

EDITORIAL BOARD

Chief Editor —

N.P. Yelinov — Ph.D., prof. (Russia)

Deputies Chief Editor —

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

N.N.Klimko — M.D., prof. (Russia)

Responsible secretary —

T.S. Bogomolova — Ph.D. (Russia)

SCIENTIFIC EDITORIAL BOARD

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

PROBLEMS IN MEDICAL MYCOLOGY

Vol. 17, № 3, 2015

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

ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

Том 17, № 3, 2015

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор —

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

Заместители главного редактора:

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

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

Ответственный секретарь —

Т.С. Богомолова — к.б.н. (Россия)

НАУЧНО-РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

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

СОДЕРЖАНИЕ

ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ И ОБЗОРЫ

- Маркин А.М., Ткаченко Г.А., Половец Н.В., Савченко С.С., Шаров Т.Н., Антонов В.А., Топорков А.В.* Разработка диагностического набора для индикации возбудителя бластомикоза с помощью ПЦР в режиме реального времени 3
- Хостелиди С.Н., Шагдилеева Е.В., Успенская О.С., Ружинская О.С., Рябыкина О.Е., Богомолова Т.С., Игнатьева С.М., Клишко Н.Н.* Случай успешного лечения мукороза легких у пациента с острым Т-клеточным лимфобластным лейкозом / лимфомой. Обзор литературы 7

КЛИНИЧЕСКАЯ МИКОЛОГИЯ

- Тараканова Л.А., Живописцева А.М., Семелев В.Н., Богданов А.Н., Шадривова О.В., Тыренко В.В., Клишко Н.Н.* Случай сочетанных инвазивных аспергиллеза и мукороза легких у больного острым промиелоцитарным лейкозом 12
- Мазуренко А.А., Захаров А.В., Русаков А.А., Ачкасов И.А., Бобылева О.А.* Микотический аортит, осложненный дистальной эмболией 17
- Билялова К.И., Аринова А.Ж., Темирбаева Ж.С.* Инфекции кровотока у гематологических больных 19
- Козлова Н.С., Баранцевич Н.Е., Иванова Л.В., Гоик В.Г., Баранцевич Е.П.* Антибиотикорезистентность энтеробактерий, выделенных из мочи пациентов многопрофильного стационара 22
- Купеева И.А., Разнатовский К.И., Раводин Р.А.* Разработка интеллектуальной системы поддержки принятия врачебных решений в дерматовенерологии 27
- Мавлянова Ш.З., Муминова С.Р., Гулямова Г.Ш., Есионова Е.В., Тешабаева Д.А.* Клинико-иммунологические и микробиологические аспекты атопического дерматита 32

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МИКОЛОГИЯ

- Васильева Н.В., Выборнова И.В., Богданова Т.В., Богомолова Т.С., Рауш Е.Р., Мамошин А.Н., Чилина Г.А., Гуранда Д.Ф., Гуранда Л.Д., Пикhtar А.В.* Антифунгальная активность субстанции «Бензилбензоат медицинский» in vitro 35
- Степанова А.А., Васильева Н.В., Чжан Ф., Тонг Д., Авдеенко Ю.Л., Богданов А.Н., Семелев В.Н., Шадривова О.В., Клишко Н.Н.* Электронно-микроскопическое изучение инвазивного аспергиллеза, обусловленного *Aspergillus fumigatus* 38
- Криворутченко Ю.Л., Кирсанова М.А., Андроновская И.Б.* Антифунгальное действие тритерпенового сапонина таурозида Sx1 из *Hedera taurica* Carr. в отношении клинических изолятов *Candida* spp. 42
- Пашинина О.А., Карташова О.Л., Пашкова Т.М., Попова Л.П.* Характеристика биофильей *Candida albicans*, выделенных у здоровых лиц и при патологии 46
- Ахмедова С.Д., Амирова И.А., Агаева Н.А.* Распространенность и клинико-микологическая характеристика дерматомикозов в Азербайджане 50
- Андреев В.А., Касанов К.Н., Сбойчаков В.Б., Степанова Н.В.* Сравнительная оценка некоторых антисептиков, полученных на основе нанотехнологий 54

ХРОНИКА И ИНФОРМАЦИЯ

- Елинов Н.П.* Заметки и рекомендации читателям от главного редактора журнала «Проблемы медицинской микологии» 59

CONTENTS

PROBLEM ARTICLES AND REVIEWS

- Markin A.M., Tkachenko G.A., Polovec N.V., Savchenko S.S., Sharov T.N., Antonov V.A., Toporkov A.V.* Development of a diagnostic kit for indication of causative agent of blastomycosis by real time PCR 3
- Khostelidi S.N., Shagdilееva E.V., Uspenskaya O.S., Ruzhinskaya O.S., Ryabykina O.E., Bogomolova T.S., Ignatyeva S.M., Klimko N.N.* The case of successful treatment of intestinal mucorosis in patients with acute leukemia. Review of the literature 7

CLINICAL MYCOLOGY

- Tarakanova L.A., Jivopistseva A.M., Semelev V.N., Bogdanov A.N., Shadrivova O.V., Turenko V.V., Klimko N.N.* A case of combined invasive aspergillosis and mucorosis of lungs in a patient with acute promyelocytic leukemia 12
- Mazurenko A.A., Zavoruev A.V., Rusakov A.A., Achkasov I.A., Bobyleva O.A.* Mycotic aortitis complicated by distal embolism 17
- Bilyalova K.I., Arinova A.J., Temirbayeva J.S.* Bloodstream infections in hematological patients 19
- Kozlova N.S., Barantsevich N.E., Ivanova L.V., Goik V.G., Barantsevich E.P.* Resistance to antibiotics in enterobacteriaceae, isolated from urine in a multidisciplinary medical centre 22
- Kupeeva I.A., Raznatovsky K.I., Ravodin R.A.* The development of intellectual support system clinical decisions in dermatology 27
- Mavlyanova Sh.Z., Muminova S.R., Gulyamova G.Sh., Esionova E.V., Teshabaeva D.A.* Clinico-immunological and microbiological aspects of atopic dermatitis 32

EXPERIMENTAL MYCOLOGY

- Vasilyeva N.V., Vybornova I.V., Bogdanova T.V., Bogomolova T.S., Raush E.R., Mamoshin A.N., Chilina G.A., Guranda D.T., Guranda L.D., Pikhatar A.V.* In vitro antifungal activity of benzilbenzoate medical 35
- Stepanova A.A., Vasilyeva N.V., Zhang F., Tong D., Avdeenko Y.L., Bogdanov A.N., Semelev V.N., Shadrivova O.V., Klimko N.N.* Electron-microscopic investigations of invasive aspergillosis caused with *Aspergillus fumigatus* 38
- Krivorutchenko Yu.L., Kirsanova M.A., Andronovskaya I.B.* Antifungal action of triterpenoid saponin Sx1 from *Hedera taurica* Carr. against clinical isolates of *Candida* species 42
- Pashinina O.A., Kartashova O.L., Pashkova T.M., Popova L.P.* Characteristic of *Candida albicans* bioprofiles allocated from healthy subjects and in pathology 46
- Ahmedova S.D., Amirova I.A., Aghayeva N.A.* Occurrence and clinico-mycological characteristics of dermatomycoses in Azerbaijan 50
- Andreev V.A., Kasanov K.N., Sboichakov V.B., Stepanova N.V.* Comparative evaluation of some antiseptics obtained on the basis of nanotechnology 54

CHRONICLE AND INFORMATION

- Yelinov N.P.* The notes and recommendations to readers from chief editor of the journal «Problems in medical mycology» 59

РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКОГО НАБОРА ДЛЯ ИНДИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ БЛАСТОМИКОЗА С ПОМОЩЬЮ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

**Маркин А.М. (н.с.)*, Ткаченко Г.А. (зав. лаб.),
Половец Н.В. (с.н.с.), Савченко С.С. (зав.
сектором), Шаров Т.Н. (н.с.), Антонов В.А. (зав.
отд.), Топорков А.В. (директор института)**

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Волгоград, Россия

© Коллектив авторов, 2015

Представлены результаты работы по подбору и анализу праймеров, направленных на обнаружение ДНК Blastomyces dermatitidis – возбудителя бластомикоза. Определение оптимальных параметров реакции амплификации с выбранными праймерами проводили на чистых культурах B. dermatitidis. Эффективность работы диагностического набора реагентов для индикации возбудителя бластомикоза в пробах биологического материала проверена в условиях моделирования заболевания на лабораторных животных.

Ключевые слова: бластомикоз, *Blastomyces dermatitidis*, набор реагентов, ПЦР в режиме реального времени

DEVELOPMENT OF A DIAGNOSTIC KIT FOR INDICATION OF CAUSATIVE AGENT OF BLASTOMYCOSIS BY REAL TIME PCR

**Markin A.M. (scientific collaborator), Tkachenko
G.A. (head of the laboratory), Polovec N.V. (senior
scientific collaborator), Savchenko S.S. (senior
scientific collaborator), Sharov T.N. (scientific
collaborator), Antonov V.A. (head of the laboratory),
Toporkov A.V. (head of the institute)**

Volgograd Research Institute for Plaque Control, Volgograd
Russia

© Collective of authors, 2015

The results of searching and analysis of primers designed to detect the DNA of the fungus Blastomyces dermatitidis, the causative agent of Blastomycosis have been presented. The determinations of the optimal parameters of the amplification reaction with selected primers were performed on pure cultures of B. dermatitidis. The efficiency of diagnostic reagent kit for indication the causative agent of blastomycosis in samples of biological material tested using a simulation of the disease in laboratory animals.

Key words: *Blastomyces dermatitidis*, blastomycosis, diagnostic kit, real-time PCR

Бластомикоз – особо опасное заболевание, этиологическим агентом которого является микромицет *Blastomyces dermatitidis*. Наиболее частые проявления заболевания: лихорадка, озноб, артралгия, миалгия, головная боль, непродуктивный кашель, кожные бородавчатые или язвенные поражения. Острая форма заболевания сходна и трудно дифференцируема с бактериальной пневмонией, хронической формой туберкулеза и раком легких. Существует молниеносная форма заболевания с развитием ОРДС (острый респираторный дистресс синдром). Причем в таком виде заболевание заканчивается в большинстве случаев летально [1]. В научной литературе представлены редкие случаи заболевания с поражением печени, селезенки, надпочечников, сердца, лимфатических узлов, центральной нервной системы, слизистых оболочек, костей и суставов, предстательной железы. Последнее наиболее интересно в плане отслеживания распространения инфекции, так как описаны случаи передачи инфекции при незащищенном половом контакте с больным бластомикозом, у которого имела место диссеминация возбудителя в предстательную железу [2].

По данным современных исследований, очерчена эндемичная зона бластомикоза в районе южных и восточных штатов США [3-5]. В Африке бластомикоз известен в 18 странах, однако большинство случаев заболевания регистрируют в южной части материка, особенно – в Южно-Африканской республике и Зимбабве [6]. Известны завозные случаи бластомикоза, например на Гавайских островах, а также некоторых странах Европы (Италия, Франция, Венгрия, Польша) [7, 8].

Случаи заболевания бластомикозом в Российской Федерации не регистрировали. Однако, исходя из данных о росте туристической и деловой активности между странами Африки, Северной и Южной Америки и Российской Федерацией, не исключена возможность появления больных на территории России. Нельзя забывать о вероятности применения возбудителя бластомикоза в качестве биологического оружия террористическими организациями. Таким образом, медицинским организациям, в частности клиническим лабораториям Российской Федерации, необходимо иметь быстрые и надежные средства для индикации и идентификации *B. dermatitidis* [9, 10]. На сегодняшний день полимеразная цепная реакция (ПЦР) дает возможность обеспечить быстрое и точное обнаружение возбудителя бластомикоза.

Наиболее перспективными мишенями для конструирования ПЦР-тест-систем могут быть гены, кодирующие различные типы белков, участвующих в формировании факторов патогенности. Ранее для этого широко использовали рибосомальные гены. Они обладают важными положительными характеристиками, например, многокопийностью, которая обеспечивает высокую чувствительность реакции амплификации. Ограничением является то, что у близкородственных микроорганизмов последовательности рРНК высоко консервативны, и высокая степень гомологии ограничивает специфичность амплификации [11].

Среди наиболее перспективных мишеней для разработки молекулярно-генетических диагностических тест-систем некоторые исследователи выделяют антигены клеточной стенки дрожжевой формы *B. dermatitidis* *Blastomyces adhesin 1* (BAD1) и α -(1,3)-

* Контактное лицо: Маркин Александр,
e-mail: alexander.markin.34@gmail.com

глюкан. BAD1 является фактором адгезии и модулирует иммунный ответ макроорганизма. Ген α -(1,3)-glucan кодирует фермент, ответственный за синтез α -1,3-глюкана клеточной стенки гриба, способствующий колонизации альвеол [12].

В настоящее время сконструированы и прошли комиссионные испытания несколько генодиагностических тест-систем, направленных на обнаружение других представителей группы особо опасных микромицетов. Это набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК возбудителей кокцидиоидомикоза *Coccidioides immitis* и *Coccidioides posadasii* методом полимеразой цепной реакции [13, 14] и набор реагентов для выявления ДНК микромицетов рода *Histoplasma* методом полимеразной цепной реакции [15].

Цель нашей работы – подбор праймеров и зонда для создания чувствительной и специфичной диагностической тест-системы для индикации возбудителя бластомикоза в пробах биологического материала.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования: штаммы *B. dermatitidis* 9, *B. dermatitidis* 2, *B. dermatitidis* 6/85. Изучали штаммы микромицета в мицелиальной и дрожжевой формах. Также в работе использовали гетерологичные микроорганизмы: по 3 штамма *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *C. posadasii*, *Cryptococcus neoformans*.

Работу с микромицетами осуществляли в соответствии с требованиями нормативных документов: СП 1.3.3118-13 Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности), СП 1.3.2322-08 Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней [16, 17].

Моделирование бластомикозной инфекции проводили посредством заражения белых мышей внутрибрюшинно по 0,1 мл взвеси микромицета *B. dermatitidis* 6/85 в концентрации $5 \cdot 10^6$ клеток/мл. Равное количество мышей заражали возбудителем в мицелиальной и дрожжевой формах.

Молекулярную структуру праймеров анализировали с использованием компьютерных программ Unipro UGENE: 1.11.1. Олигонуклеотидные праймеры и зонд синтезированы ЗАО «Синтол» (Москва). Реакционная смесь для проведения ПЦР в объеме 25 мкл содержала: исследуемую ДНК, специфические прямые и обратные праймеры, флуоресцентные зонды, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (дНТФ), $MgCl_2$, буфер, фермент Taq-полимеразу и деионизованную стерильную воду. Амплификацию в режиме реального времени выполняли на приборе «Rotor-Gene 6000» («Corbett Research», Австралия). Результаты оценивали по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией, что определяется значением порогового цикла «Сt».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно мировым исследованиям, верной стратегией является поиск мишеней среди генов, кодирующих синтез факторов патогенности. Однако в этом утверждении может скрываться ошибка. Среди близкородственных микроорганизмов встречаются сходные молекулы факторов патогенности, что исходит из гомологии нуклеотидной последовательности выбран-

ных генов. Следовательно, поиск, в первую очередь, должен касаться максимально специфичного для изучаемого организма гена. Перспективными мишенями могут стать также гены, отвечающие за морфологические перестройки. В качестве мишени мы выбрали уникальный для *B. dermatitidis* ген BYS-1 (blastomyces yeast-phase specific protein), который участвует в процессе конверсионного перехода из мицелиальной в дрожжевую фазу роста гриба [18]. Экспрессия продукта происходит в дрожжевой фазе и влияет на морфогенез дрожжевых клеток *B. dermatitidis*. Олигонуклеотидные праймеры и зонд для выявления ДНК возбудителя бластомикоза выбраны в результате анализа секвенированных нуклеотидных последовательностей генов, представленных в генетической базе GenBank. Праймеры, названные нами как Bys-1R-Bys-1F, обеспечивали специфичную амплификацию фрагмента ДНК размером 305 п.н. Также в качестве мишени выбран ген α -1,3-глюкансинтазы. Праймеры были обозначены BDags-1F - BDags-2R, размер ампликона составлял 178 п.н.

Используя базу данных BLASTn и программный пакет Primer-BLAST [18], проверили праймеры на отсутствие гомологии с секвенированными нуклеотидными последовательностями близкородственных возбудителей особо опасных микозов и гетерологичных микроорганизмов, находящихся в базах данных Genbank и Broad Institute [18, 19]. В ходе анализа *in silico* было показано, что выбранные последовательности праймеров специфически взаимодействуют только с предложенной мишенью, геном BYS-1 возбудителя бластомикоза *B. dermatitidis*. Аналогичные результаты были получены при анализе праймеров, направленных на обнаружение гена α -1,3-глюкансинтазы. Для осуществления детекции результатов амплификации сконструированы флуоресцентные зонды построенных по типу «молекулярного маячка». На одном конце каждого из зондов нами приштавлена флуоресцентная метка FAM, а на другом – гаситель флуоресценции RTQ1.

На следующем этапе исследования определяли оптимальную концентрацию компонентов реакционной смеси, подбирали температурные режимы для денатурации, отжига праймеров и элонгации цепи.

Для проведения ПЦР с праймерами Bys-1R-Bys-1F и BDags-1F - BDags-2R реакционная смесь в 25 мкл содержала: 5 мкл $\times 5$ ПЦР-буфер (ООО «ИнтерЛабСервис»), $MgCl_2$ 2,5 мМ, 200 мкМ каждого из четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов; специфические прямые и обратные праймеры по 12 пМ, 6 пМ флуоресценочного зонда, 0,5 ед. фермента Taq-F полимеразы (ООО «ИнтерЛабСервис») и 10 мкл исследуемой пробы ДНК.

Для праймеров Bys-1R-Bys-1F установлены оптимальные условия проведения реакции амплификации: этап предварительной денатурации ДНК при 95 °С – 15 мин., затем в течение 45 циклов – денатурация ДНК при 95 °С – 20 сек.; отжиг праймеров и элонгация цепи 60 °С – 60 сек.

Для праймеров BDags-1F - BDags-2R отработаны оптимальные условия проведения реакции амплификации: этап предварительной денатурации ДНК при 95 °С – 15 мин., затем в течение 45 циклов – денатурация ДНК при 95 °С – 10 сек.; отжиг праймеров 55 °С – 20 сек. и элонгация цепи 72 °С – 20 сек.

При определении чувствительности необходимо установить точную концентрацию клеток гриба в исследуемой взвеси. Однако клетки мицелия гриба имеют достаточно сильные межклеточные соединения и агрегируют с образованием крупных хлопьевидных структур, которые затрудняют подсчет концентрации. Вследствие этого прямой подсчет количества клеток при исследовании мицелиальной культуры *B. dermatitidis* в камере Горяева невозможен, а определение концентрации по стандарту мутности не дает точных результатов. Для определения количества клеток использовали подход определения расчета количества клеток по концентрации ДНК, которую измеряли на спектрофотометре «GeneQuant» («Amersham», США). А затем производили пересчет концентрации геномной ДНК на геномные эквиваленты (или копии ДНК клеток в мл) на основе среднего значения размера генома *B. dermatitidis*, который составляет около 70 Мб [19]. При исследовании чистых культур гриба после обеззараживания проб выделение ДНК осуществляли путем лизиса в растворе фенол-гуанидинизотионата натрия с последующим осаждением ДНК изопропанолом [Sandhu G.S., et al.//J. Clin. Microbiol. – 1995. – Vol. 41, №4].

В результате проведенных экспериментов минимальный порог чувствительности реакции амплификации, при котором происходит детекция с помощью праймеров Bys-1R-Bys-1F, составил $1 \cdot 10^3$ кл/мл (Рис. 1). Для праймеров BDags-1F - BDags-2R минимальный порог чувствительности достигал концентрации $1 \cdot 10^2$ кл/мл (Рис. 2). Меньшее количество циклов, необходимое для достижения порогового уровня является показателем того, что праймеры BDags-1F - BDags-2R имеют более низкий предел обнаружения и, следовательно, более высокую чувствительность.

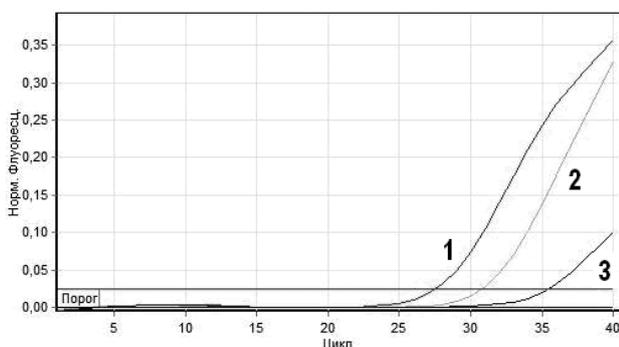


Рис.1. Кривые флуоресценции накопления продуктов амплификации с праймерами Bys-1R-Bys-1F: 1 – *B. dermatitidis* 6/85, концентрация $1 \cdot 10^3$ кл/мл, пороговый цикл 27,62; 2 – *B. dermatitidis* 6/85 концентрация $1 \cdot 10^4$ кл/мл, пороговый цикл 30,82; 3 – *B. dermatitidis* 6/85 концентрация $1 \cdot 10^5$ кл/мл, пороговый цикл 35,55.

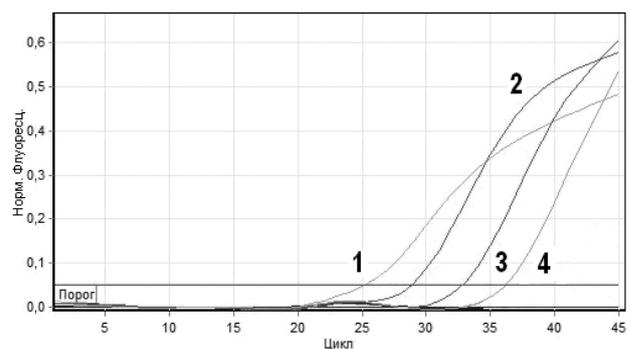


Рис.2. Кривые накопления продуктов амплификации с праймерами BDags-1F - BDags-2R: 1 – *B. dermatitidis* 9, концентрация $1 \cdot 10^2$ кл/мл, пороговый цикл 25,24; 2 – *B. dermatitidis* 9, концентрация $1 \cdot 10^3$ кл/мл, пороговый цикл 28,89; 3 – *B. dermatitidis* 9, концентрация $1 \cdot 10^4$ кл/мл, пороговый цикл 32,80; 4 – *B. dermatitidis* 9, концентрация $1 \cdot 10^5$ кл/мл, пороговый цикл 36,19

При исследовании проб чистых культур гетерологичных микроорганизмов в концентрации $1 \cdot 10^7$ кл/мл с праймерами Bys-1R-Bys-1F и BDags-1F - BDags-2R не выявили положительных реакций амплификации.

Следующим шагом было определение эффективности выбранных нами наборов праймеров и зондов для применения в диагностике заболеваний. Для этого проводили несколько экспериментов по моделированию blastomycosis, а именно – контаминацию крови возбудителем blastomycosis и заражение лабораторных животных. В обоих экспериментах использовали штамм *B. dermatitidis* 6/85.

Для контаминации крови применяли взвесь грибных клеток *B. dermatitidis* 6/85 в дрожжевой форме. Установлено, что праймеры Bys-1R-Bys-1F и BDags-1F - BDags-2R способны детектировать ДНК возбудителя blastomycosis в крови в концентрации $1 \cdot 10^4$ кл/мл.

Для определения диагностической эффективности исследуемых праймеров была проверена возможность их использования для выявления ДНК *B. dermatitidis* в пробах с биологическим материалом от 8 зараженных животных при экспериментальном blastomycosis. Исследовали кровь и внутренние органы (печень, селезенку, легкие) белых мышей на 14 сутки после заражения, т.к. манифестация заболевания у инфицированных начинается, в среднем, от двух недель. При исследовании методом ПЦР в режиме реального времени ДНК *B. dermatitidis* обнаружили в 4 пробах от 3 животных, у одного из них в пробах суспензии печени и крови, у другого – в 1 пробе печени и у третьего – в 1 пробе селезенки. При сравнении с результатами микологического посева культура *B. dermatitidis* выделена в 5 пробах. При этом в двух образцах (суспензии печени и селезенки) результаты совпадали с ПЦР. Полученные дискордантные результаты, вероятно, связаны с низкой концентрацией возбудителя и пределом чувствительности ПЦР. При проведении микологического посева во всех пробах рост наблюдали только спустя 14 дней, что в условиях клинической лаборатории удлиняет срок постановки диагноза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования методом ПЦР в режиме реального времени проб чистых культур музейных штаммов, проб контаминированных клетками возбудителя blastomycosis, а также результаты анализа

проб от зараженных мышей показана потенциальная возможность использования выбранных экспериментальных праймеров для создания набора реагентов для обнаружения возбудителя бластомикоза.

Применение сконструированного набора реаген-

тов для индикации возбудителя бластомикоза клинико-диагностическими лабораториями, позволит повысить качество диагностики и сократить время постановки диагноза.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. *Dworkin M.S., Duckro A.N., Proia L., et al.* The epidemiology of blastomycosis in Illinois and factors associated with death// Clin. Infect. Dis. – 2005. – Vol. 41. – P.107-111.
2. *Bradsher R.W., Chapman S.W., Pappas P.G.* Blastomycosis// Infect. Dis. Clin. North Am. – 2003. – Vol. 17. – P. 21-40.
3. *Baumgardner D.J., Steber D., Glazier R., et al.* Geographic information system analysis of blastomycosis in northern Wisconsin, USA: waterways and soil// Med. Mycol. – 2005. – Vol. 43. – P. 117-125.
4. *Baumgardner D.J., Knavel E.M., Steber D., et al.* Geographic distribution of human blastomycosis cases in Milwaukee, Wisconsin, USA: association with urban watersheds// Mycopathologia. – 2006. – Vol. 161. – P. 275-282.
5. *Smith J.A., Kauffman C.A.* Blastomycosis// Proc. Am. Thorac. Soc. – 2010. – Vol. 7, №3. – P. 173-180.
6. *Alvarez G.G., Burns B.F., Desjardins M., et al.* Blastomycosis in a young African man presenting with a pleural effusion// Can. Respir. J. – 2006. – Vol. 13, №8. – P. 441-444.
7. *Arnett M.V., Fraser S.L., Grbach V.X.* Pulmonary blastomycosis diagnosed in Hawaii// Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. – 2008. – Vol. 39, №4. – P. 701-705.
8. *Smith J.A., Kauffman C.A.* Blastomycosis// Proc. Am. Thorac. Soc. – 2010. – Vol. 7, №3. – P. 173-180.
9. *Маркин А.М., Гришина М.А., Кочубеева Е.Н.* Эпидемиология бластомикоза и параккокцидиоидомикоза // Проблемы особо опасных инфекций. – 2014. – №3. – С. 34-37.
10. *Антонов В.А., Липницкий А.В., Лесовой В.С. и др.* Особо опасные микозы /Под ред. В. В. Малеева. – Волгоград: изд. Волга-Паблишер, 2013. – 193 с.
11. *Bialek R., Gonzalez G.M., Begerow D., et al.* Coccidioidomycosis and blastomycosis: advances in molecular diagnosis// FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 2005. – Vol. 45. – P. 355-360.
12. *Sestero C.M., Scalone G.M.* Detection of the surface antigens BAD1 and a-(1,3)-glucan in six different strains of *Blastomyces dermatitidis* using monoclonal antibodies// J. Biology. – 2007. – Vol. 1, №1.
13. *Гришина М.А., Кочубеева Е.Н., Вьючнова Н.В. и др.* Лабораторная диагностика кокцидиоидомикоза // Проблемы особо опасных инфекций. – 2012. – №1. – С. 70-76.
14. *Ткаченко Г.А., Гришина М.А., Антонов В.А. и др.* Идентификация возбудителей кокцидиоидомикоза методом полимеразной цепной реакции// Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2007. – №4. – С. 25-31.
15. *Вьючнова Н.В., Ткаченко Г.А., Гришина М.А. и др.* Конструирование олигонуклеотидных праймеров для выявления ДНК возбудителя гистоплазмоза // Проблемы медицинской микологии. – 2012. – Т. 14, №2. – С. 58-62.
16. *Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.3118-13* Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности) // Бюллетень нормативных и методических документов. Госсанэпиднадзор России. – М., 2013. – С. 196.
17. *Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322-08* Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней // Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – М., 2009.
18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
19. <http://www.broadinstitute.org/>

Поступила в редакцию журнала 22.06.2015

Рецензент: Н.П. Елинов



СЛУЧАЙ УСПЕШНОГО ЛЕЧЕНИЯ МУКОРОЗА ЛЕГКИХ У ПАЦИЕНТА С ОСТРЫМ Т-КЛЕТОЧНЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ / ЛИМФОМОЙ. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

¹Хостелиди С.Н. (доцент кафедры),
¹Шагдилеева Е.В. (ассистент кафедры)*,
²Успенская О.С. (зав. отд.), ²Ружинская О.С. (врач-гематолог), ²Рябыкина О.Е. (врач-гематолог),
¹Богомолова Т.С. (зав. лаб.), ¹Игнатьева С.М. (в.н.с.), ¹Климко Н.Н. (зав. кафедрой)

¹ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина и кафедра клинической микологии, аллергологии и иммунологии); ² Ленинградская областная клиническая больница, Санкт-Петербург, Россия
 © Коллектив авторов, 2015

Мукороз (зигомикоз) – одна из наиболее агрессивно протекающих микотических инфекций у иммунокомпрометированных больных. Основными фоновыми заболеваниями в настоящее время считают гемобластозы и, прежде всего, острые лейкозы. Выживаемость онкогематологических больных мукорозом на фоне лечения составляет 30-10%. В статье представлен случай успешного лечения мукороза легких у больного острым Т-клеточным лимфобластным лейкозом/лимфомой на фоне проведения цитостатической полихимиотерапии.

Ключевые слова: амфотерицин В, лимфома, мукороз легких, острый лимфобластный лейкоз, позаконазол

THE CASE OF SUCCESSFUL TREATMENT OF INTESTINAL MUCORMYCOSIS IN PATIENTS WITH ACUTE LEUKEMIA. REVIEW OF THE LITERATURE

¹Khostelidi S.N. (associate professor of the chair), ¹Shagdileeva E.V. (assistant of the chair),
²Uspenskaya O.S. (head of the department),
²Ruzhinskaya O.S. (hematologist), ²Ryabykina O.E. (hematologist), ¹Bogomolova T.S. (head of the laboratory), ¹Ignatyeva S.M. (leading scientific collaborator), ¹Klimko N.N. (head of the chair)

¹North-West State Medical University named after I.I. Mechnikov (Kashkin Research Institute of Medical Mycology and Chair of Clinical Mycology, Allergology and Immunology);
²Leningrad Regional Clinical Hospital, St. Petersburg, Russia
 © Collective of authors, 2015

Mucorosis (zygomycosis) is the aggressive mycotic infection in immunocompromised patients. Hemoblastoses is the basic background diseases (first of all – acute leukemia). Overall survival rate of oncohematological patients with mucorosis patients is about 30-10%. The case of successful treatment of mucorosis pneumonia in patient with acute T-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma and chemotherapy has been presented.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, amphotericin B, lung mucorosis, lymphoma, posaconazole

* Контактное лицо: Шагдилеева Елена Владимировна, тел.: (812) 303-51-46

ВВЕДЕНИЕ

Мукороз – тяжелая оппортунистическая инфекция, характеризующаяся высокой летальностью у больных гемобластозами, прежде всего, – острым лимфобластным и миелобластным лейкозом, а также реципиентов трансплантатов кроветворных стволовых клеток [1, 2]. Летальность среди таких пациентов очень высокая – 70-95% в зависимости от его нозологической формы [2, 3]. Мукороз легких – наиболее часто встречающийся клинический вариант у данной категории больных, но у 70% лиц, даже на фоне терапии, заболевание прогрессирует, поэтому публикации об успешном лечении данной патологии ограничены.

Мы представляем случай успешного лечения мукороза легких у взрослого больного острым Т-клеточным лимфобластным лейкозом/лимфомой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Представлен клинический случай мукороза легких у пациента с острым Т-клеточным лимфобластным лейкозом на фоне длительного агранулоцитоза. Для постановки диагноза мукороза использовали клинические и лабораторные критерии, предлагаемые EORTC/MSG (Европейская организация по изучению и лечению рака/группа, исследующая микозы, Национальный институт аллергологии и инфекционных заболеваний – NIAID, США) [4].

Также мы провели анализ данных из научной литературы за последние 10 лет в базах PubMed (май 2015 г.), Scopus (май 2015 г.) и Web of Science (май 2015 г.). При поиске информации использовали следующие ключевые слова: *acute T-cell lymphoblastic leukemia, lymphoma, lung mucorosis.*

Описание клинического случая.

Пациент Д., 23 года, госпитализирован в отделение онкогематологии Ленинградской областной клинической больницы (ЛОКБ) в июне 2014 г. с жалобами на выраженную слабость, субфебрильную температуру тела с периодическими подъемами до фебрильной (преимущественно вечером), отсутствие аппетита.

Из анамнеза заболевания выяснили, что в мае 2014 г. мужчина получил травму на работе, после чего появились боли в левом плече, спине небольшой интенсивности. Обратился самостоятельно в приемное отделение центральной районной больницы (ЦРБ). Был осмотрен травматологом, от госпитализации отказался.

Через неделю болевой синдром стал нарастать, появилась одышка при небольших нагрузках. Пациент был госпитализирован в травматологическое отделение ЦРБ, где при обследовании выявили образование в средостении. Была выполнена трансторакальная биопсия образования в средостении (заключение: гистологическая картина и иммунофенотип опухоли соответствует Т-клеточной лимфобластной лимфоме / лейкозу), и больной был переведен в отделение онкогематологии ЛОКБ.

При поступлении на отделение общее состояние относительно удовлетворительное. Сознание ясное. Температура тела 37,2 °С. Кожа обычной окраски, чистая. Видимые слизистые оболочки (и склеры) обычной окраски, чистые. Небные миндалины не увеличены. Перкуторно над легкими ясный легочный звук. Аускультативно дыхание везикулярное, хрипов нет.

Частота дыхательных движений 16 в минуту. Пульс ритмичный. Тоны сердца звучные, систолический шум. Артериальное давление – 110/70 мм рт. ст. Частота сердечных сокращений – 78 в минуту. Язык чистый, влажный. Живот при пальпации безболезненный. Гепатоспленомегалия. Конституция нормостеническая.

При обследовании в общем анализе крови: Нб. – 138 г/л, тр. – $17 \cdot 10^9$ /л, л. – $10,53 \cdot 10^9$ /л (бласты – 1%). Была выполнена трепанобиопсия костного мозга. Заключение: гистологическая картина костного мозга с поражением Т-клеточной лимфообластной лимфомой (объем поражения 100%). На компьютерной томографии (КТ) внутренних органов: подчелюстные лимфатические узлы (до 1,4x1,7 см), в правой верхнечелюстной пазухе – кистозное образование (около 1,5x2,1 см), в легких очаговых и инфильтративных изменений нет, в переднем средостении объемное патологическое образование неоднородной мягкотканой плотности (распад) около 6,2x13,2x14,4 см; гепатоспленомегалия, асцит, по ходу подвздошных сосудов слева лимфоузлы до 2,0x1,2 см. На МРТ головного мозга признаков специфического поражения головного мозга не отмечали. По данным миелограммы, бласты – 55,2%. При выполнении иммунофенотипирования диагностировали острый Т-клеточный лимфообластный лейкоз, CD34(-). Таким образом, был выставлен клинический диагноз: Т-клеточная лимфообластная лимфома/лейкоз, 46,XY (поражение костного мозга, образование средостения больших размеров, подвздошных л/узлов слева).

С учетом характера опухоли начали проведение полихимиотерапии (ПХТ) по схеме HyperCVAD+Lasp+ дексаметазон, эндоксан, доксорубицин, винкристин + L-аспарагиназа) + КСФ (колониестимулирующий фактор). Достигнуты клиническая и морфологическая ремиссия. Полихимиотерапия осложнилась панцитопенией (агранулоцитоз – 13 дней) и нейтропенической лихорадкой, которая была купирована применением антибиотиков (имепинем).

После выхода из цитопении на КТ органов грудной полости появился очаг воспаления в S9-S10 левого легкого с содержимым и прослойкой воздуха – симптом «полумесца» (Рис.1).

В связи с длительным периодом агранулоцитоза, фебрильной лихорадки на фоне нейтропении и появления характерных признаков на КТ органов грудной клетки был заподозрен инвазивный аспергиллез легких (ИАЛ). Выполнен тест на галактоманнан. В сыворотке крови тест на антиген *Aspergillus* spp. – отрицательный (ИОП=0,38), в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) – положительный (ИОП=1,3). При микроскопии и посеве БАЛ грибы не обнаружили.



Рис. 1. КТ органов грудной полости от 27.06.14 г.
↑ - очаг воспаления в S9-S10 при ИАЛ

Таким образом, был диагностирован вероятный ИАЛ и начата терапия вориконазолом в стандартных дозах (первые сутки – 800 мг, затем – 400 мг/сут.).

Лечение ИАЛ было продолжено на фоне полихимиотерапии. В июле продолжили терапию основного заболевания. Провели еще два курса ПХТ в режимах M/A+Lasp+ КСФ и HyperCVAD+Lasp+ КСФ. После второго курса ПХТ зафиксировали морфологическую ремиссию (бласты – 2,2%, мегакарициты – 700) острого лейкоза.

При оценке состояния в динамике, через две недели от начала лечения ИАЛ, на КТ органов грудной клетки отмечали положительную динамику, а через месяц – еще более выраженный положительный эффект в виде уменьшения очага в нижней доле левого легкого.

При исследовании БАЛ: тест на галактоманнан отрицательный, при микроскопии и посеве грибы не обнаружены. Диагностирована ремиссия ИАЛ. В связи с риском рецидива ИАЛ, пациенту продолжена терапия вориконазолом.

Очередной курс ПХТ выполнили в августе 2014 г. Осложнения: агранулоцитоз 12 дней, анемия, тромбоцитопения; с 19.08. – нейтропеническая лихорадка (был получен ответ на имепинем). С 22.08.14 г. – рецидив нейтропенической лихорадки. Диагностировали бактериальный сепсис (положительная гемокультура *Corynebacterium jeikeium*). Осуществили замену ЦВК, антибиотикотерапию усилили ванкомицином с положительным эффектом (отсутствие гемокультуры и нормализация температуры тела).

28.08.14 г. состояние больного ухудшилось: появился сначала сухой кашель, затем – с отделением вязкой слизисто-гноющей мокроты, одышка, вновь повысилась температура тела до фебрильной.

При обследовании на КТ органов грудной клетки отрицательная динамика: обнаружили появление новых очагов в обоих легких – в S3 правого легкого (1,6x1,5 см) и S4 правого легкого (2,4x2,5 см), S6 левого легкого (2,7x3,1 см), увеличение очага в S9, S10 левого легкого (2,3x2,6 см). При выполнении теста на галактоманнан в БАЛ индекс оптической плотности 0,32 (отрицательный). При микроскопии и посеве БАЛ грибы не обнаружили.

Несмотря на отсутствие микромицетов в БАЛ, в качестве превентивной терапии был добавлен амфотерицин В в дозе 25 мг/сутки. Отмечали частичный клинический эффект – повышение температуры тела

только к вечеру до 37,7 °С, менее выраженную одышку.

В то же время, на КТ органов грудной полости наблюдали отрицательную динамику в виде увеличения размеров очагов в обоих легких (Рис.2).

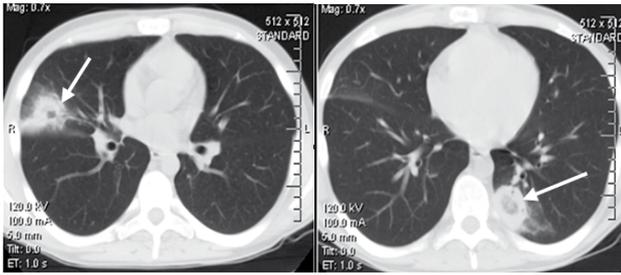


Рис. 2. КТ органов грудной полости от 04.09.14 г.
↑ - очаг воспаления в S3-S4 (слева) и S10 (справа) при мукорозе

9 сентября была проведена трансторакальная биопсия инфильтрата нижней доли левого легкого. При микроскопии биоптата выявили широкие гифы с ветвлением под прямым углом (Рис. 3), при посеве – роста грибов нет.

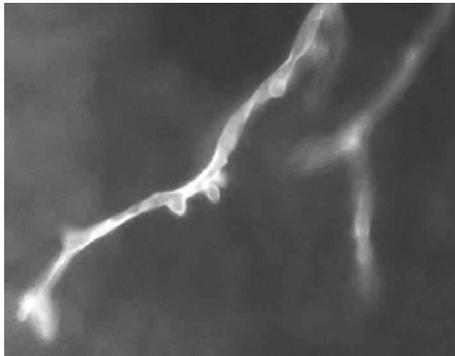


Рис. 3. Микроскопия биоптата легкого x400.
Окраска калькофлюором белым

Диагностировали мукороз легких. Дозу амфотерицина В увеличили до 50 мг в сутки, вориконазол отменили, добавили каспофунгин в дозе 50 мг в сутки. Через месяц от начала комбинированной антимикотической терапии на КТ органов грудной полости отмечали положительную динамику – уменьшение размеров инфильтративно-очаговых изменений в обоих легких (S3 правого легкого, S4 правого легкого, S6 и в S9, S10 левого легкого), образование средостения без динамики с августа 2014 г. – 3,78x3,5 см). В результате лечения наблюдали нормализацию температуры тела, отсутствие одышки, сохранение сухого кашля.

С 22.10.14 г. антимикотическую терапию продолжили позаконазолом. На фоне назначенного лечения в феврале 2015 г. на контрольной КТ органов грудной клетки зафиксировали частичное разрешение очагов воспалительного характера в легких (формирование фиброза легких). В связи с положительной динамикой в легких 13.03.15 г. пациенту была выполнена аллогенная родственная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток костного мозга (ТГСК) и достигнута ремиссия. На 97 день (18.06.15 г.) после ТГСК наблюдали рецидив основного заболевания, при этом мукороз был в состоянии стабилизации, прогрессии инфекционного процесса не отмечали, на КТ органов грудной клетки – очаги прежних размеров.

16.09.15 г. на КТ органов грудной клетки выявили

полное разрешение очагов в легких (Рис.4).

