

ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

Том 22 №4



Problems in medical mycology

Vol.22 №4

2020

Научно-практический журнал «Проблемы медицинской микологии» зарегистрирован ВАК
и с 2005 г. включен в Российский индекс научного цитирования (РИНЦ)

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, № 4, 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, № 4, 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), Шульгина М.В. — д.б.н. (Россия), Ямагучи М. — доктор медицины (Япония)

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

СОДЕРЖАНИЕ

ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ И ОБЗОРЫ

<i>Шиловский Г.А., Сорокина Е.В.</i> Охратоксин А и индукция антиоксидантной / антитоксической системы клетки транскрипционным фактором Nrf2 (обзор литературы)	3
---	---

КЛИНИЧЕСКАЯ МИКОЛОГИЯ

<i>Шагдилеева Е.В., Зайцева Е.А., Шадривова О.В., Николаева Н.Г., Десятник Е.А., Митрофанов В.С., Борзова Ю.В., Фролова Е.В., Учеваткина А.Е., Филиппова Л.В., Шурпицкая О.А., Игнатъева С.М., Васильева Н.В., Клишко Н.Н.</i> Хронический аспергиллез легких у пациентов после перенесенной COVID-19: описание клинических случаев и обзор литературы.....	8
<i>Мелёхина Ю.Э., Хостелиди С.Н., Бубнова Д.В., Борзова Ю.В., Десятник Е.А., Бехтерева И.А., Фролова Е.В., Учеваткина А.Е., Филиппова Л.В., Авдеенко Ю.Л., Богомолова Т.С., Игнатъева С.М., Васильева Н.В., Клишко Н.Н.</i> Криптококкоз лёгких у пациентов с идиопатической CD4+ лимфоцитопенией (описание двух клинических случаев и обзор литературы)	15
<i>Хисматуллина З.Р., Альхашаш Субхи М.С., Мустафина Г.Р.</i> Оценка эффективности использования глюкозаминилмурамилдипептида в комплексной терапии инфильтративно-нагноительной трихофитии волосистой части головы.....	24
<i>Курганская И.Г., Иванов А.М., Криворучко А.Б.</i> Новые подходы к отбору генетических маркеров, ассоциированных с развитием патологических рубцов кожи.....	29

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МИКОЛОГИЯ

<i>Александрова Н.А., Заславская М.И., Игнатова Н.И., Махрова Т.В., Лукова О.А.</i> Влияние продуктов метаболизма энтерококков на образование гифальной формы <i>Candida albicans</i>	35
<i>Жоля Я.С., Волонцевича А.М., Рябинин И.А.</i> Структура микрокультур некоторых <i>Aspergillus</i> spp. при периодическом наблюдении.....	38
<i>Стоянова Л.Г., Сорокина Е.В., Дбар С.Д.</i> Скрининг перспективных штаммов <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> для создания нетоксичных антимикотиков.....	46
<i>Егорова С.А., Кафтырева Л.А., Казановская Н.С.</i> Фенотипическая и молекулярная характеристика штаммов <i>Salmonella</i> , устойчивых к цефалоспорином расширенного спектра.....	54
<i>Боронина Л.Г., Саматова Е.В., Кукушкина М.П., Устюгова С.С.</i> Фенотипические характеристики изолятов <i>Haemophilus influenzae</i> , выделенных при инвазивных, первично-локализованных инфекциях и бактерионосительстве.....	60
<i>Макарова М.А., Круглов Е.Е., Матвеева З.Н., Зверьякина Н.Н., Кафтырева Л.А.</i> Характеристика штаммов <i>Escherichia coli</i> , выделенных при остром аппендиците и хроническом язвенном колите.....	66
<i>Шепелин А.П., Полосенко О.В., Храмов М.В., Марчихина И.И.</i> Изучение диагностической ценности высокоселективных питательных сред для выделения бактерий родов <i>Klebsiella</i> spp. и <i>Proteus</i> spp.	72

CONTENTS

PROBLEM ARTICLES AND REVIEWS

<i>Shilovsky G.A., Sorokina E.V.</i> Ochrotoxin A and induction of the cellular antioxidant / antitoxic system by transcription factor Nrf2 (literature review) ...	3
---	---

CLINICAL MYCOLOGY

<i>Shagdilееva E.V., Zaytseva E.A., Shadrivova O.V., Nikolaeva N.G., Desyatnik E.A., Mitrofanov V.S., Borzova Yu.V., Frolova E.V., Uchevatkina A.E., Filippova L.V., Shurpitskaya O.A., Ignatyeva S.M., Vasilyeva N.V., Klimko N.N.</i> Patients with chronic pulmonary aspergilliosis after COVID-19: description of clinical cases and literature review.....	8
<i>Melekhina Y.E., Khostelidi S.N., Bubnova D.V., Borzova Y.V., Desyatnik E.A., Bekhtereva I.A., Frolova E.V., Uchevatkina A.E., Filippova L.V., Avdeenko Y.I., Bogomolova T.S., Ignatieva S.M., Vasilyeva N.V., Klimko N.N.</i> Cryptococcosis of the lungs in patients with idiopathic CD4+ lymphocytopenia (two clinical cases and literature review)	15
<i>Khismatullina Z.R., Alkhash Subhi M.S., Mustafina G.R.</i> Evaluation of the effectiveness of glucosaminylmuramyldipeptide using in in the complex treatment of infiltrative-suppurative trichophytosis of the scalp.....	24
<i>Kurganskaya I.G., Ivanov A.M., Krivoruchko A.B.</i> New approaches to the selection of genetic markers associated with the development of pathological skin scars.....	29

EXPERIMENTAL MYCOLOGY

<i>Alexandrova N.A., Zaslavskaya M.I., Ignatova N.I., Makhrova T.V., Lukova O.A.</i> Influence of enterococcal metabolism products on the hyphal form generation of <i>Candida albicans</i>	35
<i>Jolya Ya.S., Volontsevich A.M., Ryabinin I.A.</i> Structure of some <i>Aspergillus</i> spp. slide-cultures under periodic investigation.....	38
<i>Stoyanova L.G., Sorokina E.V., Dbar S.D.</i> Screening for prospective strains <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> for the creation of non-toxic antimicrobics...	46
<i>Egorova S.A., Kaftyreva L.A., Kazanovskaya N.S.</i> Phenotypic and molecular characteristics of <i>Salmonella</i> strains resistant to extended-spectrum cephalosporins.....	54
<i>Boronina L.G., Samatova E.V., Kukushkina M.P., Ustyugova S.S.</i> Phenotypical characteristics of <i>Haemophilus influenzae</i> isolates obtained of invasive, primary localized infections and bacterial carrier.....	60
<i>Makarova M.A., Kруглов E.E., Matveeva Z.N., Kaftyreva L.A., Zverykina N.N.</i> Characteristics of <i>Escherichia coli</i> strains isolated in acute appendicitis and ulcerative colitis.....	66
<i>Shepelin A.P., Polosenko O.V., Khramov M.V., Marchikhina I.I.</i> Evaluating of the diagnostic value of highly selective culture media for isolation of bacteria of the genus <i>Klebsiella</i> spp. and <i>Proteus</i> spp.	72

ОХРАТОКСИН А И ИНДУКЦИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ / АНТИТОКСИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ КЛЕТКИ ТРАНСКРИПЦИОННЫМ ФАКТОРОМ NRF2 (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

^{1,2}Шиловский Г.А. (н.с.), ¹Сорокина Е.В. (н.с.)*

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова; ²Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, Москва, Россия

Микотоксин охратоксин А вызывает гиперпродукцию свободных радикалов, перекисное окисление липидов и повреждение клеток, прежде всего, в печени и в почках – в органах, ответственных за функции детоксикации и выделения соответственно. Окислительный стресс, по-видимому, является одним из механизмов токсичности охратоксина А в паренхиме печени и почек. В обзоре приведены данные, касающиеся влияния данного пищевого микотоксина на работу защитных систем клетки, управляемую транскрипционным фактором Nrf2.

Ключевые слова: охратоксин А, Nrf2, микотоксины, активные формы кислорода, окислительный стресс

OCHRATOXIN A AND INDUCTION OF THE CELLULAR ANTIOXIDANT / ANTITOXIC SYSTEM BY TRANSCRIPTION FACTOR NRF2 (LITERATURE REVIEW)

^{1,2}Shilovsky G.A. (scientist researcher),
¹Sorokina E.V. (scientist researcher)

¹Lomonosov Moscow State University; ²Institute for Information Transmission Problems of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

The mycotoxin ochratoxin A causes overproduction of free radicals, lipid peroxidation and cell damage, primarily in the liver and kidneys – in the organs responsible for the functions of detoxification and excretion, respectively. Oxidative stress seems to be one of the mechanisms of ochratoxin A toxicity in the liver and kidney parenchyma. The review provides data on the effect of this food mycotoxin on the functioning of the cell's defense systems controlled by the Nrf2 transcription factor.

Key words: ochratoxin, Nrf2, mycotoxins, reactive oxygen species, oxidative stress

* Контактное лицо: Сорокина Елена Владимировна,
e-mail: evsorokina77@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Охратоксины – это группа пентакетидных микотоксинов, обнаруживаемых в пищевых продуктах и продуцируемых в основном видами *Aspergillus* spp. и *Penicillium* spp. [1]. Содержание охратоксинов из-за длительного периода полураспада в пищевой цепи, по некоторым данным, может достигать 4 мкг/кг в готовых кормах и 19 мкг/кг – в зерновых, его присутствие показано в разных продуктах питания, включая виноград, орехи, инжир, злаки [2]. Ряд авторов оценивают среднее дневное потребление у человека в 1 нг/кг массы тела, также охратоксины обнаруживали в плазме человека в наномолярных концентрациях [3, 4].

Наиболее токсичный из них – охратоксин А (ОТА), поражающий в первую очередь почки (клетки проксимальных канальцев) и печень, а также характеризующийся нейротоксичностью и иммуносупрессивным действием [5, 6]. Его считают канцерогеном (Группа 2В) для человека, вызывающим опухоли почек [7]. Хотя механизм повреждающего действия ОТА полностью не изучен, предполагают, что ключевыми моментами являются окислительный стресс и генотоксичность [8].

В обзоре приведены данные, касающиеся влияния данного пищевого микотоксина на работу защитных систем клетки, управляемых транскрипционным фактором Nrf2 (эритроид-2-подобный 2 фактор 2).

Транскрипционный фактор (ТФ) Nrf2 индуцирует экспрессию детоксифицирующих и антиоксидантных белков фазы 1 и 2 в ответ на воздействие окислителей (электрофилов) [9]. Соответствующие белки способствуют предотвращению окислительного повреждения клеток и развитию химически индуцированных злокачественных новообразований. Nrf2 регулирует транскрипцию ферментов, участвующих в инактивации многочисленных активных форм кислорода (АФК). Среди таких АФК-детоксифицирующих ферментов – глутатионпероксидаза 2 (Gpx2) и глутатион-S-трансферазы (Gsts) (Gsta1, Gsta2, Gsta3, Gsta5, Gstm1, Gstm2, Gstm3 и Gstp1) [10, 11], а также тиоредоксинредуктаза 1 (Txnrd1) [12] и сульфиредоксин (Srxn1) [13], необходимые для восстановления окисленных тиолов белков [14]. У Nrf2-нуль мутантных мышей не происходит адаптивное повышение уровня экспрессии в ответ на действие повреждающего агента для многих генов антиоксидантных ферментов и белков детоксикации [15].

Введение токсинов компенсаторно активирует защитные системы клетки. Так, при действии многих ксенобиотиков повышается уровень Nrf2 и продуктов его генов-мишеней, защищая клетку от вредного воздействия. Например, показано, что воздействие афлатоксина В1 (AFB1) усиливает экспрессию Nrf2 у эмбрионов индейки [16]. В первичных гепатоцитах

бройлеров AFB1 вызывает повышенную продукцию активных форм кислорода и усиление экспрессии мРНК Nrf2 [17]. Подобные изменения экспрессии Nrf2 из-за воздействия AFB1 наблюдали также в кардиомиоцитах бройлеров [18]. Однако эффект не всех микотоксинов в этом аспекте одинаков [19]. Можно предположить, что наиболее опасным будет действие тех токсинов, которые, наряду с другими негативными эффектами, будут подавлять работу защитных систем клетки.

ОТА как ингибитор Nrf2

ОТА, как и упоминавшийся выше AFB1, вызывает перекисное окисление липидов в печени и почках бройлерных цыплят. Однако установлено, что пищевая добавка индуктора Nrf2 куркумина (150-450 мг/кг) значительно усиливает обусловленное AFB1 снижение уровня мРНК Nrf2, гемоксигеназы-1 и уровня экспрессии соответствующих белков. Напротив, воздействие охратоксина А (1126 г/кг корма) было связано со сверхэкспрессией гена Nrf2 в печени и почках по сравнению с контрольными цыплятами [20].

В модели нефротоксикоза, вызванного ОТА (50 мкг/кг массы тела) у цыплят, наблюдали снижение их массы тела и повышение перекисного окисления липидов, что является маркером окислительного стресса. Также при этом отмечено снижение антиоксидантной способности и уровня экспрессии генов, связанных с сигнальными путями PI3K/AKT и Nrf2/Keap1 [21]. При этом добавление препарата «селеновых дрожжей» («Se-Y», 0,4 мг/кг) восстанавливало активность экспрессии гена Nrf2 и его генов-мишеней (HO-1, GSH-px, GLRX2, MnSOD и CAT) у цыплят, подвергшихся воздействию ОТА.

В нескольких исследованиях установлено, что при вызванном ОТА окислительном стрессе потенциальным механизмом окислительного повреждения и токсичности ОТА является нарушение индукцибельности Nrf2, и, наоборот, индукция Nrf2 может предотвратить токсичность ОТА [22-26]. В некоторых работах продемонстрировано, что ОТА ингибирует ядерный фактор, путь реакции на окислительный стресс Nrf2 [27-32]. На клеточном уровне это ослабит синтез глутатиона, рециркуляцию окисленного глутатиона, активность оксидоредуктаз и индуцируемость генов метаболизма фазы II.

Loboda A. и соавт. выявили, что дефицит Nrf2 усугубляет ОТА-индуцированную токсичность *in vitro* и *in vivo* [33]. Ни в одном исследовании не сообщалось об активации Nrf2 в ответ на ОТА, а в крупном транскриптомном изучении всего генома заявлено об отсутствии индукции Nrf2-зависимых генов с помощью ОТА в различных протестированных моделях проксимальных канальцев *in vitro* [34], что не характерно для соединения, вызывающего окислительный стресс. Можно предположить, что

воздействие ОТА каким-то образом предотвращает активацию Nrf2. Есть несколько доказательств, подтверждающих эту гипотезу. Reszka E. и соавт. [35] продемонстрировали, что уровни селена в плазме крови положительно коррелировали с клеточными уровнями Nrf2, что согласуется с результатами добавления «селеновых дрожжей» («Se-Y») к корму, загрязненному ОТА, в почках кур. Воздействие ОТА снижает уровень Nrf2 и его гена-мишени, гемоксигеназы-1, в эпителиальных клетках проксимальных канальцев почек [25, 36]. Вероятно, окислительный стресс, вызываемый различными микотоксинами, затрагивает регуляцию Nrf2. У крыс, подвергшихся воздействию ОТА через желудочный зонд, отмечали снижение мРНК Nrf2-зависимых генов в почках, но не в печени [23].

Аналогично на молоди карпа ОТА (1,85 мг/кг массы тела) также вызывал перекисное окисление липидов и подавление окислительно-восстановительной системы глутатиона, включая экспрессию генов, кодирующих ее компоненты [37]. Отсутствие увеличения экспрессии Nrf2 предполагает отсутствие активации системы антиоксидантной защиты на уровне генов и белков. Например, ОТА индуцирует дозозависимое увеличение количества АФК в первичных клетках проксимальных канальцев почек крыс и в линии канальцевых клеток LLC-RK1, что приводит к истощению запасов внутриклеточного глутатиона и гибели клеток [38].

Cavin C. и соавт. [24] также обнаружили ОТА-индуцированное ингибирование Nrf2, исследуя экспрессию белка нескольких Nrf2-регулируемых генов в культурах клеток печени и почек крыс. Они выявили, что ОТА истощает запасы GSH в клетках почек и печени и снижает уровни соответствующих белков – продуктов генов-«мишеней» Nrf2. У отъемных поросят ОТА (в дозах 379,6 и 338,1 мкг/кг корма в течение семи недель) также вызывал замедление набора веса, перекисное окисление липидов (измеряемое по количеству малонового диальдегида) в печени и почках, а также ухудшение работы окислительно-восстановительной системы глутатиона, экспрессия ферментов которой также находится под контролем Nrf2 [39].

В исследовании *in vitro* установлено, что воздействие ОТА (5 мкМ) приводит к ингибированию Nrf2-зависимых генов в клетках первичных проксимальных канальцев почки человека [28, 34]. Показано, что ОТА ингибирует активацию Nrf2 не классическим способом (путем тиол-зависимой инактивации ингибитора Nrf2 Keap1), а на стадии транслокации Nrf2 в ядро [40, 41]. Так, при воздействии различных концентраций ОТА у мышей наблюдали дозозависимое увеличение АФК, сопутствующее снижение GSH и увеличение повреждений ДНК в клетках кожи. Однако при этом не обнаружили накопления Nrf2 в ядрах при любой концентрации и даже

отмечали небольшое снижение базальной ядерной локализации Nrf2 [40] в клетках линии LLC-PK1. Boesch-Saadatmandi С. и соавт. продемонстрировали, что совместное введение ОТА и сульфорафана сильно ослабляет индуцируемую сульфорафаном ядерную транслокацию и трансактивацию Nrf2 [25].

Вероятно, при этом задействованы не-KEAP-1-зависимые пути, например, регулирующие Nrf2 p300/CBP-зависимого ацетилирования [13], и, возможно, общее нарушение трансляции и синтеза белка. Также с использованием репортеров ARE-люциферазы с помощью анализа сдвига электрофоретической подвижности было показано, что ОТА вызывает дозозависимое снижение активности Nrf2 [24, 25]. Как и в предыдущих моделях токсичности ОТА, предварительная обработка гепатоцитов комбинацией сильных индукторов Nrf2 дитерпенов кафестола и кахвеола восстанавливает устойчивый ответ Nrf2 [22]. Индукция Nrf2 значительно снижалась, когда ОТА совместно инкубировали с дитерпенами. В клетках HepG2 ОТА вызывал образование АФК и активировал ядерную транслокацию маркера воспаления NF-κB, но подавлял таковую для ответственного за защиту клетки Nrf2. Эти негативные эффекты отменялись известным антиоксидантом и индуктором Nrf2 кверцетином [42]. Таким образом, можно предположить, что ОТА не мешает текущему ответу Nrf2, но блокирует его инициирование.

Важными посттранскрипционными регуляторами являются микроРНК (miRNAs), некоторые из которых влияют на Nrf2 и его нижестоящие мишени [43]. Установлено, что ОТА индуцирует несколько miRNA с особенно высокой индукцией miR-132, что вызывает уменьшение уровня мРНК Nrf2 в клетках линии LLC-PK1. Аналогично подавление miR-132 антигомиром предотвращает снижение мРНК Nrf2 при воздействии ОТА [36]. Согласно этим результатам, можно предположить участие miRNA, особенно miR-132, в регуляции самого гена Nrf2. Также ОТА (1126 мкг/кг корма) увеличивал экспрессию пролиферативных трансформирующих факторов роста β (TGF-β), одновременно снижая экспрессию Nrf2, гемоксигеназы-1 и эритропоэтина в клетках проксимальных канальцев почек свиней. Аденовирусная сверхэкспрессия Nrf2 противодействовала ОТА-опосредованному снижению экспрессии гемоксигеназы-1, эритропоэтина и клеточной пролиферации, а также увеличению генерации АФК и экспрессии TGFβ.

Многие стороны взаимодействия ОТА и системы белков детоксикации, регулируемых фактором Nrf2, помогут выявить дальнейшие экспериментальные исследования. Для их проведения на качественно более высоком уровне в числе прочих условий

исследователю необходимы высокоточные методы измерения концентрации ОТА, а также высокочувствительные «живые модели», позволяющие выявлять эффекты ОТА, оказываемые *in vivo*. В частности, для решения первой задачи коллективом группы иммунохимических методов анализа (руководитель группы – проф. Еремин С.А., МГУ им. М.В. Ломоносова) предложены методы с использованием наночастиц золота, что позволяет повысить порог обнаружения ОТА в 15 раз в сравнении со стандартной методикой [44]. В лаборатории физиологии и биохимии микробов МГУ разработана система оценки интегральной токсичности веществ на основе биотеста «Эколюм», основой которой является генно-инженерный штамм *Escherichia coli* K12 TG1 с созданным светящимся фенотипом, обеспеченным встроенным lux-опероном морских светящихся бактерий. Практика работы с данной системой показала ее эффективность для изучения различных химических соединений, включая подбор их эффективных и токсических концентраций [45].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из обзора литературы по изучению действия охратоксина А *in vivo* следует, что, предположительно, он значительно увеличивает образование свободных радикалов в печени и почках, в органах, ответственных за функции детоксикации и выделения соответственно, вызывает окислительный стресс и подавляет активацию путей, ответственных за работу систем клеточной защиты. Эти негативные последствия во многом связаны с подавлением способности транскрипционного фактора Nrf2 индуцировать экспрессию генов адаптивного ответа. Отсутствие активации Nrf2, о чем свидетельствует низкий уровень мРНК большинства Nrf2-зависимых генов, приводит к нарушению антиоксидантной защиты, и, таким образом, к ухудшению последствий окислительного стресса, даже при малых дозах охратоксина А.

Несомненно, использование разработанных передовых методов анализа, включая количественное определение микотоксинов, а также выявление биологических эффектов, позволит уточнить их механизмы действия.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект 18-29-13037).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. В данной работе не было никаких экспериментальных исследований, в которых были использованы в качестве объектов люди или животные.

ЛИТЕРАТУРА

1. Marin S., Ramos A.J., Cano-Sancho G., Sanchis V. Mycotoxins occurrence, toxicology, and exposure assessment.

Food Chem. Toxicol. 2013; 60: 218-37. doi: 10.1016/j.fct.2013.07.04.

2. Akpinar H.A., Kahraman H., Yaman I. Ochratoxin A sequentially activates autophagy and the ubiquitin-proteasome system. Toxins (Basel). 2019; 11 (11): 615. doi: 10.3390/toxins11110615.

3. Peraica M., Domijan A.M., Fuchs R., et al. The occurrence of Ochratoxin A in blood in general population of Croatia. Toxicol. Lett. 1999; 110: 105-112.

4. Özcelik N.; Kosar, A.; Soysal, D. Ochratoxin A in human serum samples collected in Isparta-Turkey from healthy individuals and individuals suffering from different urinary disorders. Toxicol. Lett. 2001; 121: 9-13.

5. Petrik J., Zanic-Grubisic T., Barisic K., et al. Apoptosis and oxidative stress induced by ochratoxin A in rat kidney. Arch. Toxicol. 2003; 77: 685-693. doi: 10.1007/s00204-003-0501-8.

6. Shin H.S., Lee H.J., Pyo M.C., et al. Ochratoxin A-induced hepatotoxicity through phase I and Phase II reactions regulated by AhR in liver cells. Toxins (Basel). 2019; 11 (7): 377. doi: 10.3390/toxins11070377.

7. Duarte S.C., Pena A., Lino C.M. Human ochratoxin A biomarkers – from exposure to effect. Crit. Rev. Toxicol. 2011; 41: 187-212. doi: 10.3109/10408444.2010.529103.

8. Imaoka T., Yang J., Wang L., et al. Microphysiological system modeling of ochratoxin A-associated nephrotoxicity. Toxicology. 2020; 444: 152582. doi: 10.1016/j.tox.2020.152582.

9. Kobayashi M., Yamamoto M. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. Adv. Enzyme Regul. 2006; 46: 113-140. doi: 10.1016/j.advenzreg.2006.01.007.

10. Chanas S.A., Jiang Q., McMahon M., et al. Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase Gsta1, Gsta2, Gstm1, Gstm2, Gstm3 and Gstm4 genes in the livers of male and female mice. Biochem. J. 2002; 365: 405-416. doi: 10.1042/BJ20020320.

11. Thimmulappa R.K., Mai K.H., Srisuma S., et al. Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. Cancer Res. 2002; 62: 5196-5203.

12. Sakurai A., Nishimoto M., Himeno S., et al. Transcriptional regulation of thioredoxin reductase 1 expression by cadmium in vascular endothelial cells: role of NF-E2-related factor-2. J. Cell Physiol. 2005; 203: 529-537. doi: 10.1002/jcp.20246.

13. Tebay L.E., Robertson H., Durant S.T. et al. Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease. Free Radic. Biol. Med. 2015; 88: 108-146. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.021.

14. Hawkes H.J., Karlenius T.C., Tonissen K.F. Regulation of the human thioredoxin gene promoter and its key substrates: a study of functional and putative regulatory elements. Biochim. Biophys. Acta. 2014; 1840: 303-314. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.09.013.

15. Itoh K., Chiba T., Takahashi S., Ishii T., et al. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1997; 236: 313-322. doi: 10.1006/bbrc.1997.6943.

16. Monson M.S., Cardona C.J., Coulombe R.A., et al. Hepatic transcriptome responses of domesticated and wild turkey embryos to aflatoxin B1. Toxins. 2016; 8: 1. doi: 10.3390/toxins8010016.

17. Li K., Cao Z., Guo Y., et al. Selenium Yeast Alleviates Ochratoxin A-Induced Apoptosis and Oxidative Stress via Modulation of the PI3K/AKT and Nrf2/Keap1 signaling pathways in the kidneys of chickens. Oxid. Med. Cell. Longev. 2020; 2020: 4048706. doi: 10.1155/2020/4048706.

18. Wang W.J., Xu Z.L., Yu C., et al. Effects of aflatoxin B1 on mitochondrial respiration, ROS generation and apoptosis in broiler cardiomyocytes. Anim. Sci. J. 2017; 88: 1561-1568. doi: 10.1111/asj.12796.

19. Surai P.F., Kochish I.I., Fisinin V., et al. Antioxidant defence systems and oxidative stress in poultry biology: an update. Antioxidants (Basel). 2019; 8 (7): 235. doi: 10.3390/antiox8070235.

20. Kövesi B., Cserháti M., Erdélyi M., et al. Long-term effects of ochratoxin A on the glutathione redox system and its regulation in chicken. Antioxidants (Basel). 2019; 8(6): 178. doi: 10.3390/antiox8060178.

21. Liu F., Malaphan W., Xing F., Yu B. Biodetoxification of fungal mycotoxins zearalenone by engineered probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* with surface-displayed lactonohydrolase. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2019; 103 (21-22): 8813-8824. doi: 10.1007/s00253-019-10153-1.

22. Cavin C., Holzhaeuser D., Scharf G., et al. Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. Food Chem. Toxicol. 2002; 40: 1155-1163. doi: 10.1016/S0278-6915(02)00029-7.

23. Marin-Kuan M., Nestler S., Verguet C., et al. A toxicogenomics approach to identify new plausible epigenetic mechanisms of ochratoxin a carcinogenicity in rat. Toxicol. Sci. 2006; 89: 120-134. doi: 10.1093/toxsci/kfj017.

24. Cavin C., Delatour T., Marin-Kuan M., et al. Reduction in antioxidant defenses may contribute to ochratoxin A toxicity and carcinogenicity. Toxicol. Sci. 2007; 96 (1): 30-39. Doi: 10.1093/toxsci/kfl169.

25. Boesch-Saadatmandi C., Loboda A., Jozkowicz A., et al. Effect of ochratoxin A on redox-regulated transcription factors, antioxidant enzymes and glutathione-S-transferase in cultured kidney tubulus cells. Food Chem. Toxicol. 2008; 46(8): 2665-2671. doi: 10.1016/j.fct.2008.04.023.

26. Robledinos-Antón N., Fernández-Ginés R., Manda G., et al. Activators and Inhibitors of NRF2: A review of their potential for clinical development. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2019; 2019: 9372182. doi: 10.1155/2019/9372182.
27. Sorrenti V., Di Giacomo C., Acquaviva R., et al. Toxicity of ochratoxin A and its modulation by antioxidants: A review. *Toxins.* 2013; 5: 1742-1766. doi: 10.3390/toxins5101742.
28. Limonciel A., Jennings P. A review of the evidence that ochratoxin A is an NRF2 inhibitor: implications for nephrotoxicity and renal carcinogenicity. *Toxins.* 2014; 6 (1): 371-379. doi: 10.3390/toxins6010371.
29. Bhat P.V., Pandareesh M.D., Khanum F., et al. Cytotoxic effects of ochratoxin A in neuro-2a cells: role of oxidative stress evidenced by N-acetylcysteine. *Front. Microbiol.* 2016; 7: 1142. doi: 10.3389/fmicb.2016.01142.
30. Costa J. G., Saraiva N., Guerreiro P.S., et al. Ochratoxin A-induced cytotoxicity, genotoxicity and reactive oxygen species in kidney cells: an integrative approach of complementary endpoints. *Food Chem. Toxicol.* 2016; 87: 65-76. doi: 10.1016/j.fct.2015.11.018
31. Ge J., Zhang C., Sun Y.C., et al. Cadmium exposure triggers mitochondrial dysfunction and oxidative stress in chicken (*Gallus gallus*) kidney via mitochondrial UPR inhibition and Nrf2-mediated antioxidant defense activation. *Sci. Total Environ.* 2019; 689: 1160-1171. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.06.405.
32. Zhang Q., Zhao Y., Talukder M., et al. Di(2-ethylhexyl) phthalate induced hepatotoxicity in quail (*Coturnix japonica*) via modulating the mitochondrial unfolded protein response and Nrf2 mediated antioxidant defense. *Sci. Total Environ.* 2019; 651(Part 1): 885-894. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.09.211.
33. Loboda A., Stachurska A., Sobczak M., et al. Nrf2 deficiency exacerbates ochratoxin A-induced toxicity *in vitro* and *in vivo*. *Toxicology.* 2017; 389: 42-52. doi: 10.1016/j.tox.2017.07.004.
34. Jennings P., Weiland C., Limonciel A., et al. Transcriptomic alterations induced by ochratoxin A in rat and human renal proximal tubular *in vitro* models and comparison to a rat *in vivo* model. *Arch. Toxicol.* 2012; 86: 571-589. doi: 10.1007/s00204-011-0780-4.
35. Reszka E., Wieczorek E., Jablonska E., et al. Association between plasma selenium level and Nrf2 target genes expression in humans. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2015; 30: 102-106. doi: 10.1016/j.jtemb.2014.11.008.
36. Stachurska A., Ciesla M., Kozakowska M., et al. Cross-talk between microRNAs, nuclear factor e2-related factor 2, and heme oxygenase-1 in ochratoxin A-induced toxic effects in renal proximal tubular epithelial cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 2013; 57 (3): 504-515. doi: 10.1002/mnfr.201200456.
37. Kövesi B., Kulcsár S., Zándoki E., et al. Short-term effects of deoxynivalenol, T-2 toxin, fumonisin B1 or ochratoxin on lipid peroxidation and glutathione redox system and its regulatory genes in common carp (*Cyprinus carpio* L.) liver. *Fish Physiol. Biochem.* 2020; 46 (6): 1921-1932. doi: 10.1007/s10695-020-00845-1.
38. Schaaf G.J., Nijmeijer S.M., Maas R.F., et al. The role of oxidative stress in the ochratoxin a-mediated toxicity in proximal tubular cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 2002; 1588: 149-158. doi: 10.1016/S0925-4439(02)00159-X.
39. Balogh K., Hausenblasz J., Weber M., et al. Effects of ochratoxin A on some production traits, lipid peroxide and glutathione redox status of weaned piglets. *Acta Vet. Hung.* 2007; 55 (4): 463-70. doi: 10.1556/AVet.55.2007.4.5.
40. Kumar R., Ansari K.M., Chaudhari B.P., et al. Topical application of ochratoxin A causes DNA damage and tumor initiation in mouse skin. *PloS ONE.* 2012; 7: e47280.
41. Ramyaa P., Padma V.V. Ochratoxin-induced toxicity, oxidative stress and apoptosis ameliorated by quercetin-modulation by Nrf2. *Food Chem. Toxicol.* 2013; 62: 205-216. doi: 10.1016/j.fct.2013.08.048.
42. Ramyaa P., Krishnaswamy R., Padma V.V. Quercetin modulates OTA-induced oxidative stress and redox signalling in HepG2 cells - Up regulation of Nrf2 expression and down regulation of NF-kappaB and COX-2. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014; 1840 (1): 681-692. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.10.024.
43. Chorley B.N., Campbell M.R., Wang X., et al. Identification of novel Nrf2-regulated genes by ChIP-Seq: influence on retinoid X receptor alpha. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40: 7416-7429.
44. Самохвалов А.В., Сафенкова И.В., Еремин С.А. и др. Применение наночастиц золота для высокочувствительного поляризационного флуоресцентного аптамерного анализа охратоксина А. *Российские нанотехнологии*, 2019; 14 (7-8): 91-99. doi: 10.21517/1992-7223-2019-7-8-91-99.
45. Сорокина Е.В. Биотестирование с использованием бактериального люминесцентного теста: достоинства и усовершенствования метода. *Успехи современной биологии.* 2017; 137 (6): 613-620.

Поступила в редакцию журнала 08.12.2020

Рецензент: И.А. Рябинин

ХРОНИЧЕСКИЙ АСПЕРГИЛЛЕЗ ЛЕГКИХ У ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ ПЕРЕНЕСЕННОЙ COVID-19: ОПИСАНИЕ КЛИНИЧЕСКИХ СЛУЧАЕВ И ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Шагдилеева Е.В. (доцент)*, Зайцева Е.А. (ординатор), Шадринова О.В. (доцент), Николаева Н.Г. (аспирант), Десятник Е.А. (врач-миколог), Митрофанов В.С. (зав. отд.), Борзова Ю.В. (зав. клиникой), Фролова Е.В. (зав. лаб.), Учеваткина А.Е. (с.н.с.), Филиппова Л.В. (с.н.с., ассистент кафедры), Шурпицкая О.А. (зав. лаб.), Игнатъева С.М. (в.н.с.), Васильева Н.В. (директор института, зав. кафедрой), Климов Н.Н. (зав. кафедрой)

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

Впервые в России представлены два клинических случая хронического аспергиллеза легких (ХАЛ) на фоне перенесенной новой коронавирусной инфекции (COVID-19). У больных после обусловленной SARS-CoV-2 деструктивной пневмонии на компьютерной томографии органов грудной клетки (КТ ОГК) были выявлены аспергиллемы – полости с мягкотканым компонентом («грибные шары»). Клиническими проявлениями ХАЛ были субфебрильная температура, усиливающаяся при физической нагрузке одышка и общая слабость. Для постановки диагноза ХАЛ использовали клинические и лабораторные критерии ECMM/ESCMID/ERS, 2016. Обе больные получили терапию вориконазолом, выписаны в удовлетворительном состоянии.

У пациентов после перенесенной новой коронавирусной инфекции возможно развитие ХАЛ. При выявлении полостей в легких для исключения ХАЛ необходимо обследование: проведение повторной КТ легких, тест на специфический *A. fumigatus* IgG в сыворотке крови, микроскопия и посев БАЛ или мокроты, а также тест на галактоманн в БАЛ.

Ключевые слова: аспергиллез, хронический аспергиллез легких, *Aspergillus* spp., COVID-19, коронавирусная инфекция, SARS-CoV-2

PATIENTS WITH CHRONIC PULMONARY ASPERGILLIOSIS AFTER COVID-19: DESCRIPTION OF CLINICAL CASES AND LITERATURE REVIEW

Shagdileeva E.V. (associate professor), Zaytseva E.A. (resident), Shadrivova O.V. (associate

professor), Nikolaeva N.G. (postgraduate student), Desyatnik E.A. (clinical mycologist), Mitrofanov V.S. (head of the clinical department), Borzova Yu.V. (head of the clinic), Frolova E.V. (head of the laboratory), Uchevatkina A.E. (senior scientific researcher), Filippova L.V. (senior scientific researcher, assistant of the department), Shurpickaya O.A. (head of the laboratory), Ignatyeva S.M. (leading scientific researcher), Vasilyeva N.V. (director of the institute, head of the department), Klimko N.N. (head of the department)

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia

For the first time in Russia, two clinical cases of chronic pulmonary aspergillosis (CPA) on the background of a new coronavirus infection (COVID-19) were presented. Aspergillomas – cavities with soft tissue markings (“fungal balls”) were found on the CT scans of the chest in patients after destructive pneumonia caused by the SARS-CoV-2. Clinical signs of CPA were subfebrile temperature, increased dyspnea with exertion and general weakness. For the CPA’s diagnosis clinical and laboratory criteria ECMM/ESCMID/ERS, 2016 were used. Both patients received voriconazole therapy. They were discharged in satisfactory condition.

Patients who have undergone a new coronavirus infection may develop CPA. If cavities are detected in the lungs, to exclude chronic pulmonary aspergillosis, medical examination is required: repeated CT scan of thorax, a test for specific *A. fumigatus* IgG in blood serum, microscopy and culture of BAL (bronchoalveolar lavage) or sputum, and galactomannan test in BAL.

Key words: aspergillosis, chronic pulmonary aspergillosis, *Aspergillus* spp., COVID-19, coronavirus infection, SARS-CoV-2

В конце декабря 2019 г. Китай сообщил о вспышке коронавирусной инфекции (COVID-19), вызванной SARS-CoV-2. Это стало глобальной угрозой, связанной с высокой частотой госпитализаций в отделения реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) [1]. По мере того, как пандемия коронавируса распространяется по всему миру, возникают новые клинические проблемы, одной из которых является развитие различных суперинфекций, в том числе грибковых. Ряд публикаций был посвящен инвазивному аспергиллезу легких у пациентов на фоне COVID-19 [2-8], и уже изданы международные клинические рекомендации по диагностике и лечению таких больных [2]. В октябре 2020 г. был опубликован первый случай развития хронического аспергиллеза легких (ХАЛ) у больного на фоне SARS-CoV-2 [9]. Мы представляем первое в России описание развития ХАЛ у двух больных после перенесенной пневмонии COVID-19.

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

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Представлены клинические случаи развития ХАЛ у пациентов после перенесенной новой коронавирусной инфекции. Для постановки диагноза ХАЛ использовали клинические и лабораторные критерии ESCMM/ESCMID/ERS, 2016 [10]. Также авторы провели анализ данных научной литературы в базе PubMed, ClinicalKey и Elibrary (декабрь 2020 г.). Поиск информации осуществляли по следующим ключевым словам: аспергиллез, хронический аспергиллез легких, *Aspergillus spp.*, COVID-19, коронавирусная инфекция, SARS-CoV-2.

Клинический случай №1.

Пациентка Р., 53 лет, поступила в микологическую клинику 09.11.20 г. с жалобами на субфебрильную температуру, одышку, усиливающуюся при физической нагрузке.

При объективном осмотре общее состояние удовлетворительное. Кожные покровы сухие, обычной окраски. Лимфатические узлы не увеличены. Дыхание самостоятельное. Над областью легких дыхание жесткое, проводится во все отделы, хрипов нет, частота дыхательных движений – 22 в минуту. Сатурация – 94%. При аускультации сердца тоны ясные, ритмичные, шумов нет. Артериальное давление – 120/80 мм рт. ст. Частота сердечных сокращений – 120 в мин. Живот при пальпации мягкий, перистальтические шумы отсутствуют. Печень и селезенка не увеличены. Отеки нижних конечностей. Температура тела – 36,2°C. Физиологические отправления в норме.

Анамнез заболевания: считает себя больной с 21.07.20 г., когда отметила повышение температуры тела до 39 °С, появление слабости и головной боли. Самостоятельно начала принимать амоксициллин + клавулановую кислоту (1000 мг), азитромицин (500 мг), ксиазаверин, дексаметазон, ривароксабан.

Выполнили компьютерную томографию органов грудной клетки (КТ ОГК): плевропневмоническая инфильтрация в S3 правого легкого (низкая вероятность вирусной пневмонии). Единичные участки уплотнения легочной ткани S8 правого легкого и S9 левого лёгкого, вероятнее гиповентиляционного характера. Субплевральные очаговые уплотнения легочной ткани S5 правого легкого и в S5, S8 левого легкого, вероятнее перифиссуральные лимфатические узелки. Плевропульмональные и плевродиафрагмальные спайки обоих лёгких.

На третьи сутки состояние ухудшилось – температура сохранялась, выросла одышка в покое, в связи с чем пациентка была госпитализирована в инфекционное отделение клинической инфекционной больницы им. С.П. Боткина. Вновь выполнили исследование мазков из зева и носа методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на РНК SARS-CoV-2 – результат положительный.

Установлен диагноз: новая коронавирусная инфекция (ПЦР «+» от 24.07.20 г.), тяжелое течение.

Осложнения: двусторонняя полисегментарная вирусно-бактериальная пневмония, дыхательная недостаточность II-III ст. Синдром системной воспалительной реакции. Из сопутствующих заболеваний: гипертоническая болезнь II ст. Нарушение толерантности к глюкозе. Хронический пиелонефрит вне обострения.

В клиническом анализе крови: лейкоциты – $9,32 \times 10^9/\text{л}$, нейтрофилы – $7,91 \times 10^9/\text{л}$, лимфоциты – $0,56 \times 10^9/\text{л}$; в биохимическом анализе крови: ферритин – 408,2 мкг/л, С-реактивный белок – 66,1 мг/л, остальные показатели в пределах нормы.

На КТ ОГК от 27.07.20 г. выявлена отрицательная динамика: обширные двусторонние участки альвеолярной консолидации легочной ткани с видимыми просветами бронхов, широко прилежащие к костальной плевре. Единичные фокусы «матового стекла» с ретикулярными изменениями в прикорневом отделе и средней доле правого легкого. Небольшое количество жидкости по задней поверхности правого легкого. Картина течения двусторонней полисегментарной вирусной пневмонии. Высокая вероятность КТ паттерна COVID-19. КТ-признаки средне-тяжелой степени (Рис. 1).

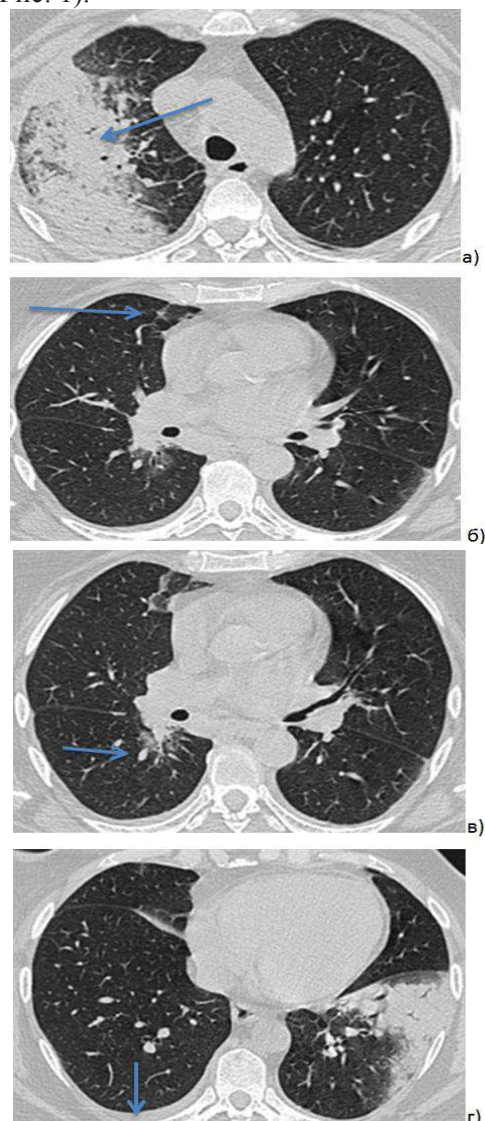


Рис.1. КТ ОГК от 27.07.2020 г.: а) участки альвеолярной консолидации легочной ткани с видимыми просветами

бронхов; б, в) единичные фокусы «матового стекла» с ретикулярными изменениями в прикорневом отделе и средней доле правого легкого; г) жидкость.

Пациентка получала лечение: антибактериальные препараты (лефлобакт, азитромицин, цефтриаксон, гентамицин), глюкокортикостероиды (дексаметазон), тоцилизумаб, инфузионную, ингаляционную и кислородотерапию, с положительным эффектом.

На контрольной КТ ОГК 22.08.20 г.: двусторонние участки консолидации легочной ткани с ретикулярными изменениями, расположенные по периферии и в глубине легочной ткани. В S3 правого легкого визуализируется полость распада с мягкотканым компонентом в верхнем отделе (Рис. 2).

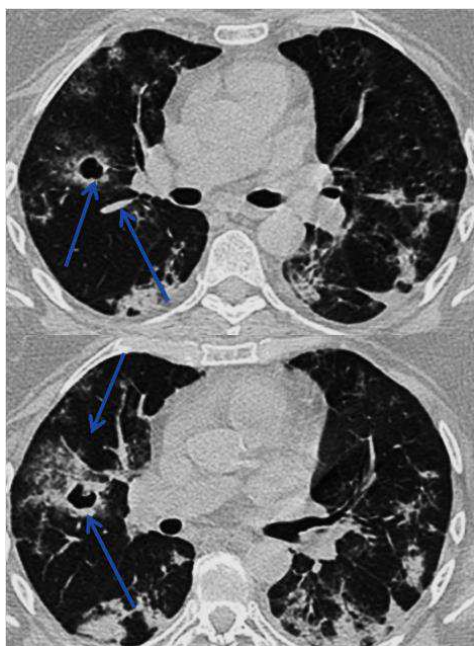


Рис. 2. КТ ОГК от 22.08.2020 г. В S3 правого легкого – полость распада с мягкотканым компонентом в верхнем отделе (стрелки).

После стабилизации состояния, улучшения лабораторных показателей (С-реактивный белок – 13,8 мг/л, остальные показатели в пределах нормы) и получения двух отрицательных результатов исследования мазков методом ПЦР на РНК SARS-CoV-2, 03.09.20 г. пациентка переведена в Городскую многопрофильную больницу №2 для дообследования, уточнения генеза полости, определения дальнейшей тактики лечения.

В клиническом анализе крови: лейкоциты – $6,5 \times 10^9$ /л, нейтрофилы – $4,8 \times 10^9$ /л, лимфоциты – $0,85 \times 10^9$ /л. При исследовании мокроты кислотоустойчивых микобактерий не обнаружили, при посеве мокроты получен рост *Klebsiella pneumoniae* – 5×10^5 .

