head of the depart-
ment), Titova T.N. (associate professor),
Alhashash Subhi M.S. (graduate student),
Titova A.A. (assistant of the department)**

Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

A new approach to assessing the effectiveness of trichophytosis treatment, including the determination of the content of interleukin-4 (IL-4) in venous blood, in com-

parison with microscopic and cultural methods of research is presented. Using the methods of mycological diagnostics, the type of dermatomycetes with characteristic phenotypic signs in the clinical material from patients with low treatment efficacy of trichophytosis was established. This correlated with the results of an immunological examination of these patients. In particular, the concentration of IL-4 exceeded 160 pg / ml. Determining the concentration of this cytokine can be used to evaluate the effectiveness of trichophytosis treatment.

Key words: trichophytosis, mycological diagnostics, evaluation of treatment effectiveness, interleukin-4

ВВЕДЕНИЕ

Среди грибковых заболеваний дерматомикозы являются одной из серьезных проблем клинической медицины во всем мире в связи высокими показателями и неуклонным ростом заболеваемости населения [1, 2]. Многие авторы отмечают, что эпидемиологическая ситуация по дерматомикозам, вызываемым зоофильными грибами рода *Trichophyton*, в России продолжает оставаться неблагоприятной. По частоте встречаемости среди микозов волосистой части головы трихофития занимает второе место, уступая лишь микроспории [3, 4]. В последние годы отмечена тенденция к постепенному росту заболеваемости [5]. Патология характерна для сельских жителей, среди городского населения она в разы ниже [6]. Своевременную диагностику зооантропонозных дерматомикозов, а также контроль эффективности лечения заболевания затрудняют клиническое многообразие, наличие атипичных и стертых форм, число которых за последние годы возросло [7, 8].

К регламентированным методам лабораторной диагностики трихофитии относятся микроскопическое и культуральное (микологическое) исследования [9-13]. Применение этих методов для оценки эффективности лечения дерматомикозов затрудняется тем, что посев на питательные среды с последующим определением вида возбудителя занимает до трех недель. В то же время микроскопическое исследование клинического материала, которое возможно использовать как экспресс-тест, не позволяет определить вид возбудителя дерматомикоза [4, 14]. Таким образом, перечисленные недостатки известных методов требуют подключения других способов оценки эффективности проведенной терапии.

Известно, что эффективность лечения трихофитии оценивают по клинической картине,

* Контактное лицо: Титова Татьяна Николаевна,
e-mail: titova1971@mail.ru

при визуальном осмотре пораженных участков [15-17], а также путем определения готовности к фагоцитозу нейтрофилов в капиллярной крови, взятой из пораженных участков. При этом эффективность терапии считают высокой, если на десятые сутки процент фагоцитов, готовых к фагоцитозу, больше 40%, а фагоцитарное число больше 4,0, как низкая – если эти показатели будут <20% и <3,3 соответственно [18].

Также эффективность лечения при трихофитии определяют с помощью функционального состояния фагоцитов (показателей фагоцитарной активности клеток венозной крови). Мы увидим, что в начальный период заболевания уровень значений снижается, а в период выздоровления – увеличивается [19]. Но данный метод не дает возможность выявить наличие воспалительной реакции в дерме у пациентов с трихофитией, индуцируемой образованием иммунозависимых цитокинов и медиаторов.

Цель исследования – разработка новых подходов к оценке эффективности лечения трихофитии, включающих определение содержания интерлейкина-4 (ИЛ-4) в венозной крови, в сравнении с микроскопическим и культуральным методами исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве клинического материала использовали волосы, волосяные фолликулы, соскобы с кожи, чешуйки, корочки, венозную кровь от 53 больных с диагнозом «трихофития», находящихся на стационарном лечении в ГАУЗ «Республиканский кожно-венерологический диспансер №1» г. Уфы.

Микологическая диагностика включала микроскопию нативных препаратов. Для растворения ороговевших масс и просветления препаратов использовали 10% раствор КОН. Готовые препараты микроскопировали под малым ($\times 100$) и большим ($\times 400$) увеличением без иммерсии (AxioImager M1, Германия). Результат исследования считали положительным, если в препарате обнаруживали нити мицелия или цепочки конидий. Также учитывали расположение элементов гриба относительно стержня волоса.

На следующем этапе для выделения возбудителей трихофитии клинический материал засеивали на питательные среды. Основной средой послужила № 2 ГРМ (Сабуро) (ФБУГ ГНЦ ПМБ, Россия). Кроме этого, использовали селективную среду M188 для выделения дермато-

мицетов («HiMedia», Индия) и дифференциально-диагностическую питательную среду с экстрактом белого риса, позволяющую идентифицировать видовую принадлежность культур дерматомицетов M1026 («HiMedia», Индия). Затем инкубировали в течение двух-трех недель при температуре 25-30 °С. Видовую принадлежность возбудителя устанавливали с помощью определителя патогенных грибов Саттона (2001).

Концентрацию ИЛ-4 выявляли в сыворотке венозной крови с применением набора реагентов ProCon IL-4 (ООО «Протеиновый контур», Россия), предназначенного для количественного определения интерлейкинов в исследуемых образцах [20]. Отмечали концентрацию ИЛ-4 на десятые сутки терапии и оценивали ее эффективность: высокая – при значении концентрации цитокина менее 105 пг/мл и низкая – при его концентрации выше 160 пг/мл.

У каждого пациента все виды исследований проводили до начала, на десятый и в последний день лечения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При микроскопическом исследовании клинических образцов до начала лечения в чешуйках кожи наблюдали нити мицелия диаметром 2-4 мкм, плохо окрашивающегося, различной длины, прямые, иногда ветвящиеся и септированные. Также обнаруживали расположенные свободно или в виде цепочек полиморфные споры неправильной формы. Эти признаки затрудняли морфологическую идентификацию дерматомицетов, но все-таки подтверждали грибковое происхождение поражений. У пораженных волос отмечали расположение спор в виде параллельных цепочек снаружи волоса. Споры крупные, диаметром 5-7 мкм, что характерно для *Trichophyton ectothrix megasporon*.

В результате культурального исследования выделенные дерматомицеты были отнесены к виду *Trichophyton verrucosum*. Отметим, что данный вид сложно культивируется. Однако образования характерных морфологических признаков добились добавлением в среду тиамина и повышением температуры до 37 °С. Медленно-растущие колонии – в виде диска с порошковатой беловатой периферической зоной и серовато-желтым возвышающимся кожистым морщинистым центром. При микроскопии определяли много ветвящегося мицелия, изредка встречали

микро- и макроконидии. Наблюдала образование концевых и интеркалярных хламидоспор в виде четок по ходу мицелия.

Применение микроскопического и культурального исследований на 10 день лечения способствовало установлению видовой принадлежности дерматомицетов с характерными фенотипическими признаками в клиническом материале от пациентов с низкой эффективностью лечения трихофитии, что коррелировало с результатами иммунологического обследования этих пациентов, т.е. показателями концентрации ИЛ-4 выше 160 пг/мл. Это соответствовало наличию воспалительной реакции в дерме, индуцируемой иммунозависимыми цитокинами и медиаторами.

При сравнении результатов измерения концентрации ИЛ-4 у больных трихофитией до начала, на десятый и в последний день терапии с разной степенью эффективности установлен достоверно более низкий уровень содержания ИЛ-4 (менее 105 пг/мл) на десятый день лечения у пациентов с высокой степенью эффективности и высокий уровень данного цитокина (более 160 пг/мл) – у больных с низкой степенью эффективности.

Пример 1. Больной И., 15 лет, находился на стационарном лечении с диагнозом «инфильтративная трихофития гладкой кожи (17 очагов), обусловленная *T. verrucosum*».

При определении концентрации ИЛ-4 в крови данного пациента выявили, что до начала лечения содержание цитокина составляло 97,3 пг/мл, к десятому дню – его уровень возрос до 166,6 пг/мл и на момент выписки (27 день) – снизился до 108,6 пг/мл. В процессе терапии наблюдали долгое разрешение очагов. На 19-й

день терапии отмечали снижение гиперемии. Контурирование очагов наблюдали вплоть до последнего дня терапии. В день выписки имело место легкое шелушение в очагах при физиологической окраске кожи. Таким образом, длительное разрешение заболевания, связанное с увеличением содержания ИЛ-4 на десятые сутки и незначительным снижением этого показателя в конце терапии, оценили как низкую эффективность лечения.

Пример 2. Больной К., 14 лет, обратился с жалобами на непонятные бляшки в зоне роста волос головы. Провели полное обследование и выставили диагноз: инфильтративная трихофития волосистой части головы (5 очагов), обусловленная *T. verrucosum*.

На момент обращения содержание ИЛ-4 в крови составляло 97,6 пг/мл, через десять дней терапии – уменьшилось до 83,1 пг/мл. Выявлено, что при снижении уровня ИЛ-4 в крови пациента улучшалось его состояние. Визуально на десятые сутки в очагах инфильтрация заметно уплостилась, контуры сгладились, гиперемии не наблюдали. Отмечен высокий уровень эффективности лечения. На 17-й день терапии (выписка) очаги не контурировались, кожа без особенностей. Таким образом, лечение оценено эффективным, т.к. снижение концентрации ИЛ-4 в сыворотке крови на десятые сутки терапии способствовало ускоренному выздоровлению.

ВЫВОДЫ

Определение содержания интерлейкина-4 в сыворотке венозной крови может быть использовано для точной оценки эффективности проводимого лечения трихофитии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kastelan M., Utjesinovic-Gudelj V., Prpic-Massari L., et al. Dermatophyte Infections in Primorsko-Goranska County, Croatia: a 21-year Survey. Acta Dermatovenerol. Croat. 2014; 22 (3): 175-179. PMID: 25230057
2. Miyajima Y., Satoh K., Uchida T., et al. Rapid real-time diagnostic PCR for *Trichophyton mentagrophytes* in patients with tinea unguium and tinea pedis using specific fluorescent probes. J. Dermatol. Sci. 2013; 69 (3): 229-235. doi.org/10.1016/j.jdermsci.2012.11.589
3. Ефимов Г.Е., Мавзютов А.Р., Титова Т.Н., Мухамадиева Р.Р. Эпидемиологически обоснованная сравнительная оценка информативности методов лабораторной диагностики зооантропонозной трихофитии. Клиническая лабораторная диагностика. 2015; 60 (7): 58-62. [Efimov G.E., Mavzyutov A.R., Titova T.N., Mukhamadieva R.R. Epidemiologically based comparative assessment of the informativeness of methods of zoonanthropozone trichophytosis laboratory diagnostics. Clinical Laboratory Diagnostics. 2015; 60 (7): 58-62 (In Russ)].
4. Медведева Т.В., Леина Л.М., Чилина Г.А., Богомолова Т.С. Трихомикозы: история изучения, современные представления об эпидемиологии, этиологии, диагностике и лечении. Клиническая дерматоло-

гия и венерология. 2011; 6: 16-22. [Medvedeva T.V., Leina L.M., Chilina G.A., Bogomolova T.S. Trichomycosis: the history of the study, modern ideas about epidemiology, etiology, diagnosis and treatment. *Clinical Dermatology and Venereology*. 2011; 6: 16-22 (In Russ)].

5. Хисматуллина З.Р., Попова Д.Р., Мухаммадеева О.Р., Мустафина Г.Р. Новые подходы к диагностике зооантропонозной трихофитии. *Практическая медицина*. 2012; 1 (56): 132-138. (URL: <http://pmarchive.ru/novye-podxody-k-diagnostike-zooantroponoznoj-trixofitii>) [Khismatullina Z.R., Popova D.R., Mukhamadeeva O.R., Mustafina G.R. New approaches to the diagnosis of zoonthroponose trichophytosis. *Practical medicine*. 2012; 1 (56): 132-138 (In Russ)].

6. Ерзина Е.И., Позднякова О.Н. Современные особенности эпидемиологии микроспории и трихофитии у детей. *Медицина и образование в Сибири*. 2012; 1: 29. [Erzina E. I., Pozdnyakova O. N. Modern features of the epidemiology of microsporia and trichophytosis in children. *Medicine and education in Siberia*. 2012; 1: 29 (In Russ)].

7. Ефимов Г.Е., Мавзютов А.Р., Титова Т.Н. и др. Оптимизация лабораторной составляющей диагностической подсистемы эпидемиологического надзора за микроспорией. *Медицина в Кузбассе*. 2013; 12 (2): 53-58. [Efimov G.E., Mavzyutov A.R., Titova T.N., et al. Optimization of the laboratory component of the diagnostic subsystem of epidemiological surveillance of microsporia. *Medicine in Kuzbass*. 2013; 12 (2): 53-58 (In Russ)].

8. Feetham J.E., Sargant N. Kerion celsi: a misdiagnosed scalp infection. *Archives of Disease in Childhood*. 2016; 101: 503. doi.org/10.1136/archdischild-2015-309756

9. Васильева Н.В., Елинов Н.П., Богомолова Т.С. и др. Микологические культуральные исследования: методические рекомендации. СПб., 2013. – 47 с. [Vasilyeva N.V., Yelinov N.P., Bogomolova T.S., et al. *Mycological cultural studies: methodological recommendations*. SPb., 2013. – 47 p. (In Russ)].

10. Ахмади М.С., Кухар Е.В. Классические методы диагностики дерматомикозов животных и человека. *Sworld: сборник научных трудов*. 2013; 38 (2): 87-95. [Ahmadi M.S., Kukhar E.V. Classical methods of diagnostics of animal and human dermatomycosis. *Sworld: a collection of scientific papers*. 2013; 38 (2): 87-95 (In Russ)].

11. Родионов А.Н. Грибковые заболевания кожи: руководство для врачей. СПб., М., Харьков, Минск, 2000. [Rodionov A.N. *Fungal skin diseases: a guide for doctors*. SPb., M., Kharkov, Minsk, 2000 (In Russ)].

12. Меньшиков В.В. Методики клинических лабораторных исследований. М.: Лабора, 2009. – 880 с. [Menshikov V.V. *Methods of clinical laboratory research*. Moscow: Labora, 2009. – 880 p. (In Russ)].

13. Лещенко В.М. Лабораторная диагностика грибковых заболеваний. М.: Медицина, 1982. – 144 с. [Leshchenko V.M. *Laboratory diagnostics of fungal diseases*. Moscow: Meditsina, 1982. – 144 p. (In Russ)].

14. Bennassar A., Grimalt R. Management of tinea capitis in childhood. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2010; 3: 89-98. doi.org/10.2147/CCID.S7992

15. Пестерев П.Н. Трихофития зооантропонозная. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1998. – 124 с. [Pesterev P.N. *Trichophytosis zoonthroponose*. Tomsk, 1998. – 124 p. (In Russ)].

16. Chen X., Jiang X., Yang M., et al. Systemic antifungal therapy for tinea capitis in children. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2016. doi.org/10.1002/14651858.CD004685.pub3

17. John A.M., Schwartz R.A., Janniger C.K. The kerion: an angry tinea capitis. *International Journal of Dermatology*. 2016; 57: 3-9. doi.org/10.1111/ijd.13423

18. Азнабаева Л.Ф., Кильсенбаева Ф.А., Кузнецова Т.Н. и др. Способ оценки эффективности лечения трихофитии. Патент на изобретение RUS 2246113 10.02.2005 [Aznabayeva L.F., Kilsenbayeva F.A., Kuznetsova T.N., et al. Method for evaluating the effectiveness of treatment of trichophytosis. Patent for the invention RUS 2246113 10.02.2005 (In Russ)].

19. Медведев Ю.А. Молекулярно-клеточные механизмы иммуногенеза при зоонозной трихофитии: Автореферат дисс. ... докт. мед. наук. М., 1988. – 36 с. [Medvedev Y.A. *Molecular-cellular mechanisms of immunogenesis in zoonotic trichophytosis: Abstract of MD dissertation*. M., 1988. – 36 p. (In Russ)].

20. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Истамов Х.И. Экологическая иммунология. М.: ВНИРО, 1995. – 220 с. [Khaitov R.M., Pinegin B.V., Istamov H.I. *Environmental immunology*. M.: VNIRO, 1995. – 220 p. (In Russ)].