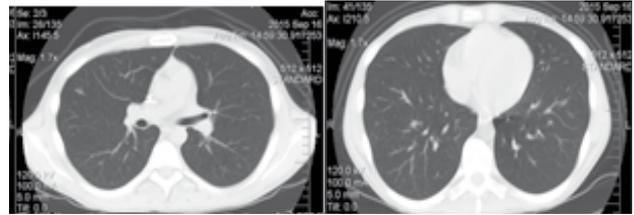


Рис. 4. КТ органов грудной полости от 09.15 г.
без патологии

Таким образом, была достигнута ремиссия микотической пневмонии. Общая продолжительность антимикотической терапии мукороза легких на сентябрь 2015 г. – 387 дней. Сохранялась ремиссия основного заболевания.

Общая продолжительность комбинированной антимикотической терапии – 45 суток. С 22.10.14 г. антимикотическое лечение было продолжено позаконазолом. Сейчас пациент получает позаконазол в качестве вторичной профилактики, ему планируют выполнить повторную ТГСК в связи с рецидивом основного заболевания.

ОБСУЖДЕНИЕ

В последние два десятилетия мукороз стал одной из наиболее актуальных оппортунистических инфекций, что обусловлено не только ростом заболеваемости, но и с высоким уровнем летальности. Возбудители заболевания – микромицеты, являющиеся представителями самостоятельного отдела *Zygomycota*, распространены повсеместно и относятся к двум основным порядкам – *Mucorales* и *Entomophthorales*. Большинство описанных клинических случаев у людей вызваны грибами порядка *Mucorales*, и поэтому мукороз и зигомикоз в настоящее время используют как термины взаимозаменяемые [1, 2, 5]. Грибы порядка *Mucorales* широко распространены в природе, они термостойки, их обычно обнаруживают в разлагающихся органических веществах.

По данным из научной литературы, заболеваемость мукорозом последние годы неуклонно растет [2, 5]. В настоящее время опубликованы результаты нескольких исследований [5-11], отличающихся по продолжительности и периоду проведения.

Так, почти два десятилетия назад, при активном наблюдательном исследовании в США установили, что ежегодная заболеваемость мукорозом составляет 1,7 случаев на 1 млн. физических лиц (500 случаев в год) [5]. Причем, основным фактором риска развития этого заболевания был декомпенсированный сахарный диабет.

При исследованиях, проведенных в последнее десятилетие в Европе, выявили более низкую частоту заболевания в некоторых странах в начале века, например, в Испании – 0,04 на 100000 человек, или 0,62 / 100 000 госпитализаций в 2006 г., и более высокую в 2011 г. – 0,2/100000 [6, 7]. Такой же рост заболеваемости наблюдали и в других странах, например, во Франции число случаев мукороза возросло с 0,7 / млн. в 1997 г. до 1,2 / млн. в 2006 г. (P, 0,001) [8]. В 2011 г. более высокая частота была отмечена в Австрии – 0,3/100000, в Нидерландах, Ирландии, Китае – 0,2/100000 [9-11]. Согласно данным нашего регистра, в России на 2011 г. частота

мукороза составляет 0,162 / 100000 человек, что соответствует средневропейским данным [12].

Отметим, что все исследователи обращают внимание на изменение спектра фоновых заболеваний. В крупнейшем Европейском регистре с 2005 по 2007 гг., где были проанализированы 230 случаев заболевания, установили, что мукороз преимущественно развивался у больных гемобластозами (53%), чуть менее половины из них – это лица с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) и лимфомами. В то же время, пациенты с декомпенсированным сахарным диабетом составили всего 9% [13]. В системе Fungiscore-A, другом международном регистре, было зарегистрировано 63% больных мукорозом на фоне гематологической малигнизации (12% – лимфопролиферативные заболевания) [14]. При анализе, проведенном во Франции, показано, что 50% случаев мукороза также развивались на фоне гемобластозов, причем треть из них – острые лимфобластные лейкозы и лимфомы [15]. В России 66% зарегистрированных случаев мукороза развились у больных гемобластозами (37% из них – ОЛЛ и лимфома).

Основным клиническим вариантом мукороза у онкогематологических больных является поражение легких (до 79%) [5, 13-16]. Второй по частоте – риноцеребральный вариант течения заболевания. Описаны также поражения желудочно-кишечного тракта, кожи, эндокарда, почек [5, 13, 14]. В России мукороз легких развивается у 72% пациентов с гемобластозами, в том числе – у 77% больных ОЛЛ и лимфомами [17, 18].

Выживаемость пациентов также зависит от формы заболевания и от тяжести основного заболевания [3, 5, 13-20]. Важную роль, в данном случае, играет быстрая диагностика. Серологическая диагностика для мукороза не разработана, в связи с чем необходим многократный забор материала для микологического и гистологического исследований. Согласно европейским исследованиям, выделить возбудителя в культуре удастся у около 68% больных [14]. Основные возбудители мукороза у онкогематологических больных: *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., *Rhizomucor* spp. и *Lichtheimia (Absidia)* spp [13, 20]. По данным нашего регистра, основной возбудитель у данной группы больных – *Rhizopus* spp. [17].

Согласно современным рекомендациям, препаратом первой линии для лечения мукороза является липидный комплекс амфотерицина В в дозе 5 мг/кг/сутки (категория доказательности рекомендаций – АII), липосомальный амфотерицин В (АIII). После достижения клинического эффекта лечение продолжают позаконазолом 800 мг/сут., но его использование в качестве монотерапии не всегда было успешно (СIII). Во многих клинических исследованиях подтверждена эффективность комбинированной антимикотической терапии препаратами амфотерицина В и эхинокандинами [20]. При оценке эффективности лечения мукороза у гематологических больных в проспективных многоцентровых исследованиях подтверждена необходимость коррекции факторов риска. Рекомендованы изменение дозы цитостатиков, глюкокортикостероидов, назначение стимуляторов кроветворения. Также важную роль играет хирургическое удаление очагов поражения [13, 14, 20]. В России основным препаратом

стартовой терапии остается амфотерицин В и его липидные комплексы. У трети больных используют комбинированное лечение.

В результате поиска мы обнаружили в научной литературе 90 публикаций, сообщающих о случаях мукороза у гематологических больных, из них – 2 случая успешного лечения мукороза легких у больных Т-клеточным лимфобластным лейкозом [21, 22]. Мукороз легких развился у больных в течение месяца после проведенной ПХТ, на фоне которой появились глубокий агранулоцитоз и панцитопения. Причем у одного больного в последствии инфекция прогрессировала (диссеминированный мукороз). Диагноз был установлен на основании микологического исследования БАЛ и биоптатов, возбудители – *Rhizomucor pusillus* и *L. corymbifera*. В качестве стартовой терапии у обоих больных использовали липидный амфотерицин В в стандартных дозах и хирургическое удаление очага поражения в легких, что, вероятно, и стало причиной успешного лечения.

У наблюдаемых нами больных мукорозом легких с острым лимфобластным лейкозом (n=9) возбудителями были *R. pusillus*, *Rhizopus* sp., *Rhizomucor* sp., *Mucor* sp. Практически всем пациентам диагноз был установлен посмертно (77%). У двух больных, в том числе и у описываемого нами пациента, в качестве стартовой терапии применяли амфотерицин В, в последующем – в комбинации с эхинокандинами. Хирургическое удаление очага поражения не представлялось возможным, т.к. имели место противопоказания для проведения оперативного вмешательства. Пациент, наблюдаемый нами в 2009 г., получал антимикотическое лечение в течение 6 месяцев. Вторичную профилактику назначили, но проводили периодически. Больной умер через 8 месяцев после диагностирования мукороза легких из-за прогрессии основного заболевания. У описываемого нами больного клинически и лабораторно зафиксировали ремиссию мукороза легких. Запланировано проведение аллогенной трансплантации кроветворных стволовых клеток в качестве терапии острого лимфобластного лейкоза.

Таким образом, в приведенном клиническом случае и по данным из научной литературы подтверждено, что мукороз легких у больных острым лимфобластным лейкозом является тяжелым осложнением, но при своевременной диагностике и адекватной антимикотической терапии, при условии контроля основного заболевания, удается добиться ремиссии заболевания.

ВЫВОДЫ

Мукороз легких – тяжелое осложнение у больных острым лимфобластным лейкозом.

Для своевременной постановки диагноза необходимо получение материала из очага поражения и использование современных методов микологической диагностики.

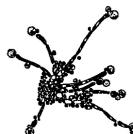
Лечение мукороза легких у онкогематологических больных должно включать: коррекцию факторов риска, назначение адекватной антимикотической терапии и, по возможности, хирургическое удаление очага поражения.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Климко Н. Н. Микозы: диагностика и лечение. – М.: Ви Джи Групп, 2008. – 336 с.
2. Petrikos G., Skiada A., Lortholary O., et al. Epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis// Clin. Infect. Dis. – 2012. – Vol. 54, №1. – P. 23-34.
3. Pagano L., Offidani M., Fianchi L., et al. Mucormycosis in hematologic patients// Haematologica. – 2004. – Vol. 89, №2. – P. 207-214.
4. De Pauw B., Walsh T.J., Donnelly P., et al. Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group// Clin. Infect. Dis. – 2008. – Vol. 46. – P. 1813-21.
5. Roden M.M., Zaoutis T.E., Buchanan W.L., et al. Epidemiology and Outcome of Zygomycosis: a review of 929 reported cases// Clin. Infect. Dis. – 2005. – Vol. 41. – P. 634-653.
6. Torres-Narbona M., Guinea J., Martinez-Alarcon J., et al. Impact of mucormycosis on microbiology overload: a survey study in Spain// J. Clin. Microbiol. – 2007. – Vol. 45. – P. 2051-2053.
7. Rodriguez-Tudela J.L., Alastruey-Izquierdo A., Gago S., et al. Burden of serious fungal infections in Spain// Clin. Microbiol. Infect. – 2015. – Vol. 21, №2. – P. 183-189.
8. Bitar D., Van Cauteren D., Lanternier F., et al. Increasing incidence of zygomycosis (mucormycosis), France, 1997-2006// Emerg. Infect. Dis. – 2009. – Vol. 15, №9. – P. 1395-1401.
9. Lass-Flörl C., Greil V., Denning D.W. Burden of serious fungal infections in Austria// Book of abstracts 24 ECCMID Congress. – 2013. – P. 1036.
10. Dorgan E., Denning D.W., McMullan R. Burden of serious fungal infections in Ireland// Book of abstracts 24 ECCMID Congress. – 2013. – P. 1039.
11. Zhu L.P., Wu J.Q., Perlin D.S., Denning D.W. Burden of serious fungal infections in China// Book of abstracts 24 ECCMID Congress. – 2013. – P. 1041.
12. Климко Н.Н., Козлова Я.И., Хостелиди С.Н. и др. Распространенность тяжелых и хронических микотических заболеваний в Российской Федерации по модели LIFE-PROGRAM// Проблемы медицинской микологии. – 2014. – Т. 16, №1. – С. 3-8.
13. Skiada A., Pagano L., Groll A., et al. Zygomycosis in Europe: analysis of 230 cases accrued by the registry of the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) Working Group on Zygomycosis between 2005 and 2007// Clin. Microbiol. Infect. – 2011. – Vol. 17, №12. – P. 1859-1867.
14. Rüppling M.J., Heinz W.J., Kindo A.J., et al. Forty-one recent cases of invasive zygomycosis from a global clinical registry// J. Antimicrob. Chemother. – 2010. – Vol. 65, №2. – P. 296-302.
15. Lanternier F., Dannaoui E., Morizot G., et al. A global analysis of mucormycosis in France: the RetroZygo Study (2005-2007)// Clin. Infect. Dis. – 2012. – Vol. 54, Suppl. 1. – P. 35-43.
16. Pagano L., Valentini C.G., Posteraro B., et al. Zygomycosis in Italy: a survey of FIMUA-ECMM (Federazione Italiana di Micopatologia Umana ed Animale and European Confederation of Medical Mycology)// J. Chemother. – 2009. – Vol. 21, №3. – P. 322-329.
17. Klimko N., Khostelidi S., Volkova A., et al. Mucormycosis in haematological patients: case report and results of prospective study in Saint Petersburg, Russia// Mycoses. – 2014. – Vol. 57, Is.Sup. 3. – P. 91-96.
18. Хостелиди С.Н., Попова М.О., Волкова А.Г. и др. Особенности мукоормикоза легких у онкогематологических больных в Санкт-Петербурге, Россия// Успехи медицинской микологии. – 2013. – Т. 11. – С. 228-229.
19. Хостелиди С.Н., Шапочник А.П., Моница Ю.В. и др. Диссеминированный мукоормикоз у больного острым лимфобластным лейкозом (клинический случай)// Журнал инфектологии. – 2013. – Т. 5, №3. – С. 74-79.
20. Skiada A., Lanternier F., Groll A.H., et al. European Conference on Infections in Leukemia. Diagnosis and treatment of mucormycosis in patients with hematological malignancies: guidelines from the 3rd European Conference on Infections in Leukemia (ECIL 3)// Haematologica. – 2013. – Vol. 98, №4. – P. 492-504.
21. Guymer C., Khurana S., Suppiah R., et al. Successful treatment of disseminated mucormycosis in a neutropenic patient with T-cell acute lymphoblastic leukaemia// BMJ Case Rep. – 2013. – doi: 10.1136/bcr-2013-009577.
22. Björkholm M., Runarsson G., Celsing F., et al. Liposomal amphotericin B and surgery in the successful treatment of invasive pulmonary mucormycosis in a patient with acute T-lymphoblastic leukemia// Scand. J. Infect. Dis. – 2001. – Vol. 33, №4. – P. 316-319.

Поступила в редакцию журнала 21.09.2015

Рецензент: А.В. Соболев



СЛУЧАЙ СОЧЕТАННЫХ ИНВАЗИВНЫХ АСПЕРГИЛЛЕЗА И МУКОРОЗА ЛЕГКИХ У БОЛЬНОГО ОСТРЫМ ПРОМИЕЛОЦИТАРНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

¹Тараканова Л.А. (клинич. ординатор)*,
¹Живопистсева А.М. (ассистент кафедры),
¹Семелев В.Н. (нач. отд.), ¹Богданов А.Н.
(профессор кафедры), ²Шадринова О.В. (ассистент
кафедры), ¹Тыренко В.В. (нач. кафедры), ²Климко
Н.Н. (зав. кафедрой)

¹Военно-медицинская академия имени С.М.Кирова;

²Северо-Западный государственный медицинский
университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2015

В статье представлено описание клинического случая сочетанного инвазивного микоза: аспергиллеза и мукороза легких у больного острым промиелоцитарным лейкозом. Несмотря на активную цитостатическую и антимикотическую терапию, у пациента наступил летальный исход.

Ключевые слова: инвазивный аспергиллез, мукороз, острый промиелоцитарный лейкоз

A CASE OF COMBINED INVASIVE ASPERGILLOSIS AND MUCOROSIS OF LUNGS IN A PATIENT WITH ACUTE PROMYELOCYTIC LEUKEMIA

¹Tarakanova L.A. (clinical physician), ¹Jivopistseva
A.M. (assistant of the chair), ¹Semelev V.N. (head
of the department), ¹Bogdanov A.N. (professor of
the chair), ²Shadrivova O.V. (assistant of the chair),
¹Turenko V.V. (head of the chair), ²Klimko N.N. (head
of the chair)

¹S.M. Kirov Military Medical Academy; ²Kashkin Research
Institute of Medical Mycology, North-West State Medical
University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2015

A case of combined invasive aspergillosis and mucorosis of lungs in patient with acute promyelocytic leukemia has been presented in the article. Despite of the adequate cytostatic and antifungal treatment the fatal outcome was registered.

Key words: acute promyelocytic leukemia, aspergillosis, mucorosis

ВВЕДЕНИЕ

Для успешного лечения гематологических пациентов важно не только совершенствование специфического лекарственного лечения, но и проведение адекватной сопроводительной терапии. Особое внимание уделяют проблеме грибковых инфекций, количество которых значительно возросло у больных гемобластомами в течение последних десятилетий. Основные возбудители инвазивных микозов (ИМ) у этих пациентов – *Candida* spp. и *Aspergillus* spp. [1]. В то же время, все чаще возникают инфекции, вызванные гиалогифомицетами и мукормицетами, что особенно актуально в связи с низкой чувствительностью этих грибов к большому числу системных антимикотиков [2]. Статья посвящена описанию случая развития сочетанного инвазивного микоза (ИМ), закончившегося летальным исходом, несмотря на комбинированную противогрибковую терапию.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для постановки диагноза ИМ использовали клинические и лабораторные критерии, предлагаемые Европейской организацией по исследованию и лечению рака (EORTC/MSG, 2008) [3]. Пациенту проводили компьютерную томографию (КТ) легких в режиме высокого разрешения, выполняли фибробронхоскопию (ФБС) с забором бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ). Лабораторная диагностика ИМ включала микроскопическое, культуральное и серологическое исследование. Наличие галактоманна в сыворотке крови определяли двойным иммуноферментным методом (EIA) «*Platelia Aspergillus*». Диагностически значимым считали индекс оптической плотности (ИОП) выше «0,5».

Описание клинического случая. Больной Ш., 62 лет, поступил в клинику факультетской терапии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова 7.02.14 г. с жалобами на общую слабость и перебои в работе сердца при физической нагрузке. При объективном обследовании патологии не выявили. Были выполнены: общий анализ крови (эр. – $3,45 \cdot 10^{12}/л$, Нб. – 119 г/л, тр. – $96 \cdot 10^9/л$, л. – $1,6 \cdot 10^9/л$; с/я – 9%, б. – 1%, э. – 1%, лимф. – 87%, мон. – 1%), цитологическое и цитохимическое исследования костного мозга (гипоклеточный костномозговой пунктат; эритропоэз нормобластический; 63% бластных клеток, содержащих обильную азурофильную зернистость, заходящую на ядро, палочки Ауэра; мегакарициты в препаратах единичные). Провели иммунофенотипическое и цитогенетическое исследования костного мозга (верифицирован промиелоцитарный вариант острого лейкоза, t(15;17)). На основании полученных данных был установлен диагноз: острый промиелоцитарный лейкоз (FAB-M3), низкий риск, первая атака. В сопутствующей патологии необходимо отметить наличие у пациента впервые выявленного сахарного диабета.

11.02.2014 г. начата стандартная программная химиотерапия по протоколу AIDA (третиноин – $45 \text{ мг}/\text{м}^2$, идарубицин – $12 \text{ мг}/\text{м}^2$). С целью проведения неселективной деконтаминации и профилактики пневмоцистной пневмонии в сопроводительную терапию включили ко-тримоксазол ($450 \text{ мг}/\text{сут.}$) и ципрофлоксацин ($1000 \text{ мг}/\text{сут.}$). В связи с отсутствием в клинике позаконазола для проведения первичной профилактики

* Контактное лицо: Тараканова Любовь Александровна,
e-mail: Dortmund89@mail.ru

микотических поражений использовали вориконазол (400 мг/сут.).

На 17-е сутки от начала химиотерапии (27.02.14 г.) состояние пациента ухудшилось: появились дыхательная недостаточность (ЧД=28 в мин.), фебрильная лихорадка (38,5 °С), артериальная гипотензия (АД – 80/60 мм рт. ст.); наблюдали прибавку в весе более 5 кг за счет отеков. При выполнении рентгенографии органов грудной клетки и придаточных пазух носа патологии не выявили. Данные проявления расценили как поздний ретиноидный синдром тяжелой степени, что было обусловлено приемом препарата третиноина. По неотложным показаниям начали лечение глюкокортикостероидами (дексаметазон по 10 мг/м² 2 р/сут. внутривенно струйно), увеличили объем инфузионной терапии с положительным эффектом – уменьшением одышки, стабилизацией артериального давления на уровне 110/60 мм рт. ст., снижением температуры тела до субфебрильных цифр. Третиноин временно отменили. 03.03.14 г. ретиноидный синдром купирован, программная химиотерапия возобновлена.

13.03.14 г. у пациента появились жалобы на кашель с трудно отделяемой мокротой и подъемы температуры тела до субфебрильных цифр. При аускультации легких отмечали появление жесткого дыхания и множества влажных мелкопузырчатых хрипов. Выполнена КТ органов грудной клетки и околоносовых пазух. Взят анализ крови на галактоманнан. Сделан посев мокроты. От проведения бронхоскопии пациент отказался.

На КТ органов грудной клетки визуализировались множественные инфильтраты в S1, S3, S4, S5, S8 правого и S1, S2, S4, S5, S6, S8, S9, S10 левого легкого, имеющие преимущественно округлую форму с четкими контурами и периферическими зонами уплотнения легочной ткани по типу «матового стекла», а также с наличием серповидного участка просветления, являющегося отражением скопления газа вокруг патологического образования – формирование «симптома серпа». Наиболее крупные инфильтраты были расположены в S2 правого (размерами до 38x29 мм) и в S5 левого легкого (размерами до 73x36 мм). Структура некоторых инфильтратов неоднородная за счёт наличия в центральных отделах воздушных долек и воздушной легочной ткани. (Рис. 1). На КТ придаточных пазух носа патологии не выявили.



Рис. 1. КТ легких, 2-й день от начала клинических проявлений (14.03.14 г.)

Эмпирически назначили антибактериальную и антифунгальную терапию: линезолид (1,2 г/сут.), до-рипенем (1,5 г/сут.) и каспофунгин в первые сутки 70 мг/сут, далее – 50 мг/сут. При проведении теста на галактоманнан в сыворотке крови 15.03.14 г. был получен положительный результат (ИОП=5,8). Установлен диагноз: «вероятный» инвазивный аспергиллез легких.

В соответствии с протоколом лечения острого лейкоза, 21.03.14 г. оценивали ответ на химиотерапию. На основании полученных результатов (общий анализ крови, цитологическое исследование костного мозга) констатировали полную клинико-гематологическую ремиссию.

При посеве мокроты от 21.03.14 г. были выявлены мукормицеты. Диагностировали сочетанный ИМ легких (аспергиллез и мукороз). Принято решение о необходимости комбинированной антимикотической терапии: в дополнение к каспофунгину (50 мг/сут.) был назначен амфотерицин В (1 мкг/кг/сут.).

Несмотря на проводимое лечение, состояние пациента прогрессивно ухудшалось. Появилась нестабильность гемодинамики с эпизодами гипотонии до 70 и 40 мм рт. ст., сохранялась дыхательная недостаточность, выросла гипергликемия до 18 ммоль/л, что потребовало постоянной инфузии инсулина. Повторный тест на галактоманнан сыворотки крови от 27.03.14 г. был положительным и нарастал в динамике (ИОП=6,58). Выполнили ФБС с забором БАЛ.

28.03.14 г. отмечали появление неврологической симптоматики: жалобы на головную боль, положительный симптом Маринеску-Радовича справа, гемипарез справа. При выполнении магнитно-резонансной томографии были выявлены признаки лакунарного инсульта в области таламуса справа. Диагностировали острое нарушение мозгового кровообращения по ишемическому типу.

При контрольной КТ органов грудной клетки от 28.03.14 г. наблюдали отрицательную динамику в виде появления множественных абсцессов, разнокалиберных многокамерных буллезных полостей на месте первичных инфильтративных изменений и в ранее интактных сегментах обоих легких. Буллезные полости, выявленные в S4, S7 (0,7 см) правого легкого и в S1+2 (7,4x6,8x7,0 см), S3 (5,6x5,3x5,5 см), S4 (0,8 см), S5 (7,6x5,8x7,1 см) левого легкого, характеризовались наличием толстых стенок (до 1,3 см у наиболее крупных) и тонких перегородок; внутри некоторых из полостей обнаружили патологические образования округлой и неправильной формы (Рис. 2).

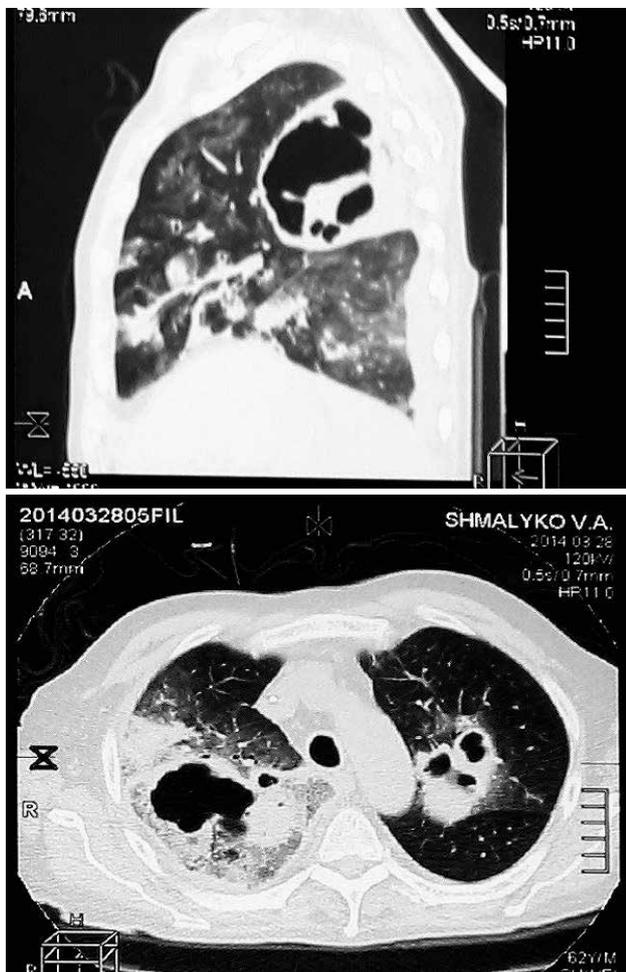


Рис. 2. КТ легких, 15-й день от начала антимикотической терапии (28.03.14 г.)

Для решения вопроса о проведении хирургического лечения, 31.03.14 г. пациента консультировал торакальный хирург, однако, учитывая общий соматический статус больного и объем поражения легких, выполнение хирургического вмешательства на данном этапе заболевания не представлялось возможным.

Результаты исследования БАЛ от 02.04.14 г: при ми-

кроскопии обнаружили истинный мицелий мукормицета, при посеве выделена культура *Rhizopus* sp. Подтвержден диагноз мукороза.

05.04.14 г. у пациента вновь появилась лихорадка до 38,5 °С, сохранились кашель с мокротой, одышка.

На КТ органов грудной клетки от 07.04.14 г. отмечали дальнейшую отрицательную динамику в виде выявления множества полостей распада, увеличения площади и интенсивности инфильтрации лёгочной ткани, преимущественно в базальных отделах правого лёгкого, появления новых фокусов инфильтрации в S4, S5, S6 и S8 левого лёгкого, а также увеличения размеров ранее имеющих полостей (Рис. 3).

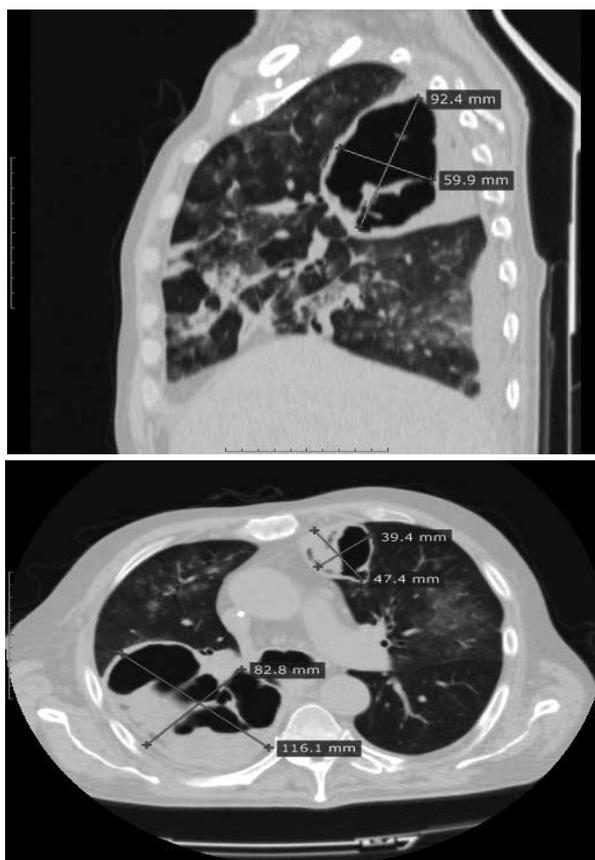


Рис. 3. КТ легких, 25-й день от начала антимикотической терапии (07.04.14 г.)

Несмотря на проводимую терапию, у пациента сохранялся фебрилитет до 38,0 °С, выросла дыхательная недостаточность, вновь появилась нестабильность гемодинамики. В результате развития острой сердечно-сосудистой недостаточности 17.04.14 г. наступил летальный исход. В связи с требованием родственников вскрытие не проводили.

ОБСУЖДЕНИЕ

Инвазивные микозы – актуальная клиническая проблема у больных гемобластозами, имеющих многочисленные факторы риска. Иммунодефицитные состояния, возникающие вследствие ятрогенной иммуносупрессии при лечении онкогематологических заболеваний, являются предрасполагающими факторами к развитию ИМ [4]. Основные возбудители микозов у этих пациентов – *Aspergillus* и *Rhizopus* spp., а также *Candida* spp. [5, 6].

Инвазивный аспергиллез (ИА) – один из наиболее

распространенных вариантов ИМ. Среди больных ИА в Санкт-Петербурге пациенты с онкогематологическими заболеваниями составляют 88%, из них около 50% – больные острым лейкозом. Наиболее частые возбудители инвазивного аспергиллеза – *A. fumigatus*, *A. niger* и *A. flavus*, значительно реже выявляют *A. terreus*, *A. versicolor*, *A. nidulans* и др. [7, 8].

Частота инвазивного аспергиллеза варьирует от 12 до 34 случаев на 1 млн. населения в год [9]. Согласно модели расчета, предложенной LIFE (Leading International Fungal Education), общее количество впервые возникшего инвазивного аспергиллеза в РФ составляет 3238 человек (2,27 случаев на 100 000 населения) [10].

При инвазивном аспергиллезе первичное поражение легких развивается у 80-90% больных, придаточных пазух носа – у 5-10%. В связи с ангиотропностью *Aspergillus* spp. в 15-40% случаев развивается гематогенная диссеминация с поражением головного мозга, кожи и подкожной клетчатки, щитовидной железы, печени, почек и других органов [5].

Клинические проявления инвазивного аспергиллеза неспецифичны. Наиболее часто у пациентов с нейтропенией выявляют рефрактерное к антибиотикам широкого спектра повышение температуры тела более 38 °С длительностью свыше 96 часов, непродуктивный кашель, боли в грудной клетке, кровохарканье и одышку. Летальность при инвазивном аспергиллезе легких у больных с нейтропенией составляет от 35 до 60%, при гематогенной диссеминации – до 90% [11].

Важнейшее условие успешного лечения инвазивного аспергиллеза легких – ранняя диагностика. В связи с неспецифичностью клинической картины основными диагностическими методами являются: компьютерная томография, микроскопия и посев материала из очага поражения, определение галактоманна в сыворотке крови [12].

Препаратом выбора для лечения ИА является вориконазол, альтернативными – каспофунгин, позаконазол или липидный комплекс амфотерицина В. При неэффективности начальной терапии возможно применение комбинации каспофунгина в сочетании с вориконазолом или липидным комплексом амфотерицина В [13].

Успехи в лечении бактериальных и вирусных осложнений, а также инвазивного кандидоза, привели к увеличению когорты больных с высоким риском развития не только ИА, но и инвазивного мукороза, возбудителями которого являются низшие грибы из класса *Zygomycetes*. По данным аутопсий, в многопрофильных стационарах экономически развитых стран мукороз выявляют в 1-5 случаях на 10000 вскрытий. Наиболее частый возбудитель мукороза – *Rhizopus oryzae*, реже обнаруживают *Rhizopus microsporus*, *Mucor indicus*, *Mucor circinelloides*, *Cunninghamella bertholletiae*, *Absidia corymbifera* [6, 14].

К факторам риска развития мукороза относят гематологические заболевания с длительным агранулоцитозом, трансплантацию органов и тканей, декомпенсированный сахарный диабет, длительное применение высоких доз глюкокортикостероидов и других иммуносупрессоров, травмы и глубокие ожоги, а также лечение дефероксамином. Мукороз характеризуется агрессивным течением с быстрым разрушением тканевых барьеров, поражением кровеносных сосудов и ге-

матогенной диссеминацией с последующим развитием тромбозов, инфарктов и некрозов тканей. Без раннего хирургического лечения и активной антифунгальной терапии заболевание приводит к летальному исходу [15, 16].

Основные клинические варианты мукороза: легочный (40-55%), риноцеребральный (22%) и диссеминированный (15-23%), реже возникают изолированные поражения желудочно-кишечного тракта, кожи и подкожной клетчатки [17, 18].

Клинические признаки мукороза легких неспецифичны. Заболевание проявляется лихорадкой, не купирующейся антибактериальными препаратами широкого спектра действия, кашлем, болями в груди, кровохарканьем или легочным кровотечением. Летальность при мукорозе легких составляет 50-80% [6].

Диагностика мукороза сложна и основана на выявлении возбудителя в материале из очагов поражения; серологические методы не разработаны. Микологические исследования (микроскопия и посев) обладают низкой чувствительностью (38-54%), поэтому необходимо повторное исследование биосубстратов. Важным компонентом диагностики является КТ легких, помогающая не только выявить очаги поражения, но и определить тактику лечения, в том числе – объем возможного хирургического вмешательства.

Основные препараты для первого этапа терапии мукороза – липидный амфотерицин В и позаконазол; применение стандартного амфотерицина В недостаточно эффективно и сопровождается выраженной токсичностью. Важнейшим условием успеха является хирургическое лечение, которое нередко затруднено в связи с тяжелым состоянием больного, выраженной тромбоцитопенией и распространенностью процесса [19, 20].

Для данного клинического случая основными факторами риска развития инвазивного микоза у пациента были: длительная нейтропения, проведение программной химиотерапии острого лейкоза, использование системных глюкокортикостероидов с целью купирования ретиноидного синдрома. С помощью полноценного обследования, включавшего КТ органов грудной клетки и околоносовых пазух, серологического и микологического исследований, смогли прижизненно диагностировать сочетанный инвазивный микоз легких (аспергиллез и мукороз), что нечасто встречается в клинической практике [12]. Тяжесть состояния пациента, быстрое развитие поражения легких с формированием множественных абсцессов и буллезных полостей, невозможность проведения хирургического лечения и отсутствие ответа на комбинированную антимикотическую терапию привели к летальному исходу.

Таким образом, инвазивные микозы (в том числе вызванные редкими патогенами) являются актуальной проблемой, поэтому необходимо дальнейшее совершенствование их диагностики и лечения.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. *Drgona L., Khachatryan A., Stephens J.* Clinical and economic burden of invasive fungal diseases in Europe: focus on pre-emptive and empirical treatment of *Aspergillus* and *Candida* species// *Eur. J. of Clin. Microbiol. and Infect. Dis.* – 2014. – Vol. 33, №1. – P. 7-21.
2. *Попова М.О., Зубаровская Л.С., Клишко Н.Н.* Инвазивные микозы при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток// *Тер. архив.* – 2012. – Vol. 7. – P. 50-57.
3. *De Pauw B., Walsh T.J., Donnelly J.P., et al.* Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group// *Clin. Infect. Dis.* – 2008. – Vol. 46, №12. – P. 1813-21.
4. *Фролова Е.В., Шадривова О.В., Филиппова Л.В. и др.* Прогностическое значение иммунологических показателей у гематологических больных инвазивным аспергиллезом// *Проблемы мед. микологии.* – 2014. – Vol. 16, №3. – С. 37-44.
5. *Leventakos K., Lewis R., Kontoyiannis D.* Fungal infections in leukemia patients: how do we prevent and treat them// *Clin. Infect. Dis.* – 2010. – Vol. 50, №3. – P. 405-415.
6. *Itai Y., Adachi Y., Kimura T.* An autopsy case of pulmonary fissure induced by zygomycosis// *Int. J. of General Med.* – 2013. – Vol. 6. – P. 575-579.
7. *Клишко Н.Н., Шадривова О.В., Хостелиди С.Н. и др.* Инвазивный аспергиллез: результаты многоцентрового исследования// *Онкогематология.* – 2014. – №. 2. – С. 13-19.
8. *Пульмонология.* Национальное руководство. Краткое издание / ред. А. Г. Чучалин – М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2013. – 768 с.
9. *Fernández-Ruiz M., Silva J., San-Juan R.* *Aspergillus* tracheobronchitis: report of 8 cases and review of the literature// *Medicine (Baltimore).* – 2012. – Vol. 91. – P. 261-273.
10. *Клишко Н.Н., Козлова Я.И., Хостелиди С.Н.* Распространенность тяжелых и хронических микотических заболеваний в Российской Федерации по модели Life Program// *Проблемы мед. микологии.* – 2014. – Vol. 16, № 1. – С. 1-8.
11. *Brown G.D., Denning D. W., Gow N.A.R., Levitz S.M.* Hidden Killers: Human Fungal Infections// *Sci. Translat. Med.* – 2012. – Vol. 4, Iss. 165. – P. 1-9.
12. *Ruhnkel M., Bohme A., Buchheidt D.* Diagnosis of invasive fungal infections in hematology and oncology – guidelines from the Infectious Diseases Working Party in Haematology and Oncology of the German Society for Haematology and Oncology (AGIHO)// *Ann. of Oncology.* – 2012. – Vol. 23, №4. – P. 823-833.
13. *Limper A., Knox K., Sarosi G.* An official American thoracic society statement: treatment of fungal infections in adult pulmonary and critical care patients// *American J. of Respir. and Critical Care Med.* – 2011. – Vol. 183. – P. 96-128.
14. *Petrikkos G., Skiada A., Lortholary O., et al.* Epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis// *Clin. Infect. Dis.* – 2012. – Vol. 54, Suppl. 1. – P. 23-34.
15. *Хостелиди С.Н., Зюзгин И.С., Ружинская О.С. и др.* Случай успешного лечения мукороза тонкой кишки у пациента с острым миелобластным лейкозом и обзор литературы// *Проблемы мед. микологии.* – 2013. – Vol. 15, №1. – P. 8-15.
16. *Skiada A., Lanternier F., Groll A., et al.* Diagnosis and treatment of mucormycosis in patients with hematological malignancies: guidelines from the 3rd European Conference on Infections in Leukemia (ECIL 3)// *Haematologica.* – 2013. – Vol. 98, №4. – P. 492-504.
17. *Klimko N., Khostelidi S., Volkova A., et al.* Mucormycosis in haematological patients: case report and results of prospective study in Saint Petersburg, Russia// *Mycoses.* – 2014. – Vol. 57. – P. 91-96.
18. *Walsh T.J., Gamaletsou M.N.* Treatment of fungal disease in the setting of neutropenia// *ASH Education Book December 6.* – 2013. – Vol. 2013, №1. – P. 423-427. – doi: 10.1182/asheducation-2013.1.423
19. *Loukeris K., Salvatore S., Hoda R.* Pulmonary zygomycosis in an immunosuppressed patient// *Diagnostic Cytopathology.* – 2011. – Vol. 39, №1. – P. 37. – ISSN 8755-1039.
20. *Kontoyiannis D., Lewis R.* How I treat mucormycosis // *Blood.* – 2011. – Vol. 118, №5. – P. 1216-1224.

Поступила в редакцию журнала 23.03.2015

Рецензент: С.Г. Бологов



МИКОТИЧЕСКИЙ АОРТИТ, ОСЛОЖНЕННЫЙ ДИСТАЛЬНОЙ ЭМБОЛИЕЙ

^{1,2}Мазуренко А.А. (зав. отделением сосудистой хирургии), ^{1,2}Заваруев А.В. (ассистент кафедры)*, ²Русаков А.А. (зав. кабинетом рентгенэндоваскулярных методов диагностики и лечения), ²Ачкасов И.А. (анестезиолог-реаниматолог), ²Бобылева О.А. (зав. отделением ультразвуковой диагностики)

¹ Амурская государственная медицинская академия (кафедра госпитальной хирургии с курсом детской хирургии); ² Амурская областная клиническая больница, Благовещенск, Россия

© Коллектив авторов, 2015

В статье представлено клиническое наблюдение пациентки 51 года с микотическим аортитом инфраренальной локализации, осложнившимся дистальной эмболией. Больная никогда не была оперирована, не страдала инфекционным эндокардитом и в течение 2-х лет находилась на лечении у хирурга и дерматолога по поводу споротрихоза правой стопы. Только при появлении трофических нарушений в левой стопе обратилась за помощью к сосудистому хирургу. По данным ультразвукового триплекса и селективной ангиографии, выявлен пристеночный ограниченный флотирующий тромбоз инфраренальной аорты и окклюзия берцовых артерий в нижней трети с двух сторон. Выполнено оперативное вмешательство – протезирование инфраренальной аорты; послеоперационный период гладкий. Диагноз был установлен на основании характерной макроскопической картины специфического процесса внутренней стенки аорты и клинического течения заболевания с учетом анамнеза.

Ключевые слова: ишемия, грибковый аортит, микотический аортит, эмболия

MYCOTIC AORTITIS COMPLICATED BY DISTAL EMBOLISM

^{1,2} Mazurenko A.A. (head the department of vascular surgery), ^{1,2} Zavoruev A.V. (assistant of the chair), ² Rusakov A.A. (head the cabinet of endovascular methods of diagnosis and treatment), ² Achkasov I.A. (anesthesiologist-resuscitator), ² Bobyleva O.A. (head of the department of ultrasound diagnostics)

¹ Amur State Medical Academy (chair of hospital surgery with the course of pediatric surgery); ² Amur Regional Clinical hospital, Blagoveshchensk, Russia

© Collective of authors, 2015

Clinical observation of the 51 years old patient with mycotic infrarenal aortitis, complicated by distal embolism has been presented in the article. The patient was not operated on and was not affected by infectious endocarditis. During the 2 years she was treated by the surgeon and dermatologist about the sporotrichosis of right foot. Only with the appearance of trophic disorders in the left foot she turned for help to a vascular surgeon. According to the ultrasonic triplex and selective angiography the parietal limited floating thrombosis of the infrarenal aorta and occlusion of the tibial arteries in the lower third on both sides were revealed. It was performed the surgery – prosthetics of infrarenal aorta. The postoperative period was smooth. The diagnosis was established based on the characteristic of macroscopic picture of the specific internal process of the inner wall of the aorta and the clinical course of the disease with regard to history.