Продолжили лечение антибактериальными препаратами (колистиметат натрия), системными глюкокортикостероидами (преднизолон, дексаметазон), больная также получала антикоагулянты, гастропротекторы, гипотензивные, муколитические, гипогликемические препараты, кислородотерапию.

На фоне проводимого лечения отмечали положительную динамику в виде улучшения общего самочувствия, уменьшения одышки, повышения толерантности к физической нагрузке. Выписана в удовлетворительном состоянии. С учетом перенесенной новой коронавирусной инфекции COVID-19 крайне тяжелой формы и формирования полости в S3 правого легкого было рекомендовано обследование в микологической клинике СЗГМУ им. И.И. Мечникова для исключения микоза легких.

27.10.20 г. у пациентки наблюдали повторный подъем температуры тела до 38 °С. Через 3 дня выполнили КТ ОГК: диффузные слабоинтенсивные участки пониженной воздушности по типу «матового стекла», минимально выраженные ретикулярные изменения. Размеры полости в S3 правого легкого сократились, в просвете остается мягкотканый компонент (Рис. 3).

Сохранялась субфебрильная температура тела без клинического эффекта от приема ципрофлоксацина.

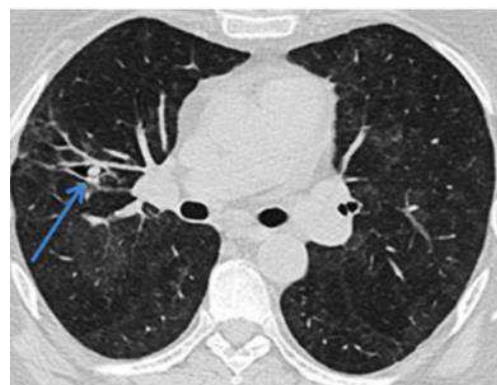


Рис. 3. КТ ОГК от 30.10.2020 г. полость в S3 правого легкого с мягкотканым компонентом (стрелка).

При поступлении в микологическую клинику в клиническом анализе крови: лейкоциты – $9,3 \times 10^9$ /л, нейтрофилы – $5,76 \times 10^9$ /л, лимфоциты – $2,42 \times 10^9$ /л; в биохимическом анализе крови: повышение уровней глюкозы – 6,64 ммоль/л и мочевины – 9,52 ммоль/л. Мазок из зева и носа методом ПЦР на РНК SARS-CoV-2 – отрицательный. Антитела к антигенам SARS-CoV-2 IgM не обнаружены.

При оценке иммунного статуса выявили признаки сохраняющегося иммунно-воспалительного синдрома: повышение количества Т-хелперов – $1,354 \times 10^9$ /л (норма – $0,580-1,300 \times 10^9$ /л), снижение количества интерферона- α – 50 пг/мл (норма – 100-500 пг/мл) и интерферона- γ – 586 пг/мл (1000-5000 пг/мл), снижение количества общего IgG – 6,94 г/л (норма – 7,0-15,0 г/л). Выраженных нарушений в субпопуляционном составе лимфоцитов не наблюдали.

Выполнили исследование бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ): тест на галактоманнан – отрицательный (ИОП=0,10), при микроскопии и посеве микроботы не выявили. По данным цитологического ис-

следования ПЖБ – небольшое количество клеток респираторного эпителия без атипии. Альвеолярные макрофаги в небольшом количестве, лейкоциты – до 20-30 в поле зрения. Элементы грибов не обнаружены. Тест на *A. fumigatus* IgG в сыворотке крови – положительный 1:400 (норма <1:100).

На основании данных клинической картины (субфебрильная температура, одышка, усиливающаяся при физической нагрузке, жесткое дыхание при аускультации, сатурация – 94%), характерных КТ признаков (полость в S3 правого легкого с мягкотканым содержимым) и определения специфического IgG к *A. fumigatus* в сыворотке крови (1:400) установлен диагноз «хронический аспергиллез лёгких».

Больная получала антимикотическую терапию вориконазолом 800 мг в 1 сутки, затем – 400 мг в сутки. Нежелательных явлений на фоне приема препарата не отмечала. Выписана в удовлетворительном состоянии. Рекомендованы продолжение антимикотической терапии амбулаторно (курс – 3 месяца) и последующая оценка динамики в микологической клинике.

Клинический случай №2.

Пациентка Г., 66 лет, поступила в микологическую клинику СЗГМУ им. И.И. Мечникова 17.09.20 г. с жалобами на выраженную общую слабость, тяжесть в ногах, сухость во рту.

При объективном осмотре общее состояние удовлетворительное. Кожные покровы обычной окраски, влажные. Лимфатические узлы не увеличены. Дыхание самостоятельное. Над областью легких дыхание жесткое, проводится во все отделы, хрипов нет, частота дыхательных движений – 16 в минуту. При аускультации сердца тоны ясные, ритмичные, шумов нет. Артериальное давление – 150/90 мм рт. ст. Частота сердечных сокращений – 75 в минуту. Живот при пальпации мягкий, перистальтические шумы отсутствуют. Печень и селезенка не увеличены. Отеки нижних конечностей. Температура тела – 36,3 °С. Физиологические отправления в норме.

Анамнез заболевания: в мае 2020 г. появились боли в левой икроножной мышце, одышка при физической нагрузке, общая слабость.

07.06.2020 г. боль в левой икроножной мышце стала нестерпимой, в связи с чем пациентка была госпитализирована в НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе. На основании проведенного обследования установлен диагноз: тромбоэмболия легочной артерии (ТЭЛА) от 07.06.20 г., посттромбофлебитическая болезнь левой нижней конечности, хроническая венозная недостаточность I ст., варикозная болезнь вен нижних конечностей. Получала соответствующее лечение.

Из сопутствующих заболеваний: ревматоидный артрит с преимущественным поражением лучезапястных суставов, II ф.кл. Аутоиммунный тиреоидит. Медикаментозный тиреотоксикоз на фоне заме-

стительной терапии левотироксидом натрия. Сахарный диабет 2 типа в стадии декомпенсации. Диабетическая нейропатия. Ишемическая болезнь сердца. Атеросклеротический кардиосклероз. Гипертоническая болезнь II ст. Артериальная гипертензия 3 ст. Риск сердечно-сосудистых осложнений 4. Посттромбофлебитическая болезнь левой нижней конечности, хроническая венозная недостаточность I ст. Варикозная болезнь вен нижних конечностей.

На 15-е сутки госпитализации у пациентки повысилась температура тела до 39 °С, в клиническом анализе крови – лейкоцитоз, в биохимическом анализе крови – повышение СРБ. При исследовании мазков из зева и носа методом ПЦР на РНК SARS-CoV-2 получили положительный результат. Переведена в СПб ГБУЗ «Городская Мариинская больница». Выполнена компьютерная томография органов грудной клетки 23.06.20 г.: полисегментарная интерстициальная инфильтрация со средним объемом поражения легочной ткани до 28%. Вероятность вирусного генеза – высокая. Очаги Гона в S2 правого легкого. Лимфаденопатия средостения. Атеросклероз аорты, коронарных, брахиоцефальных артерий. Дегенеративные изменения грудного отдела позвоночника.

Установлен диагноз: внутрибольничная деструктивная пневмония нижней доли левого легкого от 23.06.20 г. Полисегментарная COVID-19 пневмония от 25.06.20 г.

Проводимая терапия: антибактериальная (амоксциллин, азитромицин), системные глюкокортикостероиды (дексаметазон), антикоагулянтная (эноксапарин натрия), гастропротективная (омепразол), железозаместительная (железа фумарат, фолиевая кислота), сахаропонижающая (глимеперид, метформин), статины (аторвастатин), муколитическая (ацетилцистеин), инфузионная, заместительная терапия (L-тироксин), лозартан, бисопролол, спиронолактон, фуросемид.

На фоне проводимого лечения отмечали положительную клиническую и лабораторную динамику. На КТ ОГК от 07.07.20 г.: ранее выявленные участки инфильтрации частично регрессировали, трансформировавшись в участки «матового стекла», распространенность изменений снизилась, расчетный процент поражения – 20%.

Больная выписана 11.07.20 г. в удовлетворительном состоянии.

На контрольной КТ ОГК 04.08.20 г.: слева в S6 впервые выявлена полость с толстыми стенками, размером 40x42 мм, с неоднородным содержимым, перифокальными уплотнениями по типу «матового стекла», фиброзными тяжами, инфильтрацией по костальной плевре (Рис. 4).

Пациентка консультирована торакальным хирургом в НИИ фтизиопульмонологии, рекомендовано обследование в микологической клинике СЗГМУ им. И.И. Мечникова для исключения ХАЛ.

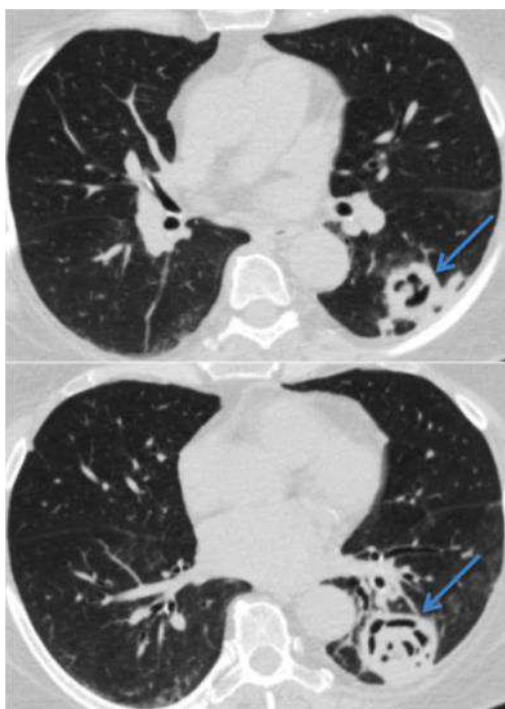


Рис. 4. КТ ОГК от 04.08.2020 г. Слева в S6 определяется полость с толстыми стенками.

При поступлении в микологическую клинику в клиническом анализе крови: лейкоциты – $8,2 \times 10^9/\text{л}$; нейтрофилы – $5,8 \times 10^9/\text{л}$; лимфоциты – $1,8 \times 10^9/\text{л}$. В биохимическом анализе крови – повышение уровня глюкозы до $12,65 \text{ ммоль/л}$, остальные лабораторные показатели в пределах нормы.

При оценке иммунного статуса выявили признаки сохраняющегося иммуно-воспалительного синдрома: повышение числа цитотоксических Т-лимфоцитов – $1,168 \times 10^9/\text{л}$ (норма – $0,370-1,000 \times 10^9/\text{л}$), естественных киллеров – $0,445 \times 10^9/\text{л}$ (норма – $0,120-0,370 \times 10^9/\text{л}$), НКТ-клеток – $0,248 \times 10^9/\text{л}$ (норма – $0,007-0,165 \times 10^9/\text{л}$); снижение уровня общего IgG – $4,26 \times 10^9 \text{ г/л}$ (норма – $7,0-15,0 \times 10^9 \text{ г/л}$), повышение метаболической активности нейтрофилов (повышены уровни НСТ спонтанного и НСТ активированного – 33% и 75% соответственно); снижение продукции интерферона- α – 27 пг/мл (норма – 100-500 пг/мл) и интерферона- γ – 343 пг/мл (норма – 1000-5000 пг/мл). Выраженных нарушений в субпопуляционном составе лимфоцитов не обнаружили.

В связи с высоким риском жизнеугрожающих осложнений (сохраняющихся радиологических признаков ТЭЛА) фибробронхоскопию пациентке не проводили. Выполнили исследование трахеального аспирата, полученного в ходе непрямой ларингоскопии с внутригортанным вливанием физиологического раствора: при микроскопии выявлен истинный мицелий микромицета, сходного с *Aspergillus*. Результат теста на *A. fumigatus* IgG в сыворотке крови был отрицательным – 1:50 (норма <1:100).

По данным КТ ОГК: в динамике размеры полости в S6 левого легкого сократились, в структуре полости сохранялся мягкотканый компонент и включения воздуха, вдоль костальной плевры на уровне полостного образования фиброзные изменения (Рис. 5.)

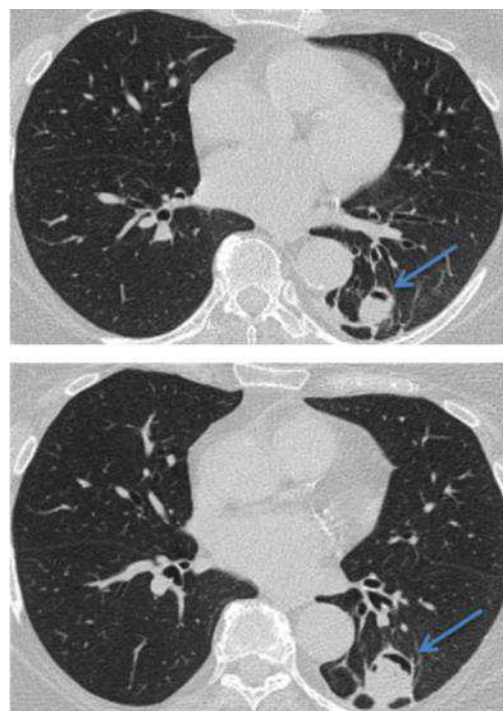


Рис. 5. КТ ОГК от 18.09.2020: полость в S6 левого легкого с мягкотканым компонентом и включениями воздуха.

На основании клинических данных (выраженная общая слабость), результатов лабораторных исследований (выявление сходного с *Aspergillus* мицелия при микроскопии трахеального аспирата) и характерных КТ признаков (полость в S6 правого легкого с мягкотканым компонентом – аспергиллема) диагностировали хронический аспергиллез лёгких. Пациентка получала антимикотическую терапию вориконазолом 800 мг в 1 сутки, затем – 400 мг в сутки. Выписана в удовлетворительном состоянии 14.10.20 г. Рекомендовано продолжение антимикотической терапии амбулаторно, курс – 3 месяца.

ОБСУЖДЕНИЕ И ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В результате литературного поиска мы обнаружили только один описанный случай ХАЛ, развившийся у 73-летнего мужчины [9], который поступил в ОРИТ в связи с нарастанием одышки, на фоне установленной коронавирусной инфекции.

Анамнез заболевания: за три дня до госпитализации появились жалобы на субъективные ощущения повышения температуры, озноб, продуктивный кашель, выраженную слабость и снижение аппетита. Были взяты мазки из зева и носа методом ПЦР на РНК SARS-CoV-2 – результат положительный. Установлен диагноз COVID-19, из сопутствующих заболеваний – гипертоническая болезнь.

При поступлении: тахипноэ (частота дыхательных движений – до 35 в минуту), сатурация – 85%. На рентгенограмме ОГК в день поступления выявили двусторонние периферические инфильтраты, характерные для COVID-19, без каких-либо признаков полостей. Получал лечение: ремдесивир, дексаметазон, переливание плазмы и кислородотерапию. Несмотря на проводимую терапию антибиотиками широкого спектра действия, у пациента сохранялась лихорадка до 39 °С и потребность в кислородотерапии. Через три недели после поступления выполнили КТ ОГК: обширное поражение легочной ткани с участками пониженной воздушности по периферии по типу «матового стекла» с двух сторон, а также тонкостенные полости в средней доле справа и верхней доле слева.

При посеве респираторного субстрата, полученного при интубации, был выделен *Aspergillus flavus*. Тест на галактоманнан в сыворотке крови – отрицательный. В посевах крови роста грибов не было. На основании проведенного обследования установили диагноз ХАЛ. Получал антимикотическую терапию вориконазолом. В связи с тяжелым острым респираторным дистресс-синдромом на фоне SARS-CoV-2, осложненным ХАЛ, пациенту выполнили трахеостомию и перевели в реабилитационный центр.

Мы впервые в России представили два клинических случая ХАЛ на фоне перенесенной COVID-19.

Хронический аспергиллез легких возникает преимущественно у пульмонологических больных при наличии полостей в легочной ткани. Основными «фоновыми» состояниями для развития ХАЛ являются туберкулез или нетуберкулезный микобактериоз, реже – саркоидоз легких и бронхоэктазы [10]. Также известны и другие «фоновые» заболевания – хроническая обструктивная болезнь легких, буллезная эмфизема, пневмоторакс, опухоль легкого и ранее перенесенная деструктивная пневмония [11]. У наших пациентов и в описанном клиническом случае [9] в анамнезе не было указанных заболеваний и полостей в легких. Полости в легких сформировались в результате деструкции легочной ткани на фоне полисегментарной пневмонии, обусловленной SARS-CoV-2.

Клиническими проявлениями ХАЛ у данной категории больных были субфебрильная температура, одышка, усиливающаяся при физической нагрузке, общая слабость. Во всех случаях ХАЛ развился примерно через 1 месяц от начала респираторной инфекции на фоне клинически значимой лимфоцитопении.

В связи с предшествующей на догоспитальном этапе лимфоцитопенией, характерной для SARS-CoV-2 [12], мы провели иммунологическое обследование для оценки тяжести иммуносупрессии. Нами были установлены признаки иммуновоспалительного синдрома на фоне снижения функциональной активности как гуморального, так и клеточного иммунитета (повышение количества отдель-

ных субпопуляций Т-лимфоцитов, снижение уровня общего IgG и снижение продукции интерферона-α и интерферона-γ). Выраженных нарушений в субпопуляционном составе лимфоцитов не выявили. Полученные данные, вероятно, свидетельствуют об иммунных нарушениях в результате перенесенной новой коронавирусной инфекции, что сопоставимо с данными других исследователей [12, 13]. Отметим, что дисрегуляция иммунной системы на фоне COVID-19 может увеличивать риск инвазивных и хронических микотических инфекций [14].

В соответствии с клиническими рекомендациями [10] для диагностики ХАЛ необходимо сочетание нескольких признаков: стойкие изменения на рентгенограмме или, что предпочтительнее, на КТ легких; прямые доказательства аспергиллезной инфекции или серологическое подтверждение; следует исключить новообразование, туберкулез, гематому и бактериальный абсцесс. Если выявлены КТ признаки ХАЛ, для его лабораторного подтверждения используют тест на специфический *A. fumigatus* IgG в сыворотке крови, микроскопию и посев БАЛ или мокроты, а также тест на галактоманнан в БАЛ. Еще одним эффективным диагностическим методом является обнаружение гифов гриба либо рост *Aspergillus* spp. при исследовании биоптатов легких.

В описанном ранее случае ХАЛ [9] диагноз был подтвержден выявлением аспергиллемы на КТ ОГК и высевом *A. flavus* из полученного при интубации респираторного субстрата, при этом тест на галактоманнан в сыворотке крови был отрицательным. У наших больных ХАЛ подтвержден данными КТ ОГК (наличие аспергиллемы) в сочетании с лабораторными данными: у пациентки №1 – положительный *A. fumigatus* IgG в сыворотке крови, у пациентки №2 – выявление гифов сходного с *Aspergillus* микромицета при микроскопии трахеального аспирата.

Лечение ХАЛ включает длительное (3-6 месяцев) применение антимикотиков (вориконазола, итраконазола или позаконазола), а также хирургическое удаление очага поражения.

Поздняя диагностика и отсутствие адекватного лечения ХАЛ приводят к высокой летальности – до 50% в течение 5 лет [10]. По данным Lowes D. и соавторов, 1-, 5- и 10-летняя выживаемость составляют 86%, 62% и 47% соответственно [11]. Наши больные и описанный ранее пациент [10] были выписаны в удовлетворительном состоянии, однако этих данных недостаточно для оценки выживаемости в данной когорте больных.

ВЫВОДЫ

У пациентов после перенесенной новой коронавирусной инфекции возможно развитие ХАЛ. При выявлении полостей в легких для исключения ХАЛ необходимо обследование: проведение повторной КТ легких, тест на специфический *A. fumigatus* IgG в сы-

воротке крови, микроскопия и посев БАЛ или мокроты, а также тест на галактоманнан в БАЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zhou F., Yu T., Du R., et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2020; 395 (10229): 1054-1062. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30566-3.
2. Prattes J., Valentin T., Hoenigl M., et al. Invasive pulmonary aspergillosis complicating COVID-19 in the ICU – A case report. *Med. Mycol. Case Rep.* 2020. doi: 10.1016/j.mmcr.2020.05.001.
3. Koehler P., Cornely O.A., Böttiger B.W., et al. COVID-19 associated pulmonary aspergillosis. *Mycoses*. 2020; 63 (6): 528-534. doi: 10.1111/myc.13096.
4. Alanio A., Dellièrè S., Fodil S., et al. Prevalence of putative invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients with COVID-19. *Lancet Respir. Med.* 2020; 8 (6): e48-e49. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30237-X.
5. Arkel A.L.E., Rijpstra T.A., Belderbos H.N.A., et al. COVID-19 associated pulmonary aspergillosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2020; 202 (1): 132-135. doi: 10.1164/rccm.202004-1038LE.
6. Nasir N., Farooqi J., Mahmood S.F., et al. COVID-19-associated pulmonary aspergillosis (CAPA) in patients admitted with severe COVID-19 pneumonia: an observational study from Pakistan. *Mycoses*. 2020; 63 (8): 766-770. doi: 10.1111/myc.13135.
7. Arastehfar A., Carvalho A., Van De Veerdonk F.L., et al. COVID-19 associated pulmonary aspergillosis (CAPA) – from immunology to treatment. *J. Fungi (Basel)*. 2020; 6 (2): 91. doi: 10.3390/jof6020091.
8. Gangneux J.P., Reizine F., Guegan H., et al. Is the COVID-19 pandemic a good time to include aspergillus molecular detection to categorize aspergillosis in ICU patients? A monocentric experience. *J Fungi (Basel)*. 2020; 6 (3): 105. doi: 10.3390/jof6030105.
9. Koehler P., Bassetti M., Chakrabarti A., et al. Defining and managing COVID-19-associated pulmonary aspergillosis: the 2020 ECMM/ISHAM consensus criteria for research and clinical guidance. *Lancet Infect Dis.* 2020; S1473-3099 (20) 30847-1. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30847-1.
10. Patti R.K., Dalsania N.R., Somal N., et al. Subacute aspergillosis “fungal balls” complicating COVID-19. *J. Investig. Med. High Impact. Case Rep.* 2020; 8: 2324709620966475. doi: 10.1177/2324709620966475
11. 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 (1): 45-68. doi: 10.1183/13993003.00583-2015.
12. Lowes D., Al-Shair K., Newton P.J., et al. Predictors of mortality in chronic pulmonary aspergillosis. *Eur. Respir. J.* 2017; 49 (2): 1601062. doi: 10.1183/13993003.01062-2016.
13. Shah V.K., Firmal P., Alam A., et al. Overview of immune response during SARS-CoV-2 infection: lessons from the past. *Front. Immunol.* 2020; 11: 1949. doi: 10.3389/fimmu.2020.01949
14. Qin C., Zhou L., Hu Z., et al. Dysregulation of immune response in patients with coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71 (15): 762-768. doi: 10.1093/cid/ciaa248.

Поступила в редакцию журнала 23.12.2020

Рецензент: М.А. Шевяков

КРИПТОКОККОЗ ЛЁГКИХ У ПАЦИЕНТОВ С ИДИОПАТИЧЕСКОЙ CD4+ ЛИМФОЦИТОПЕНИЕЙ (ОПИСАНИЕ ДВУХ КЛИНИЧЕСКИХ СЛУЧАЕВ И ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Мелёхина Ю.Э. (доцент)*, Хостелиди С.Н. (доцент), Бубнова Д.В. (студент), Борзова Ю.В. (зав. микологической клиникой), Десятник Е.А. (врач-миколог), Бехтерева И.А. (врач-патологоанатом), Фролова Е.В. (зав. лаб.), Учеваткина А.Е. (с.н.с.), Филиппова Л.В. (с.н.с., ассистент кафедры), Авдеенко Ю.Л. (с.н.с.), Богомоллова Т.С. (зав. лаб.), Игнатъева С.М. (в.н.с.), Васильева Н.В. (директор института, зав. кафедрой), Клишко Н.Н. (зав. кафедрой)

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

Идиопатическая CD4+лимфоцитопения – редкое заболевание, которое характеризуется дефицитом CD4+лимфоцитов и оппортунистическими инфекциями. Наиболее распространенная оппортунистическая инфекция у пациентов с идиопатической CD4+лимфоцитопенией – криптококкоз, обычно протекающий с поражением центральной нервной системы. Мы приводим два случая изолированного легочного криптококкоза у пациентов с идиопатической CD4+лимфоцитопенией, а также обзор литературы.

Ключевые слова: криптококкоз, легочный криптококкоз, идиопатическая, CD4+лимфоцитопения

CRYPTOCOCCOSIS OF THE LUNGS IN PATIENTS WITH IDIOPATHIC CD4+ LYMPHOCYTOPENIA (TWO CLINICAL CASES AND LITERATURE REVIEW)

Melekhina Y.E. (associate professor), Khostelidi S.N. (associate professor), Bubnova D.V. (student), Borzova Y.V. (head of the mycological clinic), Desyatnik E.A. (physician-mycologist), Bekhtereva I.A. (pathoanatomist), Frolova E.V. (head of the laboratory), Uchevatkina A.E. (senior scientific researcher), Filippova L.V. (senior scientific researcher, assistant of the department), Avdeenko Y.I. (senior scientific researcher), Bogomolova T.S. (head of the laboratory), Ignatieva S.M. (leading scientific researcher), Vasilyeva N.V. (director of the insti-

* Контактное лицо: Мелёхина Юлия Эммануиловна, e-mail: melekhina_y@mail.ru

tute, head of the department), Klimko N.N. (head of the department)

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia

Idiopathic CD4+ lymphocytopenia is a rare disease characterized by CD4 deficiency and opportunistic infections. The most common opportunistic infection in patients with idiopathic CD4+ lymphocytopenia is cryptococcosis, which usually occurs with central nervous system damage. We present two cases of isolated pulmonary cryptococcosis in patients with idiopathic CD4+lymphocytopenia, as well as a literature review.

Key words: cryptococcosis, pulmonary cryptococcosis, idiopathic CD4+lymphocytopenia

ВВЕДЕНИЕ

Криптококкоз – оппортунистический микоз, вызываемый *Cryptococcus* spp., возникает преимущественно у больных СПИДом и обычно проявляется в виде менингита. По экспертной оценке, в 2014 г. у больных СПИДом было 223 100 случаев криптококкового менингита, из которых 181 100 закончились летальным исходом, что составило 15% всех смертей, связанных со СПИД [1, 2]. Основными факторами риска являются СПИД, длительное применение глюкокортикостероидов и иммуносупрессоров, трансплантация органов и тканей, гемобластозы (острый лимфобластный лейкоз, лимфома, хронический лимфолейкоз), печеночная и почечная недостаточность, саркоидоз, коллагенозы. У 5-15% пациентов с криптококкозом указанные факторы риска не выявляют [3-8]. Количество больных криптококкозом без ВИЧ-инфекции существенно возросло за последние годы.

Идиопатическая CD4+лимфоцитопения (ИПЛ) – редкое заболевание, сопровождающееся дефицитом CD4+лимфоцитов при отсутствии инфекций, вызванных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) 1 и 2, лимфотропным Т-клеточным вирусом 1-го и 2-го типов (HTLV-I, HTLV-II), а также других очевидных причин (иммуносупрессивной терапии и пр.) [9]. Диагностируют ИПЛ при снижении абсолютного количества CD4+лимфоцитов < 300 клеток/мм³ или < 20% от общего количества Т-клеток не менее чем в двух исследованиях в течение 6 недель [10]. Обычно ИПЛ диагностируют у пациентов с оппортунистическими инфекциями, у которых тест на ВИЧ отрицательный.

Cryptococcus neoformans – наиболее распространенный возбудитель оппортунистических инфекций у лиц с ИПЛ, при этом криптококкоз обычно протекает с поражением центральной нервной системы (ЦНС) [9]. Мы приводим два случая изолированного легочного криптококкоза у пациентов с идиопатической CD4+лимфоцитопенией, а также обзор литературы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Представлены два клинических случая успешного лечения изолированного криптококкоза легких без поражения ЦНС у ВИЧ-негативных больных.

Для постановки диагноза криптококкоза лёгких использовали клинические и лабораторные критерии, предлагаемые EORTC/ MSGERC, 2020 [11]. Проанализировали данные научной литературы в базах PubMed и Wiley Interscience (на декабрь 2020 г.). Поиск информации осуществляли с помощью следующих ключевых слов: *cryptococcosis, pulmonary cryptococcosis, idiopathic CD4+lymphocytopenia*.

Описание клинического случая №1

Больной К., 40 лет, госпитализирован в микологическую клинику СЗГМУ им. Мечникова 25.03.14 г. с жалобами на кашель с мокротой, потливость, слабость.

Из анамнеза заболевания выяснено, что впервые с подобными симптомами обратился 29.10.13 г. в поликлинику по месту жительства. Тогда же, наряду с кашлем, отмечал повышение температуры тела до 37,3 °С, эпизоды кровохарканья. При обследовании на компьютерной томографии (КТ) органов грудной полости выявили участки уплотнения с зонами деструкции в обоих лёгких. Был заподозрен туберкулез легких, в связи с чем 30.10.13 г. пациент был госпитализирован в УКБ фтизиопульмонологии. В течение 3 месяцев получал противотуберкулёзную терапию (рифампицин, изониазид, пиперазинид, этамбутол) без положительной динамики. Больному была рекомендована консультация хирурга. При повторной КТ органов грудной полости отмечали отрицательную динамику в виде увеличения размеров очагов, лимфангита, сужения дренажных бронхов с перибронхиальной инфильтрацией.

29.01.14 г. выполнена расширенная нижняя лобэктомия слева. При гистологическом исследовании послеоперационного материала в ткани лёгкого обнаружен узел анапластического рака гигантоклеточного типа. Диагностирован периферический рак нижней доли левого лёгкого.

При контрольной КТ органов грудной полости (февраль 2014 г.) наблюдали отрицательную динамику: гидроторакс, образование в S6 правого лёгкого, увеличение размеров очагов и появление новых очагов в S4 и S5 (Рис. 1).



Рис.1. Пациент К., 40 лет, КТ органов грудной клетки.

При пересмотре гистологических препаратов в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. акад. Н.Н. Блохина» онкопатологию исключили. Был заподозрен микоз лёгких, в связи с чем пациент был направлен на консультацию в микологическую клинику СЗГМУ им. И.И. Мечникова.

Из анамнеза жизни выяснено, что из перенесенных ранее заболеваний больной отмечал редкие респираторные инфекции. Работает начальником технического отдела. Вредные привычки: курение в течение 20 лет, одна пачка сигарет в день. Жилищно-бытовые условия удовлетворительные. Домашних животных нет. Наследственность не отягощена. Аллергологический анамнез без особенностей. Инфекционный гепатит, венерические заболевания, тифы, малярию и туберкулез отрицает. За последние 6 месяцев за пределы Российской Федерации не выезжал, контакта с инфекционными больными не было.

При объективном осмотре общее состояние удовлетворительное. Конституция нормостеническая, рост – 182 см, вес – 86 кг. Сознание ясное. Кожные покровы и видимые слизистые оболочки чистые, розовые. Периферические лимфатические узлы не увеличены. Температура тела – 36,8 °С. Над лёгочными полями дыхание везикулярное, хрипов нет. Частота дыхательных движений – 18 в минуту. Тоны сердца приглушены, ритмичные, соотношение сохранено, шумов нет. Пульс ритмичный, симметричный, 66 ударов в минуту. Артериальное давление – 140 и 80 мм рт. ст. Частота сердечных сокращений – 66 ударов в минуту. Язык чистый, влажный. Живот при пальпации мягкий, безболезненный. Печень и селезенка не увеличены. Симптом поколачивания по поясничной области – отрицательный с обеих сторон. Отеков нижних конечностей нет. Дизурических явлений и нарушений стула нет. Менингеальные симптомы – отрицательные.

При поступлении в клиническом анализе крови выявили: гемоглобин – 152 г/л, эритроциты – $5,16 \times 10^9$ /л, лейкоциты – $5,4 \times 10^9$ /л, нейтрофилы – $3,9 \times 10^9$ /л, эозинофилы – 0×10^9 /л, моноциты – $0,3 \times 10^9$ /л, базофилы – 0×10^9 /л, лимфоциты – $1,2 \times 10^9$ /л. Биохимический анализ крови, клиниче-

ский анализ мочи – без патологии.

Проведено обследование, при котором выявлен положительный тест «*Crypto Plus*» в сыворотке крови и бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ). Показатели исследования СМЖ (микроскопия, посев, тест «*Crypto Plus*») были отрицательными, что позволило исключить криптококковый менингит. Результаты анализов на ВИЧ-инфекцию – отрицательные. При иммунологическом исследовании установлено снижение абсолютного числа CD4+ Т-хелперов до $0,218 \times 10^9/\text{л}$, а также снижение числа естественных киллеров, усиление дифференцировки Т-лимфоцитов в цитотоксическую субпопуляцию, снижение продукции интерферона- γ , повышение метаболической активности нейтрофилов, но снижение киллерной функции, эозинофилия и снижение уровня IgA (табл. 1).

Таблица 1

Пациент К. Иммунологическое исследование от 27.03.2014 г.

формула крови	(%)	абс. ($\times 10^9/\text{л}$)	норма%	норма абс. ($\times 10^9/\text{л}$)
лейкоциты		5,8		4-9
лимфоциты	25	1,45	20-39	1,27-3,26
моноциты	6		3-11	
базофилы	3		0-1	
эозинофилы	11↑		0-5	
нейтрофилы	55		47-72	
субпопуляционный состав лимфоцитов		абс. ($\times 10^9/\text{л}$)	норма (%)	норма абс. ($\times 10^9/\text{л}$)
Т-лимфоциты (CD3+CD19-)	75	1,088	60-80	0,900-2,100
Т-хелперы (CD3+CD4+)	15↓	0,218↓	35-50	0,580-1,300
Т-цитотоксические (CD3+CD8+)	64↑	0,928	19-35	0,370-1,000
В-лимфоциты (CD19+CD3-)	14	0,203	6-18	0,110-0,400
Т-актив. (CD3+CD25+)	6	0,087	1,8-6,5	0,030-0,130
Естеств. киллеры (CD3-CD56+)	7↓	0,102↓	8-17	0,120-0,370
ИРИ		0,2↓		1,5-2,6
функциональная активность нейтрофилов			%	норма (%)
НСТ спонтанный			25↑	11-18
НСТ активированный			76↑	40 - 60
фагоцитарный индекс			74	66 - 74
коэффициент киллинга			18↓	25-45
иммуноглобулины				норма (г/л)
Ig A			0,59↓	0,7-4,0
Ig M			0,62	0,4-2,6
Ig G			7,70	7,0-15,0
интерфероновый статус				норма (пг/мл)
ИФН- α спонтанный			19	0-30
ИФН- α индуцированный			145	100-500
ИФН- γ спонтанный			34	0-20
ИФН- γ индуцированный			328↓	1000-5000

При пересмотре гистологических препаратов послеоперационного материала (полученного 29.01.14 г.) обнаружили наличие клеток криптококка с умеренно развитой полисахаридной светлой капсулой (Рис. 2, 3).

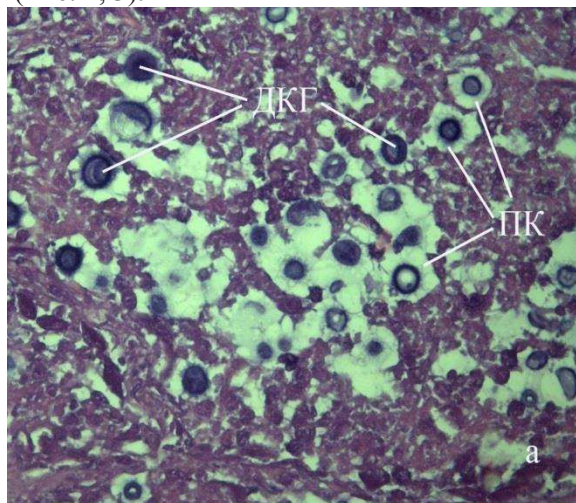


Рис. 2. Гистологический препарат ткани легкого (апрель 2014 г.). Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x 400. Скопление клеток криптококка в ткани лёгкого. Клетки *S. neoformans* одиночные, округлой формы, с умеренно развитой полисахаридной светлой капсулой. ДКГ – дрожжевая клетка гриба, ПК – полисахаридная капсула.

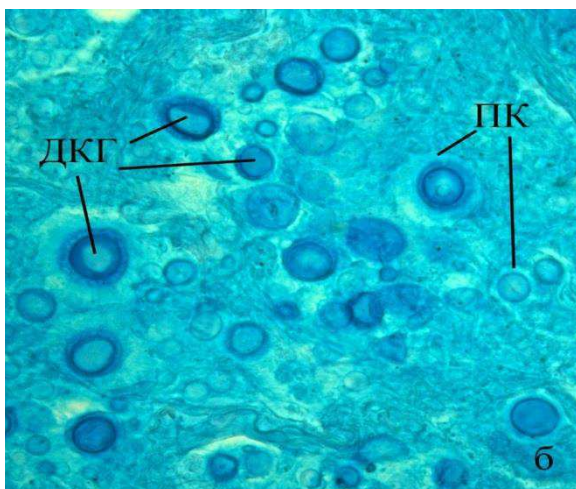


Рис. 3. Гистологический препарат ткани легкого от апреля 2014 г. Окраска альциановым синим, увеличение x 400. Скопление клеток криптококка в ткани лёгкого. Клетки *S. neoformans* с умеренно развитой полисахаридной капсулой. ДКГ – дрожжевая клетка гриба, ПК – полисахаридная капсула.

На основании гистологического заключения, выявления криптококкового антигена в сыворотке крови и промывной жидкости был установлен диагноз: криптококкоз лёгких, идиопатическая CD4+ лимфоцитопения. Назначена антифунгальная терапия – флуконазол 600 мг в сутки внутрь.

На фоне проводимого лечения отмечали улучшение самочувствия, уменьшение кашля. При повторном иммунологическом обследовании подтвердили выраженный дефицит CD4+Т-клеток ($0,043 \times 10^9/\text{л}$). Учитывая риск рецидива микотической инфекции и риск пневмоцистной пневмонии,

терапия флуконазолом была продолжена, дополнительно начата профилактика пневмоцистоза (ко-тримоксазола 960 мг 3 раза в неделю).

На КТ органов грудной полости в мае 2014 г. наблюдали положительную динамику: уменьшение количества жидкости в левой плевральной полости, уменьшение размеров очагов, отсутствие полости распада и парамедиастинальных очагов в проекции S6 правого легкого (Рис. 4).

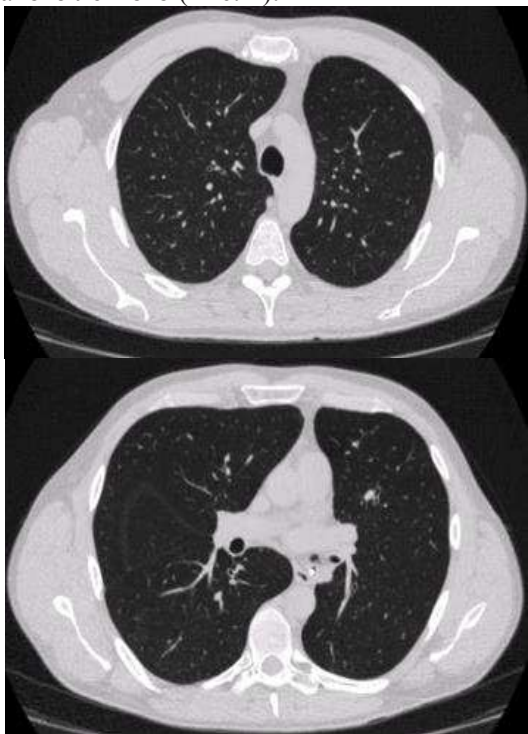


Рис. 4. Пациент К., 40 лет, КТ органов грудной клетки, май 2014 г.

В июле 2014 г. пациент самостоятельно отменил назначенное лечение. В сентябре, по рекомендации пульмонолога по месту жительства, выполнена контрольная КТ легких, на которой отмечено появление множественных очагов от 4 до 6 мм в обоих легких.

В декабре 2015 г. больной повторно госпитализирован в микологическую клинику. При обследовании в сыворотке крови и БАЛ антиген к грибам рода *Cryptococcus* – положительный. При иммунологическом исследовании выявлена более значимая CD4⁺ лимфоцитопения ($0,046 \times 10^9/\text{л}$) (табл. 2).

Таблица 2

Пациент К. Иммунологическое исследование от 20.12.2016 г.

формула крови	(%)	абс. ($\times 10^9/\text{л}$)	норма %	норма абс. ($\times 10^9/\text{л}$)
лейкоциты		4,3		4-9
лимфоциты	18	0,77↓	20-39	1,27-3,26
моноциты	9		3-11	
базофилы	0		0-1	
эозинофилы	3		0-5	
нейтрофилы	70		47-72	
субпопуляционный состав лимфоцитов			норма (%)	норма абс. ($\times 10^9/\text{л}$)
Т-лимфоциты (CD3+CD19-)	66	0,511↓	60-80	0,900-2,100

Т-хелперы (CD3+CD4+)	6↓	0,046↓	35-50	0,580-1,300
Т-цитотоксические (CD3+CD8+)	57↑	0,441	19-35	0,370-1,000
В-лимфоциты (CD19+CD3-)	11	0,085↓	6-18	0,110-0,400
Т-актив. (CD3+CD25+)	1,8	0,014↓	1,8-6,5	0,030-0,130
Естеств. киллеры (CD3-CD56+)	20↑	0,155	8-17	0,120-0,370
ИРИ		0,1↓		1,5-2,6

На основании результатов проведенного обследования диагностирован рецидив криптококкоза легких. Возобновлены антимикотическая терапия флуконазолом 600 мг/сут и профилактика пневмоцистной пневмонии.

На фоне проводимого лечения в январе 2017 г. на КТ легких свежих очаговых и инфильтративных изменений не обнаружено, в S2 справа – субплевральный обызвествлённый очаг 4 мм, в S6 в латеральных отделах – зона локального уплотнения в виде единичных мелких очагов сливного характера (Рис. 5). Тест «*Crypto-Plus*» в сыворотке крови и БАЛ – отрицательный, но сохранялся дефицит CD4⁺ Т-клеток (табл. 2).

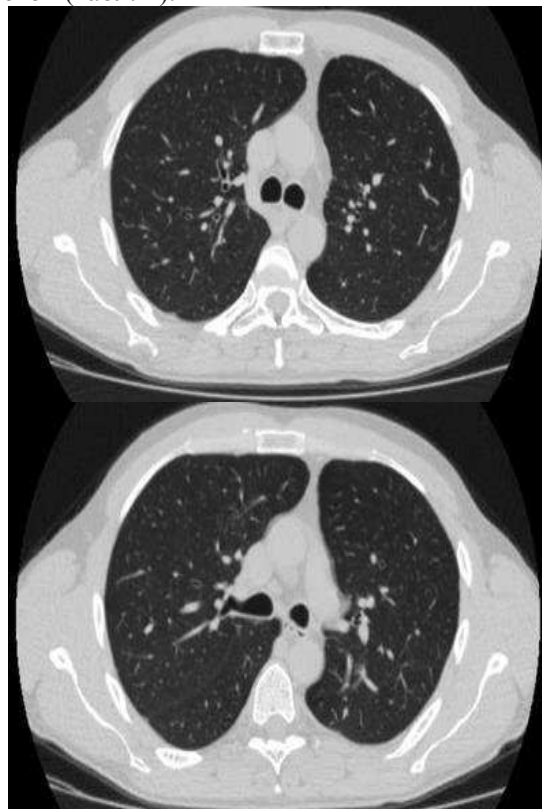


Рис. 5. Пациент К, 40 лет, КТ органов грудной клетки от 01.2017 г.

Диагностировали ремиссию криптококкоза легких, в связи с идиопатической CD4⁺ лимфоцитопенией рекомендовали противорецидивную профилактику флуконазолом 200 мг/сутки, наблюдение в микологической клинике. Ремиссия криптококкоза лёгких продолжается по настоящее время.

Клинический случай №2

Пациент В., 59 лет, 21.01.20 г. поступил в микологическую клинику СЗГМУ им. И.И. Мечникова с жалобами на сухой редкий кашель, общую слабость.

Из анамнеза заболевания выяснено, что в 2016 г. находился на лечении в Городской клинической онкологической больнице (ГКОБ) №1, г. Москвы по поводу аденокарциномы прямой кишки. Была выполнена резекция прямой кишки и проведено 8 курсов полиохиомиотерапии по схеме XELOX. В 2017 г. отмечали прогрессирование заболевания, метастазы в печени. Провели оперативное лечение – выполнена сегментэктомия С7 доли печени. При плановом обследовании в мае 2019 г. наблюдали изменения в правом лёгком. При КТ легких от 30.05.19 г. обнаружили группу мелких полостей с перифокальной инфильтрацией. Больной был направлен к фтизиатру, данных за туберкулез не получено. В августе 2019 г. в ГКОБ №1 выполнили резекцию верхней доли правого лёгкого. Гистологическое заключение послеоперационного материала: убедительных данных за наличие метастазов не обнаружено; микотическое криптококковое поражение? В связи с чем пациент направлен на консультацию в микологическую клинику СЗГМУ им. И.И. Мечникова.

Анамнез жизни: из перенесенных заболеваний отмечал детские инфекции (корь), хронический ринит, хронический бронхит вне обострения. В настоящее время не работает, инвалид II группы с 2016 года. Жилищно-бытовые условия, со слов больного, удовлетворительные, без признаков плесневого поражения. Домашних животных нет. Наследственность не отягощена. Аллергологический анамнез без особенностей. Инфекционный гепатит, венерические заболевания, тифы, малярию и туберкулез отрицает. За последние 6 месяцев за пределы Российской Федерации не выезжал, контакта с инфекционными больными не было.

При объективном осмотре общее состояние удовлетворительное. Конституция нормостеническая, рост – 192 см, вес – 80 кг. Сознание ясное. Кожные покровы и видимые слизистые оболочки чистые, розовые. Периферические лимфатические узлы не увеличены. Температура тела – 36,7 °С. Над лёгочными полями дыхание жёсткое, хрипов нет. Частота дыхательных движений – 17 в минуту. Тоны сердца приглушены, ритмичные, соотношение сохранено, шумов нет. Пульс ритмичный, симметричный, 67 ударов в минуту. Артериальное давление – 125 и 80 мм рт. ст. Частота сердечных сокращений – 67 ударов в минуту. Язык чистый, влажный. Живот при пальпации мягкий, безболезненный. Печень и селезенка не увеличены. Симптом поколачивания по поясничной области – отрицательный с обеих сторон. Отёков нижних конечностей нет. Дизурических явлений и нарушений стула нет. Менингеальные симптомы – отрицательные.