Поступила в редакцию журнала 16.01.2020

Рецензент: Л.П. Котрехова

СКАНИРУЮЩАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК *CANDIDA AURIS*

¹Васильева Н.В. (директор института, зав. кафедрой), ¹Степанова А.А. (зав. лаб.)*, ²Круглов А.Н. (зав. лаб.), ³Генералова О.К. (зав. лаб.), ⁴Орлова О.Е., (зав. лаб.) ⁴Митрохин С.Д. (зав. отд.), ⁴Шкода А.С. (главный врач), ¹Чилина Г.А. (зав. лаб.), ¹Босак И.А. (с.н.с.), ¹Выборнова И.В. (н.с.), ¹Мошкевич И.Р. (доцент)

¹Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова: НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина и кафедра медицинской микробиологии, Санкт-Петербург; ²Городская клиническая больница №24, Москва; ³Национальное агентство клинической фармакологии и фармации, Москва; ⁴Городская клиническая больница №67 им. Л.А. Ворохобова, Москва, Россия

На примере десятидневных колоний четырех штаммов (РКПГУ-1821, -1881, -1882, -1883) *Candida auris* показано, что их основными морфологическими составляющими являются образования по типу «сопок». Специфическая особенность строения зрелых дрожжевых клеток *C. auris* – мелкозернистая скульптура поверхности их клеточных стенок. Наличие внеклеточного липида на поверхности зрелых дрожжевых клеток усиливает адгезивные свойства их клеточных стенок и приводит к формированию биопленок специфического строения. Рассмотрены цитологические аспекты межштаммовых различий *C. auris*.

Ключевые слова: *Candida auris*, *in vitro*, микроморфология, сканирующая электронная микроскопия

SCANNING ELECTRON MICROSCOPY OF *CANDIDA AURIS* YEAST CELLS

¹Vasilyeva N.V. (director of the institute, head of the department), ¹Stepanova A.A.

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

(head of the laboratory), ²Kruglov A.N. (head of the laboratory), ³Generalova O.K. (head of the laboratory), ⁴Orlova O.E. (head of the laboratory), ⁴Mitrochin S. D. (head of the clinical department), ⁴Shkoda A.C. (head physician), ¹Chilina G.A. (head of the laboratory), ¹Bosak I.A. (senior scientific collaborator), ¹Vybornova I.V. (scientific researcher), ¹Moshkevich I.R. (associate professor)

¹North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov: Kashkin Research Institute of Medical Mycology and Department of Medical Microbiology, St. Petersburg; ²Municipal Clinical Hospital №24, Moscow; ³National Agency of Clinical Pharmacology and Pharmacy, Moscow; ⁴L.A. Vorokhobov Municipal Clinical Hospital №67, Moscow, Russia

On the example of 10 day colonies of four strains (PKPGU-1821, -1881, -1882, -1883) of Candida auris, it was shown that their main morphological components were "scoop" type morphological formations. Specific feature of the structure of C. auris mature yeast cells was the fine-grained sculpture of the surface of their cell walls. The presence of extracellular lipids on the surface of mature yeast cells enhances the adhesive properties of their cell walls, which leads to the formation of specific biofilms. Cytological aspects of C. auris inter-strains differences are described.

Key words: *Candida auris*, *in vitro*, microscopic morphology, scanning electron microscopy

ВВЕДЕНИЕ

Candida auris Satoh & Makimura – дрожжи, которые распространились по всему миру сравнительно недавно (с 2009 г.). Они ответственны за нозокомиальные инвазивные инфекции, часто связанные с высокой заболеваемостью и смертностью [1-3]. Ранее нами на примере штамма РКПГУ-1821 данного вида гриба были исследованы особенности тонкого строения в трансмиссионном электронном микроскопе (ТЭМ) [4]. Было показано, что специфической ультраструктурной особенностью строения зрелых дрожжевых клеток изученного штамма является наличие внеклеточного липидного «гало», формирование которого обусловлено вторичным использованием запасных липидных включений их содержимого. Ранее нами впервые в ходе изучения архитектоники колоний ряда видов рода *Candida* в ТЭМ было показано [5], что особенности их структурной пространственной ор-

ганизации существенно различаются и в целом характеризуют вид гриба. Представляло интерес провести детальное исследование в сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) ультраструктуры дрожжевых клеток культур разных штаммов *C. auris* и выяснить особенности ультраструктуры, характерные для данного вида гриба.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследовали культуры четырех штаммов (РКПГУ-1821, -320559, -320569, -320573) *Candida auris* Satoh & Makimura из Российской коллекции патогенных грибов НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина. Штамм РКПГУ-1821 был впервые изолирован из крови больного в России (Национальное агентство клинической фармакологии и фармации, Москва), другие три были получены при посеве мочи пациентов, наблюдавшихся в Городской клинической больнице №67 им. Л.А. Ворохобова, Москва). Видовую принадлежность штаммов определяли секвенированием ДНК по региону ITS, как это было описано ранее [6]. Культуры гриба выращивали 10 дней на агаризованной среде Сабуро при 37 °С. Колонии изучали и фотографировали в стереомикроскопе Zeiss Stemi 2000.

Для СЭМ небольшие кусочки с разных участков колоний гриба и с питательной средой фиксировали по методике, описанной нами ранее [7]. Затем образцы высушивали при критической точке на приборе НСР-2 в течение 15 минут, после чего их напыляли золотом и исследовали в сканирующем электронном микроскопе JSM 35 (Jeol, Токио, Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика колоний. Диаметр колоний гриба через 10 дней роста на среде Сабуро при 37 °С для штамма РКПГУ-1821 составлял 3,5 см (Рис. 1 а), РКПГУ-1881 – 3,0 см (Рис. 1 б), РКПГУ-1882 – 2,5 см (Рис. 1 в), РКПГУ-1883 – 3,3 см (Рис. 1 г). Колонии мягкие, кремовые. Их морфология у штамма РКПГУ-1821 (Рис. 1 а), изолированного из крови, отличается от трех РКПГУ-1881, -1882, -1883 других, высеянных из мочи (Рис. б-г). Центральная часть колонии штамма РКПГУ-1821 не прозрачная, тонкогранулярной текстуры (Рис. 1 а); в остальных – гладкая (Рис. 1 б-г). Для колонии штамма РКПГУ-1821 был характерен тонкий и гладкий

край (Рис. 1 а), тогда как для остальных – более широкий, крупнозубчатый (Рис. 1 б-г).

Ультраструктура дрожжевых клеток колоний.

РКПГУ-1821. Размеры дрожжевых клеток центральной и краевой зон колоний всех изученных штаммов варьировали от 2,0-2,5 до 4,5-5,0 мкм. Форма дрожжевых клеток округлая или эллипсоидная. Почкующиеся дрожжевые клетки встречались редко (Рис. 1 ж, к, стрелка). В центральной части 10-дневной колонии плотность расположения дрожжевых клеток довольно редкая – так, что просматривается поверхность питательной среды (Рис. 1 д). Большая часть дрожжевых клеток располагается в толще питательной среды, о чем свидетельствуют контуры полупогруженных дрожжевых клеток (Рис. 1 д, головки стрелок). Дрожжевые клетки на поверхности питательной среды формируют выпуклые скопления в виде «сопок» с полусферическим апексом, диаметром от 12 до 50 мкм (Рис. 1 д, стрелки). Плотность расположения и размеры «сопок» – постепенно увеличивающиеся в радиальном направлении. На электроннограмме (Рис. 1 е) продемонстрировано строение средней части колонии, где можно наблюдать все стадии формирования скоплений дрожжевых клеток, которые в формирующихся «сопках» редко находятся на разных стадиях почкования. Эти скопления обычно расположены на некотором расстоянии друг от друга, но иногда и контактируют друг с другом. «Сопки» представляют собой оформленные скопления хаотично и плотно адгезированных разновозрастных дрожжевых клеток гриба. В сформированных «зрелых сопках» скопления дрожжевых клеток на стадии почкования встречаются как исключение (Рис. 1 ж). Поверхность клеточных стенок дрожжевых клеток может быть гладкой (Рис. 1 ж, з, стрелки) либо мелкозернистой (Рис. 1 ж, з, головки стрелок). Частота встречаемости рубчиков в клеточных клетках невысокая, они могут быть апикальными (Рис. 1 з) или латеральными. При изучении на малом увеличении СЭМ гладкого периферического края колонии (Рис. 1 а) заметно, что он имеет вид «плато» с трещинами разной толщины и протяженности (Рис. 1 и, стрелки).

Дрожжевые клетки с гладкой и мелкозернистой текстурой клеточной стенки встречаются одинаково часто. На поверхности дрожжевых клеток (Рис. 1 к, л, стрелки) и в зонах их контак-

та (Рис. 1 к, л, головки стрелок) видны умеренные скопления наружного внеклеточного липида. Рубчики встречаются часто, они одиночные апикальные, апикально-латеральные либо по 4 в апексе. Максимальное их число на поверхности клеточной стенки одной дрожжевой клетки доходит до 5-6. На поверхности зрелых и часто в промежутках между соседними дрожжевыми

клетками изученной колонии имеются умеренно развитые отложения внеклеточного липидного «гало» (Рис. 1 з, к, л, головки стрелок).

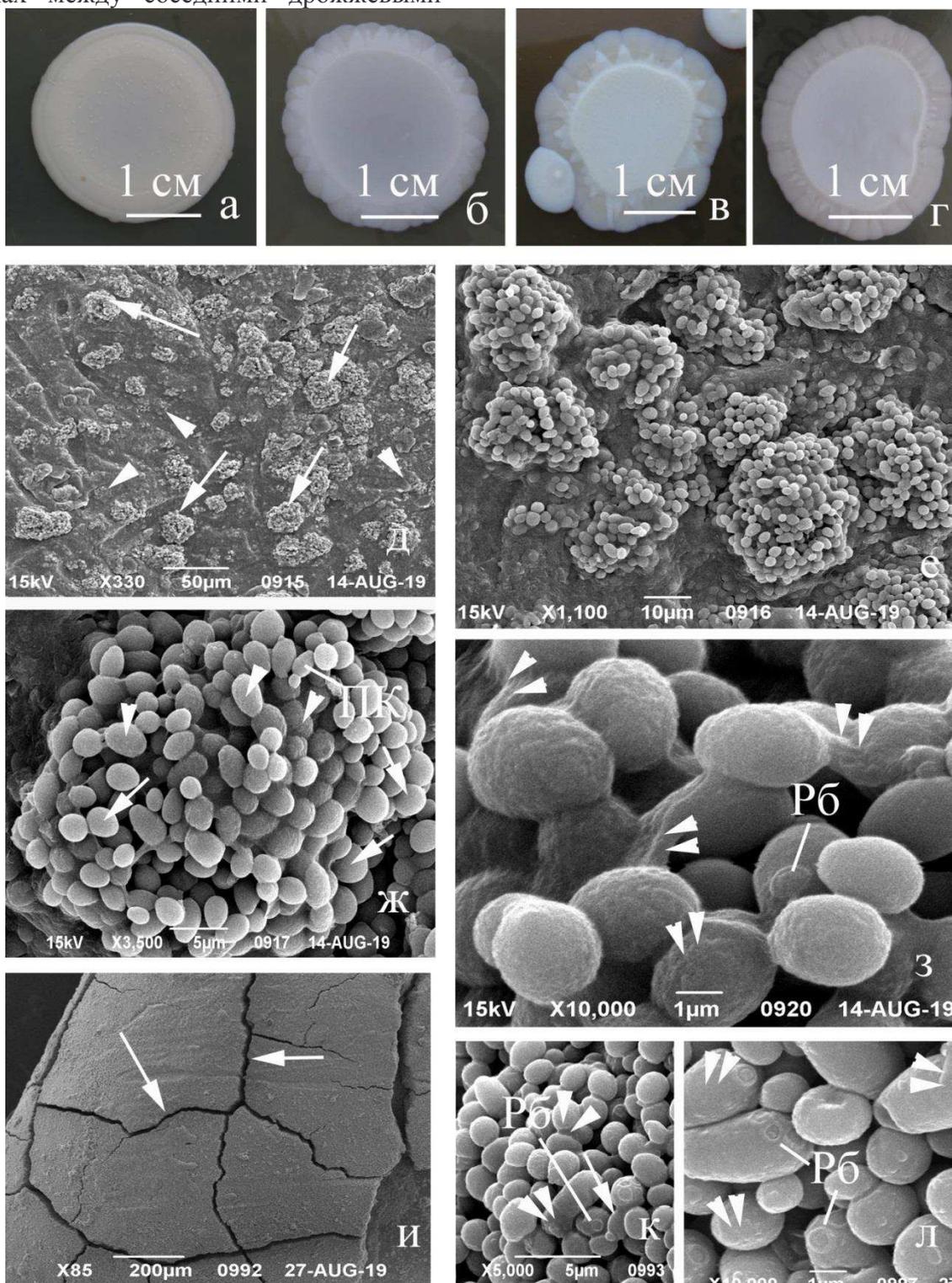


Рис. 1. *Candida auris*: а-г – общий вид 10 дневных колоний; д-л – ультраструктура клеток колоний в СЭМ. а, д-л – РКПГУ-1821, б – РКПГУ-1881; в – РКПГУ-1882, г – РКПГУ-1883. Условные обозначения здесь и на рисунках 2 и 3: ПК – почкующаяся клетка; Рб – рубчик.

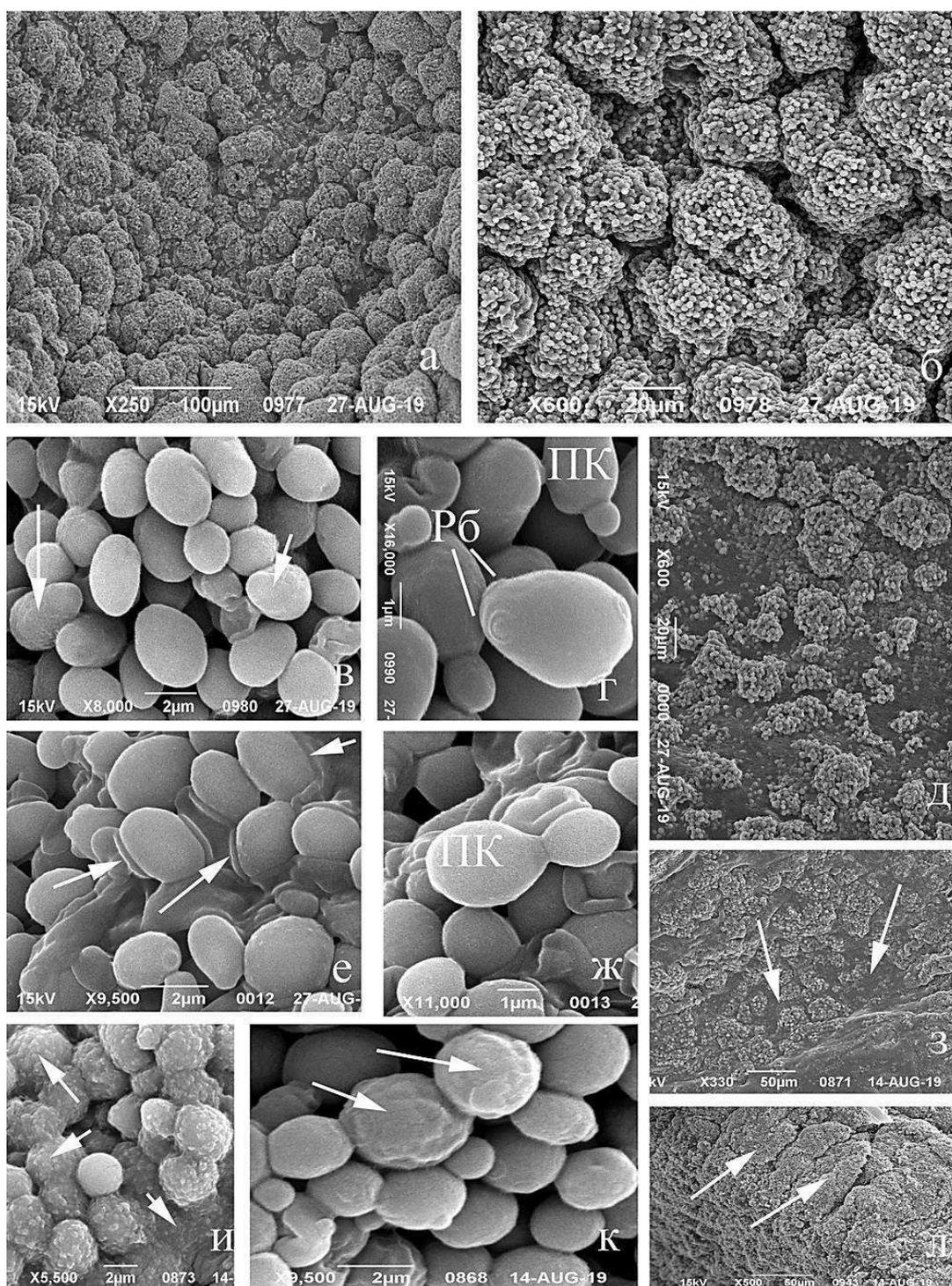


Рис. 2. Ультраструктурная организация дрожжевых клеток культур *Candida auris* в СЭМ. а-г – РКПГУ-1881, д-ж – РКПГУ-1882, з-л– РКПГУ-1883.