Key words: embolism, fungal aortitis, ischemia, mycotic aortitis

* Контактное лицо: Заваруев Артём Владимирович, e-mail: zavdoc@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Микотические поражения аорты встречаются крайне редко. Тем не менее, фунгальные аневризмы аорты хорошо известны и широко описаны в научной литературе [1, 2]. Другой формой грибкового поражения аорты является микотический аортит, который наблюдают, в основном, в виде инфекционного осложнения после операций на сердце и крупных сосудах, как правило, на фоне иммунодефицитного состояния [3, 4]. Эмболические осложнения грибкового аортита, по научным данным, единичны [5; Cheri J., et al. // J. Cardiovasc. Surg. (Torino). – 1998. – Vol. 39, №5].

Клиническое наблюдение.

Пациентка Т., 51 год, 8.12.14 г. поступила в отделение сосудистой хирургии Амурской областной клинической больницы с клинической картиной хронической критической ишемии обеих нижних конечностей. Предъявляла жалобы на умеренные боли в обеих стопах в покое, больше слева, чувство онемения в них, наличие трофических язв I и 5 пальцев левой стопы.

Считает себя больной с 2010 г., когда появился болевой синдром в I пальце правой стопы. Проходила длительное амбулаторное лечение у хирурга и ортопеда с диагнозом «остеоартроз». В 2012 г. на этом же пальце возникла трофическая язва. Длительное местное лечение – без эффекта. Пациентка консультирована дерматологом; по результатам культурологического исследования – рост гриба *Sporothrix schenckii*, вызывающего споротрихоз. Больной назначили противогрибковую терапию. Язва перешла в некроз, выполнена экзартикуляция пальца. С октября 2014 г. появились трофические нарушения в левой стопе в виде трофических язв I и 5 пальцев. Пациентка была направлена к сосудистому хирургу.

Каких-либо операций, травм, хронических заболеваний в анамнезе не было. Гепатит, туберкулез и венерические заболевания отрицает. Курить бросила (общий стаж – 15-20 лет).

При объективном осмотре со стороны органов и систем без особенностей. Температура тела нормальная. Периферические лимфоузлы не увеличены. Костно-суставной аппарат без патологии. Кожный покров без высыпаний, стопы бледноватые и прохладные на ощупь. Первый палец правой стопы отсутствует. Трофические поверхностные язвы первого и пятого пальцев левой стопы. Пульсация отсутствует на тыльной артерии стопы и задней большеберцовой артерии с двух сторон.

В клиническом анализе крови обращает внимание высокий тромбоцитоз. Каких-либо значимых изменений в биохимическом анализе крови не выявили: гликемия в норме, дислипидемии нет, ревмопробы без особенностей. Анализ на ВИЧ, сифилис и туберкулез отрицательные.

Эхокардиография: камеры сердца не расширены. Уплотнены створки аортального и митрального клапанов. Гемодинамически незначимые клапанные регургитации. Сократительная способность миокарда левого желудочка сохранена (фракция выброса – 63%). Диастолическая функция желудочков нарушена по I типу. Признаков легочной гипертензии нет.

Триплексное сканирование аорты и артерий ног: 60% гетерогенный стеноз брюшной аорты в инфраренальном отделе до ее бифуркации, окклюзия берцовых

артерий с обеих сторон в дистальном отделе и тыльной артерии стопы слева гипоезогенными массами.

Мультиспиральная компьютерная томография (МСКТ)-аортография: пристеночный тромбоз инфраренального сегмента брюшной аорты до уровня бифуркации.

Селективная аортоартериография нижних конечностей: просвет брюшного отдела аорты до 18 мм с множественными пристеночными дефектами наполнения в инфраренальном отделе с признаками флотации, протяженностью 7 см и сужением просвета до 50-60%. Висцеральные артерии без особенностей. Подвздошные, бедренные и подколенные артерии с двух сторон проходимы, дефектов наполнения нет. Окклюзия задней и передней большеберцовых артерий с обеих сторон в дистальных отделах.

Ультразвуковое исследование живота и почек: конкремент и деформация желчного пузыря, диффузные изменения паренхимы поджелудочной железы, уплотнение чашечно-лоханочного комплекса обеих почек.

Эзофагогастродуоденоскопия: эрозивный антрум-гастрит.

В иммунологическом анализе крови: антитела к фосфолипидам, кардиолипину, антиядерные антитела не обнаружены, IgA – 1,3 г/л, IgM – 1,7 г/л, IgG – 8,0 г/л, циркулирующие иммунные комплексы – 0 у.е., компонент С3 – 75,8, компонент С4 – 11,2.

Выставлен диагноз: Микотический аортит. Пристеночный флотирующий тромбоз инфраренальной аорты. Эмболия н/з берцовых артерий билатерально. Ишемия левой н/конечности IV ст. по А.В. Покровскому.

18.12.14 г. лапаротомным доступом выделена аорта от уровня почечных артерий до бифуркации – визуально без патологии (Рис.1).



Рис. 1. Инфраренальная аорта

Аорта отжата на зажимах, пересечена поперек на вышеописанном участке. В просвете интима язвенно-некротически изменена с пристеночными тромбами (Рис.2).

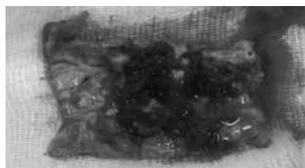


Рис. 2. Резецированная внутренняя стенка аорты

Инфраренальная аорта протезирована дакроновым протезом 18 мм конец в конец (Рис.3).



Рис. 3. Протезированная часть аорты

Время операции – 1 час 50 минут, время пережатия аорты – 30 минут. Кровопотеря – 300 мл. За время операции введено 2,5 тысячи единиц гепарина внутривенно. После операции больная сутки находилась в палате интенсивной терапии. Течение послеоперационного периода гладкое. Проведен курс ангиотропной терапии с заметным регрессом симптомов ишемии обеих стоп. Пациентка выписана на 8-сутки в удовлетворительном состоянии.

ОБСУЖДЕНИЕ

Окклюзия дистальных отделов берцовых артерий с обеих сторон расценена как эмболия на фоне флотирующего пристеночного тромбоза инфраренальной аорты. Пациентка уже в течение 2-х лет получает противогрибковую и антибактериальную терапию. Именно этим объяснимо отсутствие роста микроорганизмов при посеве с язвенно-некротической стенки аорты и неоднократных посевах с язв левой стопы.

Споротриксоз считают профессиональной болезнью садовников, фермеров, цветоводов. Синонимы: болезнь Шенка, болезнь Берманна, ринокладидоз. Споротриксозом болеют люди, животные, насекомые. При заболевании, главным образом, поражены кожа и подкожная клетчатка, лимфатические узлы, реже – мышцы, легкие, кости и внутренние органы. Мужчины болеют чаще, чем женщины. Частота заболеваний – от 1 до 2 случаев на миллион людей в США [6].

В медицинской литературе довольно много публикаций о поражениях споротриксозом внутренней оболочки артерий и сердца, подтвержденных микроскопией. В описанном нами случае, к сожалению, не удалось выявить возбудителя, что связано, вероятнее всего, с длительной антигрибковой терапией. Однако, макро- и микроскопическая картина поражения самой аорты укладывается именно в грибковый аортит. А наличие в анамнезе задокументированного споротриксоза стоп в сочетании с клинической картиной послужили основанием для постановки данного диагноза.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. *Hinchliffe R.J., Powell J.T.* The value of registries for rare diseases: bacterial or mycotic aortic aneurysm// *Circulation*. – 2014. – Vol. 130. – P. 2129-2130.
2. *Покровский А.В.* Клиническая ангиология: Руководство. – М.: Медицина, 2004. – Т.1. – С. 658-659.
3. *Khumri T.M., Joslin N.B., Nayyar S., Main M.L.* Transesophageal echocardiographic diagnosis of *Aspergillus fumigatus* aortitis after percutaneous coronary intervention// *J. Am. Soc. Echocardiogr.* – 2006. – Vol. 19, №8. – P. 1072.
4. *Pasqualotto A.C., Denning D.W.* Post-operative aspergillosis // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2006. – Vol. 12, №11. – P. 1060-1076.
5. *Abenza-Abildua M.J., Fuentes-Gimeno B., Morales-Bastos C., et al.* Stroke due to septic embolism resulting from *Aspergillus* aortitis in an immunocompetent patient // *J. Neurol. Sci.* – 2009. – Vol. 284, №1-2. – P.209-210.
6. *Ryan K.J., Ray C.G.* *Sherris Medical Microbiology*, 4th ed., McGraw Hill. – 2004. – P. 654-656.

Поступила в редакцию журнала 31.03.2015

Рецензент: Н.В. Шабашова

ИНФЕКЦИИ КРОВОТОКА У ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

**Биялова К.И. (профессор, г.н.с.)*, Аринова
А.Ж. (специалист по лабораторному делу),
Темирбаева Ж.С. (специалист по лабораторному
делу)**

Научный центр педиатрии и детской хирургии
Министерства здравоохранения и социального
обеспечения Республики Казахстан, Алматы, Казахстан

© Коллектив авторов, 2015

В работе приведены результаты анализа бактериемий у гематологических больных. Определяли спектр и видовой состав гемокультур. С помощью анализа спектра бактериемий установили наибольшую частоту участия в возникновении инфекций кровотока грамположительных микроорганизмов по сравнению с грамотрицательными бактериями. Результатом инфекционных осложнений было выявление фунгемий. Дан сравнительный анализ чувствительности выделенных культур к антибактериальным препаратам.

Ключевые слова: антибиотикочувствительность, бактериемии, грамотрицательные микроорганизмы, грамположительные микроорганизмы, фунгемии

BLOODSTREAM INFECTIONS IN HEMATOLOGICAL PATIENTS

**Bilyalova K.I. (professor, chief scientific
collaborator), Arinova A.J. (specialist in laboratory
case), Temirbayeva J.S. (specialist in laboratory case)**

Scientific Center of Pediatrics and Children Surgery, Ministry
of health and social welfare of the Republic of Kazakhstan,
Almaty, Kazakhstan

© Collective of authors, 2015

Results of the bacteriemia analysis in hematological patients have been presented in the article. Range and species composition of blood cultures were defined. With the help of spectrum analysis of bacteriemia was set the highest frequency of participation in the occurrence of bloodstream infections of gram-positive bacteria compared to gram-negative bacteria. The result of infectious complications was the identification of fungemia. A comparative analysis of the sensitivity of selected crops to antibacterial drugs has been presented.

Key words: antibiotic sensitivity, bacteremia, fungemia, gram-negative organisms, gram-positive microorganisms

ВВЕДЕНИЕ

Ежегодно регистрируют около 200 тысяч случаев внутрибольничных инфекций кровотока, которые значительно чаще развиваются у больных с катетерами, чем без них. С середины 80-х годов при внутрибольничных инфекциях кровотока все чаще стали выявлять грамположительные, а не грамотрицательные бактерии [Основы инфекционного контроля//Американский международный союз здравоохранения, 2003; John E. McGowan Jr. // Am. J. Med, 1991. – Vol. 91, Issue 3, Suppl. 2]. Самые распространенные возбудители инфекций кровотока – коагулазаотрицательные стафилококки, особенно эпидермальный. На долю этих микроорганизмов приходится до 30% всех случаев инфекций, связанных с катетеризацией [1-3]. Выросла доля инфекций кровотока, вызываемых энтерококками. Особую опасность представляют ванкомицинрезистентные штаммы. Распространение энтерококков среди возбудителей внутрибольничных инфекций связано с неоправданно частым применением антибиотиков широкого спектра действия для лечения и профилактики инфекций [4]. Все больше случаев внутрибольничных инфекций, связанных с катетеризацией, вызвано грибами. Среди всех выявленных за этот период случаев, фунгемии были вызваны, в основном, *Candida* spp. В результате исследований доказано, что возбудители могут передаваться через инфузионные растворы, оборудование, руки медицинского персонала и непосредственно от одного больного другому [5].

Грамотрицательные бактерии – более редкие возбудители инфекций, связанных с катетеризацией, чем грамположительные бактерии, грибы, но именно ими обычно вызваны инфекции, обусловленные контаминацией инфузионных растворов и систем прямого измерения АД. Пути проникновения возбудителей в кровотоки многообразны [Основы инфекционного контроля//Американский международный союз здравоохранения, 2003]. Чаще всего они попадают туда с кожи по внешней поверхности катетера. Наиболее строгий диагностический критерий инфекций кровотока – выделение одного и того же микроорганизма (вид, чувствительность к антибиотикам) при бактериологическом исследовании крови и катетера у больного с симптомами инфекции кровотока в отсутствие других очагов инфекций [Антибактериальная терапия /Под ред. Страчунского Л.С. и др. – М., 2000]. Разработка универсальных, подходящих для всех клиник, схем профилактики и лечения инфекционных осложнений у детей с гематологическими заболеваниями затруднена, так как в различных стационарах спектр возбудителей и частота их выделения существенно варьируют. По имеющимся в научной литературе данным, терапии инфекционных осложнений не всегда могут быть перенесены в конкретное лечебное учреждение [6, 7].

Цель – проанализировать видовой спектр и чувствительность к антибактериальным препаратам микроорганизмов, выделенных из крови у детей с гематологическими заболеваниями, находившихся на стационарном лечении в клинике Научного центра педиатрии и детской хирургии МЗСО Республики Казахстан, Алматы.

* Контактное лицо: Биялова Кальсим Искендиловна,
тел.: 87272992636

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Микробиологическое исследование крови 6431 пациентов с идентификацией микроорганизмов и определением чувствительности проводили стандартными, общепринятыми методами (посев на питательные, дифференциально-диагностические и хромогенные среды). Антибиотикорезистентность устанавливали диско-диффузионным методом, а также с помощью микробиологического анализатора Walk away 40 (США) и компьютерной программы Whonet 5 [8, 9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Положительный результат микробиологического исследования инфекций кровотока получили у 1384 пациентов (22%). Причем грамположительные бактерии выявили в 51,8% случаев, грамотрицательные – в 32,9%. Частота встречаемости микромицетов составила 14,4%, неферментирующие грамотрицательные бактерии обнаружили в 0,9% (Рис.1).

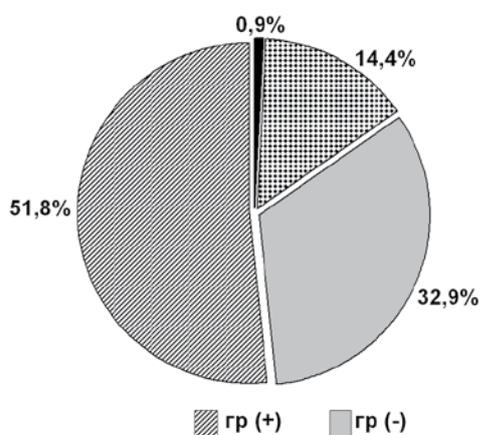


Рис. 1. Структура бактериемий у гематологических больных

Доля возбудителей бактериемий в монокультуре – 97%, в ассоциации – 3%. Ассоциации наблюдали в следующих сочетаниях: *Enterobacter* spp. и *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *S. aureus*, *S. aureus* и *Candida* spp., *Enterobacter* spp. и *Staphylococcus* spp., *Enterobacter* spp. и *Penicillium*, *E. coli* и *Streptococcus* spp.

В видовом соотношении представители грамположительных бактерий распределились следующим образом: *S. aureus* – 47,5%, *Staphylococcus* spp. – 45,4%, *Streptococcus* spp. – 7,3%. Грамотрицательные микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* выявляли с различной частотой – от 43 до 0, 2% во все годы наблюдения. Спектр представителей семейства *Enterobacteriaceae* довольно разнообразен: *Enterobacter* spp., *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Cedecea*, *Hafniae* spp., *Proteus* spp., *Serratia* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Providencia* spp., *Tatumella*, *Ewingella*, *Empedobacter* spp., *Myroides* species. Неферментирующие грамотрицательные бактерии были представлены *Acinetobacter*, *Chromobacter violonella* в 0,9%. При анализе спектра фунгемий обнаружили преобладание грибов рода *Candida* (13,8%), плесневые грибы определяли в 0,6%. Идентифицированы различные виды *Candida* spp., *Penicillium*, *Mucor*, *Cryptococcus neoformans* и незначительный процент *Aspergillus* spp.

Протестировано на чувствительность 723 штамма (51,8%) грамположительных и 460 (32,9%) грамотрицательных гемокультур. В результате анализа чувствительности грамположительных кокков к антибактери-

альным препаратам выявили, что наибольшую активность в отношении грамположительных гемокультур проявили аминогликозиды 3 поколения (99,4%). Следующие по силе активности оказались карбапенемы (98,2%). 97,9% протестированных штаммов были чувствительны к цефалоспорином IV поколения. Аминогликозиды I поколения проявили активность в отношении 96,2% штаммов. Далее активность антибактериальных препаратов была следующей: 95,4% штаммов чувствительны к гликопептидам; цефалоспорины II поколения активны в отношении 92,5% протестированных культур; 80,9% штаммов чувствительны к аминогликозидам II поколения; макролиды проявили свою активность в отношении 84,6% гемокультур. Цефалоспорины I и III поколения проявили активность в отношении 78,4% и 75,2% штаммов соответственно. Половина штаммов (54,4%) оказались резистентными к бета-лактамам пенициллинам. К цефалоспорином III и I поколения были резистентными 21-25% изученных штаммов (Рис.2).

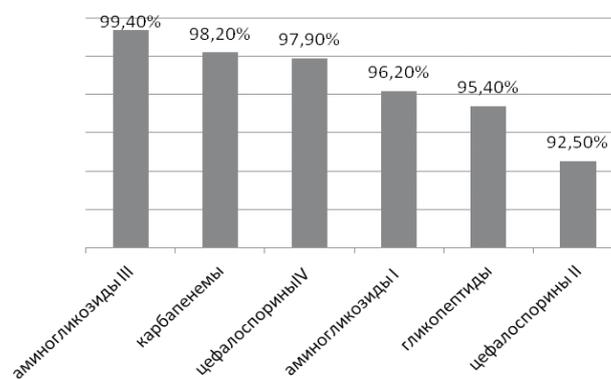


Рис. 2. Спектр чувствительности грамположительных гемокультур

Спектр антибиотикорезистентности изученных 460 грамотрицательных гемокультур выглядел следующим образом. Наибольшую активность к 96,5% культур проявили бета-лактамы пенициллины. Далее по силе активности определены аминогликозиды и хинолоны – 95,9% и 95,7% штаммов соответственно. Нитрофураны показали активность в отношении 91,3% гемокультур. 89,6% грамотрицательных гемокультур проявили чувствительность к аминогликозидам II поколения и цефалоспорином I поколения. Цефалоспорины II поколения активны в отношении 86% изученных штаммов. 83% протестированных гемокультур чувствительны к карбапенемам. Из изученных штаммов от 73,9% до 75,9% оказались чувствительными к аминогликозидам I поколения и цефалоспорином IV поколения. Более 37% гемокультур проявили резистентность к цефалоспорином III поколения, 26% – к цефалоспорином IV поколения (Рис. 3).

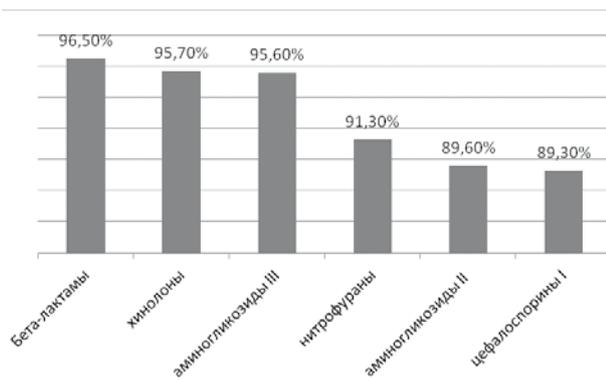


Рис. 3. Спектр чувствительности грамотрицательных гемокультур

ВЫВОДЫ

1. С помощью анализа спектра бактериемий установили наибольшую частоту участия в возникновении инфекций кровотока грамположительных микроорганизмов по сравнению с грамотрицательными бактериемиями.
2. В качестве возбудителей инфекций кровотока коагулозоположительные и коагулозоотрицательные стафилококки обнаруживали почти в одинаковом процентном соотношении (47,5% и 45,4% соответственно).

3. Среди грамотрицательных бактерий лидировали *E. coli* (43%), *Enterobacter* spp. (39,7%). Видовой спектр грамотрицательных гемокультур разнообразен.

4. Частота выявляемости возбудителей бактериемий в монокультуре составила 97%, в ассоциации – 3%.

5. Как результат инфекционных осложнений следует отметить наличие фунгемий в 14,4%.

6. Для целенаправленной этиотропной терапии инфекций кровотока необходим комплекс бактериологических и микологических исследований.

7. Грамположительные гемокультуры инфекций кровотока гематологических больных чувствительны к аминогликозидам III поколения, карбапенемам, цефалоспорином IV поколения, аминогликозидам I поколения, гликопептидам, цефалоспорином II поколения, макролидам, аминогликозидам II поколения. Установлена резистентность к бета-лактамам пенициллинам.

8. Грамотрицательные гемокультуры, наоборот, оказались чувствительными к бета-лактамам пенициллинам, аминогликозидам III поколения, хинолонам, нитрофуранам, аминогликозидам II поколения, цефалоспорином I-II поколения, карбапенемам. Отмечали резистентность к цефалоспорином III-IV поколения, аминогликозидам I поколения.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Косянова К.Г. Микроорганизмы - контаминанты рабочих растворов дезинфектантов и антисептиков// Проблемы мед. микологии. – 2014. – Т. 16, №2. – С. 89.
2. Стижак Н.П., Кайтанджан Е.И., Щетинкина Е.Е., Чеботкевич В.Н. Этиология бактериемий и фунгемий у онкологических больных// Проблемы мед. микологии. – 2014. – Т. 16, №2. – С.133-134.
3. Куцевалова О.Ю., Янковская Г.В., Аствацатурьян Е.И. Структура возбудителей сепсиса// Проблемы мед. микологии. – 2014. – Т. 16, №2. – С. 97.
4. Шадринова О.В., Десятник Е.А., Хостелиди С.Н. и др. Инвазивный аспергиллез у гематологических пациентов// Проблемы мед. микологии. – 2014. – Т. 16, №2. – С. 148.
5. Хостелиди С.Н., Шадринова О.В., Десятник Е.А. и др. Особенности инвазивного аспергиллеза у детей Санкт-Петербурга // Проблемы мед. микологии. – 2014. – Т. 16, №2. – С. 134.
6. Решедько Г.К., Рябкова Е.Л., Фарещук А.Н., Страчунский Л.С. Неферментирующие грамотрицательные возбудители нозокомиальных инфекций в ОРИТ России: проблемы антибиотикорезистентности// Клин. антимикроб. химиотерапия. – 2006. – Т. 8, №3. – С. 172.
7. Баранова А.А., Страчунский Л.С. Применение антибиотиков у детей в амбулаторной практике. Методические рекомендации// Клин. антимикроб. химиотерапия. – 2007. – Т. 9, №3. – С. 200-210.
8. Андреева И.А. Изучение антибиотикорезистентности микроорганизмов с использованием компьютерной программы Whonet // Проблемы мед. микологии. – 2013. – Т. 15, №2. – С. 54.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 14th informational supplement// NCCLS document M 100-S-14.2004-National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA (in Russ).

Поступила в редакцию журнала 03.06.2015

Рецензент: Н.П. Елинов



АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МОЧИ ПАЦИЕНТОВ МНОГОПРОФИЛЬНОГО СТАЦИОНАРА

¹Козлова Н.С. (доцент кафедры)*, ²Баранцевич Н.Е. (н.с.), ²Иванова Л.В. (н.с.), ²Гоик В.Г. (с.н.с.), ²Баранцевич Е.П. (зав. ЦНИЛ)

¹ Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова (кафедра медицинской микробиологии); ² Северо-Западный Федеральный медицинский исследовательский центр, Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2015

Методом серийных разведений определена чувствительность к 16 антибактериальным препаратам 204 штаммов энтеробактерий, выделенных из мочи пациентов многопрофильного стационара. Отмечали большое разнообразие спектров антибиотикорезистентности энтеробактерий с высоким удельным весом полирезистентных культур. Наибольшую активность в отношении энтеробактерий в данном стационаре проявляли карбапенемы. Fosфомицин, амикацин и ингибиторзащищенные пенициллины сохраняли активность в отношении эшерихий. У штамма *Klebsiella pneumoniae*, устойчивого к карбапенемам, выявили карбапенемазу NDM-1.

Ключевые слова: антибактериальные препараты, антибиотикорезистентность, карбапенемаза NDM-1, клебсиеллы, моча, энтеробактерии, эшерихии

RESISTANCE TO ANTIBIOTICS IN ENTEROBACTERIACEAE, ISOLATED FROM URINE IN A MULTIDISCIPLINARY MEDICAL CENTRE

¹Kozlova N.S. (associate professor of the chair), ²Barantsevich N.E. (scientific collaborator), ²Ivanova L.V. (scientific collaborator), ²Goik V.G. (senior scientific collaborator), ²Barantsevich E.P. (head of scientific research laboratory)

¹ North-West State Medical University named after I.I. Mechnikov (Chair of Medical Microbiology); ² North-West Federal Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2015

Minimal inhibitory concentrations (MIC) of 16 antibiotics were studied in 204 strains of Enterobacteriaceae isolated from urine of patients in a multidisciplinary medical center. The high ratio of multidrug resistance (MDR), as well as numerous spectra of resistance, were evaluated. Sensitivity to carbapenems was observed in the majority of Enterobacteriaceae. Fosfomycin, amikacin and inhibitor-protected penicillins retained the activity against *Escherichia coli*. Resistance to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* strain was associated with the presence of NDM-1 gene.

Key words: antibiotics, Enterobacteriaceae, *Escherichia*, *Klebsiella*, NDM-1 carbapenemase, resistance to antibiotics, urine

* Контактное лицо: Козлова Надежда Сергеевна, Тел.: (812) 543-19-20

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время энтеробактерии являются одними из наиболее часто встречающихся возбудителей как внебольничных, так и нозокомиальных инфекций разной локализации, в том числе инфекций мочевыводящих путей [1-3]. При госпитальных инфекциях энтеробактерии по актуальности делят 1-2 места со стафилококками [1, 4-6]. Среди возбудителей инфекций мочевыводящих путей (ИМП) превалируют *Escherichia coli* (до 70-95% при неосложненных ИМП), *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp. [1, 2], при этом для энтеробактерий характерна устойчивость к антибиотикам разных групп [6-8]. Ведущим механизмом резистентности к бета-лактамам антибиотикам у энтеробактерий является выработка бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС), а также карбапенемаз, гены которых локализируются на плазидах и способны передаваться при внутривидовой, межвидовой и, даже, межродовой передаче. При этом микроорганизмы отличаются ассоциированной резистентностью к другим антибиотикам: гентамицину – до 80%, ципрофлоксацину – 40-60% [1]. Так, при исследовании 573 штаммов энтеробактерий из 25 стационаров 18 городов России в 2011-2012 гг. продукция БЛРС была обнаружена у 78,2% всех изолятов, в том числе – у 90,6% *Klebsiella pneumoniae* и у 82,1% *E. coli* [4].

В силу сложных механизмов устойчивости и формирования полирезистентных штаммов выбор адекватного режима антибиотикотерапии нозокомиальных инфекций, вызванных энтеробактериями, представляет определенные сложности [8, 9]. Учитывая высокий уровень резистентности энтеробактерий к антимикробным препаратам разного механизма действия и его выраженную вариабельность в различных регионах, очень важным представляется изучение антибиотикорезистентности этих микроорганизмов, особенно – выделенных в многопрофильных стационарах [9], что и было целью нашего исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В 2011-12 гг. в многопрофильном стационаре г. Санкт-Петербурга из мочи пациентов с инфекциями мочевыводящих путей были выделены 204 штамма энтеробактерий, в том числе: 124 культуры *Escherichia coli*, 65 штаммов *Klebsiella pneumoniae*, 11 культур *Enterobacter* spp. и по 2 штамма *Proteus mirabilis* и *Morganella morganii* (Рис.1).

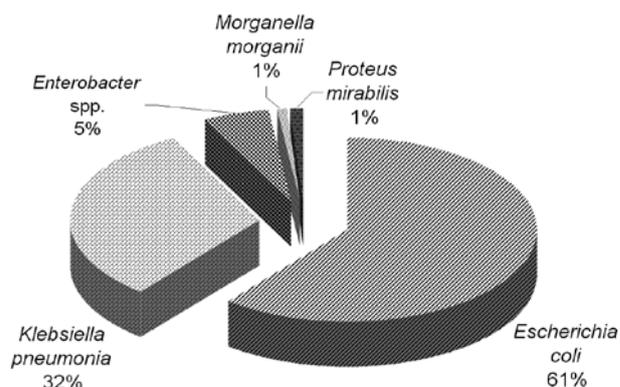


Рис. 1. Удельный вес энтеробактерий в моче пациентов многопрофильного стационара

Идентификацию этиологически значимых микроорганизмов осуществляли фенотипически и по последовательности первых 500 пар нуклеотидов гена 16SPHK [10]. Определение чувствительности выделенных чистых культур энтеробактерий к антибактериальным препаратам проводили методом серийных разведений в агаре Мюллер-Хинтон с диапазоном концентраций от 0,06 мкг/мл до 128 мкг/мл [11].

Была определена чувствительность всех штаммов к 16 антибактериальным препаратам: ампициллину (Ap), цефотаксиму (Ctx), цефепиму (Cpm), цефиксиму (Cfx), цефтриаксону (Cta), комбинациям амоксициллин / клавуланат (Am/cl), пиперациллин / тазобактам (Pi/tz), цефоперазон / сульбактам (Cfp/sb), ципрофлоксацину (Cip), моксифлоксацину (Mox), имипенему (Im), меропенему (Mer), эртапенему (Ert), гентамицину (Gm), амикацину (Ak), фосфомицину (Fm). Использовали референтные штаммы *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218. Определение категорий чувствительности на основании полученных МИК проводили в соответствии с рекомендациями European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2013) [11]. Полученные данные обрабатывали статистически с помощью пакета прикладных программ SPSS Statistics 17.0 (США) [Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М., 1999]. Для фенотипического выявления карбапенемазной активности применяли модифицированный тест Ходжа. Детекцию генов карбапенемаз (KPC, NDM, OXA-48, VIM, IMP) осуществляли с использованием отечественных наборов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Для точного определения выявленного гена исследовали последовательность нуклеотидов гена, отвечающего за продукцию карбапенемазы [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Большая часть изученных культур (75,0%) оказались устойчивы хотя бы к одному антибактериально-

му препарату. Отметим, что удельный вес резистентных культур среди штаммов, выделенных из мочи, был ниже, чем среди культур энтеробактерий, выделенных в этот же промежуток времени в данном стационаре из респираторного тракта (94,6%) [13]. Чувствительными ко всем препаратам были обе культуры протей, высокий удельный вес чувствительных ко всем препаратам штаммов был выявлен у *E. coli* (39,5%). Все культуры клебсиелл и морганелл были устойчивы хотя бы к одному антибиотику.

Среди энтеробактерий преобладали культуры, устойчивые к ампициллину (72,5%), ципрофлоксацину и моксифлоксацину (по 42,2%). Более трети штаммов были устойчивы к цефалоспорином III (по 38,2%) и IV (34,8%) поколения (Рис. 2).

В большом международном исследовании в 2011 г. из 76596 штаммов энтеробактерий, выделенных в 28 странах, устойчивыми к цефалоспорином III поколения оказались 13,3% [14], достигая 52% при инфекциях кровотока [15]. За период с 2008 по 2011 гг. в большинстве стран наблюдали выраженное увеличение удельного веса устойчивых к цефалоспорином III поколения культур, и ни в одной стране не отмечали снижения количества таких штаммов среди энтеробактерий. При этом широкое использование цефалоспоринов, помимо роста резистентности к ним самим, сопровождалось селекцией и распространением полирезистентных БЛРС-продуцирующих энтеробактерий (концепция «параллельного ущерба») [2, 16].

Почти треть выделенных культур оказалась устойчива к амоксициллин / клавуланату (31,9%) и гентамицину (30,9%). Несколько большую активность проявляли комбинации пиперациллин / тазобактам (21,6% устойчивых культур) и цефоперазон / сульбактам (17,6%), а также амикацин (резистентность 18,1%). Наиболее активными в отношении энтеробактерий оказались фосфомицин (7,3%) и карбапенемы.

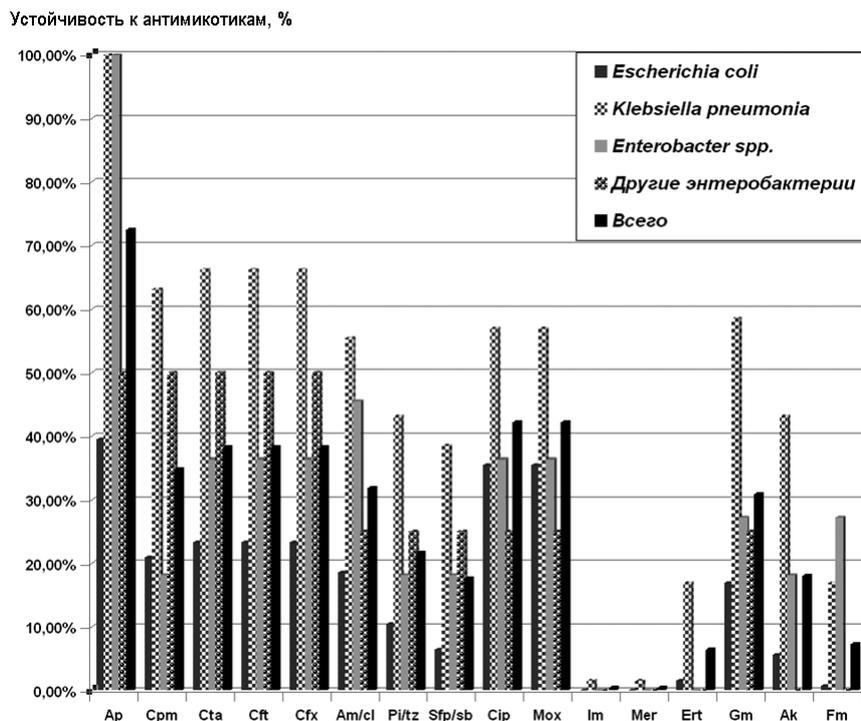


Рис. 2. Устойчивость энтеробактерий к антимикробным препаратам

Отметим, что широкое использование карбапенемов в качестве препаратов стартовой эмпирической терапии обеспечивает селекцию штаммов энтеробактерий, продуцирующих карбапенемазы [17]. В то же время удельный вес устойчивых к ним энтеробактерий остается невысоким. Так, в 2011 г. из 73920 штаммов энтеробактерий, выделенных в 28 странах, устойчивыми к карбапенемам были только 1,8%, причем большинство устойчивых культур было выявлено в Греции [14]. Устойчивость к цефалоспорином III поколения и карбапенемам является маркером полирезистентности энтеробактерий [15]. Считают, что в России практически отсутствует резистентность энтеробактерий к карбапенемам [9, 18], однако в настоящее время такие штаммы уже регистрируют в разных регионах России [19], в том числе в данном многопрофильном стационаре [12]. Среди энтеробактерий, выделенных в стационаре, 6,4% были устойчивыми к эртапенему, только 1 штамм клебсиеллы (0,5%) был устойчив к имипенему и меропенему. Большинство устойчивых к карбапенемам культур – *K. pneumoniae* (84,6%), удельный вес резистентных к эртапенему культур среди них составил 16,9%.

Наибольшую устойчивость к антимикробным препаратам среди энтеробактерий в данном стационаре проявляли штаммы клебсиелл (Рис.2). К большинству изученных антимикробных препаратов удельный вес устойчивых культур этих микроорганизмов колебался в диапазоне от 38,5% до 100%. Наибольшую активность в отношении клебсиелл проявляли карбапенемы, особенно – имипенем и меропенем, к которым выявили только одну резистентную культуру (1,5%). Данный полирезистентный штамм *K. pneumoniae* оказался устойчивым к 15 из 16 изученных нами антимикробных препаратов и проявлял чувствительность только к фосфомицину. При дополнительном определении чувствительности культуры еще к пяти антибиотикам установили ее чувствительность к азтреонаму, колистину, тетрациклину, доксициклину и тигециклину.

С помощью модифицированного теста Ходжа выявили у штамма карбапенемазную активность, далее методом ПЦР и последующего сиквенирования по Сэнгеру был обнаружен ген NDM-1 [12]. Обнаружение в многопрофильном стационаре *K. pneumoniae* – продуцента карбапенемазы является опасным прогностическим признаком, требующим строгого контроля для препятствия распространения устойчивости к карбапенемам.

В отношении энтеробактера и *E.coli* также наиболее активными были карбапенемы, определенную активность сохранил амикацин (18,2% устойчивых штаммов энтеробактера и 5,6% *E. coli*), для кишечной палочки характерной осталась чувствительность к фосфомицину, к которому отмечали только одну устойчивую культуру (0,8%). Показано, что резистентность *E. coli* к этому препарату со временем меняется очень незначительно и во всем мире обычно не превышает 5%, что, возможно, связано с особенностями механизма его действия, препятствующими развитию к нему устойчивости [2]. К преимуществам препарата можно отнести отсутствие перекрестной устойчивости с другими антимикробными препаратами и доказанное предупреждение также адгезии возбудителя к эпителию мочевыводящих путей, что делает фосфоми-

цин по-прежнему актуальным для лечения инфекций мочевыводящих путей [2].

Безусловный интерес представляет ассоциированная устойчивость энтеробактерий к разным антимикробным препаратам, которая приводит к формированию полирезистентных и панрезистентных штаммов. В нашем исследовании ассоциированная устойчивость к цефалоспорином и гентамицину составила 28,9%, к цефалоспорином и фторхинолоном – 31,4%, что снижает ценность использования данных комбинаций для терапии инфекций, вызванных энтеробактериями. В определенной части случаев, в связи с гиперпродукцией БЛРС в отношении энтеробактерий, неэффективны и ингибиторзащищенные бета-лактамы – до 40,5% [1]. В нашем исследовании ингибиторзащищенные бета-лактамы не обладали высокой активностью в отношении энтеробактерий, устойчивость к амоксилину-клавуланату составила 31,9%, к пиперациллин / тазобактаму – 21,6% и цефоперазон / сульбактаму – 17,6%. Отметим, что 18,6% культур энтеробактерий имели ассоциированную устойчивость к цефалоспорином, производным фторхинолонов, аминогликозидам и ингибиторзащищенным пенициллинам.

На рисунке 3 видно, что среди энтеробактерий чаще выявляли штаммы, устойчивые к одному (20,6%) антимикробному препарату. Значительно реже наблюдали культуры, устойчивые к трем и двенадцати (по 7,4%), десяти (6,4%) и восьми, девяти (по 5,4%) препаратам. Наибольшее разнообразие сочетаний устойчивости отмечали у клебсиелл.

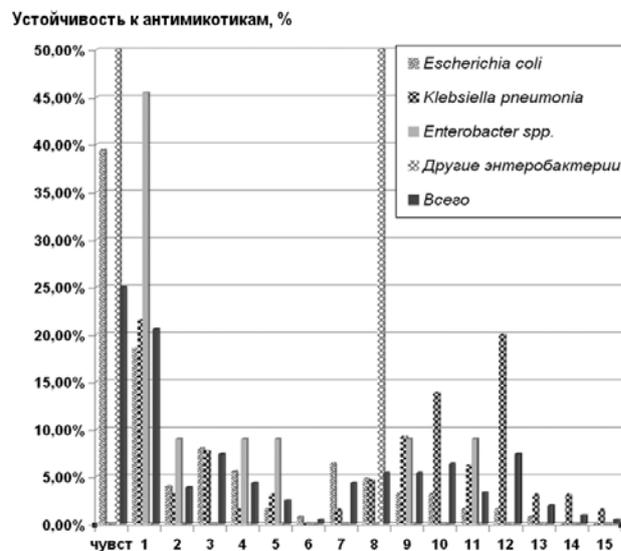


Рис. 3. Сочетанная устойчивость энтеробактерий к антимикробным препаратам

Почти половину выделенных культур составили полирезистентные (устойчивые к 3 и более препаратам разного механизма действия) штаммы (43,1%). Их удельный вес был равен удельному весу полирезистентных энтеробактерий, выделенных в этот же промежуток времени в данном стационаре из респираторного тракта (42,3%) [13], и различался у разных родов энтеробактерий (Рис. 4). Максимальное количество таких культур обнаружили среди клебсиелл (67,7%). Самым низким удельный вес полирезистентных культур оказался среди *E. coli* (29,8%).

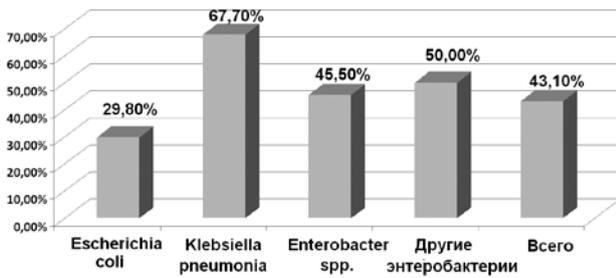


Рис. 4. Полирезистентные штаммы энтеробактерий

Всего у энтеробактерий было выявлено 46 спектров антибиотикорезистентности, наиболее распространенным среди них была моноустойчивость к ампициллину (20,6%). Значительно реже встречались следующие по распространенности спектры резистентности – к Ap, Cip, Mox, (5,9%) и Ap, Cpm, Cta, Cft, Cfx, Am/cl, Pi/tz, Sfp/sb, Gm, Ak, Cip, Mox (3,9%). В целом, штаммы с десятью спектрами (Рис. 5), вместе составили почти половину изученных культур (46,5%). Остальные 36 спектров были представлены единичными штаммами и составили вместе менее трети изученных культур (28,5%).

Наиболее разнообразными спектры антибиотикорезистентности оказались у клебсиелл (29 спектров); у эшерихий отмечали 27 спектров, у энтеробактера – 7. Наиболее распространенным спектром устойчивости среди эшерихий, клебсиелл и энтеробактера была моноустойчивость к ампициллину, которая является природной только для клебсиелл (18,5%, 21,5% и 45,5% соответственно), но в остальном роды энтеробактерий различались по типам резистентности. Так, вторым и третьим по распространенности у эшерихий были спектры устойчивости к трем (Ap, Cip, Mox – 6,5%) и семи (Ap, Cip, Mox, Cpm, Cta, Cft, Cfx – 4,0%), а у клебсиелл – к двенадцати (Ap, Cpm, Cta, Cft, Cfx, Am/cl, Pi/tz, Sfp/sb, Gm, Ak, Cip, Mox – 10,8%) и десяти (Ap, Cpm, Cta, Cft, Cfx, Am/cl, Pi/tz, Sfp/sb, Gm, Ak – 9,2%).