При обследовании в клиническом анализе крови при поступлении: гемоглобин – 161 г/л, эритроциты – $5,4 \times 10^9$ /л, лейкоциты – $4,12 \times 10^9$ /л, нейтрофилы – $1,94 \times 10^9$ /л, эозинофилы – $0,21 \times 10^9$ /л, моноциты – $0,58 \times 10^9$ /л, базофилы – $0,04 \times 10^9$ /л, лимфоциты – $1,36 \times 10^9$ /л.

На КТ органов грудной клетки от 23.01.20 г. в верхних отделах наблюдали уплотнение лёгочной ткани с металлическими клеммами в структуре, с тяжами и деформацией окружающей лёгочной ткани, вероятно, постоперационного генеза. Сохранился субплеврально расположенный очаг в S8 правого лёгкого до 6 мм, очаг в S10 до 5 мм; уплотнение плевры до 5 мм в S1-2 слева по задней поверхности, субплеврально расположенный участок уплотнения с видимым просветом бронха в S6 (9x13 мм), субплевральный очаг в S4 до 3 мм, очаг в S10 до 6 мм; в нижних отделах обоих лёгких обнаружены единичные центрилобулярно расположенные участки повышенной воздушности; бронхо-сосудистый рисунок диффузно умеренно усилен; плевроапикальные наслоения, плевроперикардальные и плевродиафрагмальные сращения с двух сторон (Рис. 6).



Рис. 6. Больной В., 59 лет, КТ легких от 23.01.20 г.

При выполнении фибробронхоскопии выявили двусторонний диффузный катаральный эндобронхит I ст. Получили положительный результат теста «Crypto Plus» в БАЛ и отрицательный – теста на криптококковый антиген в сыворотке крови. Показатели исследования СМЖ (микроскопия, посев, тест «Crypto Plus») были отрицательными, что позволило исключить криптококковый менингит. Результаты анализов на ВИЧ-инфекцию – отрицательные.

При пересмотре гистологических препаратов послеоперационного материала (от августа 2019 г.) в СЗГМУ им. И.И. Мечникова обнаружены: хроническое продуктивное воспаление, многочисленные гигантские клетки типа клеток Лангханса; многочисленные округлые и овальные формы клеток *C. neoformans*, часть клеток гриба имели вид полумесяца или «вдавленного резинового мяча»; часть клеток – с выраженными дегенеративными изменениями (декапсулированные формы) (Рис. 7).

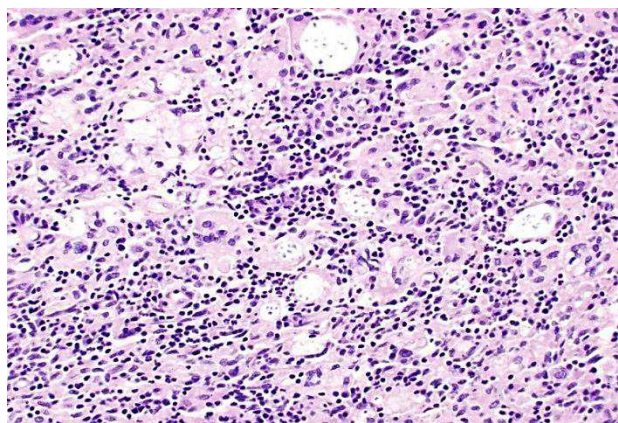


Рис. 7. Гистологический препарат ткани легкого от 08.2019 г. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x 400. Многочисленные округлые и овальные формы клеток *C. neoformans*.

При иммунологическом обследовании выявлено снижение абсолютного числа CD4⁺Т-клеток до 0,135×10⁹/л, усиление дифференцировки Т-лимфоцитов в цитотоксическую субпопуляцию, повышение числа естественных киллеров и НКТ-клеток, снижение продукции интерферона-γ, повышение метаболической активности нейтрофилов. (табл. 3).

Таблица 3

Пациент В. Иммунологическое исследование от 20.01.2020 г.

формула крови	(%)	абс. (×10 ⁹ /л)	норма, %	норма абс. (×10 ⁹ /л)
лейкоциты		3,5↓		4-9
лимфоциты	35	1,23↓	20-39	1,27-3,26
моноциты	9		3-11	
базофилы	0		0-1	
эозинофилы	5		0-5	
нейтрофилы	51		47-72	
субпопуляционный состав лимфоцитов			норма (%)	норма абс. (×10 ⁹ /л)
Т-лимфоциты (CD3+CD19-)	48↓	0,588↓	60-80	0,900-2,100
Т-хелперы (CD3+CD4+)	11↓	0,135↓	35-50	0,580-1,300
Т-цитотоксические (CD3+CD8+)	38↑	0,466	19-35	0,370-1,000
В-лимфоциты (CD19+CD3-)	16	0,196	6-18	0,110-0,400
Т-актив. (CD3+CD25+)	0,8↓	0,010↓	1,8-6,5	0,030-0,170
Естеств. киллеры (CD3-CD56+)	29↑	0,355↑	8-17	0,120-0,370
НКТ-клетки (CD3+CD56+)	9↑	0,110	0,5-6,0	0,007-0,165
ИРИ		0,3↓		1,5-2,6
функциональная активность нейтрофилов				норма (%)
НСТ спонтанный			34 ↑	11-18
НСТ активированный			63↑	40 - 60
иммуноглобулины				норма (г/л)
Ig A		1,59		0,7-4,0
Ig M		1,97		0,4-2,6

Ig G	12,34	7,0-15,0
интерфероновый статус		норма (пг/мл)
ИФН-α спонтанный	8	0-30
ИФН-α индуцированный	121	100-500
ИФН-γ спонтанный	3	0-20
ИФН-γ индуцированный	192↓	1000-5000

На основании проведенного обследования были диагностированы криптококкоз легких, идиопатическая CD4⁺лимфоцитопения. Сопутствующий диагноз: злокачественное новообразование прямой кишки (передняя резекция прямой кишки в 2016 г., 8 курсов полихимиотерапии по схеме XELOX) в стадии ремиссии. Сегментэктомию С7 доли печени (метастазы). Верхняя лобэктомия справа (2019 г.). Рекомендована антимикотическая терапия флуконазолом по 400 мг в сутки. В настоящее время сохраняется ремиссия криптококкоза легких.

ОБСУЖДЕНИЕ

Криптококкоз – тяжелая оппортунистическая инфекция, распространенность которой возрастает в последние десятилетия. Наиболее распространен криптококкоз у больных СПИДом. В настоящее время данное заболевание становится актуальным и у лиц без ВИЧ-инфекции, особенно у групп пациентов, имеющих факторы риска, связанные с применением иммуносупрессивных препаратов, после трансплантации органов и ТКСК, на фоне длительного применения глюкокортикоидов, на фоне онкогематологических заболеваний и других [4-8].

Вероятность развития криптококкоза зависит от степени выраженности иммунодефицита [12]. Отметим, что криптококки могут проникать в дыхательные пути, при этом у иммунокомпетентных пациентов за счет механизмов иммунного ответа происходит элиминация возбудителя, реже возможна бессимптомная колонизация [13-15].

Идиопатическая CD4⁺ лимфоцитопения – это гетерогенное состояние, клинические проявления которого варьируют от бессимптомных до опасных для жизни оппортунистических инфекций, подобных тем, которые обнаруживают у больных СПИДом. Идиопатическая CD4⁺ лимфоцитопения была признана болезнью в 1992 г. (к этому времени уже было зарегистрировано около ста случаев). Центры по контролю и профилактике заболеваний США (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) определили критерии как падение абсолютного числа CD4⁺ Т-лимфоцитов менее 300 клеток/мл или менее 20% от общего количества Т-лимфоцитов, в отсутствие ВИЧ-инфекции, наличия первичного иммунодефицита или проведения иммуносупрессивной терапии, связанной со сниженным числом CD4⁺Т-лимфоцитов [16].

Причины снижения числа CD4⁺ Т-лимфоцитов не до конца изучены. У пациентов с идиопатической CD4⁺лимфоцитопенией установлено уменьшение

числа наивных CD45RA⁺CD62L⁺CD4⁺ Т-клеток, что могло свидетельствовать о нарушении созревания предшественников эффекторных CD4⁺ Т-клеток. Другой возможной причиной этого заболевания могла быть ускоренная гибель CD4⁺Т-клеток вследствие активации процессов апоптоза. Ускоренный апоптоз CD4⁺ Т-клеток и повышение экспрессии маркеров активированных Т-клеток (CD25, CD69 и Fas/CD95) обнаружено у пациента с идиопатической CD4⁺лимфоцитопенией по сравнению с контрольными значениями. В других исследованиях у больных идиопатической CD4⁺лимфоцитопенией выявлено нарушение регуляции IL-7 созревания лимфоидных предшественников, снижение способности CD4⁺Т-клеток к хемотаксису за счет нарушения экспрессии CXCR4, недостаточная продукция TNF-α и IFN-γ и повышенный синтез IL-17. Кроме того, к развитию идиопатической CD4⁺лимфоцитопении могут предрасполагать мутации в генах *RAG1*, *UNC119*, *ITK*, *STK4* и *CD45* [17].

У пациента с идиопатической CD4⁺лимфоцитопенией и криптококковым менингитом Salit R.B. и соавт. обнаружили антитела против CD4⁺ Т-лимфоцитов в большей концентрации, чем в контрольной сыворотке [18].

Идиопатическая CD4⁺лимфоцитопения – редкое

заболевание, которое необходимо исключить при наличии у пациента необъяснимой оппортунистической инфекции и снижения числа CD4⁺ Т-клеток. В настоящее время основным методом терапии является лечение оппортунистических инфекций с использованием соответствующих противомикробных препаратов. Дальнейшие исследования иммунопатогенеза и понимание молекулярно-генетических причин этого гетерогенного состояния помогут найти новые возможности для лечения пациентов с идиопатической CD4⁺лимфоцитопенией.

Анализ оппортунистических инфекций у больных идиопатической CD4⁺лимфоцитопенией показал, что наиболее распространенными являются криптококкоз (26,6%), туберкулез (17,0%) и пневмоцистоз (7,7%) [10]. У большинства лиц с идиопатической CD4⁺лимфоцитопенией криптококкоз протекал с поражением ЦНС [10, 19, 20]. Кроме того, опубликованы сообщения о криптококковом поражении костей и кожи у таких пациентов [21, 22].

Изолированный криптококкоз легких у больных идиопатической CD4⁺лимфоцитопенией встречается редко. При анализе данных научной литературы в базах PubMed и Wiley Interscience мы обнаружили публикации о 5 таких пациентах (табл. 4).

Таблица 4

Криптококкоз легких у больных идиопатической лимфоцитопенией

Автор, год публикации	Пол	Возраст	Соп. заболевания	CD3+CD4+ (×10 ⁹ /л)	Диагностика криптококкоза	Лечение	Исход
Zaharatos G.J., et al, 2001 [24]	м	47	туберкулез	0,039	посев + аспиратов трахеи, БАЛ и плевральной жидкости	Флуконазол 8 недель	Жив
Ahn I.S., et al, 2005 [25]	м	73	телноклеточный рак	0,127	биопсия, гистология+	АмВ 15 дней 0,5 мг/кг/с, флуконазол 10 мес., затем профилактика рецидива	Жив
Yuanjie Z., et al, 2008 [26]	ж	41	нет данных	0,081-0,094	биопсия, гистология+, посев+ БАЛ, крипто АГ+ в сыворотке крови	Лобэктомия; АмВ 25 мг/сут плюс 5-флуцитозин 3 г/сут 12 недель, профилактика рецидива флуконазол 150 мг/с	Жива более 5 лет
Thornton C.S. et al, 2019 [27]	ж	56	СД 1 типа	0,286	биопсия, гистология+ криптоАГ+ в сыворотке крови	Флуконазол 400 мг/сут, затем позаконазол 300 мг/сут (12 мес.)	Жива

Примечательно, что схемы лечения в этих случаях были различными. Согласно рекомендациям Американского общества по инфекционным заболеваниям (IDSA), при криптококковой пневмонии или неменингеальном криптококкозе другой локализации препаратом выбора является флуконазол в дозе 6 мг/кг/сутки. Возможно применение итраконазола (200 мг/сутки) или вориконазола (200 мг/сутки), или позаконазола (400 мг/сутки) и амфотерицина В (1 мг/кг/сутки) при неэффективности или невозможности использования флуконазола. При сохраняющейся иммуносупрессии показана антифунгальная профилактика рецидива [28].

Наряду с антимикотической терапией при лечении криптококкоза легких применяют хирургические методы – резекцию доли легкого, лобэктомию,

в зависимости от объема поражения [29-32]. Криптококкоз легких протекает более благоприятно, чем криптококкоз ЦНС. В то же время при несвоевременной диагностике и отсутствии адекватного лечения летальность при криптококкозе легких у пациентов с низкими показателями CD4⁺ Т-клеток может достигать 29% [33].

У описанных нами больных после хирургического лечения (лобэктомии) провели терапию флуконазолом в стандартных дозах с последующей антифунгальной профилактикой рецидива. Оба пациента в хорошем состоянии находятся под наблюдением в микологической клинике СЗГМУ им. И.И. Мечникова.

ВЫВОДЫ

1. У больных идиопатической CD4⁺ лимфоцитопенией возможно развитие криптококкоза лёгких без поражения ЦНС.
2. При выявлении криптококкоза необходимо исключить не только СПИД, но и идиопатическую CD4⁺ лимфоцитопению.

3. Для лечения криптококкоза лёгких у больных идиопатической CD4⁺ лимфоцитопенией показано применение флуконазола в стандартных дозах, хирургическое удаление очага поражения, а также антифунгальная профилактикой рецидива.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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: 873-81. doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30243-8
2. Pyrgos V., Seitz A.E., Steiner C.A., et al. Epidemiology of cryptococcal meningitis in the US:1997-2009. *PLoS One.* 2013; 8 (2): e56269. doi: 10.1371/journal.pone.0056269.
3. Nguyen M.H., Husain S., Clancy C.J., et al. Outcomes of central nervous system cryptococcosis vary with host immune function: results from a multi-center, prospective study. *J. Infect.* 2010; 61 (5): 419-26. doi.org/10.1016/j.jinf.2010.08.004
4. Wang R-Y, Chen Y-Q, Wu J-Q, et al. Cryptococcosis in patients with hematological diseases: a 14-year retrospective clinical analysis in a Chinese tertiary hospital. *BMC Infect. Dis.* 2017; 17: 463-471. doi: 10.1186/s12879-017-2561-z.
5. Li L., Liang Z., Zhou J., Shao C. Pulmonary cryptococcosis coexisting with adenocarcinoma: a case report and review of the literature. *J. Med. Case Rep.* 2018; 12: 327-332. doi: 10.1186/s13256-018-1853-2.
6. Chamilos G., Lionakis M.S., Kontoyiannis D.P. Call for action: invasive fungal infections associated with ibrutinib and other small molecule kinase inhibitors targeting immune signaling pathways. *Clin. Infect. Dis.* 2017. doi.org/10.1093/cid/cix687
7. George I.A., Spec A., Powderly W.G., Santos CAQ. Comparative epidemiology and outcomes of HIV, non-HIV non-transplant and organ transplant associated cryptococcosis: a population-based study. *Clin. Infect. Dis.* 2017. doi.org/10.1093/cid/cix867
8. Lin Y.Y., Shiau S., Fang C.T. Risk factors for invasive *Cryptococcus neoformans* diseases: a case-control study. *PLoS One.* 2015; 10 (3): e0119090. doi: 10.1371/journal.pone.0119090.
9. Yarmohammadi H., Cunningham-Rundles C. Idiopathic CD4 lymphocytopenia: pathogenesis, etiologies, clinical presentations and treatment strategies. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2017; 119 (4): 374-378. doi: 10.1016/j.anai.2017.07.021.
10. Ahmad D.S., Esmadi M., Steinmann W.C. Idiopathic CD4 lymphocytopenia: spectrum of opportunistic infections, malignancies, and autoimmune diseases. *Avicenna J. Med.* 2013; 3 (2): 37-47. doi: 10.4103/2231-0770.114121.
11. Donnelly J.P., Chen S.C., Kauffman C.A., et al. Revision and update of the consensus definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71 (6): 1367-1376. doi: 10.1093/cid/ciz1008.
12. Alvarez M., Casadevall A. Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. *Curr. Biol.* 2010; 7: 2161-2165. doi.org/10.1016/j.cub.2006.09.061
13. Lin T.Y., Yeh K.M., Lin J.C., et al. Cryptococcal disease in patients with or without human immunodeficiency virus: clinical presentation and monitoring of serum cryptococcal antigen titers. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2009; 42 (3): 220-6. PMID: 19812855
14. Hou X., et al. Pulmonary cryptococcosis characteristics in immunocompetent patients-A 20-year clinical retrospective analysis in China. *Mycoses.* 2019; 62: 937-944. doi.org/10.1111/myc.12966
15. Gibson J.F., Johnston S.A. Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* during cryptococcosis. *Fungal Genet Biol.* 2015; 78: 76-86. doi: 10.1016/j.fgb.2014.11.006
16. Ghosh K. Idiopathic CD4+ T lymphocytopenia: still a long way to understand the disease. *J. Postgrad. Med.* 2020; 66 (2): 65-66. doi: 10.4103/jpgm.JPGM_595_19
17. Saravanakumari Vijayakumar, Stalin Viswanathan, Rajeswari Aghoram. Idiopathic CD4 lymphocytopenia: Current Insights. *ImmunoTargets and Therapy.* 2020; 9: 79-93. doi: 10.2147/ITT.S214139.
18. Salit R.B., Hankey K.G., Yi R., et al. Detection of CD4(+) T-cell antibodies in a patient with idiopathic CD4 T lymphocytopenia and cryptococcal meningitis. *Br. J. Haematol.* 2007; 139: 133-137. doi:10.1111/j.1365-2141.2007.06781.x
19. Regent A., Autran B., Carcelain G., et al. Idiopathic CD4 lymphocytopenia: clinical and immunologic characteristics and follow-up of 40 patients. *Medicine (Baltimore).* 2014; 93 (2): 61-72. doi: 10.1097/MD.0000000000000017.
20. Shribman S., Noyce A., Gnanapavan S., et al. Cryptococcal meningitis in apparently immunocompetent patients: association with idiopathic CD4+ lymphopenia. *Pract. Neurol.* 2018; 18 (2): 166-169. doi: 10.1136/practneurol-2017-001800.

21. *Sharma D., Singh N., Kaushal S., Jain S.J.* Isolated cutaneous cryptococcosis in clinically unsuspected idiopathic CD4 lymphocytopenia. *Cytol.* 2014; 31 (4): 230-2. doi: 10.4103/0970-9371.151143.
22. *Meesing A., Jittjareon A., Pornpetchpracha A., et al.* Disseminated cryptococcosis in an HIV-seronegative pregnant woman with transient T-lymphocytopenia: a case report and review of the literature. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health.* 2014; 45 (3): 647-53. PMID: 24974649
23. *McNulty A., Kaldor J.M., McDonald A.M., et al.* Acquired immunodeficiency without evidence of HIV infection: national retrospective survey. *BMJ.* 1994; 308 (6932): 825-826. doi: 10.1136/bmj.308.6932.825.
24. *Zaharatos G.J., Behr M.A., Libman M.D.* Profound T-lymphocytopenia and cryptococemia in a human immunodeficiency virus-seronegative patient with disseminated tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.* 2001; 33 (11): E125-E128. doi: 10.1086/324086.
25. *Ahn I.S., Kim H.G., Ryu J.S., et al.* A case of pulmonary cryptococcosis with non-small cell lung cancer in idiopathic CD4+ T-lymphocytopenia. *Yonsei Med. J.* 2005; 46 (1): 173-176. doi: 10.3349/ymj.2005.46.1.173.
26. *Yuanjie Z., Julin G., Fubing C., Jianghan C.* Recurrent pulmonary cryptococcosis in a patient with idiopathic CD4 lymphocytopenia. *Med. Mycol.* 2008; 46 (7): 729-734. doi: 10.1080/13693780802256083.
27. *Thornton C.S., Larios O., Grossman J., et al.* Pulmonary *Cryptococcus* infections as a manifestation of idiopathic CD4 lymphocytopenia: case report and literature review. *BMC Infect. Dis.* 2019; 19 (1): 862. doi: 10.1186/s12879-019-4453-x.
28. *Perfect J.R., Dismukes W.E., Dromer F., et al.* Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of America. *Clin. Infect. Dis.* 2018; 50 (3): 291-322. doi: 10.1086/649858
29. *Hou X., et al.* Pulmonary cryptococcosis characteristics in immunocompetent patients-A 20-year clinical retrospective analysis in China. *Mycoses.* 2019; 62: 937-944.
30. *Yamamoto T., Matsuzaki K., Katayama K., et al.* Primary pulmonary cryptococcosis mimicking lung metastases of bladder cancer: a case report. *Hinyokika Kyo.* 2020; 66 (11): 393-395. doi: 10.14989/ActaUrolJap_66_11_393.
31. *Ni L.F., Wang H., Li H., et al.* Clinical analysis of pulmonary cryptococcosis in non-human immunodeficiency virus infection patients. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2018; 50 (5): 855-860. PMID: 30337748
32. *Feng Ye, Jia-xing Xie, Qing-si Zeng, et al.* Retrospective analysis of 76 immunocompetent patients with primary pulmonary cryptococcosis. *Lung.* 2012; 190: 339-346. doi.org/10.1007/s00408-011-9362-8
33. *He Q., Ding Y., Zhou W., et al.* Clinical features of pulmonary cryptococcosis among patients with different levels of peripheral blood CD4(+) T lymphocyte counts. *BMC Infect. Dis.* 2017; 17 (1): 768. doi: 10.1186/s12879-017-2865-z.

Поступила в редакцию журнала 30.12.2020

Рецензент: А.В. Соболев

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГЛЮКОЗАМИНИЛМУРАМИЛДИПЕПТИДА В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ИНФИЛЬТРАТИВНО-НАГНОИТЕЛЬНОЙ ТРИХОФИТИИ ВОЛОСИСТОЙ ЧАСТИ ГОЛОВЫ

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

Башкирский Государственный медицинский университет (кафедра дерматовенерологии с курсами дерматовенерологии и косметологии ИДПО), Уфа, Россия

Проведено сравнительное исследование моно- и комбинированной терапии инфильтративно-нагноительной трихофитии волосистой части головы с оценкой изменений показателей иммунного статуса.

Ключевые слова: трихофития, нагноительная форма, гризеофульвин, ликопад

EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF GLUCOSAMINYLMURAMYLDIPEPTIDE USING IN IN THE COMPLEX TREATMENT OF INFILTRATIVE-SUPPURATIVE TRICHOPHYTOSIS OF THE SCALP

Khismatullina Z.R. (head of the department), Alkhash Subhi M.S. (postgraduate student), Mustafina G.R. (associate professor)

Bashkir State Medical University (department of dermatovenerology with courses of dermatovenerology and cosmetology IDPO), Ufa, Russia

A comparative study of mono- and combination therapy of infiltrative suppurative trichophytosis of the scalp with an assessment of changes in the immune status indicators was conducted.

Key words: trichophytosis, suppurative trichophytosis, griseofulvin, lycopid

Зооантропонозная трихофития на территории Республики Башкортостан (РБ) является наиболее часто встречающимся заболеванием. В общем числе больных трихофитией доля выявления инфильтративно-нагноительной трихофитии волосистой части

головы за 2014-2019 гг. в РБ составляет в среднем 5,7 на 100 тыс. населения. В лечении основным антимикотическим препаратом остается гризеофульвин. По данным научной литературы, а также результатам собственных исследований, в процессе терапии встречаются резистентные к данному препарату формы инфильтративно-нагноительной трихофитии волосистой части головы, при этом увеличение длительности его приема (как и курсовых доз) не приводит к элиминации возбудителя в очагах поражения [1].

При данном заболевании возбудители, проникая в кожу, вызывают выраженное воспаление, носящее деструктивный характер. Как результат воспалительного процесса в очаге происходит запуск синтеза цитокинов, которые активизируют функцию всех иммунных клеток, что ведет к изменениям как в клеточном, так и гуморальном иммунитете [2].

Изложенное выше свидетельствует об актуальности оптимизации метода лечения инфильтративно-нагноительных форм трихофитии с использованием иммуномодулирующих средств в комплексной терапии. Одним из таких препаратов является глюкозаминилмурамилдипептид (ГМДП). Согласно данным литературы, при оценке клинико-иммунологической эффективности комплексной терапии с применением ГМДП наблюдали положительную динамику в лечении больных с кожной патологией [3].

Глюкозаминилмурамилдипептид в организме главным образом активирует макрофагально-фагоцититарное звено, стимулирует продукцию провоспалительных цитокинов и др. [4].

В этой связи анализ эффективности использования глюкозаминилмурамилдипептида в комплексной терапии инфильтративно-нагноительной трихофитии волосистой части головы представляет определенный интерес.

Цель исследования – изучение показателей врожденного иммунитета в ходе комплексного лечения инфильтративно-нагноительной трихофитии волосистой части головы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Под наблюдением находился 61 пациент в возрасте от 5 до 18 лет. Всем больным было проведено комплексное иммунологическое обследование. Контрольную группу составили 28 человек, опытную – 33. У всех пациентов констатирована инфильтративно-нагноительная трихофития волосистой части головы (ИНТВГ).

Исследование общего анализа крови осуществляли на автоматическом гематологическом анализаторе «Sysmex KX – 21» (Япония) с помощью коммерческого набора реактивов фирмы «Roch-Diagnostics» (Япония). НСТ-тест в планшетах выполняли по методу Rook J.A.W. et al. (1985). Фагоцитоз нейтрофилов

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

оценивали с использованием опсонизированных дрожжей в качестве объекта фагоцитоза (Root R.K. et al., 1975) с модификациями. Результаты реакции учитывали под микроскопом с применением масляной иммерсии. Подсчитывали фагоцитарный индекс (процент нейтрофилов, вступивших в фагоцитоз) и фагоцитарное число (среднее количество дрожжевых клеток, поглощенное одним нейтрофилом, которое выражали в условных единицах). Исследованные показатели больных ИНТВГ (лейкоциты, нейтрофилы, в том числе фагоцитарный индекс, фагоцитарный показатель, НСТ) были подвергнуты двухфакторному и однофакторному дисперсионному анализу. В качестве контролируемых факторов выступали «этапы наблюдения» и «способ лечения». Первый фактор отражал изменения показателей пациентов в процессе болезни, ее терапии и в отдаленный период: до начала лечения, на 10-й день от его начала, при выписке, а также через месяц и полгода после завершения терапии. Под способом лечения подразумевалась принадлежность больного к группе с применением гризеофульвина (контрольная группа – 28 чел.) и гризеофульвина в сочетании с ГМДП (основная группа – 33 чел.).

Статистическую обработку результатов исследования проводили в программе STATISTIKA 6, используя двухфакторный и однофакторный дисперсионный анализ, а также путем вычисления средней арифметической (M) и средней ошибки средней (m). При оценке достоверности различий сравниваемых данных за уровень значимости принимали $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В процессе изучения отмечали последовательные изменения некоторых показателей врожденного иммунитета. Так, двухфакторный дисперсионный анализ показал, что число лейкоцитов в обоих группах в основном зависит от «этапов наблюдения», т.е. самого факта заболевания, его лечения и отдаленных последствий терапии – $\eta^2=64\%$, $F=68$, $p < < 0,0001$. Зависимость изменения уровня лейкоцитов от «способа лечения» оказалась статистически значимой, хотя и несколько слабее ($\eta^2=15\%$, $F=14,8$, $p < 0,0002$), влияние фактора лечения было средней силы в соответствии с оценочной шкалой. Корреляционная взаимосвязь между методикой применяемой терапии и изменениями уровня лейкоцитов крови в динамике – средняя ($r^* = 0,59$). Последнее означает, что при некоторой близости численности лейкоцитов на определенных этапах наблюдения в обеих группах имело место существенное межгрупповое различие. Несмотря на то, что динамика числа лейкоцитов по периодам мониторинга в обеих группах оказалась однонаправленной, в контрольной группе изменение показателя было более выраженным ($\eta^2=89\%$, $F=75$, $p < < 0,0001$), чем в основной группе ($\eta^2=56\%$, $F=18$, $p < < 0,0001$).

Как видно на рисунке 1, среднее число лейкоцитов в основной и контрольной группах до начала лечения значимо не различалось ($p > 0,52$). На 10 день терапии отмечали некоторое незначимое повышение показателя как в основной ($p > 0,07$), так и в контрольной группах ($p > 0,21$); межгрупповые различия также были статистически не значимыми ($p > 0,30$).

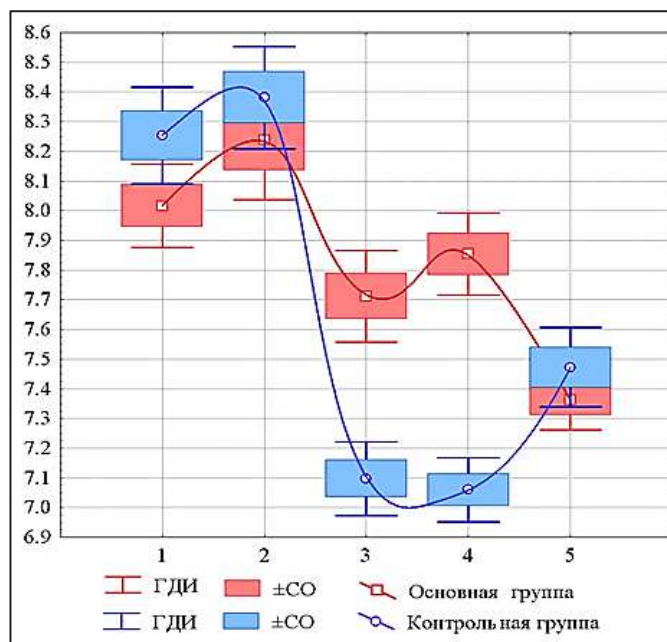


Рис.1. Динамика изменения лейкоцитов в крови больных ИНТВГ на различных этапах наблюдения.

По оси абсцисс – этапы наблюдения: 1 – до начала лечения, 2 – на 10-й день с начала лечения, 3 – при выписке, 4 – через 1 месяц после завершения лечения, 5 – через 3 месяца после выписки. По оси ординат – численность лейкоцитов ($10^9/л$). ГДИ и $\pm CO$ – границы доверительного интервала и стандартная ошибка среднего значения (m). Аппроксимация непрерывных изменений получена методом наименьших квадратов.

Далее наблюдали снижение числа лейкоцитов в обеих группах пациентов. К моменту выписки и через 1 месяц после выписки в основной группе произошло небольшое снижение уровня лейкоцитов ($7,71 \pm 0,45 \times 10^9/л$ и $7,85 \pm 0,41 \times 10^9/л$ соответственно) в отличие от контрольной группы, где снижение показателя было значимо ниже ($7,04 \pm 0,33 \times 10^9/л$ и $7,06 \pm 0,29 \times 10^9/л$ соответственно, $p < 0,05$). Отметим, что через 3 месяца после выписки из стационара средний уровень лейкоцитов в обеих группах стабилизировался и не имел значимых различий ($p > 0,19$) (Рис.2).

При исследовании последовательного изменения лимфоцитов не выявили статистически значимых межгрупповых различий. В ходе дисперсионного анализа установлено, что средний уровень лимфоцитов в обеих группах зависел в основном от фактора «этапы наблюдения» – $\eta^2=86\%$, $F=185$, $p < < 0,0001$. Влияние же «способов лечения» и сочетанного действия обоих факторов в данном случае оказалось ме-

нее незначимым ($p > 0,15$). Корреляционная взаимосвязь между методикой применяемой терапии и изменениями уровня лимфоцитов крови в динамике была средней ($r^* = 0,59$).

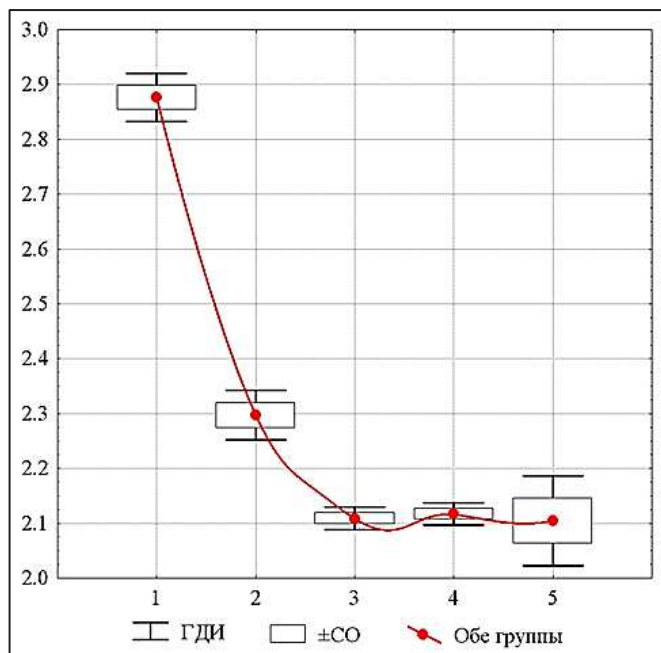


Рис. 2. Динамика лимфоцитов в крови больных ИНТВГ на различных этапах наблюдения.

По оси ординат – численность лимфоцитов ($10^9/\text{л}$). По оси абсцисс – этапы наблюдения: 1 – до начала лечения, 2 – на 10-й день с начала лечения, 3 – при выписке, 4 – через 1 месяц после завершения лечения, 5 – через 3 месяца после выписки. ГДИ и $\pm\text{CO}$ – границы доверительного интервала и стандартная ошибка среднего значения (m). Аппроксимация непрерывных изменений получена методом наименьших квадратов.

Схожесть последовательных динамических изменений лимфоцитов в группах наблюдения позволила рассматривать данные, полученные в обеих группах, как одну совокупность. Как видно на рисунке 2, с момента поступления до выписки пациентов средняя численность лимфоцитов при обоих способах лечения существенно и статистически значимо снижалась (до $2,10 \pm 0,08 \times 10^9/\text{л}$), удерживалась на том же самом уровне в течение 3-х месяцев после выписки из стационара ($p > 0,80$). Однако через 3 месяца после выписки межиндивидуальная вариабельность среднего числа лимфоцитов возрастала четырехкратно при отсутствии значимой разницы между группами ($p > 0,34$). Причиной этого, скорее всего, было усиление неоднородности по числу лимфоцитов внутри каждой группы.

Анализ динамики среднего уровня нейтрофилов в группах сравнения (Рис. 3) показал, что она во многом была аналогичной изменению уровня лейкоцитов крови, рассмотренному нами выше (Рис. 1).

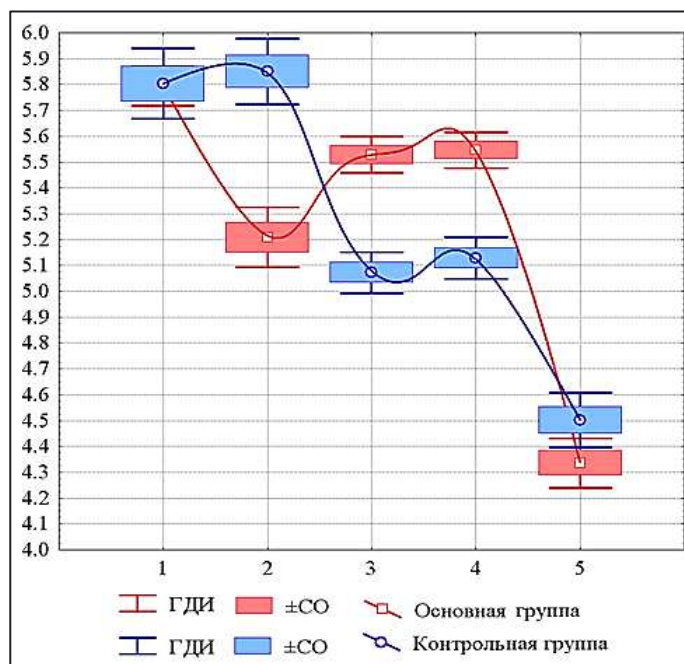


Рис. 3. Изменения средней численности нейтрофилов в крови больных ИНТВГ на различных этапах наблюдения.

По оси ординат – численность нейтрофилов ($10^9/\text{л}$). По оси абсцисс – этапы наблюдения: 1 – до начала лечения, 2 – на 10-й день с начала лечения, 3 – при выписке, 4 – через 1 месяц после завершения лечения, 5 – через 3 месяца после выписки. ГДИ и $\pm\text{CO}$ – границы доверительного интервала и стандартная ошибка среднего значения (m). Аппроксимация непрерывных изменений получена методом наименьших квадратов.

Так, численность нейтрофилов в обеих группах менялась разнонаправленно и была тесно связана с «этапами наблюдения» ($p < < 0,0001$). В каждой группе зависимость числа нейтрофилов от данного фактора была достаточно высокой и равноценной ($p < < 0,0001$). До начала лечения среднее число нейтрофилов в обеих группах фактически совпадало: $5,80 \pm 0,36 \times 10^9/\text{л}$ – в контрольной и $5,79 \pm 0,23 \times 10^9/\text{л}$ – в основной.

Однако на следующих трех этапах наблюдения выявлены статистически значимые межгрупповые различия среднего уровня показателя. Так, на 10-й день от начала лечения в контрольной группе средняя численность нейтрофилов практически не изменилась ($p > 0,57$), а в основной – значимо снизилась до $5,21 \pm 0,34 \times 10^9/\text{л}$. К концу терапии в стационаре и через месяц в основной группе средний уровень численности нейтрофилов значимо возрос до $5,52 \pm 0,28 \times 10^9/\text{л}$ и $5,55 \pm 0,20 \times 10^9/\text{л}$ соответственно. В контрольной группе в то же время имело место снижение средней численности нейтрофилов. Через 3 месяца после лечения выявленные различия нивелировались, и численность нейтрофилов в основной и контрольной группе уже практически совпала ($p < 0,02$).

Подчеркнем, что влияние метода терапии на уровень нейтрофилов оказалось средней силы ($\eta^2 = 19\%$, $F = 68$, $p < < 0,001$); взаимосвязь уровня

нейтрофилов и лечебного фактора – средняя ($r^* = 0,43$).

Совсем иную картину отмечали при рассмотрении динамики среднего значения фагоцитарного индекса (ФИ). Последовательные изменения характеризовались значительным повышением ФИ, что обусловило высокую степень зависимости от «этапов наблюдения» как в целом ($p < 0,0001$), так и в каждой группе по отдельности ($p < 0,0001$). Статистически значимым, хотя мало выраженным, оказалось влияние на уровень ФИ «способа лечения» ($p < 0,0001$) со слабой корреляцией ($r^* = 0,24$). Существенной была сила влияния сочетания изучаемых факторов на динамику ФИ ($p < 0,0001$).

Как показано на рисунке 4, до начала лечения средний уровень ФИ в основной и контрольной группах был достаточно одинаков ($p > 0,05$). В дальнейшем средний уровень ФИ в обеих группах резко возрос. Отметим, что в основной группе максимальное повышение ФИ наблюдали уже на 10-й день лечения. При этом в контрольной группе повышение ФИ зафиксировано только при выписке пациентов и сохранялось в течение месяца после их госпитализации ($p > 0,65$).

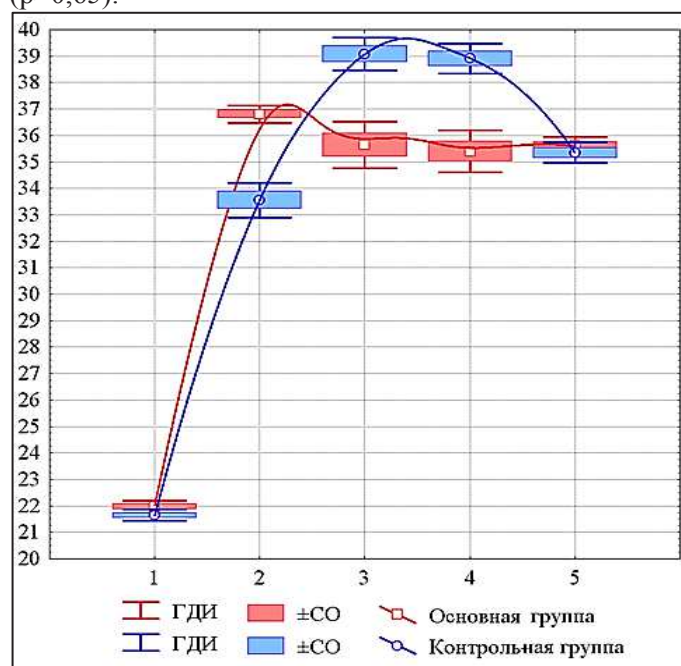


Рис. 4. Изменения среднего значения фагоцитарного индекса (ФИ) у больных ИНТВГ на различных этапах наблюдения. По оси ординат – ФИ в %. По оси абсцисс – этапы наблюдения: 1 – до начала лечения, 2 – на 10-й день с начала лечения, 3 – при выписке, 4 – через 1 месяц после завершения лечения, 5 – через 3 месяца после выписки. ГДИ и \pm СО – границы доверительного интервала и стандартная ошибка среднего значения (m). Аппроксимация непрерывных изменений получена методом наименьших квадратов.

При исследовании ФИ через 3 месяца после выписки больных из стационара не выявили значимых межгрупповых различий в контроле и в основной группе ($p > 0,33$). Причем в основной группе достиг-

нутый средний уровень ФИ практически оставался стабильно высоким и в наблюдаемый катамнестический период.

Несколько иная картина имела место в динамике фагоцитарного показателя (ФП). На протяжении всего периода стационарного лечения до выписки отмечали резкий подъем показателя ФП. Его величина также была жестко связана с фактором «этапы наблюдения» как в целом, так и в каждой группе по отдельности ($p < 0,0001$).

Зависимость от «способа лечения» и взаимодействия обоих факторов оказалась существенной ($p < 0,0001$); корреляционная взаимосвязь – средняя ($r^* = 0,49$ и $r^* = 0,44$ соответственно).

Начальные значения ФП в основной и контрольной группах фактически совпадали ($p > 0,82$). К моменту завершения лечения пациентов средний уровень ФП в обеих группах повысился до наивысших значений: $4,79 \pm 0,20$ у.е. – в основной и $4,2 \pm 0,21$ у.е. – в контрольной ($p < 0,04$). К моменту контрольного осмотра больных, проведенного через 3 месяца после завершения терапии, средние уровни ФП в обеих группах несколько снизились, при этом оставаясь выше первоначальных данных почти в 1,4 раза, и, как до начала лечения, фактически совпали ($p > 0,89$). Характеризуя в целом последовательные изменения фагоцитарного показателя, отметим, что интенсивность иммунологических процессов на фоне применения препарата ГМДП в основной группе была статистически значимо выше. Так, к моменту выписки из стационара ФП увеличился в основной группе в 1,7 раза, а в контрольной – в 1,5 раза.

Рассмотрим далее динамику изменений двух показателей бактерицидной активности нейтрофилов – «нитросиний тетразолий-спонтанный» (НСТ-сп) и «нитросиний тетразолий-индуцированный» (НСТ-инд).

В динамике НСТ-сп в обеих типологических группах картина изменений была практически идентичной, что нашло отражение в результатах дисперсионного анализа. Уровень НСТ-сп оказался в жесткой, практически функциональной зависимости от «этапов наблюдения» как в целом, так и в каждой группе по отдельности ($p < 0,0001$). Зависимость от способа лечения и сочетанного действия этих факторов была хотя и статистически значимой, но фактически несущественной ($p < 0,001$ и $p < 0,03$); корреляционная зависимость была слабой ($r^* = 0,24$ и $r^* = 0,22$ соответственно).

Это означает, что последовательные изменения уровня НСТ-сп очень существенны, но в каждой группе происходят однотипно. Начальные средние значения НСТ-сп практически совпадали ($11,49 \pm 0,38\%$ – в основной группе и $11,54 \pm 0,47\%$ – в контрольной) и значимо не различались ($p > 0,65$). На 10-й день лечения пациентов средний уровень НСТ-

сп в обеих группах значимо возрастал: до $12,69 \pm 1,07\%$ – в основной группе и $13,18 \pm 0,93\%$ – в контрольной ($p < 0,05$). К моменту выписки больных средний уровень НСТ-сп в обеих группах снижался практически в 1,6 раза по сравнению с исходными данными и оставался на этом уровне через месяц после завершения терапии. При этом на отрезке времени от 10-ти дней лечения до 1 месяца после его завершения средний уровень НСТ-сп в основной группе незначительно, но статистически значимо ($p < 0,05$) был ниже, чем в контрольной. Через 3 месяца средние уровни НСТ-сп в обеих группах становились еще ниже и опять начинали практически совпадать: $4,65 \pm 0,58\%$ – в основной группе и $4,68 \pm 0,63\%$ – в контрольной ($p > 0,82$).

Изменения НСТ-инд в высокой степени зависели от «этапов наблюдения» как в целом ($\eta^2=95\%$, $F=2092$, $p < < 0,0001$), так и в каждой группе по отдельности ($\eta^2=98\%$, $F=1563$, $p < < 0,0001$ – в основной и $\eta^2=97\%$, $F=1040$, $p < < 0,0001$ – в группе контроля). Зависимость от способа лечения и сочетанного действия изучаемых нами факторов оказалась средней, значимой ($\eta^2=17\%$, $F=321$, $p < < 0,0001$ и $\eta^2=15\%$, $F=69,4$, $p < < 0,0001$), как и корреляционная взаимосвязь ($r^*=0,41$ и $r^*=0,39$).

Средние уровни НСТ-инд, как и у других индикаторов клеточного иммунитета, практически совпадали и значимо не различались до начала лечения ($30,24 \pm 1,8\%$ – в основной группе и $29,6 \pm 1,28\%$ – в контрольной, $p > 0,15$) и через 3 месяца после его завершения ($35,27 \pm 4,3\%$ – в основной и $35,2 \pm 4,1\%$ – в контрольной, $p > 0,95$). Рост среднего уровня НСТ-инд в обеих группах фиксировали к 10-му дню после начала терапии пациентов, а максимально высокие значения имел к моменту его завершения ($75,4 \pm 2,3\%$ – в основной группе и $68,3 \pm 2,8\%$ – в контрольной). Через месяц после завершения лечения начиналось снижение уровня НСТ-инд. На всех этих трех этапах наблюдения уровень НСТ-инд в основной группе оказался выше, чем в контрольной.