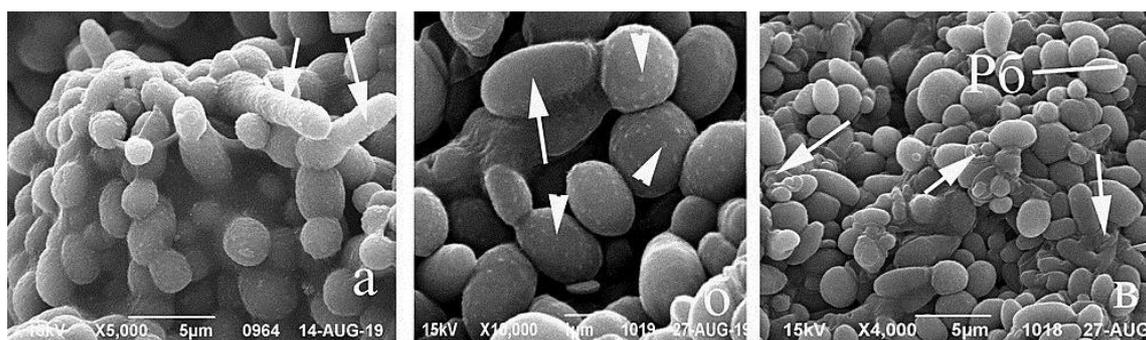


Рис. 3. Особенности строения дрожжевых клеток культур *Candida auris* в СЭМ. а-в – РКПГУ-1883.

РКПГУ-1881. Центральная часть 10-дневной колонии состоит из скоплений дрожжевых клеток гриба в форме «сопок», располагающихся настолько плотно, что поверхность питательной среды при этом не выявляется (Рис. 2 а, б). Размеры скоплений варьируют от 20 до 40 мкм; они постепенно увеличиваются в центробежном направлении (Рис. 2 а). «Сопки» располагаются плотно относительно друг друга (Рис. 2 б). Поверхность растущих дрожжевых клеток гладкая, тогда как зрелых – мелкозернистая. Почкующиеся однополярно дрожжевые клетки и рубчики в составе их клеточных стенок встречаются редко (Рис. 2 г). Последние апикальные либо латеральные. Скопления внеклеточного липида на поверхности и в промежутках между зрелыми дрожжевыми клетками развиты умеренно (Рис. 2 в, стрелки).

РКПГУ-1882. Частота расположения скоплений дрожжевых клеток в 10-дневной колонии данного штамма умеренная (Рис. 2 д), промежуточная между двумя ранее описанными. Как и в колониях предыдущих двух штаммов, плотность расположения и размеры скоплений гриба в форме «сопок» возрастают в центробежном направлении. Особенности строения поверхности стенок дрожжевых клеток сходны с аналогичными вышеописанных штаммов данного вида. Рубчики наблюдали редко ввиду хорошо развитого внеклеточного липида (Рис. 2 е, стрелки), часто формирующего массивные скопления в промежутках между дрожжевыми клетками. Почкующиеся дрожжевые клетки единичные (Рис. 2 ж); характер почкования однополярный.

РКПГУ-1883. Центральную часть 10-дневной колонии составляют довольно равномерно расположенные скопления дрожжевых клеток варьирующего размера (Рис. 2 з, стрелки), последующий морфогенез которых, как и в колониях ранее изученных штаммов, происходит в центробежном направлении. Здесь просматриваются небольшие по площади участки поверхности питательной среды. Уникальной особенностью строения колоний данного штамма был тот факт, что в поверхностных слоях некоторых «сопок» наблюдали прорастающие дрожжевые клетки (Рис. 3 а, стрелки). Ростковые трубки однополярные, толщиной 1 мкм и протяженностью 4-5 мкм. Поверхность ростковых трубок мелкозернистая, апекс закруглен. На большом увеличении СКАНа четко различима гладкая

(Рис. 3 б, стрелки) и мелкозернистая (Рис. 3 б, головки стрелок) скульптура клеточной стенки соответственно растущих, зрелых и почкующихся (Рис. 3 б) клеток гриба. Почкование однополярное (Рис. 3 б). В составе стенки дрожжевых клеток рубчики в умеренном числе (1-3 на клетку). Они одиночные, апикальные или латеральные (Рис. 3 в). Поверхность края колонии гриба на малом увеличении СКАНа выглядит как плотно расположенные, радиально ориентированные, широкие (40-50 мкм), вытянутые, в виде выпуклых «валиков» (Рис. 2 л, стрелки) массивные скопления дрожжевых клеток. Край сходного строения был характерен и для изученных колоний штаммов РКПГУ-1881 и РКПГУ-1882. Только в периферическом ободке колонии данного штамма наблюдали профили сильно смятых стенок отмерших дрожжевых клеток (Рис. 3 в, стрелки).

По данным настоящего исследования установлено, что основным морфологическим элементом 10-дневных колоний изученных штаммов *C. auris*, выделенных из разных субстратов, являются образования по типу «сопок». Последние напоминают так называемые «ласточки гнезда», характерные для культур *Candida albicans* [5]. Однако у «сопок» *C. auris* внутренняя полость отсутствовала, а дрожжевые клетки не формировали стенку, как это было характерно для *C. albicans*. В имеющихся работах по изучению в СЭМ культуральных форм *C. auris* приведены описания клеток в виде монослоя или бесформенного приземистого образования [8-10], что, вероятно, обусловлено условиями пробоподготовки. По нашим наблюдениям, развитие «сопок» в колониях *C. auris* происходит центробежно. К числу межштаммовых различий можно отнести разную плотность расположения скоплений дрожжевых клеток в центральной и средней частях колоний, частоту встречаемости рубчиков и их количество в пересчете на одну дрожжевую клетку, способность формировать ростковые трубки и степень развития внеклеточного липидного покрова, ранее выявленного нами для культуральных форм гриба методами ТЭМ [4]. Интересным является наблюдение, согласно которому в крае колонии штамма РКПГУ-1821 дрожжевые клетки были снабжены намного большим числом рубчиков, чем аналогичные в центральной и средней части ее. Пока не представляется возможным объяснить эти различия, как и различия в строении края в

культурах штаммов *C. auris*, выделенных из разных субстратов. По нашим данным, специфической и общей особенностью строения зрелых дрожжевых клеток *C. auris* (иными словами, характерный для них ультраструктурный «портрет») является мелкозернистая скульптура поверхности их клеточных стенок.

Поскольку картины почкования в колониях всех изученных штаммов *C. auris* встречались достаточно редко, то допускается предположить, что процесс их роста в основном завершен. Судя по тому, что отмершие дрожжевые клетки были выявлены только по периферии колонии штамма РКПГУ-1883, то можно говорить об определенной «молодости» всех остальных.

Согласно нашему мнению, наличие внеклеточного липида на поверхности зрелых дрожжевых клеток *C. auris* намного усиливает адгезивные свойства их клеточных стенок, что и приво-

дит к формированию биопленок специфического строения. О большой пластичности в смысле формирования биопленок данного вида гриба свидетельствует его способность формировать такие морфологические композиции как «сопки», «валики» и ровные «плато». Актуальным представляется изучить, каким образом изменяется пространственная конфигурация морфологических композиций *C. auris* при переходе его в тканевую форму, что и будет предметом последующего исследования.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы выражают благодарность П.А. Цинману за неоценимую помощь в подготовке образцов для последующего электронно-микроскопического изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jeffery-Smith A., Taori S.K., Schelenz S., et al. *Candida auris*: a review of the literature. Clin. Microbiol. Rev. 2017; 61: doi: 10.1128/CMR.00029-17.
2. Mohsin J., Hagen F., Al-Balushi Z.A.M., et al. The first cases of *Candida auris* candidaemia in Oman. Mycoses. 2017; 60 (9): 569-575. doi: 10.1111/myc.12647. Epub 2017 Jul 7.
3. Casadeval A. Don't forget the fungi when considering global catastrophic biorisk. Health Security. 2017; 15: 341-342.
4. Vasilyeva N.V., Kruglov A.N., Stepanova A.A., et al. Cytological features of *Candida auris* yeast cells explaining their multi-resistance. Problems in Medical Mycology. 2018; 20: 3-7.
5. Елинов Н.П., Васильева Н.В., Степанова А.А., Босак И.А., Чилина Г.А. Краткий атлас медицинских значимых микромицетов рода *Candida*. СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2013. – 73 с. [Yelinov N.P., Vasilieva N.V., Stepanova A.A., Bosak I.A., Chilina G.A. A brief atlas of medically significant micromycetes of the genus *Candida*. SPb., 2013. – 73 p. (In Russ)].
6. Pchelin I.M., Azarov D.V., Churina M.A., et al. Whole genome sequence of first *Candida auris* strain, isolated in Russia. Med. Mycol. 2019. doi: 10.1093/mmy/myz078.
7. Степанова А.А., Чилина Г.А., Баракаева Ф.Р. Сканирующая электронная микроскопия *Aspergillus fumigatus*. Проблемы медицинской микологии. 2018; 20 (4): 39-42. [Stepanova A.A., Chilina G.A., Barakaeva F.R. Scanning electron microscopy of *Aspergillus fumigatus*. Problems in Medical Mycology. 2018; 20 (4): 39-42 (In Russ)].
8. Yue H., Bing J., Zheng Q., Zhang Y., Hu T., et al. Filamentation in *Candida auris*, an emerging fungal pathogen of humans: passage through the mammalian body induces a heritable phenotypic switch. Emerg. Microbes Infect. 2018; 7: 18. doi:10.1038/s41426-018-0187-x.
9. Ledwoch K., Jean-Yves Maillard J.-Y. *Candida auris* dry surface biofilm (DSB) for disinfectant efficacy testing. Materials (Basel). 2019; 12 (1): 18. doi: 10.3390/ma12010018
10. Horton M.V., Johnson C.J., Kernien J.F., et al. *Nett Candida auris* forms high-burden biofilms in skin niche conditions and on porcine skin. mSphere Pub Date: 2020-02-26. doi: 10.1128/msphere.00972-19

Поступила в редакцию журнала: 27.01.2020

Рецензент: Т.С. Богомолова

СКАНИРУЮЩАЯ ЭЛЕКТРОН- НАЯ МИКРОСКОПИЯ КЛЕТОК КУЛЬТУР *LICHTHEIMIA* *CORYMBIFERA* И *RHIZOPUS* *ARRHIZUS*

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

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

В сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) изучали особенности микро-морфологии культур *Lichtheimia corymbifera* (Cohn) Vuill (РКПГФ-1601/1966) и *Rhizopus arrhizus* A. Fisch. (РКПГФ-1537), выращенных на среде Сабуро. Для культур *L. corymbifera* характерно умеренно выраженное асинхронное спороношение. Для зрелых клеток вегетативного мицелия, спорангиеносцев, спорангиев и спорангиоспор этого вида свойственно наличие мелкозернистой скульптуры поверхности. Для колоний *R. arrhizus* характерно обильное спороношение. Выявлено, что поверхность клеточных стенок спорангиеносцев молодых спорангиев и клеток вегетативного мицелия данного вида гладкая, тогда как с возрастом она становится поперечно-складчатой. Показано, что формирование элементов слоя орнаментации спорангиоспор обоих видов происходит асинхронно после их освобождения из спорангия.

Ключевые слова: *in vitro*, *Lichtheimia corymbifera*, *Rhizopus arrhizus*, сканирующая электронная микроскопия

SCANNING ELECTRON MI- CROSCOPY OF THE CULTURAL CELLS OF *LICHTHEIMIA* *CORYMBIFERA* AND *RHIZOPUS* *ARRHIZUS*

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

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

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

In scanning electron microscopes (SEM) micro-morphological peculiarities of the Lichtheimia corymbifera (Cohn) Vuill (PKPGF-1601/1966) and Rhizopus arrhizus A. Fisch. (PKPGF-1537) cultures grown on Sabouraud medium were studied. For cultures of L. corymbifera was typical moderately asynchronous sporulation. For the mature cells of vegetative mycelium, stipes of the sporangies, sporangia and sporangiospores of this species were typical the presence of fine-grained surface sculpture. Colonies R. arrhizus were characterized by abundant sporulation. It was revealed that the surface of the cell walls of the stipes of young sporangia and cells of vegetative mycelium of this species were smooth, while with age it becomes transversely folded. It is shown that the formation of elements of the sporangiospores ornamentation layer in both species takes place asynchronous after their release from sporangium.

Key words: *in vitro*, *Lichtheimia corymbifera*, *Rhizopus arrhizus*, scanning electron microscopy

ВВЕДЕНИЕ

Ранее мы провели исследование ультраструктурной организации мукоморомицета *Lichtheimia corymbifera* (Cohn) Vuill (штамм РКПГФ-1601/1966) *in vitro* [1] и *in vivo* [2]. Для завершения этой работы были изучены особенности микро-морфологии клеток культур гриба в сканирующем электронном микроскопе (СЭМ).

Представляло интерес продолжить изучение мукоморомицетов на примере *Rhizopus arrhizus* A. Fisch. – широко распространенного вида микро-мицета, вызывающего риноцеребральные [3], кожные инфекции [4], а также язву желудка у больных после пересадки почки [5]. Данный вид

гриба может вызывать поражение легких после пересадки сердца [6], мочеполовой системы [7], является причиной риноцеребрального мукормикоза у больных сахарным диабетом [8] и др. Полученные данные по ультраструктурной организации *R. arrhizus* станут основой для его последующего изучения в трансмиссионном электронном микроскопе в ходе *in vitro* → *in vivo* трансформации, что чрезвычайно важно для понимания закономерностей патогенеза микозов, вызываемых данными видами грибов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследовали штаммы *L. corymbifera* (РКПГФ-1601/1966) и *R. arrhizus* А. Fisch. (РКПГФ-1537) из коллекции НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина. Первый штамм был выделен от больного с риноцеребральным мукормикозом, тогда как второй – из бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) пациента с диагнозом «острый миелоидный лейкоз». Штаммы *L. corymbifera* (РКПГФ-1601/1966) и *R. arrhizus* (РКПГФ-1537) были определены молекулярно-генетическими методами по ITS локусу.

Для СЭМ кусочки питательной среды с частью трехсуточных колоний двух видов грибов фиксировали по методике, описанной нами ранее [9]. Образцы высушивали при критической точке на приборе НСР-2 15 минут, после чего напыляли золотом и изучали в СЭМ JSM 35 (Jeol, Токио, Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сканирующая электронная микроскопия клеток культур *L. corymbifera*.