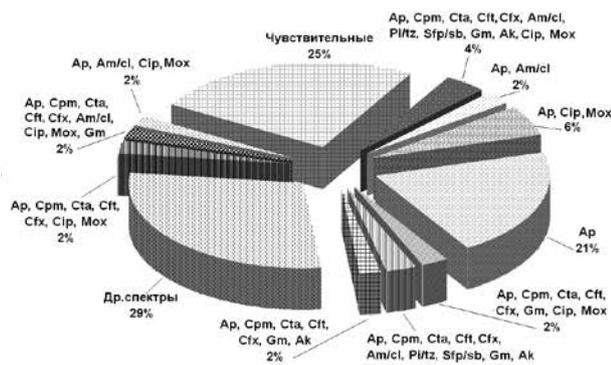


Рис. 5. Спектры антибиотикорезистентности энтеробактерий

Спектры резистентности, наиболее характерные для клебсиелл и эшерихий, представлены на рисунках 6 и 7. Отметим, что из сорока шести спектров устойчивости тринадцать обнаруживали только у эшерихий, пятнадцать – только у клебсиелл, один – только у энтеробактера. В то же время, десять спектров резистентности были общими для эшерихий и клебсиелл, пять – для *E. coli* и энтеробактера, четыре – для клебсиелл и энтеробактера и по одному – для эшерихий и морганеллы, клебсиеллы и морганеллы.

Только два спектра встречались у трех родов энтеробактерий (к Ap и Ap, Am, Cl).

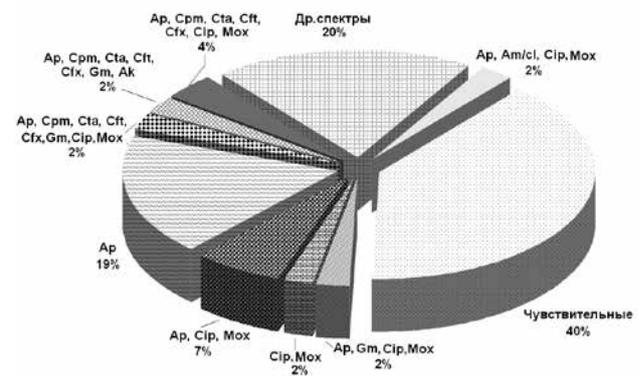


Рис. 6. Спектры антибиотикорезистентности *E. coli*

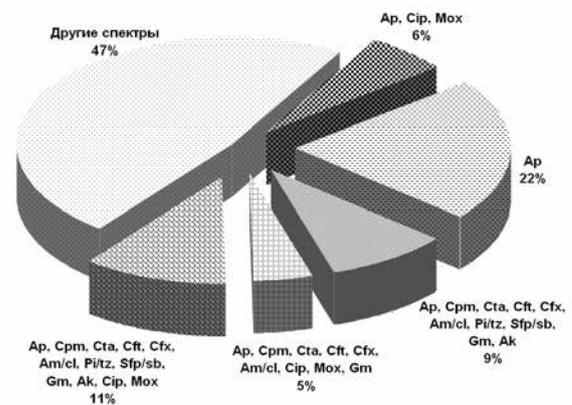


Рис. 7. Спектры антибиотикорезистентности *K. pneumoniae*

Разнообразие спектров антибиотикорезистентности обусловлено высокой гетерогенностью циркулирующих в стационаре энтеробактерий, что дает возможность предположить отсутствие широкого распространения в данном стационаре госпитальных штаммов энтеробактерий.

ВЫВОДЫ

1. Среди энтеробактерий, выделенных из мочи в многопрофильном стационаре, преобладали антибиотикорезистентные культуры с высоким удельным весом полирезистентных штаммов (43,1%), которые чаще отмечали среди клебсиелл (67,7%) и энтеробактера (45,5%).

2. Наибольшую активность в отношении энтеробактерий проявляли карбапенемы, особенно имипиенем и меропенем, к которым была выявлена только одна устойчивая культура *K. pneumoniae*. В отношении эшерихий сохраняли активность фосфомицин, к которому обнаружили только один устойчивый штамм, амикацин и ингибиторзащищенные пенициллины.

3. Устойчивость к карбапенемам штамма *K. pneumoniae* была обусловлена продукцией карбапенамазы NDM-1 и сочеталась с полирезистентностью к фторхинолонам и аминогликозидам. Культура проявляла чувствительность к фосфомицину, доксициклину, тигециклину, азтреонаму, колистину и хлорамфениколу. Выявление в стационаре продуцентов новых карбапенемаз является опасным прогностическим признаком, подтверждающим неблагоприятную глобальную тен-

денцию распространения устойчивости к карбапенемам.

4. Вариабельность устойчивости энтеробактерий к антимикробным препаратам и появление опасных для

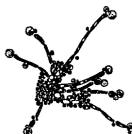
распространения генов резистентности штаммов подтверждает необходимость проведения постоянного мониторинга антибиотикорезистентности микроорганизмов с анализом механизмов их устойчивости.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Сидоренко С.В. Микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae*: клиническое значение и этиотропная терапия// *Consilium Medicum*. – 2004. – Т. 6, №1. – С. 23-26.
2. Козлов Р.С., Толуб А.В. Выбор антимикробных препаратов при неосложненных инфекциях мочевых путей: как принять соломоново решение?// *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. – 2014. – Т. 16, №1. – С. 18-25.
3. Рябкова Е.Л., Иванчик Н.В., Сухорукова М.В. и др. Резистентность нозокомиальных штаммов *Escherichia coli* в стационарах России// *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. – 2009. – Т. 11, №2. – С. 161-169.
4. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Скленова Е.Ю. и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Enterobacteriaceae* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011-2012 гг.// *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. – 2014. – Т. 16, №4. – С. 254-265.
5. Решедько Г.К., Рябкова Е.Л., Кречикова О.И. и др. Резистентность к антибиотикам грамотрицательных возбудителей нозокомиальных инфекций в ОРИТ многопрофильных стационаров России// *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. – 2008. – Т. 10, №2. – С. 96-112.
6. Решедько Г.К., Щебников А.Г., Морозов М.В. и др. *Escherichia coli* как возбудитель нозокомиальных инфекций в ОРИТ// *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. – 2012. – Т. 13, №4. – С. 314-321.
7. Руднев В.А., Бельский Д.В., Дехнич А.В. Инфекции в ОРИТ в России: результаты национального многоцентрового исследования// *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. – 2011. – Т. 13, №4. – С. 294-303.
8. Яковлев С.Я. Госпитальные инфекции, вызванные резистентными грамотрицательными микроорганизмами: клиническое значение и современные возможности терапии// *Инфекция и антибактериальная терапия*. – 2004. – Т. 6, №4. – С. 48-56.
9. *Стратегия и тактика применения антимикробных средств в лечебных учреждениях России. Российские национальные рекомендации*. – М., 2012. – 92 с.
10. Пестова Н.Е., Баранцевич Е.П., Рыбкова Н.С. и др. Изучение эффективности применения метода секвенирования ДНК по фрагменту гена 16s рРНК для идентификации микроорганизмов// *Профилактическая и клиническая медицина*. – 2011, №4. – С. 57-59.
11. EUCAST-(2013) - [Электронный ресурс] - Режим доступа: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
12. Barantsevich E.P., Churkina I.V., Barantsevich N.E., et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* producing NDM-1 carbapenemase in Saint Petersburg, Russia// *J. Antimicrob. Chemother.* – 2013. – Vol. 68, №5. – P. 1204-6. doi: 10.1093/jac/dks503. Epub 2013 Jan 12.
13. Козлова Н.С., Баранцевич Е.П., Баранцевич Н.Е., Гоик В.Г. Антибиотикорезистентность энтеробактерий в стационаре// *Научное обозрение*. – 2014, №8. – С. 992-998.
14. *Antimicrobial resistance surveillance in Europe Annual report of European Antimicrobial resistance surveillance network (EARS-net), 2011*. – Stockholm: ECDC, 2012. – 79 p.
15. *The bacterial challenge: time to react ECDC/EMEA joint technical report*. – Stockholm: ECDC, 2009. – 42 p.
16. Козлов Р.С. Селекция резистентных микроорганизмов при использовании антимикробных препаратов: концепция «параллельного ущерба»// *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. – 2010. – №12. – С. 284-94.
17. *Risk assessment on the spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) through patient transfer between healthcare facilities? With special emphasis on cross-border transfer*. – Stockholm: ECDC, 2011. – 63 p.
18. *Научный отчет о результатах многоцентрового исследования этиологии и антибиотикорезистентности энтеробактерий – возбудителей осложнённых интраабдоминальных инфекций в России. НИИ антимикробной химиотерапии*. – Смоленск, 2010.
19. Егорова С.А., Кафтырева Л.А., Липская Л.В. и др. Штаммы энтеробактерий, продуцирующие бета-лактамазы расширенного спектра и металлобета-лактамазу NDM-1, выделенные в стационарах в странах Балтийского региона // *Инфекция и иммунитет*. – 2013. – Т.3, №1. – С. 29-36.

Поступила в редакцию журнала 29.07.2015

Рецензент: Л.А. Кафтырева



РАЗРАБОТКА ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ПОДДЕРЖКИ ПРИНЯТИЯ ВРАЧЕБНЫХ РЕШЕНИЙ В ДЕРМАТОВЕНЕРОЛОГИИ

¹Купеева И.А. (заместитель директора),
²Разнатовский К.И. (зав. кафедрой), ²Раводин Р.А.
(доцент кафедры)*

¹ Департамент медицинского образования и кадровой политики в здравоохранении, Москва; ² Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (кафедра дерматовенерологии), Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2015

Статья посвящена проблеме повышения качества оказания медицинской помощи населению. Как один из способов повышения качества и доступности дерматовенерологической помощи предложена интеллектуальная система поддержки принятия врачебных решений, особое внимание уделено особенностям разработки данной системы.

Ключевые слова: дерматовенерология, интеллектуальные системы, медицина, системы дистанционного обучения, системы поддержки принятия врачебных решений

THE DEVELOPMENT OF INTELLECTUAL SUPPORT SYSTEM CLINICAL DECISIONS IN DERMATOLOGY

**Kupeeva I.A. (deputy director), Raznatovsky K.I.
(head of the chair), Ravodin R.A. (associate professor
of the chair)**

¹ Department of Health Education and Personnel Policy in Health Care, Moscow; ² North-West State Medical University named after I.I. Mechnikov (Chair of dermatovenereology), St. Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2015

The article is devoted to the problem of improvement of quality of rendering of medical aid to the population. As one way of improving the quality and availability of dermatological care is proposed intellectual system to support clinical decision, special attention is paid to the design of this system.

Key words: dermatovenereology, distance learning, intelligent systems, medicine, support systems clinical decision

ВВЕДЕНИЕ

Основной целью государственной политики в области здравоохранения, определенной Правительством Российской Федерации на период до 2020 года, является формирование системы, обеспечивающей доступность медицинской помощи и повышение эффективности медицинских услуг, объемы, виды и качество которых должны соответствовать уровню заболеваемости и потребностям населения, передовым достижениям медицинской науки [1]. В проекте концепции долгосрочного развития системы здравоохранения в Российской Федерации на период до 2020 г. в качестве одного из приоритетных направлений предусмотрена информатизация процесса предоставления медицинских услуг [2]. Качество оказываемой медицинской помощи населению, в значительной степени, зависит от уровня подготовки (компетентности) врачебного персонала [3]. По данным комиссии Европейского Союза (ЕС), в каждом десятом случае обращения за медицинской помощью ставят ошибочный диагноз или назначают неправильное лечение. Согласно данным той же комиссии ЕС, в Германии каждый год от врачебных ошибок умирают около 25 000 немцев. Ежегодно в стране отмечают до 100 тыс. случаев ошибок диагностики, неправильного назначения лекарств и других дефектов оказания медицинской помощи. Число больных, пострадавших от врачебных ошибок, в Канаде составляет 30%, в Австралии – 27%, в Новой Зеландии – 25%, в Германии – 23%, в Великобритании – 22% [4]. В настоящее время в больницах США ежедневно регистрируют около 40 000 случаев причинения вреда здоровью пациентов вследствие врачебных ошибок, что составляет около 15 млн. таких случаев в год [5]. В России такую официальную статистику не проводят из-за отсутствия законодательного закрепления таких понятий, как «врачебная ошибка», «дефект медицинской помощи», «халатность при оказании медицинской помощи» [6].

Дерматовенерология не является в этой связи исключением. При выборочном анализе диагностических ошибок, допущенных врачами-дерматовенерологами Ленинграда в 1984-1985 гг., выявили, что в 90% случаев причины их были субъективными (во всех 90% незнание, сочетавшееся в 70% с поверхностным осмотром), и лишь в 10% случаев могла идти речь о такой сравнительно объективной причине, как нехватке времени для принятия решений. Авторы отмечают недостаточное знакомство некоторых врачей с клиникой даже распространенных дерматозов, не говоря уже об отдельных редких заболеваниях [Шапошников О.К. и др. Ошибки в дерматологии – Л., 1987]. Количество гражданских исков и жалоб пациентов на качество оказания дерматовенерологической помощи в шести регионах Центрального Федерального округа Российской Федерации за 5 лет (с 1998 по 2002 гг.) возросло более чем в 14 раз [7]. По данным 120 комиссионных и комплексных судебно-медицинских экспертиз, проведенных в Центральном Федеральном округе РФ (включая Москву) в 1999-2004 гг. по определению судов в связи с гражданскими исками пациентов на профессиональные последствия при оказании дерматовенерологической помощи, 30% исков были обусловлены ошибками диагностики [8].

Другие актуальные проблемы современной ме-

* Контактное лицо: Раводин Роман Анатольевич
e-mail: rracad@mail.ru

дицины – лавинообразный рост знаний, появление новых лекарственных препаратов, а также возникновение совершенно новых медицинских специальностей (иммунологии, аллергологии и ряда других), что приводит к информационному коллапсу, справиться с которым рядовому практикующему врачу с помощью стандартных справочных средств становится всё сложнее. Одновременно с ростом информационной нагрузки в современном мире стремительно уменьшается время на принятие решения, в том числе – и врачебного [9].

В этих условиях одним из перспективных направлений повышения качества медицинской помощи больным дерматовенерологического профиля, отвечающим современным требованиям, является создание лечебно-диагностических и обучающих интеллектуальных систем поддержки принятия решений (ИСППР), а также развитие на их базе телемедицинских технологий. ИСППР имитируют на компьютере мышление человека, предлагая выводы и логичные рассуждения, осуществляемые с помощью специального программного средства, именуемого системой и основанного на знаниях экспертов в конкретной предметной области [10-12]. При широком внедрении таких систем можно существенно повысить качество подготовки врачей-дерматовенерологов что, в целом, благоприятно отразится на эффективности лечебных учреждений. В этом случае медицинские работники смогут не только получать необходимую консультативную помощь в трудных клинических случаях, но и дистанционно повышать свою квалификацию. Этими же обстоятельствами продиктована необходимость разработки интеллектуальных систем и для обучения студентов (врачей-дерматовенерологов), особенно – дистанционного, поскольку они дают возможность визуализировать учебный материал в информационном (виртуальном) окружении дисциплины, что обеспечивает наилучшее усвоение информации [13-15].

Цель работы – разработать интеллектуальную информационно-диагностическую и обучающую систему по дерматовенерологии, способную решить комплексную задачу по повышению качества и доступности дерматовенерологической помощи населению и подготовке врачей-дерматовенерологов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Разрабатываемая дистанционная обучающая система предназначена для повышения уровня подготовки практикующих врачей и призвана помочь им в диагностике и лечении дерматовенерологических заболеваний. Работа выполнена в комплексном порядке и состояла из нескольких последовательных этапов, которые соответствовали решаемым задачам. В её основу положена онтологическая классификация, позволяющая описать как дерматологического больного, так и дерматовенерологическое заболевание.

На первом этапе на основе анализа отечественной и зарубежной литературы была разработана онтологическая классификация симптомов и признаков дерматовенерологического больного. В ходе работы использовали фундаментальные труды по дерматовенерологии [16, 17]. При построении онтологии проанализировали симптоматику свыше 250 наиболее распространённых дерматовенерологических заболе-

ваний с учётом специфичности каждого симптома. В ходе описания каждого заболевания все его симптомы мы подразделяли на три категории: «высокоспецифичные», «среднеспецифичные» и «низкоспецифичные». Под «высокоспецифичными» подразумевали наиболее характерные для данного заболевания симптомы (являющиеся патогномоничными) и/или встречающиеся практически всегда при этом заболевании; под «среднеспецифичными» – симптомы, которые могут встречаться при данном заболевании, но, в ряде случаев, могут отсутствовать; под «низкоспецифичными» – нехарактерные для данной патологии симптомы [18]. Была собрана собственная картотека фотографий дерматовенерологических симптомов и заболеваний, а также банк фотографий микропрепаратов (гистологических и микроскопических).

На втором этапе было сформулировано техническое задание к разработке программы для ЭВМ, получившей название интеллектуальная система «Logoderm». Программу создавали на основе лицензионной версии CMS 1С-Битрикс: Управление сайтом. Нами была произведена формула для расчёта вероятности каждого заболевания в зависимости от имеющейся симптоматики у конкретного пациента, разработан графический дизайн модулей и определён их состав. На данном этапе осуществляли наполнение системы информацией и тестировали её работоспособность [19, 20].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе создания ИСППР «Logoderm» мы разработали ряд модулей: диагностику, атлас, рекомендации (последний модуль включает в себя рекомендации по обследованию и лечению, соответствующие национальным стандартам) и школу врача. Модуль «атлас» представляет собой формализованное описание заболевания с возможностью просмотра фотографий без информации об обследовании и лечении.

Модуль «диагностика» включает разделы, описывающие пациента. Наименования разделов соответствуют 20 классам онтологии, разработанной нами ранее, при этом часть из этих разделов носит обязательный характер для заполнения пользователем, а часть – необязательный (однако их включение способствует увеличению точности диагностики). Обязательными для заполнения являются все разделы, описывающие сыпь (тип сыпи на коже, тип сыпи на слизистых оболочках, изменения волос и ногтей, особенности расположения сыпи, взаимное расположение элементов сыпи, локализация сыпи, локализация начальных высыпаний, пол, возраст начала заболевания, жалобы, начало заболевания, длительность, течение заболевания).

Раздел модуля диагностика «тип сыпи на коже» включает следующие подразделы: пятно, папула, волдырь, бугорок, узел, пузырь, пузырек, гнойничок, чешуйка, корка, струп, эксфолиация, эрозия, трещина, язва, рубец, вегетация, лихенификация, кератоз, дерматосклероз, атрофодермия, атрофия, пойкилодермия, анетодермия. Структура раздела модуля диагностика «тип сыпи на слизистых оболочках» аналогична разделу «тип сыпи на коже».

В модуле «диагностика» (разделы «изменения волос» и «изменения ногтей») описаны возможные поражения волос и ногтей.

Пользователю (практикующему врачу) предоставляется возможность выбрать соответствующие симптомы, имеющиеся у пациента, сопоставляя их со стандартизированными изображениями симптомов и их описанием в системе. После заполнения обязательных полей модуля «диагностика» система «Logoderm» выдаёт перечень из 10 диагнозов с указанием их вероятностей. В процессе работы мы ограничились максимальной вероятностью заболевания 80%. Это было сделано намеренно, чтобы исключить излишнюю самоуверенность практикующих врачей. Врач, выбрав курсором соответствующий диагноз из представленного по результатам диагностики списка, может получить развёрнутое описание заболевания, просмотреть фотографии симптомов (при этом происходит пере-

ключение модуля «диагностика» на модуль «атлас»). Выбрав модуль «рекомендации», врач в дальнейшем может просмотреть стандарты диагностики и лечения диагностированного заболевания. Модуль «рекомендации», помимо описательной части, содержит также фотографии гистологических и других микропрепаратов, использующихся в микроскопической диагностике кожных и венерических болезней. По результатам диагностики формируется формализованное описание дерматологического больного, которое, в случае необходимости (при сомнениях в правильности предлагаемого системой диагноза), можно сопроводить фотографиями и отправить электронным письмом выбранному врачом эксперту-дерматовенерологу (Рис. 1).

ДИАГНОСТИКА

II - этап

↓

I - этап

→

	Тип сыпи на коже	Тип сыпи на слизистых оболочках	Изменение волос	Изменение ногтей	ДИАГНОЗ																						
Особенности расположения сыпи*	Результаты диагностики																										
Взаимное расположение элементов сыпи*	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 80%;">Наименование заболевания</th> <th style="width: 20%;">Вероятность</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Крапивница (Подробнее о заболевании)</td> <td style="text-align: center;">60.04%</td> </tr> <tr> <td>Строфулюс взрослых (Подробнее о заболевании)</td> <td style="text-align: center;">24.31%</td> </tr> <tr> <td>Крапивница детская папулезная (Подробнее о заболевании)</td> <td style="text-align: center;">22.9%</td> </tr> <tr> <td>Ветряная оспа (Подробнее о заболевании)</td> <td style="text-align: center;">18.38%</td> </tr> <tr> <td>Лишай опоясывающий (Подробнее о заболевании)</td> <td style="text-align: center;">17.11%</td> </tr> <tr> <td>Узловатое пруриго (Подробнее о заболевании)</td> <td style="text-align: center;">17.03%</td> </tr> <tr> <td>Простой герпес (Подробнее о заболевании)</td> <td style="text-align: center;">14.36%</td> </tr> <tr> <td>Экзема герпетическая Капоши (Подробнее о заболевании)</td> <td style="text-align: center;">12.34%</td> </tr> <tr> <td>Нейродермит (Подробнее о заболевании)</td> <td style="text-align: center;">8.93%</td> </tr> <tr> <td>Дерматит атопический (Подробнее о заболевании)</td> <td style="text-align: center;">8.9%</td> </tr> </tbody> </table>					Наименование заболевания	Вероятность	Крапивница (Подробнее о заболевании)	60.04%	Строфулюс взрослых (Подробнее о заболевании)	24.31%	Крапивница детская папулезная (Подробнее о заболевании)	22.9%	Ветряная оспа (Подробнее о заболевании)	18.38%	Лишай опоясывающий (Подробнее о заболевании)	17.11%	Узловатое пруриго (Подробнее о заболевании)	17.03%	Простой герпес (Подробнее о заболевании)	14.36%	Экзема герпетическая Капоши (Подробнее о заболевании)	12.34%	Нейродермит (Подробнее о заболевании)	8.93%	Дерматит атопический (Подробнее о заболевании)	8.9%
Наименование заболевания						Вероятность																					
Крапивница (Подробнее о заболевании)						60.04%																					
Строфулюс взрослых (Подробнее о заболевании)						24.31%																					
Крапивница детская папулезная (Подробнее о заболевании)						22.9%																					
Ветряная оспа (Подробнее о заболевании)						18.38%																					
Лишай опоясывающий (Подробнее о заболевании)						17.11%																					
Узловатое пруриго (Подробнее о заболевании)						17.03%																					
Простой герпес (Подробнее о заболевании)						14.36%																					
Экзема герпетическая Капоши (Подробнее о заболевании)						12.34%																					
Нейродермит (Подробнее о заболевании)	8.93%																										
Дерматит атопический (Подробнее о заболевании)	8.9%																										
Пол*																											
Локализация сыпи*																											
Локализация начальных высыпаний*																											
Возраст начала заболевания*																											
<input type="button" value="Проконсультироваться с"/> <input type="button" value="Сохранить результаты"/>																											

Рис. 1. Результаты диагностики

В ходе создания модуля «школа врача» мы разработали три уровня подготовки слушателей. Первый уровень посвящён основам клинического обследования дерматовенерологического больного и включает цикл занятий, содержащих подробную информацию об особенностях проведения осмотра, характеристиках

проявлений высыпаний на коже и слизистых оболочках. Каждое занятие содержит подробное клиническое описание того или иного элемента сыпи, его фотографии, а также сводную таблицу морфологических элементов, помогающую наглядно и быстро усвоить характеристики высыпного элемента (Рис. 2, 3).

Лекция
Таблица элементов сыпи
Промежуточный тест

ЗАНЯТИЕ 5. МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ КОЖНОЙ СЫПИ (продолжение).

Пузырь (булла) – первичный морфологический элемент кожной сыпи, представляющий собой полостное однокамерное образование размерами более 0,5 см в диаметре. В пузыре выделяют полость, содержимое, дно и покрывку. Покрывка пузыря может быть дряблой или напряжённой, что в значительной степени зависит от её толщины. Содержимое пузырей может быть серозным или серозно-геморрагическим, что отражает глубину их расположения в коже.

В зависимости от уровня возникновения пузырей в коже, выделяют: интраэпидермальные пузыри и субэпидермальные пузыри, образующиеся по механизму акантолиза и эпидермолиза соответственно. Акантолиз и эпидермолиз могут быть связаны с аутоиммунными механизмами, с действием бактериальных токсинов, а также являться следствием внешних воздействий (температурных, химических, механических, УФО). Интраэпидермальные пузыри локализуются в пределах эпидермиса (выше базальной мембраны), а субэпидермальные пузыри – под эпидермисом в зоне базальной мембраны или глубже (на уровне сосочков дермы). Интраэпидермальные пузыри разрываются бесследно, а субэпидермальные пузыри могут оставлять после себя рубцы. Интраэпидермальные пузыри в свою очередь могут быть субкорнеальными (локализоваться под роговым слоем эпидермиса) и супрабазальными (располагаться над базальным слоем клеток эпидермиса), последние наиболее характерны для вульгарной пузырчатки.

Для постановки диагноза ряда буллезных дерматозов (кожных заболеваний, сопровождающихся образованием пузырей) значимую роль играет периферический симптом Никольского, предложенный русским дерматологом П.В. Никольским в 1936 году. Периферический симптом Никольского характеризуется отслойкой эпидермиса с образованием эрозии при трении здоровой кожи вблизи пузырей. Этот симптом наиболее характерен для листовидной и вульгарной пузырчатки, а также для синдрома Лайелла. Другие симптомы, характеризующие буллезные дерматозы, включают: краевой симптом Никольского, симптом Асбо-Хансена и симптом груши. Краевой симптом Никольского проявляется отслойкой эпидермиса на значительное расстояние при потягивании его обрывков по краю эрозии. Симптом груши – это провисание содержимого пузыря при вертикальном положении тела, по форме напоминающее грушу. Симптом Асбо-Хансена характеризуется увеличением площади пузыря при надавливании на его покрывку.



Рис. 2. Первый уровень: лекция

ЭЛЕМЕНТЫ КОЖНОЙ СЫПИ

Пыно		
Папула		
Ангиодермия	Атрофия	Атрофидермия
Бугорок	Дегенерация	Полдырь
Гнойничок (пустула)	Дерматосклероз	Коротко
Корка	Ликенификация	Пойкилодермия
Пузырек (везикула)	Пузырь (булла)	Рубец

Рис. 3. Первый уровень: таблица элементов сыпи

При описании элементов сыпи мы опирались на разработанную онтологическую классификацию, основанную на анализе данных из научной литературы. Таким же образом была разработана классификация изменений волос и ногтей. По окончании каждого занятия слушателям предлагается пройти промежуточный

тест, включающий не более 10 вопросов для самопроверки. Последнее занятие посвящено принципам постановки диагноза в дерматовенерологии и на конкретных примерах показывает, как правильно выстраивать диагностическую логику. Заканчивается первый уровень итоговым (экзаменационным) тестом, включающим 100 вопросов по материалам всех занятий данного уровня. В случае его успешного прохождения слушатель переходит на следующий (второй) уровень (Рис. 4).

Второй уровень содержит описание (включая расклад заболевания на составляющие его симптомы) наиболее распространённых дерматовенерологических заболеваний, рекомендации по их обследованию и лечению.

Расклад заболевания на симптомы представлен в разделе «таблица симптомов» и производится в соответствии с их специфичностью. Каждый симптом, который может быть визуализирован, снабжён фотографией (Рис. 5).

Общее описание заболевания содержит клинические фотографии, а рекомендации по обследованию снабжены фотографиями гистологических и микроскопических препаратов. Рекомендации по лечению основаны на национальных стандартах и клиническом опыте Санкт-Петербургской дерматовенерологической школы (Рис. 6).

ОСНОВЫ ДИАГНОСТИКИ: ИТОГОВОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ

2 00:24:45

Симптомы псориазической триады включают:

- симптом облатки, симптом коллоидной плёнки и симптом кровяной росы
- симптом скрытого шелушения, симптом терминальной плёнки и симптом кровяной росы
- симптом стеаринового пятна, симптом терминальной плёнки и симптом кровяной росы

ДАЛЕЕ ЗАКОНЧИТЬ ТЕСТ

Рис. 4. Первый уровень: итоговый тест

Элементы кожной сыпи

Придатки кожи: ногти

Придатки кожи: волосы

Особенности расположения сыпи

Взаимное расположение элементов сыпи

Пол

Высокоспецифичные Среднеспецифичные Низкоспецифичные

Элементы кожной сыпи

Чешуйка

Трещина

Рис. 5. Второй уровень: таблица симптомов

ИНТЕРТРИГИНОЗНАЯ ФОРМА МИКОЗА СТОП: описание заболевания

Интертригинозная форма микоза стоп – это грибковое поражение стоп, характеризующееся воспалением кожи в межпальцевых складках с мацерацией рогового слоя эпидермиса и образованием эрозий.

Синонимы: tinea pedis, эпидермофития стоп (интертригинозная форма).

Эпидемиология

Возраст: любой, но чаще в 20-50 лет

Пол: мужчины болеют чаще.

Анамнез

на фоне длительно существующего мелкопластинчатого шелушения в межпальцевых складках (чаще в 3-й и 4-й) одной из стоп развивается покраснение кожи и мацерация рогового слоя эпидермиса с последующим его отторжением и образованием болезненных эрозий, нередко в глубине эрозий могут появиться болезненные трещины. Процесс постепенно распространяется на подошвенную поверхность пальцев и стопы, позже поражается и вторая нога.

Рис. 6. Общее описание заболевания

По окончании занятия (изучения заболевания) рекомендуется пройти промежуточный тест для самопроверки. Переход на следующий уровень возможен только после успешного прохождения итогового (экзаменационного) теста, включающего 100 вопросов по материалам всех занятий.

Третий уровень представлен клиническими задачами, содержащими описание клинической ситуации и фотографиями высыпаний. Обучаемому предлагается выбрать из перечня диагнозов правильный. В случае правильного ответа появляется обоснование диагноза и полное описание заболевания. Итоговый тест также представлен клиническими задачами.

В ходе проведенного исследования системы «Logoderm» в тестовом режиме получены предварительные результаты, служащие показателем эффективности разработанного курса дистанционного обучения, представленного модулем «школа врача».

ВЫВОДЫ

Для построения интеллектуальной системы поддержки принятия решений «Logoderm» в области дерматовенерологии нами была разработана электронная история болезни дерматовенерологического больного, которая может быть использована в качестве типовой.

Разработанный диагностический модуль ИСППВР помогает повысить диагностическую эффективность практикующего врача и сократить время на принятие решения о назначении соответствующего обследования и лечения пациента.

Телемедицинский модуль дает возможность решать задачи удаленного консультирования экспертом практикующего врача в диагностически сложных случаях, повышая качество оказания и доступность специализированной дерматологической помощи населению.

Создана новая технология обучения врачей-дерматовенерологов, способная оптимизировать учебный процесс: повысить его эффективность и сделать его дистанционным, не отрывая врачей от своих рабочих мест.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Распоряжение Правительства РФ №1662-р от 17.11.08.
2. Кубанова А.А. и др. Современные информационные технологии в деятельности специализированных дерматовенерологических// Вестн. дерматологии и венерологии. – 2009. – №6. – С. 4-15.
3. Совецание о реализации региональных программ модернизации здравоохранения// <http://kremlin.ru/news/16739>. – 31.10.2012.
4. Галанова Г.И. Врачебная ошибка – проблема не только врача// Менеджер здравоохранения. – 2014. – № 8. – С. 49-52.
5. The Facts / Patient Safety Education Program // <http://www.safecarecampaign.org/statistics.html>.
6. Понкина А.А. Врачебная ошибка в контексте защиты прав пациентов / Кафедра правового обеспечения государственной и муниципальной службы МИГСУ и РАНХиГС. – М.: Консорциум специалистов по защите прав пациентов, 2012. – 200 с.
7. Пашина А.Г. Анализ профессиональных ошибок и дефектов оказания дерматовенерологической помощи// Вестн. дерматол. и венерол. – 2004. – №4. – С. 24-26.
8. Пашина А.Г., Елистратова И.В., Арутюнян Г.Б. Экспертиза врачебных ошибок в дерматовенерологии// Вестн. дерматол. и венерол. – 2007. – № 4. – С. 23-25.
9. Проходит общественное обсуждение проект приказа, утверждающего типовые отраслевые нормы времени посещения пациентом врача / <http://www.rosminzdrav.ru/news/2015/01/26/2206>. – 26.01.2015.
10. Гаврилова Т.А., Муромцев Д.И. Интеллектуальные технологии в менеджменте: инструменты и системы: Учеб. пособие. – СПб.: Изд-во «Высшая школа менеджмента»; Изд. дом СПбГУ, 2007. – 488 с.
11. Киликоский В.В., Олимпиаева С.П. Технология создания компьютерных консультативных экспертных систем для интеллектуальной поддержки принятия медицинских решений// Врач и информационные технологии. – 2004. – №9. – С. 22-27.
12. Кобринский Б.А. Консультативные интеллектуальные медицинские системы: классификации, принципы построения, эффективность// Врач и информационные технологии. – 2008. – №2. – С. 38-47.
13. Голенков В.В., Емельянов В.В., Тарасов В.Б. Виртуальные кафедры и интеллектуальные обучающие системы// Новости искусственного интеллекта. – 2010. – №4. – С. 3-13.
14. Попов В.Е. Организационные технологии и системный анализ управления самостоятельной подготовкой студентов (на примере кадровой оптимизации в дерматовенерологии): Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – М., 2006. – 38 с.
15. Попова Н.Э. Информационно-коммуникационная модель дистанционного обучения сотрудников государственной противопожарной службы: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – СПб., 2012. – 25 с.
16. Burns T, et al. Rook's textbook of dermatology. 8 ed. – Oxford: Willey-Blackwell, 2010. – 5024 p.
17. Wolf K., et al. Fitzpatrick's dermatology in general medicine. 7 ed. – New York: McGraw-Hill, 2007. – 2402 p.
18. Раводин Р.А. Создание онтологии при проектировании систем интеллектуальной поддержки врачебных решений в дерматовенерологии// Проблемы мед. микологии. – 2013. – Т.15, №1. – С. 3-7.
19. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2014615574 от 28 мая 2014 г. Программа для ЭВМ «Интеллектуальная медицинская система «LOGODERM» для диагностики, самодиагностики кожных и венерических заболеваний и обучения врачей-дерматовенерологов».
20. Раводин Р.А. Интеллектуальная система поддержки принятия врачебных решений в дерматовенерологии// Проблемы мед. микологии. – 2014. – Т. 16, № 3. – С. 59-65.

Поступила в редакцию журнала 14.03.2015

Рецензент: В.Г. Корнишева

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА

Мавлянова Ш.З. (зав. отделом)*, Муминова С.Р. (докторант), Гулямова Г.Ш. (с.н.с.), Есионова Е.В. (н.с.), Тешабаева Д.А. (н.с.)

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

© Коллектив авторов, 2015

*В статье приведены клинико-микробиологические и иммунологические аспекты атопического дерматита (АД). У больных АД выявили повышенную микст-контаминацию инфекционными агентами в биосубстратах организма с преобладанием *Candida spp.* на слизистых оболочках (полости рта, кишечника) и *Staphylococcus aureus* – на коже на фоне гиперпродукции ФНО- α и общего IgE.*

Ключевые слова: атопический дерматит, иммунология, *Candida spp.*, микробиология кожи и слизистых оболочек, *Staphylococcus aureus*

CLINICO-IMMUNOLOGICAL AND MICROBIOLOGICAL ASPECTS OF ATOPIC DERMATITIS

Mavlyanova Sh.Z. (head of the department), Muminova S.R. (doctoral candidate), Gulyamova G.Sh (senior scientific collaborator), Esionova E.V. (scientific collaborator), Teshabaeva D.A. (scientific collaborator)

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

© Collective of authors, 2015

*Clinico-microbiological and immunologic aspects of atopic dermatitis (AD) have been described in the article. In patients with AD revealed the increased mixed-contamination with infectious agents in body biosubstrates with a predominance of *Candida spp.* on the mucous membrane (mouth, intestine) and *Staphylococcus aureus* – on the skin on the background of hyperproductive TNF- α and total IgE.*

Key words: atopic dermatitis, *Candida spp.*, immunology, microbiological status of skin and mucosae, *Staphylococcus aureus*

Атопический дерматит (АД) – хроническое рецидивирующее воспалительное заболевание кожи с характерным фенотипом и типично расположенными очагами поражения, проявляющимися интенсивным зудом, имеющим сложную патогенетическую особенность развития [1-7].

В последние десятилетия существенными факторами риска развития АД служат различные инфекционные агенты, которые являются мощными, длительно действующими индукторами усиления иммунопатологических реакций, источниками парадоксального иммунного ответа и формирования аутоиммунного процесса [5, 7-12].

Цель работы – изучить клинико-микробиологические особенности течения атопического дерматита с учетом оценки роли провоспалительного цитокина ФНО- α .

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 135 больных с АД (59 лиц мужского пола и 76 – женского) в возрасте от 10 до 65 лет. Контрольную группу составили 36 здоровых лиц соответствующего возраста. Всем пациентам проводили клинические, микробиологические, микологические, иммунологические, генетические и статистические методы исследования. Для установления диагноза использовали критерии J. Hanifin и G. Rajka (1980), степень тяжести заболевания устанавливали по индексу SCORAD (Severity Scoring of Atopic Dermatitis) [Stalder J.F., Taied A., 1993]. Микологический анализ осуществляли микроскопическими и культуральными исследованиями биосубстратов на грибы рода *Candida* (отделяемое полости рта, faecis) на среде Сабуро. В иммунологические исследования, проведенные у 42 больных АД и у 15 здоровых лиц (контрольная группа), входило определение общего IgE и провоспалительного цитокина – ФНО- α методом ИФА.

Результаты обрабатывали статистически с помощью стандартных методов вариационной статистики с применением t-критерия Стьюдента по прикладной программе «Excel-Office-2010» на компьютере Pentium IV.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эритематозно-сквамозную форму АД установили у 19 больных, эритематозно-сквамозную форму с лихенификацией – у 21, экссудативную – у 27, лихеноидную – у 33, пруригинозную – у 35.

По возрастной категории: 19,3% (26 больных) составили дети до 14 лет; 22,9% (31) – 15-20 лет; 25,9% (35) – 21-30 лет; 8,1% (11) – 31-40 лет; 9,6% (13) – 41-50 лет; 14,1% (19) – свыше 50 лет. При изучении давности заболевания выявили, что 17,03% (23) пациентов имели заболевание сроком до 1 года, 22,2% (30) – от 1 до 5 лет и 60,7% (82) – более 5 лет. Отметим, что сопутствующие заболевания, в определенной степени, оказывают влияние на течение основного процесса. Так, у 45 (33,3%) человек наблюдали заболевания желудочно-кишечного тракта, у 37,04% (50) – анемию, у 16,3% (22) – протозойно-паразитарную инфекцию, у 20,7% (28) – патологию нервной системы, у 7,4% (10) – заболевания со стороны сердечно-сосудистой системы, у 11,8% (16) – эндокринной системы, у 21,5% (29) – дыхательной системы (бронхиальную астму, сезонный катар), у 11,1% (15) – мочеполовой системы, у 2,9% (4) – грибковое заболевание (микоз стоп).

* Контактное лицо: Мавлянова Шахноза Закировна, e-mail: shahnoza.mavlyanova@yandex.ru

Среди 135 больных АД отягощенную наследственность отмечали у 57 человек (42,2%), сезонность заболевания – у 58 (42,9%), у 77 (57,03%) АД проявлялся круглогодично с частыми рецидивами.

Степень тяжести заболевания у 135 больных АД определяли с помощью индекса SCORAD: среднюю степень выявили у 49,6% (67 человек) – 63,1±3,3 баллов, легкую – у 21,5% (29) – 42,6±4,5 баллов, тяжелую – у 28,8% (39) – 87,2±3,5 баллов.

Давность заболевания у 23 больных составила до 1 года, у 30 – 1-5 лет, у 82 – более 5 лет. При изучении степени тяжести АД в зависимости от давности заболевания установили, что индекс SCORAD у пациентов с давностью заболевания до 1 года составил, в среднем, 54,2±4,7 баллов, 1-5 лет – 71,5±4,1 и более 5 лет – 66,4±2,5 баллов, что соответствовало средней степени тяжести заболевания. Полученные данные служат показателем того, что давность заболевания не определяет степень тяжести заболевания.

При клинико-микробиологических (в том числе – микологических) исследованиях биосубстратов (с кожных покровов, слизистой оболочки полости рта, faecis) организма больных АД отмечали высокую выявляемость патогенных форм микроорганизмов семейства *Mycrococcaceae* – *Staphylococcus* spp. и грибов рода *Candida*. Так, среди 135 больных АД в биосубстратах микроорганизмы семейства *Mycrococcaceae* были обнаружены на коже у 96 пациентов (71,1%), тогда как *Candida* spp. – у 93 (68,8%). Рост *Candida* spp. в кишечнике составил 58,1% (54 больных), на слизистой полости рта – 39,8% (37).

В зависимости от клинической формы, стафилококки наиболее часто высевали с кожи больных с лихеноидной (28,1%) и пруритинозной (23,9%) формами (табл.1).

Таблица 1

Характеристика микроорганизмов, изолированных из биосубстратов (кожа, слизистая оболочка полости рта, faecis) в зависимости от клинической формы АД

	Эритематозно-сквамозная		Эритематозно-сквамозная с лихенификацией		Экссудативная		Лихеноидная		Пруритинозная	
	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%
<i>Staphylococcus</i> spp. n=96	13	13,5	14	14,6	19	19,8	27	28,1	22	23,9
<i>Candida</i> spp. n=93	12	12,9	17	18,3	14	15,1	23	24,8	27	29,1

При этом в группе пациентов с эритематозно-сквамозной формой – у 13 (13,5%), эритематозно-сквамозной формой с лихенификацией – у 14 (14,6%), экссудативной – у 19 (19,8%) на коже в очагах поражения также культивировали *Staphylococcus* spp.