ВЫВОД

В ходе исследования было установлено, что сочетание гризеофульвина с иммуномодулирующей терапией оказывало положительное влияние на показатели врожденного иммунитета.

В основной группе пациентов выявлены достоверно более высокие значения числа лейкоцитов, нейтрофилов, ФП и НСТ-инд на 10-е сутки от момента назначения терапии, по сравнению с больными, получавшими традиционное лечение.

ЛИТЕРАТУРА

1. Даниленко Р.У., Хисматуллина З.Р., Мухамадеева О.Р. Формы зооантропонозной трихофитии, резистентные к терапии гризеофульвином. Доктор. Ру. Аллергология Дерматология. 2015; 7 (108): 39-41. [Danilenko R.U., Hismatullina Z.R., Mukhamadeeva O.R. Forms of zoonthropous trichophytosis resistant to griseofulvin therapy. Doctor.ru. Allergology Dermatology. 2015; 7 (108): 39-41 (In Russ)].
2. Макарова В.И., Макаров А.И. Роль цитокинов в реализации воспалительной реакции. Экология человека. Фундаментальная медицина. 2008; 5: 31-35. [Makarova V.I., Makarov A.I. the Role of cytokines in the implementation of the inflammatory response. Human ecology. Fundamental medicine. 2008; 5: 31-35 (In Russ)].
3. Колесникова Н.В., Козлов И.Г., Гурьянова С.В. и др. Клинико-иммунологическая эффективность и перспективы использования мурамилдипептидов в лечении atopических заболеваний. Медицинская иммунология. 2016; 18 (1): 15-20. [Kolesnikova N.V., Kozlov I.G., Guryanova S.V., et al. Clinical and immunological efficacy and prospects for the use of muramyldipeptides in the treatment of atopic diseases. Medical immunology. 2016; 18 (1): 15-20 (In Russ)].
4. Буркин А.В., Свистушкин В.М., Никифорова Г.Н., Духанин А.С. Глюкозаминилмурамилдипептид в терапии инфекционных заболеваний респираторного тракта. Вестник оториноларингологии 2019; 84 (6): 118-131. [Burkin A.V., Svistushkin V.M., Nikiforova G.N., Dukhanin A.S. Glucosaminylmuramyldipeptide in the treatment of infectious diseases of the respiratory tract. Bulletin of otorhinolaryngology 2019; 84 (6): 118-131 (In Russ)].

Поступила в редакцию журнала 11.09.2020

Рецензент: Е.В. Фролова

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ОТБОРУ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАЗВИТИЕМ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ РУБЦОВ КОЖИ

^{1,2}Курганская И.Г. (преподаватель кафедры)*, ²Иванов А.М. (зав. кафедрой), ²Криворучко А.Б. (старший преподаватель кафедры)

¹Детский научно-клинический центр инфекционных болезней; ²Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

Предрасположенность к появлению патологических рубцов обусловлена множеством различных факторов. Актуален поиск возможных прогностических генетических полиморфизмов, ассоциированных с патофизиологическими механизмами формирования рубцов.

Цель исследования: анализ данных полногеномного поиска генетических маркеров, ассоциированных с патологическими рубцами кожи.

Методы: использован новый подход к дизайну формирования набора молекулярно-генетических маркеров, объединяющий традиционный поиск маркеров, априорно связанных с геном-кандидатом, и ассоциации с изучаемым признаком на основании результатов полногеномного ассоциативного анализа GWAS (Genome-Wide Association Study).

Результаты: по данным анализа ассоциации молекулярно-генетических маркеров с рубцами кожи сформирован перечень молекулярно-генетических маркеров формирования патологических рубцов, включающий 10 полиморфизмов генов с полногеномным уровнем значимости $p < 5 \cdot 10^{-8}$; включены гены, кодирующие регуляторные процессы дисплазии соединительной ткани.

Заключение: изучение генетической предрасположенности к патологическому рубцеванию кожи, а также молекулярно-генетических маркеров, предопределяющих формирование рубцовых деформаций, является перспективным направлением разработки новых патогенетически обусловленных эффективных методов их коррекции.

Ключевые слова: молекулярно-генетические маркеры, однонуклеотидный полиморфизм (SNP), полногеномный поиск ассоциаций, GWAS-анализ, патологические рубцы

NEW APPROACHES TO THE SELECTION OF GENETIC MARKERS ASSOCIATED WITH THE DEVELOPMENT OF PATHOLOGICAL SKIN

* Контактное лицо: Курганская Инга Геннадьевна, e-mail: manga-85@mail.ru

SCARS

Kurganskaya I.G. (lecturer of the department)^{1,2}, Ivanov A.M. (head of the department)², Krivoruchko A.B. (senior lecturer of the department)²

¹Children's Research and Clinical Center for Infectious Diseases; ²Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, Russia

Predisposition to the appearance of pathological scars is due to many different factors. The search for possible prognostic genetic polymorphisms associated with pathophysiological mechanisms of scar formation is relevant.

The purpose of the study: analysis of data from genome-wide search for genetic markers associated with pathological skin scars.

Methods: a new approach to the design of the formation of a set of molecular genetic markers is used, which combining the traditional search for markers a priori associated with the candidate gene and associations with the studied trait based on the results of genome-Wide Association analysis GWAS (Genome-Wide Association Study).

Results: based on the analysis of the association of molecular genetic markers with skin scars, a list of molecular genetic markers for the formation of pathological scars was formed, including 14 gene polymorphisms with a genome-wide significance level $p < 5 \cdot 10^{-8}$. It included genes encoding regulatory processes of connective tissue dysplasia.

Conclusion: the study of genetic predisposition to pathological skin scarring, as well as molecular genetic markers that determine the formation of scar deformities is a promising direction for the development of new pathogenetically determined effective methods for their correction.

Key words: molecular genetic markers, single-nucleotide polymorphism (SNP), genome-wide association search, GWAS analysis, pathological scars.

ВВЕДЕНИЕ

В XXI веке стремительно развивается методология персонализированной медицины, которая основана на наукометрическом анализе многочисленных исследований факторов риска, генетической предрасположенности к патологическому рубцеванию. Их учет позволяет предотвратить появление патологических рубцов на ранних этапах регенерации и разработать новые успешные протоколы коррекции. Известно, что большинство патологических рубцов имеют многофакторную природу и развиваются как под влиянием факторов окружающей среды, так и при трансформации синтезируемых белков-регуляторов в патогенезе процесса рубцевания. Установлено, что наиболее частой причиной существования нескольких вариантов (аллелей) гена является однонуклеотидный полиморфизм – SNP (Single Nucleotide Polymorphism).

Известно, что наследственную предрасположенность к различным заболеваниям формирует множество ассоциаций генов-кандидатов («генных

сетей)), отвечающих за синтез различных элементов соединительной ткани – клеток, волокон и межклеточного вещества. В этом ряду особую роль играют гены, регулирующие синтез основного волокна соединительной ткани – коллагена, определяющего форму рубца, а также эластина, обуславливающего его упругие свойства.

Наследственную предрасположенность сегодня обсуждают, в том числе и для процессов синтеза волокон соединительной ткани, патология которого определяет дисплазию соединительной ткани и формирование патологических рубцов [1]. Однако до настоящего времени исчерпывающей ассоциации генов-кандидатов, определяющих развитие определенных видов патологических рубцов, равно как и вариантов полиморфизмов, способных точно обосновать их формирование, не представлено [2]. Данное положение подтверждает общее заключение генетиков об отсутствии в популяции пациентов генов (вариантов), объясняющих значительное количество фенотипических признаков [3].

Активно развивающиеся вследствие удешевления и упрощения проведения исследования ассоциативных «генов-кандидатов», однонуклеотидных полиморфизмов SNP по типу случай/контроль, позволили получить данные о полиморфных аллелях с разной степенью значимости их связи с патологическим признаком. Количество валидизированных однонуклеотидных полиморфизмов в текущей базе данных dbSNP достигло 690 тысяч и постоянно нарастает [4]. При формировании «банка» данных о полиморфных аллелях, вследствие взрывного роста ассоциативных исследований в первое десятилетие XX века в рамках масштабных международных проектов «Геном человека», «НарМар» и «1000 геномов», выявили различную степень корреляции точечного генотипирования SNP с фенотипами человека. В этих исследованиях был обнаружен феномен диссоциации отбора достоверных и информативных полиморфных локусов: включение в диагностическую «геномную панель» значительного числа SNP ведет к снижению специфичности отдельных полиморфизмов, тогда как их малое количество снижает их чувствительность и прогностически не значимо.

Установлено, что ремоделирование (деградацию или протеолиз) коллагеновых волокон осуществляют матриксные металлопротеиназы (MMP), а эластических – эластазы, среди которых имеются и некоторые металлопротеиназы. В геноме человека было обнаружено не менее 200 MMP подобных генов, включая собственно MMP (25 генов), мембранносвязанные MMP, ADAM протеиназы (дизинтегрин-металлопротеиназные домены), ADAMTS протеиназы (дизинтегрин-металлопротеиназные домены с тромбоспондиновым мотивом) и ряд других [5].

Следующим шагом в развитии представлений о

генетической предрасположенности к формированию различных патологических процессов стал поиск генов-кандидатов, регулирующих белки, участвующие в патогенезе дисплазии соединительной ткани. Выявили, что активность протеаз регулирует специфические ингибиторы тканевых металлопротеиназ (TIMP белки). Для каждой специфической металлопротеиназы был выделен специфический TIMP белок (например, для MMP1 ингибитор TIMP1 и т.д.). Популяционные геномные исследования сыграли ключевую роль в выяснении патогенеза патологических рубцов кожи, однако ни один причинный ген не обладал достаточным уровнем значимости следственной связи, что подтверждает вероятный менделевский полигенный паттерн наследования признаков патологического фиброза [6, 7]. В результате некоторые из генов-кандидатов были удалены вследствие низкой надежности определивших их популяционных исследований. Такой подход позволил выделить меньшее число полиморфных вариантов, вероятность ассоциации которых с формированием рубцов существенно снижена вследствие выраженности гетерогенности групп случай/контроль по негенетическим признакам (высокая частота ложноположительных ассоциаций из-за малых выборок групп, этнической неоднородности и некорректности клинических критериев формирования групп) [8]. В связи с этим значительное количество обнаруженных вариантов не имеют статистической значимости или демонстрируют слабую связь с заданным признаком. В результате некоторые из генов-кандидатов были удалены вследствие низкой надежности определивших их ассоциативных исследований.

Таким образом, несмотря на очевидную значимость «кандидатного подхода», полученные данные часто трудно поддаются интерпретации. В этих условиях механизмы реализации синтеза протеаз, регулирующих формирование волокон соединительной ткани и белок-кодирующих участков генома (экзонов), становятся весьма спекулятивны. Дискутабелен и удельный вес влияния конкретных протеаз в патогенезе формирования патологических рубцов кожи с учетом того, что в белок-кодирующих участках генома-экзонах локализовано минимальное количество полиморфных вариантов.

Альтернативой оценки однонуклеотидных полиморфизмов в последние годы стал полногеномный поиск ассоциаций – GWAS (Genome-Wide Association Study)-анализ. С помощью данного метода изучают частоту встречаемости SNP в репрезентативной выборке геномов нескольких миллионов человек с множеством полиморфных генетических маркеров. Такой вариант поиска позволил установить высокозначимые корреляционные связи конкретных вариантов генома с наличием заболевания, отвечаю-

щим за признак, и выявить встречающиеся чаще полиморфизмы в группе с исследуемым фенотипом с высоким уровнем значимости ($p < 5 \cdot 10^{-8}$ и ниже). Чем ниже данный уровень, тем выше достоверность ассоциации SNP с изучаемым признаком. Несмотря на продуктивность GWAS-анализа в оценках наследственной предрасположенности многих соматических заболеваний (ИБС, ГБ, ревматоидный артрит и др.), полногеномный поиск ассоциаций отдельных молекулярно-генетических маркеров патологических рубцов до настоящего времени не выполнен [3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На начальном этапе исследования осуществляли поиск в базе генов-кандидатов Huge Navigator с использованием интернет-платформы Phenopedia [9]. По ключевым словам «scarring», «cicatrix», «hypertrophic», «keloid» был сформирован список генов, которые были выделены как ассоциированные с признаком, а также определено количество оригинальных статей и мета-анализов, указывающих на достоверность их включения. В оригинальных публикациях исследований генов-кандидатов учитывали значимые корреляции с уровнем не ниже $p < 0,05$.

Полногеномный поиск ассоциаций выполнен с использованием агрегаторов данных, каталогизирующих и систематизирующих результаты большинства ассоциативных исследований. В гипотетический тест-набор включали маркеры с идентификационными номерами согласно dbSNP.

Применяли следующие критерии отбора генетических маркеров [10]:

- генетические маркеры с полногеномным уровнем значимости $p < 5 \cdot 10^{-8}$ и ниже, подтвержденном на независимой выборке;

- ассоциации, подтвержденные не менее чем в двух независимых GWAS-анализах или мета-анализах высокого уровня;

- маркеры, полученные в более поздних анализах ассоциаций или включавшие большее число участников;

- маркеры, полученные в репрезентативных выборках, позволявших обнаружить их ассоциации с определенными частотами встречаемости;

- маркеры, полученные в однородной выборке с четкими фенотипическими критериями патологических рубцов.

Для поиска генетических полиморфизмов с указанными геномными координатами и оценки уровня их достоверности (по p -значениям) в пределах полногеномного анализа GWAS-исследований использовали онлайн-агрегаторы GWAS [11, 12].

Для детализации информации об европейской популяции пациентов был проведен поиск среди выборки биобанка из Великобритании с применением двух платформ [13, 14], который не дал результатов,

так как данные этих баз содержат прямые наследуемые признаки заболеваний. Отрицательный результат, по-видимому, связан с невозможностью интерпретации процесса рубцевания как прямого наследуемого заболевания. По этой же причине, вероятно, не найдено результатов, удовлетворяющих критериям поиска вариантов с большим молекулярным эффектом, похожих на критичные патогенные мутации в онлайн-агрегаторах ClinVar и HGMD, содержащих данные о патогенности различных вариантов моногенных заболеваний [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В связи с тем, что большинство локусов, имеющих значимые ассоциации с различными видами рубцов, содержалось только в одном из проанализированных нами 75 исследований для устранения «случайных» ассоциаций, из 128 SNP были отобраны только полиморфизмы с высокой вероятностью ассоциации с развитием патологических рубцов, включенные в нескольких полногеномных исследований или содержащиеся в дополнительных мета-анализах высокого уровня. Это позволило сформировать список генов, вовлеченных в процесс формирования патологических рубцов.

После определения уникальных идентификационных номеров маркеров (rs в dbNSP) нами были получены следующие данные по уровню значимости их ассоциаций с патологическим рубцеванием и о силе их эффектов. Совокупность генетических полиморфизмов, по данным онлайн-агрегаторов полногеномных исследований, представлена в таблице.

Таблица

Полиморфизмы генов, ассоциированных с формированием патологических рубцов

SNP	Ген	P-значение	Аллели риска	Хромосома
rs747650, rs1060573	DDB2	$4,41 \cdot 10^{-9}$ $1,28 \cdot 10^{-8}$	G	11p11.2
rs7531806	SELL	$1,20 \cdot 10^{-8}$	A	1q24.2
rs8032158, rs 2271289	NEDD4	$5,96 \cdot 10^{-13}$ $1,02 \cdot 10^{-11}$	C	15q21.3-22.3
rs873549		$5,89 \cdot 10^{-23}$ $3,03 \cdot 10^{-33}$	C	1q41
rs1511412, rs940187	FOXL2	$2,31 \cdot 10^{-13}$ $1,80 \cdot 10^{-13}$	A	3q23
rs11136645	CSMD1	$8 \cdot 10^{-8}$	C	8:3640649
rs1442440		$9,85 \cdot 10^{-18}$	A/A	1q41

Доказано влияние генов *DDB2* и *SELL* на метаболизм андрогенов и их участие в воспалительных процессах при формировании рубцов после тяжелых акне. По данным энциклопедии элементов ДНК [16] установлено, что rs4237547 *DDB2* кодирует ДНК-связывающий белок, который является меньшей субъединицей гетеродимерного белкового комплекса и участвует в репарации нуклеотидов. *DDB2* имеет

решающее значение в процессах апоптоза или блокировки репликации клетки при повреждении ДНК и опосредует убиквитинирование гистонов H3 и H4 (из которых H4, как было показано, является основным компонентом в антимикробном действии человеческих себоцитов. *DDB2* – новый белок, взаимодействующий с андрогеновыми рецепторами. *SELL* (селектин L) – селектин молекул адгезии играет важную роль в регуляции гомеостаза и кожного воспаления и экспрессируется на поверхности большинства циркулирующих лейкоцитов, способствуя их миграции во вторичные лимфоидные органы и очаги воспаления. Анализ профилей экспрессии генов показал, что экспрессия мРНК *SELL* была повышена при поражении акне [17]. *NEDD4*- убиквитинлигаза E3, фермент высоко экспрессируемый кожей, регулирует большое количество мембранных белков, опосредует регуляцию компонентов сигнального пути эпидермального фактора роста (EGF) и рецепторов факторов роста фибробластов *FGFR1*.

Установлена ведущая роль *NEDD4 TV3* в активации NF- κ B и индуцированной им экспрессии IL-6 в клетках эпидермальных кератиноцитов. *NEDD4 TV3* может быть вовлечен в клеточную пролиферацию или дифференцировку через различные сигнальные пути, включая *PI3K*, *MAPK* или *TGF- β* , взаимодействует с RIP, адапторным белком, необходимым для передачи сигналов TNF- α . Таким образом, убиквитинлигазу 3 можно рассматривать как диагностический «маркер» и потенциальную терапевтическую «мишень» для коррекции келоидных рубцов кожи [18].

Для гена *FOXL2* была показана связь с келоидом в японской и в меньшей степени китайской популяциях, однако в европейских популяциях значимой ассоциации не выявлено [19].

Ген *CSMD1* посредством взаимодействия с компонентами системы комплемента влияет на опухолевую супрессию и, предположительно, связан со снижением риска развития тяжелых деформаций [20] у пациентов с послеожоговыми рубцами. Данная ассоциация должна быть подтверждена в ходе дальнейших полномасштабных исследований потенциальной роли *CSMD1* в заживлении ран.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные высокозначимые генетические ассоциации патологического рубцевания позволяют представить тонкие механизмы формирования патологических рубцов, а большинство обнаруженных вариантов статистически достоверную связь с заданным признаком.

Сравнительный анализ диагностического тест-набора генов, определяющих формирование патологических рубцов, показал отсутствие корреляции с некоторыми ранее выявленными исследователями

молекулярно-генетическими маркерами [21-23]. К последним относятся полиморфизмы генов *TIMP*, *TGF- β 3*, *TG F- β 1*, играющие ведущую роль в ремоделировании рубцовой ткани при замещении незрелых волокон коллагена типа III на зрелый коллаген типа I [24-27], РНК AC067945.2 и lncRNA8975-1 сверхэкспрессия которых препятствует пролиферации фибробластов и ингибирует экспрессию белков *COL1A2*, *COL1A1*, *COL3A1* [28, 29] и некоторые другие [30-35].

При сопоставлении полученных данных с результатами аналогичного GWAS-анализа глобальных регуляторных сетей развития фиброза подтвердили предположение о том, что рубцы являются одним из общих проявлений фиброза и общим конечным результатом неупорядоченной реакции пролиферации фиброзных волокон. Поэтому неудивительно, что многие из генов и путей, описанных в этих исследованиях, сохраняются в различных тканях [36].

Многочисленное увеличение пула генетических маркеров, обнаруженных разными методами, свидетельствует об отсутствии прямой каузальной связи с ожидаемым событием и не отражает вклад негенных признаков (образ жизни, факторы окружающей среды и др.) в соотношение рисков формирования патологических рубцов. Кроме того, обнаруженные молекулярно-генетические маркеры могут влиять на работу регуляторного комплекса протеаз, связанного с сотней других генов, только некоторые из которых непосредственно связаны с конкретным заболеванием или признаком. Таким образом, накапливается все больше фактов для перехода от концепции «мультигенных» признаков к «всегенной» регуляции внутриклеточных каскадов дисплазии соединительной ткани. Такое заключение подтверждают данные о том, что в белок-кодирующих участках экзона кодируется минимальное число полиморфных вариантов, а их большинство находится в интронах, некодирующих РНК и других относительно слабоизученных участках генома.

Несмотря на некоторые объективные ограничения GWAS-анализа, модель полногеномного поиска ассоциаций позволяет увеличить их значимость по сравнению с «ген-кандидатным» анализом на шесть порядков. Такой анализ определяет абсолютную информативную значимость выявленных ассоциативно-генетических маркеров в сравнении с молекулярно-генетическими в формировании мультифакторных фенотипических особенностей патологических рубцов. Используемый нами алгоритм отбора позволяет учитывать как маркеры, отобранные на основе априорного предположения о функциональной значимости гена кандидата, так и поиск ассоциаций по всему геному на основании GWAS-исследований. Объединение молекулярно-генетического и GWAS-

анализа помогает проводить селекцию ДНК-маркеров как по статистически высокозначимой ассоциации с изучаемым многофакторным признаком, так и по их молекулярной функциональной значимости.

Итак, накопление значительных массивов данных о генетической основе формирования патологических рубцов, наряду с возрастающей сложностью применяемых аналитических подходов, дает возможность значимо увеличить информативность представлений о молекулярных механизмах формирования многофакторных процессов образования патологических рубцов и уточнить набор определяющих их генетических маркеров. Изучение генети-

ческой предрасположенности к патологическому рубцеванию кожи, а также молекулярно-генетических маркеров, предопределяющих формирование рубцовых деформаций, является перспективным направлением разработки новых патогенетически обусловленных эффективных методов их коррекции. Разработка методов лечения, направленных на общие процессы патогенеза фиброза и специфические механизмы патогенеза рубцов, выявленных с помощью ассоциативных геномных исследований, приведет к улучшению качества жизни пациентов, страдающих фиброзными заболеваниями.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gibbon A., Hobbs H., van der Merwe W., et al. The MMP3 gene in musculoskeletal soft tissue injury risk profiling: A study in two independent sample groups. *J. Sports Sci.* 2017; 35 (7): 655-662. doi.org/10.1080/02640414.2016.1183806
2. Немчанинова О.Б., Черникова Е.В., Максимова Ю.В. и др. Генетическая предрасположенность к формированию рубцов при акне. *Journal of Siberian Medical Sciences.* 2020; 2:98-110 [Nemchaninova O.B., Chernikova E.V., Maksimova Yu.V., et al. Genetic predisposition to the formation of acne scars. *Journal of Siberian Medical Sciences.* 2020; 2:98-110 (In Russ)]. doi: 10.31549/2542-1174-2020-2-98-110
3. Burton P.R., et al. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature.* 2007; 447 (7145): 661-678. doi.org/10.1038/nature05911
4. Пузырев В.П., Степанов В.А. Патологическая анатомия генома человека. Новосибирск: Наука. СПб. предприятие РАН. 1997: 224 с. [Puzyrev V.P., Stepanov V. A. Pathological anatomy of the human genome. Novosibirsk: Nauka. SPb. enterprise RAS. 1997: 224 p. (In Russ)].
5. Пономаренко Г.Н., Карпова Т.Н. Физические методы лечения рубцов. СПб, 2009: 112 с. [Ponomarenko G.N., Karpova T.N. Physical methods of scar treatment. Saint Petersburg, 2009: 112 p. (In Russ)].
6. Ogawa R. Keloid and hypertrophic scars are the result of chronic inflammation in the reticular dermis. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18: 606. doi: 10.3390/ijms18030606
7. Carswell L., Borger J. Hypertrophic Scarring Keloids. StatPearls; Treasure Island, FL, USA: 2020. PMID: 30725743
8. Gold M.H., Manturova N.E., Kruglova L.S., Ikonnikova E.V. treatment of moderate to severe acne and scars with a 650-microsecond 1064-nm laser and isotretinoin. *J. Drugs Dermatol.* 2020 1; 19 (6): 646-651. doi: 10.36849/JDD.2020.M5108.
9. HuGE Navigator. URL: <https://phgkb.cdc.gov/PHGKB/startPagePhenoPedia.action>.
10. Wang W.Y.S., et al. Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. *Nature Reviews Genetics.* 2005; 6 (2): 109-118. doi.org/10.1038/nrg1522
10. *GWAS Catalog* [Electronic resource]. URL:<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>. Accessed 12.2018.
11. <https://www.gwascentral.org/>
12. <http://fastgwa.info/ukbimp/phenotypes>
13. <https://biobankengine.stanford.edu/>
14. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>
15. <http://genome.ucsc.edu/encode/>
16. He L., Wu W.J., Yang J.K., et al. Two new susceptibility loci 1q24.2 and 11p11.2 confer risk to severe acne. *Nat. Commun.* 2014; 5: 2870. doi.org/10.1038/ncomms3870
17. Nakashima M., Chung S., Takahashi A., et al. A genome-wide association study identifies four susceptibility loci for keloid in the Japanese population. *Nat. Genet.*, 2010; 42 (9): 768-771. doi: 10.1038/ng.645.
18. Fujita M., Yamamoto Y., Jiang J.J., et al. NEDD4 is involved in inflammation development during keloid formation. *J. Invest. Dermatol.* 2019; 139 (2): 333-341. doi: 10.1016/j.jid.2018.07.044.
19. Zhu F., Wu B., Li P., et al. Association study confirmed susceptibility loci with keloid in the Chinese Han population. *PLoS One.* 2013; 8 (5): e62377. doi: 10.1371/journal.pone.0062377.
20. Sood R.F., Hocking A.M., Muffley L.A., et al. Genome-wide association study of post-Burn Scars reveals a new protective variant. *Ann Surg.* 2015; 262 (4): 563-9. doi: 10.1097 / SLA.0000000000001439.
21. Linjawi S.A., Tork S.E., Shaibah R.M. Genetic association of the COL1A1 gene promoter -1997 G/T (rs1107946) and Sp1 +1245 G/T (rs1800012) polymorphisms and keloid scars in a Jeddah population. *Turk. J. Med. Sci.* 2016; 46 (2):

414-423. doi.org/10.3906/sag-1412-41

22. Tu Y., Lineaweaver W.C., Zhang F. TGF- β 1 -509C/T polymorphism and susceptibility to keloid disease: a systematic review and meta-analysis. *Scars, Burns & Heal.* 2017; 3. doi:10.1177/2059513117709943.

23. Hellwege J.N., Russell S.B., Williams S.M., et al. Gene-based evaluation of low-frequency variation and genetically-predicted gene expression impacting risk of keloid formation *Ann. Hum. Genet.* 2018; 82 (4): 206-215. doi: 10.1111 / ahg.12245.

24. Kuehlmann B., Bonham C.A., Zucal I., et al. Mechanotransduction in wound healing and fibrosis. *J. Clin. Med.* 2020; 9: 1423. doi: 10.3390/jcm9051423.

25. Carlván I., Bertino B., Rivier M., et al. Atrophic scar formation in patients with acne involves long-acting immune responses with plasma cells and alteration of sebaceous glands. *Br. J. Dermatol.* 2018; 179 (4): 906-917. doi: 10.1111/bjd.16680.

26. Zhu Z., Ding J., Tredget E.E. The molecular basis of hypertrophic scars. *Burns & Trauma.* 2016; 4: 2. doi: 10.1186/s41038-015-0026-4.

27. Akoglu G., Tan C., Ayvaz D.C., Tezcan I. Tumour necrosis factor α -308 G/A and interleukin 1 β -511 C/T gene polymorphisms in patients with scarring acne. *J. Cosmet. Dermatol.*, 2019; 18 (1): 395-400. doi:10.1111/jocd.12558.

28. Wu X., Li J., Yang X., et al. miR-155 inhibits the formation of hypertrophic scar fibroblasts by targeting HIF-1 α via PI3K/AKT pathway. *J. Mol. Histol.* 2018. Aug. Vol. 49 (4). P. 377-387. doi: 10.1007/s10735-018-9778-z.

29. Wang X., Zhang Y., Jiang B.H., et al. Study on the role of Hsa-miR-31-5p in hypertrophic scar formation and the mechanism. *Exp. Cell. Res.* 2017; 361 (2): 201-209. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.09.009.

30. Tan J., Bourd V., Bissonnette R., et al. Prospective study of pathogenesis of atrophic acne scars and role of macular erythema. *J. Drugs Dermatol.* 2017; 16 (6): 566-572. PMID: 28686774

31. Li J., Chen L., Cao C., et al. The long non-coding RNA LncRNA8975-1 is upregulated in hypertrophic scar fibroblasts and controls collagen expression. *Cell. Physiol. Biochem.* 2016; 40 (1-2): 326-334. doi.org/10.1159/000452548

32. Kruglikov I.L., Scherer P.E. Caveolin-1 as a target in the prevention and treatment of hypertrophic scars. *NPJ Regen Med.* 2019; 4: 9. doi: 10.1038/s41536-019-0071-x.

33. Lee H.J., Jang Y.J. Recent understandings of biology, prophylaxis and treatment strategies for hypertrophic scars and keloids. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19 (3): 711. doi: 10.3390/ijms19030711

34. Abdu Allah A.M.K., Mohammed K.I., Farag A.G.A., et al. Interleukin-6 serum level and gene polymorphism in keloid patients. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand).* 2019;65 (5): 43-48. PMID: 31304905.

35. Krumdieck Yokota K., Kobayakawa K., Saito T., et al. Periostin promotes scar formation through the interaction between pericytes and infiltrating monocytes / macrophages after spinal cord injury. *Am. J. Pathol.* 2017; 187 (3): 639-653. doi: 10.1016/j.ajpath. 20 16.11.010.

36. Stone R.C., Chen V., Burgess J., et al. Genomics of human fibrotic diseases: disordered wound healing response. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21 (22): 8590. doi: 10.3390/ijms21228590.

Поступила в редакцию журнала 08.12.2020

Рецензент: Н.Н. Климко

ВЛИЯНИЕ ПРОДУКТОВ МЕТАБОЛИЗМА ЭНТЕРОКОККОВ НА ОБРАЗОВАНИЕ ГИФАЛЬНОЙ ФОРМЫ *CANDIDA ALBICANS*

Александрова Н.А. (старший преподаватель)¹, Заславская М.И. (профессор кафедры), Игнатова Н.И. (доцент), Махрова Т.В. (доцент), Лукова О.А. (старший преподаватель)

Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия

Установлено, что продукты метаболизма энтерококков способны подавлять гифообразование *Candida albicans*. Антигифальная активность бактериальных метаболитов носит штамм-специфический характер. Лактат, являющийся одним из компонентов продуктов метаболизма энтерококков, не оказывает существенного влияния на гифообразование *C. albicans*. Способность *Enterococcus spp.* к синтезу бактериоцинов не коррелирует с антигифальной активностью штаммов.

Ключевые слова: *Candida*, гифы, энтерококки, микробный антагонизм, антигифальная активность

INFLUENCE OF ENTEROCOCCAL METABOLISM PRODUCTS ON THE HYPHAL FORM GENERATION OF *CANDIDA ALBICANS*

Alexandrova N.A. (senior lecturer), Zaslavskaya M.I. (professor of the department), Ignatova N.I. (associate professor), Makhrova T.V. (associate professor), Lukova O.A. (senior lecturer)

Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia

It was shown that the enterococcal metabolic products are able to inhibit hyphae formation of *Candida albicans*. Anti-hyphal activity of bacterial metabolites depends on the strain. Lactate, which is one of the components of enterococcal metabolism products, does not significantly affect the hyphae formation of *C. albicans*. The bacteriocin synthesis ability of *Enterococcus spp.* does not correlate with the anti-hyphal activity of the strains.

Key words: *Candida*, hyphae, enterococci, microbial antagonism, anti-hyphal activity

ВВЕДЕНИЕ

Грибы рода *Candida* – наиболее распространенные возбудители оппортунистических грибковых инфекций [1-3], присутствующие в составе многих микробиоценозов тела человека и, прежде всего, слизистых оболочек, кожи и кишечника. Наиболее часто возбудителем кандидоза слизистых оболочек является *Candida albicans* [3-5]. Среди основных факторов патогенности *C. albicans* можно выделить способность к морфологической трансформации «дрожжевая форма - мицелиальная форма». Гифы часто рассматривают как более вирулентную форму *Candida*. Переход дрожжеподобных клеток в гифы способствует инвазии микромицетов в ткани хозяина [3]. Известно, что некоторые представители нормальной микробиоты могут оказывать влияние на процесс гифообразования *Candida* [6]. Понимание механизмов антикандидозной стратегии бактерий микробиома чрезвычайно важно для создания условий, способных сдерживать кандидоносительство и препятствовать развитию клинически выраженного кандидоза у человека.

Цель нашей работы – изучение влияния продуктов метаболизма энтерококков на формирование гифальной формы *C. albicans*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали штаммы из музея кафедры эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава РФ: *Candida albicans* 601, *Enterococcus faecalis* (штаммы 179-2, 208, 651, 682, 2482, 4276, 4304, 4306, 4314), *Enterococcus faecium* (штаммы L3, 173-5).

Для получения экзогенных энтерококковых метаболитов бактерии культивировали в триптиказо-соевом бульоне (ТСБ) (HiMedia) в течение 48 часов при 37 °С. Стерильный фильтрат бульонной культуры энтерококков, содержащий метаболиты, получали путем отделения от бактериальных клеток с помощью бактериальных фильтров CellTricks с диаметром пор 100 мкм (Partec, Germany).

Candida культивировали на агаре Сабуро (ФБУН ГНЦ ПМБ Оболенск, Россия) 24 ч при 37 °С. После чего готовили суспензию клеток в дрожжевой форме 10⁷ КОЕ/мл в забуференном физиологическом растворе (ЗФР). Для получения гифальной формы 0,05 мл стандартизованной клеточной суспензии *C. albicans* (10⁷ КОЕ/мл в ЗФР) вносили в микропробирки типа Eppendorf объемом 1,5 мл с коническим дном и приливали 0,7 мл среды DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium, ПанЭко, Россия).

Для изучения влияния метаболитов энтерококков на образование гиф микромицетами в пробирки с грибами добавляли по 0,5 мл фильтрата бульонной культуры бактерий. В контроле использовали рав-

*Александрова Наталья Александровна,
e-mail: natalyuskova@rambler.ru

ный объем стерильного ТСБ. Пробирки инкубировали в течение 48 ч при 37 °С, после чего измеряли объем, занимаемый образовавшимися гифами *Candida*.

В ряде экспериментов для оценки влияния молочной кислоты, содержащейся в продуктах метаболизма энтерококков, в ТСБ добавляли химически чистый лактат, доводя pH до значения 6,0, что соответствовало показателю кислотности супернатанта двухсуточной бульонной культуры энтерококков. Для измерения pH среды применяли индикаторные полоски Hydrion® Brilliant pH dip sticks (Micro Essential Laboratory, USA).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе экспериментов было показано, что продукты метаболизма всех исследуемых штаммов энтерококков способны угнетать образование гифальной формы *C. albicans* (Рис., табл.). При этом выраженность антигифального эффекта зависела от характеристик штамма бактерий. Наибольшим эффектом обладали метаболиты *E. faecium* L3, *E. faecalis* 179-2 и *E. faecalis* 208. При воздействии продуктов метаболизма этих штаммов на суспензию грибов объем, занимаемый гифами микромицетов, был ниже, чем в контроле в 25,73±16,21, 10,97±3,35 и 10,6±6,35 раз соответственно ($p < 0,05$).

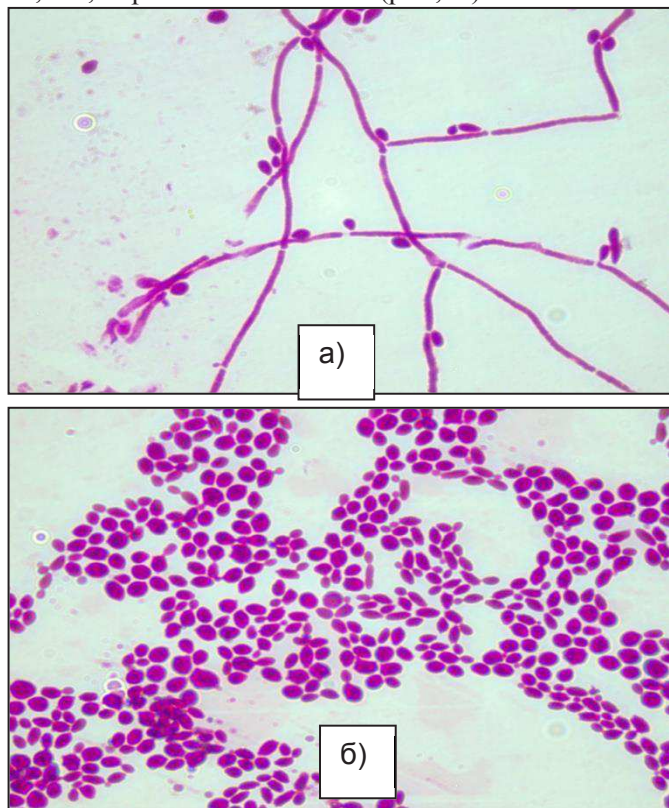


Рис. Способность к гифообразованию у *C. albicans* штамм 601 при культивировании (48 ч, 37 °С) *in vitro*. Окраска карболовым фуксином.

а) контроль (без метаболитов энтерококков) – доминирование гифальной формы;
б) эксперимент (с метаболитами *E. faecium* L3) – доминирование дрожжевой формы.

Известно, что энтерококки являются молочно-кислыми бактериями, и в состав их метаболитов входит лактат. Мы предположили, что антигифальная активность метаболитов энтерококков может быть обусловлена высокой концентрацией молочной кислоты. Для проверки нашей гипотезы использовали стерильную питательную среду с добавлением лактата. В ходе экспериментов установлено, что присутствие молочной кислоты в питательной среде не влияло на образование гиф *C. albicans*: объем гифальной массы в опытных образцах не отличался от контроля ($p > 0,05$).

Таблица

Гифообразование *Candida albicans* 601 через 48 часов экспозиции с метаболитами энтерококков, (M±m)

Метаболиты штаммов энтерококков	Объем, занимаемый гифами <i>C. albicans</i> (мл ³)	Кратность снижения объема, занимаемого гифами <i>C. albicans</i> относительно контроля (количество раз)
контроль (без метаболитов энтерококков)	0,43±0,09	1
<i>E. faecium</i> L3	0,04±0,03*	25,73±15,06*
<i>E. faecium</i> 173-5	0,28±0,06*	1,50±0,17*
<i>E. faecalis</i> 2482	0,21±0,05*	2,13±0,35*
<i>E. faecalis</i> 682	0,08±0,04*	6,88±2,50*
<i>E. faecalis</i> 651	0,12±0,05*	3,86±0,72*
<i>E. faecalis</i> 179-2	0,05±0,02*	10,97±3,35*
<i>E. faecalis</i> 4304	0,12±0,06*	7,15±3,80*
<i>E. faecalis</i> 4276	0,26±0,03*	1,69±0,39*
<i>E. faecalis</i> 4306	0,08±0,06*	6,91±2,37*
<i>E. faecalis</i> 4314	0,16±0,02*	2,75±0,15*
<i>E. faecalis</i> 208	0,16±0,04*	10,6±6,35*

* – статистически значимые отличия по сравнению с контролем ($p < 0,05$)

Подавление формирования мицелия у *C. albicans* могло быть связано с наличием в энтерококковых метаболитах биологически активных веществ, обладающих либо ферментативной активностью, либо действующих как бактериоцины. Из данных, полученных нами ранее [7], известно, что *E. faecalis* 179-2, *E. faecium* 173-5 и *E. faecalis* 4276 не имеют генов, кодирующих известные в настоящее время бактериоцины, однако все вышеуказанные штаммы имели выраженную антигифальную активность. Понимание механизмов антикандидозной стратегии бактерий микробиома чрезвычайно важно для создания условий, способных сдерживать кандидоносительство и препятствовать развитию клинически выраженного кандидоза у человека.

Замечено, что при увеличении времени культивирования *Candida* с метаболитами энтерококков до 5 суток антигифальный эффект нивелировался: на этом этапе эксперимента объем гифальной массы в опытных образцах не отличался от контроля

($p > 0,05$). Это могло быть связано с биodeградацией действующих веществ в субстрате в течение данного периода времени. Таким образом, воздействие экзогенных продуктов метаболизма энтерококков на грибы замедляет образование гифальных элементов у микромицетов, но не отменяет полностью способность к формированию гиф *C. albicans*.

ВЫВОДЫ

1. Экзогенные продукты метаболизма всех исследуемых штаммов энтерококков способны подав-

лять формирование мицелиальной формы *C. albicans*.

2. Молочная кислота, синтезируемая энтерококками, не оказывает существенного влияния на гифообразование *C. albicans*.

3. Ингибирование образования гиф у *C. albicans* в присутствии метаболитов энтерококков, вероятнее всего, связано с действием бактериальных экзоферментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Silva-Rocha W.P., de Brito Lemos V.L., Ferreira M.R.A., et al. Effect of the crude extract of *Eugenia uniflora* in morphogenesis and secretion of hydrolytic enzymes in *Candida albicans* from the oral cavity of kidney transplant recipients. BMC Complement Altern. Med. 2015;15: 6. doi: 10.1186/s12906-015-0522-x
2. Li Y., Jiao P., Li Y., Gong Y., Chen X., Sun S. The synergistic antifungal effect and potential mechanism of d-penicillamine combined with fluconazole against *Candida albicans*. Front Microbiol. 2019; 10: 2853. doi: 10.3389/fmicb.2019.02853.
3. Vila T., Sultan A.S., Montelongo-Jauregui D., Jabra-Rizk M.A. Oral candidiasis: a disease of opportunity. J. Fungi (Basel). 2020; 16; 6 (1):15. doi: 10.3390/jof6010015
4. Marinho S.A., Teixeira A.B., Santos O.S., et al. Identification of *Candida* spp. by phenotypic tests and PCR. Braz. J. Microbiol. 2010; 41 (2): 286-294. doi: 10.1590/S1517-83822010000200004
5. Пестрикова Т.Ю., Юрасова Е.А., Котельникова А.В. Вульвовагинальный кандидоз: современный взгляд на проблему. РМЖ. Мать и дитя. 2017; 25 (26): 1965-1970. [Pestrikova T.Yu., Yurasova E.A., Kotelnikova A.V. Vulvovaginal candidiasis: a modern view of the problem. The mother and child. 2017; 25 (26): 1965-1970 (In Russ)].
6. Barbosa J.O., Rossoni R.D., Godinho Vilela S.F., et al. *Streptococcus mutans* can modulate biofilm formation and attenuate the virulence of *Candida albicans*. PLoS One. 2016; 11 (3): e0150457. doi: 10.1371/journal.pone.0150457
7. Заславская М.И., Александрова Н.А., Лукова О.А. и др. Влияние продуктов метаболизма энтерококков на адгезию *Candida albicans* (Berkhout) к буккальным эпителиоцитам *in vitro*. Проблемы медицинской микологии. 2016; 18 (3): 55-59. [Zaslavskaya M.I., Alexandrova N.A., Lukova O.A., et al. Effect of enterococcal metabolic products on the adhesion of *Candida albicans* (Berkhout) to buccal epithelial cells *in vitro*. Problems in Medical Mycology. 2016; 18 (3): 55-59 (In Russ)].

Поступила в редакцию журнала 07.10.2020

Рецензент: Т.С. Богомолова

СТРОЕНИЕ МИКРОКУЛЬТУР НЕКОТОРЫХ *ASPERGILLUS* SPP. ПРИ ПЕРИОДИЧЕСКОМ НАБЛЮДЕНИИ

¹Жоля Я.С. (студент), ¹Волонцевича А.М. (студент), ²Рябинин И.А. (м.н.с., ассистент кафедры)*

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Представлены экспериментальные данные по структурной организации культур *Aspergillus* spp. на агаровых блоках при наблюдении за их ростом в динамике. Изучены штаммы *A. fumigatus* РКПГ F-1437, *A. niger* РКПГ F-1445, *A. candidus* РКПГ F-1494, идентифицированные морфологически, а также методами MALDI-TOF-масс-спектрометрии клеточного экстракта и таргетного ДНК-секвенирования таксономически значимых локусов. Из данных штаммов получили микрокультуры на агаровых блоках из среды Чапека с дрожжевым экстрактом, за развитием которых наблюдали до 5 (*A. fumigatus*) и до 15 суток (*A. niger*, *A. candidus*) с инкубацией при 24 °С. В целом штаммы *A. fumigatus*, *A. niger* и *A. candidus* проявили контрастные тенденции развития: первые два отличались преобладанием конидиеносцев над вегетативным мицелием, быстрым образованием конидиальных головок и формированием признаков старения культуры в конце срока наблюдения. Штамм *A. candidus*, напротив, отличался преобладанием развитого воздушного мицелия над конидиеносцами, конидиальное спороношение здесь формировалось на более поздних сроках. Данные о развитии микрокультур *Aspergillus* spp. и других микромицетов необходимы для исследований их реакций на различные воздействия, в том числе антимикотиков, дезинфектантов, микробных метаболитов.

Ключевые слова: микрокультура, агаровый блок, *Aspergillus* spp., развитие микромицетов

STRUCTURE OF SOME *ASPERGILLUS* SPP. SLIDE-CULTURES UNDER PERIODIC INVESTIGATION

¹Jolya Ya.S. (student), ¹Volontsevicha A.M. (student), ²Ryabinin I.A. (junior scientific researcher, assistant of the department)

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia

Experimental data on the structural organization of *Aspergillus* spp. on agar blocks while observing their growth in dynamics are presented. Strains of *A. fumigatus* RCPF F-1437, *A. niger* RCPF F-1445 & *A. candidus* RCPF F-1494 identified by morphology and MALDI-TOF mass-

spectrometry of cellular extracts as well as by targeted DNA-sequencing of taxonomically significant loci, were studied. Fungal microcultures were obtained on Czapek yeast extract agar blocks, the development of which was observed for up to 5 days for *A. fumigatus* and up to 15 days for *A. niger* and *A. candidus* with incubation at 24 °C. In general, strains of *A. fumigatus*, *A. niger*, and *A. candidus* showed contrasting tendencies in their development: the first two were distinguished by the predominance of conidiophores over vegetative mycelium, rapid formation of conidial heads and the formation of aging signs in the culture at the end of observation period. The strain of *A. candidus*, on the other hand, was distinguished by the predominance of developed aerial mycelium over conidiophores; conidial sporulation here formed at a later stage. Data on the development of *Aspergillus* spp. microcultures and other micromycetes are needed to study their reactions to various influences, including antifungals, disinfectants, and microbial metabolites.