При изучении колоний гриба, выращенных в чашках Петри, на малом увеличении СЭМ выявили, что они состоят из радиально и рыхло ориентированных гиф (Рис. 1 а). В маргинальной молодой части колоний гифы мицелия имеют гладкую поверхность (Рис. 1 б). Характерной особенностью строения поверхности гиф, локализующихся в средней и центральной колониях, является наличие на их поверхности многочисленных мелкозернистых элементов скульптуры (Рис. 1 в, стрелки). Характерной особенностью строения гиф вегетативного мицелия была редкая встречаемость латеральных ответвлений, располагающихся под прямым углом к несущей их гифе. Для колонии анализируемого штамма характерно умеренно выраженное спороношение в виде разновозрастных, хаотично располо-

женных одиночных спорангиев или в немногочисленных группах, в основном, локализующихся по ее периферии.

Молодые (Рис. 1 г) и зрелые до освобождения спорангиоспор спорангии (Рис. 1 д, е) округлой формы (от 50 до 80 мкм). Поверхность молодых спорангиев гладкая (Рис. 1 г), тогда как зрелых – с характерным мелкозернистым рисунком (Рис. 1 д, е). Апофиза конической формы. В молодых спорангиях с гладкой структурой поверхности она имеет мелко складчатую поверхность (Рис. 1 г), в зрелых – к этому добавлялись плотно расположенные мелкозернистые элементы скульптуры (Рис. 1 е, ж).

Локальный (Рис. 1 ж) или тотальный лизис оболочки зрелого спорангия приводит к «оголению» еще молодых спорангиоспор. Именно после лизиса оболочки спорангия начинается их созревание и формирование элементов скульптуры спородермы. На рисунке 1 з продемонстрировано асинхронное формирование элементов скульптуры спорангиоспор. В ходе и после полного завершения этого процесса спорангиоспоры все еще образуют плотную группу, повторяющую округлую форму зрелого спорангия (Рис. 1 и). Скульптура поверхности зрелых спорангиев мелкозернистая, что характерно для зрелых клеток вегетативного мицелия, спорангиев и спорангиеносцев. Форма зрелых спорангиоспор округлая (3,0-5,0 мкм) либо эллипсоидальная (3,8-5,0х 2,5-4,4 мкм). Вне спорангиев умеренное количество одиночных или собранных в небольшие группы зрелых спорангиоспор можно было наблюдать на поверхности питательной среды и клеток вегетативного мицелия. Отметим, что до наших исследований общепринятым было считать наличие у данного вида зрелых спорангиоспор с гладкой поверхностью [10]. Ранее на примере культуры *Lichtheimia* spp. [11] было также показано наличие мелкозернистой скульптуры поверхности зрелых спорангиоспор данного вида.

Процессы старения в пределах колонии имеют центробежную направленность и асинхронный характер в пределах отдельно взятой гифы. В этот период содержимое клеток опустошается, оболочка клеток гиф сильно деформируется, большая часть элементов скульптуры лизирует. Стенка колумеллы после освобождения спорангия от спорангиоспор также сильно деформируется, теряет присущую ей форму.

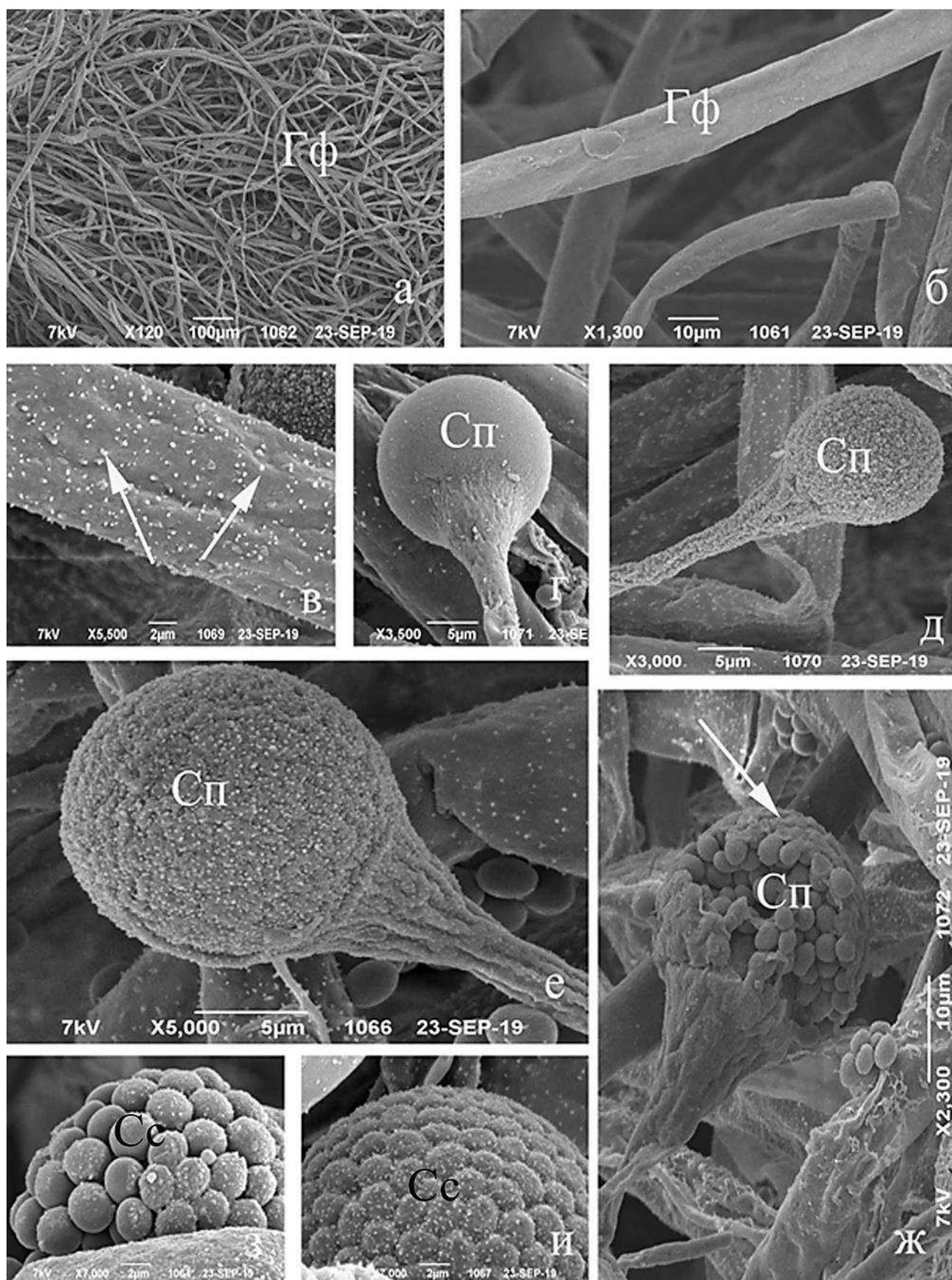


Рис.1. Особенности строения разных типов клеток культуры *L. corymbifera* в СЭМ. Условные обозначения здесь и на рисунке 2: Гф – гифа(ы); Сп – спорангий(и); Сс – спорангиоспоры.

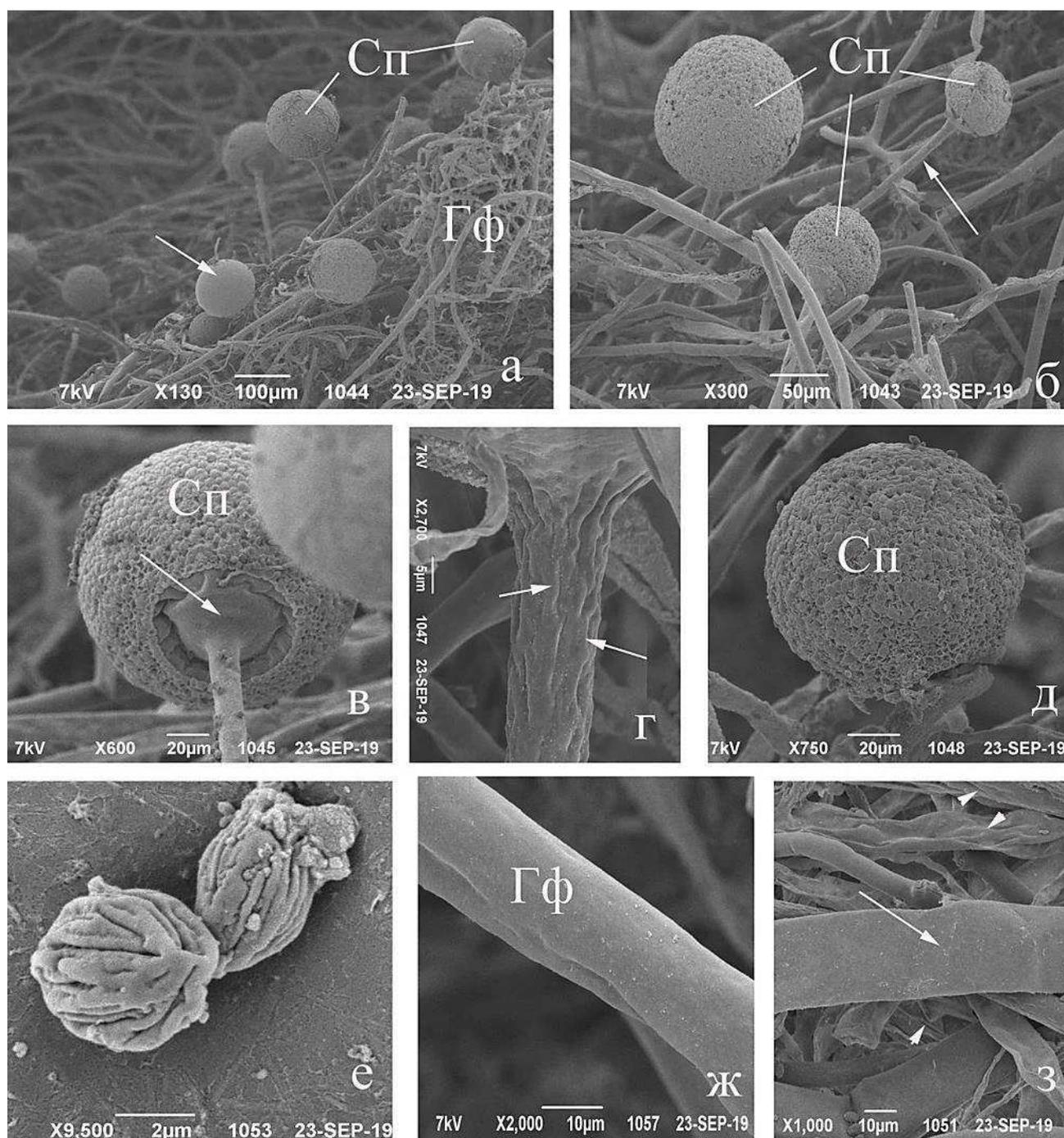


Рис. 2. Ультраструктура разных типов клеток культуры *R. arrhizus* в СЭМ.

Сканирующая электронная микроскопия клеток культур *R. arrhizus*.

На малых увеличениях СЭМ видно (Рис. 2 а), что спорангии (до 1500 мкм в длину и 18 мкм в ширину) простые или разветвленные, располагаются в группах по два либо более, либо одиночно (Рис. 2 б). Спорангии сферической формы, часто с несколько уплощённым основанием (Рис. 2 в, стрелка). В молодых спорангиях поверхность спорангиеносцев гладкая (Рис. 2 а, стрелка), а в зрелых – в виде неглубоких продольных дискретных складок (Рис. 2 е). Поверх-

ность зрелых спорангиев слегка шероховатая (Рис. 2 а-в, д). Оболочка зрелых спорангиев со временем лизирует, оголяя зрелые спорангиоспоры. Последние эллипсоидальные (6-8 x 4-5 мкм, Рис. 2 е), с невысокими продольными протяженными «полосами» разной ширины, протяженности и глубины. Аналогичное строение было показано для данного вида и другими исследователями [10, 12 и др.]. Формирование элементов слоя орнаментации спорангиоспор происходит асинхронно после их освобождения из спорангия.

Поверхность клеточных стенок молодых (2 ж, 3, стрелка) и зрелых гиф (Рис. 2 з, головки стрелок) вегетативного мицелия *R. arrhizus* анализируемой культуры гладкая. С возрастом гифы мицелия теряют присущую им форму, их клеточные стенки сильно деформируются, на их поверхности появляются поперечные складки разной глубины и протяженности. В пределах одной гифы процесс старения протекает асинхронно, что характерно и для других видов мицелиальных грибов [13, 14].

ВЫВОДЫ

1. Для культур изученного штамма *L. corymbifera* характерно умеренно выраженное асинхронное спороношение. Формирование спорангионосцев и спорангиев происходит асинхронно.

2. Согласно данным СЭМ, для зрелых клеток вегетативного мицелия, спорангионосцев,

спорангиев и спорангиоспор *L. corymbifera* в условиях культуры характерно наличие мелко-зернистой скульптуры поверхности.

3. Поверхность клеточных стенок спорангионосцев молодых спорангиев и клеток вегетативного мицелия *R. arrhizus* гладкая, тогда как с возрастом становится поперечно-складчатой.

4. Формирование элементов слоя орнаментации спорангиоспор *L. corymbifera* и *R. arrhizus* проходит асинхронно после их освобождения из спорангия.

5. По данным СЭМ, процессы старения в пределах одной гифы у изученных видов протекают асинхронно.

Данная работа выполнена в рамках Госзадания «Изучение морфо-биологических особенностей мукоромикетов-возбудителей микозов у пациентов с иммунодефицитом» (2019-2021).

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильева Н.В., Степанова А.А., Богомоллова Т.С. и др. Цитологическое изучение *Lichtheimia corymbifera in vitro*. Проблемы медицинской микологии. 2019; 21 (3): 3-8. [Vasilyeva N.V., Stepanova A.A., Bogomolova T.S., et al. Cytological investigation of *Lichtheimia corymbifera in vitro*. Problems in Medical Mycology. 2019; 21 (3): 3-8 (In Russ)].
2. Васильева Н.В., Степанова А.А., Богомоллова Т.С. и др. Цитологическое изучение возбудителя мукоромикоза *Lichtheimia corymbifera in vivo*. Проблемы медицинской микологии. 2019; 21 (4): 3-7. [Vasilyeva N.V., Stepanova A.A., Bogomolova T.S., et al. Cytological study of the causative agent of mucormycosis *Lichtheimia corymbifera in vivo*. Problems in Medical Mycology. 2019; 21 (4): 3-7 (In Russ)]. DOI:10.24412/1999-6780-2019-4-3-7
3. Adler D.E., Milhorat T.H., Miller J.I. Treatment of rhinocerebral mucormycosis with intravenous, interstitial, and cerebrospinal fluid administration of amphotericin B: case report. Neurosurgery. 1998; 42: 644-649. doi.org/10.1097/00006123-199803000-00037
4. Albízuri-Prado M.F., Sánchez-Orta A., Rodríguez-Bandera A., Feito-Rodríguez M. Primary cutaneous mucormycosis due to *Rhizopus arrhizus* in an 8-Year-Old Girl. Actas Dermosifiliogr. 2018; 109 (6): 562-564. doi: 10.1016/j.ad.2017.07.020.
5. Winkler S., Susani S., Willinger B., et al. Gastric mucormycosis due to *Rhizopus oryzae* in a renal transplant recipient. J. Clin. Microbiol. 1966; 34: 2585-2587. doi.org/10.1128/JCM.34.10.2585-2587.1996
6. Muhm M., Zuckermann A., Prokesch R., et al. Early onset of pulmonary mucormycosis with pulmonary vein thrombosis in a heart transplant recipient. Transplantation. 1996; 62: 1185-1187. doi.org/10.1097/00007890-199610270-00029
7. Williams J.C., Schned A.R., Richardson J.R., et al. Fatal genitourinary mucormycosis in a patient with undiagnosed diabetes. Clin. Infect. Dis. 1995; 21: 682-684. doi.org/10.1093/clinids/21.3.682
8. da Cunha M.A., Nery A.F., Lima F.P., et al. Rhinocerebral zygomycosis in a diabetic patient. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2011; 44 (2): 257-259. doi.org/10.1590/S0037-86822011000200027
9. Степанова А.А., Чилина Г.А., Баракаева Ф.Р. Сканирующая электронная микроскопия *Aspergillus fumigatus*. Проблемы медицинской микологии. 2018; 20 (4): 39-42. [Stepanova A.A., Chilina G.A., Barakaeva F.R. Scanning electron microscopy of *Aspergillus fumigatus* Fres. Problems in Medical Mycology. 2018; 20 (4): 39-42 (In Russ)].
10. de Hoog G.S., Guarro J., Gené J., et al. Atlas of clinical fungi (e-version). Westerdijk Institute / Universitat Rovira i Virgili, Utrecht / Reus. 2019. clinicalfungi.org/BioloMicsInfo.aspx

11. Степанова А.А., Хостелиди С.Н., Аравийский Р.А. и др. Электронно-микроскопическое исследование *Lichtheimia* spp. in vivo и in vitro. Проблемы медицинской микологии. 2012; 14 (4): 55-61. [Stepanova A.A., Khostelidi S.N., Araviyskiy R.A., et al. Electron-microscopic investigations of *Lichtheimia corymbifera* in vivo and in vitro. Problems in Medical Mycology. 2012; 14 (4): 55-61 (In Russ)].
12. Soccol C.R., Marin B., Roussos S., Raimbault M. Scanning electron microscopy of the development of *Rhizopus arrhizus* on raw cassava by solid state fermentation. Mycol. Neotrop. 1993; 6: 27-39.
13. Степанова А.А., Сеницкая И.А. Ультраструктурные аспекты старения клеток некоторых видов рода *Aspergillus*. Проблемы медицинской микологии. 2009. 11 (4): 24-29. [Stepanova A.A., Sinitskaya I.A. Ultrastructural aspects of cells senescence of some *Aspergillus* spp. Problems in Medical Mycology. 2009; 11 (4): 24-29 (In Russ)].
14. Савицкая Т.И., Степанова А.А., Сеницкая И.А., Краснова Е.В. Ультраструктурные аспекты старения клеток вегетативного мицелия некоторых видов рода *Trichophyton*. Проблемы медицинской микологии. 2011; 13 (2): 106. [Savitskaya T.I., Stepanova A.A., Sinitskaya I.A., Krasnova E.V. Ultrastructural aspects of senescence of the vegetative mycelium cells of some *Trichophyton* species. Problems in Medical Mycology. 2011; 13 (2): 106 (In Russ)].