Candida spp. наиболее часто наблюдали у больных АД с пруритинозной и лихеноидной формами – у 29,1% и 24,8% соответственно, с эритематозно-сквамозной формой с лихенификацией – у 18,2%, экссудативной – у 15,1%, эритематозно-сквамозной – у 12,9%.

У больных АД *Candida* spp. на слизистой оболочке полости рта обнаруживали: при эритематозно-сквамозной форме с лихенификацией – у 70,6%, эритематозно-сквамозной – у 58,3%, экссудативной – у 57,1%, а при лихеноидной и пруритинозной – 26,1 и 18,5% соответственно.

Однако высеваемость *Candida* spp. со слизистой оболочки кишечника была наиболее высокой при лихеноидной и пруритинозной формах, что составило 73,9 и 81,5 %, а при эритематозно-сквамозной форме – 41,7%, эритематозно-сквамозной с лихенификацией – 29,4%, экссудативной – 42,9%.

В результате исследования обсемененности патогенными микроорганизмами биосубстратов от больных АД выявили повышенную колонизацию *S. aureus* на коже – 3129,4±127,8 КОЕ/см², что достоверно отличалось от показателей из группы здоровых лиц (P<0,05). В зависимости от клинической формы АД, наиболее высокие показатели отмечали у больных с лихеноидной (3317,4±239,7 КОЕ/см²) и пруритинозной (3719,5±144,5 КОЕ/см²) формами (P<0,05).

Повышенную степень колонизации *Candida* spp. в биосубстратах (кишечник) у больных АД установили при лихеноидной (5400±54,8 КОЕ/мл) и пруритинозной (4800±51,6 КОЕ/мл) формах, при эритематозно-сквамозной с лихенификацией (4200±36,4 КОЕ/мл), при экссудативной (2700±32,6 КОЕ/мл), что достоверно отличалось от показателей в контрольной группе (n=14) – 602±39,1 КОЕ/мл.

С помощью кристаллографического метода видовой идентификации *Candida* spp. обнаружили у 33 пациентов (35,5%) *C. tropicalis*, у 29,03% (27) – *C. albicans*, у 11,8% (11) – *C. krusei*, у 13,9% (13) – *C. famata* и у 9,6% (9) – *C. pseudotropicalis*.

Staphylococcus spp. и *Candida* spp. наиболее часто высевали в группе больных с лихеноидной (28,1% и 24,8%) и пруритинозной формами АД (23,9% и 29,1%) соответственно; при эритематозно-сквамозной, эритематозно-сквамозной форме с лихенификацией и экссудативной форме эти показатели были значительно ниже.

Полученные данные являются показателем развития колонизации кожи и слизистых оболочек в группе больных с эритематозно-сквамозной формой с лихенификацией, эритематозно-сквамозной форме АД, обусловленного умеренным ростом *Candida* spp. в кишечнике (3450 ±34,5 кое/мл) и *Staphylococcus* spp. – на коже в очагах поражения (2452,8±221 КОЕ/см²); тогда как в группе больных с лихеноидной и пруритинозной формами отмечали высокий рост *Candida* spp. в кишечнике (5100±53,2 кое/мл) и *Staphylococcus* spp. на коже (3518,5±192,1 КОЕ/см²).

В результате исследований подтверждена значимость микробиологических факторов в клиническом течении заболевания. Высокая колонизация кожи больных АД патогенной формой стафилококков приводит к усилению кожного воспаления, усугублению клинического течения заболевания, а также развивает резистентность к проводимой базисной терапии. В основе такого явления важная роль принадлежит иммунной системе организма. Отметим, что большинство обследуемых больных АД – 116 человек (85,9%) на коже в очагах поражения не наблюдали вторичных гнойничковых высыпаний. Только у 17 пациентов (12,6%) выявили пиодермию на фоне основного кожного заболевания.

Большое значение в регуляции воспалительного процесса принадлежит про- и противовоспалительным цитокинам, в первую очередь – медиаторам, оказывающим влияние на функцию нейтрофилов и

макрофагов. При изучении уровня ФНО- α в сыворотке крови у больных АД обнаружили их повышенное содержание на фоне гиперпродукции общего IgE. (табл. 2).

Таблица 2

Показатели ФНО- α и IgE у больных АД с учетом клинической формы АД		
Клинические формы АД	TNF- α (пг/мл)	IgE ME
Экссудативная	33,4 \pm 2,1*	181,3 \pm 9,14*
Эритематозно-сквамозная	32,6 \pm 2,3*	153,2 \pm 5,6*
Эритематозно-сквамозная с лихенификацией	36,8 \pm 3,92*	196,3 \pm 20,4*
Лихеноидная	24,4 \pm 1,2*	150,5 \pm 5,9*
Пруригинозная	41,5 \pm 0,81*	225,1 \pm 11,1*
Здоровые n=15	2,5+ 0,1	71,1+1,8

Примечание: * – достоверность по отношению к показателям контрольной группы, (p < 0,05)

Как видно из таблицы 2, уровень ФНО- α в крови больных АД повышался в 12,7 раз по сравнению с контрольной группой (P<0,05). Такую же картина прослеживали при всех клинических формах АД (P<0,05). Отметим, что наиболее высокую концентрацию ФНО- α отмечали при эритематозно-сквамозной с лихенификацией и пруригинозной формах АД.

Высокая концентрация ФНО- α служит показателем выраженности воспалительного процесса у пациентов с АД на фоне высокой колонизации их на поверхности кожи и слизистых оболочек, что поддерживает рост и созревание эозинофилов, общего IgE.

Так как, ФНО- α является первичным медиатором воспаления и принимает активное участие в активации фагоцитов, нейтрофилов, а также в патогенезе бактериальных, вирусных и грибковых инфекций, по

уровню концентрации его в крови у больных АД можно судить о степени тяжести процесса, также он может быть одним из критериев оценки степени тяжести заболевания (табл. 3).

Таблица 3

Показатели ФНО- α и IgE у больных АД с учетом степени тяжести по индексу SCORAD		
Степень тяжести АД	TNF- α (пг/мл)	IgE (ME)
Легкая, n=9	32,7 \pm 1,1*	175,7 \pm 16,01*
Средняя, n=18	31,7 \pm 1,8*	176,2 \pm 7,7*
Тяжелая, n=15	32,6 \pm 1,7*	174,7 \pm 9,1*
Контрольная группа, n=21	2,5 \pm 0,1	71,1 \pm 1,1

Примечание: * – достоверность по отношению к показателям контрольной группы, (p < 0,05).

При изучении данных показателей в зависимости от клинического течения заболевания определили, что при легкой степени тяжести АД уровень ФНО- α достоверно повышался – в 13,1 раза. Такую же тенденцию наблюдали при средней и тяжелой степени тяжести заболевания. На наш взгляд, высокий уровень ФНО- α является показателем повышенной бактериальной нагрузки организма, что требует внимательного подхода в плане комплексного обследования и патогенетической терапии больных АД.

ВЫВОДЫ

Таким образом, у больных atopическим дерматитом выявили повышенную микст-контаминацию инфекционными агентами в биосубстратах организма с преобладанием *Candida* spp. и *S. aureus* на слизистых оболочках (полости рта, кишечника) на фоне гиперпродукции ФНО- α и общего IgE. Полученные данные представляют интерес для выработки тактики этиопатогенетической терапии у больных АД.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Арзумян В.Г., Зайцева Е.В., Кабаева Б.И., Темпер Р.М. Оценка стафилококковой и нелипофильной дрожжевой микрофлоры кожи у больных с кожной патологией при контактном способе посева // Вестн. дерматол. – 2004. – №6. – С. 3-6.
- Баранов А.А., Ревякина В.А., Короткий Н.Г. и др. Атопический дерматит и инфекции кожи у детей: диагностика, лечение и профилактика: Пособие для врачей. – М., 2004.
- Воронина В.Р., Смолкин Ю.С., Чебуркин А.А. Роль грибковой и бактериальной флоры кожи в патогенезе atopического дерматита: Обзор // Вестн. дерматологии и венерологии. – 2003. – №1. – С. 16-19.
- Корнищева В.Г., Зверязкина Е.Н. Контаминация кишечника *Candida* species при atopическом дерматите // Проблемы медицинской микологии. – 2010. – Т. 12, №4. – С. 25-27.
- Кудрявцева А.В., Катосова Л.К., Балаболкин И.И., Асеева В.Г. Роль золотистого стафилококка при atopическом дерматите у детей // Педиатрия. – 2003. – №6. – С. 32-35.
- Beghe B., Barton S., Rorke S., et al. Polymorphisms in the interleukin-4 and interleukin-4 receptor a chain genes confer susceptibility to asthma and atopy in a Caucasian populations // Clin. Exp. Allergy. – 2003. – Vol. 33. – P. 1111-1117.
- Khusnutdinova E.K., Karunas A.S., Fedorova U.U., Gilyazova I.R. Association of candidate genes polymorphism with asthma in Bashkortostan Republic of Russia/ In: Molecular Polymorphism of Man / Ed.: S.D. Varfolomyev, G.E. Zaikov. – Moscow, 2009. – P. 540-582.
- Короткий Н.Г., Тихомиров А.А., Белова А.В. Особенности развития инфекционных процессов и роль бактериальных суперантигенов в формировании различных клинико-патогенетических вариантов atopического дерматита у детей // Журн. им. Г.Н. Сперанского. – 2003. – №6. – С. 26-32.
- Мавлянова Ш.З. Клинико-иммунологическая характеристика микотических поражений кожи и слизистых оболочек: Дис. ... докт. мед наук. – Ташкент, 2004. – 246 с.
- Мачарадзе Д.Ш. Наиболее часто встречающиеся дерматиты у детей: особенности диагностики и терапии // Коллоквиум. Педиатрия. – 2007. – №7. – С. 42-45.
- Мокроносорова С.А., Пыж В.В., Кашаева О.В., Резников О.В. Терапевтический эффект активированного цинка пиритиона у больных с синдромом atopического дерматита / экземы с сенсibilизацией к дрожжеподобным грибам // Росс. Аллерголог. Журн. – 2004. – №3. – С. 83-87.
- Шабашова Н.В. Грибы и иммунитет (проблемы взаимоотношения грибов и макроорганизма – хозяина: от персистенции до инвазии). – СПб.: СПбМАПО, 2008 – 18 с.

Поступила в редакцию журнала 23.02.2015

Рецензент: В.Г. Корнищева

АНТИФУНГАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ СУБСТАНЦИИ «БЕНЗИЛБЕНЗОАТ МЕДИЦИНСКИЙ» IN VITRO

¹Васильева Н.В. (директор НИИ, зав. кафедрой), ¹Выборнова И.В. (н.с.), ²Богданова Т.В. (ассистент кафедры), ¹Богомолова Т.С. (зав. лаб.), ²Рауш Е.Р. (ассистент кафедры), ¹Мамошин А.Н. (лаборант-исследователь), ¹Чилина Г.А. (зав. лаб.), ³Гуранда Д.Ф. (начальник лаб.), ³Гуранда Л.Д. (эксперт I категории), ³Пихтарь А.В. (инженер по качеству)

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова; ¹ НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина; ² кафедра медицинской микробиологии, Санкт-Петербург; ³ ООО «Фарм ИннТех», Московская область, Одинцово, Россия

© Коллектив авторов, 2015

Методом серийных разведений в жидкой среде Сабуро определена активность субстанции «бензилбензоат медицинский» в отношении возбудителей микозов кожи и ее придатков. Установлена высокая фунгистатическая и фунгицидная активности бензилбензоата в отношении дерматомицетов *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *Microsporum canis*. Бензилбензоат проявил также антифунгальную активность в отношении *Malassezia spp.*, *Fusarium spp.*, *Scopulariopsis brevicaulis*.

Ключевые слова: дерматомицеты, минимальная подавляющая концентрация, минимальная фунгицидная концентрация, серийные разведения

IN VITRO ANTIFUNGAL ACTIVITY OF BENZILBENZOATE MEDICAL

¹Vasilyeva N.V. (director of the institute, head of the chair), ¹Vybornova I.V. (scientific collaborator), ²Bogdanova T.V. (assistant of the chair), ¹Bogomolova T.S. (head of the laboratory), ²Raush E.R. (assistant of the chair), ¹Mamoshin A.N. (laboratory assistant), ¹Chilina G.A. (head of the laboratory), ³Guranda D.T. (head of the laboratory), ³Guranda L.D. (expert category I), ³Pikhtar A.V. (quality engineer)

North-Western State Medical University named after I.I. Metchnikov; ¹Kashkin Research Institute of Medical Mycology; ²Department of Medical Microbiology, St. Petersburg; ³«Pharm InnTech» Ltd., Moscow region, Odincovo, Russia

© Collective of authors, 2015

Benzilbenzoate medical activity against etiological agents of skin, hair and nails mycoses was determined by serial dilutions method in Sabouraud broth. High fungistatic and fungicidal activities of benzyl benzoate against dermatomycetes Trichophyton mentagrophytes, T. rubrum, Microsporum canis was established. Benzil benzoate showed antifungal activity also against Malassezia spp., Fusarium spp., Scopulariopsis brevicaulis.

Key words: dermatomycetes, minimal inhibitory concentration, minimal fungicidal concentration, serial dilutions

ВВЕДЕНИЕ

Бензилбензоат (фенилметилловый эфир бензойной кислоты, C₁₄H₁₂O₂) – вещество с доказанными антипаразитарными свойствами. Практически нерастворим в воде. Лекарственные формы (крем и эмульсия бензилбензоата 20%) применяют для лечения чесотки и педикулеза. Возможность использования бензилбензоата в терапии микозов кожи и ее придатков не изучена, сведения об активности этого соединения в отношении патогенных и условно-патогенных микроскопических грибов отсутствуют.

Микозы кожи, волос и ногтей – очень распространенные заболевания. По данным Всемирного фонда по борьбе с грибковыми инфекциями (GAFFI, Global Action Fund for Fungal Infections), 14,3% населения Земли страдает от микозов кожи и ее придатков. Так, микозами волосистой части головы болеют около 200 млн. детей [1]. Несмотря на имеющиеся противогрибковые средства, нередко терапия микозов кожи недостаточно эффективна и сопровождается рецидивами. В связи с этим поиск новых антимикотических препаратов для лечения микозов кожи, волос и ногтей представляется актуальным.

Цель исследования – определить *in vitro* активность субстанции «бензилбензоат медицинский» в отношении ряда микромикотетов – возбудителей микозов кожи и ее придатков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемое вещество. Изучали субстанцию бензилбензоата медицинского концентрации 99,8% (серия 50212, производства ДП «Завод Химических Реактивов» НТК «Институт Монокристаллов», Украина). Субстанция предоставлена ООО «Фарм ИннТех».

Штаммы грибов. В качестве тест-культур использовали следующие штаммы микромикотетов из Российской коллекции патогенных грибов (РКПГ):

T. mentagrophytes – 5 штаммов (F 1394, F 1404, F 1425, F 1426, F 1457);

T. rubrum – 5 штаммов (F 1157, F 1209, F 1220, F 1231, F 1301);

M. canis – 5 штаммов (F 1156, F 1302, F 1392/1028, F 1395/329, F 1403);

Fusarium oxysporum – 2 штамма (F 1390/671, F 1504/70590);

F. proliferatum – 1 штамм (F 1503/58436);

Fusarium sp. – 2 штамма (F 1436/459, F 1449);

S. brevicaulis – 5 штаммов (F 165/ВКМ-406, F 166/ВКМ-407, F 1167, F 1297/450, F 1412).

Использовали также 10 штаммов *Malassezia sp.*, выделенных с кожи дерматологических пациентов (№№ 115/12, 05/13, 133/12, 135/12, 14/13, 16/13, 20/13, 146/12, 21/13, 22/13).

Питательные среды. Агаризованную среду Сабуро применяли для выращивания культур дерматомицетов и плесневых грибов. Состав среды: вода дистиллированная – 1 л, пептон – 10 г, глюкоза – 40 г, агар-агар микробиологический – 18 г, рН – 6,8.

Жидкую среду Сабуро использовали для определения минимальных подавляющих концентраций (МПК) бензилбензоата для дерматомицетов и плесневых грибов. Состав среды: вода дистиллированная – 1 л, пептон – 10 г, глюкоза – 40 г, рН – 6,8.

Для выращивания культур *Malassezia sp.* применя-

* Контактное лицо: Богомолова Татьяна Сергеевна, Тел.: (812) 303-51-40

ли модифицированную агаризованную среду Лиминга-Нотман; для определения активности бензилбензоата в отношении этих липофильных дрожжей – модифицированную жидкую среду Лиминга-Нотман [2].

Состав среды «модифицированный агар Лиминга-Нотман»: пептон – 10 г, глюкоза – 10 г, дрожжевой экстракт – 2 г, сухая бычья желчь – 8 г, глицерин – 10 мл, глицерина моностеарат – 0,5 г, Твин 60 – 5 мл, оливковое масло – 20 мл, агар-агар микробиологический – 15 г, вода дистиллированная – до 1 литра, pH – 6,0.

Состав жидкой среды Лиминга-Нотман: пептон – 10 г, глюкоза – 10 г, дрожжевой экстракт – 2 г, сухая бычья желчь – 8 г, глицерин – 10 мл, глицерина моностеарат – 0,5 г, Твин 60 – 5 мл, оливковое масло – 20 мл, вода дистиллированная – до 1 литра, pH – 6,0.

Определение фунгистатической активности бензилбензоата в отношении нитчатых грибов (дерматомицетов и плесневых грибов) выполняли методом серийных разведений в жидкой среде Сабуро [3, 4]. Готовили 20% раствор субстанции бензилбензоата в жидкой среде Сабуро, содержащий 5% диметилсульфоксида. Выполняли последовательные двукратные разведения субстанции бензилбензоата, начиная с максимальной концентрации в среде 20% и до минимальной концентрации 0,00007%.

Для приготовления взвесей тест-культуры грибов выращивали в течение 2 недель при 28 °С на агаре Сабуро в пробирках, затем клеточную массу снимали с поверхности агара, постепенно добавляя 0,85% стерильный раствор натрия хлорида до густоты рабочих взвесей 1 ЕД по МакФарланду. Количество вносимой рабочей взвеси в каждую пробирку ряда составляло 0,1 мл.

В каждом исследовании ставили 3 контроля: 1) культуры (1 мл питательной среды + 0,1 мл рабочей взвеси тест-культуры); 2) питательной среды (1 мл питательной среды без культуры и без исследуемого Объекта №1); 3) контроль исследуемого вещества (0,5 мл питательной среды + 0,5 мл исходного раствора субстанции бензилбензоата).

Все ряды подготовленных разведений с тест-культурами грибов и контрольные пробирки выдерживали при 28 °С в течение 7-10 суток до появления роста гриба в первом контроле. МПК бензилбензоата считали концентрацию в последней пробирке ряда (максимальное разведение), в которой отсутствовал визуально определяемый рост микромицета.

Определение фунгицидного действия бензилбензоата в отношении нитчатых грибов (дерматомицетов и плесневых грибов) проводили на основании высевов из каждой пробирки ряда разведений, в которой визуально отсутствовал рост тест-культуры. Высев выполняли микробиологической петлей, нанося штрихи на секторы агаризованной среды Сабуро в чашках Петри. Одновременно делали высев из пробирки с контролем культуры. Чашки с высевами инкубировали при 28 °С до появления роста колоний в контрольном секторе, после чего отмечали наличие или отсутствие роста гриба во всех засеянных секторах. Минимальной фунгицидной концентрацией (МФК) считали минимальную концентрацию (максимальное разведение) бензилбензоата в пробирке, высев из которой на плотную питательную среду был негативным (не давал роста грибов).

Определение фунгистатической активности бензилбензоата в отношении *Malassezia* spp. осуществляли методом серийных микроразведений. Использовали 96-ти луночные пластиковые планшеты с U-образными лунками. В каждую лунку планшета помещали 50 мкл рабочих концентраций бензилбензоата и 50 мкл взвеси клеток культуры в жидкой среде Лиминга-Нотман [2].

Для приготовления взвесей тест-культуры *Malassezia* spp. выращивали в течение 5 суток при оптимальной температуре 32 °С на агаре Лиминга-Нотман в пробирках, затем клеточную массу снимали с поверхности агара, постепенно добавляя стерильную дистиллированную воду, содержащую 0,04% Твин 80 до густоты исходных взвесей 1 ЕД по МакФарланду. Готовую взвесь клеток разводили жидкой средой Лиминга-Нотман до концентрации 1,0-5,0·10⁴ КОЕ/мл. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева.

При каждом титровании ставили четыре контроля: 1) культуры (50 мкл питательной среды + 50 мкл взвеси тест-культуры); 2) питательной среды (100 мкл); 3) контроль исследуемого вещества (50 мкл питательной среды + 50 мкл исходного раствора бензилбензоата); 4) контроль роста культуры из рабочей взвеси на агаризованной среде Лиминга-Нотман.

Все ряды подготовленных разведений с тест-культурами *Malassezia* sp. и контроли в планшетах выдерживали при 32 °С в течение 3-9 суток до появления роста гриба в контроле на агаризованной среде.

После окончания основного периода инкубации в каждую лунку планшета добавляли 50 мкл 0,01% рабочего раствора резазурина и возвращали планшет в термостат. Результаты учитывали визуально через 4 часа по изменению цвета индикатора. При появлении роста культуры цвет индикатора – резазурина визуально изменялся с голубого на розовый.

МПК исследуемого вещества определяли по минимальной концентрации (максимальному разведению) в последней лунке ряда, где визуально не изменялся цвет индикатора.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Данные о полученных значениях МПК и МФК субстанции «бензилбензоат медицинский» в отношении испытанных культур дерматомицетов и плесневых грибов представлены в таблице 1.

Таблица 1

Антифунгальная активность субстанции «бензилбензоат медицинский» *in vitro* в отношении нитчатых грибов из РКПГ

№ п/п	Вид и штамм микромицета	МПК, %	МФК, %
1	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> F 1394	0,02	0,05
2	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> F 1404	0,05	0,05
3	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> F 1425	0,1	0,2
4	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> F 1426	0,2	0,2
5	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> F 1457	0,2	0,2
6	<i>Trichophyton rubrum</i> F 1157	0,0003	0,0003
7	<i>Trichophyton rubrum</i> F 1209	0,03	0,03
8	<i>Trichophyton rubrum</i> F 1220	0,3	0,65
9	<i>Trichophyton rubrum</i> F 1231	0,3	0,65
10	<i>Trichophyton rubrum</i> F 1301	0,15	0,65
11	<i>Microsporum canis</i> F 1156	0,004	0,01
12	<i>Microsporum canis</i> F 1302	0,004	0,004
13	<i>Microsporum canis</i> F 1392/1028	0,004	0,004
14	<i>Microsporum canis</i> F 1395/329	0,002	0,002
15	<i>Microsporum canis</i> F 1403	0,004	0,004

16	<i>Fusarium oxysporum</i> F 1390/671	2,5	5
17	<i>Fusarium</i> sp. F 1436/459	5	5
18	<i>Fusarium</i> sp. F 1449	5	10
19	<i>Fusarium proliferatum</i> F 1503/58436	5	10
20	<i>Fusarium oxysporum</i> F 1504/70590	5	5
21	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> F 165/BKM-406	5	>20
22	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> F 166/BKM-407	2,5	>20
23	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> F 1167	2,5	>20
24	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> F 1297/450	5	>20
25	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> F 1412	2,5	20

Бензилбензоат проявил высокие фунгистатическую и фунгицидную активности *in vitro* в отношении всех изученных культур дерматомицетов. МПК находились в пределах от 0,002% до 0,004% – для штаммов *M. canis*; от 0,02% до 0,2% – для *T. mentagrophytes*; от 0,0003% до 0,3% – для *T. rubrum*. МФК составили 0,004%-0,01%; 0,05%-0,2% и 0,0003%-0,65% соответственно.

Выраженное антифунгальное действие бензилбензоата обнаружили также в отношении *Fusarium* spp., хотя значения МПК и МФК были более высокими, чем для дерматомицетов: 2,5%- 5% и 5%-10% соответственно.

В отношении другого плесневого гриба – частого возбудителя онихомикоза *S. brevicaulis* действие бензилбензоата было только фунгистатическим, МПК составили 2,5%-5%.

Результаты исследования активности бензилбензоата в отношении *Malassezia* spp. *in vitro* представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Фунгистатическая активность субстанции «бензилбензоат медицинский» в отношении *Malassezia* spp. *in vitro*

№ п/п	Тест-культуры (№ штамма/год выделения)	МПК, %
1	<i>Malassezia</i> sp. 115/12	0,4
2	<i>Malassezia</i> sp. 05/13	0,2
3	<i>Malassezia</i> sp. 133/12	0,2
4	<i>Malassezia</i> sp.135/12	0,1
5	<i>Malassezia</i> sp. 14/13	0,1
6	<i>Malassezia</i> sp. 16/13	0,2
7	<i>Malassezia</i> sp. 20/13	>20
8	<i>Malassezia</i> sp. 146/12	0,1
9	<i>Malassezia</i> sp. 21/13	2,5
10	<i>Malassezia</i> sp. 22/13	1,25

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. www.GAFFI.org
2. Sugita T., Tajima M., Takashima M., et al. A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects// Microbiol. Immunol. – 2004. – Vol. 48, №8. – P. 579-83.
3. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М: Гриф и К, 2012. – 944 с.
4. Богданова Т.В., Богомолова Т.С., Васильева Н.В. и др. Микологическое обследование объектов окружающей среды и определение противогрибковой активности различных веществ. Методические рекомендации №2. – СПб: СПб МАПО, 2008. – 16 с.
5. Васильева Н.В., Аравийский Р.А., Выборнова И.В. и др. Экспериментальное моделирование трихофитии на морских свинках в зависимости от вирулентности патогена-возбудителя// Проблемы медицинской микологии. – 2013. – Т. 15, №1. – С. 34-39.

Поступила в редакцию журнала 16.09.2015

Рецензенты: Н.П. Елинов

Бензилбензоат проявил выраженную фунгистатическую активность в отношении 9 из 10 изученных штаммов *Malassezia* spp. МПК составили от 0,1% до 2,5%. Оценку фунгицидности бензилбензоата в отношении *Malassezia* spp. не выполняли, так как стандартные методы исследования для этих липофильных грибов в мире еще не разработаны.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами впервые проведено исследование активности субстанции «бензилбензоат медицинский» *in vitro* в отношении микромицетов – возбудителей микозов кожи и ее придатков. Установлены высокие фунгистатическая и фунгицидная активности препарата в отношении наиболее частых возбудителей – дерматомицетов *M. canis*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*. В связи с этим представляется целесообразным продолжить изучение антифунгального действия бензилбензоата *in vivo* на экспериментальной модели дерматомикоза у лабораторных животных [5].

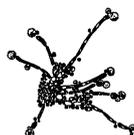
Выявлена выраженная фунгистатическая активность бензилбензоата в отношении большинства штаммов *Malassezia* spp., что может быть показателем перспективности использования этого медицинского препарата для лечения отрубевидного лишая и других кожных *Malassezia*-ассоциированных заболеваний.

В более высоких концентрациях (2,5%-10%) бензилбензоат оказывал антифунгальное действие на плесневые грибы *Fusarium* spp. и *S. brevicaulis*, которые могут вызывать поражения кожи и ногтей, трудно поддающиеся лечению обычными антимикотиками.

ВЫВОДЫ

Субстанция «бензилбензоат медицинский» (99,8%) обладает высокой фунгицидной активностью *in vitro* в отношении дерматомицетов *M. canis*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*.

Субстанция «бензилбензоат медицинский» (99,8%) обладает выраженной антифунгальной активностью *in vitro* в отношении *Malassezia* spp., *Fusarium* spp. и *S. brevicaulis*.



ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ИНВАЗИВНОГО АСПЕРГИЛЛЕЗА, ОБУСЛОВЛЕННОГО *ASPERGILLUS FUMIGATUS*

¹Степанова А.А. (зав. лаб.), ¹Васильева Н.В. (директор института, зав. кафедрой), ²Чжан Ф. (директор института, зав. кафедрой), ²Тонг Д. (доцент кафедры), ¹Авдеенко Ю.Л. (с.н.с.), ³Богданов А.Н. (профессор кафедры), ³Семелев В.Н. (нач. отд.), ¹Шадривова О.В. (ассистент кафедры), ¹Климко Н.Н. (зав. кафедрой)

¹ НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия; ² Харбинский Медицинский Университет, Харбин, Китай; ³ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2015

Изучены особенности ультраструктурной организации гиф мицелия *A. fumigatus* в легких больного острым лейкозом и инвазивным аспергиллезом, возникшим после цитостатической терапии. Установлено, что морфогенез клеток мицелия *A. fumigatus* сопровождался усилением уровня вакуолизации, аккумуляцией небольшого числа запасных липидов, формированием снаружи клеточных стенок толстого темного внеклеточного матрикса. Зрелые клетки гиф мицелия не различались между собой по ультраструктуре интерфазных ядер, митохондрий и компонентов эндомембранной системы, а также по количеству и качеству аккумулируемых запасных веществ. Способность гиф гриба формировать одну гигантскую митохондрию, походящиеся клетки гиф мицелия, а также хорошо развитый внеклеточный матрикс можно отнести к цитологическим критериям его высокой вирулентности.

Ключевые слова: *Aspergillus fumigatus*, инвазивный аспергиллез, компоненты клеток, легкие человека, электронная микроскопия

ELECTRON-MICROSCOPIC INVESTIGATIONS OF INVASIVE ASPERGILLOSIS CAUSED WITH *ASPERGILLUS FUMIGATUS*

¹Stepanova A.A. (head of laboratory), Vasilyeva N.V. (director of the institute, head of the chair), ²Zhang F. (director of the institute, head of the chair), ²Tong D. (associate professor), ¹Avdeenko Y.L. (senior scientific collaborator), ³Bogdanov A.N. (professor of chair), ³Semelev V.N. (head of department), ¹Shadrivova O.V. (assistant of the chair), ¹Klimko N.N. (head of the chair)

¹ Kashkin Research Institute of Medical Mycology, I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, Saint Petersburg, Russia; ² Harbin Medical University, Harbin, China; ³ Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2015

Ultrastructural peculiarities of the organization of *A. fumigatus* hyphal vegetative cells in lungs of patient with invasive aspergillosis and

* Контактное лицо: Степанова Амалия Аркадьевна, тел.: (812) 303-51-40

acute leukemia have been studied. It was revealed, that the morphogenesis of hyphal cells of *A. fumigatus* was accompanied by increasing the level of vacuolization, accumulation of a small number of storage lipids, formation outside of the cell walls a wide dark extracellular matrix. The mature hyphal cells didn't differ among themselves according the ultrastructure of interphase nucleus, mitochondria and components of endomembrane system, quantity and quality of accumulated storage substances. Ability of the studied tissular vegetative hyphae to develop one giant mitochondrion, hyphal resting cells and well developed extracellular matrix can be considered as cytological criteria of its virulence.

Key words: *Aspergillus fumigatus*, cell components, electron microscopy, invasive aspergillosis, lung

INTRODUCTION

Aspergillus fumigatus Fresen. is a major pathogen of invasive aspergillosis in immunocompromised patients [Latgé J.-P. // Clin. Microbiol. Rev. – 1999. – Vol. 12, №2]. The literature data about the fine organization of the tissular forms of *A. fumigatus* is limited. Thus, ultrastructural peculiarity of the integral part of the cell wall – so called «extracellular matrix» of *A. fumigatus*, damaging of the mouse and human lung tissue, was studied in the certain work [1-5]. Fine structure of the *A. fumigatus* hyphal cells was investigated in the mouse lung tissue [4] and in the lungs of the patient in association with *A. flavus* [5]. The aim of this study was ultrastructural investigations of the *A. fumigatus* hyphal cells, which cause the invasive aspergillosis in a patient with acute leukemia.

MATERIALS AND METHODS

We investigate the lungs of patient K. (41 y.o.) with invasive aspergillosis and mixed phenotype acute leukemia. Invasive aspergillosis was developed after cytostatic chemotherapy (1-st course induction according the «RACOP» protocol). The diagnosis of invasive aspergillosis was made according EORTC/MSG 2008 criteria (risk factors, clinical and CT scan features, and positive galactomannan test in serum) [6]. Despite antifungal therapy with voriconazole progressed neurological symptoms with the development of coma, and increased respiratory and cardiovascular failure. After 10 days from the start of antifungal therapy the death of patient was verify. According to the results of mycological examinations of the autopsy material was diagnosed disseminated invasive aspergillosis with lungs, brain and thyroid involvement, caused by *Aspergillus fumigatus*.

The lung pieces were fixed for light microscopy in 10% formalin solution and then treated according the standard methods. The paraffin sections were stained with hematoxylin-eosin (H-E) and by the Gomori-Grocott (G-G) methods. For transmission electron microscopy (TEM) the lung pieces were fixed 3 hours in 3% solution of the glutaraldehyde, and then post-fixed during the 9 hours in 1% solution of osmium tetroxide, dehydrated in series of ethanol and acetone, after what were embedded in the epoxy medium epon-araldite according the previously described method [7]. From epoxy blocks on Pyramitome 11800 LKB we obtain semi-thin sections (3,0-5,0 μm), which were stained with toluidine blue and investigated with light microscope for revealing the fungal aggregation and subsequent aimed trimming and cutting. Ultrathin sections were cut with glass knives and stained with uranyl acetate and lead citrate and then observed with transmission electron microscope Jem-100 SX (Jeol, Japan).

RESULTS AND DISCUSSION

During the light microscopic examinations after of the H-E staining we observed in the patient lungs the vast areas

of necrosis with scanty inflammatory infiltration, presented with rare neutrophils and macrophages. In lung tissue we revealed the fibrinous exudate and areas of aspergillus pneumonia. After the staining with G-G methods in areas of necrosis we identified the variable in size (from 15,0 to 25,0 μm) aggregations of the radially oriented, branching (Fig. 1 a) and septate vegetative hyphae. The diameter of the hyphae was variable from 3 to 4 μm .

Under TEM the vegetative cells of fungi may be solitary or form dense aggregations (Fig. 1 b, 2 c, h). The hyphal cells were differed in the presence or absence of vacuoles, and the degree of vacuolization. The apical fungal segments were rich with cytosol and practically without vacuoles (Fig. 1 b). Following the hyphal cells in the peripheral marginal area, were poorly vacuolized (Fig. 1 c-f). Vacuoles were small, with light content, uniformly distributed on the median sections of cells. Interphase nuclei single or in pairs, as a rule, occupied the lumen of the hyphae. They were spherical (1,2 μm) or slightly ellipsoid (0,8x1,2 μm) in shape, with lower level of uniformly distributed condensed chromatin (Fig. 1 e, f), contained one large spherical (from 0,4 to 0,5 μm) excentric nucleolus with a higher contrast and predominance of granular component. Notice, that the lower level of chromatinization of interphase nuclei was typical for in vitro growing cells of this [8] and another species of the *Aspergillus* [9-12].

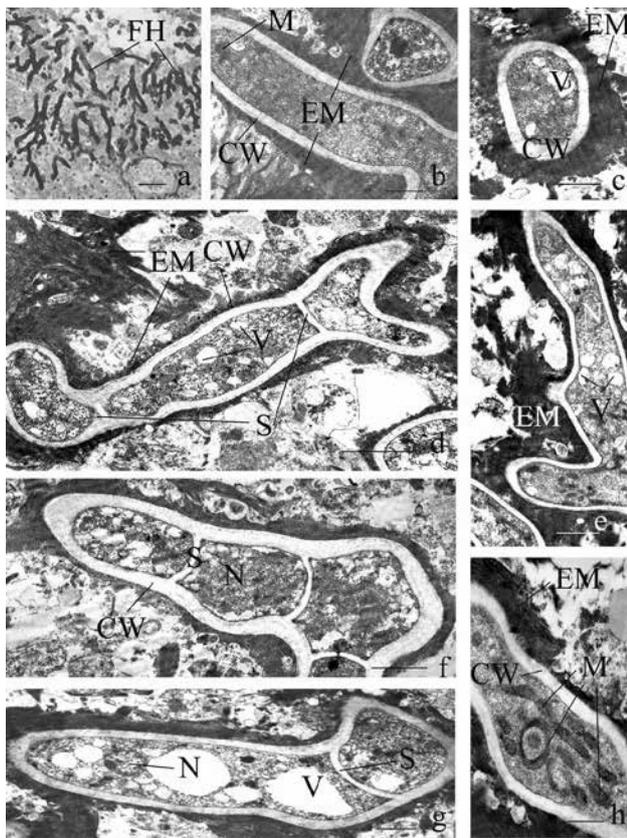


Fig. 1. Light- (a) and transmission (b-h) electron microscopic images of the *A. fumigatus* hyphal cells in patient lungs parenchyma. Abbreviations used in this and Fig. 2: V – vacuole, FH – fungal hyphae, EM – extracellular matrix, FC – fungal cell, CW – cell wall, LI – lipids inclusions, M – mitochondrion(ia), P – plug, PCW – primary cell wall, S – septum(ae), SCW – secondary cell wall, WB – Woronin body(ies), N - nucleus. Scale bars: a – 20,0 μm , b - h – 1,5 μm

Mitochondria are uniformly distributed on the cells sections. They number on the median sections of growing

cells varied from 5 to 7. They were single or often localized in small groups, polymorphic, variable in size (from 0,3 to 0,5 μm), with a dark matrix and a often light cristae. The dark matrix of these organelles made them easily distinguishable from the moderately electron dense cytosol.

After the poorly vacuolated cells of hyphae followed (towards to the center of the fungal colony) cells with rare light medium size (Fig. 1 g) vacuoles or several large (Fig. 2 a, g), which occupies the main area in the cell. In these actively growing cells of the hyphae, the number of mitochondria was increased to 20-25 on the median section of cell. They are polymorphic. We identified the profiles of the mitochondria considerable in length (about 0,6-0,8 μm , fig. 1 h) and often annular in shape. Storage substances in the cytosol were observed rarely, mostly it was a few small, rounded and of moderate electron density lipids inclusions, which are localized single or in small groups in the cytosol or near the cell wall (Fig. 2 d). Notice, that in vitro condition the mature hyphal cells of the *A. fumigatus* synthesized more variable types of storage substances [8] and the degree of last were higher, which can be explained by more nutritional value of the medium, as well as by the necessity to produce the numerous conidiogenous apparatus. Another explanation for the low content of storage substances in mature hyphal cells of the analyzed in present work case is still short time of infection current in the lung tissue of the patient.

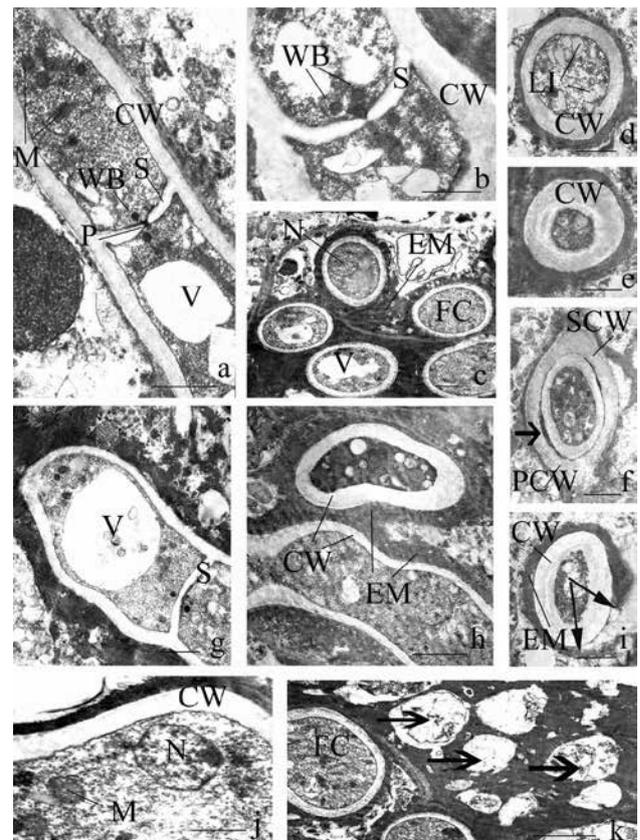


Fig. 2. Ultrastructure of the *A. fumigatus* vegetative cells in patient lungs parenchyma. Scale bars: a – 1,0 μm , b, j – 0,5 μm , c – j, k – 1,0 μm

Components of the endomembranouse systems were not good developed. They are presented in the form of short slightly curved cisterns of endoplasmic reticulum and small light vesicles, which localized near the cell wall. Single cisterns of the Golgi were not detected. The cytosol

with moderate electron density contains numerous free ribosomes. Microbodies were not detected.

The plasma membrane of intact hyphal cells was three-layered, asymmetric. Periplasmic space is absent. The lateral cell walls thin (from 0,15 to 0,20 μm), light, homogeneous and with lower contrasting randomly oriented microfibrils (Fig. 1 b-f, h, 2 a, b, d - f, h, i, j). Notice that the hyphal cells of *A. fumigatus* in vitro [8] and in vivo [4, 5] possess with the cell wall similar in thickness and ultrastructure. Cell walls outside were covered with good developed dark granular-fibrillar layer, so-called «extracellular matrix» (Fig. 1 b-e, h, 2 c, h, i). In the mature hyphal cells the thickness of this layer was in 2-6 times (up to 1,0-1,2 μm) larger in comparison with the cell wall.

During the growth and development of the hyphal cells we not observed significant increasing in the cell wall, what cannot be typical about of the extracellular matrix (Fig. 1 b, c, e, h, 2 c, h). It should be noted, that in the hyphal extracellular matrix of the tissular forms of *A. fumigatus* [1-5] was thicker and electron dense in comparison with the same in vitro [8], what clearly indicate about its protective function. As a rule, in the more mature part of the fungal aggregations the extracellular matrix of neighboring hyphae come into tight contact (Fig. 2 c, h), so that became the cause for the formation of specific hyphal clusters in the form of biofilm. In the cultural condition the extracellular matrix was revealed in another species, such as *A. niger* [9], *A. flavus* [10], *A. versicolor* [11] and *A. terreus* [12], but the level of its development in the same condition in *A. fumigatus* was more higher [8].