Key words: agar blocks, *Aspergillus* spp., development of micromycetes, slide-culture

ВВЕДЕНИЕ

Метод получения микрокультур грибов на агаровых блоках успешно используют в изучении биологии возбудителей микозов на протяжении многих десятилетий. В сравнении с изготовлением стандартных микропрепаратов типа «раздавленная капля» данный метод имеет ряд принципиальных особенностей. Он требует от лабораторного миколога несколько большего опыта и усилий, связанных с созданием стерильной микрокамеры на стекле. Получаемая в таком исследовании микроскопическая картина часто не позволяет видеть мельчайшие детали конидиеносного аппарата, однако здесь культура сохраняет естественное устройство, включая «архитектонику» мицелия и расположение наиболее механически хрупких элементов органов размножения (например, цепочек конидий). Кроме того, метод агаровых блоков позволяет вести динамическое наблюдение за развитием культуры. Поэтому данную технику, наряду с более простыми приёмами, используют для идентификации микромицетов и выявления их физиологических реакций на внешнее воздействие (антимикотический препарат, дезинфектант, присутствие стороннего микроорганизма, физический фактор и т.д.). Впервые метод микрокультур для грибов-возбудителей микозов предложил один из основателей медицинской микологии Раймонд Сабуро.

Способы получения микрокультур детально описаны в известной монографии П.Н. Кашкина «Дерматомикозы (человека и животных)», изданной в 1967 г. На современном этапе исследователь также может обратиться к целому ряду сообщений [1-3], протоколов и видеоруководств, размещённых в сетевых источниках [4-6].

Различных представителей рода *Aspergillus* неоднократно исследовали таким образом [7]. Однако в литературе затруднительно найти подобное описание особенностей микрокультур *Aspergillus* spp., ос-

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

нованное на работе со штаммами, идентифицированными с помощью экспертных методов. Восполнению «информационного пробела» в этом направлении посвящена данная работа.

Цель работы – характеристика динамики роста микрокультур коллекционных штаммов избранных видов *Aspergillus* spp.

Некоторые результаты наблюдений нами были в краткой форме представлены ранее [8], в этой работе данные помещены в той степени подробности, в какой они были получены в опыте.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы *Aspergillus* spp. предоставлены Российской коллекцией патогенных грибов: *A. fumigatus* РКПГ F-1437, *A. niger* РКПГ F-1445, *A. candidus* РКПГ F-1494.

Реидентификацию культур осуществляли методом линейной MALDI-TOF-масс-спектрометрии клеточного экстракта, как описано нами ранее [9]. Помимо этого, использовали результаты таргетного ДНК-секвенирования таксономически значимых локусов (β -тубулина и внутреннего транскрибируемого спейсера), полученные Михайловой Ю.В. и соавторами [10].

Изготовление агаровых блоков проводили по успешно опробованной нами методике [11], которая в кратком изложении состоит в следующем. На стерильные предметные стекла, уложенные в чашки Петри стандартного размера по 2, заливали слой агаризованной питательной среды, давали застыть, делали обрезку так, чтобы на стекле оставалась полоса агара в центре со свободным пространством по периферии. Затем выполняли посев инокулюма в виде небольших фрагментов колонии штамма с картофельно-глюкозного агара по одному на каждую сторону агарового блока. Далее блок закрывали тремя покровными стёклами по всей площади и герметизировали парафином. Инкубацию проводили при 24 °С до 15 суток (для штамма *A. fumigatus* – до 5 суток) с наблюдением и фотофиксацией.

Для наблюдения и съёмки использовали микроскоп МБР-1 (ЗАО «ЛОМО», Россия; увеличение $\times 56$) и камеру iSight, 12 МП. Редакцию изображений осуществляли в XnView и GIMP.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты исследования представлены в форме последовательных серий микроснимков для каждого наблюдаемого штамма с аннотациями (Рис.1, 2). Для краткости виды (штаммы) обозначены: AF – *A. fumigatus*, AN – *A. niger*, AC – *A. candidus* (после обозначения приведен порядковый номер снимка в серии); «d» с числовым индексом – сутки наблюдения.

Развитие микрокультуры *A. fumigatus* РКПГ F-1437:

AF-1. 1-е сутки наблюдения. На поверхности агарового блока видны массы конидий из инокулюма, на стекле в свободном пространстве некото-

рые конидии начинают прорастать, образуя очень короткие гифы.

AF-2. 1-е сутки наблюдения. Участок микрокультуры, где на поверхности стекла происходит более интенсивное прорастание конидий; гифы ориентированы в разные стороны, но многие растут по направлению к блоку агара.

AF-3. 2-е сутки наблюдения. Культура обладает стремительным ростом, на поверхности стекла образуется разветвленная петлистая сеть мицелия, более густая со стороны блока агара. Гифы формируют анастомозы.

AF-4. 2-е сутки наблюдения. Гифы на поверхности стекла неоднородны по диаметру, они ветвятся в форме неправильной сети, либо образуя треугольные в плане фигуры из расходящихся ветвей. Видны тени-проекции конидиальных головок, которые расположены в другой плоскости.

AF-5. 2-е сутки наблюдения. При смене фокусировки проявляются контуры конидиеносцев. Они преимущественно прямые, растут под углом к поверхности агарового блока, их венчают молодые конидиальные головки, где еще не сформировались цепочки конидий.

AF-6. 3-е сутки наблюдения. Усиливается образование конидий, из конидиальных головок сформирован массив в форме вала. В его основании виден очень густой слой субстратного мицелия с конидиеносцами. Головки расположены в боковой проекции в несколько ярусов вместе с сетью воздушного мицелия. В них заметен характерный темно-зеленый пигмент. Над валом головок выступают слабоветвящиеся, более разреженные воздушные гифы.

AF-7. 3-е сутки наблюдения. Усиление конидиогенеза. Часть конидиальных головок расположены на конидиеносцах, возвышающихся над основным «валом», их размеры увеличиваются, но характерные колонки еще не сформированы. Мицелий на стекле формирует более густую сеть, чем в предыдущие сутки.

AF-8. 3-е сутки наблюдения. Видны более развитые конидиальные головки с характерными колонками из цепочек конидий. Часть крупных гиф на стекле образуют ветвление с менее развитыми анастомозами, сходное с картиной роста в предыдущие сутки.

AF-9. 5-е сутки наблюдения. Крупные конидиальные головки с колонками. Некоторые конидиеносцы, по-видимому, отходят от гиф на стекле или свободного воздушного мицелия, а не от субстратного (базального) мицелия, как основная часть.

AF-10. 5-е сутки наблюдения. Основной массив культуры из-за интенсивного конидиогенеза и развития воздушного мицелия теряет прозрачность, отдельные конидиеносцы выступают за его пределы. Конидиальные головки здесь преимущественно не имеют колонковидной структуры, вероятно, из-за высвобождения конидий. От участков (фрагментов) окантовки блока виден рост гиф вне основной мик-

рокультуры.

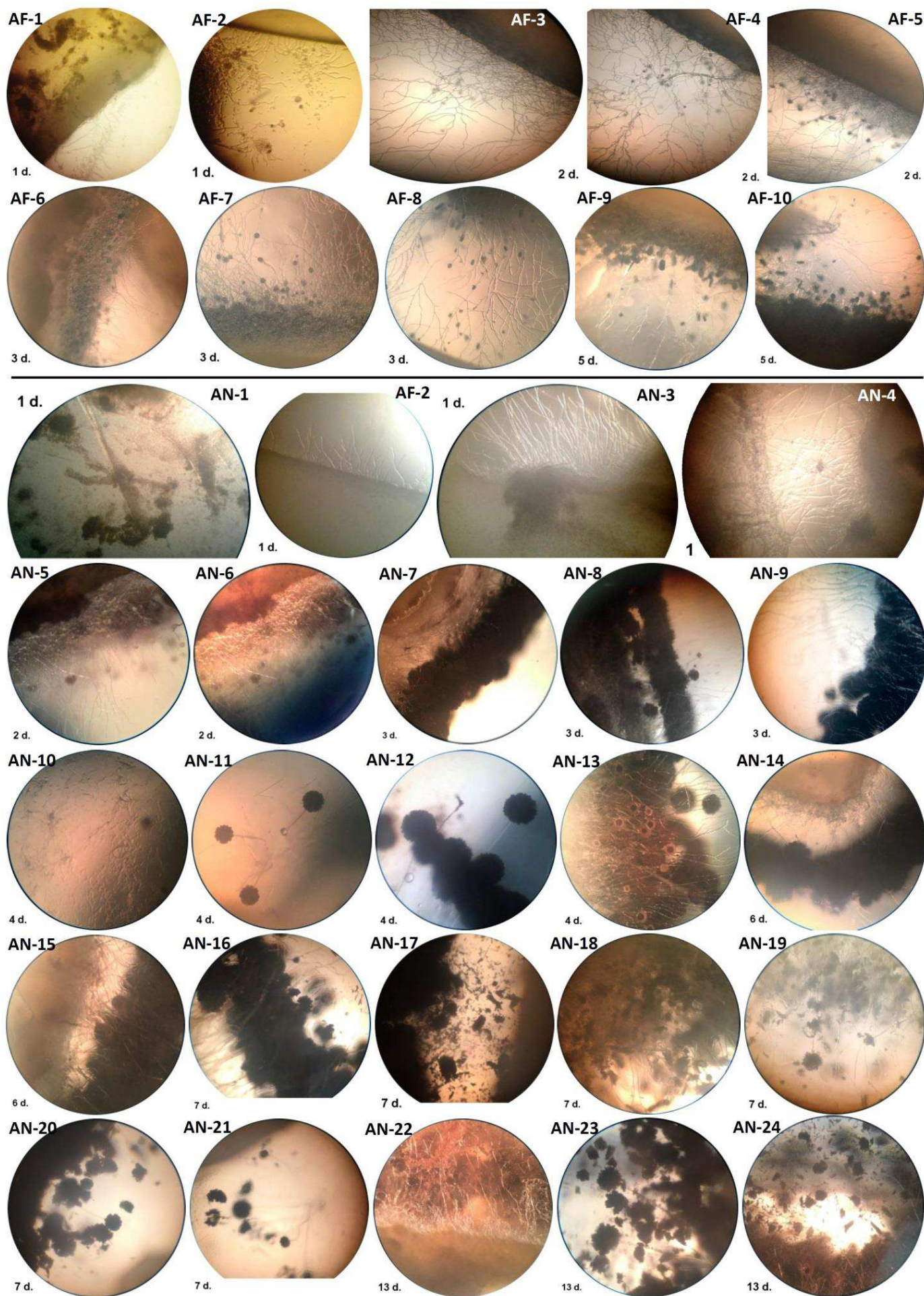


Рис. 1. Динамика развития штаммов *A. fumigatus* и *A. niger* на агаровых блоках (обозначения в тексте).

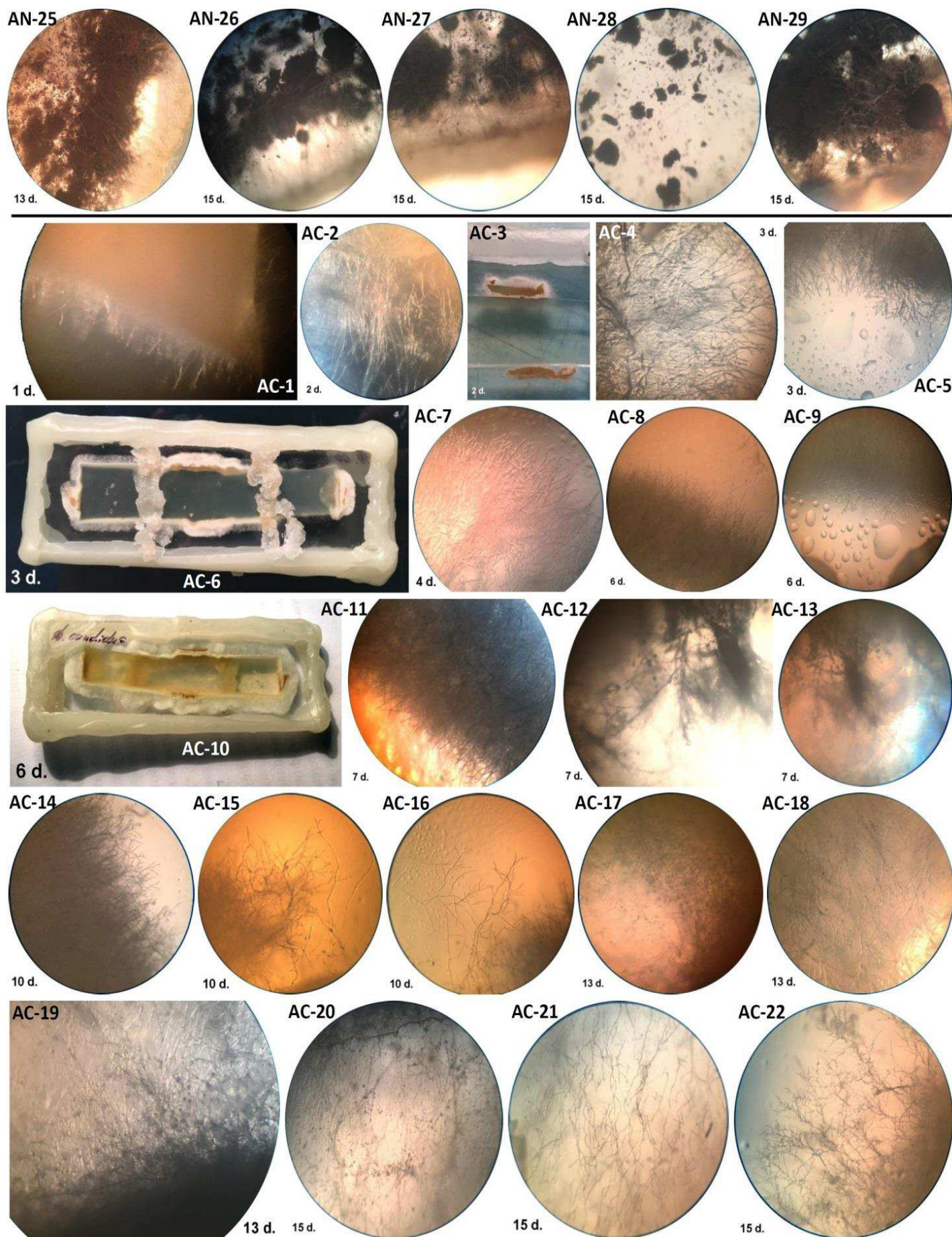


Рис. 2. Динамика развития штаммов *A. niger* и *A. candidus* на агаровых блоках (обозначения в тексте).

Развитие микрокультуры *A. niger* РКПГ F-1445:

AN-1. 1-е сутки наблюдения. В пространстве агарового блока видны массы спор и элементы мицелия из инокулюма.

AN-2. 1-е сутки наблюдения. На краю агарового блока из конидий прорастают короткие, слабоветвящиеся гифы.

AN-3. 1-е сутки наблюдения. На другом участке того же агарового блока видно образование более протяжённых гиф, также редко образующих ветви.

AN-4. 1-е сутки наблюдения. Участок с более густо нанесенным инокулюмом, видно более интенсивное образование мицелия, сплетения и анастомозы гиф.

AN-5. 2-е сутки наблюдения. В культуре происходит более интенсивное развитие мицелия, появляются молодые конидиеносцы с конидиальными головками на разных стадиях формирования.

AN-6. 2-е сутки наблюдения. В растущем мицелии накапливается материал клеточной стенки, при косо направленном освещении он приобретает заметную блескость.

AN-7. 3-е сутки наблюдения. На 3-е сутки конидиальные головки становятся зрелыми, формируют типичные массы из цепочек угольно-черных конидий. Многочисленные конидиеносцы формируют вал вокруг культуры.

AN-8. 3-е сутки наблюдения. Наряду с ранее сформированными конидиеносцами, в культуре появляются новые, видны более мелкие конидиальные головки разной степени зрелости.

AN-9. 3-е сутки наблюдения. Над слоем конидиальных головок видны гифы, распространяющиеся по поверхности покровного стекла.

AN-10. 4-е сутки наблюдения. Отдаленная часть культуры. На поверхности стекла происходит прорастание конидий с формированием нерегулярной сети молодых гиф.

AN-11. 4-е сутки наблюдения. В отдалённом регионе роста на гифах образуются одиночные конидиеносцы.

AN-12. 4-е сутки наблюдения. Наиболее крупные конидиеносцы, выходящие за общую линию роста.

AN-13. 4-е сутки наблюдения. В самой поверхностной части культуры, стелющейся на поверхности покровного стекла, видны протяженные воздушные гифы. Ближе к наблюдателю расположены молодые конидиальные головки с более тёмными терминальными расширениями и светлыми стеригмами. Глубже находятся более старые, крупные и тёмные конидиальные головки.

AN-14. 6-е сутки наблюдения. На 6-е сутки «вал» конидиальных головок становится наиболее развитым, под ним виден более светлый прозрачный слой ножек конидиеносцев и воздушных гиф.

AN-15. 6-е сутки наблюдения. Участок блока с сильно развитым спороношением. Между темным

массивом конидиальных головок и желтоватым слоем агара видна светлая «полоса» конидиеносцев и воздушных гиф.

AN-16. 7-е сутки наблюдения. Характер строения микрокультуры в основном сохраняется, виден «вал» конидиальных головок.

AN-17. 7-е сутки наблюдения. От конидиальных головок опадают конидии в форме отдельных клеток, групп, коротких цепей и крупных масс.

AN-18. 7-е сутки наблюдения. В культуре формируются признаки старения, видны конидиальные головки неправильной формы, видоизмененные отчасти из-за высвобождения конидий.

AN-19. 7-е сутки наблюдения. Видны полиморфные конидиальные головки на конидиеносцах, исходящих из базального сплетения гиф и отдалённых воздушных ветвей.

AN-20. 7-е сутки наблюдения. Стареющие, ранее сформированные конидиальные головки сильно варьируют по диаметру и форме, иногда образуют агрегаты.

AN-21. 7-е сутки наблюдения. В отдалённой части культуры на конидиеносцах, сформировавшихся вне основного массива, видны конидиальные головки разных возрастов: растущие и сбрасывающие конидии.

AN-22. 13-е сутки наблюдения. На 13-е сутки инкубации при микроскопии в отраженном свете субстратный и воздушный мицелий культуры сохраняет характерную блескость, а конидиальные массы выглядят кофейно-коричневыми.

AN-23. 13-е сутки наблюдения. Вблизи конидиальных головок наиболее выступающих конидиеносцев лежат опавшие массы из цепочек конидий, в некоторых головках видно расщепление на короткие колонки.

AN-24. 13-е сутки наблюдения. В данном фрагменте культуры видно высвобождение не только конидиальных масс, но и отдельных фрагментов цепочек конидий. Внизу видны конидиальные головки, по-видимому, позднего происхождения: их базальные элементы (терминальные расширения, стеригмы) пигментированы умеренно.

AN-25. 13-е сутки наблюдения. Из-за высвобождения большого количества конидий ранее сформированный вал конидиальных головок теряет свои правильные очертания. В пространстве около него видны диффузно рассредоточенные группы спор.

AN-26. 15-е сутки наблюдения. Фрагмент вала конидиальных головок с умеренно сохранной структурой. Внизу снимка видны гифы – конидиеносцы.

AN-27. 15-е сутки наблюдения. Та же область микрокультуры, что и на снимке «AN-26», с приближением к границе «среда-воздух». В базальной части культуры определяются: сеть воздушных гиф, конидиеносцы, контуры скопления конидиальных головок и высвободившиеся группы конидий.

AN-28. 15-е сутки наблюдения. В свободном

пространстве агарового блока, где слабо прослеживаются единичные, стелящиеся по стеклу гифы, расположились многочисленные слущенные с конидиальных головок массы спор и единичные группы конидий.

AN-29. 15-е сутки наблюдения. Пространство, расположенное ниже основного вала конидиальных головок, где несущие гифы конидиеносцев закрывают крупные, низкорасположенные конидиальные головки, и густая сеть мицелия.

Развитие микрокультуры *A. candidus* РКПГ F-1494:

АС-1. 1-е сутки наблюдения. На краю агарового блока видно обильное прорастание конидий в виде множества коротких, слабветвящихся гиф.

АС-2. 2-е сутки наблюдения. Образование гифальной сети умеренной густоты, гифы исходят из поверхности агара и скоплений спор инокулюма вблизи нее.

АС-3. 2-е сутки наблюдения. Вид сегмента агарового блока с кусочками культуры *A. candidus*, в одном из фрагментов происходит интенсивное развитие мицелия.

АС-4. 3-е сутки наблюдения. Формирование плотной, сильноразветвленной гифальной сети, в глубоких частях она окружена аморфной гиалиновой субстанцией.

АС-5. 3-е сутки наблюдения. В наиболее детальной части воздушного мицелия формируется лучистый край из часто светящихся завершений гиф.

АС-6. 3-е сутки наблюдения. Общий вид агарового блока. Более интенсивный рост виден в местах посева кусочков инокулюма на торцах и «ребрах» блока, культура переходит на свободную поверхность агара.

АС-7. 4-е сутки наблюдения. Продолжается рост воздушного мицелия, усиливается ветвление гиф, их стенки обладают высокой блестястью.

АС-8. 6-е сутки наблюдения. Воздушный мицелий становится густым и из-за обилия ветвлений местами малопрозрачным.

АС-9. 6-е сутки наблюдения. Частые разветвления гиф вблизи апекса. На поверхности покровного стекла – капли жидкости, пропотевающей из агарового блока.

АС-10. 6-е сутки наблюдения. Общий вид агарового блока с оборотной стороны. Культура распространилась по всему контуру блока, воздушный мицелий сильно развит.

АС-11. 7-е сутки наблюдения. Уплотнение сети гиф воздушного мицелия, часть колонии теряет прозрачность.

АС-12. 7-е сутки наблюдения. Вблизи гифальных тяжей формируются слабозаметные конидиеносцы, несущие конидиальные головки радиального типа.

АС-13. 7-е сутки наблюдения. Очертания конидиальных головок ровные, форма приближается к сферической.

АС-14. 10-е сутки наблюдения. Продолжается краевой рост воздушного мицелия, новые гифы сильно ветвятся на всем протяжении.

АС-15. 10-е сутки наблюдения. Отдаленная часть края колонии, видны переплетающиеся, спутанные гифы с неправильным характером ветвления.

АС-16. 10-е сутки наблюдения. Наиболее дистально расположенные воздушные гифы на поверхности стекла образуют сложные фигуры с «петлями» и анастомозами, концевыми фрагментами в форме «елочки».

АС-17. 13-е сутки наблюдения. На ветвях воздушного мицелия россыпью образуются конидиальные головки.

АС-18. 13-е сутки наблюдения. Многократно ветвящиеся гифы воздушного мицелия на поверхности стекла.

АС-19. 13-е сутки наблюдения. Фрагмент колонии вблизи парафиновой окантовки блока, развитие мицелия и единичных конидиальных головок.

АС-20. 15-е сутки наблюдения. Развитие сети тонких гиф воздушного мицелия и мелких конидиальных головок в отдаленной части колонии.

АС-21. 15-е сутки наблюдения. Развитие гиф на стекле, вырастающих, по-видимому, из новообразованных конидий.

АС-22. 15-е сутки наблюдения. Краевая зона основной колонии, где развиты апикальные ветвления в форме «елочки».

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно результатам исследования, штаммы проявили разнонаправленные тенденции в своём морфологическом развитии. *A. niger* и *A. fumigatus* отличались быстрым развитием конидиеносцев, а в конце периода наблюдения у их конидиеносцев появились признаки старения. Вегетативный воздушный мицелий был развит умеренно, в основном распространялся по поверхности стекла (покровного и предметного), иногда он давал начало формированию новых, удаленно расположенных очагов конидиального спороношения вне основного массива культуры. Напротив, у штамма *A. candidus* появление роста отметили в те же сроки, что и у предыдущих изолятов, однако все развитие культуры здесь происходило значительно медленнее. Воздушный мицелий развивался интенсивно, его массив значительно превосходил по объему в культуре органы конидиального спороношения. Спорообразование возникало отсрочено в конидиальных головках малого размера, которые формировались на коротких конидиеносцах – ветвях гиф небольшими группами. В силу малого размера проследить динамику развития таких головок у этого штамма в микрокультуре сложно.

Напротив, у наблюдаемого штамма *A. niger* в молодых конидиальных головках, в особенности расположенных вблизи покровного стекла, можно отчетливо рассмотреть терминальное расширение, слой стеригм и формирующуюся массу из цепочек

конидий (Рис. 1, AN-13). В наших более ранних наблюдениях за культурой того же вида на блоках из мясо-пептонного агара детали строения конидиальных головок рассмотреть не удалось, были видны только их контуры. По-видимому, эта особенность связана с составом среды культивирования: при изготовлении препаратов типа «раздавленная капля» у *A. niger* также можно разглядеть детали строения конидиальных головок в культуре разного возраста, тогда как при выращивании на среде Сабуро подробно можно увидеть только головки в молодых колониях, они скоро становятся непрозрачными.

Штаммы *A. fumigatus* РКПГ F-1437 и *A. niger* РКПГ F-1445 по совокупности культуральных и морфологических свойств, выявленных в данном исследовании и определённых ранее [12], являются типичными представителями своих видов, следовательно, их параметры микроморфологического развития с высокой вероятностью можно экстраполировать для других штаммов дымчатого и чёрного аспергиллов соответственно. Отметим, что, несмотря на двухвековую историю изучения *A. candidus* Link, штаммы этого вида в клинической практике выявляют нечасто, поэтому сложнее выделить морфологические тенденции и атипичные формы. Например, в Российской коллекции патогенных грибов имеется изолят *A. candidus* РКПГ F-123, который, в отличие от штамма F-1494, образует уплощенные, а не куполообразные, колонии с гранулярной поверхностью. Спороношение у него происходит преимущественно в крупных, а не карликовых, конидиальных головках. Притом оба штамма фактически соответствуют диагнозу вида по культурально-морфологическим, молекулярно-генетическим и физико-химическим признакам.

Ранее подобная методика микрокультур нами использована для штаммов *A. niger*, *Penicillium* spp. и *Mucor* sp., в этих случаях блоки готовили из мясо-пептонного агара. На протяжении более 10 лет хранения многие образцы таких микрокультур, несмотря на высыхания питательной среды, в основном сохранили своё строение, оказались пригодными для научных и учебных работ. В некоторой модификации данная методика позволяет изучать влияние микробных метаболитов на микромицеты [13]. Для этого исследования на поверхности покровного стекла оставляли не одну полоску агара, а две параллельно расположенных меньшего размера. В одном из проведённых опытов внешнюю сторону агаровых полосок засеивали инокулятом из спор микромицета (*Penicillium* sp.), а внутреннюю – различными бактериями. Как оказалось, *Staphylococcus aureus* своими метаболитами стимулировал конидиогенез

Penicillium sp., вызывая образование на конидиеносцах гипертрофированных масс конидий; модулирующее влияние оказывала *Klebsiella pneumoniae* – в ее присутствии конидиеносцы формировались сравнительно короткие, но в большом количестве и с длинными колонками конидий. *Proteus vulgaris*, напротив, вызывал образование карликовых конидиеносцев. В аналогичном опыте для культуры *Mucor* sp. показано изменение морфологии спорообразования под влиянием метаболитов пигментных и беспигментных штаммов *Serratia marcescens*, выделенных из биоматериалов человека. Путем внесения добавок в питательную среду для изготовления блоков можно исследовать способность микромицета деградировать различные соединения. Такая модификация метода нами использована для исследования роста микромицетов в присутствии лигнина в качестве единственного питательного ресурса [14].

ВЫВОДЫ

1. Примененная модификация метода микрокультур («агаровых блоков») пригодна для динамического наблюдения за ростом и развитием штаммов *Aspergillus* spp.

2. В отношении изученных микрокультур сохраняются особенности темпов роста и дифференцировки, характерные для обычных культур *Aspergillus* spp. на плотных питательных средах.

3. Метод агаровых блоков позволяет выполнять наблюдения над строением и развитием микромицетов без внесения тех механических искажений, которые возникают при изготовлении препаратов типа «раздавленная капля».

4. Совокупность морфологических признаков, выявляемых при микроскопии «агаровых блоков» штаммов *Aspergillus* spp. не позволяет наблюдать тонкое строение органов конидиального спороношения, но поддерживает возможность дифференцировки аспергиллов.

Исследование выполнено в рамках реализации комплексной темы НИР «Молекулярно-биологические особенности грибковых патогенов и молекулярные механизмы иммунопатогенеза микозов как основа разработки новых методов диагностики, профилактики и лечения микотических заболеваний».

Авторы сообщения признательны заведующей Российской коллекций патогенных грибов Г.А. Чилиной, любезно предоставившей штаммы для исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Woo P.C.Y., Ngan A.H.Y., Chui H.K., et al. Agar block smear preparation: a novel method of slide preparation for preservation of native fungal structures for microscopic examination and long-term storage. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010; 48 (9): 3053-3061. doi: 10.1128/JCM.00917-10
2. Kali A., Srirangaraj S., Charles M.V.P. A modified fungal slide culture technique. *Letter to editor. Indian Journal of Pathology and Microbiology*. 2014; 57 (2): 356-357.

3. Wijedasa M.H., Liyanapathirana L.V.C. Evaluation of an alternative slide culture technique for the morphological identification of fungal species. Sri Lanka Journal of Infectious Diseases. 2012; 2 (2): 47-52. doi: 10.4038/sljid.v2i2.4070
4. Slide culture/Fungal identification/Fungal culture/Microbiology/Dermatophytes/STAR LABORATORY: <https://www.youtube.com/watch?v=wcNnfW5eI1o>
5. Slide Culture Technique for Fungi – Amrita University: <https://www.youtube.com/watch?v=FcW5tHrbAos>
6. Mycology Online. The University of Adelaide. Slide Culture Preparations: <https://mycology.adelaide.edu.au/laboratory/slide/>
7. McClenny N. Laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic observation and culture: the traditional approach. Medical Mycology. 2005; 3, (Suppl. 1): S125-S128. doi: 10.1080/13693780500052222
8. Жоля Я.С., Волонцевича А.М. Особенности микроморфологии развития культур микромицетов *Aspergillus niger* и *A. candidus* на агаровых блоках. Мечниковские чтения-2019. Материалы Всероссийской научно-практической студенческой конференции с международным участием / Под редакцией А.В. Силина, С.В. Костюкевича. 2019: 226-227. [Zholya Ya.S., Volontsevicha A.M. Features of micro-morphology development of the cultures of *Aspergillus niger* and *A. candidus* micromycetes on agar blocks. Mechnikov readings-2019. Materials of the all-Russian scientific and practical student conference with international participation / Edited by A.V. Silin, S. V. Kostyukevich. 2019: 226-227 (In Russ)].
9. Vasilyeva N., Riabinin I., Jolya Y., et al. The similarities and differences of *Aspergillus* and *Penicillium* strains detected by MALDI-TOF mass spectrometry of the hyphal extracts. ESCMID eLibrary. ECCMID 2019. P2204: https://www.escmid.org/escmid_publications/escmid_elibrary/?q=Jolya&id=2173&L=0&x=17&y=19
10. Михайлова Ю.В., Лавникевич Д.М., Чилина Г.А. и др. Молекулярная идентификация клинических изолятов *Aspergillus* и *Zygomycetes* из Санкт-Петербурга. Успехи медицинской микологии. 2013; 11: 37-39. [Mikhaylova Y.V., Lavnikovich D.M., Chilina G.A., et al. Molecular identification of clinical isolates of *Aspergillus* and *Zygomycetes* from Saint Petersburg. Advances in medical Mycology. 2013; 11: 37-39. (In Russ)].
11. Лунина С.С., Рябинин И.А. Микроархитектоника колонии штамма-аллергопродуцента *Penicillium* sp. секции *asymmetrica velutina* в прямом и отраженном свете. Синергия наук. 2018; 19: 930-941. [Lunina S.S., Ryabinin I.A. Microarchitectonics of the colony of the allergoproduct strain *Penicillium* sp. *asymmetrica velutina* sections in direct and reflected light. Synergy of Sciences. 2018; 19: 930-941 (In Russ)].
12. Васильева Н.В., Елинов Н.П., Богомолова Т.С. и др. Методические рекомендации «Микологические культуральные исследования». СПб.: СЗГМУ им. И.И. Мечникова. 2013: 50 с. [Vasil'yeva N.V., Yelinov N.P., Bogomolova T.S., et al. Methodological recommendations "Mycological cultural research". SPb.: Northwestern state medical University them. I. I. Mechnikov. 2013. 50 pp. (in Russ)].
13. Васильев О.Д., Рябинин И.А. Действие микробных метаболитов на морфологию *Scopulariopsis brevicaulis*. Проблемы медицинской микологии. 2010; 12 (2): 70 [Vasiliev O.D., Ryabinin I.A. Action of microbial metabolites on the morphology of *Scopulariopsis brevicaulis*. Problems in Medical Mycology. 2010; 12 (2): 70 (In Russ)].
14. Рябинин И.А., Васильев О.Д., Анисимов А.П. Изменение морфологии мицелиальных грибов на среде с лигнином. Проблемы медицинской микологии. 2011; 13 (2): 105 [Ryabinin I.A., Vasiliev O.D., Anisimov A.P. Changes in the morphology of mycelial fungi on a medium with lignin. Problems in Medical Mycology. 2011; 13 (2): 105 (In Russ)].

Поступила в редакцию журнала 04.12.2020

Рецензент: Т.С. Богомолова

СКРИНИНГ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ШТАММОВ *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *LACTIS* ДЛЯ СОЗДАНИЯ НЕТОКСИЧНЫХ АНТИМИКОТИКОВ

Стоянова Л.Г. (в.н.с.), Сорокина Е.В. (н.с.)*, Дбар С. Д. (аспирант)

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (кафедра микробиологии), Москва, Россия

Из молока, молочных продуктов различных климатических регионов методом «реплик» были выделены штаммы *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* с фунгицидной активностью, что является малоизвестным свойством для лактококков этого подвида. Сравнивали антимикотическую активность природных штаммов, изолированных из молока и национального лечебно-профилактического напитка Курунга, с музейным низинообразующим штаммом МГУ и рекомбинантным штаммом, полученным слиянием протопластов. Определяли накопление молочной кислоты, способность к синтезу антимикробных метаболитов, обладающих фунгицидным действием. Установлено, что фунгицидная активность лактококков штаммоспецифична, степень ингибирования роста разных групп микромицетов не одинакова. Уровень активности оценивали по росту культур в жидкой ферментационной среде после обработки лактококков ацетон-уксусной смесью (в лизатах) и рассчитывали по подавлению роста 4-х тест-культур микромицетов (грибы и дрожжи) с пересчетом на активность стандартных растворов препарата нистатина. Активность состоит из фунгицидного действия молочной кислоты и антимикробных метаболитов, локализованных в клетке. Методом бактериальной люминесценции на основе биотеста «Эколюм-06» установлена нетоксичность штаммов и их метаболитов.

Показана возможность создания антимикотиков на основе перспективных штаммов *L. lactis* subsp. *lactis*, эффективных против конкретных грибов, колонизирующих продукты питания, и *Candida albicans* на уровне биотопов в организме человека, что поможет в лечении ряда микозов.

Ключевые слова: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, молочная кислота, антимикотики, токсичность, нистатин

SCREENING FOR PROSPECTIVE STRAINS *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *LACTIS* FOR THE CREATION OF NON-TOXIC ANTIMICOTICS

* Контактное лицо: Сорокина Елена Владимировна, e-mail: evsorokina77@mail.ru

Stoyanova L.G. (leading scientific researcher), Sorokina E.V. (scientific researcher), Dbar S. D. (postgraduate student)

Lomonosov Moscow State University (Department of Microbiology), Moscow, Russia

Lactococcus lactis subsp. *lactis* strains with fungicidal activity were isolated from milk and dairy products of various climatic regions by the method of "replicas", which is a little-known property for lactococci of this subspecies.

We compared the antimycotic activity of natural strains isolated from milk and the national therapeutic and prophylactic drink Kurunga, a museum low-forming strain of Moscow State University and a recombinant strain obtained by fusion of protoplasts. The accumulation of lactic acid and the ability to synthesize antimicrobial metabolites with a fungicidal effect were determined. It has been established that the fungicidal activity of lactococci is strain-specific, the degree of growth inhibition of different groups of micromycetes is not the same. The activity level was assessed by the growth of cultures in a liquid fermentation medium after treatment of lactococci with an acetone-vinegar mixture (in lysates) and calculated by suppressing the growth of 4 test cultures of micromycetes (fungi and yeast) based on the activity of standard solutions of nystatin. The activity consists of the fungicidal action of lactic acid and antimicrobial metabolites localized in the cell. The non-toxicity of strains and their metabolites was established by the method of bacterial luminescence based on the "Ecolum-06" biotest.

The possibility of creating antimycotics based on promising strains of *L. lactis* subsp. *lactis*, effective products against specific fungi that colonize food, and *Candida albicans* at the biotope level in the human body, which will help in the treatment of a number of mycoses.

Key words: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, lactic acid, antimycotics, toxicity, nystatin

Порча продуктов питания микромицетами является основной причиной для беспокойства производителей продовольствия, поскольку представляет особую опасность для здоровья человека вследствие образования токсинов. Молочнокислое брожение стало известно людям на заре развития цивилизации как способ консервирования и создания продуктов лечебного назначения. Все виды кисломолочных продуктов являются в той или иной мере способом консервирования ценного пищевого сырья, такого как молоко, их издавна широко использовали не только как провиант, но и как лечебно-профилактические и лечебные средства при заболеваниях сердечно-сосудистой системы, органов дыхания, желудочно-кишечного тракта и т.д. [1]. Помимо этого, молочнокислые бактерии составляют основу симбионтной микробиоты желудочно-кишечного тракта и слизистых оболочек человека [2].

Применение молочнокислых бактерий (МКБ) в решении проблемы порчи продуктов питания и кор-

мов плесневыми грибами – перспективное направление исследований.

Молочнокислые бактерии *L. lactis* subsp. *lactis* – продуценты природного консерванта низина, известного под торговой маркой «Nisaplin» («Aplin & Barrett Ltd», Англия), а в последнее время – под торговой маркой «Krisin» («Christian Hansen», Дания), разрешенного для применения в продуктах как пищевая добавка Е-234 [3]. Препараты обеих компаний – это высушенные культуры, нормализованные солью и молочной сывороткой, содержащие 2,5% активного компонента (бактериоцина низина А) с активностью 1000 МЕ/мг (МЕ – международная единица). Однако низин, как и его продуцент, подавляют только грамположительные бактерии и неэффективны против грибов. По этой причине лактококки можно рассматривать как потенциальные продуценты различных антимикробных препаратов с более широким спектром действия, чем низин. В свете повышенной устойчивости патогенов к антибиотикам и химическим препаратам пробиотики могут служить как альтернативное антимикробное средство для предотвращения заражения патогенами [4]. В настоящее время особый интерес вызывают способы направленного синтеза антибиотических веществ лактококками с целью получения новых (с более ценными свойствами) для использования в качестве натуральных консервантов пищевых продуктов. В перспективе ряд мер, направленных на уменьшение применения консервантов химической природы и антибиотиков, и увеличение сроков годности приведут к появлению новых высококачественных пищевых продуктов с пониженным содержанием солей и консервантов, а также с пониженной кислотностью.

Основные трудности, связанные с созданием нетоксичных антимикотиков, вызваны в основном отсутствием методов скрининга, отдельных продуцентов, поскольку многие молочнокислые бактерии синтезируют несколько активных соединений, и, вероятно, между ними существует синергидный эффект.

Усовершенствование методологии выделения и идентификации противогрибковых соединений к настоящему моменту привели к увеличению количества публикаций, связанных с выделением новых штаммов, продуцирующих фунгицидные метаболиты. Однако эти работы большей частью проводят на *Lactobacillus* sp. [3], что свидетельствует о том, что обнаружение способности к синтезу фунгицидов у *L. lactis* subsp. *lactis* является редким и неизученным свойством.

Преимущество лактококков состоит в том, что этот подвид растет при 28 °С в стационарных условиях. Этот факультативный анаэроб с высокой скоростью роста является основной употребляемых

продуктов и адаптированной к желудочно-кишечному тракту бактерий.

Цель исследования – выделение и идентификация штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, перспективного для создания нетоксичных антимикотиков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования – микробиота кисломолочных продуктов, изготовленных в Московском регионе и привезенных из Бурятии, экологически чистой зоны озера Байкал. В работе использовали сырое необработанное коровье молоко, полученное с молочных ферм Сельскохозяйственной академии им. К.А. Тимирязева (ТСХА) Москвы и Бурятского района (Россия), а также бурятский национальный лечебно-профилактический молочнокислый продукт «Курунга». Пробирки с исследуемыми образцами продуктов вносили в стерильный обрат, оставляли для самоферментации при 28 °С в стационарных условиях на 17 часов. Затем бактерии из пробирок, в которых образовался плотный молочный сгусток, повторно пассировали в обрат и культивировали в течение 10-17 ч для дифференциации характерных гомоферментативных лактококков из микробиоты исследуемых продуктов. Учет количества лактококков облегчается при добавлении в среду инкубирования 0,01%-ного раствора индикатора бромкрезолового пурпурного, поскольку при глубинном инкубировании кислотообразующие бактерии образуют зону обесцвечивания среды (из фиолетовой в желтую) вокруг колоний.

Морфологию колоний изучали по общепринятым методикам: с помощью микрокопирования и в световом микроскопе МБИ (Россия) – 15 с фазово-контрастным конденсором КФ-4, а также в электронном сканирующем микроскопе («Can Scan» фирмы «Greshman», UK). При микрокопировании в световом микроскопе МБИ готовили фиксированные окрашенные препараты, в качестве красителя использовали спиртовой раствор метиленового синего.

Из сбереженного в обрат сгустка микробиологической петлей лактококки пересекали в агаровую среду, приготовленную на основе гидролизата молока с индикатором бромкрезоловым [5], переносили медом реплик на среду Сабуро, предварительно засеянную тест-культурами микромицетов.

В работе использовали штаммы лактококков разного происхождения, а именно: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* штамм К-205 – мезофильный лактококк, выделенный из национального молочнокислого продукта «Курунга»; GenBank EF 114305; *L. lactis* subsp. *lactis* штамм 194, изолированный из коровьего молока (Бурятия); GenBank DQ 255954; *L. lactis* subsp. *lactis* штамм МГУ – низин-продуцирующий штамм, который по биологическим и физико-химическим свойствам идентичен продуценту коммерческого

препарата «Nisaplin» фирмы «Aplin & Barrett, Ltd» (Англия), содержащему в своем составе 2,5% чистого низина А; *L. lactis* subsp. *lactis* штамм 729 – природный штамм, выделенный из молока, произведенного в Московском регионе, низкоактивный по синтезу низина; GenBank EF 102814; *L. lactis* subsp. *lactis* штамм F-116 – рекомбинантный штамм с высоким уровнем низин-синтезирующей активности, полученный путем слияния протопластов двух родственных низкоактивных штаммов 729 и его мутанта 1605, произведенного комбинированным воздействием УФ-лучей и нитрозозтилмочевины; GenBank EF 100777 [6].

Вышеуказанные штаммы как наиболее перспективные по синтезу антимикробных метаболитов, идентифицированные по свойствам и гену 16S РНК как *L. lactis* subsp. *Lactis*, были депонированы в GenBank.

Для получения обратного сырое молоко без консервантов центрифугировали при 3000 об/мин в течение 20 минут, снимали жировой компонент и стерилизовали при 0,5 ати 15 мин. Далее проводили культивирование штаммов *L. lactis* subsp. *lactis* при 30 °С в термостате в течение 24 часов в стационарных условиях. Затем из образовавшегося плотного молочного сгустка отбирали стерильными пипетками его часть в пробирку с посевной средой, приготовленной на водопроводной воде с дрожжевым экстрактом (20 г/л) и глюкозой (10 г/л); рН среды доводили до 6,8-7,0 с помощью 20%-ного раствора NaOH и также проводили культивирование при 30 °С в термостате в течение 24 часов в стационарных условиях.

После этого инокулят (OD_{540} 0,14-0,19) вносили в количестве 5 об. % в ферментационную (биосинтетическую) среду, содержащую (г/л): KH_2PO_4 – 20,0; глюкоза – 10,0; NaCl – 1,0; $MgSO_4$ – 0,2 и автолизат дрожжей – 10, рН – 6,8-7,0; инкубировали при 28 °С в течение 18-24 часов.

Физиологические и биохимические свойства штаммов, проявивших наиболее выраженную антимикробную активность, оценивали в соответствии с ферментацией углеводов, потребностью в факторах роста, уровнем антимикробной активности и диапазоном антимикробной активности. Культуральные свойства выделенных штаммов исследовали классическими микробиологическими и молекулярно-генетическими методами идентификации культуры [6].

Уровень фунгицидной активности устанавливали методом диффузии в агар с измерением зон подавления роста тест-культуры в мм. В качестве стандарта на микромицеты использовали растворы 100, 50, 40 ед/мл коммерческого препарата нистатин (Nistatine фирмы *Sigma*) с активностью 4670 ед/мг.

Изучение динамики роста штаммов проводили в жидкой ферментационной среде в течение 24 ч с ин-

тервалом 3 ч. В каждой точке отбирали пробу, измеряли оптическую плотность на ФЭКе ($\lambda=590$, $l=1,0$ см) с последующим пересчетом на количество клеток в 1 мл, рН и уровень антимикотической активности. Индикаторными культурами служили три штамма микроскопических грибов: *Aspergillus niger* 369, *Penicillium chrysogenum* 32, *Fusarium oxysporum* 9 и штамм дрожжей – *Candida albicans* INA 00763. Тест-культуры получены из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Микромицеты выращивали на среде Сабуро в (г/л): глюкоза – 40,0; пептон – 10,0; агар – 20,0; левомицетин – 0,002. Экстракцию антимикотика из культуральной жидкости лактококков осуществляли смесью: «ацетон: уксусная кислота: вода CH_3COCH_3 : CH_3COOH : H_2O в соотношении (4:1:5)» при 55 °С в течение 90 мин. Лизаты разводили фосфатным буфером (рН – 5,5) в соотношении 1:10 и вносили в лунки на агаровой среде с тест-организмом, затем культивировали в течение 24-48 часов. Экстракция позволяла учитывать экзо- и эндометаболиты. Количественное определение антимикотической активности выполняли по измерению зон подавления роста тест-культур с дальнейшим пересчетом по калибровочной кривой стандартных растворов антибиотиков. Величина зоны отсутствия роста указывала на степень активности данного антибиотика в отношении исследуемой тест-культуры и зависела от его концентрации и химической природы. Антимикотическую активность измеряли как в культуральной жидкости лактококков, так и в лизатах после обработки клеточной стенки лактококков экстрагирующей смесью для извлечения всех метаболитов, образующихся в процессе молочнокислого брожения. Такой же обработке подвергали и стандартный препарат нистатин.