Поступила в редакцию журнала: 17.01.2020

Рецензент: О.Д. Васильев

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МОДЕЛЬНОГО ШТАММА *CANDIDA AURIS*, ВЫЯВЛЯЕМЫЕ ПОСРЕДСТВОМ MALDI-TOF- МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

¹Васильева Н.В. (директор НИИ, зав. кафедрой), ¹Рябинин И.А. (м.н.с., ассистент кафедры)*, ¹Выборнова И.В. (н.с.), ¹Босак И.А. (с.н.с.), ¹Канаева В.М. (лаб.-иссл.), ¹Пчелин И.М. (н.с.), ¹Тараскина А.Е. (зав. лаб.), ¹Борзова Ю.В. (зав. клиникой), ¹Богданова Т.В. (ассистент кафедры), ¹Алексеев А.Ю. (лаб.), ²Орлова О.Е. (зав. лаб.)

¹Северо-западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова: НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, кафедра медицинской микробиологии, Санкт-Петербург; ²Городская клиническая больница №67 им. Л.А. Ворохобова, Москва, Россия

В сообщении представлены данные экспериментального исследования с модельным штаммом *Candida auris* РКПГ Y-1821, идентифицированным с использованием референтных молекулярно-генетических приемов. Проведенная работа освещает особенности формирования MALDI-масс-спектра *C. auris* в связи с влиянием (1) среды для культивирования, (2) протокола подготовки, (3) принадлежности к определенному культуральному варианту и (4) пребывания в органах зараженного лабораторного животного (мышь). Помимо этого, авторы сообщения кратко описали композицию MALDI-масс-спектров *C. auris*, сходства и различия масс-спектро-профилей (МСП) штамма *C. auris* РКПГ Y-1821 с МСП штаммов этого вида из других коллекций, обнаружили пики в масс-спектре препаратов из субкультур *C. auris*, встречающиеся в масс-спектрах культур других микромицетов.

Ключевые слова: видовая идентификация, инвазивный кандидоз, модификационная изменчивость, MALDI-TOF-масс-спектрометрия, *Candida auris*

PHYSICOCHEMICAL FEATURES OF THE *CANDIDA AURIS* MODEL STRAIN DETECTED BY MALDI-TOF MASS-SPECTROMETRY

Vasilyeva N.V. (director of the institute, head of the department)¹, Ryabinin I.A. (junior scientific collaborator, assistant of the department)¹, Vybornoova I.V. (scientific collaborator)¹, Bosak I.A. (senior scientific collaborator)¹, Kanaeva V.M. (research assistant)¹, Pchelin I.M. (scientific collaborator)¹, Taraskina A.E. (head of the laboratory)¹, Borzova Y.V. (head of the clinic)¹, Bogdanova T.V. (assistant of the department)¹, Alekseev A.Y. (research assistant)¹, Orlova O.E. (head of laboratory)²

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

The report presents the data from experimental research with model strain C. auris RCPF Y-1821, identified with using reference molecular genetic techniques. This work highlights the features of C. auris MALDI-mass-spectrum formation in connection with influences of (1) culture medium, (2) preparation protocol, (3) belonging to a specific cultural type, and (4) staying in organs of infected laboratory animal (mouse). In addition, the authors briefly described the composition of the C. auris MALDI-mass-spectra, as well as the similarities and differences in the main-spectral-profiles (MSP) of the C. auris RCPF Y-1821 strain with MSPs of strains from other collections. Moreover the peaks in mass-spectrum of preparations from subcultures of C. auris also situated in mass-spectra of cultures of other micro-mycetes were found by authors.

Key words: *Candida auris*, invasive candidiasis, MALDI-TOF mass-spectrometry, modificational variability species identification

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы мировое здравоохранение столкнулось с проблемой инвазивного кандидоза, вызванного штаммами *Candida auris* Satoh & Makimura, 2009. Данный вид возбудителей, среди прочих *Candida* spp. и сходных дрожжей, со-

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

держит штаммы, отличающиеся множественной лекарственной устойчивостью к различным противогрибковым препаратам. По этой причине инвазивный кандидоз, вызванный *C. auris*, часто бывает не управляем с помощью этиотропной терапии, сопровождается высокой летальностью. Другая сторона проблемы связана с тем, что *C. auris* не отличается своеобразием морфологических и физиологических черт, поэтому использование традиционных средств идентификации дрожжевых грибов при работе с *C. auris* закономерно приводит к ошибкам [1].

MALDI-TOF-масс-спектрометр в комплексе с микробиологическим программным обеспечением, как показал практический опыт, является мощным диагностическим средством для идентификации возбудителей инвазивного кандидоза, а также их внутривидового типирования [2]. Большая часть работ, связанных с применением MALDI-TOF-масс-спектрометрии материала клеток *C. auris*, касалась проблемы совершенствования идентификации этого вида дрожжей и критической оценке ее эффективности [3, 4 и др.]. В исследованиях последнего периода открыта интересная перспектива экспресс-определения чувствительности *C. auris* к эхинокандинам также с применением масс-спектрометрии [5, 6].

Учреждения России пока, очевидно, располагают небольшим количеством штаммов *C. auris*, что затрудняет эффективное информирование отечественных специалистов в области лабораторной и клинической медицины. В связи с этим обстоятельством необходимо проводить детальные наблюдения над теми культурами, которые (1) прошли процедуру видовой идентификации с помощью экспертных методов и (2) используются или планируются к использованию в качестве модельных объектов для изучения биологии возбудителя и патогенеза этой опасной инфекции.

Цель – выявление и описание физико-химических свойств эталонного модельного штамма *Candida auris* РКПГ Y-1821 в зависимости от способа подготовки культуры к MALDI-TOF-MS, пребывания клеток в органах лабораторного животного и принадлежности к определенному культуральному варианту.

МАТЕРИАЛЫ МЕТОДЫ

Модельный штамм *C. auris* РКПГ Y-1821 – полирезистентный возбудитель инвазивного

кандидоза, выделенный из крови, предоставлен Российской коллекцией патогенных грибов (поступление из микробиологической лаборатории городской клинической больницы №67 им. Л.А. Ворохобова, Москва, 2017 г.). Видовую идентификацию проводили методом таргетного ДНК-секвенирования локуса фактора элонгации трансляции 1- α (транскрипционный фактор элонгации, *TEF1 α*) с обработкой данных по протоколу CLSI MM18, 2-е издание [7, 8], а также методом полногеномного ДНК-секвенирования [9].

Процедура MALDI-TOF-масс-спектрометрии. Для масс-спектрометрической идентификации получили субкультуру штамма РКПГ Y-1821 на среде Сабуро с 2% глюкозы и «колумбийском» агаре с бараньей кровью (инкубация при 35 °С 24 ч). Субкультуру готовили для исследования 2 способами: (1) клеточную биомассу смешивали с 1,5 мкл 70% муравьиной кислоты на мишени масс-спектрометра MTP 384 polished steel target plate либо (2) получали клеточный экстракт согласно протоколу производителя масс-спектрометра [10]. Обе процедуры применили и для субкультуры на среде Сабуро, и для субкультуры на кровяном агаре. Подготовили 4 позиции мишени с кислотно-обработанной биомассой клеток с кровяного агара для автономной работы масс-спектрометра, а также по 8 позиций для биомасс клеток, обработанных кислотой с кровяного агара и агара Сабуро, аналогично для клеточных экстрактов (с кровяного агара и агара Сабуро), предназначенных для «ручного» режима работы на масс-спектрометре. Подготовленные позиции мишени покрывали 2 мкл насыщенного при температуре 25 °С раствора α -циано-4-гидроксицианомовой кислоты в растворителе «ТА30».

MALDI-TOF-масс-спектрометрию в линейном режиме детекции положительно заряженных ионов диапазона масс 2-20 kDa провели на инструменте Autoflex speed TOF/TOF (Bruker Daltonik GmbH, Германия) со встроенным пакетом программного обеспечения. При ионизации использовали режим «МВТ», напряжение на источнике ионов 1 и 2 – 19,89 и 18,64 kV соответственно, подавление сигнала от ионов матрицы, мощность лазера – 30-40%. Высокочастотный режим лазера был традиционным – 200 импульсов / цикл, в суммарные (анализируемые в дальнейшем) MALDI-масс-спектры собирали до

7000 «единичных» спектров. Для идентификации полученных масс-спектров использовали MALDI Biotyper 3.1 с библиотекой масс-спектро-профилей «Bruker Taxonomy», которая на момент проведения анализа имела следующие МСП интересующего вида: *S. auris* (CBS) KCTC 17809 (сгенерирован из 23 спектров), *S. auris* (CBS) KCTC 17810 (сгенерирован из 24 спектров) и *S. auris* DSM 21092T (сгенерирован из 24 спектров, получен из типового штамма вида). Все референтные масс-спектры получены из клеточных экстрактов, однако режим культивирования и питательная среда в оригинальных матаданных не указаны. Обработку и анализ масс-спектров выполнили во flexAnalysis 3.4.

Получение субкультур штамма из органов лабораторного животного (мышь). Методика моделирования инвазивного кандидоза на мышах соавторами настоящего сообщения описана ранее [11]. Для исследования получали высевы на «колумбийском» кровяном агаре материала почек, сердца и селезенки с последующей инкубацией при 35 °С 24 ч. Из каждой полученной культуры из органов готовили по 4 позиции кислотно-травленных клеток на мишени масс-спектрометра, процедуру MALDI-TOF-масс-спектрометрии проводили, как описано выше. Помимо исследования особенностей адаптации клеток *S. auris* к существованию в различных инфицированных органах, при проведении модельного эксперимента обнаружили расщепление культуры в посевах из почек на «серый» и «белый» культуральный варианты. Из культур обоих вариантов готовили также по 4 позиции на мишени с последующим масс-спектрометрическим исследованием.

Программно-математическая обработка масс-спектров. Кроме стандартных функций анализа масс-спектров (сличение с различными масс-спектро-профилями типовых штаммов, сопоставление спектров «наложением»), для кластеризации результатов съемок культур на разных средах (из разных культуральных вариантов) и обработанных различными способами использовали иерархическую кластеризацию методом центроидов с расчетом евклидовой дистанции, а также анализ главных компонент (в обоих случаях – с предварительной нормализацией масс-спектров). Для сравнения групп масс-спектров, полученных при исследовании субкультур из органов лабораторного животного, а также двух культуральных вариантов в посевах

из почек использовали построение матрицы сложного коэффициента корреляции (настройки «по умолчанию»). Обработку выполнили во «встроенном» программном обеспечении масс-спектрометра «MALDI Biotyper OS» того же производителя. Для выборки масс-спектров из «органных» субкультур во flexAnalysis 3.4 проводили генерацию масс-листов (с пороговым значением отношения интенсивности «сигнал:шум» S/N не менее 3-х), подсчитывали количество детектируемых пиков и сравнивали их с количеством детектируемых пиков культуры до заражения, сравнение оценивали с помощью теста Уилкоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Вид обработанной биомассы клеток *S. auris*, подготовленной для MALDI-TOF-масс-спектрометрии. Визуализация образцов с помощью камеры, установленной во внутренней среде масс-спектрометра, позволила выявить у них довольно разнообразную структуру. Кислотно-травленная и обработанная «матрицей» биомасса выглядела как гомогенный мелкозернистый слой на мишени (Рис. 1.1 и 1.2), в иных случаях фоновый слой был визуально очень тонким, его покрывали округлые гранулы различной величины (кристаллы матрицы, рисунок 1.3 и 1.4). В некоторых образцах (массивное нанесение культуры) обработанная биомасса была представлена растрескивающимися крупными пластинами неправильной полигональной формы, также покрытыми кристаллами матрицы (Рис. 1.5 и 1.6).

MALDI-масс-спектр *S. auris* и эффективность способов подготовки культуры к масс-спектрометрической съемке. При использовании автоматического режима работы идентификация штамма (субкультура на кровяном агаре, прямое нанесение) оказалась нерезультативной, из двух позиций мишени масс-спектры получены, из двух других суммировать сигнал в масс-спектр не удалось. При работе в «ручном» режиме штамм успешно идентифицирован. Как оказалось, ионизация позиций с экстрактами клеток с кровяного агара и агара Сабуро, а также с кислотно-обработанными клетками с агара Сабуро позволила извлечь небольшое количество точечных спектров удовлетворительного качества, таким путем получили, соответственно, 3, 1 и 2 суммарных масс-спектра. С другой стороны, при работе с позициями, на которые

нанесли кислотно-обработанные клетки субкультуры с кровяного агар, получили наибольшее количество точечных спектров подходящего качества, так, что удалось образовать 49 сум-

марных спектров для идентификации. Всего, таким образом, выполнили 59 записей, включающих 57 годных к обработке масс-спектров.