Rarely we mentioned the resting hyphal cells, which formed the thick (from 0,4 to 0,5 μm) secondary cell wall (Fig. 2 f), similar in structure with the primary one. The another type of resting cells possess with very thick (from 0,6 to 0,8 μm) primary cell wall (Fig. 2 d, e, i). In the first case, between the primary and secondary cell walls we detected the thin irregular in thickness dark homogeneous layer (Fig. 2 f, arrow), and the outside of last - a thin extracellular matrix. In the contents of the described both cells types we observed electron-dense cytosol, which often masking their intercellular components (Fig. 2 e, f, h).

It was obvious, that the presence of a thick walls and dark content of such cells indicate that some of the cells of the hyphae of the investigated tissular form of the fungus transit into a resting condition, which at the time of the favorable situation may cause secondary mycotic infection. Similar morphological peculiarity in the structure of hyphal cell walls was revealed on the example of tissular forms of another strain of *A. fumigatus*, which infected mouse lung [4]. Is still open the following question: are the identified peculiarity was typical for the individual cells of the hyphae, or it occurs within the one hyphae.

It is interesting to note, that during the transition of some hyphal cells in the resting stage its extracellular matrix was locally undergo lysis (Fig. 2 i, arrows) and reduce in thickness until complete disappearance. There is in fact, that the fungal cell wall and its integral part - extracellular matrix, present a dynamic «alliance» in the course of which the regular changes in their thickness and ultrastructure provides strong protection to the fungal pathogen from the cells of the human immune system. It was obviously the domination of the protective functions of the cell wall, but not extracellular matrix, during the transition of hyphal cells in the resting stage.

Intact hyphal cells were separated from each other by transverse wedge-shaped moderate electron density septae (Fig. 2 a, b). The thickness of last was on the average was equal 0,20 μm near the lateral cell and 0,12 μm - in the middle part of septum. The ultrastructure of the septal pore apparatus was similar for the cells of the hyphal cells of tissular [4] and cultural forms [8] of *A. fumigatus*. Septum posses with central pore near which we revealed the Woronin bodies and dark variable in morphology plugs (Fig. 2 a, b). The diameter of septal pore was on the average 0,12 μm . Woronin bodies were small, spherical (0,15 μm), dark, homogenous, have a three-layered limiting membrane. The number of last components varied from 2 to 4 on median sections of septum. They were located at the same distance from each other and septal pore. Plugs were localized in the lumen of the septal pore. In the growing hyphal cells in the composition of the septal pore apparatus we identified only Woronin bodies, whereas in mature - Woronin bodies and plugs.

Thus, we not found the differences in the structure of septae and components of the septal pore apparatus in the hyphal cells of the tissular [4] and cultural forms [8] of *A. fumigatus*. The ultrastructure of the pore septal pore apparatus of the filamentous fungi was the rather conservative characteristic which recently attracted the attention of researchers for decision the questions in field of the fungal systematic and phylogeny. The analyses of own data [9-12] and in literature [Robinson P.M., et al.// Trans. Brit. Mycol. Soc. - 1969. - Vol. 52, №3; Bojović-Cvetić D., Vujčić R. // Protoplasma. - 1976. - Vol. 88; Momamy M., et al. // Mycology. - 2002. - Vol. 94, №2; etc.] shows that within the genus *Aspergillus* significant differences in the structure of the septal pore apparatus between the different species absent. However, according of these cytological characteristics, both as in vitro and in vivo conditions, reliably able provide the fungal identification on the genus level. The homogeneity in the structure of the septal pore apparatus of the members of the genus *Aspergillus* were the evidence of its naturalness and homogeneity.

The central part of the radially oriented fungal aggregations consists from senescent and dead cells. The contents of the predominant number of the cells was without cytosol (Fig. 2 j), and sometimes - destructive organelles. It is interesting note, that after the complete loosing the hyphal cells contents and the fully destruction of their cell walls, in lung tissue was presented the zones of accumulation of dark extracellular matrix with characteristic spherical light «holes» of locations of once intact fungal cells (Fig. 2 k, arrows).

In the senescent hyphal cells the nuclei lost their group localization, the enlightenment of the cytosol and nucleoplasm were revealed (Fig. 2 j); significantly decreased the number of organelles and storage substances. In a whole, the general pattern of the ultrastructural changes were identical with previously described for senescent growing in vitro cells of this and another species from genus *Aspergillus* [13].

The investigated in the patient lungs parenchyma the *A. fumigatus* vegetative cells were formed in mature condition the one giant mitochondrion that according the cytological criterion was the indicator of their high functional activity. Earlier [4], on the example of another strain of this species, which we investigated in mouse lung tissue, we did not reveal such morphological form of this cell component. We believed that the ability of the tissular form of the in-

vestigated in the patient lungs parenchyma vegetative cells of the *A. fumigatus* to develop a one giant mitochondrion was cytological indicator of its higher virulence, such as it was revealed for *Cryptococcus neoformans* in mouse brain during its transformation from cultural to tissular form [7].

Another specific features of the studied in present work tissular forms of *A. fumigatus* was the ability to developed the resting vegetative hyphal cells with dark cytoplasm, thick cell walls and the good developed extracellular matrix. Of course, that the ability to developed the resting cells, which can be considered analogues of infectious propagules with vegetative origin, shows a high level of functional activity of the fungus, and the frequency of their occurrence - about the duration of the infectious process. In our opinion, the presence of such type of the cells in the lung tissue may cause a secondary mycotic infectious process. It was interesting to note, that at the first time the numerous resting hyphal cells with the similar structures were revealed for tissular forms of another strain of the *A. fumigatus* in the lungs of mouse after 5 days after beginning of infection [4].

Thus, according the ultrastructural data in the studied patients lung tissue was dominated the intact and active hyphal cells of the *A. fumigatus*. Identified with a light microscope rare cells of immune system in the TEM

practically were not revealed. In a whole, the absence of the pronounced condition of the cells of the host immune system, may explains the intact and active condition of the fungal pathogen in the investigated patients lung tissue.

CONCLUSIONS

1. During the light-microscopic studies of lungs sections of patient with invasive aspergillosis we revealed the radially oriented variable in size aggregations of the *A. fumigatus* hyphae.

2. Morphogenesis of the *A. fumigatus* hyphal cells in the lungs parenchyma of the patient with invasive aspergillosis was accompanied with the increasing the level of vacuolization, mitochondrial proliferation, development of one giant mitochondrion, accumulation of a small number of storage substances in the form of lipids inclusions, thickening of the lateral cell wall, formation outside of last the well developed extracellular matrix. Mature hyphal cells did not differ among themselves by the number and fine structure of interphase nuclei, mitochondria, on the quantity and quality of accumulated storage substances and components endomembranous system.

3. The ability of the studied mature vegetative hyphae of the *A. fumigatus* to developed one giant mitochondria, resting hyphal cells and wide outer extracellular matrix can be consider as cytological factors of its higher virulence.

REFERENCES

1. Loussert C., Schmitt C., Prevost M.-C., et al. In vivo biofilm composition of *Aspergillus fumigatus*// Cellular Microbiology. – 2009. – Vol. 12. – P. 405-410.
2. Muller F.-M., Seidler M., Beauvais A. *Aspergillus fumigatus* biofilms in the clinical setting// Medical Mycology. – 2011. – Vol. 49. – P. 96-100.
3. Muszkieta L., Beauvais A., Pähtz V., et al. Investigation of *Aspergillus fumigatus* formation by various «omics» approaches// Frontiers in Microbiology. – 2013. – Vol. 4. – P. 1-15.
4. Степанова А.А., Босак И.А., Сеницкая И.А. Цитологическое исследование *Aspergillus fumigatus* в легких мышей// Проблемы мед. микологии. – 2013. – Т. 15, №1. – С. 52-58.
5. Степанова А.А., Васильева Н.В., Борзова Ю.В. и др. Электронно-микроскопическое изучение аспергиллеза легких человека на примере архивного материала// Проблемы мед. микологии. – 2014. – Т. 16, №3. – С. 70-79.
6. Боданов А.Н., Семелев В.Н., Тараканова Л.А. и др. Случай диссеминированного инвазивного аспергиллеза больного острым лейкозом со смешанным фенотипом и нейрорлейкозом// Успехи современной микологии. – 2015. – Т. 17, №2. – С. 12-14.
7. Васильева Н.В., Степанова А.А., Сеницкая И.А. Особенности морфогенеза клеток *Cryptococcus neoformans* в зависимости от вирулентности штаммов // Проблемы мед. микологии. – 2007. – Т. 9, №4. – С. 23-30.
8. Степанова А.А., Сеницкая И.А., Авдеев Ю.Л. Субмикроскопическое изучение клеток вегетативного мицелия *Aspergillus fumigatus* // Проблемы мед. микологии. – 2004. – Т. 6, №3. – С. 34-40.
9. Степанова А.А., Сеницкая И.А. Ультраструктура клеток *Aspergillus niger*. Вегетативный мицелий// Проблемы мед. микологии. – 2003. – Т. 5, №4. – С. 32-39.
10. Степанова А.А., Сеницкая И.А. Ультраструктура клеток вегетативного мицелия *Aspergillus flavus*, выращенного in vitro // Проблемы мед. микологии. – 2006. – Т. 8, №1. – С. 40-45.
11. Степанова А.А., Сеницкая И.А. Цитология клеток выращенного in vitro вегетативного мицелия *Aspergillus versicolor*// Проблемы мед. микологии. – 2006. – Т. 8, №3. – С. 22-28.
12. Степанова А.А., Сеницкая И.А. Электронно-микроскопическое изучение клеток вегетативного мицелия *Aspergillus terreus* // Проблемы мед. микологии. – 2007. – Т. 9, №3. – С. 26-33.
13. Степанова А.А., Сеницкая И.А. Ультраструктурные аспекты старения клеток некоторых видов рода *Aspergillus*// Проблемы мед. микологии. – 2009. – Т. 11, №4. – С. 24-29.

Поступила в редакцию журнала 17.06.2015

Рецензент: М.А. Шевяков



АНТИФУНГАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ ТРИТЕРПЕНОВОГО САПОНИНА ТАУРОЗИДА SX1 ИЗ HEDERA TAURICA CARR. В ОТНОШЕНИИ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ CANDIDA SPP.

Криворутченко Ю.Л. (зав. кафедрой), Кирсанова М.А. (ассистент кафедры)*, Андроновская И.Б. (доцент кафедры)

Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского (кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии), Симферополь, Россия

© Коллектив авторов, 2015

Изучена чувствительность 104 клинических изолятов различных видов *Candida spp.* к тритерпеновому сапонину таурозиду Sx1 из крымского плюща *Hedera taurica Carr.* (Araliaceae) и к антифунгальным препаратам группы азолов и полиеновых антибиотиков. Изоляты грибов были получены от пациентов с различными заболеваниями, госпитализированных в больницы Симферополя. Чувствительность грибов к антимикотикам исследовали с помощью метода дисков. Чувствительность грибов к таурозиду Sx1 изучали методом разведений. В пределах пяти категорий обследованных лиц, сгруппированных по принципу сходства патологии, *C. albicans* выявляли в 46-81% случаев, а отдельные не *albicans* виды *Candida* обнаруживали с частотой от нуля до 27% случаев. Средняя устойчивость изолятов к полиеновым антибиотикам амфотерицину В и нистатину составляла 21,2% и 33,7% соответственно. Устойчивость к клотримазолу, флуконазолу и итраконазолу была выше – 55,8%, 67,3% и 76,9% соответственно. Изоляты, выделенные от ВИЧ-позитивных лиц, были наиболее устойчивы к антимикотикам. Сапонин таурозид Sx1 имел выраженную фунгицидную активность в отношении 95,1% изолятов (МИК 125-250 мг/л). В результате исследования отмечали обнадеживающие перспективы использования сапонина таурозид Sx1 для подавления жизнедеятельности *Candida spp.*, принадлежащих к разным видам, у пациентов с различной патологией.

Ключевые слова: *Candida spp.*, патология человека, сапонин таурозид Sx1, чувствительность к антимикотикам

ANTIFUNGAL ACTION OF TRITERPENOID SAPONIN SX1 FROM HEDERA TAURICA CARR. AGAINST CLINICAL ISOLATES OF CANDIDA SPECIES

Krivorutchenko Yu.L. (head of chair, professor), Kirsanova M.A. (assistant of chair), Andronovskaya I.B. (associate professor of chair)

V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Medical Academy named after S. I. Georgievsky (Chair of microbiology, virology and immunology), Simferopol, Russia

© Collective of authors, 2015

Sensitivity of 104 clinical isolates of different *Candida* species to triterpenoid saponin tauroside Sx1 from Crimean ivy *Hedera taurica Carr.* and azole derivatives and polyene antifungal drugs has been studied. The

* Контактное лицо: Кирсанова Марина Александровна, e-mail: m.a_kirsanova@mail.ru

isolates were recovered from patients with various diseases in Simferopol city, Crimea. Sensitivity of the fungal isolates to the antifungal drugs was determined by the disk diffusion method. Sensitivity of the microorganisms to tauroside Sx1 was determined by the dilution method. In the examined individuals subdivided into five different categories of patients, which were grouped due to similarity of their pathology, *C. albicans* has been isolated in 46-81% of cases, and certain non-*albicans* species of *Candida* – from none to 27% of cases. An average resistance of the *Candida* isolates to polyene antibiotics, such as amphotericin B and nystatin were 21.2% and 33.7% respectively. The resistance to clotrimazole, fluconazole and itraconazole was higher – 55.8%, 67.3% and 76.9% respectively. The isolates from HIV-positive patients were possessed of highest resistance to the antifungal drugs. Saponin tauroside Sx1 had pronounced fungicidal activity against 95.1% of the fungal isolates (MIC 125-250 mg/l) independently of susceptibility of these microorganisms to the examined antifungal drugs. Result of the present study revealed a great promise in the application of saponin tauroside Sx1 against different *Candida* species participating in various human pathology.

Key words: antifungal drug sensitivity, *Candida* species, human pathology, saponin tauroside Sx1

ВВЕДЕНИЕ

Широкое использование антимикробных препаратов привело к прогрессирующему возрастанию лекарственной устойчивости микроорганизмов, в связи с чем возникла необходимость разработки более эффективных средств лечения инфекционных заболеваний. Распространение полирезистентности среди патогенных грибов, в первую очередь, касается представителей рода *Candida*. Так, в Крыму, Украине и России на протяжении последних десятилетий уровень резистентности дрожжеподобных грибов, выделенных от ВИЧ-инфицированных и других пациентов, стал критическим [1-3]. В связи с этим возрос интерес к поиску и терапевтическому использованию натуральных продуктов, способных подавлять жизнедеятельность микроорганизмов [4, 5].

Одна из перспективных групп натуральных продуктов с антимикробными свойствами – сапонины растений. К ним относят гликозиды, образующие пену при смешивании с водой. Сапонины присущи широкое разнообразие биологических эффектов. Некоторые из них рассматривают как потенциальные антибиотики [6, 7]. Примерами таких сапонинов являются стероидные диосгенилы гликозиды, обладающие антибактериальным и антифунгальным действиями [8, 9]. По данным ряда авторов [10], диосгенил 2-амино-2-диокси-β-d-глюкопиранозид гидрохлорид (HSM1) подавляет рост клинических изолятов различных грампозитивных кокков при минимальных ингибирующих концентрациях (МИК) 2-32 мг/л. Антимикробная активность была выявлена и у тритерпеновых сапонинов. Например, гликозиды из *Lecaniodiscus cupanioides* подавляли рост грибов, включая *C. albicans*, при МИК от 10-25 мг/л [11]. В наших предыдущих исследованиях на нескольких штаммах и клинических изолятах *C. albicans* была установлена антифунгальная активность тритерпенового сапонина таурозид Sx1 из крымского плюща *Hedera taurica Carr.* [12].

Цель настоящей работы – сравнительное изучение чувствительности к таурозиду Sx1 и широко применяемым антимикотикам более 100 изолятов грибов разных видов рода *Candida*, выделенных от больных с различной инфекционной и соматической патологией.

Материалы и методы

В работе использовали референс-штаммы *C. albicans* ССМ 885 и *C. albicans* ATCC 885-663 и 104 изолята *Candida spp.*, выделенных в 2000-2008 гг. от здоровых лиц и пациентов, госпитализированных в

больницы Симферополя. От здоровых людей (контрольная группа) было получено 24 изолята, от ВИЧ-инфицированных детей – 34, от пациентов с заболеваниями периодонта – 21, от детей с различной соматической патологией – 14 изолятов, от больных с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки (ЯБДК) – 11.

Выделение и идентификацию грибов проводили по стандартной методике с помощью тест-системы «Auxocolor 2» (BioRad, Франция).

Тритерпеновый сапонин 3-О-α-L-рамнопиранозил (1→2)-α-L-арабинопиранозил-хедеранин (таурозид Sx1) был получен из крымского плюща *Hedera taurica* Carr. (*Araliaceae*) в Таврическом национальном университете им. В.И. Вернадского (Симферополь). Сапонин был любезно предоставлен для изучения профессором В.И. Гришковцом.

Чувствительность грибов к антифунгальным препаратам амфотерицину В, нистатину, итраконазолу, клотримазолу и флюконазолу определяли стандартным методом диффузии в агар в соответствии с рекомендациями производителя дисков (НИЦФ, Санкт-Петербург, Россия).

Минимальные ингибирующие концентрации таурозида Sx1 устанавливали с помощью модифицированного нами метода серийных разведений [13]. Таурозид Sx1 разводили в изотоническом растворе NaCl (ИР) и из него готовили серийные разведения сапонины на среде RPMI-1640 (БиоТ, С. Петербург, Россия) с добавлением 3% лошадиной сыворотки (ППБП, Харьков, Украина), рН 7,2. Каждое разведение сапонины в двух повторностях вносили в ячейки 96-луночных круглодонных микропланшет (Ленмедполимер, Россия).

Грибы выращивали на агаризованной среде Сабуро (Микроген, Россия). Инокуляты готовили путем снятия 1-3 колоний с поверхности агара и ресуспендирования в 5 мл стерильного ИР. Их разводили в среде RPMI-1640 с 3% лошадиной сывороткой до концентрации клеток 3,0-5,0 · 10³ КОЕ/мл.

Инокуляты грибов добавляли к разведениям сапонины в равных количествах до общего объема в 100 мкл и конечных концентраций таурозида Sx1 от 15,6 мг/л до 1000 мг/л. В тест-планшеты вносили контроли роста грибов (грибы в ИР без сапонины) и питательной среды (среда без грибов). Экспериментальные смеси и контроли инкубировали 48 часов при 28 °С и 5% CO₂. МИК определяли путем изъятия из лунок планшета по 10 мкл материала и его пересева на агар Сабуро с последующим инкубированием при 28 °С, 5% CO₂, 48 часов. Минимальной ингибирующей (фунгицидной) концентрацией считали наименьшую концентрацию сапонины, способную полностью подавлять рост микроорганизмов в агаре.

Статистический анализ результатов исследования выполняли с помощью *t*-теста Стьюдента для непарных выборок и определения χ². Достоверными считали различия при значениях *p*<0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изученные изоляты принадлежали к 10 видам грибов: *C. albicans* – 70,2% изолятов, *C. parapsilosis* – 6,7%, *C. dubliniensis* – 5,8%, *C. krusei* – 4,8%, *C. lusitaniae* – 3,8%, *C. tropicalis* – 3,8%, *C. famata* – 1,9%, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* и *C. kefyri* – по 1%. Во всех группах изоля-

тов, полученных от пациентов с различной патологией и здоровых людей, преобладала *C. albicans*. Распределение *C. albicans* и не-*albicans* видов *Candida* в разных группах изолятов было различным (табл. 1).

Таблица 1

Распределение *C. albicans* и не-*albicans* видов *Candida* среди изолятов, полученных от пациентов с различными заболеваниями

Вид	Распределение изолятов по обследованным группам, %				
	Здоровые (контроль) n=24	Заболевания периодонта n=21	ЯБДК n=11	Соматическая патология n=14	ВИЧ n=34
<i>C. albicans</i>	79,16	80,96	45,46	50,00	70,60
<i>C. dubliniensis</i>	4,17	0	0	14,29	8,82
<i>C. famata</i>	0	0	0	0	5,88
<i>C. glabrata</i>	4,17	0	0	0	0
<i>C. guilliermondii</i>	0	0	0	7,14	0
<i>C. kefyri</i>	0	0	0	0	2,94
<i>C. krusei</i>	0	9,52	27,27	0	0
<i>C. lusitaniae</i>	4,17	0	0	0	8,82
<i>C. parapsilosis</i>	8,33	4,76	27,27	7,14	0
<i>C. tropicalis</i>	0	4,76	0	21,43	2,94
Средняя доля не- <i>albicans</i> видов <i>Candida</i>	5,21±1,04	6,35±1,59	27,27±2,12	12,5±3,42	5,88±1,31
Различия с контролем, <i>p</i>	-	0,556	0,002	0,111	0,715

Примечание: *n* - количество людей в группе; ЯБДК - язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки.

У людей из разных групп изоляты отдельных не-*albicans* видов *Candida* выявляли с разной частотой – от полного отсутствия (*C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* и *C. parapsilosis* у ВИЧ-инфицированных) до 27,27% (*C. krusei* и *C. parapsilosis* у больных с ЯБДК). От здоровых и ВИЧ-инфицированных лиц, больных со стоматологической и детской соматической патологией не-*albicans* виды *Candida* обнаруживали в 5,9-12,5% случаев; показатели средней частоты выделения в этих группах не имели существенных различий (*p*>0,05). Доли *C. krusei* и *C. parapsilosis*, изолированных от больных с ЯБДК, были достоверно выше (*p*=0,002). В целом, выявленное нами распределение видов *C. albicans* и не-*albicans* видов *Candida* среди грибов, выделенных от разных категорий пациентов, соответствовало данным, опубликованным другими авторами [2].

В ходе настоящего исследования отмечали выраженную чувствительность клинических изолятов грибов разных видов *Candida spp.* к тритерпеновому сапонину таурозиду Sx1. Этот сапонин ингибировал рост 39,6% изолятов грибов при МИК 125 мг/л, а для 55,5% и 4,9% изолятов значения МИК были 250 мкг/мл и 500 мкг/мл соответственно. В таблице 2 приведены данные по чувствительности к таурозиду Sx1 изолятов грибов, принадлежащих к разным видам *Candida spp.*

Таблица 2

Чувствительность к таурозиду Sx1 изолятов грибов разных видов

№	Виды	Число изолятов	Изоляты (%), для которых МИК сапонины (мг/л) была:			Средние значения МИК (мг/л)
			125	250	500	
1	<i>C. albicans</i>	72	44,4	52,8	2,8	201,4±8,0
2	<i>C. parapsilosis</i>	7	14,3	85,7	0	232,1±17,86
3	<i>C. dubliniensis</i>	6	16,7	66,6	16,7	270,8±50,17
4	<i>C. krusei</i>	5	60,0	40,0	0	175,0±30,62

Таблица 3

5	<i>C. tropicalis</i>	5	20,0	60,0	20,0	275,0±61,24
6	<i>C. lusitaniae</i>	4	25,0	75,0	0	218,8±31,25
7	<i>C. famata</i>	2	0	50,0	50,0	375,0±125
8	<i>C. glabrata</i>	1	100,0	0	0	125
9	<i>C. guilliermondii</i>	1	0	100,0	0	250
10	<i>C. kefyr</i>	1	100,0	0	0	125
	В целом	104	39,4	58,8	4,8	-

Для изолятов 6 видов (таблица 2, №№1-6), число которых позволяло проводить статистические расчеты, средние значения МИК таурозиды Sx1 варьировали в пределах 175-275 мг/л и не имели существенных межвидовых различий ($p > 0,05$). Единичные изоляты остальных 4 видов грибов демонстрировали сходные результаты, за исключением изолятов *C. famata*, средняя МИК для которых была более 350 мг/л.

При анализе полученных результатов мы использовали критерии оценки антифунгальной активности растительных материалов, изложенные в работах [7, 14, 15]. По данным [7], при тестировании новых фармакологически-активных веществ слабыми считают антифунгальные эффекты, характеризующиеся МИК более 1000 мг/л. Вещества с такими свойствами признают «не активными» [14]. Согласно остальным источникам, если МИК вещества, выделенного из растения, не превышает 500 мг/л, его антифунгальную активность можно считать сильной. Если значения МИК продукта находятся в пределах 600-1500 мг/л, его можно отнести к умеренно активным, а если МИК вещества превышает 1600 мг/л – его активность определяют как слабую [14, 15].

В соответствии с этими критериями, таурозид Sx1 обладал выраженным антифунгальным действием в отношении всех изученных изолятов грибов. Если сравнивать таурозид Sx1 с применяемыми в лечебной практике препаратами, можно отметить, что значения МИК таурозиды Sx1 близки к значениям МИК препарата «Экзодерил» (нафтифина гидрохлорид), который используют для местного лечения микозов. Терапевтическое действие этого препарата считают приемлемым, если его МИК в отношении исследуемого изолята составляет 100 мг/л [16]. Учитывая приведенные сведения, мы решили считать чувствительными к таурозиду Sx1 те изоляты грибов, для которых МИК составляла 125-250 мг/л. Изоляты, для которых МИК сапонина была 500 мкг/мл, рассматривали как мало чувствительные. Таким образом, низкую чувствительность к сапонину проявили менее 5% изученных изолятов.

В таблице 3 приведены сравнительные данные по устойчивости изолятов к пяти широко используемым антимикотикам и таурозиду Sx1, чувствительность к которому оценивали по приведенным выше критериям.

Устойчивость изолятов грибов к антимикотикам и таурозиду Sx1

Группы изолятов	Количество устойчивых изолятов, %					
	Нистатин	Амфотерицин В	Итраконазол	Клотримазол	Флуконазол	Таурозид Sx1
Здоровые люди	16,7	20,8	58,3	45,8	58,3	4,2
Стоматологическая патология	19,1	33,3	76,2	52,4	76,2	0
ЯБДК	45,5	27,3	36,4	18,2	27,3	0
Соматическая патология	28,6	28,6	78,6	64,3	64,3	14,3
ВИЧ	50,0	8,8	97,1	79,4	82,4	5,8
Суммарная устойчивость	31,9±6,8	23,8±4,2	69,3±10,3	52,0±10,2	61,7±9,6	4,9±2,6
Различия с таурозидом Sx1, p	0,014	0,005	0,002	0,007	0,002	-

Как видно из таблицы 3, суммарная устойчивость изученных изолятов к клотримазолу, флуконазолу и итраконазолу составляла 52-69%, что является показателем проблематичности перспектив их использования. Исключение составляют только изоляты, полученные от больных с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки. Их устойчивость к препаратам группы азолов не превышала 37%. Наиболее устойчивыми были изоляты грибов, выделенные от ВИЧ-инфицированных пациентов. Их устойчивость к азолам находилась на критическом уровне (79-97%), что соответствовало выводам других авторов [2, 3]. Суммарная устойчивость грибов к амфотерицину В и нистатину была значительно ниже, что служит признаком сохранения терапевтической эффективности у полиеновых антибиотиков. Вместе с тем, выявленная у изолятов, полученных от больных из некоторых групп, устойчивость на уровне 33-50% может означать риск снижения этими препаратами терапевтического потенциала в обозримом будущем. На этом фоне 5%-ная суммарная устойчивость изученных изолятов грибов к таурозиду Sx1, которая была существенно меньше, чем устойчивость по отношению к любому из исследованных антимикотиков ($p = 0,002-0,014$), является показателем перспективности указанного сапонина в плане создания на его основе антифунгального препарата.

ВЫВОДЫ

1. Дрожжеподобные грибы, выделенные в Симферополе от здоровых людей и больных с различной патологией, принадлежали к 10 видам *Candida* spp. Обнаружение *C. albicans* у лиц из разных групп колебалось от 45,5% до 81%, а отдельных не-*albicans* видов *Candida* – не превышало 27,3%.

2. Устойчивость изолятов к антимикотикам находилась на средне-высоком уровне: к полиеновым антибиотикам амфотерицину В и нистатину составляла 23,8% и 31,9% соответственно; к клотримазолу, флуконазолу и итраконазолу была гораздо выше – 52,0%, 61,7% и 69,3% соответственно. Наибольшую устойчивость имели изоляты, полученные от ВИЧ-инфицированных пациентов.

3. Тритерпеновый сапонин таурозид Sx1 из крымского плюща *Hedera taurica* Carr. (*Araliaceae*) обладает выраженным антифунгальным действием. Для 95,1%

изолятов грибов антифунгальный эффект сапонина проявлялся при МИК 125-250 мг/л. Согласно полученным результатам, можно рассматривать таурозид Sx1

как вещество, перспективное в плане создания на его основе нового антифунгального средства.

ЦИТИРУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Криворутченко Ю.Л., Кирсанова М.А., Постникова О.Н., Гришковец В.И. Чувствительность к мирамистину, амфотерицину В и таурозиду Sx1 грибов, выделенных от больных в Крыму// Biomedical and Biosocial Anthropology. – 2010. – Т.15. – С. 144-149.
2. Полищук О.Л., Покас А.В., В'ялих Ж.Е., Василенко Л.Г. та ін. Чутливість до антимікотиків дріжджоподібних грибів, ізольованих від ВІЛ-інфікованих хворих// Мікробіологічний журнал. – 2007. – Т. 69, №3. – С. 37-43.
3. Захарова Ю.В. Характеристика грибов рода *Candida*, изолированных от ВИЧ-инфицированных детей// Успехи медицинской микологии. – М.: Национальная академия микологии. – 2014. – С. 290-292.
4. Saleem M., Nazir M., Ali M.S., Hussain H., at al. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates// Natural Product Reports. – 2010. – Vol. 27. – P. 238-254.
5. Швядене Ю., Папкявичус А., Швядас А. Чувствительность дрожжей рода *Candida* к эфирным маслам// Успехи медицинской микологии. – М.: Национальная академия микологии. – 2014. – С. 436-437.
6. Avijgan M., Hafizi M., Saadat M., at al. Antifungal effect of *Echinophora platyloba*'s extract against *Candida albicans*// Iranian J. of Pharmaceutical Research. – 2006. – №4. – P. 285-289.
7. Sparg S.G., Light M.T., van Staden J. Biological activities and distribution of plant saponins// J. Ethnopharmacol. – 2004. – Vol. 94. – P. 219-243.
8. Ameru A.O., Fawole O.A., Chukwujekwu J.C., at al. In vitro antimicrobial, anthelmintic and cyclooxygenase-inhibitory activities and phytochemical analysis of *Leucosidea sericea*// J. Ethnopharmacol. – 2010. – №131. – P. 22-27.
9. Di Liberto M., Svetaz L., Furlan R.L., at al. Antifungal activity of saponin-rich extracts of *Phytolacca dioica* and of saponins obtained through hydrolysis// Nat. Prod. Commun. – 2010. – №5. – P. 1013-1018.
10. Cirioni O., Myszka H., Dawgul M., at al. In vitro activity and in vivo efficacy of the saponin diosgenyl 2-amino-2-deoxy-β-d-glucopyranoside hydrochloride (HSM1) alone and in combination with daptomycin and vancomycin against Gram-positive cocci// J. Med. Microbiol. – 2011. – Vol. 60, №9. – P. 1337-1343.
11. Adesegun S.A., Coker H.A.B., Hamann M.T. Antifungal triterpenoid saponins from *Lecaniodiscus cupanioides*// Research J. of Phytochemistry. – 2008. – №2. – P. 93-99.
12. Криворутченко Ю.Л., Постникова О.Н., Кирсанова М.А. и др. Воздействие сапонина таурозида Sx1 и мирамистина на дрожжеподобные грибы, вызывающие оппортунистические микозы// Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2011. – Т. 1. – №1(1). – С. 79-84.
13. Кирсанова М.А. Модификация метода определения чувствительности дрожжеподобных грибов рода *Candida* к антифунгальным препаратам// Таврический медико-биологический вестник. – 2007. – Т. 10, №3. – С. 157-159.
14. Duarte M.C.T., Figueira G.M., Sartoratto A., at al. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants// J. Ethnopharmacol. – 2005. – Vol. 97. – P. 305-311.
15. Tsuzuki J.K., Svidzinski T.I.E., Shinobu C.S., at al. Antifungal activity of extracts and saponins from *Sapindus saponaria* L.// An. Acad. Bras. Cienc. – 2007. – Vol. 79. – P. 577-583.
16. Михайлец Н.В., Святенко Т.В. Рациональные подходы к выбору местного антимикотического средства// Український журнал дерматології, венерології, косметології. – 2010. – Т. 36., №1. – С. 70-75.

Поступила в редакцию журнала 23.06.2015

Рецензент: Н.П. Елинов



ХАРАКТЕРИСТИКА БИОПРОФИЛЕЙ *CANDIDA* *ALBICANS*, ВЫДЕЛЕННЫХ У ЗДОРОВЫХ ЛИЦ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Пашинина О.А. (с.н.с.), Карташова О.Л. (зав. лаб.),
Пашкова Т.М. (с.н.с.), Попова Л.П. (с.н.с.)*

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО
РАН, Оренбург, Россия

© Коллектив авторов, 2015

Изучали биологические свойства *Candida albicans* различной локализации, выделенных у здоровых лиц и лиц с инфекционно-воспалительной патологией. Определены биопробы, характеризующие патогенные и непатогенные изоляты. Штаммы, выделенные при патологии, чаще характеризовались фосфолипазной активностью и персистентными свойствами с более высокими значениями признаков, в то время как у штаммов, изолированных от здоровых лиц, значительнее выражена антиоксидантная активность. Полученные результаты могут быть использованы для дифференциации патогенных вариантов *C. albicans* от штаммов, входящих в состав нормальной микрофлоры.

Ключевые слова: биологические свойства, дифференциация, *Candida albicans*

CHARACTERISTIC OF *CANDIDA ALBICANS* BIOPROFILES ALLOCATED FROM HEALTHY SUBJECTS AND IN PATHOLOGY

Pashinina O.A. (senior scientific collaborator),
Kartashova O.L. (head of the laboratory), Pashkova
T.M. (senior scientific collaborator), Popova L.P.
(senior scientific collaborator)

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch of
Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russia

© Collective of authors, 2015

Biological properties of *Candida albicans* of different localization, isolated from healthy individuals and those with infectious and inflammatory diseases have been studied. Bioprofiles, characterizing pathogenic and non-pathogenic isolates were defined. Strains isolated in pathology, usually characterized by the phospholipase activity and persistent properties with higher values, while the strains isolated from healthy individuals, expressed significant antioxidant activity. The results can be used to differentiate pathogenic variants of *C. albicans* from the representatives of the normal microbiota.

Key words: biological properties, *Candida albicans*, differentiation

ВВЕДЕНИЕ

Дрожжеподобные грибы рода *Candida*, являясь комменсалами, обитающими в пищеварительном или/и дыхательном и урогенитальном трактах, а также на поверхности кожи, могут вызывать развитие заболеваний [1, 2]. В связи с ростом инфекций, вызываемых *C. albicans*, необходим поиск новых способов дифференциации нормальной микрофлоры от этиологических агентов, способных вызывать развитие патологических процессов, в основе которых лежит выявление качественных признаков, характерных для патогенных микроорганизмов. В последние годы у *Candida* spp. широко изучают способность к инактивации факторов естественной резистентности организма хозяина [3-5]. Установлено значение комплекса факторов персистенции *C. albicans* при хроническом течении инфекционно-воспалительного процесса [6].

Однако комплекс биологических, в том числе вирулентных и персистентных свойств (биопробы) грибов, выделенных у здоровых лиц и лиц с инфекционно-воспалительной патологией, охарактеризован не достаточно полно. В этой связи представлялось целесообразным изучить биопробы грибов разной локализации, изолированных у здоровых лиц и при патологии, а также выявить наиболее информативные характеристики для дифференциальной идентификации патогенных и непатогенных штаммов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучали 211 штаммов *C. albicans*, в том числе – 29, выделенных из зубодесневых карманов от больных катаральным гингивитом; 47 – с заднего свода влагалища страдающих сальпингоофоритом женщин; 54 – из мокроты больных бронхитом, 37 – из фекалий пациентов с дисбиозом кишечника I-III степени. Штаммы были получены из бактериологической лаборатории ЦРБ Оренбургского района Оренбургской области и лаборатории дисбиозов ИКВС УрО РАН, а также выделены с заднего свода влагалища при профилактическом осмотре клинически здоровых женщин, из фекалий и со слизистой оболочки ротовой полости клинически здоровых лиц (44 штамма).

Выделение и идентификацию штаммов *C. albicans* проводили по Р.Н. Ребровой (1989).

Культуры изучали на наличие факторов патогенности и персистенции. Каталазную и гемолитическую активности определяли по Биргер М.О. (1982), лизоцимную – по Ленцнер А.А. с соавт. (1975), способность образовывать биопленки (БПО) – по O'Toole G. с соавт. (2000), липолитическую активность (ЛЛА) – по [7]. Фосфолипазную активность (ФЛА) устанавливали согласно Богомоловой Т.С. (1990), рассчитывали показатель фосфолипазной активности ($K_{ФЛА}$), равный отношению диаметра зоны помутнения среды к диаметру колонии, который выражали в условных единицах. Антиоксидантную активность (АОА) грибов определяли амперометрическим методом на анализаторе «ЦветЯуза – ААА – 01» (НПО «Химвавтоматика», Москва) по [8] и выражали в единицах кверцетина (ед. кв.). Персистентные свойства изучали фотометрическим (антилизоцимную активность (АЛА) – по Бухарину О.В. с соавт., 1999) и иммуноферментными методами: sIgA – протеазная активность по Бухарину О.В. с соавт. (2004), антилактоферриновая активность (АЛФА) – по [9].

* Контактное лицо: Попова Лидия Петровна,
Тел.: 8 (3532) 77-44-63

Результаты обрабатывали статистически общепринятыми методами вариационной статистики с использованием программ Excel и Биостатистика.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Нами определен биофильс *C. albicans*, выделенных у здоровых лиц с заднего свода влагалища (1 группа, $n = 17$), из фекалий (2 группа, $n = 15$), со слизистой оболочки ротовой полости (3 группа, $n = 12$), а также культур грибов, изолированных у больных сальпингоофоритом (4 группа, $n = 47$), пациентов с дисбиозом кишечника (5 группа, $n = 37$), больных бронхитом (6 группа, $n = 54$), больных катаральным гингивитом (7 группа, $n = 29$).

В результате проведенных исследований установлено наличие каталазной и антиоксидантной активностей, а также отсутствие лизоцимной активности и способности гемолизировать эритроциты у всех выделенных штаммов.

Штаммы, обладающие ФЛА, выявляли только у лиц с патологией в 37,5-58,8% случаев. Липолитической ак-

тивностью штаммы *C. albicans* 1, 2 и 3 групп характеризовались в 90,1%, 89% и 86% случаев; штаммы, выделенные при патологии – в 76,5%, 65,8%; 74,1%; 86,2% случаев соответственно. Способностью к образованию биопленок обладали 100% *C. albicans* 4 и 5 групп, а 1 и 2 групп – в 92% и в 78% случаев. Напротив, *C. albicans*, изолированные у здоровых лиц со слизистой оболочки ротовой полости, в 43% случаев образовывали биопленки, тогда как, изолированные от лиц с патологией – в 25% ($p < 0,05$). При сопоставлении результатов частоты встречаемости изученных персистентных свойств установили, что *C. albicans*, выделенные при патологии, в 100% случаев характеризовались способностью к инактивации факторов естественной резистентности организма (АЛА, АЛФА, sIgA-протеазная активность), в отличие от штаммов, полученных от здоровых лиц (Рис. 1). Далее у всех выделенных штаммов оценивали уровень выраженности персистентных характеристик, антиоксидантной активности, способности к образованию биопленок и коэффициент фосфолипазной активности (Рис. 2).

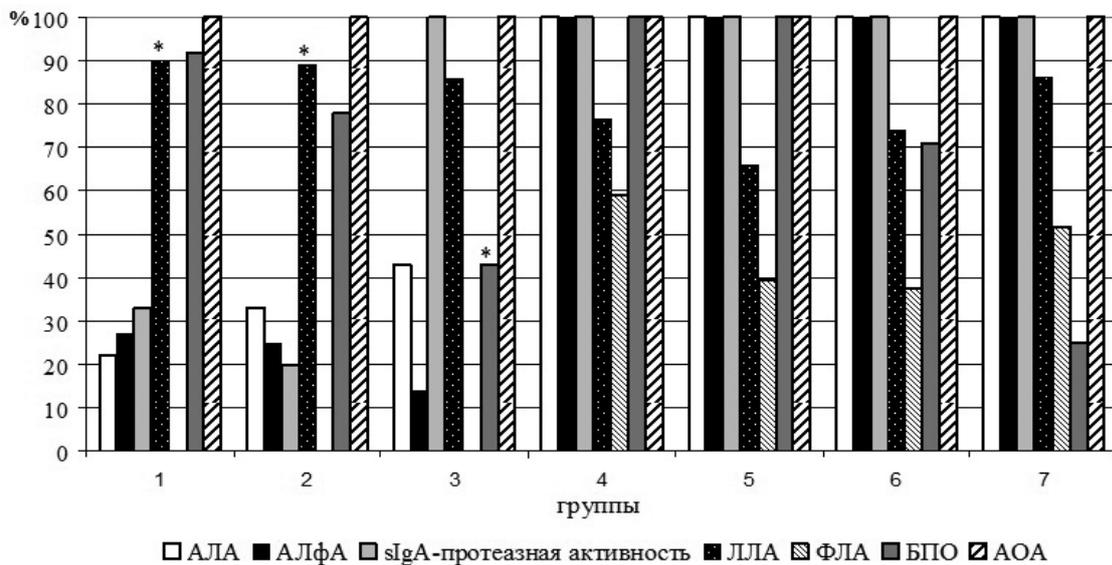


Рис. 1. Распространенность биологических свойств *C. albicans*, выделенных у здоровых лиц и при патологии. * $p < 0,5$ – уровень значимости различий между соответствующими группами у здоровых лиц и при патологии

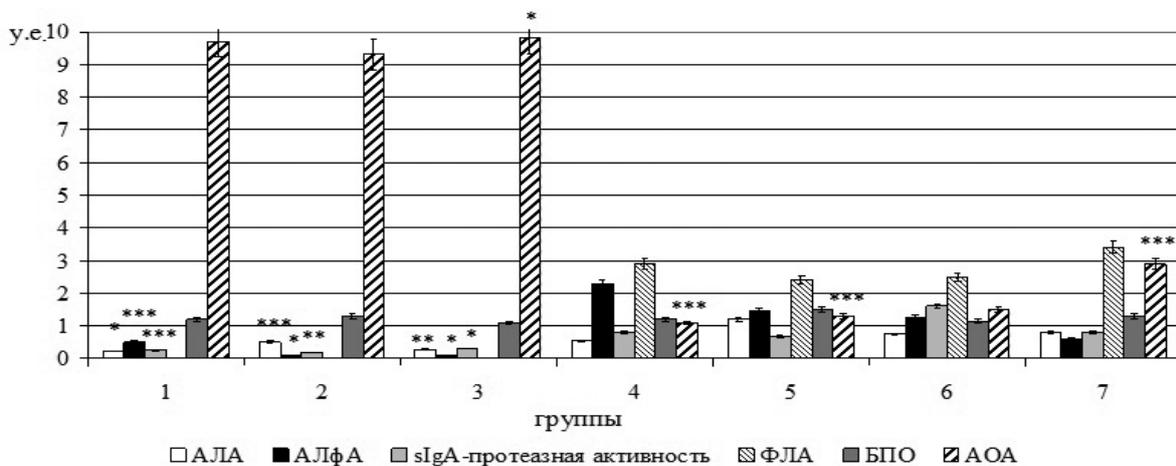


Рис. 2. Выраженность биологических свойств *C. albicans*, выделенных у здоровых лиц и при патологии. * $p < 0,5$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,005$ – уровень значимости различий между соответствующими группами у здоровых лиц и при патологии

Среднее значение АЛА у *C. albicans* 4, 5, 6 и 7 групп составило $0,53 \pm 0,3$; $1,2 \pm 0,06$; $0,7 \pm 0,08$; $0,8 \pm 0,1$ мкг/мл*ОП соответственно. Максимальную экспрессию АЛФА у *C. albicans*, выделенных при патологии, отмечали у изолятов 4 группы ($228,8 \pm 26,83$ нг/мл), у штаммов 5 группы она составляла $147,0 \pm 26,1$ нг/мл, у 6-ой – $127,5 \pm 24,3$ нг/мл, у 7-ой – $60,1 \pm 13,51$ нг/мл. sIgA-протеазная активность у *C. albicans* 4 группы была равна $0,8 \pm 0,042$ мкг/мл; 5-ой – $0,7 \pm 0,04$ мкг/мл; 6-ой – $1,6 \pm 0,05$ мкг/мл; 7-ой – $0,8 \pm 0,038$ мкг/мл.