Определение количества молочной кислоты выполняли в культуральной жидкости с параоксидифенилом по Баркеру и Саммерсонух [7].

Принцип метода: из молочной кислоты в присутствии серной кислоты и солей меди образуется уксусный альдегид, который, реагируя с параоксидифенилом, дает фиолетовую окраску.

Для этого определения лактококки выращивали в течение 17 ч в ферментационной среде вышеуказанного состава. Для расчета молочной кислоты в культуральной жидкости строили калибровочный график, использовали различные концентрации молочной кислоты: 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 мкг/мл. Определение проводили аналогично исследуемым пробам. На основании полученных данных строили калибровочный график, откладывая на оси абсцисс концентрацию молочной кислоты, а на оси ординат – оптическую плотность. По нему устанавливали содержание молочной кислоты в исследуе-

мых образцах. Полученные экстракты колориметрировали на ФЭЖе при λ 670, $l=0,5$ см против раствора сравнения, как описано ранее [8].

Токсичность штаммов и синтезируемых антимикотиков выявляли методом бактериальной люминесценции. При оценке токсичности штаммов в каждую контрольную и опытную кюветы типа Эппендорфа объемом 1,5 мл наливали 0,1 мл суспензии биосенсора. В контрольную кювету добавляли 0,9 мл дистиллированной воды, в опытную кювету – 0,9 мл водного экстракта молочнокислых бактерий, используя в пробе биосенсор $7,6 \cdot 10^7$ клеток на мл генно-инженерный штамм *Escherichia coli* K12 TG1 с созданным светящимся фенотипом, обеспеченным встроенным lux-опероном морских светящихся бактерий *Photobacterium leiognathi* 54D10. Полученный штамм хранится на кафедре микробиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова и известен как биосенсор тест-системы «Эколюм-06». Интенсивность свечения (имп/сек) биотеста контрольного и опытного образцов регистрировали одновременно через 5, 15 и 30 минут с помощью люминометра при температуре 25 °С. Индекс токсичности (Т) образцов устанавливали по программе люминометра по формуле: $T=100 \cdot (I_k - I) / I_k$, где I_k – интенсивность свечения контроля, I – интенсивность свечения опыта. Оценку токсичности исследуемых образцов классифицировали по трем группам значений индекса токсичности: $T < 20$ – образец нетоксичен; $T > 20$, но < 50 – образец токсичен; $T > 50$ – образец очень токсичен [9]. При наблюдении стимуляции свечения тест-организма, т.е. значение Т с отрицательным знаком, образец был нетоксичен. Анализировали не менее 3 проб одного образца, рассчитывая индекс токсичности.

Статистическую обработку всех результатов проводили с помощью программы Excel Microsoft Office, данные представляли, как среднее \pm стандартная ошибка среднего; статистическую значимость различий определяли по общепринятой методике с использованием t-критерия Стьюдента. Достоверность различий соответствовала $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Один из первых и важных этапов в поиске и выборе перспективного для использования в пищевой промышленности и медицине штамма – определение его таксономической принадлежности, так как правильная идентификация на видовом уровне позволяет исследователю заранее иметь понятие о безопасности, происхождении, среде обитания и физиологических характеристиках выделенного микроорганизма.

Курунга представляет собой жидкий пенящийся продукт молочно-белого цвета с мелкими хлопьями казеина, с кисловатым запахом и вкусом. Его полу-

чают путем сбраживания коровьего молока культурами молочнокислых бактерий и молочных дрожжей. В результате жизнедеятельности микроорганизмов происходит превращение молочного сахара в молочную кислоту, спирт и углекислый газ, что свидетельствует о том, что курунга является продуктом двух брожений – молочнокислого и спиртового. Микробный состав курунги, как правило, состоит из двух видов местной расы молочнокислых бактерий – вида *Lactobacillus casei*, а также молочнокислых стрептококков и бифидобактерий. Курунга не является механической смесью различных элементов микробиоты, она представляет собой типичное явление симбиоза: дрожжи для своего развития нуждаются в продуктах жизнедеятельности молочнокислых бактерий и в образуемой ими молочной кислоте, а молочнокислые бактерии в присутствии дрожжей лучше развиваются и дольше сохраняют свою активность. Эти симбиотические отношения в курунге сохраняются в течение долгого времени, без подавления ни одного из составных элементов микробной композиции другими. Состав молочнокислых бактерий ее микробиоты отличается большим разнообразием. В поле зрения электронного микроскопа (Рис. 1.) видны лактококки, лактобациллы, бифидобактерии и молочные дрожжи.

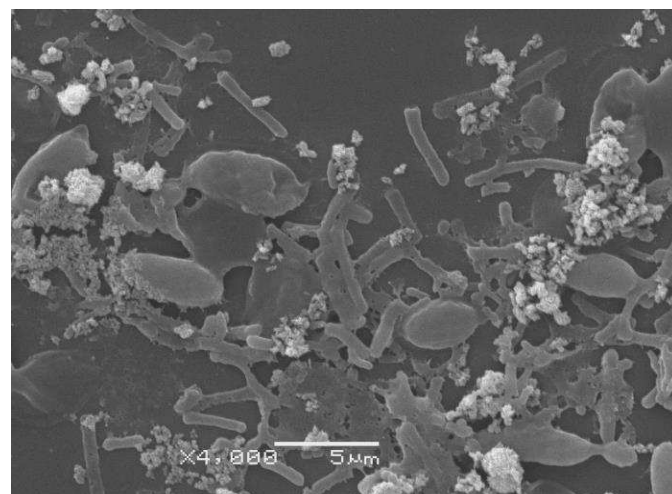


Рис. 1. Микробный состав курунги в электронном сканирующем микроскопе «Can Scan» фирмы «Greshman», UK: увеличение 1x 2500.

Для выделения из молочных продуктов мезофильных лактококков, обладающих фунгицидной активностью, применяли метод «реплик». Данные представлены на рисунке 2, где видны зоны подавления роста микромицетов по месту укола репликатора. В качестве индикаторной культуры использовали дрожжи *Candida albicans* INA 00763. Отбирали клоны с максимальной зоной ингибирования роста микромицетов.



Рис. 2. Выделение колоний с фунгицидной активностью методом «реплик» (тест-культура *C. albicans*).

Из курунги был выделен штамм К-205 *L. lactis* subsp. *lactis* с высоким уровнем фунгицидной активности (Рис. 3.).



Рис. 3. Штамм К-205 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* на твердой ферментационной среде.

По форме клеток молочнокислые бактерии представляют собой кокки сферической или эллипсоидной формы. Бактерии рода *Lactococcus* – круглые или слегка овальные клетки, расположенные единично, парами или цепочками. Типичного представителя этого рода – *L. lactis* subsp. *lactis* некоторые считают палочковидной формой, поскольку его клетки больше в длину, чем в ширину, а в сбереженном молочном сгустке преобладают сочетания в виде диплококков (Рис. 4.).

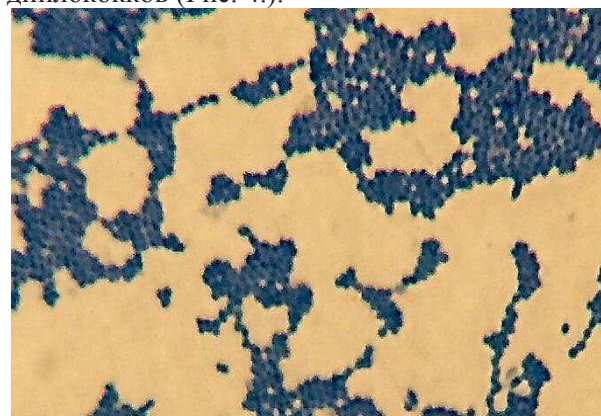


Рис. 4. Вид *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* в поле зрения светового микроскопа (1х 100). Окраска по метиленовому синему. Увеличение (X100).

При компьютерной обработке результатов секвенирования генов 16S рРНК и сравнительном анализе полученных нами последовательностей изучаемых штаммов с последовательностями тех же генов вышеуказанных типовых штаммов между ними обнаружили большое сходство. Все штаммы проявляли высокую степень гомологии ДНК (на уровне 98,9-100%) по отношению к референтным штаммам *L. lactis* subsp. *lactis*. Высокий уровень гомологии выявлен между штаммами, изолированными в Бурятии (99,6%), а сходство их со штаммами, выделенными из молока московского региона, было меньше (98,9%).

Рост и развитие *L. lactis* subsp. *lactis* в базовой ферментационной среде с глюкозой представлены в таблице 1.

Таблица 1

Изучение динамики роста штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* базовой ферментационной среде (P ≤ 0,05)

Штаммы	Время культивирования, ч								
	0	3	6	9	12	15	18	21	24
	Оптическая плотность (ОП ₅₄₀), нм								
Шт.МГУ	0,451	0,967	1,32	1,56	1,57	1,54	1,53	1,55	1,52
F-116	0,538	0,939	1,702	1,759	1,601	1,653	1,716	1,604	1,787
К-205	0,439	1,145	1,529	1,659	1,630	1,643	1,666	1,518	1,730
194	0,557	0,968	0,883	1,091	1,299	1,421	1,531	1,498	1,400
729	0,419	1,245	1,729	1,769	1,630	1,623	1,606	1,518	1,730

Этот процесс развития сопровождается снижением рН, что коррелирует с накоплением молочной кислоты как основного метаболита и увеличением фунгицидной активности после экспоненциальной фазы роста (табл. 2).

Молочная кислота как основной продукт сбраживания углеводов при развитии гомоферментативных лактов является причиной снижения рН среды и вызывает ингибирование роста многих микроорганизмов, включая плесневые грибы и дрожжи, вследствие взаимодействия с клеточной мембраной клетки-мишени, нейтрализуя её электрохимический протонный градиент [10].

Таблица 2

Динамика изменения рН при культивировании штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* в базовой ферментационной среде и накопление молочной кислоты (P ≤ 0,05)

Штамм/ часы	0	3	6	9	12	15	17	21	24	Молочная к-та
Шт. МГУ	6,8	6,8	5,0	4,8	4,3	4,2	4,2	4,2	4,1	8,867
F-116	7,0	6,8	5,0	5,0	4,2	4,2	4,1	4,2	4,2	8,089
К-205	7,0	6,8	5,0	5,0	4,15	4,15	4,15	4,2	4,2	9,956
194	7,0	6,8	4,8	4,3	4,1	4,1	4,15	4,15	4,1	14,467
729	7,0	6,0	4,5	4,2	4,2	4,2	4,1	4,1	4,1	16,489

В результате эксперимента по определению молочной кислоты выявили, что наибольшее количество молочной кислоты выделял *L. lactis* subsp. *lactis*

штамм 729, и это подтверждает его свойство как сильного кислотообразователя.

Установлено, что за 24 ч инкубирования в среде с глюкозой он синтезировал до 0,82% молочной кислоты, в то время как другие штаммы накапливали 0,45-0,62% лактата при тех же условиях. Количество образуемой молочной кислоты штаммом 729 превышало в 0,8-1,8 раза по сравнению с количеством, синтезируемым низинообразующим штаммом МГУ и рекомбинантным штаммом, но значение было близко к уровню накопления кислоты штаммом 194.

Исследуемые штаммы молочнокислых бактерий оценили на их биотоксичность с помощью биотеста «Эколюм-06». Методики измерений интегральной токсичности лекарственных препаратов и новых химических соединений с помощью тест-системы «Эколюм -06» имеют свидетельство о метрологической аттестации (4/7-93), зарегистрированы в Департаменте Госсанэпиднадзора РФ (№№ 11-1/131-09, 11-1/132-09, 11-1/133-09, 11-1/134-09) и Госкомэкологии – сертификат Госстандарта России № 01.19.231/2001. Они внедрены на территории РФ в органах санитарно-эпидемиологического надзора и ориентированы на использование реактивов и оборудования отечественного производства [11].

Результаты оценки токсичности исследуемых штаммов представлены в таблице 3.

Таблица 3

Оценка интенсивности свечения и индекса токсичности за 30 мин исследования с биотестом «Эколюм-06»

МО / штаммы	Интенсивность свечения биотеста «Эколюм-06»	Индекс токсичности к 30 мин
Контроль	1067	0
729	1377	-29
1605	1291	-21
F-116	1344	-26
194	1152	-8
K-205	1206	-13

Происходила стимуляция свечения клеток биотеста «Эколюм-06» относительно контроля, и, следовательно, токсичность была с отрицательным знаком, указывая на безопасность исследуемых штаммов.

По характеру стимуляции свечения биотеста с возрастанием времени биотестирования (5, 15, 30 мин) индекс токсичности практически не менялся [9]; наблюдали стимуляцию свечения бактериального биосенсора (табл. 2).

Стимуляция интенсивности люминесценции у светящихся бактерий при действии многих веществ в низких концентрациях отмечена ранее многими авторами. При этом в рекомендациях к анализам при биотестировании на основе бактериальной люминесценции предлагают делать вывод об отсутствии токсичности исследуемых образцов [12]. Однако при действии веществ, приводящем к значительному

стимулированию интенсивности свечения бактериального биотеста, стимуляция функционирования их люминесцентной системы может быть связана с конкуренцией дыхательной системы клеток биотеста за восстановленный флаavin. Вследствие этого происходит подавление транспорта электронов в дыхательной цепи соответственно, поток электронов в этой цепи снижается, эквивалентно возрастая в цепи люминесцентной системы. В результате интенсивность биолюминесценции повышается, а регистрируемый в этот момент Т приобретает отрицательное значение. Следует отметить известное понятие гормезиса, когда различные вещества в малой концентрации, действуя на некоторые функции организма, вызывают их стимуляцию [11].

Изучая спектр фунгицидной активности установили, что штамм МГУ как музейный низинпродуцирующий не имел фунгицидной активности, что подтверждает отсутствие ингибирующего действия низина на грибы.

Отобранные другие штаммы F-116, K-205, 729 и 194 обладали фунгицидной активностью на микромицеты при культивировании в базовой среде штаммов и были активны против всех четырех тест-культур. Однако наибольшую активность лактококки проявляли против *C. albicans*, хотя отличались по степени воздействия (рассчитана по зоне ингибирования роста индикаторной культуры в пересчете по калибровочной кривой по нистатину). Так, активность штамма 194 составила 36,21 ед/мл; штамма F-116 – 29,75 ед/мл; K-205 – 28,71 ед/мл и штамма 729 – 16,14 ед/мл (Рис. 5).

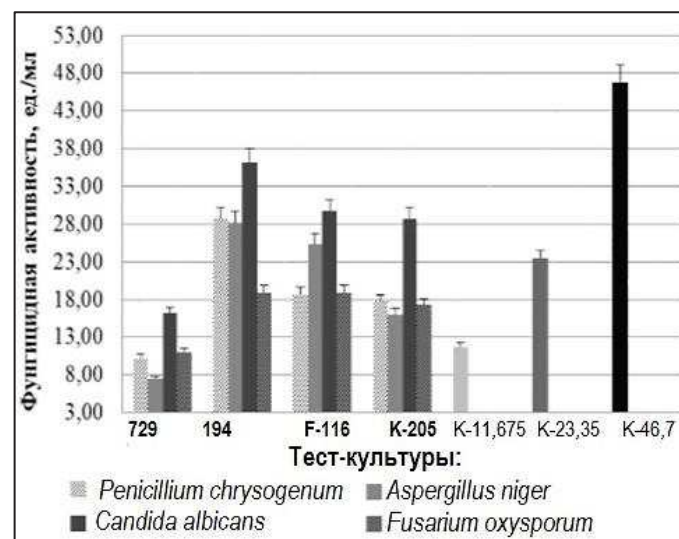


Рис. 5. Фунгицидная активность штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* к микромицетам.

Особый интерес представлял штамм 194, выделенный из свежего коровьего молока из Бурятии, который, как описано ранее [13], ингибировал рост грамположительных и грамотрицательных бактерий за счет образования антибиотического комплекса,

состоящего из 2-х бактериоцинов (низина А и пептида, не содержащего лантионин, гидрофобной природы).

Наименее активным на *P. chrysogenum* был штамм К-205, выделенный из курунги, с активностью 171,20 ед/мл, однако штамм К-205 был активным на *A. niger* (518,01 ед/мл). На дрожжи *Candida* высокий уровень фунгицидной активности был выявлен у штамма 194.

По результатам исследования наибольшей фунгицидной активностью обладал штамм 194 при культивировании в жидкой ферментационной среде (Рис. 6.).

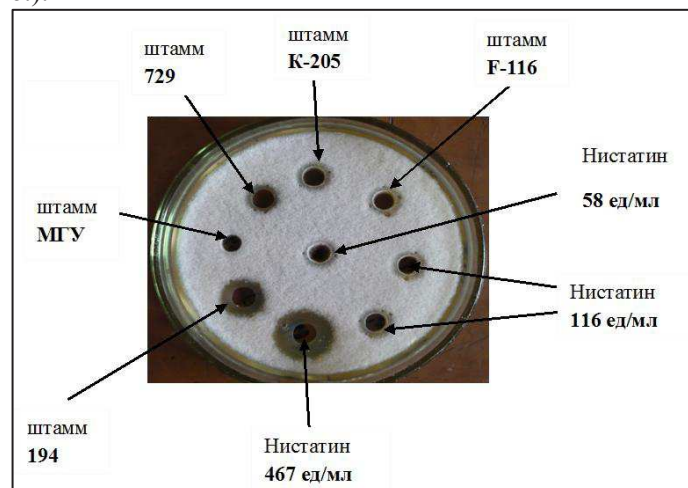


Рис. 6. Фунгицидная активность суспензии штаммов *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* в ферментационной среде после 20 часов культивирования. Тест-организм *Candida albicans*, контроль – нистатин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из молока, молочных продуктов и продуктов функционального питания различных климатических регионов методом «реплик» были выделены новые нетоксичные штаммы лактококков с малоизвестным

свойством к синтезу метаболитов с фунгицидной активностью. Показана возможность создания антимикотиков на основе перспективных штаммов *L. lactis* subsp. *lactis*, эффективных против микромицетов, колонизирующих продукты питания, и кандидозов, обусловленных *Candida albicans*, на уровне биотопов в организме человека, что поможет в лечении ряда заболеваний, вызванных грибами. Порча пищевых продуктов под действием плесневых грибов является широко распространенным и глобальным явлением, и поиск эффективных способов ее предотвращения составляет проблему для многих исследовательских лабораторий. Потенциальное производство токсинов грибами представляет особую опасность для здоровья. Как упоминалось выше, *Lactococcus* spp., продуцирующие бактериоцины, обычно подавляют только грамположительные бактерии и не эффективны против грибов. В данном исследовании показано, что некоторые штаммы лактококков обладают способностью продуцировать антимикотические вещества, которые были определены как альдегиды или кетоны [7, 14]. Таким образом, новые штаммы *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* со статусом GRAS, обладающие фунгицидным действием, являются большим достижением в поиске новых эффективных и безопасных пищевых антимикотиков. Биотестирование на основе бактериальной люминесценции расширило возможности мониторинга объектов, позволило показать отсутствие токсичности изученных штаммов и их метаболитов. Следовательно, штаммы могут быть рекомендованы для применения в пищевой промышленности и в медицине, и тщательно продуманный выбор перспективных штаммов *L. lactis* subsp. *lactis* поможет в дальнейшем в создании новых природных антимикотиков, безопасных для здоровья.

ЛИТЕРАТУРА

1. De Almada C., Martinez R. Characterization of the intestinal microbiota and its interaction with probiotics and health impacts. Appl Microbiol. Biotechnol. Published online: 21 April .2015. doi.org/10.1007/s00253-015-6582-5
2. Олескин А.В., Шендеров Б.А. Пробиотики, психобиотики и метабиотики: проблемы и перспективы. Физическая и реабилитационная медицина, медицинская реабилитация. 2020; 2: 18-28. [Oleskin A.V., Shenderov B.A. Probiotics, psychobiotics and metabiotics: problems and prospects. Physical and rehabilitation medicine, medical rehabilitation. 2020; 2: 18-28 (In Russ)]. DOI: 10.36425/rehab25811
3. Стоянова Л.Г., Устюгова Е.А., Нетрусов А.И. Антимикробные метаболиты молочнокислых бактерий: разнообразие и свойства (обзор). Прикл. Биохим. Микробиол. 2012; 48 (3): 259-275. [Stoyanova L.G., Ustyugova E.A., Netrusov A.I. Antimicrobial metabolites of lactic acid bacteria: diversity and properties (review). Prikl. Biochem. Microbiol. 2012; 48 (3): 259-275 (In Russ)].
4. Svanström A., Boveri S., Boström E., et al. The lactic acid bacteria metabolite phenyllactic acid inhibits both radial growth and sporulation of filamentous fungi. BMC Research Notes, 2013; 6: 464-473. doi.org/10.1186/1756-0500-6-464
5. Quinto E.J., Jiménez P., Caro I., et al. Probiotic lactic acid bacteria: a review. Food and Nutrition Sciences. 2014; 5:1765-1775. doi.org/10.4236/fns.2014.518190
6. Стоянова Л.Г. Выделение и идентификация молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* subsp *lactis* с антимикробным действием. Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии 2017; 5: 41-617. [Stoyanova L.G. Isolation and identification of lactic acid bacteria *Lactococcus lactis* subsp *lactis* with antimicrobial action. Proceedings of the Timiryazev agricultural Academy 2017; 5: 41-617 (In Russ)].

7. Stoyanova L.G., Napalkova M.V., Netrusov A.I. The creating a new biopreservative based on fusant strain *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* F-116 for food quality and its safety. *Journal of Hygienic Engineering and Design*. 2016;16: 19-27.
8. Stoyanova L.G., Sul'timova T.D., Botina S.G., et al. Isolation and identification of new nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp *lactis* from milk. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2006; 42: 492-499. doi.org/10.1134/S0003683806050085
9. Zarubina A.P., Gapochka M.G., Novoselova L.A., et al. Effect of low intensity electromagnetic radiation on the toxicity of domestic wastewater tested with the eolum test system. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*. 2013; 68: 49-52. doi: 10.3103/S0096392512030108
10. Patrick O. Lactic acid bacteria in health and disease. *Rwanda J. of Health Sciens* (review). 2012; 1: 39-50.
11. Сорокина Е.В. Биотестирование с использованием бактериального люминесцентного теста: достоинства и усовершенствования метода. *Успехи современной биологии*, 2017; 137 (6): 613-620. [Sorokina E.V. Biotesting using bacterial luminescence test: advantages and improvements of the method. *Advances in modern biology*, 2017; 137 (6): 613-620 (In Russ)].
12. Zarubina A.P., Perfiliev Yu.D., Sorokina E.V., et al. Evaluation of the properties of potassium ferrate used for water purification by luminescence bioassay. *Moscow University biological sciences bulletin*. Allerton Press (New York, N.Y. United States). 2016; 71 (4): 226-230. doi: 10.3103/S0096392516040131.
13. Gerez C. L., Torres M. J., Font de Valdez G., et al. Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. *Biol Control*. 2013; 64: 231-237. doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.10.009
14. Устюгова Е.А., Федорова Г.Б., Стоянова Л.Г. и др. Изучение антибиотического комплекса, образуемого *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 194 - К. *Микробиол.* 2011; 80 (5): 644-650. [Ustyugova E.A., Fedorova G.B., Stoyanova L.G., et al. Study of the antibiotic complex formed by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 194-K. *Microbiol.* 2011; 80 (5): 644-650 (In Russ)].

Поступила в редакцию журнала 10.12.2020

Рецензент: Е.И. Ермоленко

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *SALMONELLA*, УСТОЙЧИВЫХ К ЦЕФАЛОСПОРИНАМ РАСШИРЕННОГО СПЕКТРА

¹Егорова С.А. (с.н.с.)*, ^{1,2}Кафтырева Л.А. (зав. лаб., профессор кафедры), ³Казановская Н.С. (зав. лаб.)

¹ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург; ² Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург; ³ Центр гигиены и эпидемиологии в Иркутской области, Иркутск, Россия

В статье представлена фенотипическая и молекулярная характеристика штаммов *Salmonella*, устойчивых к цефалоспорином расширенного спектра, выделенных в Российской Федерации. В последние годы в Санкт-Петербурге отмечен рост доли таких штаммов с 0,4% (2002-2005 гг.) до 1,6% (2014-2019 гг.). Устойчивые штаммы (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Abony*, *S. Coeln*, *S. Virchow*, *S. Newport*) продуцировали бета-лактамазы расширенного спектра молекулярного класса А генетического семейства CTX-M (групп CTX-M1, -2 и -9), а также AmpC-цефалоспориноазы CMY-2 (*S. Enteritidis*, *S. Newport*). Профиль устойчивости к отдельным бета-лактамам был обусловлен субстратной специфичностью и генетически семейством продуцируемой бета-лактамазы. Штаммы *Salmonella*, устойчивые к цефалоспорином расширенного спектра, характеризовались множественной устойчивостью к другим классам антибиотиков (фторхинолонам, аминогликозидам, тетрациклину, хлорамфениколу, триметоприм/сульфаметоксазолу). Высокую активность в отношении таких штаммов сохраняли цефтазидим/авибактам, карбапенемы, колистин и тигециклин.

Ключевые слова: *Salmonella*, резистентность к антимикробным препаратам, бета-лактамы, БЛРС, AmpC-цефалоспориноаза

PHENOTYPIC AND MOLECULAR CHARACTERISTICS OF *SALMONELLA* STRAINS RESISTANT TO EXTENDED-SPECTRUM CEPHALOSPORINS

¹Egorova S.A. (senior scientific researcher), ^{1,2}Kafytyreva L.A. (head of the laboratory, professor of the department), ³Kazanovskaya N.S. (head of the laboratory)

* Контактное лицо: Егорова Светлана Александровна, e-mail: egorova72@mail.ru

¹Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg; ²North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg; ³Center of Hygiene and Epidemiology in the Irkutsk region, Irkutsk, Russia

The study includes the phenotypic and molecular characteristics of *Salmonella* resistant to extended-spectrum cephalosporins isolated in Russian Federation. In recent years, the proportion of cephalosporin resistant strains in St. Petersburg has increased from 0,4% (in 2002-2005) to 1,6% (in 2014-2019). Resistant *Salmonella* (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Abony*, *S. Coeln*, *S. Virchow*, *S. Newport*) produced extended-spectrum beta-lactamases of CTX-M genetic family (CTX-M1, -2, and -9 groups), as well as CMY-2 AmpC cephalosporinases (*S. Enteritidis*, *S. Newport*). The profile of resistance to individual beta-lactams was determined by the substrate specificity and genetic family of the beta-lactamase. *Salmonella* resistant to extended-spectrum cephalosporins had multi drug resistance to other antimicrobials (fluoroquinolones, aminoglycosides, tetracycline, chloramphenicol, trimethoprim / sulfamethoxazole). Ceftazidim / avibactam, carbapenems, colistin and tigecycline were highly active against these strains.

Key words: *Salmonella*, antimicrobial resistance, beta-lactams, ESBL, AmpC-cephalosporinase

ВВЕДЕНИЕ

Цефалоспорины расширенного спектра (ЦРС) используют для лечения сальмонеллезной инфекции при тяжелом течении, генерализованных, внекишечных формах, у детей до 2 лет и пациентов с тяжелыми сопутствующими состояниями [1-6]. Появление и распространение штаммов *Salmonella*, устойчивых к ЦРС, обусловлено использованием этого класса препаратов для лечения и профилактики инфекций у сельскохозяйственных животных и птиц, а также широким распространением и обменом мобильными генетическими элементами, содержащими гены, кодирующие различные бета-лактамазы, у штаммов энтеробактерий. Высокая частота такой резистентности характерна для определенных сероваров *Salmonella*: *S. Dublin* (в разных странах устойчивы более 60,0% штаммов данного серовара), *S. Heidelberg* (31,0%), *S. Kentucky* (17,1%), *S. Infantis* (от 2,6 до 6,9%), *Salmonella* 1,4,5,12:i:- (6,0%) [7-9]. В РФ доля штаммов *Salmonella*, устойчивых к ЦРС, составляла от 0 до 45,3% и была наиболее характерна для штаммов *S. Typhimurium* [10, 11].

Устойчивость к ЦРС у штаммов энтеробактерий обусловлена продукцией бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) молекулярного класса А, а также цефалоспориноаз молекулярного класса С (AmpC). Штаммы *Salmonella* различных сероваров, продуцирующие БЛРС генетических семейств CTX-M, TEM, SHV, OXA и цефалоспориноазу CMY-2, выделяют практически во всех странах Азии, Европы, Северной Америки и Африки от людей, сельскохозяйственных животных и из пищевых продуктов [10-16]. Несмотря на то, что карбапенемы не применяют

для лечения сальмонеллезных инфекций, у штаммов *Salmonella* обнаружены карбапенемазы, имеющие высокую клиническую значимость: KPC-2 (S. Cubana, S. Typhimurium и S. Schwarzengrund), OXA-48 (S. Typhimurium, S. Saintpaul, S. Kentucky, S. Paratyphi B), металло-бета-лактамазы IMP-4 (S. Waycross, S. Typhimurium), VIM-1,2 (S. Infantis, S. Kentucky ST198), NDM-1 (S. Senftenberg, S. Westhampton, S. Stanley, S. Agona, S. Indiana, S. Corvallis) и NDM-5 (S.1,4, [5], 12:i:) [17].

Определение чувствительности штаммов *Salmonella* к бета-лактамам не вызывает методических затруднений при использовании алгоритма EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), включающего скрининг «подозрительных» штаммов (тестирование индикаторных препаратов цефтазидима и цефотаксима) и дальнейшее подтверждение продукции БЛРС и цефалоспориноаз AmpC фенотипическими и молекулярными методами [18]. В то же время подходы к интерпретации полученных результатов различны. По данным EUCAST, используемые в настоящее время клинические пограничные значения позволяют выявить устойчивость к ЦРС у большинства штаммов энтеробактерий, продуцирующих БЛРС и AmpC, поэтому подтверждение продукции бета-лактамазы не влияет на категоризацию штамма и рекомендовано только в рамках инфекционного контроля. В отличие от EUCAST, в российских клинических рекомендациях «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» предложено выявлять продукцию БЛРС или AmpC и информировать врача о возможной нечувствительности штамма к цефалоспоринозам и азтреонаму, даже если этот штамм формально попадает в категорию «S – чувствительный» [19].

Цель исследования – выявление штаммов *Salmonella*, устойчивых к ЦРС, с использованием алгоритма EUCAST, и их фенотипическая и молекулярная характеристика.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучена чувствительность к бета-лактамам 746 штаммов *Salmonella*, выделенных от людей в 2014-2019 гг. в Санкт-Петербурге (S. Enteritidis – 79,6%, S. Typhimurium – 6,8%, S. Infantis – 3,8%, других сероваров – 9,8%). Видовую идентификацию проводили с помощью бактериологического анализатора Vitek 2 Compact (BioMérieux, Франция). Чувствительность штаммов *Salmonella* к антибиотикам выявляли согласно клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (2018 г.) методом градиентной диффузии (цефокситин, цефепим, азитромицин, тетрациклин, хлорамфеникол, нитрофурантин) с использованием агара Мюллера-Хинтон и полосок с антибиотиками производства Oxoid (Великобритания), а также мето-

дом последовательных разведений в жидкой среде (азтреонам, цефтазидим, цефотаксим, меропенем, амоксициллин/клавулановая кислота, цефтазидим/авибактам, цефтолазан/газобактам, колистин, тигециклин, гентамицин, амикацин, триметоприм/сульфаметоксазол, цiproфлоксацин) с применением тест-системы Sensititre (Thermo Scientific). Для отнесения штаммов к клинической категории чувствительности применяли критерии EUCAST: «S» – чувствительный при стандартном режиме дозирования; «I» – чувствительный при увеличенной экспозиции; «R» – резистентный [20]. Скрининг штаммов, «подозрительных» на продукцию БЛРС или AmpC, проводили с применением дисков цефтазидима (10 мкг) и цефотаксима (5 мкг) согласно руководству EUCAST [18]. Постановку подтверждающих тестов на основе определения чувствительности бета-лактамаз к ингибиторам клавулановой кислоты (ингибитор БЛРС) и клоксациллину (ингибитор AmpC-цефалоспориноаз) осуществляли методом комбинированных дисков и набора реагентов «ESBL+AmpC Screen Kit» (Rosco Diagnostica, Дания). Во избежание ложных результатов в том случае, если штамм одновременно продуцировал БЛРС и AmpC, оценивали синергизм между цефепимом (не подвергающимся гидролизу цефалоспориноазами AmpC) и клавулановой кислотой в тесте синергизма с двумя дисками (цефепим и амоксициллин/клавулановая кислота). Бактериальную ДНК выделяли с помощью реагента InstaGen Matrix производства BioRad (США) согласно инструкции производителя. Поиск генов, кодирующих бета-лактамазы, провели методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации, используя ранее опубликованные праймеры (производства ЗАО Евроген, РФ) и протоколы [21]. Выявляли *bla*-гены, ответственные за продукцию БЛРС молекулярного класса А генетического семейства CTX-M генетических групп CTX-M1,-2,-8,-9 и -25, а также AmpC-цефалоспориноаз молекулярного класса С генетических семейств ACC, FOX, MOX, DNA, CIT и EBC.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В популяции штаммов *Salmonella* в Санкт-Петербурге в 2014-2019 гг. устойчивость к ЦРС была выявлена у 1,6% штаммов (95% ДИ 0,9-2,8), самый высокий показатель отмечен у штаммов серовара S. Typhimurium (7,8%, 95% ДИ 3,1-18,5). По сравнению с 2002-2005 гг. (данные Северо-Западного регионального центра по сальмонеллезам, ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера) в 2014-2019 гг. отмечали рост устойчивости к ЦРС с 0,4% (95% ДИ 0,1-1,3) до 1,6% (95% ДИ 0,9-2,8). Несмотря на то, что этот рост не являлся статистически значимым, обращает на себя внимание, что в 2002-2005 гг. устойчивость к ЦРС была обнаружена только у

двух штаммов редко выделяемых сероваров (*S. Virchow* и *S. Newport*), в то время как в 2014-2019 гг. из 12 устойчивых штаммов семь относились к доминирующему серовару *S. Enteritidis*.

После проведения скрининга для углубленного исследования были отобраны 18 штаммов *Salmonella*, устойчивые к ЦРС (12 штаммов выявлены в Санкт-Петербурге в 2014-2019 гг., 6 штаммов – в Иркутской области в 2008-2013 гг.), которые были представлены сероварами: *S. Enteritidis* (7 штаммов), *S. Typhimurium* (7 штаммов), *S. Abony* (1 штамм), *S. Coeln* (1 штамм), *S. Virchow* (1 штамм), *S. Newport* (1 штамм). Подтверждающий тест установил синергизм между ЦРС (цефотаксимом и/или цефтазидимом) и клавулановой кислотой у 16 штаммов: диаметр зоны подавления роста вокруг таблеток с комбинированными препаратами (цефтазидим+клавулановая кислота и цефотаксим+клавулановая кислота) более чем на 5 мм превышал диаметр зоны вокруг цефтазидима и цефотаксима. Это позволило предположить продукцию этими штаммами БЛРС молекулярного класса А. У двух штаммов (*S. Newport* и *S. Enteritidis*) обнаружен синергизм между ЦРС и клоксациллином: диаметр зоны подавления роста вокруг таблеток с комбинированными препаратами (цефтазидим+клоксациллин и цефотаксим+клоксациллин) более чем на 5 мм превышал диаметр зоны вокруг цефтазидима и цефотаксима, что указывало на вероятную продукцию этими штаммами AmpC-цефалоспориноз молекулярного класса С. Дополнительно оценили синергизм между цефепимом (не подвергающимся гидролизу цефалоспоринозами AmpC) и клавулановой кислотой в тесте синергизма с двумя дисками (цефепим и амоксициллин/клавулановая кислота лав). Синергизм между цефепимом и клавулановой кислотой отмечали у 16 штаммов, что совпало с результатами метода комбинированных дисков. Таким образом, штаммов с сочетанной продукцией БЛРС и AmpC фенотипическими методами выявлено не было.

Согласно рекомендациям EUCAST, цефокситин может быть использован как высокочувствительный маркер для дополнительного скрининга штаммов энтеробактерий, продуцирующих AmpC-цефалоспоринозы, в комбинации с установлением чувствительности к ингибиторам. Штаммы энтеробактерий «дикого типа», не продуцирующие AmpC, имеют МПК цефокситина ≤ 8,0 мг/л; для штаммов, продуцирующих AmpC, МПК цефокситина превышает 8,0 мг/л. В нашем исследовании 14 из 18 штаммов по чувствительности к цефокситину относились к «дикому» типу, у 4 штаммов МПК цефокситина составила от 16,0 до 256,0 мг/л, что указывало на вероятную продукцию AmpC.

При молекулярном исследовании у 16 штаммов, предположительно продуцирующих БЛРС, по результатам фенотипических тестов обнаружены гены, кодирующие продукцию БЛРС генетического семейства

СТХ-М трех генетических групп: СТХ-М1 (10 штаммов), СТХ-М2 (2 штамма), СТХ-М9 (3 штамма), у одного штамма *S. Typhimurium* выявлены гены БЛРС двух генетических групп – СТХ-1 и СТХ-М2. У двух штаммов, предположительно продуцирующих AmpC-цефалоспоринозы, по результатам фенотипических тестов (*S. Newport* и *S. Enteritidis*) обнаружены гены цефалоспориноз молекулярного класса С генетической группы CMY-2 (табл. 1).

Таблица 1

Гены бета-лактамаз различных молекулярных классов, выявленные у штаммов *Salmonella*, устойчивых к ЦРС

Генетическое семейство бета-лактамаз	Число штаммов	Доля от числа устойчивых к ЦРС, %	Серовары (количество штаммов)
Всего штаммов	18	100	
TEM, SHV (БЛРС)	0	0	-
AmpC из них генетические группы:	2	11,1	<i>S. Newport</i> <i>S. Enteritidis</i>
- CMY-2	2	11,1	<i>S. Newport</i> <i>S. Enteritidis</i>
- ACC, FOX, MOX, DNA, EBC	0	0	-
СТХ-М из них генетические группы:	16	88,9	
- СТХ-М1	10	55,6	<i>S. Typhimurium</i> (4) <i>S. Enteritidis</i> (3) <i>S. Abony</i> (1) <i>S. Virchow</i> (1) <i>S. Coeln</i> (1)
- СТХ-М2	2	11,1	<i>S. Typhimurium</i> (2)
- СТХ-М9	3	16,7	<i>S. Enteritidis</i> (3)
- СТХ-М1+ СТХ-М2	1	5,5	<i>S. Typhimurium</i> (1)

Характеристика штаммов *Salmonella*, продуцирующих бета-лактамазы различных генетических семейств, в отношении чувствительности и устойчивости к широкому спектру бета-лактамов (ЦРС, комбинациям бета-лактамов с ингибиторами, карбапенемам, азтреонаму) представлена в таблице 2.

Фенотипическая характеристика штаммов полностью соответствовала молекулярному механизму резистентности и была обусловлена спектром ферментативной активности продуцируемых бета-лактамаз. Так, штаммы, продуцирующие БЛРС генетического семейства СТХ-М, характеризовались устойчивостью высокого уровня к азтреонаму (МПК от 4 до более чем 32,0 мг/л), цефотаксиму (МПК более 32,0 мг/л) и цефепиму (МПК от 6,0 до 256,0 мг/л). Семь штаммов оставались чувствительны к цефтазидиму при увеличенной экспозиции (категория «I»), что подтверждало выраженную субстратную специфичность продуцируемых бета-лактамаз в отношении цефотаксима. Два штамма, продуциру-

ющие AmpC-цефалоспоринозу CMY-2, характеризовались устойчивостью высокого уровня к цефотаксиму (МПК более 32,0 мг/л) и цефтазидиму (МПК 48,0 и более 256,0 мг/л), но сохраняли чувствительность (при стандартном режиме дозирования) к це-

фепиму (МПК 0,5 и 1,0 мг/л), что соответствовало особенностям субстратной специфичности цефалоспориноз молекулярного класса С.

Таблица 2

МПК (мг/л) бета-лактамов для штаммов *Salmonella*, продуцирующих бета-лактамазы

Серovar	Бета-лактамаза	МПК, мг/л								
		Азтреонам	Цефалоспорины расширенного спектра				«Защищенные» бета-лактамы			Карбапенемы
			Цефтазидим	Цефотаксим	Цефепим	Цефокситин	АКК	ЦАВ	ЦТЗ	
<i>S. Virchow</i>	CTX-M1	4,0 (R)	2,0 (I)	>32,0 (R)	>256,0 (R)	1,0 (WT)	64,0 (R)	≤0,5 (S)	2,0 (R)	0,03 (S)
<i>S. Abony</i>	CTX-M1	>32,0 (R)	16,0 (R)	>32,0 (R)	>256,0 (R)	2,0 (WT)	16,0 (R)	≤0,5 (S)	1,0 (S)	0,06 (S)
<i>S. Typhimurium</i>	CTX-M1+ CTX-M2	>32,0 (R)	>256,0 (R)	>32,0 (R)	>256,0 (R)	4,0 (WT)	32,0 (R)	≤0,5 (S)	1,0 (S)	0,06 (S)
<i>S. Typhimurium</i>	CTX-M2	16,0 (R)	2,0 (I)	>32,0 (R)	16,0 (R)	24,0 (не-WT)	≤4,0 (S)	≤0,5 (S)	≤0,5 (S)	0,015 (S)
<i>S. Typhimurium</i>	CTX-M2	32,0 (R)	6,0 (R)	>32,0 (R)	24,0 (R)	32,0 (не-WT)	>64,0 (R)	≤0,5 (S)	1,0 (S)	0,03 (S)
<i>S. Typhimurium</i>	CTX-M1	>32,0 (R)	>256,0 (R)	>32,0 (R)	>256,0 (R)	2,0 (WT)	≤4,0 (S)	≤0,5 (S)	2,0 (R)	0,015 (S)
<i>S. Enteritidis</i>	CTX-M1	>32,0 (R)	96,0 (R)	>32,0 (R)	24,0 (R)	1,5 (WT)	≤4,0 (S)	≤0,5 (S)	≤0,5 (S)	0,03 (S)
<i>S. Typhimurium</i>	CTX-M1	32,0 (R)	8,0 (R)	>32,0 (R)	64,0 (R)	4,0 (WT)	≤4,0 (S)	≤0,5 (S)	1,0 (S)	0,03 (S)
<i>S. Enteritidis</i>	CTX-M9	16,0 (R)	4,0 (I)	>32,0 (R)	>256,0 (R)	2,0 (WT)	16,0 (R)	≤0,5 (S)	1,0 (S)	0,03 (S)
<i>S. Enteritidis</i>	CTX-M1	>32,0 (R)	>256,0 (R)	>32,0 (R)	>256,0 (R)	4,0 (WT)	8,0 (S)	≤0,5 (S)	2,0 (R)	0,015 (S)
<i>S. Enteritidis</i>	CTX-M9	32,0 (R)	4,0 (I)	>32,0 (R)	16,0 (R)	1,5 (WT)	16,0 (R)	≤0,5 (S)	1,0 (S)	0,015 (S)
<i>S. Enteritidis</i>	CTX-M9	16,0 (R)	4,0 (I)	>32,0 (R)	16,0 (R)	2,0 (WT)	16,0 (R)	≤0,5 (S)	1,0 (S)	0,03 (S)
<i>S. Coeln</i>	CTX-M1	8,0 (R)	12,0 (R)	>32,0 (R)	48,0 (R)	1,0 (WT)	≤4,0 (S)	≤0,5 (S)	≤0,5 (S)	0,06 (S)
<i>S. Typhimurium</i>	CTX-M1	16,0 (R)	2,0 (I)	>32,0 (R)	32,0 (R)	2,0 (WT)	8,0 (S)	≤0,5 (S)	≤0,5 (S)	0,03 (S)
<i>S. Typhimurium</i>	CTX-M1	>32,0 (R)	>256,0 (R)	>32,0 (R)	64,0 (R)	6,0 (WT)	16,0 (R)	≤0,5 (S)	1,0 (S)	0,03 (S)
<i>S. Enteritidis</i>	CTX-M1	32,0 (R)	4,0 (I)	>32,0 (R)	16,0 (R)	1,5 (WT)	≤4,0 (S)	≤0,5 (S)	≤0,5 (S)	0,015 (S)
<i>S. Newport</i>	CMY-2	8,0 (R)	>256,0 (R)	>32,0 (R)	1,0 (S)	>256,0 (не-WT)	>64,0 (R)	≤0,5 (S)	2,0 (R)	0,03 (S)
<i>S. Enteritidis</i>	CMY-2	8,0 (R)	48,0 (R)	>32,0 (R)	1,0 (S)	64,0 (не-WT)	>64,0 (R)	≤0,5 (S)	≤0,5 (S)	0,03 (S)

Примечание: МПК – минимальная подавляющая концентрация, АКК – амоксициллин/клавулановая кислота, ЦАВ – цефтазидим/авибактам, ЦТЗ – цефталозан/тазобактам, WT – «дикий» тип (wild type), не-WT – «не-дикий» тип (non-wild type), S – чувствительный (при стандартной дозировке), I – чувствительный при увеличенной экспозиции, R – резистентный.

При тестировании комбинаций бета-лактамов с ингибиторами бета-лактамаз установлено, что амоксициллин/клавуланат оставался активным (категория «S») в отношении 8 штаммов, продуцирующих БЛРС (МПК от ≤ 4,0 до 8,0 мг/л), остальные штаммы были резистентны (МПК – от 16,0 до более 64,0 мг/л). Выявлена высокая активность цефтазидим/авибактама вне зависимости от вида продуцируемой бета-лактамазы: для всех штаммов МПК составило менее 0,5 (категория «S»). Активность цефталозан/тазобактама была ниже: к категории «S» относились 14 штаммов (МПК ≤ 0,5-1,0 мг/л), к категории «R» – 4 штамма. Все штаммы оставались высоко чувствительны к карбапенемам (категория «S»): МПК меропенема колебалось от 0,015 до 0,06 мг/л.

Практически все штаммы *Salmonella*, продуцирующие БЛРС (17 штаммов из 18), характеризовались устойчивостью к 1-7 не-лактамам классам антибиотиков (Рис. 1).