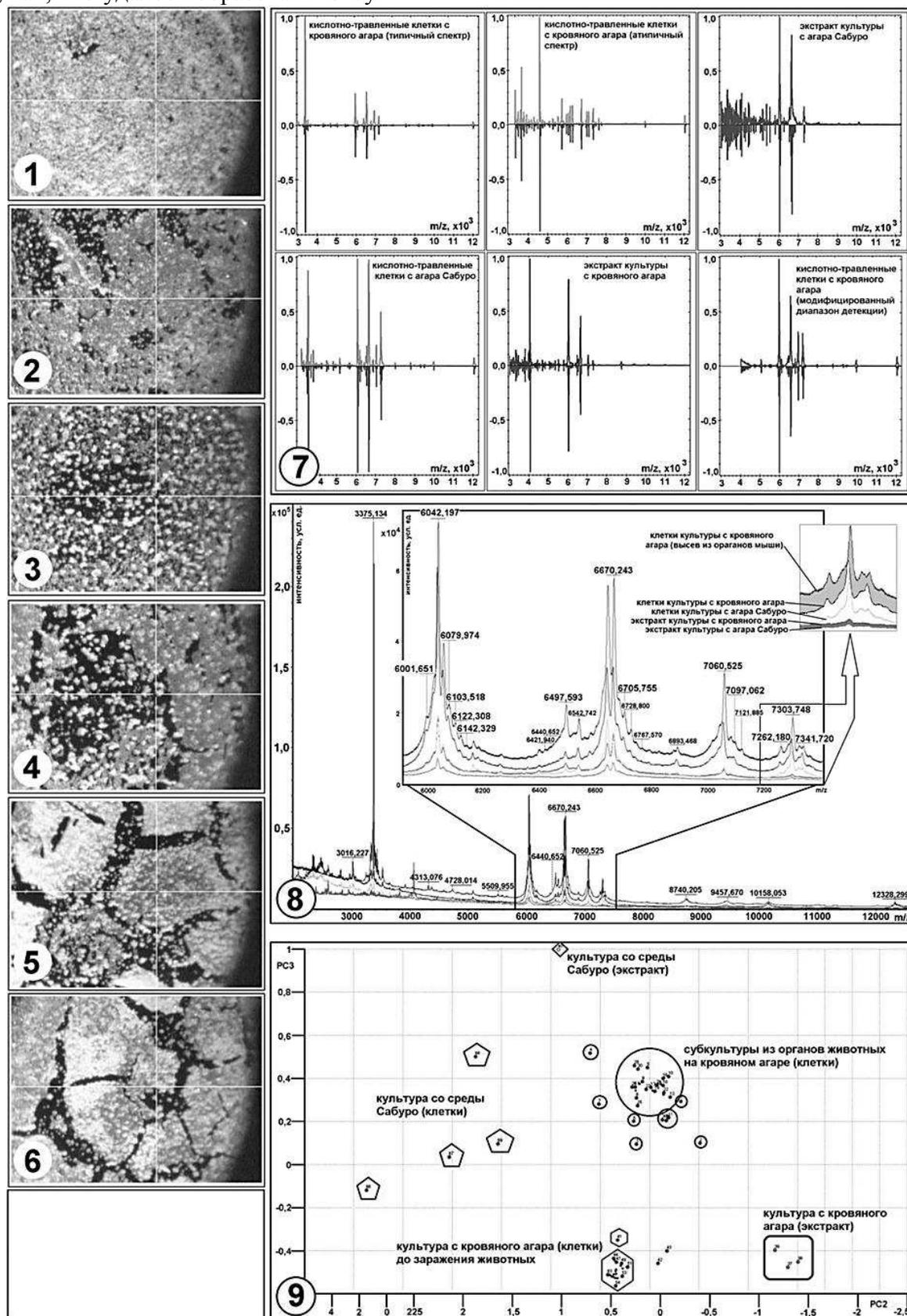


Рис. 1. Свойства *S. auris* РКПГ Y-1821, выявляемые посредством MALDI-TOF-масс-спектрометрии. Часть I. Объяснение в тексте.

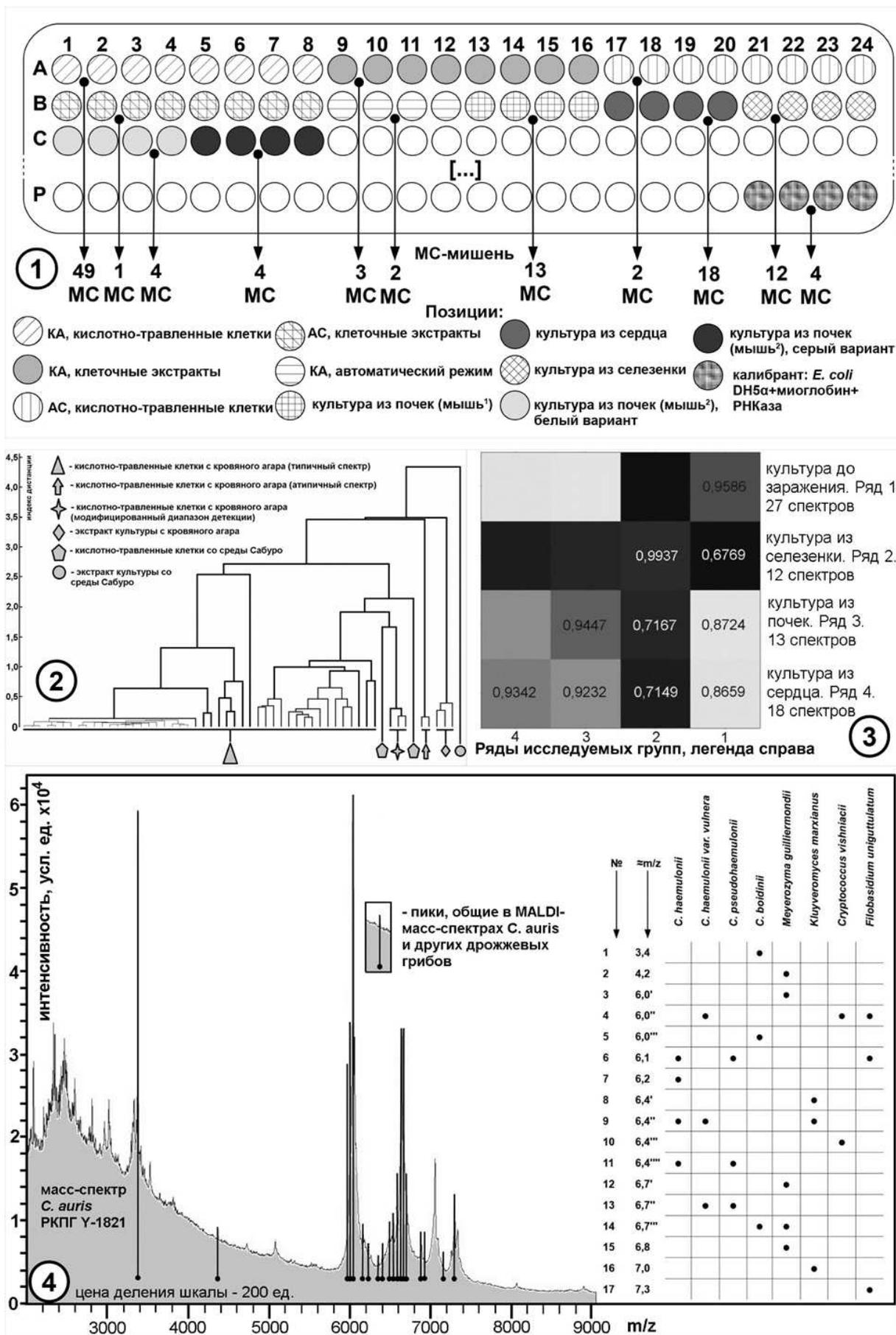


Рис. 2. Свойства *C. auris* РКПГ Y-1821, выявляемые посредством MALDI-TOF-масс-спектрометрии. Часть II. Объяснение в тексте.

Композиция масс-спектра *C. auris* РКПГ Y-1821 в целом является сравнительно традиционной для дрожжей рода *Candida* (Рис. 1.7 и 1.8): MALDI-масс-спектр отчетливо разделен на 3 сегмента (в соответствии с ранее предложенной нами схемой [12]):

- сегмент «малых масс» (2 – ≈5,5 kDa) – детализованный, несколько изменяющийся от съемки к съемке, пики его многочисленны, с узким основанием, в основном невысокой интенсивности (один из пиков этого сегмента, напротив, имеет наивысшую интенсивность во всем спектре, его обсуждение – в следующем разделе);

- сегмент «средних масс» (≈5,5 – ≈7,5 kDa) – детализованный и стабильный по композиции вне зависимости от применяемой питательной среды и способа подготовки культуры. Его пики интенсивны; отчетливо выделяются в спектре, как единый комплекс;

- сегмент «больших масс» (≈7,5 – 13 kDa) – детализован слабо (это связано у дрожжей и других микроорганизмов с особенностями действия на исследуемый образец использованной здесь MALDI-матрицы – 4-гидроксикоричной кислоты), пики его немногочисленные, некоторые из них детектируются от съемки к съемке непостоянно, имеют широкое основание.

MALDI-масс-спектры, полученные с культур на разных средах и с разной подготовкой проб, имеют отличия (Рис. 1.7; в верхней части диаграмм – выровненные масс-спектры, в нижней части – масс-спектро-профили). Масс-спектры колоний на среде Сабуро имеют наиболее выраженный «шум», особенно в сегменте малых масс. Масс-спектры, полученные из экстрактов, отличаются более низкой интенсивностью по всему диапазону съемки, в отличие от спектров, полученных из кислотно-травленных клеток (Рис. 1.8).

На проекции кластера анализа главных компонент видно, что масс-спектры из субкультур с разных сред и с разными способами пробоподготовки кластеризуются раздельно (Рис. 1.9), притом масс-спектры кислотно-травленных клеток с агара Сабуро разбросаны наиболее сильно, по-видимому, работа с субкультурой в таком режиме дает наименее воспроизводимые результаты.

На рисунке 2.1 показана примерная схема проведенного опыта: приведен вид сегмента

мишени MALDI-TOF-масс-спектрометра с разметкой позиций. Ниже, под схемой мишени приведено количество снятых масс-спектров с каждой серии измерений. Аббревиатуры: МС – масс-спектры (количество); КА – кровяной агар, АС – агар Сабуро.

С несколько иного ракурса свойства субкультур, полученных и подготовленных различными способами, открываются при рассмотрении дендрограммы, составленной методом иерархической кластеризации MALDI-масс-спектров (Рис. 2.2). Группа масс-спектров субкультур, полученных с кровяного агара с последующей протравой клеток на мишени, сосредоточена в виде двух крупных клад: одна из них является обособленной, вторая близка спектрам той же субкультуры с измененным диапазоном съемки, а также из кислотно-травленных клеток со среды Сабуро. MALDI-масс-спектры клеточных экстрактов дистанцированы от спектров, снятых с кислотно-травленных клеток, промежуточное положение между ними занимают атипичные спектры кислотно-травленных клеток с кровяного агара. Здесь понятие «атипичные масс-спектры» введено для таких (немногих) MALDI-масс-спектров наблюдаемого штамма, которые резко отличаются по композиции пиков среди общей совокупности выполненных измерений (съемок). Причина такого распределения, вероятно, связана с их большей детализацией в сравнении с типичными спектрами (Рис. 1.7), а технически такой феномен можно объяснить иными пропорциями по объему биомассы и муравьиной кислоты.

Показатели достоверности идентификации и сравнение с типовыми масс-спектро-профилями. Из выборки масс-спектров с помощью библиотеки «Bruker Taxonomy» удалось получить относительно достоверные ответы идентификации для 23 спектров (40,4%; из них 3 получены из клеточного экстракта с кровяного агара, 20 – из обработанной на мишени биомассы клеток с кровяного агара). Значение «Score Value» составили 1,704-1,898; категория идентификации для всех масс-спектров – В. Во всех идентифицированных спектрах, кроме одного, второй наиболее близкий МСП соответствовал значению Score Value менее 1,700.

Все оригинальные МСП, полученные из биомассы клеток, обработанной на мишени, отличались сходством с типовым МСП *C. auris* DSM 21092T, а оригинальные МСП, получен-

ные из клеточных экстрактов, были похожи на *C. auris* (CBS) КСТС 17809 (2) и *C. auris* DSM 21092Т (1). При сравнительном просмотре МСП из биомассы клеток с кровяного агара были довольно близки по композиции с референтными МСП *C. auris* DSM 21092Т и *C. auris* (CBS) КСТС 17809, но резко отличались от них наличием высокоинтенсивного пика ионов 3,38 kDa (самого интенсивного в спектре, Рис. 1.8).

Аналогичный по показателю M_r (m/z) пик имелся в типовом МСП *C. auris* (CBS) КСТС 17810, но там он отличался довольно малой интенсивностью (всего 52 у.е.). Для исключения влияния данного пика 3 масс-спектра получили с измененным диапазоном детекции (4-40 kDa, Рис. 1.7), но такой прием улучшить идентификацию не позволил.

C. auris РКПГ Y-1821 в своих масс-спектропрофилях не имеет некоторых пиков высокомолекулярного диапазона, которые есть у других указанных коллекционных штаммов этого вида, например группа из 3 пиков с $M_{r_{ионов}} \approx 13,5 - 14$ kDa у *C. auris* DSM(z) 21092Т (он же CBS 10913).

Спектральное сходство с другими микромицетами. В масс-спектрах *C. auris* РКПГ Y-1821 имеются отдельные пики, встречающиеся в типовых МСП представителей 33 родов микромицетов (дрожжевых и мицелиальных; аскомицетных, базидиомицетных и мукоромицетных; анаморфных и телеоморфных): *Alternaria*, *Arthroascus*, *Aspergillus*, *Clavispora*, *Colletotrichum*, *Cryptococcus*, *Cyberlindnera*, *Dipodascus*, *Exophiala*, *Filobasidium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Hanseniaspora*, *Hyphopichia*, *Issatchenkia*, *Kazachstania*, *Kluyveromyces*, *Kodamaea*, *Lodderomyces*, *Malassezia*, *Metschnikowia*, *Meyerozyma*, *Microsporium*, *Mucor*, *Phoma*, *Pichia*, *Rhodosporeidium*, *Rhodotorula*, *Saprochaete*, *Sporidiobolus*, *Trichosporon*, *Wickerhamomyces*, *Yarrowia* и *Zygosaccharomyces* (Рис. 2.4). На рисунке 2.4 в таблице указан ряд пиков MALDI-масс-спектра *C. auris* РКПГ Y-1821, общих с другими дрожжевыми грибами; для краткости значения M_r соответствующих спектрообразующих ионов (m/z) округлены до десятых долей kDa. Если пики, образуя серию, имеют очень близкие m/z (M_r), то при перечислении им присвоен знак апостроф («'», «"» и т. д.). Анализ показан для 7 видов микромицетов, где нашли наибольшее совпадение по значениям «Score Value». Наличие таких пиков в определенной степени объяс-

няет ошибки масс-спектрометрической идентификации изолятов *C. auris*, которые возникают, если использовать электронные базы, где мало представлены типовые МСП коллекционных штаммов *C. auris*. Примечательно, что подавляющее большинство таких пиков расположено именно в сегменте «средних масс» (это хорошо видно на рисунке), малое количество (всего 2) – в сегменте «малых масс», а в сегменте «больших масс» они отсутствовали. По-видимому, при работе с «проблемными» в идентификации (и терапии) штаммами *Candida* spp. методом MALDI-TOF-MS на качество съемки именно этого сегмента спектра следует обратить максимальное внимание. Сходные феномены, исходя из нашего опыта, имеют место быть и у других дрожжей. Например, ранее, при работе со штаммами *Cryptococcus neoformans* [13], наряду с основной «линией» опыта, выявили, что именно съемка MALDI-масс-спектра с детализированным сегментом «больших масс» позволяет определить принадлежность штамма к вариантам *C. neoformans* var. *neoformans* и *C. neoformans* var. *grubii*. В то же время, если этот сегмент был снят не отчетливо, штаммы удавалось идентифицировать с высокими показателями достоверности, но только с дифференцировкой до уровня вида.