Значительно реже способностью к инактивации факторов естественной резистентности организма обладали штаммы, изолированные от здоровых лиц. Причем выраженность признаков была ниже, чем данные показатели у грибов, выделенных при патологии.

Так, АЛА обладали 22% штаммов 1 группы, 33% – 2 группы, 43% – 3 группы, средние значения признака составляли $0,2 \pm 0,07$; $0,5 \pm 0,03$; $0,3 \pm 0,01$ мкг/мл*ОП соответственно.

Способность к инактивации лактоферрина была выявлена у 27% изолятов *C. albicans* 1 группы с выраженностью признака 50 ± 5 нг/мл, у 25% штаммов 2 группы (среднее значение АЛФА 10 ± 3 нг/мл) и у 14% изолятов 3 группы (10 ± 3 нг/мл).

sIgA-протеазной активностью в 38% случаев характеризовались *C. albicans*, выделенные из ротовой полости, в 33% – из репродуктивного тракта, в 20% – из кишечника. Выращенность признака составляла в 1 группе $0,3 \pm 0,08$ мкг/мл, во 2-ой – $0,2 \pm 0,08$ мкг/мл, в 3-ей – $0,3 \pm 0,01$ мкг/мл.

Различия между значениями выраженности факторов персистенции грибов, полученных от здоровых лиц и лиц с патологией, были статистически значимы.

При анализе выраженности АОА грибов выявили обратную закономерность: *C. albicans*, выделенные от здоровых лиц, имели высокие значения признака: $9,8 \pm 3,8$ ед. кв. – у изолятов из ротовой полости, $9,3 \pm 2,3$ ед. кв. – у фекальных изолятов и $9,7 \pm 2,7$ ед. кв. – у изолятов из репродуктивного тракта; напротив, АОА у *C. albicans* 4 группы составляла $1,1 \pm 0,1$ ед. кв., 5-ой – $1,3 \pm 0,2$ ед. кв., 6-ой – $1,5 \pm 0,1$ ед. кв., 7-ой – $2,9 \pm 0,2$ ед. кв. ($p < 0,05$).

Вместе с тем, не отмечали существенных различий между изученными изолятами по способности образовывать биопленки: $1,2 \pm 0,02$ усл. ед. у штаммов 1 группы против $1,2 \pm 0,06$ усл. ед. у штаммов 4 группы; $1,3 \pm 0,052$ усл. ед. (2 группа) против $1,5 \pm 0,3$ усл. ед. (5 группа); $1,1 \pm 0,01$ усл. ед. (3 группа) против $1,3 \pm 0,4$ усл. ед. (7 группа) ($p > 0,05$); значение признака у штаммов 6 группы составляло $1,2 \pm 0,1$ усл. ед.

При анализе выраженности фосфолипазной активности *C. albicans* обнаружили, что $K_{\text{ФЛА}}$ в группах штаммов, изолированных при патологии, нарастал в ряду: кишечник ($2,4 \pm 0,2$ усл. ед.); респираторный тракт ($2,5 \pm 0,1$ усл. ед.); репродуктивный тракт ($2,9 \pm 0,3$ усл. ед.); ротовая полость ($3,4 \pm 0,3$ усл. ед.).

В результате проведенных исследований выявили биологические свойства, по которым изученные группы штаммов различались между собой. Так, грибы, выделенные при патологии, обладали фосфолипазной

активностью и изученными факторами персистенции с более высокими значениями признаков, в то время как у штаммов, полученных от здоровых лиц, значительно выражена антиоксидантная активность.

ОБСУЖДЕНИЕ

Candida sp., выделенные от пациентов, часто являются вторичными инфекционными агентами,отягчающими течение заболевания на фоне первичного патологического процесса. Они проявляют свою патогенность в случае достижения численности популяцией определенного порогового значения, при котором срабатывает «чувство кворума», запуская экспрессию специфических генов, обеспечивающих реализацию патогенного и персистентного потенциала *Candida sp.*

В связи с двойственной природой *Candida sp.* возникает необходимость дифференциации патогенных штаммов *C. albicans* от штаммов, входящих в состав нормобиоты.

При анализе фенотипического проявления факторов патогенности у *C. albicans*, выделенных при патологии, установлена высокая распространенность фосфолипазной активности, в отличие от штаммов, изолированных от здоровых лиц, у которых данный признак не регистрировали. Эти данные согласуются с другими исследованиями, в частности [10], в которых была показана диагностическая значимость данного свойства, позволяющего различать штаммы грибов по степени их патогенности.

Наличие липолитической активности у штаммов, выделенных как от здоровых лиц, так и при патологии объясняется, по-видимому, тем, что липолитические ферменты используются грибами для расщепления жиров на глицерин и жирные кислоты, которые в дальнейшем включаются в обмен веществ.

Все штаммы *C. albicans*, выделенные при патологии, обладали набором факторов персистенции с высоким уровнем выраженности признаков, тогда как штаммы, полученные от здоровых лиц, значительно реже характеризовались способностью к инактивации факторов естественной резистентности организма, а выраженность признаков была значительно ниже. Ранее рядом исследователей установлена возможность использования персистентных свойств бактерий для дифференциации нормальной микробиоты от возбудителей инфекционно-воспалительного процесса [11, 12].

Полученные нами данные о высоком уровне выраженности антиоксидантной активности у грибов, изолированных от здоровых лиц, в сравнении со штаммами, выделенными при патологии, подтверждают мнение Шендерова Б.А. о том, что нормальная микробиота вносит существенный вклад в поддержание окислительно-восстановительного баланса организма (2001).

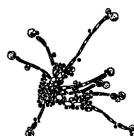
Совокупность выявленных информативных параметров может быть использована для дифференциации патогенных вариантов *C. albicans* различной локализации от штаммов, входящих в состав микробиоты.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Мамедова Л.Р., Караев З.О. Этиологическая характеристика нозокомиальных инфекций мочевыводящих путей// Проблемы медицинской микологии. – 2010. – Т. 12, №3. – С. 13-14.
2. Кузьмина Д.А., Новикова В.П., Шабашова Н.В. и др. *Candida* spp. и микробиоценоз полости рта у детей с декомпенсированной формой кариеса// Проблемы медицинской микологии. – 2011. – Т. 13, №1. – С. 23-27.
3. Свиридов М.А., Долгушин И.И., Карташова О.Л. Оценка персистентных характеристик *Candida albicans*// Медицинская наука и образование Урала. – 2008. – №4. – С. 104-105.
4. Четвертнова Г.А., Куркина О.Н. Факторы, способствующие персистенции микрофлоры в полости рта при аномалии положения зубов// Актуальные вопросы экспериментальной, клинической и профилактической стоматологии. – 2006. – Т. 63, вып.1. – С. 110-112.
5. Капустина О.А., Чайникова И.Н., Карташова О.Л. Видовая характеристика и факторы персистенции грибов рода *Candida*, выделенных из разных биотопов при инфекционно-воспалительных заболеваниях и дисбиозе кишечника// Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2012. – №4. – С. 37-41.
6. Пашинина О.А., Карташова О.Л., Уткина Т.М. и др. Характеристика биологических свойств клинических изолятов *Candida albicans*// Проблемы медицинской микологии. – 2014. – Т. 16, №3. – С. 91-93.
7. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. и др. Практикум по микробиологии. – М.: Академия, 2005. – 608 с.
8. Яшин А.Я. Инжекционно-проточная система с амперометрическим детектором для селективного определения антиоксидантов в пищевых продуктах и напитках// Российский химический журнал. – 2008. – №2. – С. 130-135.
9. Бухарин О.В., Вальшев А.В., Чайникова И.Н. и др. Способ определения антилактоферриновой активности микроорганизмов. Патент РФ на изобретение № 2245923. Бюл. № 4 от 10.02.2005.
10. Карпунина Т.И., Олина А.А., Машуров М.Г. и др. Фосфолипаза оппортунистических грибов: их возможная роль в патогенезе и диагностике микозов// Проблемы медицинской микологии. – 2006. – Т. 8, №4. – С. 41-46.
11. Карташова О.Л., Норкина А.С., Чайникова И.Н. и др. Фенотипическая характеристика стафилококков и местный иммунитет при бактерионосительстве// Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2009. – №4. – С. 99-103.
12. Иванов Ю.Б., Черкасов С.В., Кузьмин М.Д. и др. Способ дифференциации микрофлоры урогенитального тракта человека. Патент РФ на изобретение № 2260054. Бюл. № 25 от 10.09.2005.

Поступила в редакцию журнала 19.03.2015

Рецензент: Е.П. Баранцевич



РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И КЛИНИКО-МИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕРМАТОМИКОЗОВ В АЗЕРБАЙДЖАНЕ

¹Ахмедова С.Д. (ассистент кафедры)*, ¹Амирова И.А. (профессор кафедры), ²Агаева Н.А. (доцент кафедры)

Азербайджанский медицинский университет: ¹кафедра дерматовенерологии, ²кафедра микробиологии и иммунологии, Баку, Азербайджан

© Коллектив авторов, 2015

Проведен анализ заболеваемости микозами кожи и ее придатков в зависимости от возраста, ассоциации с соматическими заболеваниями, профессиональной деятельности, а также представлена характеристика поражений в виде изолированных и сочетанных форм дерматомикозов с помощью культуральной и микроскопической диагностики.

Ключевые слова: антропофильные грибы, дерматомицеты, *Epidermophyton Microsporum*, мицелий, *Trichophyton*

OCCURENCE AND CLINICO-MYCOLOGICAL CHARACTERISTICS OF DERMATOMYCOSES IN AZERBAIJAN

¹Ahmedova S.D. (assistant of the chair), ¹Amirova I.A. (professor of the chair), ²Aghayeva N.A. (associate professor of the chair)

Azerbaijan Medical University: ¹Chair of dermatology, ²Chair of microbiology and immunology, Baku, Azerbaijan

© Collective of authors, 2015

There was held an analysis of morbidity of mycoses of skin and its appendages depending on the age, on association with somatic diseases, on professional activity. Characteristic of damages as isolated and mixed forms of dermatomycoses with the help of cultural and microscopic diagnostics is presented.

Key words: anthropophilic fungi, dermatomycetes, *Epidermophyton*, *Microsporum*, mycelium, *Trichophyton*

ВВЕДЕНИЕ

Дерматомикозы в настоящее время являются одной из актуальных проблем здравоохранения. При статистическом анализе заболеваемости дерматомикозами за последнее десятилетие выявили, что число грибковых заболеваний во всем мире ежегодно возрастает. Распространенность микозов кожи в популяции, по различным данным, приближается к 10% [1]. Однако проблемы, связанные с дерматомикозами, не ограничиваются только ростом заболеваемости. Количество грибов, идентифицированных при этих заболеваниях, также увеличивается. Своевременная диагностика грибковых поражений кожи связана со значительными трудностями. Правильный диагноз распространенного микотического поражения удастся поставить лишь в 15-40% случаев [2,3].

Патологический материал из пораженных очагов должен быть исследован и идентифицирован микроскопически и культурально, так как выбор противогрибковой терапии для каждого больного, прежде всего, зависит от результатов идентификации грибов-возбудителей и определения чувствительности выявленного гриба к конкретному препарату.

Дерматомицеты – одна из основных групп патогенных для человека грибов. Они представлены 39 видами, объединенными в роды *Trichophyton*, *Microsporum* и *Epidermophyton*. Кератин, входящий в состав рогового слоя эпидермиса, ногтей, волос, является основным источником питания, необходимым для существования, размножения и роста антропофильных дерматомицетов (*T. rubrum*, *T. interdigitale*). Животные и птицы – среда обитания для зоофильных дерматомицетов (*M. canis*, *M. distortium*, *T. equinum*, *T. mentagrophytes* var. *erinacei*, *T. mentagrophytes* var. *gypseum*, *T. verrucosum*). Некоторые виды зоофильных дерматомицетов паразитируют в коже, волосах и ногтях человека, их относят к зооантропофильным дерматомицетам. Небольшую группу дерматомицетов, обитающих в почве, составляют геофильные дерматомицеты [4].

Несмотря на многочисленные исследования дерматомикозов, до сих пор сложной проблемой являются сочетанные формы микозов (микст-инфекции), создающие дополнительные трудности для диагностики и лечения [5, 6]. Не ясна роль микст-микробиоты, выделяемой из очагов поражения, в патогенезе и распространении этой группы заболеваний. Решающее значение в диагностике микозов, вызванных дерматомицетами, имеют микроскопическое исследование патологического материала, взятого из очагов поражения, культуральное исследование и идентификация выделенных возбудителей [4].

Цель нашего исследования – изучение особенностей распространения дерматомикозов среди различных групп населения в Азербайджане, их клиническая характеристика, а также совершенствование методов диагностики и профилактики микотических поражений кожи с помощью культуральной и микроскопической диагностики.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проанализировали заболеваемость поверхностными микозами кожи в г. Баку за период с 2013 по 2014 гг., по данным формы государственного статистического наблюдения № 9 («Сведения о заболеваниях, пере-

* Контактное лицо: Ахмедова Сабина Джувановна, email: doc.sabina@mail.ru

даваемых преимущественно половым путем, грибковых кожных заболеваниях и чесотке»), утвержденной постановлением Азербайджанской Государственной Статистической комиссии от 04.12.2000 г. № 72/5.

За этот период в Республиканский кожно-венерологический диспансер (базу Азербайджанского медицинского университета) обратились 153 пациента с микотическими поражениями волосистой части головы и гладкой кожи в возрасте от 18 лет и старше. В стационаре инфекционного отделения Детского кожно-венерологического диспансера №3 г. Баку было зарегистрировано 126 детей в возрасте от 3 до 18 лет, страдающих трихомикозами, а также сочетанными формами трихомикозов и гладкой кожи.

Обследовали и наблюдали 48 больных с дерматомикозами в возрасте от 3 до 80 лет, в том числе: от 3 до 10 лет – 8 человек (17%), от 11 до 18 лет – 18 (38%), от 19 до 26 лет – 12 (25%), свыше 26 лет – 10 (20%). 19 пациентов – жители сельской местности, старше 18 лет, занимающиеся, главным образом, скотоводством; 29 человек – представляли городской контингент в младшей и взрослой возрастных группах.

Всем больным было проведено клиническое и микологическое обследование, включавшее микроскопическое и культуральное исследования образцов патологического материала из очагов поражения. При сквамозной форме микоза гладкой кожи изучали мукосидные чешуйки из кожных борозд, взятые в результате поскабливания; при дисгидротической форме микотического поражения кистей и стоп брали пробы с отслаивающегося эпидермиса по периферии очагов; при поражении ногтей пластинок роговые массы скабливали скальпелем; при трихомикозах исследовали волосы, взятые из очагов поражения. Далее посев материала производили на среду Сабуро и инкубировали при 28 °С в течение 7-15 дней в аэробных условиях. Выделенные культуры идентифицировали до вида.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В младшей возрастной группе от 3 до 10 лет клинически диагностировали и подтвердили лабораторными микологическими исследованиями диагноз кандидоза кожи (крупных складок) у 6 пациентов, у двух – выявили микроспорию гладкой кожи в ассоциации с плесневыми грибами *Cladosporium* sp., *Phialophora* sp.

В возрастной группе от 11 до 18 лет у всех 18 больных был клинически диагностирован, а также микроскопически и культурально подтвержден диагноз микоза (возбудители: *Microsporium audouinii*, *Trichophyton interdigitale*, *T. verrucosum*, *T. violaceum*) как в виде моноинфекции – у 6 человек, так и в форме сочетанной микст-инфекции (в сочетании с *Cladosporium* sp., *Phialophora* sp.) – у 12. В этой возрастной группе наблюдали инфильтративно-нагноительную форму микоза волосистой части головы, анамнестически связанную с занятиями подростков в спортивных секциях контактными видами спорта.

В возрастной группе от 19 до 26 лет у всех больных клинически диагностирован и микологически подтвержден диагноз микоза (возбудители: *T. verrucosum* – у 4 пациентов, *T. mentagrophytes*, *Phialophora* sp., *T. interdigitale*, *Cladosporium* sp. – у 8). Как и в предыдущей возрастной группе, анамнестически этот факт также был связан с занятиями в спортивных секциях кон-

тактными видами спорта.

В возрастной группе старше 26 лет у 10 больных отмечали изолированные формы микоза кожи и ее придатков, включая кандидоз ногтей пластин, рубромикоз кожи. Из них у 3-х пациентов микоз стоп и кистей сочетался с сахарным диабетом, был ассоциирован с избыточным весом; у 3-х человек кандидоз ногтей пластинок был связан с профессиональными особенностями (игрой на фортепиано, работе с ногтями пластинками в косметологических салонах).

Давность заболевания в возрастных группах от 3 до 18 лет варьировала от 1 до 3 месяцев, в старших возрастных группах – от 1 до 6 месяцев. У 23 больных кожное поражение носило распространенный характер. Очаги имели эритематозно-сквамозный характер, были с четкими полициклическими очертаниями, увеличивались в размере за счет периферического роста, независимо от места расположения на гладкой коже или на волосистой части головы.

Сведения об этиологической структуре дерматомикозов, в зависимости от локализации инфекционного процесса, у пациентов в г. Баку представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Клинико-микологическая характеристика больных дерматомикозами (n=48)

Клиническая форма дерматомикоза	Количество больных (%)	Возбудители
Микоз волосистой части головы	4 (8,4%)	<i>Trichophyton violaceum</i>
	5 (10,1%)	<i>Microsporium audouinii</i>
	6 (12,5%)	<i>Trichophyton</i> spp. + <i>Cladosporium</i> sp.
	Всего: 15 (31%)	
Микоз гладкой кожи	4 (8,4%)	<i>Trichophyton rubrum</i>
	5 (10,1%)	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> + <i>Phialophora</i> sp.
	2 (4,5%)	<i>Microsporium audouinii</i> + <i>Cladosporium</i> sp. + <i>Phialophora</i> sp.
	Всего: 11 (23%)	
Сочетанный микоз волосистой части головы и гладкой кожи	6 (12,6%)	<i>Trichophyton interdigitale</i> + <i>Cladosporium</i> sp. + <i>Phialophora</i> sp.
	4 (8,4%)	<i>Trichophyton verrucosum</i>
	Всего: 10 (21%)	
Микоз крупных складок кожи	6 (12,6%)	<i>Candida albicans</i>
Микоз стоп и кистей	3 (6,2%)	<i>Trichophyton rubrum</i>
Онихомикоз	3 (6,2%)	<i>Candida albicans</i>
Итого:	48 (100%)	

Среди 15 (31%) обследованных больных с микозом волосистой части головы клинический диагноз «поверхностная трихофития волосистой части головы (*Trichophytia superficialis capitis*), обусловленная *T. violaceum*», был микологически подтвержден у 4 (8,5%) пациентов. Клиническая картина заболевания представляла собой бледно-красноватые очаги с синюшным оттенком и шелушением на поверхности.

Микроспория волосистой части головы (*Microsporia capillitii*), вызванная *M. audouinii*, подтверждена у 5 (10,5%) больных. В очагах поражения отмечали сплошное поражение волос, которые как бы подстрижены на одном уровне (обламываются на 5-8 мм от общего уровня кожи).

У 6 (12%) обследованных лиц с инфильтративно-нагноительным процессом на волосистой части головы (*kerion Celsii*) микологически были верифицированы возбудители *Cladosporium* sp. и *Trichophyton* spp. Очаги поражения были резко очерченные, гиперемии-

рованные, значительно инфильтрированные, покрытые большим количеством гнойных, сочных корок. После снятия корок патологический процесс приобрел характер «фолликулярного абсцесса» (Рис.1).



А



Б

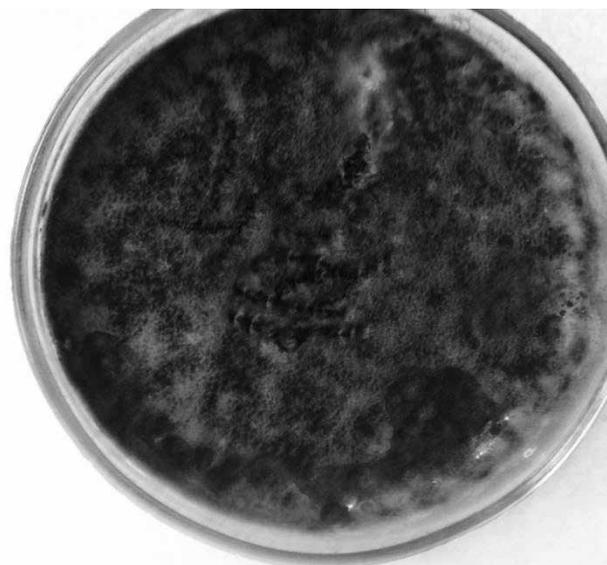
Рис. 1. Поражение волосистой части головы у школьника 16 лет (фото А); занимается контактным видом спорта (айкидо). 3 месяца назад заметил болезненные высыпания на волосистой части головы. Обратился по месту жительства, откуда был направлен в детский кожно-венерологический диспансер №3. Субъективно – болезненность. При посеве обнаружили *Cladosporium* sp. (фото Б).

Из 11 (23%) обследованных лиц с изолированным микотическим поражением гладкой кожи у 4 (8,4%) микологически подтвержден возбудитель *T. rubrum*, в 2-ух случаях (4,5%) из младшей возрастной группы – микроспория в виде микст-инфекции (*M. audouinii* + *Cladosporium* sp. + *Phialophora* sp.), а в 5 (10,1%) случаях верифицировали сочетание двух возбудителей (*T. mentagrophytes* и *Phialophora* sp.). Патологический процесс протекал в виде фолликулярно-узловой (глубокой) формы с преимущественным поражением голеней, ягодиц и предплечий. Поверхность очагов была бурого цвета, отмечали нерезкую инфильтрацию, шелушение. Края очагов имели фестончатый валик, на котором

располагались папулы и корочки (Рис. 2).



А



Б

Рис. 2. Поражение гладкой кожи (фото А) у пациентки 20 лет. Занимается сельским хозяйством; болеет 8 месяцев, высыпания на нижних конечностях появились после травмы, были единичными, а затем стали сливаться. Субъективно – зуд. При посеве получен рост *Phialophora* sp. (фото Б)

Из 10 (21%) пациентов с сочетанным микотическим поражением волосистой части головы и гладкой кожи у 6 (13%) микологически верифицировали микст-микобиоту из трех возбудителей (*T. interdigitale*, *Cladosporium* sp., *Phialophora* sp.). Очаги поражения были хорошо очерчены, несколько приподняты над уровнем кожи, округлых очертаний, имели по краям небольшой валик узловатого характера, на котором были мелкие пузырьки и корочки. В центре очага отмечали разрешение, субъективно – нерезкий зуд. У остальных 4 (8%) больных микологически подтверждено микотическое поражение в виде моноинфекции (возбудитель – *T. verrucosum*). Патологический процесс носил крупноочаговый характер. По периферии

очагов располагались пузырьки, пустулы, корочки. Пораженные волосы в очагах вовлекались в процесс не сплошь, а имело место поредение волос. Субъективные жалобы отсутствовали.

У 6 (13%) пациентов в младшей возрастной группе с микозом крупных складок кожи (*Tinea cruris*) микологически верифицировали возбудитель *Candida albicans*. Очаги поражения локализовались в паховых складках, на внутренней поверхности бедер, лобке, в подмышечных складках, в области молочных желез. Патологический процесс характеризовался эритематозными, воспалительными пятнами с мацерированной, покрытой белым налетом поверхностью и приподнятым отечным краем. Больных субъективно беспокоил зуд.

Микоз стоп и кистей (*tinea pedis et manum*) диагностировали у 3 (6%) человек (этиологический агент – *T. rubrum*). При этом кожа подошв и ладоней имела застойно-гиперемированный фон, на котором отмечали усиленное ороговение в виде гиперкератоза и отрубевидное шелушение. Рисунок кожных борозд был усилен.

Онихомикозы (*onychomycosis, tinea unguium*) в качестве моноинфекции выявляли не всегда, их возник-

новение, как правило, было связано с профессиональными особенностями. Был характерен гипертрофический тип поражения ногтевых пластинок. Начальные изменения – в виде желтых пятен и полос у свободного ногтевого края, а затем вся пластинка утолщалась, приобретала охряно-желтую окраску, крошилась, под ней отмечали скопление роговых масс. В нашем исследовании у 3 (6%) пациентов с онихомикозом микологически верифицировали возбудитель *C. albicans*.

На основании вышеизложенного, можно заключить, что из 48 пациентов с дерматомикозами у 29 (60,5%) микоз диагностирован в виде моноинфекции, в ассоциации с *Cladosporium* sp., *Phialophora* sp. – у 19 (39,5%) наблюдаемых лиц.

Сочетание нескольких возбудителей при микозе кожи и ее придатков обуславливает нетипичность течения заболевания, затрудняет правильную постановку диагноза, так как проведение неполноценного микологического исследования способствует ошибкам в диагностическом процессе и приводит к неэффективности лечения дерматомикозов. По нашему мнению, эти факторы могут быть причиной упорного течения дерматомикоза, а также резистентности к проводимой антифунгальной терапии стандартными препаратами.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Лукашева Н.Н. Особенности клинической диагностики дерматофитий// *Сов. Мед. (Дерматология)* – 2007. – №2. – С. 24-28.
2. Елинов Н.П., Васильева Н.В., Разнатовский К.И. Дерматомикозы или поверхностные микозы кожи и ее придатков – волос и ногтей. Лабораторная диагностика // *Проблемы мед. микологии.* – 2008. – Т. 10, №1. – С. 27-34.
3. Белоусова Т.А., Горячкина М.В., Грязева Т.М. Принципы наружной терапии дерматозов сочетанной этиологии// *Сов. Мед. (Дерматология).* – 2011. – №2. – С. 16-20.
4. Елинов Н.П. Дерматомицеты (Лекция). Учебное пособие. – СПб: КОСТА, 2010. – 48 с.
5. Shoham S. and Levitz S.M. The immune response to fungal infections// *British J. of Immun.* – 2005. – №129. – P. 569-582.
6. Brown G.D., Netea M.G., et al. Immunology of Fungal infections. – London, 2007. – P. 481.

Поступила в редакцию журнала 14.08.2015

Рецензент: Т.С. Богомолова



СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА НЕКОТОРЫХ АНТИСЕПТИКОВ, ПОЛУЧЕННЫХ НА ОСНОВЕ НАНОТЕХНОЛОГИЙ

**Андреев В.А. (доцент кафедры)*, Касанов
К.Н. (м.н.с.), Сбойчаков В.Б. (зав. кафедрой),
Степанова Н.В. (слушатель интернатуры)**

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2015

В статье показана обоснованность применения антисептиков при гнойно-воспалительных процессах как дополнение к лечению антибиотиками. Отражены основные преимущества использования антисептиков для лечения раневых инфекций перед антибиотиками. Представлена сравнительная характеристика традиционных и новых антисептиков, полученных на основе нанотехнологий. Приведены основные достоинства наноантисептиков. Установлено их бактерицидное действие на различные бактерии, в том числе – на госпитальные штаммы. Исследованы воздействие различных концентраций антисептиков на тестируемые микроорганизмы и эффективность воздействия на госпитальные штаммы бактерий различных концентраций модифицированного катапола, содержащего акриловую и метакриловую кислоты. Отмечено преимущество использования катапола, содержащего акриловую кислоту. Выявлены основные наноантисептики, обладающие наибольшей эффективностью. Отражена перспектива их использования в качестве компонента для раневых покрытий.

Ключевые слова: акриловая кислота, арабиногалактан, метакриловая кислота, модифицированный катапол, наноантисептики, раневые покрытия

COMPARATIVE EVALUATION OF SOME ANTISEPTICS OBTAINED ON THE BASIS OF NANOTECHNOLOGY

**Andreev V.A. (associate professor of the chair),
Kasanov K.N. (junior scientific collaborator),
Sboichakov V.B. (head of the chair), Stepanova N.V.
(student of internship)**

Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2015

Validity of the antiseptics use in pyo-inflammatory processes as a complement to antibiotic treatment has been shown in the article. The main advantage of the antiseptics use for the treatment of wound infections before antibiotics are reflects. Comparative characteristic of traditional and new antiseptics, obtained on the basis of nanotechnology is presents. The main advantages of nanoantibiotics are done. It was installed their bactericidal activity against various bacteria, including hospital strains. The effects of different concentrations of antiseptics for the tested microorganisms and the effectiveness of hospital strains of bacteria of various concentrations of modified katapola containing acrylic and methacrylic acid have been investigated. It was marked the advantage of katapola using containing acrylic acid. The main nonanticipating with the greatest efficiency is identified. The perspective of their use as a component in wound dressings is reflected.

Key words: acrylic acid, arabinogalactan, methacrylic acid, modified katapola, nonanticipatory, wound coverings

* Контактное лицо: Андреев Виктор Александрович,
Тел.: (812) 292-34-65

ВВЕДЕНИЕ

Проблема распространения устойчивых к антибиотикам штаммов, в большой степени, осложняет борьбу с гнойно-воспалительными инфекциями в стационарах. Так, частота больных с гнойно-деструктивными процессами мягких тканей и их осложнениями составляет 30-35% от общего числа больных [1]. Причем металлобеталактамазопродуцирующие штаммы у неферментирующих бактерий, разрушающие как беталактамы, так и карбапенемы, выявлены в 23 стационарах 9 городов России, а частота выделения метициллинрезистентных штаммов в стационарах Москвы и Санкт-Петербурга достигает 65,9% [2].

В связи с вышеизложенным, применение в хирургической практике антисептиков и материалов на их основе, в значительной степени, дополняет профилактику и лечение раневых инфекций. Важным качеством антисептиков является более медленное, по сравнению с антибиотиками, появление устойчивых к ним штаммов бактерий. Однако к традиционным антисептикам, таким как фурацилин, хлоргексидин, борная кислота и другие, возбудители гнойно-воспалительных инфекций выработали устойчивость, что, в значительной мере, снизило эффективность использования антисептиков. Появление резистентности отмечают даже к перексиду водорода, что связано со способностью ингибировать антисептик выработкой бактериальной каталазы и другими клеточными и внеклеточными метаболитами. Одним из современных способов повышения эффективности применения антисептиков является применение нанотехнологий. Так, использование серебра в виде наноразмерных частиц способно многократно повысить бактерицидный эффект [3].

Вещества в виде наночастиц обладают свойствами, часто – радикально отличными от их аналогов в виде макроскопических дисперсий, что помогает создавать новые фармакологически активные препараты и применять их в медицине [4]. Помимо антибактериального, использование веществ в наносостоянии дает возможность достигать и другие активные лечебные эффекты: иммуномодулирующий, антиоксидантный, дегидратационный а также сорбционный при применении с соответствующими раневыми покрытиями [5]. Одной из первых технологий, основанных на использовании наносостояний, является применение липосом – микроскопических сферических везикул, мембрана которых состоит из молекул природных фосфолипидов, аналогичных входящим в состав клеточных мембран эукариотов. Достоинства липосом как носителей лекарств очевидны: полученные из природных фосфолипидов липосомы полностью биodeградируемы и биосовместимы, они пригодны для иммобилизации в них многих фармакологических агентов. Антибактериальные препараты внутри липосом более устойчивы в организме, так как изолированы липидной мембраной от повреждающих воздействий внешних условий и не оказывают общетоксического действия на макроорганизм.

Вместе с тем, большинство антисептиков на основе наноматериалов исследованы еще недостаточно.

Цель работы – изучение антимикробной активности наноантисептиков (серебро, золото, платина, железо, стабилизированные арабиногалактаном; коллоидные растворы серебра, цинка и меди), традици-

онных антисептиков (катапол, диоксидин) и нового антисептического препарата (модифицированного катапола).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в соответствии с «Методами испытаний дезинфекционных средств для оценки их безопасности и эффективности» (М., МЗ РФ, 1998) на следующих микроорганизмах: *Staphylococcus aureus* (штамм ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). После 15 минутной экспозиции соответствующих концентраций этих микроорганизмов антимикробное действие растворов нейтрализовали универсальным нейтрализатором (содержащим твин 80, сапонин 3%, гистидин 0,1%, цистеин 0,1%), 0,5% растворами тиосульфата натрия и хлористого натрия (для нейтрализации антисептики, содержащих Ag). Затем проводили высев на соответствующую плотную среду, используя количественные методы посева. Антисептики считали эффективными при подавлении роста 99,99% колониеобразующих единиц (КОЕ) соответствующих микроорганизмов. Дополнительно определяли размеры зон угнетения роста тест-микробов, образующихся при испытании растворов различных концентраций и обработанных ими нано-гель-пленок *Acetobacter xylinum*. Исследование проводили, придерживаясь методики, изложенной в «Testing for antibacterial activity and efficacy on textile products» (Japanese Industrial Standard). Метод описан для определения бактерицидной активности изделий из текстильного материала, его перевод опубликован во втором английском издании в 2002 г. (Japanese Standards Association /Akasaka, Minato-ku, Tokyo, 107-8440 JAPAN). Посевную дозу готовили согласно стандарту мутности 0,5 по МакФарланд, что соответствует концентрации микроорганизмов $1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. После посева соответствующих микроорганизмов и аппликации материалов, содержащих антисептики, чашки Петри инкубировали при 37 °С. Зоны задержки роста микроорганизмов измеряли с точностью до 0,5 мм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первую группу исследованных препаратов составили неорганично-органические нанобиокомпозиты, содержащие металлы (серебро, золото, платину и железо), стабилизированные арабиногалактаном. Вторая группа препаратов включала коллоидные растворы серебра, цинка и меди, стабилизация которых была осуществлена путём адсорбции наночастицами положительно заряженных ионов металлов. В результате происходило образование нанокластеров, которые удерживаются в жидкости, не переходя в донную фазу за счёт теплового движения молекул воды. Третью группу составили комплексы ПВП-нано-Ag⁰ (повиаргол) и ПВП-нано-Se⁰ (селенопол), представляющие собой наночастицы нуль-валентного серебра и селена, стабилизированные ПВП (поливинилпирролидон). Концентрации исследуемых препаратов в растворах были выбраны в соответствии с рекомендациями производителей (0,5, 1,0, 3,0% диоксидин; 2,5% катапол; 2,5% повиаргол; 0,5% селенопол; коллоидные растворы: 0,15% Ag⁰; 2,15% Zn⁰; 1,7% Cu⁰; растворы металлов, стабилизированные арабиногалактаном: 2,5% Ag⁰; 0,03% и 2,5% Au⁰; 0,01% и 2,5% Fe⁰; 0,028% и 2,5% Pt⁰;

0,1% фуллерен C60, ковалентно связанный с ПВП; 0,3% водная дисперсия шунгитового углерода (ШУ).

Изучали также комбинированный препарат на основе концентрата антимикробного средства «Ардезин», содержащего 50% пероксида водорода и 750 мг/дм³ серебра в виде комплексных ионов с винной кислотой. С помощью восстановителя, введенного в этот препарат, ионное серебро частично было переведено в нанокристаллическое, что зафиксировано по появлению оптического эффекта Тиндала в прозрачном растворе. Препараты сравнивали с традиционными антисептиками – диоксидином, катаполом и модифицированным катаполом (МК). Последний был разработан в Институте высокомолекулярных соединений РАН и представляет антисептический комплекс, из состава которого был исключён ПВП.

Исходный антисептик – катапол является сополимером ПВП с кротоновой кислотой и катамином Б (антисептик – диметилалкилбензиламмоний хлорид). Соплимер при этом способствует пролонгированному действию препарата. Вместе с тем, включение ПВП в лекарственные композиции нежелательно в связи с агрессивным воздействием на ткани организма [6]. В модифицированном катаполе вместо ПВП использовали 2-деокси-2-метакриламидо-D-глюкозу, а вместо кротоновой кислоты – акриловую или метакриловую кислоту. Результаты исследования антибактериальной активности представлены в таблице 1.

Таблица 1

Антибактериальная активность антисептиков			
Препарат	Эффективность обеззараживания при различных концентрациях растворов антисептиков (в %)		
	<i>S. aureus</i> ATCC 29212	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E. coli</i> ATCC 25922
Диоксидин 1%	99,99	99,99	29,6±2,70
Диоксидин 0,5%	99,99	99,99	34,3±1,53
Диоксидин 3%	99,99	99,99	30,2±1,98
Катапол 2,5%	99,99	99,99	34,5±1,37
Повиаргол 2,5%	99,99	94,0	99,99
Селенопол 0,5%	99,99	98,0	99,99
Ag ⁰ 0,15%	90,99	96,0	98,0
Cu ⁰ 1,7%	10,0	15,0	55,0
Zn ⁰ 2,15%	21,0	10,0	28,0
Ag ⁰ 0,1мас% на основе средства «Ардезин»	10,0	55,0	60,0
Ag ⁰ 0,25мас% основе средства «Ардезин»	99,99	99,99	99,99
Fe ⁰ 0,01% и 2,5% (арабиногалактан)	6,0	8,0	8,0
Pt ⁰ 0,028% и 2,5% (арабиногалактан)	8,0	10,0	8,0
С60/ПВП 0,1%	6,0	8,0	8,0
ШУ 0,3%	4,0	6,0	4,0
МК-А 1,5% (с акриловой кислотой)	99,99	99,99	99,99
МК-М 1,5% (с метакриловой кислотой)	99,99	99,99	99,99
Ag ⁰ 0,1мас% на основе средства «Ардезин»	10,0	55,0	60,0
Ag ⁰ 0,25мас% основе средства «Ардезин»	99,99	99,99	99,99

Чувствительность микроорганизмов к двум модифицированным формам катапола (с акриловой – МК-А и метакриловой – МК-М кислотами) с определением оптимальной антимикробной концентрации МК, в сравнении с катаполом, была исследована нами на госпитальных штаммах, выделенных из ран пострадавших и больных, находившихся на лечении в клини-

ке военно-полевой хирургии ВМА им. С.М. Кирова: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*. Эти бактерии представляли группу наиболее часто выделяемых возбудителей гнойно-воспалительных инфекций. Общее количество наблюдений составило 158 (табл. 2).

Таблица 2

Оценка эффективности антимикробного действия различных концентраций модифицированных форм катапола на госпитальные штаммы микроорганизмов по зонам задержки роста (мм, X±σ)

Концентрация	Исследованные штаммы микроорганизмов		
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>
МК-А 2,0%	29,9±1,51	26,5±2,04	40±2,11
МК-А 1,5%	39,9±1,52	25,0±1,6	39,9±1,44
МК-А 1,0%	24,0±2,03	23,2±2,25	20,4±2,97
МК-А 0,5%	22,8±1,36	22,7±2,05	20,3±3,03
МК-М 2,0%	21,8±3,55	28,1±1,59	19,9±1,61
МК-М 1,5%	34,3±1,49	24,6±1,83	20,4±1,10
МК-М 1,0%	24,1±2,22	20,4±2,80	24,6±1,95
МК-М 0,5%	23,76±2,08	20,0±2,99	20,2±2,44
Катапол 2,0%	24,1±2,16	29,7±1,46	30,2±2,43
Катапол 1,5%	21,4±1,78	29,9±2,17	28,3±2,18
Катапол 1,0%	20,3±4,12	27,2±3,34	27,8±2,70
Катапол 0,5%	20,1±2,86	19,9±2,53	24,9±2,27

Как видно из представленных результатов, МК-А обладал наиболее высокой антимикробной активностью к исследованным штаммам в концентрации 1,5%. МК-М также оказался наиболее эффективен в концентрации 1,5%, но в меньшей степени по сравнению с МК-А. Предшественник МК – катапол более эффективно подавлял рост синегнойной палочки, но в остальных случаях эффективность его воздействия на рост бактерий была более низкой, что, вероятно, связано с повышением резистентности к нему исследованных госпитальных штаммов.

На основании полученных результатов был сделан вывод, что модифицированный катапол может быть использован в качестве антисептического компонента для раневых покрытий, причём наибольшей эффективностью обладает 1,5% раствор, содержащий в своей структуре акриловую кислоту.

Мы также изучали антимикробную активность 4-х различных концентраций аргентарабиногалактана: 0,1%, 0,25%, 0,75%, 1,5%, 2,5%, 3,0%. Растворы предварительно сорбировали на нано-гель-плёнках бактериальной целлюлозы. Установлено, что по отношению к исследуемым штаммам микроорганизмов наиболее эффективным оказался 2,5% раствор аргентарабиногалактана.