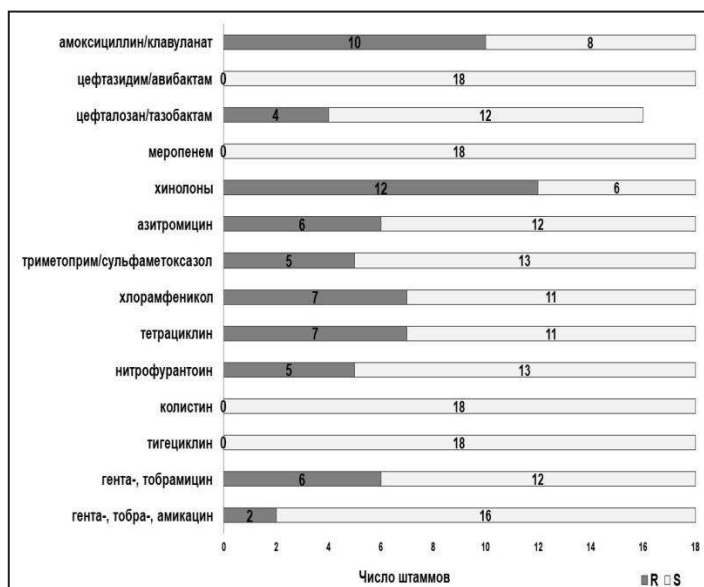


Рис. 1. Устойчивость штаммов *Salmonella*, продуцирующих БЛРС и AmpC, к антимикробным препаратам различных классов (абс. число штаммов).

Наиболее часто устойчивость к ЦРС сочеталась с устойчивостью к хинолонам: 12 штаммов из 18 характеризовались устойчивостью низкого уровня к ципрофлоксацину (МПК 0,12-0,5 мг/л). Также отмечена резистентность к хлорамфениколу (МПК от 16,0 до более 32,0 мг/л) у 7 штаммов; тетрациклину (МПК выше 32,0 мг/л) – 7 штаммов; азитромицину (МПК от 24,0 до 256,0 мг/л) – 6 штаммов; гентамицину и тобрамицину (МПК 16,0-32,0 мг/л и более 8,0 мг/л соответственно) – 6 штаммов; триметоприм / сульфаметоксазолу (МПК выше 8,0 мг/л) – 5 штаммов; нитрофурантоину (МПК от 96,0 до 256,0 мг/л) – 5 штаммов; ко всем тестируемым аминогликозидам, включая амикацин (МПК 32,0 мг/л) – 2 штамма. Все штаммы сохраняли чувствительность к колистину и тигециклину.

Таким образом, в результате исследования выявили, что устойчивость к ЦРС у штаммов *Salmonella* обусловлена механизмом резистентности, характерным для бактерий семейства *Enterobacteriaceae*: продукцией бета-лактамаз различных молекулярных классов и генетических семейств. Большинство устойчивых штаммов (16 из 18 штаммов), представленных сероварами *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Virchow*, *S. Abony*, *S. Coeln* и *Salmonella* 1,4,12:i:-, продуцировали БЛРС молекулярного класса А генетического семейства СТХ-М, два штамма (*S. Newport* и *S. Enteritidis*) – цефалоспориноазу молекулярного класса С генетической группы СМУ-2. Полученными данными подтверждена диагностическая ценность алгоритма фенотипической детекции БЛРС и AmpC у штаммов *Salmonella*.

Алгоритм детекции, включающий тестирование индикаторных ЦРС (цефтазида и цефотаксима) и цефокситина, а также подтверждающие фенотипические тесты с ингибиторами, позволяет с высокой вероятностью предположить продукцию бета-лактамазы определенного молекулярного класса (А или С). Знание конкретного механизма резистентности помогает выбрать оптимальный антибиотик для этиотропной терапии, в том числе из группы бета-лактамов (цефепим, ингибиторозащищенные цефалоспорины).

ВЫВОДЫ

1. Несмотря на невысокую частоту устойчивости к ЦРС штаммов *Salmonella*, выделенных в Санкт-Петербурге (1,6% штаммов), отмечена тенденция к росту этого показателя в последние годы, а также появление устойчивых штаммов доминирующего серовара *S. Enteritidis*.

2. Молекулярный механизм устойчивости штаммов *Salmonella* к ЦРС – продукция БЛРС генетического семейства СТХ-М и AmpC-цефалоспориноаз СМУ-2.

3. У штаммов *Salmonella* профиль устойчивости к отдельным бета-лактамам обусловлен субстратной специфичностью и генетически семейством продуцируемой бета-лактамазы.

3. Штаммы *Salmonella*, устойчивые к ЦРС, характеризуются множественной устойчивостью к другим классам АМП. Высокую активность в отношении таких штаммов сохраняют цефтазидим/авибактам, карбапенемы, колистин и тигециклин.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Клинические рекомендации* (протокол лечения) оказания медицинской помощи детям, больным сальмонеллезом. – ФГБУ НИИДИ ФМБА России. Утв. 09.10.2013. Режим доступа: <http://niidi.ru/dotAsset/6501246b-27f5-4d17-964d-7dc4defb8b43>. [Clinical recommendations (treatment protocols) of rendering of medical aid to children suffering from salmonellosis. FGBU NIIDI FMBA of Russia. - Approved on 09.10.2013. Access mode: <http://niidi.ru/dotAsset/6501246b-27f5-4d17-964d-7dc4defb8b43> (In Russ)].
2. *Клинические рекомендации «Сальмонеллез у взрослых»*. – ФГБУ ВПО «Дагестанская государственная медицинская академия» МЗ РФ. ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ России. Режим доступа: <http://nnoi.ru/uploads/files/Salmonelles.pdf> [Clinical recommendations "Salmonellosis in adults". - Dagestan State Medical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation. FSBI "Influenza research institute" of the Ministry of Health of Russia. Mode of access: <http://nnoi.ru/uploads/files/Salmonelles.pdf> (In Russ)].
3. *Козлов С.Н., Козлов Р.С.* Современная антимикробная химиотерапия: руководство для врачей. 3-е изд. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2017: 400 с. [Kozlov S.N., Kozlov R.S. Modern antimicrobial chemotherapy: a guide for doctors. 3rd ed. Moscow: Medical Information Agency LLC, 2017: 400 p. (In Russ)].
4. *Милютин Л.Н., Рублева О.В., Голубев А.О. и др.* Практическое руководство по диагностике и лечению сальмонеллезов у детей. 2-е изд. М.: Журн. «Архив внутренней медицины», 2014: 94 с. [Milyutina L.N., Rubleva O.V., Golubev A.O., et al. Practical guide to the diagnosis and treatment of salmonellosis in children. 2nd ed. Moscow: J. Archive of Internal Medicine, 2014: 94 p. (In Russ)].
5. *Guarino A., Ashkenazi S., Gendrel D., et al.* European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition/European Society for Pediatric Infectious Diseases Evidence-Based Guidelines for the Management of Acute Gastroenteritis in Children in Europe: update 2014. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2014; 59 (1): 132-152. doi.org/10.1097/MPG.0000000000000375
6. *Riddle M.S., DuPont H.L., Bradley A., Connor B.A.* ACG clinical guideline: diagnosis, treatment, and prevention of acute diarrheal infections in adults. American J. Gastroenterology. 2016; 111 (5): 602-622. doi.org/10.1038/ajg.2016.126

7. *Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS) Annual Report 2013*. Public Health Agency of Canada, Guelph, Ontario. Government of Canada. 2015. <https://www.canada.ca/en/public-health/services/surveillance/canadian-integrated-program-antimicrobial-resistance-surveillance-cipars/cipars-reports.html>
8. *CDC. National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS): Human Isolates Surveillance Report for 2015 (Final Report)*. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services. CDC. 2018. https://www.cdc.gov/narms/pdf/2015-NARMS-Annual-Report-cleared_508.pdf
9. *The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017*. EFSA Journal. 2018; 16 (12). Article 5500. doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500
10. Гончар Н.В., Лазарева И.В., Рычкова С.В. и др. Заболеваемость детей сальмонеллезом и уровень резистентности клинических штаммов сальмонелл к антибактериальным препаратам в Санкт-Петербурге. Журнал инфектологии. 2015; 7 (1): 80-86. [Gonchar N.V., Lazareva I.V., Rychkova S.V., et al. Morbidity of children with salmonellosis and the level of resistance of clinical strains of salmonella to antibacterial drugs in St. Petersburg. Journal of Infectology. 2015; 7 (1): 80-86 (In Russ)].
11. Козырева В.К., Эйдельштейн М.В., Тапальский Д.В. Клональное распространение СТХ-М-5-продуцирующих нозокомиальных штаммов *Salmonella* Typhimurium в России, Беларуси и Казахстане. Клиническая микробиология и химиотерапия. 2012; 14 (1): 38-50. [Kozyreva V.K., Eidelstein M.V., Tapalsky D.V. Clonal distribution of STX-M-5-producing nosocomial strains of *Salmonella* Typhimurium in Russia, Belarus and Kazakhstan. Clin. Microbiol. and Antimicrobial Chemotherapy. 2012; 14 (1): 38-50 (In Russ)].
12. Castellanos L.R., Graaf-van Bloois L., Donado-Godoy P., et al. Genomic characterization of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella enterica* in the colombian poultry chain. Front Microbiol. 2018; 9. Article 2431. doi.org/10.3389/fmicb.2018.02431
13. Chen C.Y., Hsieh P.H., Chang C.Y., et al. Molecular epidemiology of the emerging ceftriaxone resistant non-typhoidal *Salmonella* in southern Taiwan. J. Microbiol. Immunol. Infect. 2018; 52 (2): 289-296. doi.org/10.1016/j.jmii.2018.08.007
14. Kuang D., Zhang J., Xu X., et al. Increase in ceftriaxone resistance and widespread extended-spectrum β -lactamases genes among *Salmonella enterica* from human and nonhuman sources. Foodborne Pathog. Dis. 2018; 15 (12): 770-775. doi.org/10.1089/fpd.2018.2468
15. Madec J.Y., Haenni M., Nordmann P., Poirel L. Extended-spectrum β -lactamase/AmpC- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in animals: a threat for humans? Clin. Microbiol. Infect. 2017; 23 (11): 826-833. doi.org/10.1016/j.cmi.2017.01.013
16. Ranjbar R., Ardashiri M., Samadi S., Afshar D. Distribution of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) among *Salmonella* serogroups isolated from pediatric patients. Iranian J. Microbiol. 2018; 10 (5): 294-299. PMID: 30675325
17. Fernández J., Guerra B., Rodicio M.R. Resistance to carbapenems in non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars from humans, animals and food. Veterinary sciences. 2018; 5 (2): E40. doi.org/10.3390/vetsci5020040
18. *The EUCAST guideline on detection of resistance mechanisms v. 2.0 2017*. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCASTfiles/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf
19. *Клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (версии 2014, 2015, 2018 г.)* Режим доступа: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrec-dsma2018.pdf> [Clinical recommendations "Determination of the sensitivity of microorganisms to antimicrobial drugs" (versions 2014, 2015, 2018) Access mode: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrec-dsma2018.pdf> (In Russ)].
20. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters*. European Society of Clinical Microbiology and Infectious. 2020. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
21. Dallenne C., Costa A.Da, Decré D., et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in *Enterobacteriaceae*. J. Antimicrob. Chemother. 2010; 65 (3): 490-495. doi.org/10.1093/jac/dkp498

Поступила в редакцию журнала 07.10.2020

Рецензент: Л.А. Краева

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИЗОЛЯТОВ *HAEMOPHILUS INFLUENZAE*, ВЫДЕЛЕННЫХ ПРИ ИНВАЗИВНЫХ, ПЕРВИЧНО-ЛОКАЛИЗОВАННЫХ ИНФЕКЦИЯХ И БАКТЕРИОНОСИТЕЛЬСТВЕ

¹Боронина Л.Г. (профессор)*, ²Саматова Е.В. (врач-бактериолог), ²Кукушкина М.П. (врач-бактериолог), ²Устюгова С.С. (врач-бактериолог)

¹Уральский государственный медицинский университет (кафедра клинической лабораторной диагностики и бактериологии); ²Областная детская клиническая больница (лаборатория клинической микробиологии), Екатеринбург, Россия

До вакцинального периода инвазивные инфекции, вызванные *Haemophilus influenzae*, относились к серотипу «b» и при биотипировании причислены к I, II, III. Кроме *H. influenzae* серотипа «b», инвазивные инфекции были вызваны серотипами «d», «f»; бескапсульный штамм *H. influenzae* был выделен при сепсисе у новорожденного ребенка. Первично-локализованные инфекции обусловлены преимущественно нетипируемыми штаммами, при инфекциях дыхательной системы наиболее часто обнаруживали I, II, III биотипы. На задней стенке носоглотки у здоровых детей в 86% случаев выделяли преимущественно бескапсульные штаммы, относимые к I, II, III биотипу (25%). Среди *H. influenzae*, изолированных из носоглотки здоровых детей, обнаружены 5% штаммов серотипа «b», 3% – «d», 2% – «f», 1% – «a», 1% – «c». Исследования проведены до внедрения в календарь прививок вакцинации против *H. influenzae* «b».

Ключевые слова: дети, инфекции, бактерионосительство, биотип, серотип *Haemophilus influenzae*

PHENOTYPICAL CHARACTERISTICS OF *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* ISOLATES OBTAINED OF INVASIVE, PRIMARY LOCALIZED INFECTIONS AND BACTERIAL CARRIER

¹Boronina L.G. (professor), ²Samatova E.V. (bacteriologist), ²Kukushkina M.P. (bacteriologist), ²Ustyugova S.S. (bacteriologist)

¹Ural State Medical University (Department of Clinical Laboratory Diagnostics and Bacteriology); ²Regional Children's Clinical Hospital (Laboratory of Clinical Microbiology), Ekaterinburg, Russia

* Контактное лицо: Боронина Любовь Григорьевна, e-mail: boroninalg@mail.ru

In the pre-vaccination period invasive infections caused by *Haemophilus influenzae* belonged to serotype "b"; when biotypes, they were assigned to I, II, III. In addition to *H. influenzae* serotype "b", invasive infections were caused by serotypes "d", "f"; a non-capsule *H. influenzae* strain was isolated in sepsis in a newborn. Primary localized infections are caused mainly by non-typed strains, with infections of the respiratory system, biotypes I, II, III were most often found. On the posterior wall of the nasopharynx in healthy children, in 86%, mainly non-capsule strains attributed to biotypes I, II, III (25%) were isolated.

Among *H. influenzae* isolated from the nasopharynx of healthy children, 5% of serotype "b" strains were found, 3% – "d", 2% – "f", 1% – "a", 1% – "c". Studies were conducted prior to the introduction of *H. influenzae* "b" vaccination in the vaccination calendar.

Key words: children, infections, carrier of bacteria, biotype, *Haemophilus influenzae* serotype

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для микробиологической диагностики инфекций существуют различные питательные среды и методики, в том числе молекулярно-генетические, латексные диагностикумы для выявления антигенов *Haemophilus influenzae* серовара «b». В то же время диагностические возможности для определения других серовариантов *H. influenzae* при диагностике инфекций не используются вовсе или ограничены. Капсульные штаммы *H. influenzae* представлены сероварами «a», «b», «c», «d», «e», «f» и бескапсульными вариантами, нетипируемыми капсульными сыворотками. Известно, что у *H. influenzae* выявлены несколько биовариантов на основе биохимического типирования (образование индола, ферментов орнитиндекарбоксилазы и уреазы).

В то же время отсутствуют сведения о заболеваемости и распространении других нозологических форм гнойно-септических инфекций и носоглоточного носительства, вызванных разными сероварами и биотипами *H. influenzae* [1-3].

В доступной отечественной литературе описаны единичные исследования по серотипированию капсульных штаммов, в которых антигенные свойства капсульных бактерий определяли с сывороткой типа «b» и со смесью сывороток остальных типов («a», «c», «d», «e», «f»), производимых в Швеции (Phadebact *Haemophilus* Test) [3].

В настоящее время производители диагностических препаратов предлагают только диагностикумы для серотипирования капсульных вариантов *H. influenzae* «b» в реакции латекс-агглютинации; другие сероварианты типировать не удастся, что существенно ограничивает определение роли других серовариантов в развитии и распространении *H. influenzae*-инфекций. Определение биовариантов у штаммов *H. influenzae* проводят по наличию у них ферментов орнитиндекарбоксилазы, уреазы и обра-

зованию индола на шесть биологических вариантов [3, 4]. В настоящее время для обнаружения антигенов в спинномозговой жидкости применяют наборы латексных препаратов: «Sladex meningite Kit 5» (BioMerieux), «Directigen Meningitis combo Test» (Becton Dickinson), «Pastorex meningitis», «Pastorex Hib» (Bio-Rad). Диагностикумы «Pastorex meningitis Hib» (Bio-Rad) для выявления антигенов *H. influenzae* «b» в спинномозговой жидкости, крови и моче требуют специальной пробоподготовки.

Биотипы определяют как у капсульных, так и у бескапсульных штаммов на жидких питательных средах [1]. Определение биотипа *H. influenzae* по биохимическим тестам считают наиболее информативным, доступным и пригодным для использования в практических лабораториях.

В настоящее время ЦНИИ эпидемиологии выпускает диагностикумы для определения возбудителей бактериальных менингитов методом ПЦР, в том числе *H. influenzae* без определения серотипа [2]. Определение капсульного антигена в ликворе и крови возможно при использовании реакции латекс-агглютинации. Диагностические наборы также производят, но только для выявления сероварианта *H. influenzae* «b». В то же время известно, что в этиологии бактериальных менингитов имеют значение и другие сероварианты [5].

Чаще всего встречаются штаммы серовариантов «b», «f», тогда как штаммы серовара «c» являются исключительно редкими [2]. При бактериологическом исследовании в носоглотке капсульные варианты «b» обнаружены в 2% случаев. Фарингиальное носительство *H. influenzae* «b» до прививочного периода у детей в возрасте 6 месяцев – 4 лет составляет 2,2%, назофарингиальное носительство *H. influenzae* у детей в возрасте 4-8 лет – 26,5-37,7% [6]. При изучении носоглоточного носительства (колонизация) в Германии в 2001-2004 гг. после введения в календарь прививок против *H. influenzae* «b» (Hib) обнаружили серотип «e» и отсутствие капсульных штаммов «b»; носоглотку чаще колонизировали штаммы биотипа II (42,7%) вместе со штаммами биотипа I (24,0%) и биотипа III (20,8%). При хронических заболеваниях бронхолегочной системы капсульные *H. influenzae* обнаружены в 16% [7]. Из крови и мокроты были выделены *H. influenzae* серотипа «d» биотипов I, IV и VI. От больных детей с хронической пневмонией нетипируемые *H. influenzae* выявлены в 17,5%; *H. influenzae* «a», «c»-«f» – в 14,8% (в монокультуре); в ассоциации с пневмококком Hib – в 11,7%, пневмококк и *H. influenzae* «a», «c»-«f» – в 23,5%, пневмококк и нетипируемые *H. influenzae* – в 64,7%. После применения вакцинации против Hib в Германии в 2001-2001 гг. у детей с инфекцией дыхательных путей не обнаружили увеличения нетипируемых *H. influenzae*; типа «b» не выявили, так же, как

типа «e» и «d». Из нетипируемых биотип I отмечали в 37,1%, биотип II – в 29,1%, биотип III – в 14,9% [8].

В отечественной литературе недостаточно информации о распространении различных серо- и биовариантов *H. influenzae* при назофарингиальном бактерионосительстве, а также о распространении различных серовариантов как при первично-локализованных, так и инвазивных инфекциях [2, 3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено бактериологическое исследование: мазков с задней стенки носоглотки у 656 детей, 1316 образцов ликвора и крови – от 940 пациентов; мокроты – от 104 больных с клиническими признаками пневмонии, при воспалении среднего уха (85 детей), при инфекции околоносовых пазух (122 пациента); жидкости бронхоальвеолярного лаважа – 48 человек, отделяемого с конъюнктивы – 340, мокроты при хронических воспалительных заболеваниях легких – 408. Обследование выполнено в Екатеринбурге и Свердловской области до включения в календарь вакцинации против *H. influenzae* «b», все обследованные и заболевшие дети не были привиты. Для изучения частоты назофарингиального носительства у здоровых, по сравнению с больными детьми, было обследовано 653 ребенка, посещавших поликлинику; из них 181 человек были признаны клинически здоровыми и отнесены к первой группе здоровья.

Посев ликвора осуществляли в коммерческие флаконы ВАСТЕС (bioMerieux, Франция), отделяемое из других локализаций – на «шоколадный» агар. Идентификацию выделенных штаммов проводили рутинными методами и с помощью тест-систем для идентификации микроорганизмов на полуавтоматическом АТВ-Expression (bioMerieux, Франция). Определение биоварианта *H. influenzae* по биохимическим тестам выполняли по наличию у штамма ферментов орнитиндекарбоксилазы, уреазы и образованию индола. Для определения полисахаридов капсулы у штаммов *H. influenzae* использовали экспериментальные диагностические кроличьи гипериммунные типоспецифические капсульные сыворотки, полученные при иммунизации кроликов антигенами из формализированных клеток капсульных бактерий штаммов *H. influenzae* серологических типов из коллекции ГИСК им. Л.С. Тарасевича: «a» 5/63, «b» 11/64, «b» 94505/81, «c» 7/63, «d» 27/63, «a» 8/63, «e» 52/63, «f» 10/63, и клиническим авторским штаммом *H. influenzae* «b» № 99 в соответствии со схемой Alexander. Для оценки частоты различий между показателями, в случаях соответствия вариабельности изучаемых показателей закону нормального распределения, применяли t-критерий Стьюдента. Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы (об отсутствии значимых различий) принимали равным

0,05. Использовали компьютерные программы Excel, Statistica 6.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из проб крови было выявлено 14 штаммов *H. influenzae* серовара «b», из них 12 – при гнойном менингите и септицемии, по одному – при остеомиелите и при септической форме пневмонии. Один штамм, изолированный из крови при деструктивной пневмонии, относился к серовару «d». Штаммы, выделенные из проб ликвора (31) пациентов с гнойным менингитом принадлежали к серовару «b». Четыре штамма *H. influenzae* «b» были выявлены из материала аутопсии при фульминантном сепсисе.

При первично-локализованных инфекциях обнаружены 70 штаммов *H. influenzae*, из них только 1 штамм, изолированный из мокроты пациента с острой пневмонией, относился к серовару «b». Остальные 69 штаммов, выделенных из пунктата пазух при гнойном синусите (22), отделяемого при конъюнктивите (19), раны орбиты глаза (1) и из мокроты при острой пневмонии (27), относились к нетипируемым вариантам *H. influenzae*. При серотипировании 348 штаммов *H. influenzae*, изолированных из различных мест локализации, установили, что 21,8% штаммов имели капсулу, из них 78,8% относились к серовару «b», 1,3% – серовару «a», 1,1% – серовару «c», 11,0% – серовару «d» и 9,7% – серовару «f».

Среди штаммов *H. influenzae*, выделенных со слизистой оболочки носоглотки, капсульные штаммы всех серовариантов, за исключением «e», составили 14% (Рис. 1). На долю *H. influenzae* серовара «b» приходилось 5%, частота выявления у детей – 1,6%.

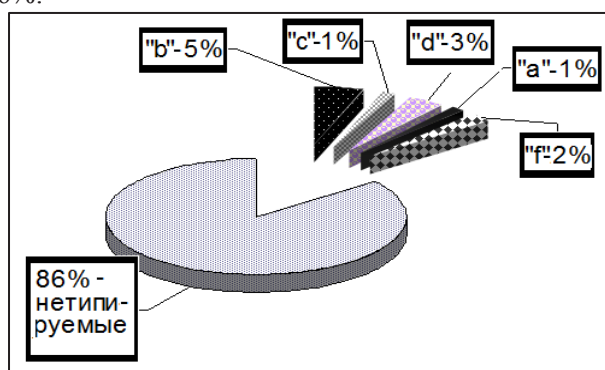


Рис. 1. Серологические типы капсулы среди штаммов *H. influenzae* (n=74), выделенных со слизистой оболочки задней стенки носоглотки у детей (в %).

Из мокроты детей с хроническими заболеваниями лёгких изолировано 52 штамма *H. influenzae*, из них 5 – капсульных («b» – 2, «d» – 1, «f» – 2); из материала бронхоальвеолярного лаважа – 48 штаммов, из них 6 – капсульных («b» – 2, «d» – 2, «f» – 2); 7 нетипируемых штамма, были выделены из мочи при хроническом пиелонефрите – 4 и при вульвите из отделяемого со слизистой оболочки вульвы – 3. Бак-

териальные менингиты, вызванные *H. influenzae*, диагностированы в течение периода наблюдений неравномерно, их доля у больных детей в возрасте от 1 месяца до 14 лет, поступивших в стационар с признаками первичного (внебольничного) гнойного менингита, составляла 2-9%. Во всех случаях выявляли *H. influenzae*, принадлежавшие к одному серовару «b», но к разным биовариантам (I, II, III).

Штаммы *H. influenzae*, выделенные при первично-локализованных и инвазивных инфекциях, относились к разным биовариантам. Инвазивные формы (в том числе менингит, сепсис, остеомиелит) были вызваны биоварами I, II, реже – III, первично-локализованные формы инфекции (средний отит и другие ЛОР-инфекции, конъюнктивит, хронические воспалительные заболевания лёгких) – I, II, III биоварами, а также VII, реже – VIII. На рисунке 2 показана частота выявления биовариантов *H. influenzae*, выделенных при различной патологии.

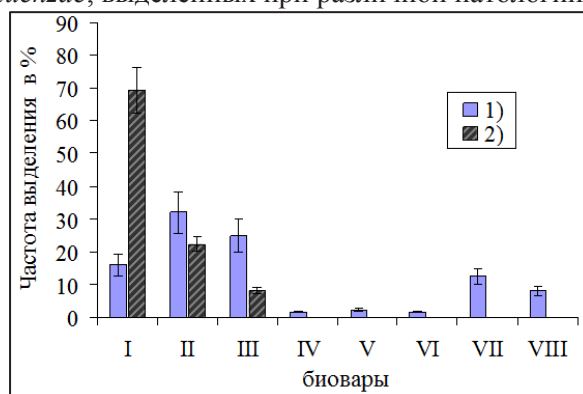


Рис. 2. Частота выделения биовариантов (биотипов) при различных инфекциях, вызванных *H. influenzae*. По оси абсцисс – биовары, по оси ординат – частота выявления биоварианта (I, II, III, V, VI, VII, VIII) в % при: 1) первично-локализованных инфекциях; 2) при инвазивных инфекциях.

Обнаружение на слизистой оболочке носоглотки детей капсульных штаммов серовара «b» I, II, III биоваров является потенциально опасным в связи с тем, что эти биоварианты и сероварианты чаще вызывают первично-локализованные и инвазивные *H. influenzae*-инфекции.

Среди фенотипов назофарингиальных штаммов *H. influenzae*, выделенных от детей первой группы здоровья, наблюдали преимущественно нетипируемые, бескапсульные штаммы VIII биовара. У детей, относимых к другим группам здоровья, обнаружены как нетипируемые, бескапсульные штаммы I, II, III, VII, VIII биоваров, так и капсульные серовары «a», «b», «c», «d», «f», которые были изолированы не более чем у 1% обследованных. Частота выявления фенотипов зависела от возраста, сезона, группы здоровья детей и составляла от 12 до 36%.

Нетипируемые штаммы *H. influenzae*, выделенные при первично-локализованных среднем отите (7%) и инфекции околоносовых пазух (18%), принадлежали к биоварам I, II, III, VII, VIII с преимуще-

ственным преобладанием I, II, III. Типируемые штаммы обнаружены при внебольничной пневмонии – 1 случай Hib, при хронических неспецифических заболеваниях легких – 4 случая Hib (*H. influenzae* «d» – в 3 случаях, «f» – в 2-х).

Распределение биотипов штаммов *H. influenzae*, выделенных с задней стенки носоглотки детей из детских учреждений, представлены на рисунке 3.

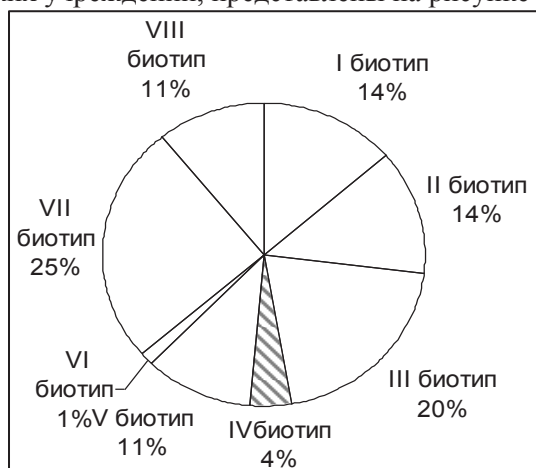


Рис. 3. Биотипы штаммов *H. influenzae* (n=75), выделенных с задней стенки носоглотки у детей из детских учреждений.

Особенностью фенотипических свойств штаммов было выделение у детей из детских садов г. Кирова только *H. influenzae* III биовара, из них два штамма отнесены к капсульным сероварам «f» и «a» и фактически впервые выявлены на территории Свердловской области. В носоглотке детей из детского комбината в посёлке Бисерть обнаружены штаммы биовара II, в Двуреченске – только I, II, III биоваров. В этих детских коллективах не было найдено ни одного бескапсульного штамма биоваров VII и VIII.

Несмотря на большую частоту выделения *H. influenzae*, у детей из детского сада с дневным пребыванием г. Дегтярска (26,8%) изолировали только бескапсульные штаммы двух биоваров – VII, VIII, капсульных штаммов не обнаружили. Напротив, в детских учреждениях городов Красноуральск и Кировград, а также поселка Бисерть *H. influenzae* выделяли в 17,5%, 7,3%, 8,8% соответственно, но это были капсульные штаммы I, II, III биоваров. Данные биотипы выявляли чаще других: в 10,0%, 7,3%, 8,8% случаев соответственно, и реже – со слизистой оболочки носоглотки детей из детских учреждений других регионов.

При носоглоточном носительстве капсульные варианты обнаружены у разных сероваров, из них не все относились к I биовару. У штаммов I, II, III биовара (чаще I биовара) была выявлена капсула. Все изоляты серовара «b» принадлежали к I биовару, другие капсульные варианты отнесены к I, II, III, IV биоварам. Бескапсульные (нетипируемые) штаммы *H. influenzae* относились к другим биовариантам,

преимущественно к VII и VIII, а также к IV, V, VI. Достоверно чаще назофарингиальные штаммы принадлежали к VII биовару по сравнению с V, IV ($p < 0,001$) и VIII ($p < 0,05$). Значимых различий в частоте выявления I, II, III, биоваров не установлено ($p > 0,05$). Таким образом, можно сделать заключение о присутствии на слизистой оболочке задней стенки носоглотки детей штаммов *H. influenzae* всех сероваров и с наименьшей частотой – биоваров IV и VI.

Наибольшее число капсульных штаммов отнесены к серовару «b», второй по частоте – серовар «f», третий – «d». Серовары «a» и «c» выделены только у детей из детских учреждений, у больных их не выявляли; серовар «e» не обнаружили. У семи штаммов *H. influenzae* (28%), изолированных от больных с инфекциями дыхательной системы, капсулу не удалось типировать капсульными сыворотками. Штаммы серовара «b» находили чаще, чем штаммы других сероваров ($p < 0,05$).

Фенотипическая структура штаммов *H. influenzae*, выделенных от больных, лиц первой группы здоровья, в коллективах детей разных возрастов, отличалась и зависела от времени года: у 12% – в летнее и у 39% здоровых детей – в зимнее время, у 20-25% детей с хроническими заболеваниями – вне зависимости от времени года. На слизистой оболочке носоглотки здоровых детей наблюдали преимущественно нетипируемые штаммы всех биоваров, реже – IV, V. У здоровых детей первой группы была наибольшая (64%) частота выявления нетипируемых штаммов VIII биовара.

На рисунке 4 показана частота выделения биоваров *H. influenzae* со слизистой оболочки задней стенки носоглотки здоровых детей: биовар VIII обнаружен в 64% случаев, биовар VII – в 9%, биовар I – в 6%, биовар V – в 3%, биовары IV, VI не найдены. При этом выявлены преимущественно нетипируемые по капсульным полисахаридам бескапсульные штаммы *H. influenzae* ($p < 0,05$).

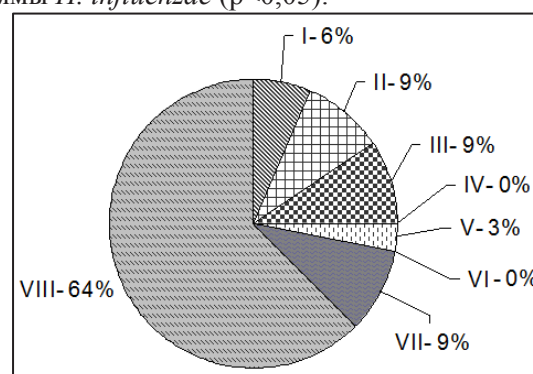


Рис. 4. Распределение биотипов среди штаммов *H. influenzae*, выделенных из носоглотки детей первой группы здоровья (n=181, в %).

У детей с признаками инфекций дыхательной системы на слизистой оболочке задней стенки носоглотки *H. influenzae* принадлежали к пяти биоварам

– I, II, III, VII, VIII, из которых каждый третий (34%) – биовар III. У больных с инфекциями дыхательной системы биовары V, IV, VI не обнаружены (Рис. 5).

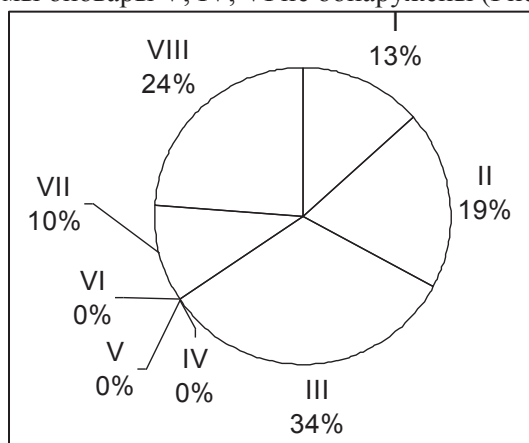


Рис. 5. Распределение биотипов среди штаммов *H. influenzae*, выделенных со слизистой оболочки задней стенки носоглотки у больных с инфекциями дыхательной системы (в %).

При заболеваниях дыхательной системы чаще встречались II, III биовары (Рис. 6). При внебольничных пневмониях I биовар выявляли чаще, чем у здоровых лиц, а выделение VIII биовара из носоглотки было достоверно меньше при инфекциях ($p < 0,05$), чем у детей первой группы здоровья.

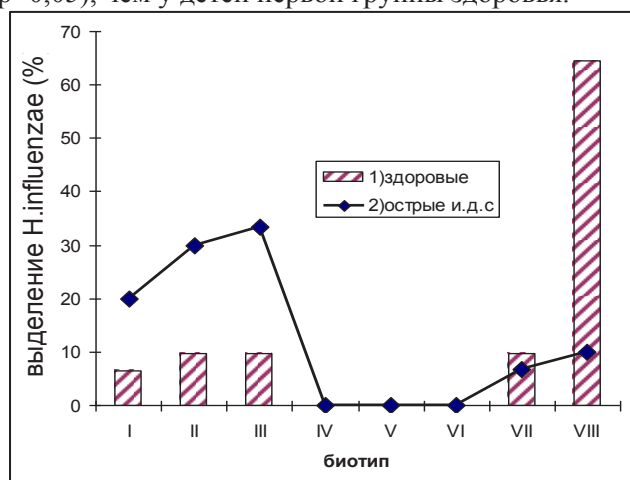


Рис. 6. Сравнение частота выделения биоваров *H. influenzae* со слизистой оболочки носоглотки у детей первой группы здоровья ($n=181$) и больных с инфекциями дыхательной системы ($n=408$). По оси абсцисс – биовары, по оси ординат – выделение биоваров *H. influenzae* в % в группах: 1) в группе здоровых; 2) в группе детей с инфекциями.

При инвазивных инфекциях в пробах крови при септицемии, остеомиелите, деструктивной пневмонии, ликвора при гнойном менингите, мокроты при внебольничной пневмонии и материала аутопсии при фульминантном сепсисе выявлены штаммы *H. influenzae* серовара «b»; один штамм, изолированный из крови при деструктивной пневмонии, отнесен к бескапсульному варианту *H. influenzae*. Выделенный из крови новорожденного ребенка и отделяемого

матки родильницы штамм *H. influenzae* отнесен к VI биотипу.

Таким образом, применяемая для верификации этиологии инфекции индикация антигенов или генома молекулярно-биологическими и другими методами, являясь необходимым этиологическим исследованием, не заменяет классические бактериологические методы при диагностике инфекций.

Культуральное исследование позволяет обнаруживать капсульные штаммы других серотипов и нетипируемые штаммы *H. influenzae*, а также определять резистентность к антибактериальным препаратам. При отсутствии возможности устанавливать серотип необходимо выявлять биотип, в связи с тем, что биотипы I, II, III чаще ассоциируются с первично-локализованными и инвазивными инфекциями, вызванными *H. influenzae*.

Среди штаммов *H. influenzae*, выделенных со слизистой оболочки носоглотки детей без клинических проявлений инфекций, посещающих детские учреждения, обнаружены капсульные штаммы всех серотипов, за исключением сероварианта «a», которые составили 14% от числа обследованных. Среди всех штаммов *H. influenzae*, изолированных у здоровых детей из носоглотки, серотип «b» составил 5%.

Назофарингиальные штаммы, выделенные от детей первой группы здоровья, – преимущественно нетипируемые, бескапсульные *H. influenzae* VIII биовара. У детей, относимых к другим группам здоровья, обнаружены как нетипируемые, бескапсульные штаммы I, II, III, VII, VIII биоваров, так и капсульные серовары «a», «b», «c», «d», «f», выявленные не более чем у 1% обследованных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что в развитии инвазивных инфекций принимают участие различные серотипы *H. influenzae*, преимущественно серотип «b», что полностью соответствует данным зарубежной и отечественной литературы [1-6]. Все штаммы серотипа «b» при биотипировании отнесены к I, II, III. Кроме *H. influenzae* серотипа «b», инвазивные инфекции были вызваны серотипами «d», «f», бескапсульный штамм *H. influenzae* выделен при сепсисе у новорожденного ребенка.

Первично-локализованные инфекции вызваны преимущественно нетипируемыми штаммами, при инфекциях дыхательной системы наиболее часто выявляли биотипы I, II, III. На задней стенке носоглотки у здоровых детей в 86% обнаруживали преимущественно бескапсульные штаммы, относимые к I, II, III биотипам (25%). Среди выделенных из носоглотки здоровых детей штаммов *H. influenzae* «b» обнаружены в 5% случаев, *H. influenzae* «d» – в 3%, «f» – в 2%, «a» – в 1%, «c» – в 1%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Крамарь Н.Н., Хлынина Ю.О. Гемофильная инфекция у детей: проблемы и перспективы. Лекарственный вестник. 2011; 6(3): 42-47. [Kramar N.N., Hlinova J.O. Haemophilus infection from children: problem and prospects. Medicinal Bulletin. 2011; 6 (3): 42-47 (In Russ)].
2. Спирихина Л.В., Закраева И.М., Королева И.С. и др. Гнойные менингиты неменингококковой этиологии в Москве за 2002-2010 гг. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2011; 3:45-47. [Spiryhina L.V., Zakraeva I.M., Koroleva I.S., et al. Purulent meningitis of non-meningococcal etiology in Moscow for 2002-2010. Epidemiology and infectious diseases. Topical issues. 2011; 3: 45-47 (In Russ)].
3. Фролова Е.Я., Филатов В.Н. Эпидемиологический мониторинг и профилактика гемофильной инфекции типа b в Российской Федерации. Журнал инфектологии. 2012; 2 (4):73-83. [Frolov V.N., Fylatov E.Y. Epidemiological monitoring and prevention of hemophilic infection type b in the Russian Federation. Journal of Infectology. 2012; 2 (4): 73-83 (In Russ)].
4. Andrzejczuk S., Chwiejczak E., Kosikowska U., et al. Phenotypic diversity of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* isolates depending on origin and health condition. Curr. Issues Pharm. Med. Sci. 2017; 30 (2): 90-99. doi:10.1515/cipms-2017-0018.
5. Whittaker R., Economidou A., Dias J.G., et al. Epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* disease, Europe, 2007-2014. Emerg. Infect. Dis. 2017; 23 (3): 396-404. doi: 10.3201/eid2303.161552.
6. Ladhani S., Slack M.P., Heath P.T., et al. Invasive *Haemophilus influenzae* disease, Europe, 1996-2006. Emerg Infect Dis. 2010; 16: 455-63. doi:10.3201/eid1603.090290
7. Kalies H., Siedler A., Gröndahl B., et al. Invasive *Haemophilus influenzae* infections in Germany: impact of non-type b serotypes in the post-vaccine era. BMC Infect Dis. 2009; 9: 45. doi:10.1186/1471-2334-9-45.
8. Takla A., Schönfeld V., Claus H., et al. Invasive *Haemophilus influenzae* infections in Germany after the introduction of routine childhood immunization, 2001-2016. Open Forum Infect. Dis. 2020; 7 (10):ofaa444. doi: 10.1093/ofid/ofaa444.

Поступила в редакцию журнала 08.12.2020

Рецензент: Л.А. Кафтырева

ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI*, ВЫДЕЛЕННЫХ ПРИ ОСТРОМ АППЕНДИЦИТЕ И ХРОНИЧЕСКОМ ЯЗВЕННОМ КОЛИТЕ

^{1,3}Макарова М.А. (с.н.с., ассистент кафедры)*, ²Круглов Е.Е. (ассистент кафедры), ¹Матвеева З.Н. (в.н.с.), ⁴Зверьякина Н.Н. (зав. лаб.), ^{1,3}Кафтырева Л.А. (зав. лаб., профессор кафедры)

¹ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (лаборатория идентификации патогенов), Санкт-Петербург; ²Самарский государственный медицинский университет (кафедра общей и молекулярной биологии), Самара; ³Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (кафедра медицинской микробиологии), Санкт-Петербург; ⁴Центр гигиены и эпидемиологии, Санкт-Петербург, Россия

Изучены факторы вирулентности, чувствительность к антимикробным препаратам (АМП) и принадлежность к филогенетическим группам 152 штаммов *Escherichia coli*: 65 – выделенные при острых аппендицитах и 87 – язвенных колитах (ЯК). Изоляты по ферментативным свойствам принадлежали к типичным лактозоположительным *E. coli* и относились к 4 основным филогруппам (A, B1, B2, D). Гены вирулентности ExPEC (*fimH*, *pap*, *sfa*, *hlyA*, *cnf*, *iutA*, *afa*) содержали 96,9% (ОА) и 89,7% (ЯК) штаммов. Каждый второй штамм имел от двух до семи генов вирулентности. Штаммы, резистентные к цефалоспорином расширенного спектра (ЦРС) и продуцирующие БЛРС, достоверно чаще принадлежали к филогенетической группе B2, сохраняли чувствительность к карбапенемам (меропенему) и аминогликозидам.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, аппендицит, язвенный колит, резистентность к антибиотикам, гены вирулентности

CHARACTERISTICS OF *ESCHERICHIA COLI* STRAINS ISOLATED IN ACUTE APPENDICITIS AND ULCERATIVE COLITIS

^{1,3}Makarova M. A. (senior scientific researcher, assistant of the department), ²Kruglov E.E. (assistant of the department), ¹Matveeva Z.N. (leading scientific researcher), ^{1,3}Kaftryeva L. A. (head of laboratory, professor of the department), ⁴Zverykina N.N. (head of laboratory)

* Контактное лицо: Макарова Мария Александровна, e-mail: makmaria@mail.ru

¹Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology (Laboratory of Identification of Pathogens and Enteric Infections), St. Petersburg; ²Samara State Medical University (Department of General and Molecular Biology), Samara; ³North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov (Department of Medical Microbiology), St. Petersburg; ⁴Center for Hygiene and Epidemiology, St. Petersburg, Russia

Virulence factors, antimicrobial susceptibility, and belonging to phylogenetic groups of 152 strains of Escherichia coli: 65 – isolated from acute appendicitis (AA) and 87 – ulcerative colitis (UC) have been studied. According to their enzymatic properties, the isolates belonged to typical lactose-positive E. coli and pertained to 4 main phylogenetic groups (A, B1, B2, D). The virulence genes of ExPEC (fimH, pap, sfa, hlyA, cnf, iutA, afa) contained 96,9% (AA) and 89,7% (UC) of the strains. Every second strain had from two to seven virulence genes. Resistant strains to extended-spectrum cephalosporins (ESC) and produced ESBL more likely belonged to the phylogenetic group B2. All strains were susceptibility to carbapenems (meropenem) and aminoglycosides.

Key words: *Escherichia coli*, appendicitis, ulcerative colitis, resistance, virulence genes

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что патогенные *Escherichia coli* различаются по наличию специфических факторов вирулентности, делающих возможной реализацию инфекционного процесса в организме человека, и этим отличаются от *E. coli* – представителей нормобиоты кишечника. *E. coli*, вызывающие инфекции внекишечной локализации (внекишечные патогенные *E. coli* – ExPEC), характеризуются широким спектром факторов вирулентности, включая адгезины, токсины, сидерофоры, капсулы и инвазины, которые кодируются генами, расположенными на островах патогенности (РАИ), плаزمиде, мобильных генетических элементах. Такие штаммы могут вызвать патологический процесс практически каждого органа или системы [1, 2]. Часто возникают инфекции мочевыводящих путей, бактериемии, сепсис, пневмонии, гнойно-воспалительные инфекции брюшной полости и мягких тканей [3]. Не исключена роль облигатных представителей микробиоты кишечника при острых и хронических заболеваниях желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) в инициации и поддержании патологического воспалительного процесса, а также язвенно-некротических реакций [4]. Наиболее частым возбудителем абдоминальных инфекций и осложнений у больных хирургического профиля является *E. coli* [5]. Генетическое разнообразие *E. coli*, наличие специфических генов вирулентности позволяют предположить этиологическую значимость этих микроорганизмов в развитии ЯК [4].