Сравнение MALDI-масс-спектров субкультур из различных органов мыши. Полученные группы масс-спектров для каждой органной субкультуры оказались сравнительно однородными (коэффициент корреляции (КК), составил 0,9342-0,9937; Рис. 2.3). По диагонали матрицы (из левого нижнего угла в правый верхний) показаны значения КК, отражающие масс-спектрометрическую однородность группы, а в других ячейка (на пересечении перпендикуляров горизонтальной и вертикальной осей) – средние показатели, отражающие сходство одной группы с другой. Наибольшие различия с масс-спектрами других субкультур выявили у спектральной группы, полученной из культуры, – высева пораженной селезенки (КК в сравнении со спектральными группами из других органов всего 0,6769-0,7167). Предполагаем, что такое отличие связано с включением особых механизмов адаптации возбудителя к существованию в окружении клеток, опосредствующих акты врожденного и приобретенного иммунитета, которые проходят с участием селезенки. С точки зрения фактического влияния на формирование

MALDI-масс-спектра, подобная адаптация может включать изменения в составе протеома, а также некоторые модификации клеточной стенки, что в конечном итоге отражается на качественных и количественных характеристиках получаемой при обработке белково-пептидной смеси. Хотя в целом из органных субкультур получают более интенсивные масс-спектры, в сравнении с интактной культурой (Рис. 1.8), число детектируемых пиков после заражения животного статистически значимо уменьшается (расчет критерия Уилкоксона: $W_{\text{эмпирич.}}=9$, $W_{\text{критич.}}=92$, $N=27$, $p<0,01$). Масс-спектры из органных субкультур при обработке собранного массива данных методом анализа главных компонентов сосредотачиваются в виде обособленной, но несколько гетерогенной группы, отделенной от группы спектров интактной культуры (Рис. 1.9), притом, что они были получены на среде одного состава, в идентичных условиях и с одинаковым способом подготовки. Это обстоятельство вновь доказывает изменения физико-химических свойств *C. auris* РКПГ Y-1821 вследствие пребывания в организме инфицированного животного.

К настоящему моменту накоплен большой объем работ, посвященных исследованию свойств клеточной стенки *Candida* spp. Убедительно показано, что отдельные факторы сборки и регуляции ее структуры определяют вирулентность возбудителей кандидоза [14]. Однако нам не удалось найти в доступной литературе обстоятельных исследований, отражающих биохимические изменения в клеточной стенке *Candida* spp., которые (хотя бы временно) сохраняются у культуры *in vitro* после модельной инфекции.

Сравнение MALDI-масс-спектров субкультур различных колониальных типов проведено методом построения матрицы сложного коэффициента корреляции и иерархической кластеризации, как описано выше. Изучены «белый» (субкультура «3») и «серый» вариант (субкультура «5») в субкультуре из почек инфицированной мыши, отличающиеся оттенком колоний. MALDI-масс-спектры «белого» варианта достаточно однородны ($KK=0,9660$), а группа спектров «серого» варианта более гетерогенна ($KK=0,9269$). Между этими вариантами данным методом прослеживаются неярко выраженные различия ($KK=0,9026$), а при иерархической кластеризации, как оказалось, MALDI-масс-

спектры двух вариантов кластеризуются строго отдельно (кроме одного спектра серого варианта, формирующего наиболее дистантную «внегрупповую» ветвь).

ВЫВОДЫ

1. Биомасса клеток *C. auris* РКПГ Y-1821, подготовленная к MALDI-TOF-масс-спектрометрии, отличается полиморфной картиной на мишени масс-спектрометра.

2. Кислотное травление на мишени клеток *C. auris* РКПГ Y-1821, выращенных на кровяном агаре при 35 °C за 24 ч, является наиболее эффективным способом подготовки материала для MALDI-TOF-масс-спектрометрии.

3. При использовании кислотного травления на мишени клеток *C. auris* РКПГ Y-1821, выращенных на агаре Сабуро в аналогичных условиях, масс-спектрометрическая съемка проходит с наименее воспроизводимым результатом.

4. Полное химическое экстрагирование белков и пептидов из культур *C. auris* (на примере штамма РКПГ Y-1821) не является обязательным для их успешной MALDI-идентификации.

5. MALDI-масс-спектр *C. auris* РКПГ Y-1821 имеет типичную композицию для грибов рода *Candida*.

6. *C. auris* РКПГ Y-1821 обладает штаммоспецифичными масс-спектрометрическими признаками.

7. Многие пики в MALDI-масс-спектрах *C. auris* РКПГ Y-1821 присутствуют в масс-спектрах из культур других микромицетов.

8. В «органной» субкультуре *C. auris* РКПГ Y-1821 расщепляется на «белый» и «серый» колониальные варианты, которые отличаются масс-спектрометрическими свойствами.

9. После пассажа в органах лабораторного животного в субкультурах *C. auris* РКПГ Y-1821 появляются изменения, включающие в повышение интенсивности ионного тока по всему диапазону съемки и снижение количества детектируемых пиков.

10. Субкультура из селезенки проявляет наиболее выраженные масс-спектрометрические различия в сравнении с субкультурами из других органов мыши, включенных в исследование.

Поддержка работы

Работа выполнена в рамках Государственного задания Минздрава России «Разра-

ботка быстрых методов диагностики микозов и молекулярных маркеров резистентности клинически значимых микромицетов к противо-

грибковым препаратам» (№ АААА-А18-118052990083-4).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Caceres D.H., Forsberg K., Welsh R.M., et al.* *Candida auris*: A review of recommendations for detection and control in healthcare settings. *Journal of Fungi*. 2019; 5 (4): 111. doi: 10.3390/jof5040111.
2. *Rausch E.P.* Особенности возбудителей внутрибольничного инвазивного кандидоза: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб.: СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2015. – 22 с. [*Rausch E.R.* Features of nosocomial invasive candidiasis causative agents: Abstract of the MD dissertation. St. Petersburg: SZGMU n.a. I.I. Mechnikov, 2015. – 22 p. (In Russ.)].
3. *Buil J.B., van der Lee H.A.L., Curfs-Breuker I., et al.* External quality assessment evaluating the ability of dutch clinical microbiological laboratories to identify *Candida auris*. *Journal of Fungi*. 2019; 5 (4): 94. doi: 10.3390/jof5040094
4. *Bao J.R., Master R.M., Azad K.N., et al.* Rapid, accurate identification of candida auris by using a novel matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) Database (Library). *Journal of Clinical Microbiology*. 2018; 56 (4): e01700-17. doi: 10.1128/JCM.01700-17
5. *Vatanshenassan M., Boekhout T., Meis J.F., et al.* *Candida auris* identification and rapid antifungal susceptibility testing against echinocandins by MALDI-TOF MS. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2019; 9: 20. doi:10.3389/fcimb.2019.00020
6. *Delavy M., Santos A., Heiman C., Coste A.* Investigating antifungal susceptibility in *Candida* species with MALDI-TOF MS-based assays. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2019: 9. doi: 10.3389/fcimb.2019.00019.
7. *Vasilyeva N., Kruglov A., Pchelin I.M., Riabinin I., et al.* The first Russian case of candidaemia due to *Candida auris*. ESCMID eLibrary. 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID 2018). 21-24 April, 2018. Madrid, Spain: P0311. https://www.escmid.org/escmid_publications/escmid_elibrary/
8. *Petti C.A., Brandt M.E., Church D.E., et al.* MM18. Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by targeted DNA sequencing. 2nd Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018. –152 p.
9. *Pchelin I.M., Azarov D.V., Churina M.A., Ryabinin I.A., et al.* Whole genome sequence of first *Candida auris* strain, isolated in Russia. *Medical Mycology*. 2019; 9. pii: myz078. doi: 10.1093/mmy/myz078.
10. *MALDI Biotyper 3.1 User Manual. Revision 1 (May 2012).* Bremen: Bruker Daltonics, 2012. – 212 p.
11. *Босак И.А., Выборнова И.В., Богомолова Т.С. и др.* Изучение вирулентности штаммов *Candida* spp. с разной чувствительностью к антимикотикам. *Проблемы медицинской микологии*. 2017; 19 (2): 44. [*Bosak I.A., Vybornova I.V., Bogomolova T.S., et al.* Study of virulence of *Candida* spp. with different sensitivity to antimicrotics. *Problems in Medical Mycology*. 2017; 19 (2): 44 (in Russ.)].
12. *Рябинин И.А.* Масс-спектрометрия в видовой идентификации возбудителей бактериальных и грибковых инфекций. Модуль. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. – Режим доступа: <https://www.rosmedlib.ru/book/1MECH-0006.html> [*Ryabinin I.A.* Mass-spectrometry in the specific identification of pathogens of bacterial and fungal infections. Module. – Moscow: GEOTAR-Media, 2016. – Mode of access: <https://www.rosmedlib.ru/book/1MECH-0006.html> (in Russ.)].
13. *Vasilyeva N.V., Atsapkina A.A., Riabinin I.A., Bogomolova T.S., Chilina G.A.* Evaluation of modified MALDI-TOF-based approach to identification and typing of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates. *Mycoses*. 2014; 57 (Suppl. 1): 70.
14. *Gow N.A.R., Hube B.* Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Current Opinion in Microbiology*. 2012; 15 (4): 406-412. doi: 10.1016/j.mib.2012.04.005

Поступила в редакцию журнала 17.02.2020

Рецензент: А.С. Степанов

ОСОБЕННОСТИ РОСТА *CANDIDA ALBICANS* В ПРИСУТСТВИИ ХОЛЕСТЕРИНА

Быкова Л.П. (доцент кафедры),
Трапезников Я.П. (студент), Годовалов
А.П. (в.н.с.)*, Бадыков И.И. (ординатор)

Пермский государственный медицинский университет
им. акад. Е.А. Вагнера (кафедра микробиологии и
вирусологии), Пермь, Россия

Цель исследования – изучение особенностей роста *Candida albicans* в присутствии холестерина. Осуществляли культивирование *C. albicans* в присутствии 0,5; 3; 5; 7; 9 ммоль/л холестерина, когда в течение 24 ч каждый час измеряли оптическую плотность при 580 нм. Концентрацию холестерина определяли в пробах перед культивированием и после него ферментативным методом. Для определения ингибирующего действия холестерина использовали диско-диффузионный метод. Способность микроорганизмов к биопленкообразованию оценивали, окрашивая биопленки генцианвиолетом с последующей его экстракцией спиртом и учетом оптической плотности при 560 нм. Для оценки изменений концентрации холестерина применяли набор для определения общего холестерина ферментативным методом ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск).

Установлено, что холестерин во всех изученных концентрациях не оказывает ингибирующего эффекта на *C. albicans*. Клинические штаммы по-разному меняют уровень холестерина в инкубационной среде. При оценке кинетики роста штаммов показано, что холестерин увеличивает накопление их биомассы. Кроме этого, культивирование *C. albicans* в присутствии холестерина ускоряет наступление экспоненциальной фазы роста штаммов. Интенсивность биопленкообразующей активности *C. albicans* существенно различалась в зависимости от концентрации холестерина.

Таким образом, клинические штаммы *C. albicans* могут существенно менять уровень холестерина в пробах. При этом меняются параметры роста штаммов и их функциональная активность.

Ключевые слова: *C. albicans*, холестерин, кинетика роста, биопленкообразование

CANDIDA ALBICANS GROWTH FEATURES IN THE PRESENCE OF CHOLESTEROL

Bykova L.P. (associate professor),
Trapeznikov Y.P. (student), Godovalov A.P.
(leading scientific collaborator), Badykov I.I.
(physician)

Acad. E.A. Wagner Perm State Medical University
(Department of Microbiology and Virology), Perm, Russian
Federation

The aim of the investigation was to study the growth characteristics of *Candida albicans* in the presence of cholesterol. *C. albicans* was cultured in the presence of 0.5; 3; 5; 7; 9 mmol/L of cholesterol, when the optical density at 580 nm was measured every hour for 24 hours. The concentration of cholesterol was determined in samples before cultivation and after it by the enzymatic method. To determine the mycotoxic effect of cholesterol, the disk diffusion method was used. The ability of microorganisms to biofilm formation was evaluated by staining the biofilms with a crystal violet, followed by its extraction with alcohol and taking into account the optical density at 560 nm. To assess changes in cholesterol concentration, a kit was used to determine total cholesterol by the enzymatic method.

It was found that cholesterol in all studied concentrations does not have a mycotoxic effect on *C. albicans*. Clinical strains change cholesterol levels in the incubation medium in different ways. When assessing the kinetics of growth of strains, it was shown that cholesterol increases the accumulation of biomass of strains. In addition, cultivation of *C. albicans* in the presence of cholesterol accelerates the onset of the exponential growth phase of the strains. The intensity of the biofilm-forming activity of *C. albicans* significantly varied depending on the concentration of cholesterol.

Thus, clinical strains of *C. albicans* can significantly change cholesterol levels in samples. In this case, the growth parameters of the strains and their functional activity change also.

Key words: *C. albicans*, cholesterol, growth kinetics, biofilm formation

Представители рода *Candida* известны как комменсалы и условно-патогенные микроорганизмы. *Candida albicans* характеризуется широким спектром факторов патогенности и персистенции, с помощью которых способна выживать в условиях постоянного воздействия врожденного и адаптивного иммунитета, вызывая развитие ряда заболеваний [1-3]. В настоящее время доказано, что микоинфекции с высокой частотой связаны с

* Контактное лицо: Годовалов Анатолий Петрович,
e-mail: agodovalov@gmail.com

заболеваемостью и смертностью человека. Значительная часть населения инфицирована грибами, а 1,5 миллиона человек умирают ежегодно от микозных инфекций. Отмечен значительный рост числа заболеваний, ассоциированных с грибами рода *Candida* [4]. Это обусловлено глобальным распространением вторичных иммунодефицитов, а также расширением арсенала диагностических приемов. Для возникновения заболеваний грибковой этиологии необходимо снижение реактивности организма, которое приводит к срыву регуляторных процессов, обеспечивающих функционирование симбиоза макро- и микроорганизма. Особую угрозу грибы представляют для пациентов с иммуносупрессией, у которых степень риска развития системного кандидоза значительно повышена, что зачастую приводит к смерти. При этом *C. albicans*, являясь представителем условно-патогенной микробиоты человека, находится в постоянном взаимодействии с эукариотическими клетками макроорганизма [5-7]. Результатом такого взаимодействия, сформировавшегося в процессе длительной коэволюции, является особая биохимическая взаимосвязь микроорганизмов и человека. В недавних исследованиях показана роль *Candida* spp. в формировании атеросклеротических бляшек, поддержании хронического воспаления сосудистой стенки. Кроме этого, персистенция *Candida* в бляшке обеспечивает регулярное поступление в системный кровоток различных метаболитов, которые могут включаться в биохимические пути организма человека [8-10]. Представляет интерес изучение особенностей взаимодействия основного участника липидного обмена человека – холестерина и грибов рода *Candida*.

Цель исследования – изучение особенностей роста *C. albicans* в присутствии холестерина.

В задачи исследования входила оценка влияния холестерина на ростовые свойства и биопленкообразование *C. albicans*, а также определение изменений концентрации холестерина в культуральной среде.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использованы 22 клинических штамма *C. albicans*. Культивирование грибов осуществляли в бульоне Сабуро, содержащем 0,5; 3; 5; 7; 9 ммоль/л холестерина (Serva, Германия), при температуре $+36 \pm 1^\circ\text{C}$. Подбор концентраций холестерина выполняли согласно [11]. В контрольных пробах вместо холестерина

был внесен его растворитель. Для оценки изменения концентрации холестерина пробы культивировали 48 ч, а для анализа ростовых свойств – 24 ч. В течение 24 ч каждый час измеряли оптическую плотность при 580 нм. Концентрацию холестерина определяли в пробах перед культивированием и после него.

Для выявления возможного ингибирующего действия холестерина использовали диско-диффузионный метод, когда диски из стерильной фильтрованной бумаги пропитывали в растворах с разной концентрацией холестерина. Затем диски после непродолжительного подсушивания помещали на поверхность агара Сабуро с посевом тест-штаммов. Учитывали зоны задержки роста вокруг дисков в миллиметрах.

Для определения способности микроорганизмов к биопленкообразованию применяли метод О'Тоуле [12]: толщину биопленок устанавливали при помощи окраски генцианвиолетом с последующей его экстракцией спиртом и учетом оптической плотности на фотометре при 560 нм. Биопленкообразование выявляли в стерильных плоскостных планшетах из полистирола.

Для оценки изменений концентрации холестерина использовали набор для определения общего холестерина ферментативным методом ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск).

Все исследования проведены в повторях не менее 3. Статистическую обработку данных осуществляли с применением парного варианта *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе работы было установлено, что холестерин во всех изученных концентрациях не оказывал ингибирующего эффекта на *C. albicans*.