Растворы, проявившие максимальную антимикробную активность, сорбировали нано-гель-плёнкой целлюлозы *Acetobacter xylinum* и изучали их на госпитальных штаммах по зонам задержки роста (табл. 3).

Таблица 3

Сравнительная характеристика антимикробного действия антисептиков, сорбированных нано-гель-плёнкой целлюлозы *Acetobacter xylinum*, на госпитальные штаммы микроорганизмов по зонам задержки роста (мм, X±σ)

Госпитальный штамм	Препарат			
	Диоксидин 1%	Аргентарабино-галактан 2,5%	Катапол 2,5%	МК-А 1,5%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	34,6±1,69	20,6±1,50	29,3±2,20	33,1±1,76
<i>S. aureus</i>	34,3±1,27	33,6±1,57	19,4±1,83	36,9±2,18
<i>P. aeruginosa</i>	34,3±1,24	22,9±2,66	14,5±1,75	24,8±1,93
Ассоциация микроорганизмов	32,6±2,96	25,1±1,37	24,0±2,26	30,1±1,31

Как видно из таблицы 3, имело место повышение резистентности госпитальных штаммов *S. aureus* и *P. aeruginosa* к 2,5% раствора катапола, что, вероятно, связано с достаточно длительным применением его в клинике для местного лечения ран.

Наиболее эффективными оказались образцы нано-гель-плёнок бактериальной целлюлозы, содержащие 1% раствор диоксида и 1,5% раствор МК-А, что наглядно видно на рисунке 1.

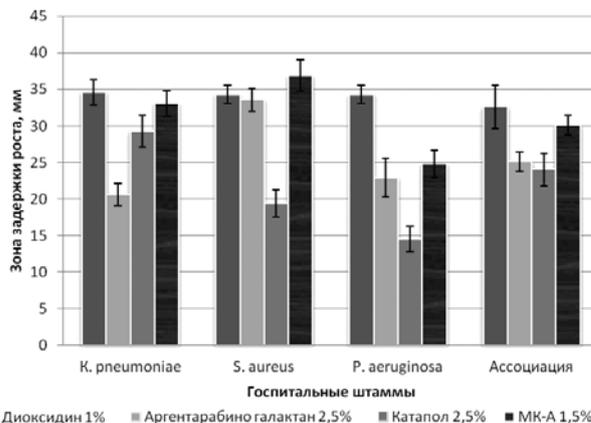


Рис. 1. Антибактериальная активность препаратов нано-гель-плёнки бактериальной целлюлозы с абсорбцией на ней антисептиков

Закреплено повышение резистентности исследованных госпитальных штаммов (особенно *S. aureus*) к 2,5% раствору катапола. Раствор серебра, стабилизированный арабиногалактаном, менее эффективно подавлял рост *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*.

На современном этапе, помимо использования традиционных повязок и мазей, находят все большее применение раневые покрытия. Это и понятно, если учесть возможность создания разнообразных свойств, обеспечивающих скорейшее заживление раневой поверхности, таких как: создание оптимальной среды для заживления, сорбционные свойства (в том числе поглощение микроорганизмов из раневой поверхности), доставку лекарственных препаратов в рану, обеспечивающих антимикробное действие и др. Для придания антимикробных свойств возможна иммобилизация серебра на раневые покрытия в различных формах (в виде солей, коллоидных растворов, серебро-содержащих белков и др.). Однако указанные формы не обеспечивают достаточной продолжительности антимикробного действия активного ионизированного серебра. По данным многочисленных публикаций, наиболее перспективным для иммобилизации на раневые покрытия являются наноразмерные частицы серебра (AgNPs – ArgentumNanoParticles), обеспечивающие дозированный и пролонгированный антимикробный эффект [4]. Разработка способов получения и введения в матрицу раневых покрытий наночастиц серебра даст возможность значительно улучшить их антимикробные свойства. Широко представлены способы синтеза наночастиц металлов, в том числе AgNPs, в структуре природных (монтмориллонит, каолинит, смектит и др.) и синтетических (лапонит) слоистых силикатов [1, 3, 5, 7]. Полученные таким образом наноразмерные частицы удерживаются в межслоевом пространстве и/или на внешних поверхностях силиката, что препятствует их агрегации и образованию мало-

активных агломераций. Высокая сорбционная способность (набухание) слоистых силикатов, заметное влияние на исходные физико-химические свойства полимеров, а также антимикробное действие, обусловленное способностью к образованию AgNPs, определяют интерес к использованию их в качестве наполнителей матриц раневых покрытий. Так, иммобилизованный в структуру композитного покрытия модифицированный серебром монтмориллонит (Ag-MMT) является источником дозированного выведения Ag⁺ в рану и, обеспечивая пролонгированные антимикробные свойства покрытия, препятствует цитотоксическому действию серебра.

При сравнительной оценке биоцидной активности ряда традиционных антисептиков и водных взвесей высокодисперсного (D<0,25 мкм) модифицированного монтмориллонита различной концентрации выявили значимую эффективность последнего. Наиболее эффективное бактериостатическое действие Ag-MMT содержащих образцов установили по отношению к культурам *E. coli* и *P. aeruginosa*, причем отмечали равнозначное действие на референтные и госпитальные штаммы указанных микроорганизмов. На рисунке 2 представлены результаты определения бактериостатического действия разработанных образцов и коммерческих раневых покрытий в отношении госпитального штамма синегнойной палочки.

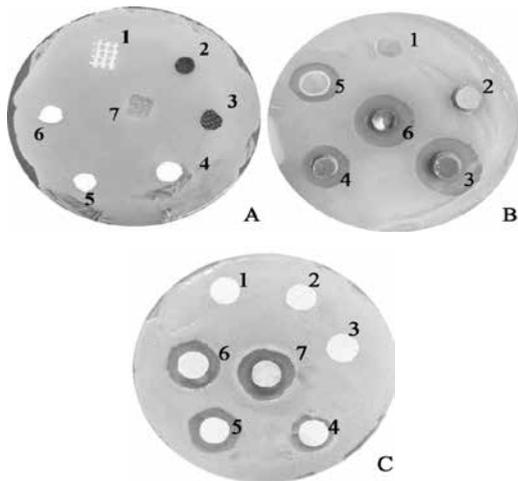


Рис. 2. Бактериостатическое действие раневых покрытий в отношении госпитального штамма *P. aeruginosa*: А – коммерческих (1 – «Бранолинд Н», 2 – «АМН», 3 – «АУТ-М», 4 – «Меропре», 5 – «Апполо», 6 – «Cosmopor», 7 – «Atrauman® Ag»), В – на основе гидрогелевого нанокомпозита (концентрация Ag-MMT в полимере, масс. %: 1 – 0%, 2 – 1%, 3 – 10%, 4 – 3%, 5 – 2%, 6 – 5%), С – на основе дезинтегрированной целлюлозы *Glucanobacter xylinus* (концентрация Ag-MMT в полимере, масс. % 1 – 0%, 2 – 0,05%, 3 – 0,1%, 4 – 0,2%, 5 – 0,3%, 6 – 0,5%, 7 – 1%)

Так, видно, что ни одно из коммерческих покрытий не образует зоны задержки роста бактерий, т.е. их применение для профилактики и борьбы с раневой инфекцией не дает достаточной эффективности. Отметим, что разработанные монтмориллонит содержащие матрицы значимо подавляли рост метициллин-резистентного стафилококка (MRSA). Данное наблюдение особенно актуально в условиях возросшей резистентности микроорганизмов, в т.ч. основных возбудителей раневой инфекции по отношению к традиционным антисептикам.

По результатам оценки способности разработанных матриц подавлять рост раневой микробиоты установлено значимое снижение уровня бактериальной обсемененности инфицированных ран, а также возможность сравнительно длительного его поддержания ниже критического уровня (10^3 КОЕ) за счет пролонгированного антимикробного действия. Эффективное подавление раневой инфекции, являющейся ведущим патогенетическим звеном осложненного течения раневого процесса, объясняет значимое сокращение сроков заживления ран. На рисунке 3 представлена макроскопическая картина гранулирующих ожоговых ран на 20 сутки после некрэктомии с использованием различных способов ведения. Наблюдали выраженность процессов репарации, отсутствие перифокального воспаления, гнойного отделяемого при ведении ран с использованием разработанных антимикробных матриц.

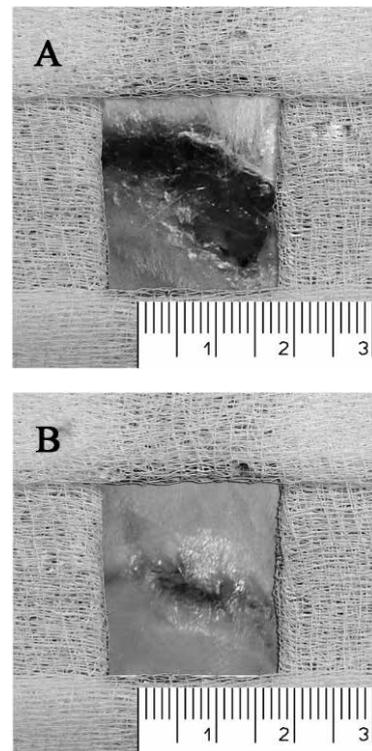


Рис. 3. Общий вид гранулирующих ожоговых ран на 20 сутки после некрэктомии: А – ведение раны под асептической повязкой, В – применение антимикробного покрытия на основе гидрогелевого нанокомпозита с AgNPs

ВЫВОДЫ

Нано-гель-плёнки бактериальной целлюлозы с иммобилизованными на них антисептическими препаратами (2,5% раствор аргентарабиногалактана, 2,5% раствор катапола, 1% раствор диоксидина и 1,5% раствор модифицированного катапола) могут быть применены в качестве матрицы биоактивных раневых покрытий. При этом последние два антисептика обладают наибольшей антибактериальной активностью.

Модифицированный катапол, содержащий в своем составе акриловую кислоту, перспективен как для использования в качестве антисептического компонента раневых покрытий, так и для обработки ран на догоспитальном этапе медицинской эвакуации. Наибольшей эффективностью обладает его 1,5% раствор.

Раневые покрытия для инфицированных ран вместе с вязкой ускоряют сроки заживления. Это традиционного ведения ран под асептической по-

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Толстых М.П., Луцевич О.Э. Теоретические и практические аспекты заживления ран. – М.: Дипак, 2007. – 96 с.
2. Шевченко О.В., Эйдельштейн М.В., Степанова М.Н. Металлобеталактамазы: значение и методы выявления у грамотрицательных неферментирующих бактерий// Клини. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2007. – Т. 9, №3. – С. 20-25.
3. Крутяков Ю.А., Кудринский А.А., Оленин А.Ю., Лисичкин Г.В. Синтез и свойства наночастиц серебра: достижения и перспективы// Успехи химии. –2008. – Т. 77. – С. 242.
4. Vort P.J., et al. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC// Particle Fibre Toxic. – 2006. – Vol. 3. – P. 11-35.
5. Венгерович Н.Г. Патогенетическое обоснование биоактивных наноматериалов при раневом процессе: Дис. ... канд. мед. наук – СПб, 2011.
6. Попов В.А., Тюнин М.А., Зайцева О.Б. и др. Морфофункциональные изменения во внутренних органах экспериментальных животных при внутрибрюшинном введении комплекса С60 с N-поливинилпирролидоном// Прил. Вест. Рос. Воен.-мед. академии. – 2008. – Т. 23, №3. – С. 484.
7. Патент на изобретение «Антисептическое средство» №2446808 МПК 8А61 К 31/78, опубл. 10.04.2012 г. Авторы: Венгерович Н.Г., Хрипунов А.К., Андреев В.А и др.

Поступила в редакцию журнала 20.06.2015

Рецензенты: С.Д. Жоголев, В.С. Митрофанов



ЗАМЕТКИ И РЕКОМЕНДАЦИИ ЧИТАТЕЛЯМ ОТ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА ЖУРНАЛА «ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ»

Елинов Н.П. (главный редактор журнала «Проблемы мед. микол.», профессор кафедры)*

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

© Елинов Н.П., 2015

В настоящее время многие микробиологи «по старинке» используют в устной речи и в печати неточные (фактически – неграмотные) термины. Это касается сравнительно многих авторов, присылающих в наш журнал свои клинические, экспериментальные и обзорные статьи, в которых, до редакционной обработки, они «грешат» либо подменой действительного залога в русском языке на страдательный, либо на замену русских терминов на неравнозначные (неравноценные) иностранными. Имеют место случаи, когда неодушевленные объекты что-либо «демонстрируют» одушевленному(-ым) читателю(-ям) из Царства Animalia и т.д. В данной статье представлен мир микробов, начиная с прионов и завершая протистами и простейшими организмами. Здесь важно знать и помнить о том, что прионы – это инфекционные полипептиды, вирусы и вириды – организованные частицы (не организмы), остальные микробы относятся к разным организмам.

THE NOTES AND RECOMMENDATIONS TO READERS FROM CHIEF EDITOR OF THE JOURNAL «PROBLEMS IN MEDICAL MYCOLOGY»

Yelinov N.P. (Chief editor of the journal «Problems in med. mycol.», professor of the chair)

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

© Yelinov N.P. 2015

In the present time many microbiologists «at previous custom» use in verbal speech and in the print incorrect (in fact illiterate) microbiological terms. I bring the some of them and also correctly write. This is concerned of comparatively of many authors, sending in our Journal their clinical, experimental and reviewed (till editorship) they «sin» either with substitution the actual voice in Russian language or for passive voice or in replacement of Russian terms for an unequal (non equal evaluable) with foreign languages. There are cases when in animal objects «demonstrate» something to animated reader(-s) from Kingdom Animalia and so on. In the Universe microbes beginning with **Prions** and completing with **Protista** and **Protozoa** presented in the given article. Here it is important to know and to remember that **prions** are the **infectious polypeptids**, **Vira** and **Viroids** – **organized particles** (not organisms!); the others microbes take to different organisms.

* Контактное лицо: Елинов Николай Петрович, тел.: (812) 303-51-40

ЗАМЕТКИ И РЕКОМЕНДАЦИИ

А) Дерматомицеты (от греч. *derma* – кожа, синоним латинскому слову *cutis*). [1, 2] (Рис 1). Дерматофиты – слово неправильного написания и произношения (по лат. *Phyton* – растение). Патогенных (болезнетворных) растений в организме человека нет.

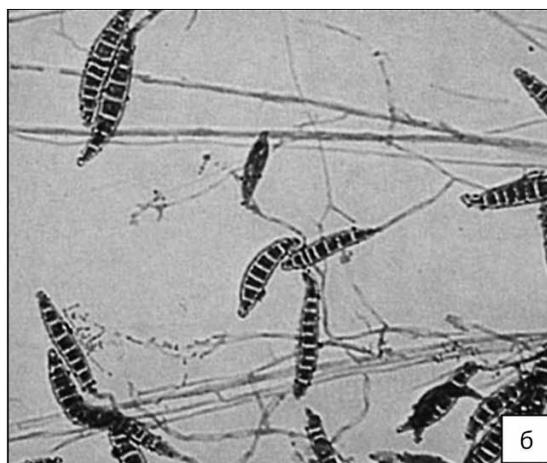
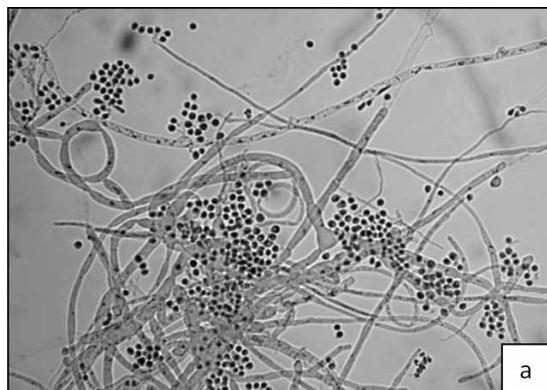


Рис 1. Некоторые дерматомицеты: *Trichophyton mentagrophytes* (а) и *Microsporum lanosum* (б) – возбудители заболеваний кожи и её придатков у людей.

Б) Гриб(ок) – по греч. в единственном числе *myces* – гриб(ок), во множественном числе *mycetes* – грибы(-бки) (Рис 2).

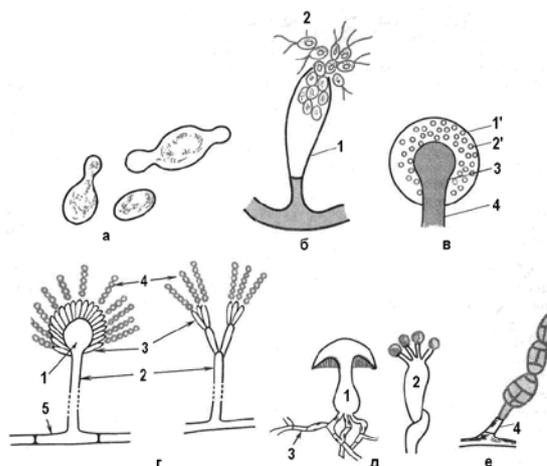


Рис 2. Морфология некоторых представителей грибов: а - дрожжи-сахаромицеты; б - сапролегния (1 - зооспорангий, 2 - зооспоры); в - мукор (1' - спорангий, 2' - спорангиоспоры, 3 - колонка, 4 - спорангионосец); г - аспергилл и пеницилл (1 - головка, 2 - конидионосец, 3 - стеригмы, 4 - конидиоспоры, 5 - опорная клетка); д - базидиальный

гриб (1 - плодовое тело, 2 - базидия с базидиоспорами, 3 - мицелий); e - несовершенный гриб (альтернария) - конидиеносец с конидиоспорами.

Науку о грибах (*субмикробиологию*) именуют *микологией*: по англ. – *mycology*. В середине XX века (по определению ряда учёных, включая американского систематика Уиттакера Р.Х. и др.[3, 4а, 4б]), грибы были выделены из Царства растений в самостоятельное Царство (по-лат. *Fungi* – грибы во множественном числе, *Fungus* – в единственном числе). Поэтому название «дерматофиты» в устах систематиков-дерматологов или микробиологов стоит в разряде грамматически неправильных, или неграмотных. При этом следует помнить о том, что слово «микроб» включает все формы микроскопических размеров (некоторые виды представлены на рисунке 3).

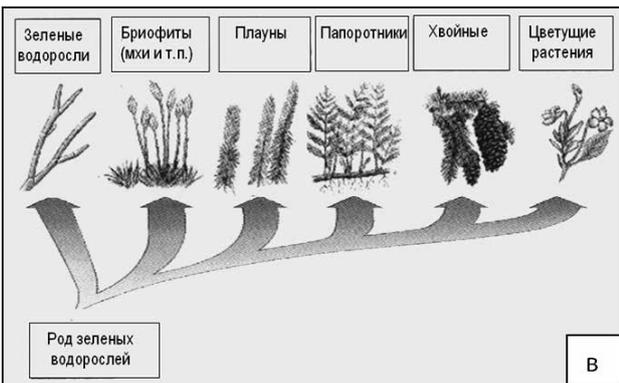
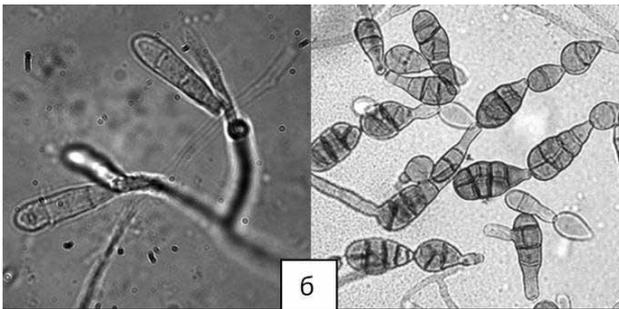
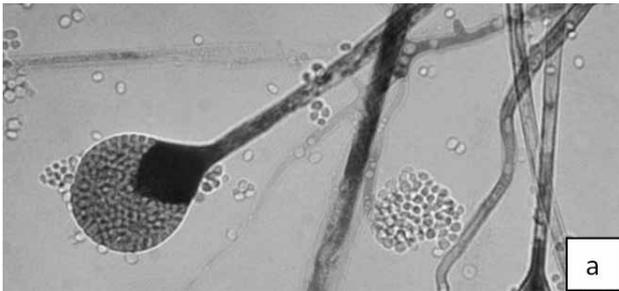


Рис. 3. Отдельные представители царств *Fungi*: низших – Мукоры (а); высших – Дерматомицеты и Альтернарии (б) и царство *Plantae* (в)

К микробам относят и прионы (по-лат. *micrós* – малый).

В) Прионы-молекулы полипептидов (Рис 4).

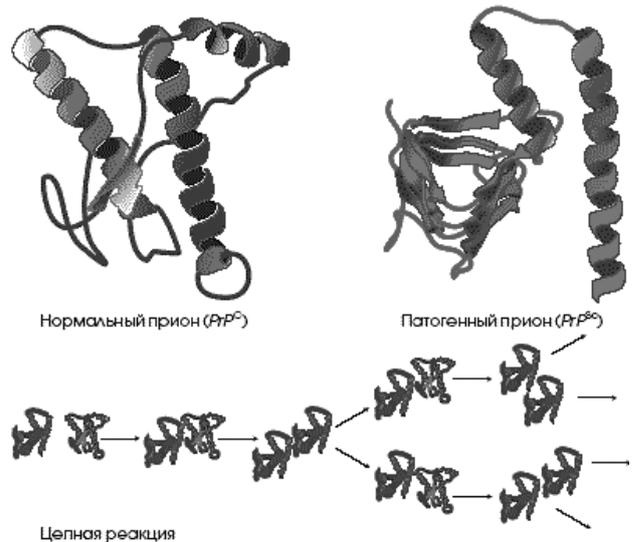


Рис. 4. «Инфекционные прионы» - полипептидные молекулы (см. специальную публикацию в нашем журнале в 2013 г. (Т.15, №3)

Г) Вирусы и вириды (Рис 5.) организованные частицы.

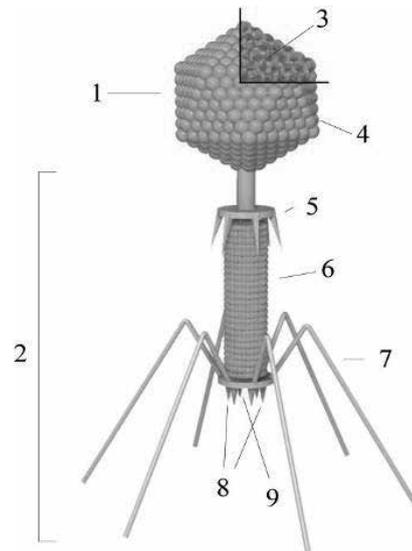


Рис. 5. Структура бактериофага Т2: 1 - головка, 2 - хвост, 3 - нуклеиновая кислота, 4 - капсид, 5 - «воротничок», 6 - белковый чехол хвоста, 7 - фибриллы хвоста, 8 - шипы, 9 - базальная пластинка

Д) Бактерии и спорообразующие бациллы (Рис. 6).

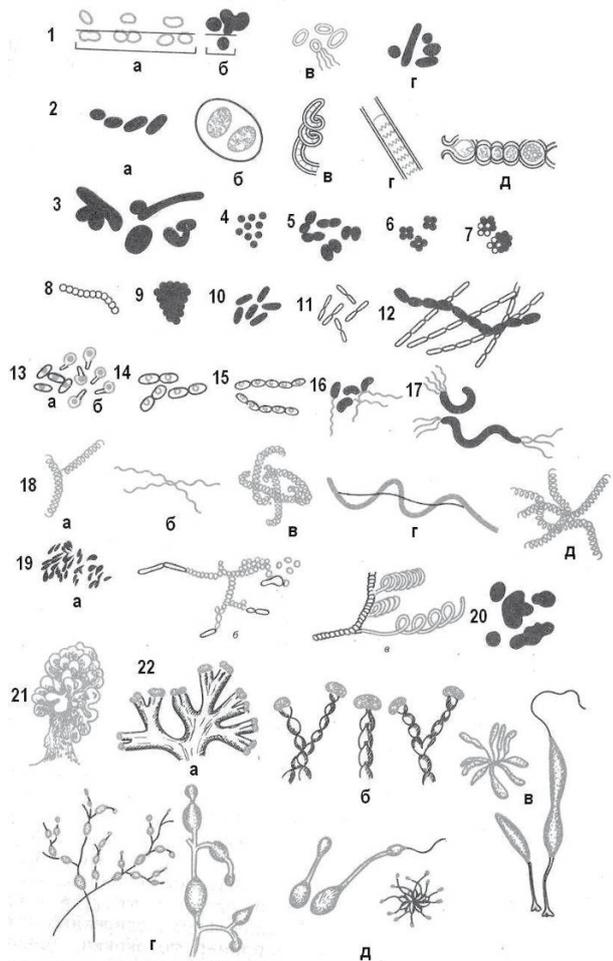


Рис.6. Предъядерные бактерии и бациллы: 1- археобактерии (а - метанобактерии, вегетативные и б - покоящиеся формы, в - галофилы, живущие в средах с высокими концентрациями некоторых солей, г - термоацидофильные бактерии); 2- цианобактерии (а-д); 3- микоплазмы; 4- микрококки; 5- диплококки; 6- тетракокки; 7- сарцины; 8- стрептококки; 9- стафилококки; 10- бактерии; 11- диплобактерии; 12- стрептобактерии; 13- бациллы (а - клостридии, б - плектридии); 14- диплобациллы; 15- стрептобациллы; 16- вибрионы; 17- спириллы; 18- спирохеты (а - трепонемы, б - боррелии, в - лептоспиры, г - кристиспиры, д - спирохеты); 19- актиномицеты (а - микобактерии, б - нocardии, в - стрептомицеты); 20- риккетсии; 21- миксобактерии; 22- стебельковые бактерии (а - *Nevskia*, б - *Gallionella*, в - *Caulobacter*, г - *Rhodomicrobium*, д - *Hyphomicrobium*).

Е) Одноклеточные водоросли (*Algae*)(Рис. 7).

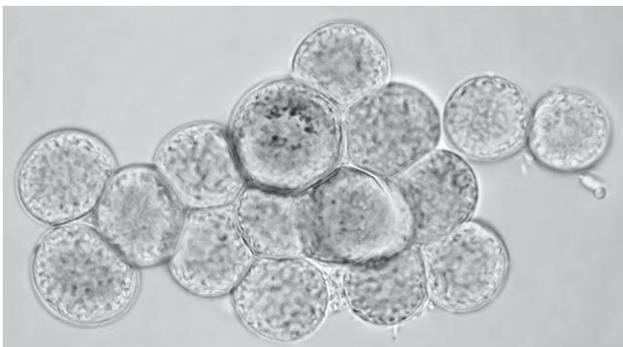
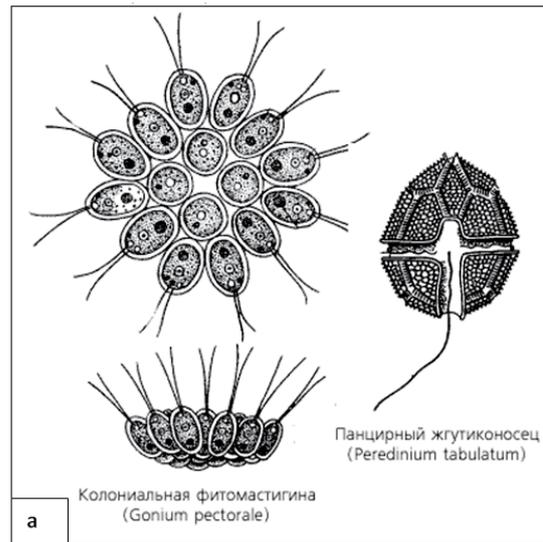


Рис. 7. Некоторые эукариоты – водоросли

Ж) Одноклеточные протисты (Рис 8а).

З) Одноклеточные протозоа (простейшие животные (Рис 8б).



а Колониальная фитомасгина (*Gonium pectorale*)

Панцирный жгутиконосец (*Peredinium tabulatum*)

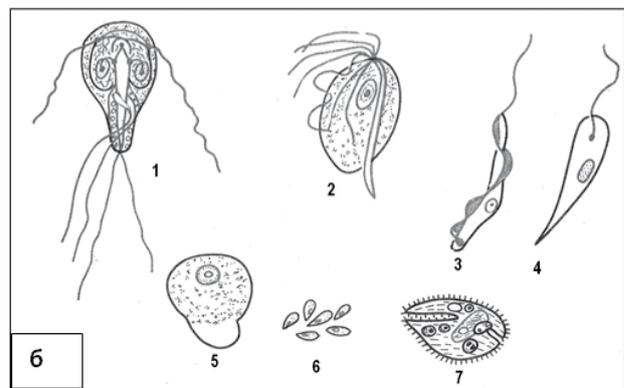


Рис. 8. Некоторые протисты (а) и протозоа (б): 1 – лямблия, 2 – трихомонада, 3 – трипаносома, 4 – лейшмания, 5 – дизентерийная амеба, 6 – малярийные мерозоиты, 7 – кишечная балантидия

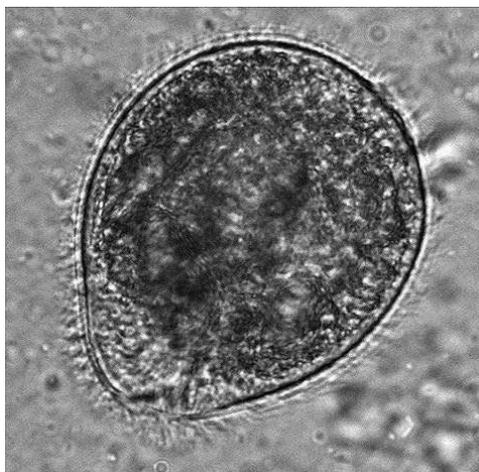
В начале XXI века мы рекомендовали применять в микробиологии, микробиологической литературе и в устной речи такие термины, как **супрамикробиология** и **субмикробиология** (от приставок в латинском языке *supra* – «над» и *sub* – «под»). Супрамикробиология объединяет общие представления об её объектах, начиная с прионов и кончая протистами и протозойными организмами, включённых в надцарства (*Supraregni*: безъядерные (*Akaryota* по греч. *karyon* – ядро, *a* – без), предъядерные (*Prokaryota* – по греч. *karyon* – ядро, *pro* – пред) и ядерные (*Eukaryota* – по лат. и по греч. *Eu* – красивый, лёгкий, настоящий, *karyon* – ядро) (табл.).

Основные признаки надцарств и царств живых организмов

Надцарство	Царство	Признаки			
		Питание	Клеточные стенки	Кристы митохондрий	Отростки на жгутиках (флагеллярные мастигонемы)
EUCARIOTA - ядерные	Chromista	Автотрофные (фотосинтез или абсорбция)	Часто из целлюлозы, хитин и β-гликаны отсутствуют	Трубчатые	Трубчатые
	Fungi	Гетеротрофное (абсорбтивное/ осмотрофное)	Из хитина и β-гликанов	Плоские	Отсутствуют
	Plantae	Автотрофное (фотосинтетическое)	Из целлюлозы и других гликанов	Плоские	Отсутствуют
	Animalia (Protozoa)*	Гетеротрофное (фаготрофное) или автотрофное (фотосинтетическое)	Отсутствуют, когда питаются; различные, когда имеются	Трубчатые	Не тубулярные
PROCARIOTA	Bacteria	Авто- или гетеротрофное (фотосинтез или абсорбция)	Из мурамил-пептида, реже – без клеточной стенки	Митохондрий нет	Трубчатые, у многих представителей отсутствуют
ACARIOTA	Vira	Облигатный паразитизм	Отсутствуют	Отсутствуют	Отсутствуют

Примечание: (*) К одушевленным (*Animalia*) относят также простейшие организмы (*Protista*) и простейшие животные (*Amoebozoa*).

Из всех Царств оформленные ядра с оболочкой и различным числом хромосом имеют только Эукариоты. Протисты и протозойные организмы – это не фотосинтезирующие Эукариоты. Предполагают, что они произошли от водорослей, в большинстве своём потерявших хлоропласты, а с ними – способность использовать энергию лучей. *Protista* и *Protozoa* подразделяют на плазмодромные (классы – мастигофорные *Mastigophora*, саркодовые *Sarcoda*, споровики *Sporozoa*) и реснитчатые (*Ciliophora*). Среди протозойных микроорганизмов известны патогенные *Giardia lamblia*, вызывающая лямблиоз *Trichomonas vaginalis*, индуцирующая трихомоноз; *Trypanosoma gambiense*, вызывающая трипаносомоз; причиной лейшманиоза выступает *Leishmania donovani*, относящаяся к жгутиковым; к саркодовым относят возбудителей амёбной дизентерии *Entamoeba histolytica*; к споровикам – возбудителей малярии *Plasmodium* spp., к реснитчатым – возбудитель балантидиоза *Balantidium coli* (Рис 9).

Рис.9. *Balantidium coli*

В природных условиях микроорганизмы находятся в составе биогеоценозов (от греч. *Bios* – жизнь, *geo* – земля, *koinos* – община).

По определению В.Н. Сукачева, биогеоценоз – это участок земной поверхности, на котором в тесном взаимодействии развивается однородная по составу и производительности растительность; однородный комплекс животных и микроорганизмов; однородная по физико-химическим свойствам почва; поддерживается однородная газовая и климатическая ситуация и устанавливаются однородные по масштабу и ритму

материально-энергетические микроэкоценозы, главная роль которых заключается в обмене между всеми составляющими биогеоценоза [4 а, б]. Частью биогеоценозов являются микроэкоценозы, главная роль которых заключается в минерализации органических веществ. Основной резервуар микробов-сапробов – почва, где они могут выживать какое-то время, находясь в состоянии анабиоза или метабиоза. Анабиоз – приостановка жизнедеятельности организма при неблагоприятных условиях существования с последующим восстановлением жизнедеятельности при наступлении благоприятных условий. Метабиоз – рост, развитие и размножение организма при определенном уровне обменных процессов, или метаболизма, в соответствующих условиях среды обитания. Метаболизм складывается из катаболизма – разложения химических веществ в целях получения энергии и анаболизма – синтеза веществ клетки. Реакции обмена называют амфиболизмом [5]. При анабиозе микроорганизмы выживают, но не размножаются. При метабиозе в природных условиях микробы постоянно взаимодействуют между собой и с организмами. Эти взаимоотношения подразделяют на симбиотические, или симбиоз (комменсализм, мутуализм, паразитизм), и антагонистические, или антибиоз (одно или двухсторонний гетероантагонизм; изоантагонизм; виолентаантагонизм, или насильственный антагонизм). О грибах-патогенах и условных патогенах мы подготовили и опубликовали соответствующее учебное пособие [6]. В природных и искусственных условиях микроорганизмы подвержены изменениям по форме, типам размножения, обменным процессам. Мало стабильные формы называют полиморфными (от лат. *poly* – много, греч. *morfe* – форма, вид), а само явление – полиморфизмом (реже – плеоморфными, от греч. *pleon* – больше) и плеоморфизмом. К таким микробам относят холерный вибрион, дерматомицеты и др., особенно, если их длительно сохраняют в лабораторных условиях. Клетки предъядерных бактерий, включая актиномицеты, или «лучистые грибы», не имеют оформленных ядер, но содержат ядерный материал лишь в единственной хромосоме. Среди эукариот в Царстве грибов представлены полифелитические организмы (по-греч. *phyle* – племя, род, вид), относимые, как минимум, к трём Царствам – *Fungi*, *Chromista* и *Protozoa*. К Царству *Chromista* (по греч. *chroma* – цвет) относят преимущественно одноклеточные, филаментирующие или первично колониальные фототрофные организмы; в их клеточных стенках нет

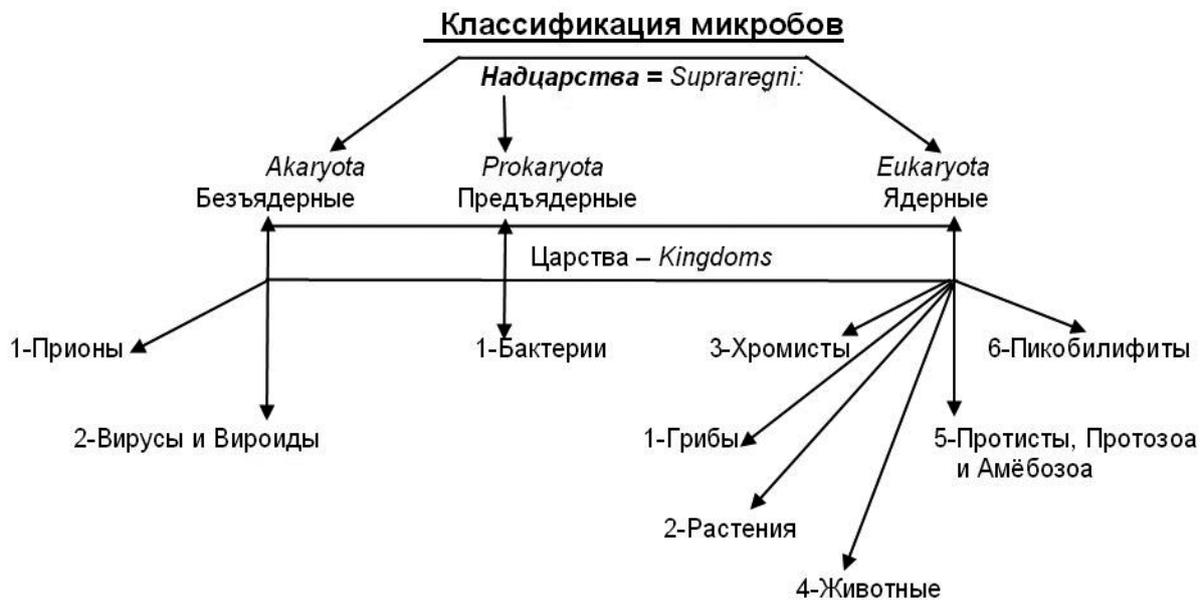
хитина и β -глюкана, но они могут содержать целлюлозу; хлоропласты локализируются в просвете обычно шероховатого эндоплазматического ретикулума, имеют двухмембранный покров внутри перипластидной мембраны. В случае содержания хлорофилла, то он представлен типами *a* и *c*. Митохондрии с трубчатыми кристами; в клетках всегда обнаруживают аппарат Гольджи и пероксисомы; большинство представителей этого Царства являются свободноживущими в среде обитания. Размеры их разные – от микроскопических до визуально наблюдаемых (золотистые бурые водоросли); некоторые из них могут иметь жгутики. К Царству *Chromista* относят 3 отдела – *Hyphochytriomycota*, *Labyrinthulomycota*, *Oomycota*.

Вирусы и вириды представляют собой **организованные частицы (не клетки!), обитающие на/в живой ткани**, включая представителей царства *Animalia* (от англ. *anima* – душа, т.е. одушевленные, включая

человека). Вириды преимущественно – паразиты растений.

Прионы – это, как правило, **инфекционные полипептиды**, состоящие, в среднем, из 144 **аминокислот**.

В 2007 г. Международная группа учёных из Германии, Испании, Канады и Франции обнаружила в Северных широтах Атлантики новый вид живых существ, названных **Пикобилифитами** (от итальянского *piccolo* – маленький, от латинского *bili* – желчь; конкретно в данном слове – от биллипротеина; но от греч. *phyton* – растение). В пикобилифитах выявили генные последовательности, не связанные ни с одним Царством живых организмов, следовательно, они могут быть шестым Царством эукариот. Размеры их находят в пределах 2x5 мкм, и тогда схема микробной классификации может быть изображена следующим образом (Рис 10).



Примечание: Названия Царств по латинской (или англ.) транскрипции. Царства: 1) *Vira* и *Viroids*, 2) *Prions* в Надцарстве *Akaryota*. Царств 1) *Bacteria* в надцарстве *Prokaryota* Царства: 1) *Fungi*, 2) *Plantae*, 3) *Chromista*, 4) *Animalia*, 5) *Protista*, *Protozoa* и *Amoebozoa*, и, наконец, царство 6) Пикобилифиты в Надцарстве *Eukaryota*

В течение последних лет текущего столетия нередко можно слышать по радио или, даже, в отдельных лекциях молодых и опытных лекторов такой термин как **микробиота**, который ныне также «архаичен», как и **дерматофиты**. В обоих случаях лица, использующие их, проявляют неграмотность. О дерматомицетах сказано в начале данной статьи, а здесь отметим то, что термин «флора» происходит из древнеримской мифологии и обозначает «богиню цветов и весны, или

разнотравья, в различные геологические периоды Земли. Микробиологам-систематикам и другим специалистам следовало отказаться от названного термина «микробиота», ибо он не имеет никакого отношения к «микробиоте» человеческого организма. Нередко авторы предлагаемых публикаций прибегают и к таким выражениям, как «...таблица демонстрирует...», или «...рисунок показывает...» и т.п., что, по- существу, грамматически неправильно.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Елинов Н.П. Дерматомицеты (Лекция) (Учебное пособие). – СПб., 2010. – 48 с.
2. Елинов Н.П. Химическая микробиология. – М.: «Высшая школа», 1989. – 448 с.
3. Скулачев В.П. Аккумуляция энергии в клетке. – М., 1969.
4. а) *Wittaker R.H.* New concepts of Kingdoms of organisms // *Science*. – 1969. – Vol. 163. – P. 150-160.
б) *Wittaker R.H. and Margulis L.* Protist classification and the Kingdom of organisms // *Biosystems*. – 1978. – Vol. 10. – P. 3-18.
5. Елинов Н.П. Общие закономерности строения и развития микробов – продуцентов биологически активных веществ. – Л.: «Медицина», 1977. – 288 с.
6. Елинов Н.П., Васильева Н.В., Маметьева А.А. и др. Патогенные и условно-патогенные макро- и микромицеты как объекты царства грибов (*Fungi*), их характеристика с учётом требований Международного Кодекса ботанической номенклатуры. Выпуск I (Учебное пособие). – СПб., 2011. – 64 с.



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

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

«ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ»
Per. № 77-1396 от 20.12.1999 г. ISSN 1999-6780
Журнал включен в реферативный журнал и базы ВИНТИ.
Сведения о журнале ежегодно публикуются в международной системе по периодическим и продолжающимся изданиям
«Ulrich's Periodicals Directory».
Оригинал-макет — НИИ «Медицинской микологии им. П. Н. Кашкина СЗГМУ».
Подписано в печать 30.09.2015. Формат 60×90 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Times. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 8. Тираж 999 экз.