Цель исследования – изучение генов вирулентности и чувствительности к антимикробным препаратам штаммов *Escherichia coli*, выделенных при остром аппендиците и хроническом язвенном колите.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучены 152 клинических изолята *E. coli*, выделенные из проб перитонеальной жидкости (65) и биоптатов язвенной поверхности (87) от госпитализированных больных с острым аппендицитом (ОА) и гистологически подтвержденным диагнозом «язвенный колит» (ЯК), на основании стандартных протоколов обследования пациентов [6]. Маркеры вирулентности патогенных *E. coli* (возбудителей диарей и внекишечных заболеваний – DEC и ExPEC) выявляли молекулярными методами, которые включали полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с гибридным флуоресцентной (ПЦР-РВ) и с электрофоретической детекцией продуктов амплификации (ПЦР-ЭФ). Детекцию генов, кодирующих факторы вирулентности DEC, проводили методом ПЦР-РВ с набором реагентов «АмплиСенс® Эшерихиозы-FL» (ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии, Россия). Амплификацию генов ExPEC, кодирующих продукцию адгезинов (*fimH*, *sfa*, *afa*, *pap*), токсинов (*hlyA*, *cnf*), сидерофоров (*iutA*), генов β-лактамаз и определяющих филогенетическую группу штаммов, осуществляли в ПЦР-ЭФ [7-9]. Продукты амплификации анализировали путем электрофоретического разделения в горизонтальном 2% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Синтез ПЦР-праймеров выполнен ЗАО «Евроген» (Россия). Экстракцию ДНК проводили набором «InstaGene™ Matrix» (Bio-Rad, США). В качестве маркеров молекулярного веса использовали GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Литва). Положительными контролями служили штаммы *E. coli* J96 (*fimH*, *pap*, *sfa*, *hlyA*, *cnf*, *iutA*) и *E. coli* KS52 (*afa*); отрицательным – *E. coli* Hb101. Чувствительность к 14 антимикробным препаратам (АМП) шести функциональных групп – бета-лактамам (ампициллину, амоксиклаву, цефтазидиму, цефотаксиму, цефепиму, меропенему), аминогликозидам (гентамицину, амикацину), хинолонам (налидиксовой кислоте, цiproфлоксацину), тетрациклину, хлорамфениколу, триметоприм сульфаметоксазолу (ко-тримоксазол) и нитрофурантоину определяли диско-диффузионным методом с применением дисков и агара Мюллера-Хинтон (Oxoid, Великобритания). Результаты интерпретировали согласно Клиническим рекомендациям 2018 г. [10]. Для выявления продукции БЛРС (β-лактамазы расширенного спектра) использовали метод «двойных дисков» с цефтазидимом, цефотаксимом, цефепимом и амоксиклавом [11]. В соответствии с международными критериями, к фенотипу множественной резистентности (MDR) отнесены штаммы, устойчивые к трем категориям АМП, включая продуцентов БЛРС [12].

Статистическую обработку результатов осуществляли методом оценки различий средних величин (точный критерий Фишера). Статистически зна-

чимыми считали различия при доверительном интервале 95% ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При сравнительном анализе биологических свойств *E. coli*, выделенных при острых (ОА) и хронических (ЯК) заболеваниях кишечника, установлено, что по наличию генов вирулентности, резистентности к АМП и филогенетической принадлежности штаммы не имели различий. По ферментативным свойствам штаммы принадлежали к типичным лактозоположительным *E. coli*, относились к четырем основным филогенетическим группам (А, В1, В2, D). Статистически значимо чаще ($p < 0,05$) *E. coli*, выявленные при ОА, относились к филогруппе В2 (40,0%), по сравнению со штаммами, выделенными при ЯК (17,2%). (табл. 1).

Таблица 1

Филогенетические группы *E. coli*, выделенных при остром аппендиците и язвенном колите

Филогенетическая группа	о. аппендицит			язвенный колит			p
	абс.	%	95% ДИ	абс.	%	95% ДИ	
А	21	32,3	21,2-45,1	42	48,3	37,4-59,3	>0,05
В1	2	3,1	0,4-10,7	10	11,5	5,6-20,1	>0,05
В2	26	40,0	28,0-52,9	15	17,2	10,0-26,8	<0,05
D	16	24,6	16,0-38,5	22	25,3	16,6-35,7	>0,05

Гены вирулентности диареогенных *E. coli* – возбудителей острых кишечных инфекций (ОКИ) были обнаружены у одного штамма, выделенного при ЯК, который принадлежал к новой патогруппе DEC – энтероагрегативные *E. coli* (EAgEC), вызывающие диарейные заболевания детей и взрослых [13, 14]. EAgEC характеризуются специфическим феноменом агрегационной адгезии к эпителиальным клеткам в виде «сложенной кирпичной кладки». Исследования, проведенные в странах Северной и Южной Америки, Персидского залива, Азии, Африки, Восточной Европы и России, показали, что EAgEC чаще, чем другие бактериальные патогены (*Campylobacter* spp., *Salmonella enterica*) являются причиной диарей у детей [15, 16]. EAgEC-инфекция относится к антропонозам, ее резервуаром и источником является человек – бессимптомный носитель этого возбудителя.

Гены вирулентности ExPEC содержали 96,9% штаммов, выделенных при ОА, и 89,7% – при ЯК. Гены адгезии *fimH* (фимбрии 1 типа), *pap* (структурная субъединица пиелонефрит-ассоциированных пилей), *sfa* (S-фимбрии), *afa* (афимбриальные адгезины) обнаруживали с разной частотой без значимых различий ($p > 0,05$) в штаммах *E. coli*, выявленных при острых и хронических заболеваниях кишечника. Ген *fimH* значимо чаще ($p < 0,05$) присутствовал в изолятах

ОФА (87,7%) и ЯК (78,2%) по сравнению с другими генами адгезии (*pap*, *sfa*, *afa*).

Кодирующий продукцию α-гемолизина ген *hlyA* в два раза чаще отмечали в штаммах, выделенных при ЯК (17,2%), по сравнению с ОА (9,2%). В штаммах *E. coli*, изолированных при ЯК (29,2%), значимо чаще ($p < 0,05$) присутствовал ген, ответственный за синтез цитонекротического фактора (*cnf*); в штаммах, выделенных при ОА (53,8%), значимо чаще присутствовал ген, кодирующий синтез аэробактина (*iutA*) (табл. 2).

Таблица 2

Гены вирулентности штаммов *E. coli*, выделенных при остром аппендиците и язвенном колите

Ген вирулентности	острый аппендицит			язвенный колит			p
	абс.	%	95% ДИ	абс.	%	95% ДИ	
<i>fimH</i>	57	87,7	77,2-94,5	68	78,2	68,0-86,3	>0,05
<i>pap</i>	17	26,2	16,0-38,5	32	36,8	26,7-47,8	>0,05
<i>afa</i>	8	12,3	5,5-22,8	5	5,7	1,9-12,9	>0,05
<i>sfa</i>	4	6,2	1,7-15,0	18	20,7	12,8-30,7	>0,05
<i>hlyA</i>	6	9,2	3,5-19,0	15	17,2	10,0-26,8	>0,05
<i>cnf</i>	7	10,8	4,4-19,9	26	29,9	20,5-40,7	<0,05
<i>iutA</i>	35	53,8	41,0-66,3	17	19,5	11,8-29,4	<0,05

По набору генов ExPEC в штаммах *E. coli*, выделенных при ЯК, выявлены 24 индивидуальных спектра вирулентности, включающих от одного до семи генов, в штаммах ОА – 16 спектров (от одного до шести генов). Из них семь спектров вирулентности, включающих один ген (*fimH*), два гена (*fimH+pap*, *fimH+afa*, *fimH+hlyA*), три гена (*fimH+pap+afa*, *fimH+pap+iut*) и четыре гена (*fimH+pap+cnf+iut*) без значимых различий ($p > 0,05$), обнаружили в штаммах *E. coli*, выделенных при острых и хронических заболеваниях кишечника (табл. 3).

Таблица 3

Генотипы вирулентности штаммов *E. coli*, выделенных при остром аппендиците и язвенном колите

Гены, кодирующие факторы вирулентности	острый аппендицит			язвенный колит		
	абс.	%	95% ДИ	абс.	%	95% ДИ
Отсутствуют гены ExPEC	2	3,1	0,4-10,7	9	10,3	4,8-18,7
Присутствуют гены ExPEC	63	96,9	89,3-99,6	78	89,7	81,3-95,2
1 ген вирулентности	17	26,2	16,0-38,5	28	32,2	22,6-43,1
<i>fimH</i> *	11	16,9	8,8-28,3	23	26,4	17,6-37,0
<i>pap</i>	-	-	-	2	2,3	0,3-8,1
<i>sfa</i>	-	-	-	2	2,3	0,3-8,1
<i>cnf</i>	-	-	-	1	1,1	0-6,2
<i>iutA</i>	6	9,2	3,5-19,0	-	-	-
2 гена вирулентности	29	44,6	32,3-57,5	21	24,1	15,6-34,5
<i>fimH+pap</i> *	2	3,1	0,4-10,7	5	5,7	1,9-12,9
<i>fimH+afa</i> *	5	7,7	2,5-17,1	1	1,1	0-6,2
<i>fimH+sfa</i>	-	-	-	1	1,1	0-6,2

<i>fimH+hlyA</i> *	2	3,1	0,4-10,7	1	1,1	0-6,2
<i>fimH+cnf</i>	-	-	-	8	9,2	4,1-17,3
<i>fimH+iutA</i>	20	30,8	19,9-43,5	-	-	-
<i>pap+afa</i>	-	-	-	2	2,3	0,3-8,1
<i>pap+sfa</i>	-	-	-	3	3,4	0,7-9,8
3 гена вирулентности	11	16,9	8,8-28,3	10	11,5	6,7-20,1
<i>fimH+pap+afa</i> *	1	1,5	0-8,3	1	1,1	0-6,2
<i>fimH+pap+sfa</i>	-	-	-	6	6,9	2,6-14,4
<i>fimH+pap+hly</i>	1	1,5	0-8,3	-	-	-
<i>fimH+pap+cnf</i>	3	4,6	0,9-12,9	-	-	-
<i>fimH+pap+iutA</i> *	4	6,2	1,7-15,0	1	1,1	0-6,2
<i>fimH+afa+iutA</i>	2	3,1	0,4-10,7	-	-	-
<i>fimH+hly+cnf</i>	-	-	-	2	2,3	0,3-8,1
4 гена вирулентности	3	4,6	0,9-12,9	8	9,2	4,1-17,3
<i>fimH+pap+afa+iutA</i>	-	-	-	1	1,1	0-6,2
<i>fimH+pap+sfa+cnf</i>	2	3,1	0,4-10,7	-	-	-
<i>fimH+pap+sfa+iutA</i>	-	-	-	1	1,1	0-6,2
<i>fimH+pap+cnf+iutA</i> *	1	1,5	0-8,3	1	1,1	0-6,2
<i>fimH+afa+hly+cnf</i>	-	-	-	1	1,1	0-6,2
<i>fimH+hly+cnf+iutA</i>	-	-	-	4	4,6	1,3-11,4
5 генов вирулентности	2	3,1	0,4-10,7	7	8,0	3,3-15,9
<i>fimH+pap+sfa+hly+cnf</i>	1	1,5	0-8,3	-	-	-
<i>fimH+pap+sfa+cnf+iutA</i>	-	-	-	2	2,3	0,3-8,1
<i>fimH+pap+hly+cnf+iutA</i>	1	1,5	0-8,3	5	5,7	1,9-12,9
6 генов вирулентности	1	1,5	0-8,3	1	1,1	0-6,2
<i>fimH+pap+sfa+hly+cnf+iutA</i>	1	1,5	0-8,3	1	1,1	0-6,2
7 генов вирулентности	-	-	-	3	3,4	0,7-9,8
<i>fimH+pap+afa+sfa+hly+cnf+iutA</i>	-	-	-	3	3,4	0,7-9,8

* - спектры вирулентности штаммов, выделенных при ОА и ЯК

В соответствии с критериями [17], к истинным возбудителям ExPEC (наличие двух и более генов вирулентности) отнесены 50 (64,1%) штаммов, выделенных при ЯК, и 46 (73,0%) – при ОА.

Девять (10,3%) штаммов и два (3,1%), выделенные при ЯК и ОА соответственно, не имели искомым генов вирулентности ExPEC и были расценены нами как представители нормобиоты.

Острый аппендицит – наиболее частое хирургическим заболевание, на долю которого в современной гастроэнтерологии и хирургии приходится около 90%. Несмотря на достижения в области диагностики и совершенствование хирургических методов лечения, послеоперационные осложнения составляют 5-9%, летальность – 0,1-0,3%. Известным осложнением аппендэктомии является развитие послеоперационных внутрибрюшных абсцессов и перитонита. Адекватная антибактериальная терапия наряду с хирургическим вмешательством – важнейший компонент ле-

чения осложненных и неосложненных ОА, а результаты микробиологического исследования – основа целенаправленного режима антибактериальной терапии [5, 18].

В Европейском консенсусе ЕССО по диагностике и лечению ЯК представлены рекомендации по использованию АМП при всех тяжелых атаках ЯК, протекающих с фебрильной температурой. Назначение АМП при ЯК является эффективной профилактикой септических осложнений и развития токсической дилатации ободочной кишки. В качестве препаратов первой линии применяют комбинации фторхинолонов с метронидазолом, в качестве второй линии – карбапенемы [19].

Чувствительными ко всем тестируемым АМП были восемь (12,3%) штаммов, выделенных при ОА, и семь (8,0%) – при ЯК. Высокие доли чувствительности штаммов *E. coli*, изолированных при острых и хронических заболеваниях кишечника, отмечены к меропенему (100%), нитрофурантоину (100%/87,4%) и амикацину (96,9%/95,4%) соответственно (табл. 4).

Таблица 4

Резистентность к антибиотикам штаммов *E. coli*, выделенных при остром аппендиците и язвенном колите

Антимикробный препарат	острый аппендицит			язвенный колит		
	абс.	%	95% ДИ	абс.	%	95% ДИ
ампициллин	45	69,2	56,6-80,1	66	75,9	65,5-84,4
амоксиклав	23	35,4	23,9-48,2	31	35,6	25,7-46,6
цефтазидим	20	30,8	18,6-41,8	24	27,6	18,5-38,2
цефотаксим	22	33,8	22,6-46,7	28	32,2	22,6-43,1
цефепим	22	33,8	22,6-46,7	28	32,2	22,6-43,1
меропенем	0	0	0-5,5	0	0	0-4,2
налидиксовая кислота	40	61,5	48,6-73,4	27	31,0	21,6-41,9
ципрофлоксацин	42	64,6	51,8-76,1	29	33,3	23,6-44,3
гентамицин	25	38,5	26,7-51,4	40	46,0	35,2-57,0
амикацин	2	3,1	0,4-10,7	4	4,6	1,3-11,4
тетрациклин	33	50,8	38,1-63,4	69	79,3	69,3-87,3
хлорамфеникол	4	6,2	1,7-15,0	31	35,6	25,7-46,6

Устойчивость к β-лактамам была наиболее выражена к аминопенициллинам – 62,9% *E. coli*, выделенных при ОА, и 75,9% – при ЯК. Резистентность к амоксиклаву отмечена у 1/3 штаммов, выявленных при ОА и ЯК. Чувствительность к цефалоспорином (ЦРС) III-IV поколения (цефтазидим, цефотаксим, цефепим) сохраняли около 70% изученных штаммов. Положительный тест с клавулановой кислотой установлен у всех резистентных к ЦРС штаммов, что указывало на продукцию БЛРС.

MDR-фенотипом характеризовались 78,5% штаммов, выделенных при ОА, из них продуцентами БЛРС были 49,0%. В геномах штаммов ОА обнаружены гены β-лактамаз молекулярного класса А (TEM, SHV, CTX-M), статистически значимо чаще

– *bla*_{CTX-M} (78,9%), по сравнению с генами *bla*_{TEM} (31,6%) и *bla*_{SHV} (5,3%). При ЯК 81,3% штаммов характеризовались MDR-фенотипом, из них продуцентами БЛРС были 69,2%. В геномах *E. coli* при ЯК выявлены гены β-лактамаз двух молекулярных классов А и D (TEM, SHV, CTX-M и OXA), статистически значимо чаще выделяли гены *bla*_{CTX-M} (55,6%) и *bla*_{SHV} (55,6%) по сравнению с *bla*_{TEM} (24,4%) и *bla*_{OXA} (26,7%).

Резистентность к группе хинолонов (налидиксовая кислота) и фторхинолонов (ципрофлоксацин) в штаммах сравниваемых групп значимо выше была при ОА (61,6/64,5) по сравнению с ЯК (31,0/33,3).

Резистентность к группе аминогликозидов II (гентамицин) и III (амикацин) поколений отмечали в штаммах сравниваемых групп. Достоверные различия в частоте резистентных штаммов отсутствовали, значимые различия фармакодинамического преимущества выявлены у амикацина по сравнению с гентамицином: при ОА (3,1% и 38,5%) и при ЯК (4,6% и 46,0%).

При тестировании к препаратам других классов установлено, что штаммы *E. coli*, выделенные при ЯК, чаще были резистентны к тетрациклину (79,3%) и хлорамфениколу (35,6) по сравнению со штаммами, выявленными при ОА – 50,8 % и 6,2% соответственно.

Использование антимикробной терапии является оправданным в периоды обострения заболевания ЯК либо при развитии осложнений при ОА. Колонизация пораженных участков кишечника резистентными к АМП бактериями, входящими в кишечную микробиоту, может приводить к неэффективности проводимой антимикробной терапии. Для получения достоверных данных об этиологии ЯК и роли представителей микробиоты кишечника в патогенезе воспаления толстого кишечника требуется проведение дальнейших исследований. Особенно это становится актуальным в связи с широким распространением среди больных ЯК грамтрицательных бактерий с фенотипом множественной резистентности к АМП, продуцирующих БЛРС.

ВЫВОДЫ

1. Штаммы *E. coli*, выделенные при острых аппендицитах и хронических язвенных колитах, содержали комплекс генов вирулентности, что позволяет отнести их к патогенным *E. coli*, способным вызывать гнойно-воспалительные заболевания кишечника.
2. Штаммы *E. coli* характеризовались множественной устойчивостью к антимикробным препаратам разных групп. Резистентность к β-лактамам обусловлена продукцией БЛРС разных молекулярных классов, значимо чаще генетического семейства CTX-M – глобально распространенного в популяции грамтрицательных бактерий.

3. При назначении антимикробной терапии необходимо учитывать тенденции развития резистентности в популяции *E. coli* – возбудителей острых и хронических заболеваний желудочно-кишечного тракта.

4. Профилактика осложнений и рецидивов заболеваний желудочно-кишечного тракта должна включать меры, направленные на коррекцию нормобиоты

кишечника, – снижение доли облигатных *E. coli*, способных к реализации патогенного потенциала и нарушению барьерных функций эпителия кишечника.

5. Впервые у пациента с язвенным колитом из биоптата выделен штамм EAgEC – возбудитель острых и хронических диарейных заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Erjavec M.S., Zgur-Bertok D. Virulence potential for extraintestinal infections among commensal *Escherichia coli* isolated from healthy humans – the Trojan horse within our gut. FEMS Microbiol Lett. 2015; 362 (5): fnu061. doi: 10.1093/femsle/fnu061.
2. Johnson J.R., Russo T.A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. EcoSal Plus. 2018; 8 (1): 29667573. doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0004-2017.
3. Dale A.P., Woodford N. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. J. Infect. 2015; 71(6): 615-626. doi: 10.1016/j.jinf.2015.09.009.
4. Zhang S.L., Wang S.N., Miao C.Y. Influence of microbiota on intestinal immune system in ulcerative colitis and its intervention. Front. Immunol. 2017; 8: 1674. doi: 10.3389/fimmu.2017.01674.
5. Чепурная И.М., Русанова Е.В., Шагинян И.А., Захаров Ю.В. Этиология интраабдоминальных инфекций (обзор). Альманах клинической медицины. 2012; 26: 83-87. [Chepurnaya I.M., Rusanova E.V., Shaginyan I.A., Zakharov Y.V. Etiology of intra-abdominal infections: review. Almanac of Clinical Medicine. 2012; 26: 83-87 (In Russ)].
6. Каторкин С.Е., Жестков А.В., Суворова Г.Н. и др. Комплексная характеристика клинических, патоморфологических, микробиологических особенностей язвенного колита. Воен.-мед. журн. 2019; 340 (10): 68-71. [Katorkin S.E., Zhestkov A.V., Suvorova G.N., et al. Complex characteristics of the clinical, pathomorphological, microbiological features of ulcerative colitis. Military medical Journal 2019; 340 (10): 68-71 (In Russ)].
7. Johnson J.R., Stell A.L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. Infect. Dis. 2000; 181: 261-272. doi: 10.1086/315217.
8. Dallenne C., Da Costa A., Decre D., et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in *Enterobacteriaceae*. Antimicrob. Chemother. 2010; 65: 490-495. doi:10.1093/jac/dkp498
9. Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. Appl. Environ. Microbiol. 2000; 66 (10): 4555-8. doi:10.1128/aem.66.10.4555-4558.2000.
10. Клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам». Режим доступа: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrec-dsma2018.pdf>. [Guidelines «Antimicrobial susceptibility testing of microorganism». Available at:<http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrec-dsma2018.pdf> (In Russ)].
11. Эйдельштейн М.В. Выявление бета-лактамаз расширенного спектра у грамотрицательных бактерий с помощью фенотипических методов. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2001; 3 (2): 183-189. [Edelstein M.V. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in gram-negative bacteria using phenotypic methods. Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya. 2001; 3 (2): 183- 189 (In Russ)].
12. Magiorakos AP., Srinivasan A., Carey R.B., et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definition for acquired resistance. Clin. Microbiol. Infect. 2012; 18 (3): 268-281. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
13. Соколова Е.Д., Галтаева А.М., Замурий О.Ю. и др. Полимеразная цепная реакция в диагностике острых кишечных инфекций в детском инфекционном стационаре: возможности и проблемы. Инфекция и иммунитет. 2016; 6 (3): 225-231. [Sokolova E.D., Galtaeva A.M., Zamuriy O.Yu., et al. Polymerase chain reaction in the diagnosis of acute intestinal infections in the children's infectious diseases hospital: opportunities and problems. Infektsiya i immunitet. 2016; 6 (3): 225-31 (In Russ)].
14. Pabalan N., Singian E., Jarjanazi H., Steiner T.S. Enteroaggregative *Escherichia coli* and acute diarrhea in children: a meta-analysis of South Asian populations. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2013; 32: 597-607. doi:10.1007/s10096-012-1779-3.
15. Jensen B.H., Olsen K.E.P., Struve C., et al. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 2014; 27: 614-630. doi: 10.1128/CMR.00112-13.
16. Бондарева А.В., Горелов А.В., Подколзин А.Т., Николаева Т.А. Роль патогенных эшерихий в этиологической структуре острых кишечных инфекций у детей на современном этапе. Инфекционные болезни. 2012; 10 (1): 61.

- [Bondareva A.V., Gorelov A.V., Podkolzin A.T., Nikolaeva T.A. The role of pathogenic *Escherichia* in the etiological structure of acute intestinal infections in children at the present stage. *Infektsionnye bolezni*. 2012;10 (1): 61 (In Russ)].
17. Johnson J.R., Russo T.A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*. 2018; 8 (1): 29667573. doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0004-2017.
18. Козлов Р.С., Голуб А.В., Дехнич А.В., Сухорукова М.В. Антибиотикорезистентность грамотрицательных возбудителей осложненных интраабдоминальных инфекций в России. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2015; 17(3): С. 227-234. [Kozlov R.S., Golub A.V., Dekhnich A.V., Sukhorukova M.V. Antibiotic resistance of gram-negative pathogens of complicated intra-abdominal infections in Russia. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2015; 17 (3): С. 227- 234 (In Russ)].
19. Головенко О.В., Корнева Т.К., Михайлова Т.Л., Лягина И.А. Место антибиотиков в схемах лечения воспалительных заболеваний кишечника (обзор литературы). *Фарматека*. 2009; 13: 11-19. [Golovenko O.V., Korneva T.K., Mikhailova T.L., Lyagina I.A. The place of antibiotics in treatment regimens for inflammatory bowel diseases (review). *Pharmateca*. 2009; 13: 11-19 (In Russ)].

Поступила в редакцию журнала 08.12.2020

Рецензент: Л.А. Краева

ИЗУЧЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЦЕННОСТИ ВЫСОКОСЕЛЕКТИВНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИЙ РОДОВ *KLEBSIELLA* SPP. И *PROTEUS* SPP.

Шепелин А.П. (зам. директора), Полосенко О.В. (в.н.с.)*, Храмов М.В. (зам. директора), Марчихина И.И. (зав. лаб.)

Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk, Московская область, Россия

В последнее время спектр возбудителей внутрибольничных инфекций постоянно расширяется. Среди значимых из семейства *Enterobacteriaceae* в эпидемиологическом отношении отмечают представителей родов *Klebsiella* и *Proteus*.

Основным методом диагностики инфекций, вызываемых энтеробактериями, является бактериологический. В статье описаны питательные среды, применяемые в практике микробиологических исследований при клебсиеллезной и протейной инфекциях. Представлены данные по изучению диагностической ценности высокоселективных питательных сред отечественного производства: «дифференциально-элективная питательная среда для выделения клебсиелл» и «дифференциально-диагностическая питательная среда для выделения бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*» и их сравнительный анализ с питательными средами, используемыми в современных условиях. Качество испытываемых сред оценивали по основным биологическим показателям на широком наборе тест-штаммов: чувствительность, скорость роста, дифференцирующие и ингибирующие свойства.

Ключевые слова: питательные среды, энтеробактерии, селективность, чувствительность, дифференцирующие свойства

EVALUATING OF THE DIAGNOSTIC VALUE OF HIGHLY SELECTIVE CULTURE MEDIA FOR ISOLATION OF BACTERIA OF THE GENUS *KLEBSIELLA* SPP. AND *PROTEUS* SPP.

Shepelin A.P. (deputy director), Polosenko O.V. (leading scientific researcher), Khramov M.V. (deputy director), Marchikhina I.I. (head of the laboratory)

* Контактное лицо: Полосенко Ольга Вадимовна,
e-mail: polosenko.olga@yandex.ru

The spectrum of pathogens causing nosocomial infections is constantly expanding. Among the most significant of the Enterobacteriaceae family in epidemiological terms are representatives of the genera Klebsiella and Proteus.

The main method of diagnosis of infections caused by enterobacteria is bacteriological. The nutrient media used in microbiological research of Klebsiella-associated and Proteus infections have been described in the article. There are data on evaluating of the diagnostic potential of highly selective domestic nutrient media, such as "differential-elective culture medium to isolate Klebsiella" and "differential-diagnostic medium to isolate bacteria of the genera Proteus, Morganella, Providencia" and their comparative analysis with nutrient media used in modern conditions. The media were tested for quality based on their key biological parameters (sensitivity, growth rate, differentiating and inhibiting properties) using a wide range of test strains.

Key words: culture media, enterobacteria, selectivity, sensitivity, differentiating properties

ВВЕДЕНИЕ

По критериям патогенности семейство *Enterobacteriaceae* включает практически все категории микроорганизмов. Наибольшую группу составляют условно-патогенные виды, адаптированные к обитанию в нестерильных областях организма и входящие в состав нормальной микрофлоры. Их вирулентный потенциал весьма вариабелен, но они выступают частыми возбудителями поражений у человека (например, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* или *Proteus vulgaris*) [1].

Особую актуальность приобретают представители семейства *Enterobacteriaceae*, у которых отмечена бурная эволюция в сторону накопления факторов вирулентности и антибиотикорезистентности [2-4].

Наиболее ярким представителем таких бактерий является *Klebsiella pneumoniae*. Новые, гипервирулентные, варианты *K. pneumoniae* (hvKp) распространились сначала во внегоспитальных экологических нишах, вызывая опасные формы инфекций в виде гнойных абсцессов печени, эндофтальмитов и инфекций центральной нервной системы, а затем и в госпитальной среде. Клебсиеллы этого типа характеризуются наличием большого набора вирулентных свойств, способностью к мультиорганному распространению в пораженном организме и высоким уровнем смертности [5, 6].

В настоящее время опубликовано уже достаточно много сообщений о формировании генетических линий *K. pneumoniae*, обладающих одновременно свойствами гипервирулентных и мультирезистентных патогенов, в том числе – в России [7, 8].

Лабораторную диагностику клебсиеллезной инфекции традиционно осуществляют бактериологиче-

ским методом путем выделения и идентификации возбудителя из клинического материала на широко известных питательных средах: Эндо, Левина, МакКонки, К-2 (МПА с мочевиной, раффинозой и бромтимоловым синим) др. Из-за слабой селективности и дифференциации использование таких питательных сред в бактериологической практике диагностики клебсиеллезов малоинформативно, так как рост других грамотрицательных бактерий осложняет работу бактериологов по отбору колоний, характерных именно для клебсиелл, и их дальнейшей идентификации. Поэтому для определения принадлежности выделенных культур к клебсиеллам необходима постановка целого ряда подтверждающих тестов, а, следовательно, значительного времени и материальных затрат [9].

Известны питательные среды для выделения клебсиелл, принцип действия которых основан на утилизации преимущественно клебсиеллами инозита или рамнозы с одновременным добавлением антибиотиков или других ингибиторов сопутствующей микрофлоры (желчные соли, кристаллический фиолетовый и др.). Стандартами ISO для выделения клебсиелл являются модифицированные среды МакКонки с инозитом, обладающие более высокими селективными свойствами, чем традиционные среды, но недостаточными для подавления *Serratia* spp. Дифференциация колоний клебсиелл от серраций по морфологии на этих средах весьма затруднительна.

В настоящее время возросла потребность в применении высокоселективных сред для выделения бактерий рода *Klebsiella* spp., которые могут ускорить выделение патогена из клинического образца. Быстрота получения результатов при микробиологических исследованиях в значительной степени влияет на диагностику, проведение терапевтических и противоэпидемических мероприятий.

Ряд представителей рода *Proteus* представляют большой интерес для микробиологов и инфекционистов, так как в последнее время они часто (примерно в 25% случаев) становятся причиной вторичных воспалительных процессов у человека. Что касается внутрибольничных инфекций, то наиболее часто протеи обнаруживают в гное из послеоперационных ран урологических больных и пациентов с трофическими язвами. Клинически значимыми штаммами протея являются *P. mirabilis*, *P. rettgeri* и *P.morganii*. Реже из биологических материалов выделяют *P. vulgaris*. Несмотря на чувствительность *P. mirabilis* к антибиотикам, описаны случаи вспышек инфекции, вызываемой штаммами, устойчивыми одновременно к нескольким препаратам [11].

Бактериологический метод остается основным и наиболее достоверным способом диагностики протейной инфекции. Диагноз инфекции, вызванной *Proteus* spp., зависит от результатов культурального

выделения микроорганизма. Для целей клинической микробиологии применяют ряд широко известных питательных сред, таких как среда Эндо, агар с эозин-метиленовым синим, среда Плоскирева. Слабоселективные среды без внесения соответствующих ингибиторов – антибиотиков, растворов хлоралгидрата или других компонентов, обычно не справляются с вуалеобразным ростом протеев.

Действующие до настоящего времени методические рекомендации «Определение грамотрицательных потенциально патогенных бактерий – возбудителей внутрибольничных инфекций» для выявления бактерий родов *Proteus* и *Providencia* рекомендуют посев материала осуществлять на среду П-2, в состав которой в качестве селективных агентов входят желчные соли по Олькеницкому, кристаллический фиолетовый и полимиксин [11].

Рост протеев в виде изолированных колоний можно наблюдать на таких многокомпонентных питательных средах, как ксилозо-лизиновый дезоксихолатный агар (XLD), лактозный агар с тергитолом 7. Но они, как правило, обеспечивают рост и других грамотрицательных бактерий [12-14].

При переходе к современным методам исследования большое значение приобретает унификация процедуры выполнения используемых методик. Для усовершенствования этих методов микробиологического анализа при выделении протеев актуально применение эффективных высокоселективных питательных сред.

В работе представлены данные по изучению диагностической ценности высокоселективных питательных сред для выделения бактерий родов *Klebsiella* spp. и *Proteus* spp. и их сравнительный анализ с питательными средами, используемыми в настоящее время.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучены 155 тест-штаммов микроорганизмов, полученных из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур ФБУН «ГНЦ ПМБ»: тест-штаммы энтеробактерий для определения специфической активности питательных сред по показателям чувствительности, скорости роста и проявлению типичных морфологических свойств и грамположительные тест-штаммы для определения ингибирующих свойств питательных сред.

Взвеси тест-штаммов готовили в 0,9% растворе хлорида натрия в концентрации, соответствующей 10 единицам по стандартному образцу мутности бактериальных взвесей ГИСК им. Л.А. Тарасевича (ОСО 42-28-59-86П). Исходные взвеси доводили до нужных концентраций, используемых при исследованиях.

Для сравнительного изучения биологических показателей «дифференциально-элективной питательной среды для выделения клебсиелл» применяли модифицированный агар МакКонки, (MacConkey Agar, Modified) (HiMedia Laboratories Pvt Ltd); для «дифференциально-диагностической питательной среды для выделения бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*» – среду лабораторного приготовления П-2 согласно методическим рекомендациям «Определение грамотрицательных потенциально патогенных бактерий – возбудителей внутрибольничных инфекций» [11].

Приготовление сухих питательных сред осуществляли в соответствии с инструкциями по применению, изучение диагностической ценности (специфическая активность: чувствительность, скорость роста, дифференцирующие и ингибирующие свойства) – согласно МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред» [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Питательные среды для выделения клебсиелл.

Наибольшим ингибирующим эффектом для придания селективных свойств питательным средам обладают соли основных желчных кислот – холевой и дезоксихолевой. При разработке сухой «дифференциально-элективной питательной среды для выделения клебсиелл» в качестве селективного компонента были использованы сухие соли желчных кислот (СЖК), приготовленные по отечественной технологии. СЖК получали путем адсорбции примесей активированным углем с последующими стадиями фильтрации, щелочного гидролиза осветленной желчи 50%-ным раствором натрия гидроксида с последующим освобождением от непрогидролизированных белков и высокомолекулярных пептидов путем обработки хлористым барием, отстаивания осажденных примесей, осаждения желчных кислот в кислой зоне, их нейтрализации в щелочной среде, последующего осветления активированным углем, фильтрации и высушивания [16].

При конструировании среды было доказано, что наличие в среде, полученной по новой технологии СЖК, кристаллического фиолетового и карбенициллина в значительной степени ингибировало рост грамположительных микроорганизмов и большинства представителей семейства *Enterobacteriaceae*, панкреатический гидролизат рыбной муки и пептон мясной обеспечивали ростовые потребности клебсиелл в азотистом питании, а мезо-инозит в присутствии нейтрального красного – дифференциацию клебсиелл [17].

При сравнительном анализе биологического контроля «дифференциально-элективной питательной среды для выделения клебсиелл» и среды MacConkey Agar, Modified выявили, что обе среды

обеспечивали хорошие ростовые свойства тест-штаммов *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* 3534/51, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* 418 и *K. oxytoca*. Клебсиеллы, расщепляя инозит с образованием кислоты через 20-24 часа инкубации при 37 °С, формировали круглые, гладкие, слизистые колонии малинового цвета. Питательная среда полностью подавляла рост грамположительных бактерий: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. из разведений 10^4 . При посеве широкого набора тест-штаммов – представителей родов *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* и *Proteus* из разведений 10^5 была доказана хорошая ингибирующая способность сред. На среде сравнения, в отличие от «дифференциально-элективной питательной среды для выделения клебсиелл», в равнозначных условиях культивирования при тех же разведениях наблюдали рост *Serratia* spp. На всех средах при посеве из разведений 10^1 - 10^2 отмечали рост некоторых штаммов эшерихий, не мешающих выделению клебсиелл. В этом случае рост микроорганизмов рода *Escherichia*, не утилизирующих инозит, обнаруживали в виде круглых, гладких, бесцветных колоний.

Питательные среды для выделения протеев

В результате экспериментов по созданию «дифференциально-диагностической питательной среды для выделения бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*» обоснованно показано, что среда, содержащая в качестве белковой составляющей панкреатический гидролизат рыбной муки и пептон мясной, обеспечивает рост и выделение микроорганизмов не только рода *Proteus*, но и родов *Morganella* и *Providencia*. Наличие в среде кристаллического фиолетового и полимиксина В значительно ингибирует рост грамположительных микроорганизмов и большинства представителей семейства *Enterobacteriaceae*.

Согласно проведенным сравнительным исследованиям, «дифференциально-диагностическая питательная среда для выделения бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*» и среда П-2 при посеве по 0,1 мл микробной взвеси из разведения 10^6 через 20-24 ч инкубации при $t(37\pm 1)$ °С на всех засеянных чашках Петри обеспечивали рост тест-штаммов *Providencia alcalifaciens* NCTC 1068-50, *Proteus mirabilis* 3177, *Proteus vulgaris* HX 19 222, *Morganella morganii* 1518 в количестве не менее 30 колоний в виде: колонии *P. alcalifaciens* NCTC 1068-50 – круглые, гладкие, полупрозрачные, розового цвета диаметром от 1,5 до 2,5 мм, колонии *M. morganii* 1518 – круглые, гладкие, полупрозрачные, розового цвета диаметром от 1,5 до 2,5 мм. Колонии *P. mirabilis* 3177 на «дифференциально-диагностической питательной среде для выделения бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*» – полупрозрачные, розовые с темным центром, без

роения, диаметром от 1,0 до 2,5 мм. На среде П-2 отмечали незначительное почернение культуры, что свидетельствовало о слабых дифференцирующих свойствах среды.

«Дифференциально-диагностическая питательная среда для выделения бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*» обеспечивала рост *P. vulgaris* НХ 19 222 в виде круглых, гладких, полупрозрачных, желтоватых колоний без роения, со слабым пожелтением среды, иногда колонии имели темный центр, диаметром от 1,0 до 2,5 мм. На среде лабораторного приготовления П-2 рост тест-штамма *P. vulgaris* НХ 19 222 при посеве из разведения 10^{-6} отсутствовал, тогда как при посеве более высокой концентрации 10^{-4} - 10^{-5} наблюдали рост в виде гладких, полупрозрачных, желтоватых колоний.

При посеве широкого набора тест-штаммов энтеробактерий – представителей родов *Escherichia*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Klebsiella* из разведений 10^{-4} - 10^{-5} была показана достаточная для выделения и дифференциации ингибирующая способность обеих сред.

Обе испытываемые среды подавляли рост бактерий рода *Streptococcus* и *Staphylococcus* при посеве по 0,1 мл микробной взвеси из разведения 10^{-4} на всех засеянных чашках Петри через 20-24 ч инкубации при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

При исследовании высокоселективной «дифференциально-диагностической питательной среды для выделения бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*» в сравнении со средой лабораторного приготовления П-2 выявили, что сухая среда удоб-

нее в использовании и обладает большей чувствительностью.

ВЫВОДЫ

Внесение в «дифференциально-элективную питательную среду для выделения клебсиелл» желчных солей отечественного производства позволило получить среду с хорошими ростовыми свойствами в отношении клебсиелл и, в совокупности с карбенициллином и кристаллическим фиолетовым, обладающую выраженным ингибирующим эффектом в отношении грамположительных бактерий и большинства представителей семейства *Enterobacteriaceae*. Питательная среда зарегистрирована в установленном порядке в Росздравнадзоре, получено Регистрационное удостоверение № РЗН 2020/12517 от 11 ноября 2020 г.

При сравнительной оценке качества дифференциально-диагностических питательных сред по селективным свойствам установлено преимущество питательной среды для выделения бактерий родов *Proteus*, *Providencia*, *Morganella* по сравнению со средой лабораторного приготовления П-2 по чувствительности при росте тест-штамма *P. vulgaris* НХ 19 222. Кроме того, ее применение дополнительно позволило по фенотипическим признакам дифференцировать изоляты протеев по способности образовывать сероводород.

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шепелин А.П., Дятлов И.А. Питательные среды для энтеробактерий. Монография. Изд. Династия. 2017: 230 с. [Shepelin A.P., Dyatlov I.A. Nutrient media for enterobacteria. Monografia. Ed. Dinastia. 2017: 230 p (In Russ)]
2. Анганова Е.В., Распопина Л.В., Ветохина А.В., Духанина А.В. Антибиотикоустойчивость *Klebsiella pneumoniae* к препаратам цефалоспоринового ряда. Микробиология и вирусология. 2017; 2 (4): 43-47. [Anganova E.V., Raspopina L.V., Vetohina A.V., Duhanina A.V. Antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* to cephalosporin preparations. Microbiology and Virology. 2017; 2 (4): 43-47 (In Russ)].
3. Козлова Н.С., Баранцевич Н.Е., Баранцевич Е.П. Чувствительность к антибиотикам штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в многопрофильном стационаре. Инфекция и иммунитет. 2018; 8 (1): 79-84 [Kozlova N.S., Barantsevich N.E., Barantsevich E.P. Susceptibility to antibiotics in *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in a multidisciplinary medical centre. Russian Journal of Infection and Immunity. 2018;8 (1):79-84 (In Russ)]. doi.org/10.15789/2220-7619-2018-1-79-84
4. Fursova N.K., Astashkin E.I., Knyazeva A.I., et al. The spread of blaOXA-48 and blaOXA-244 carbapenemase genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter* spp. isolated in Moscow, Russia. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2015; 14:46. dx.doi.org/10.1186/s12941-015-0108-y
5. Sachdev D.D., Yin M.T., Horowitz J.D., et al. *Klebsiella pneumoniae* K1 liver abscess and septic endophthalmitis in a U.S. resident. J. Clin. Microbiol. 2013; 51:1049e 51. dx.doi.org/10.1128/JCM.02853-12.
6. Prokesch B.C., TeKippe M., Kim J., et al. Primary osteomyelitis caused by hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. Lancet Infect. Dis. 2016; 16: e190e5. dx.doi.org/10.1016/S1473-3099 (16)30021-4
7. Lev A.I., Astashkin E.I., Kislichkina A.A., et al. Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in 2012-2016 that differ by antibiotic resistance genes and virulence genes profiles. Pathog. Glob. Health. 2018;112 (3):142-151. dx.doi.org/10.1080/20477724.2018.1460949

8. *Albasha A.M., Osman E.H., Abd-Alhalim S., et al.* Detection of several carbapenems resistant and virulence genes in classical and hyper-virulent strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated from hospitalized neonates and adults in Khartoum. BMC Res Notes. 2020; 13 (1): 312. DOI: dx.doi.org/10.1186/s13104-020-05157-4
9. *Полосенко О.В., Шепелин А.П., Фурсова Н.К.* Современный подход к проблеме выделения клебсиелл с использованием питательных сред. Справочник заведующего КДЛ. 2020; 9: 23-34 [Polosenko O.V., Shepelin A.P., Fursova N.K. A modern approach to the problem of *Klebsiella* isolation using nutrient media. Directory of the head of the CDL. 2020; 9: 23-34 (In Russ)].
10. *Борзилов А.И., Коробова О.В., Комбарова Т.И. и др.* Эффективность бактериофага Pm3 при лечении летальной инфекции у мышей, обусловленной *Proteus mirabilis*. Материалы V Национального конгресса бактериологов. 2019: 18-19 [Borzilov A.I., Korobova O.V., Kombarova T.I., et al. Efficacy of Pm3 bacteriophage in the treatment of lethal infection in mice caused by *Proteus mirabilis*. Proceedings of the V National Congress of bacteriologists. 2019: 18-19 (In Russ)].
11. *Определение* грамотрицательных потенциально-патогенных бактерий – возбудителей внутрибольничных инфекций М., 1986. Утв. 03.06.1986 Минздрав РСФСР. Дата актуализации 01.02.2020 [Determination of gram-negative potentially pathogenic bacteria-pathogens of nosocomial infections M., 1986. Approved 03.06.1986 by Russian Federation Minzdrav. Date of actualization 01.02.2020 (In Russ)].
12. *Шепелин А.П., Полосенко О.В.* Идентификация протеев на отечественных питательных средах. Материалы V Национального конгресса бактериологов. Изд. Династия, 2019: 87. [Shepelin A.P., Polosenko O.V. Identification of *Proteas* on domestic nutrient media. Proceedings of the V National Congress of Bacteriologists. Ed. Dynasty, 2019: 87 (In Russ)].
13. *Шепелин А.П., Полосенко О.В.* Сравнительный анализ питательных сред для выделения протеев. Бактериология. 2019; 4 (3): 31-37 [Shepelin A.P., Polosenko O.V. Comparative analysis of nutrient media for *Proteus* isolation. Bacteriology. 2019; 4 (3): 31-37 (In Russ)].
14. *Шепелин А.П., Полосенко О.В.* Современные возможности культурального метода выявления протеев. Современная лабораторная диагностика. 2019. 3: 28-30. [Shepelin A.P., Polosenko O.V. Modern possibilities of the cultural method of detecting *Proteas*. Modern laboratory diagnostics. 2019. 3: 28-30 (In Russ)].
15. *Методы контроля* бактериологических питательных сред. Методические указания. МУК 4.2.2316-08. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008: 67 с. [Modern possibilities of the cultural method of detecting *Proteas*. Modern laboratory diagnostics, 2008: 67 p. (In Russ)].
16. *Шепелин А.П., Марчихина И.И., Шолохова Л.П., Полосенко О.В., Миронова Е.Н.* Способ производства сухих очищенных солей желчных кислот для бактериологии. Патент RU 2705314 C1 Рос. Федерация: МПК: C12N 1/20, A61K 31/575, заявитель и патентообладатель ФБУН ГНЦ ПМБ. Заявл. 2019.03.18; опубл. 2019.11.06 [Shepelin A.P., Marchikhina I.I., Sholokhova L.P., Polosenko O.V., Mironova E.N. Method of production of dry purified bile acid salts for bacteriology. Patent RU 2705314 C1 ROS. Federation: IPC: C12N 1/20, A61K 31/575, applicant and patent holder of the Federal state budgetary INSTITUTION SSC PMB. Appl. 2019.03.18; publ. 2019.11.06 (In Russ)].
17. *Шепелин А.П., Марчихина И.И., Полосенко О.В., Шолохова Л.П.* Дифференциально-элективная питательная среда для выделения клебсиелл. Патент RU 2704854 C1; МПК C12N 1/20, C12Q 1/04, C12R 1/01 заявитель и патентообладатель ФБУН ГНЦ ПМБ. № 2019107617. Заявл. 2019.03.18; опубл. 2019.10.31 [Shepelin A.P., Marchikhina I.I., Polosenko O.V., Sholokhova L.P. Differential-elective nutrient medium for *Klebsiella* isolation. Patent RU 2704854 C1; IPC C12N 1/20, C12Q 1/04, C12R 1/01 applicant and patent holder of the Federal state budgetary INSTITUTION SSC PMB. № 2019107617. Appl. 2019.03.18; publ. 2019.10.31 (In Russ)].

Поступила в редакцию журнала 09.12.2020

Рецензент: Л.А. Кафтырева