В предварительном эксперименте исследовали изменение концентрации холестерина в культуральной среде с постоянным его уровнем. Выявлено, что клинические штаммы *C. albicans* по-разному меняют уровень холестерина в инкубационной среде. Так, при культивировании 54,6% штаммов наблюдали увеличение концентрации холестерина с $1,39 \pm 0,19$ до $1,90 \pm 0,14$ ммоль/л ($p < 0,05$). В трети случаев (31,8%) штаммы снижали концентрацию холестерина с $1,39 \pm 0,19$ до $0,97 \pm 0,12$ ммоль/л ($p < 0,05$), 13,6% штаммов при культивировании в инкубационной среде с холестерином не изменили его концентрацию. В контрольных пробах, где отсутствовали микроорганизмы, концентрация холестерина статистически

значимо не поменялась. Известно, что циркуляция штаммов, увеличивающих уровень холестерина, может способствовать развитию и поддержанию атеросклероза [11].

Для более детального исследования влияния холестерина на *C. albicans* оценивали ростовые свойства штаммов в присутствии разных концентраций холестерина. Во всех изученных концентрациях холестерин увеличивал накопление биомассы штаммов. Кроме этого, культивирование *C. albicans* в присутствии холестерина ускоряло наступление экспоненциальной фазы роста штаммов. Аналогичные данные получены для стационарной фазы роста штаммов (Рис. 1).

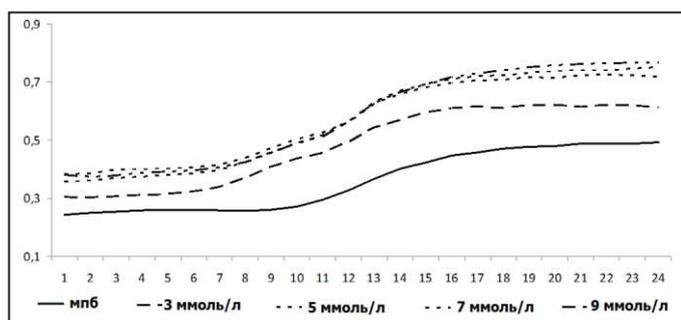


Рис. 1. Кинетика роста *C. albicans* в присутствии разных концентраций холестерина (по оси ординат – единицы оптической плотности, по оси абсцисс – часы).

Интенсивность биопленкообразующей активности *C. albicans* существенно различалась в зависимости от концентрации холестерина (Рис. 2). При всех концентрациях холестерина, кроме 9 ммоль/л, наблюдали снижение биопленкообразования.

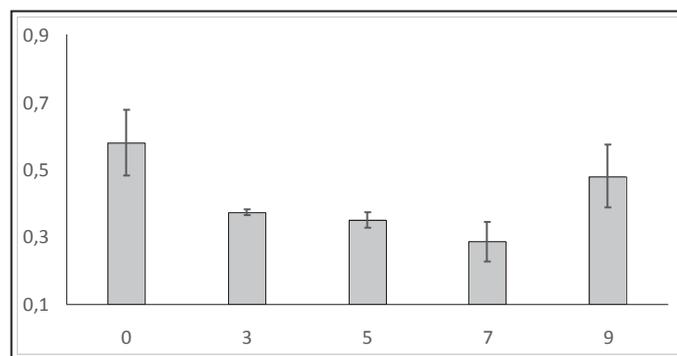


Рис. 2. Биопленкообразующая активность *C. albicans* в присутствии разных концентраций холестерина (по оси ординат – единицы оптической плотности; по оси абсцисс – концентрация холестерина в пробах в ммоль/л).

В целом допустимо предположить, что холестерин оказывает благоприятное влияние на ростовые свойства *C. albicans*, но тормозит биопленкообразование, что, вероятно, связано с тем, что штаммы используют холестерин для синтеза ряда структурных компонентов новых клеток, что может сочетаться со снижением биопленкообразования [13-15].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, для половины клинических штаммов *C. albicans* показана способность увеличивать концентрацию холестерина, а для трети штаммов – его деградировать. Только десятая часть штаммов никак не повлияла на концентрацию холестерина. Кроме того, в присутствии холестерина *C. albicans* накапливает биомассу более интенсивно, что отражается на кинетике роста штаммов. Биопленкообразование грибов в присутствии холестерина при концентрации 3-7 ммоль/л было сниженным. При достижении критической концентрации холестерина 9 ммоль/л плёнкообразование *C. albicans* усиливалось.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nikou S.A., Kichik N. *Candida albicans* interactions with mucosal surfaces during health and disease. Pathogens. 2019; 8 (2): 53. doi.org/10.3390/pathogens8020053
2. Лисовская А.М., Алешукина А.В. Изучение биологических свойств *Candida* spp., выделенных из различных локусов у амбулаторных больных. Проблемы медицинской микологии. 2006; 8 (2): 57. [Lisovskaja A.M., Aleshukina A.V. Study of the biological properties of *Candida* spp. isolated from various loci in outpatient patients. Problems in Medical Mycology. 2006; 8(2): 57 (In Russ)].
3. Li Q.Q., Tsai H.F., Mandal A., et al. Sterol uptake and sterol biosynthesis act coordinately to mediate anti-fungal resistance in *Candida glabrata* under azole and hypoxic stress. Mol. Med. Rep. 2018; 17(5):6585-6597. /doi.org/10.3892/mmr.2018.8716
4. Годовалов А.П., Быкова Л.П. Особенности *Candida* sp. из микробных ассоциаций при воспалительных заболеваниях дыхательных путей. Успехи медицинской микологии. 2013; 11: 84-87. [Godovalov A.P., Bykova L.P. Features of *C. albicans* sp. from microbial associations in inflammatory diseases of the respiratory tract. Advances in

medical mycology. 2013; 11: 84-87 (In Russ)].

5. Годовалов А.П., Ожгибесов Г.П., Быкова Л.П., Никулина Е.А. Изучение роли *Candida* spp. при дисбиозе кишечника. Проблемы медицинской микологии. 2008; 10 (2): 34. [Godovalov A.P., Ozhgibesov G.P., Bykova L.P., Nikulina E.A. Studying of role *Candida* spp. at intestinal dysbiosis. Problems in Medical Mycology. 2008; 10 (2): 34 (In Russ)].

6. Лебедева Т.Н. Иммуитет при кандидозе (обзор). Проблемы медицинской микологии. 2004; 6 (4): 8-16. [Lebedeva T.N. Immunity in candidiasis (review). Problems in Medical Mycology. 2004; 6(4): 8-16 (In Russ)].

7. Sima P., Vannucci L., Vetricka V. β -glucans and cholesterol. Int. J. Mol. Med. 2018; 41(4):1799-1808. doi.org/10.3892/ijmm.2018.3411

8. Нургельдыева М.Д., Ходжакулиев Б.Г. Особенности атерогенеза при сенсбилизации организма к *Candida albicans*. Евразийский кардиологический журнал. 2013; 1: 70-75. [Nurgel'dyeva M.D., Hodzhakuliev B.G. Features of atherogenesis in the case of the body sensitization to *Candida albicans*. Eurasian Journal of Cardiology. 2013; 1: 70-75 (In Russ)].

9. Kriaa A., Bourgin M., Potiron A., et al. Microbial impact on cholesterol and bile acid metabolism: current status and future prospects. J. Lipid. Res. 2019; 60(2):323-332. doi.org/10.1194/jlr.R088989

10. Walpole G.F.W., Grinstein S., Westman J. The role of lipids in host-pathogen interactions. IUBMB Life. 2018; 70(5):384-392. /doi.org/10.1002/iub.1737

11. Игонина Н.А., Журавлева Е.А., Кондрашева Е.А. Уровень холестерина в популяции взрослого населения РФ 20-70 лет. Атеросклероз и дислипидемии. 2012; 4: 67-71. [Igonina N.A., Zhuravleva E.A., Kondrasheva E.A. The cholesterol level in Russian adults aged 20-70 years. Atherosclerosis and dyslipidemia. 2012; 4: 67-71 (In Russ)].

12. O'Toole G.A. To build a biofilm. J. Bacteriol. 2003; 185 (9): 2687-9. doi.org/10.1128/JB.185.9.2687-2689.2003

13. Пашина О.А., Карташова О.Л., Пашкова Т.М., Попова Л.П. Характеристика биопрофилей *Candida albicans*, выделенных у здоровых лиц и при патологии. Проблемы медицинской микологии. 2015; 17 (3): 46-49. [Pashinina O.A., Kartashova O.L., Pashkova T.M., Popova L.P. Characteristics of *Candida albicans* bioprophiles allocated from healthy subjects and in pathology. Problems in medical mycology. 2015; 17(3): 46-49 (In Russ)].

14. Годовалов А.П., Быкова Л.П., Никулина Е.А., Ожгибесов Г.П. Изучение микробного пейзажа толстого кишечника при кандидозном носительстве. Медицинский вестник МВД. 2016; 80 (1): 41-43. [Godovalov A.P., Bykova L.P., Nikulina E.A., Ozhgibesov G.P. Study of colonic microflorain case of candidiasis carrier state. Medical Bulletin of the Ministry of Internal Affairs. 2016; 80(1): 41-43 (In Russ)].

15. Giorgi V., Menéndez P., García-Carnelli C. Microbial transformation of cholesterol: reactions and practical aspects-an update. World. J. Microbiol. Biotechnol. 2019; 35(9):131. doi.org/10.1007/s11274-019-2708-8

Поступила в редакцию журнала 24.09.2019

Рецензент: Т.С. Богомолова

XXVIII КОНГРЕСС ЕВРОПЕЙСКОЙ АКАДЕМИИ ДЕРМАТОЛОГИИ И ВЕНЕРОЛОГИИ (EADV)

¹Медведева Т.В. (дерматовенеролог)*,
²Леина Л.М. (доцент кафедры)

¹НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова; ²Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

THE 27TH CONGRESS OF EUROPEAN ACADEMY OF DERMATOLOGY AND VENEROLOGY (EADV)

¹Medvedeva T.V. (dermatovenereologist),
²Leina L.M. (associate professor of the
chair)

¹Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov; ²St.Petersburg State Pediatric Medical University, St.Petersburg, Russia

9-13 октября 2019 года в Мадриде (Испания) состоялся 28 Конгресс Европейской Академии Дерматологии и Венерологии (EADV). Заседания этого значимого форума проходили в здании IFEMA – Feria de Madrid, расположенного в районе Кампо-де-лас-Насьонес и насчитывающего сотни конференц-залов, 12 павильонов, 3 конференц-центра, 2 отеля и Большой Дворец Конгрессов (Рис.1).

В помещении IFEMA состоялось и торжественное открытие Конгресса EADV, на котором выступили нынешние руководители Академии – профессор В. Dreño (Франция), формировавшая научную программу Конгресса, и профессор С. Paul (Франция).

* Контактное лицо: Медведева Татьяна Владимировна,
e-mail: medvedeva43@mail.ru



Рис.1. IFEMA – Feria de Madrid.

В своем приветственном слове, адресованном участникам Конгресса, нынешний президент EADV профессор Carle Paul (Франция) (Рис. 2) сообщил, что мероприятие объединило 12 600 участников, 584 докладчика, которые представляли около 70 стран мира.

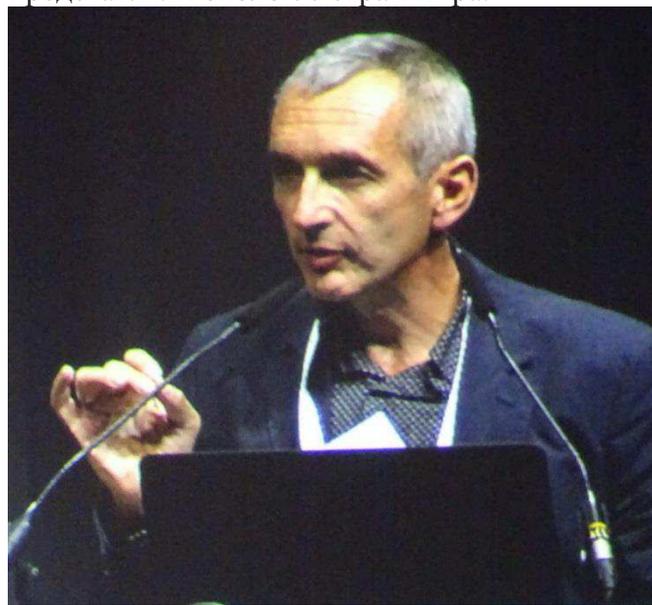


Рис. 2. Президент EADV профессор Carle Paul (Франция).

Также он отметил, что достижением данного Конгресса EADV явилось проведение «полемиических сессий», на которых были представлены различные взгляды на использование биологических препаратов в лечении кожных заболеваний, применение длительных курсов антибактериальных средств, топических кортикостероидов. Пленарная лекция на открытии Конгресса была посвящена искусственному интеллекту в медицине (I.H.V. Medrano, Испания).

Согласно установившейся традиции, за день до официального открытия Конгресса свои заседания провели многочисленные общества, объединяющие «узких» специалистов и дерматонерологов, проживающих в определенном регионе (или стране). Для практикующих клинических микологов всегда представляли интерес заседания ENS (European Nail Society), так как вопросы дифференциальной диагностики и терапии онихомикозов составляют значительную часть в повседневной деятельности дерматолога. В начале заседания собравшиеся были проинформированы о создании в 2019 году нового профессионального сообщества, занимающегося изучением ногтевых пластинок, – International Nail Society (INS), объединившего 4 крупных общества: ENS, Council for Nail Disorder (CND), Nail Society of India (NSI) и Korean Society for Nail Research (KSNR). Был избран президент нового общества – профессор D. Rigopoulos (Греция), и принято решение проводить международные саммиты INS 1 раз в три года.

Патологии ногтевых пластинок на прошедшем XXVIII Конгрессе EADV было уделено большое внимание: такое количество сессий, посвященных этой проблеме, активные участники мероприятий, проводимых Академией, не помнят. Отдельное заседание было отдано дерматоскопии ногтевых пластинок (онихоскопии). Нарушения состояния ногтевых пластинок различного генеза (псориазические, микотические, врожденные и др.), дисхромии ногтей составили проблематику для других заседаний. Отдельные доклады были посвящены хирургическим аспектам воздействия на ногтевые пластинки (в том числе и правильному забору биоптата). С сообщениями, связанными с микотическими поражениями ногтей, выступили ведущие ученые мирового сообщества – проф. B. Sigurgeirsson (Исландия), проф. N. Shear (Канада), проф. R. Varan (Франция), проф. B. Richert (Бельгия). Среди причин, затрудняющих адекватную терапию онихомикозов, помимо известных ранее (дерматофитома, возраст и сопутствующие заболевания пациента, наличие «yellow spikes»), на Конгрессе активно обсуждалась новая – формирование биопленки, и дискутировались пути преодоления данной ситуации. Также в материалах Конгресса были затронуты вопросы перспектив в лечении онихомикозов: молекула VT-1161 (ингибитор грибковой CYP51) с широким спектром действия в отношении дер-

матомицетов и *Candida* spp., находящаяся на 2 фазе исследования, и флоравуконазол (Л-лизинэтанол) – новый триазол, проходящий 3 фазу исследования (материалы были предоставлены доктором D.M.L. Saunte, Дания).

Значительную проблему для европейской медицины представляет приток мигрантов из стран Ближнего Востока и Северной Африки. Так, на 1 января 2018 года на территории Европы насчитывалось 22,3 млн. человек, не являющихся гражданами Евросоюза. Отдельная сессия EADV была посвящена изменениям структуры дерматологической заболеваемости в Европе в связи с миграционными процессами. Был проведен анализ состояния здоровья мигрантов, прибывших на Мальту в 2010-2011 гг. Установлено, что около 70% из них имели разного рода заболевания, причем дерматологическая патология была наиболее распространенной – 21,9% обследованных страдали кожными болезнями. Из дерматологических заболеваний в популяции мигрантов диагностировали кожный лейшманиоз (выходцы из Сирии, Афганистана), нарушения пигментации, а также инфекции кожи бактериальной и микотической этиологии.

Очередной 29 Конгресс EADV должен состояться осенью 2020 г. в Вене (Австрия).