

На правах рукописи

РОДЧЕНКО ЮЛИЯ ВАЛЕРИЕВНА

**ГРИБЫ *MALASSEZIA FURFUR* У НОВОРОЖДЁННЫХ ОТДЕЛЕНИЙ ХИРУРГИИ,
РЕАНИМАЦИИ И ИНТЕНСИВНОЙ ТЕРАПИИ: ОПТИМИЗАЦИЯ
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ**

03.02.03 – Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук

Татьяна Валерьевна Припутневич

доктор медицинских наук, доцент

Виктор Васильевич Зубков

Официальные оппоненты:

Дерябин Дмитрий Геннадьевич, доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ "Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии" Минздрава России, отдел лабораторной диагностики инфекций передаваемых половым путём и дерматозов, ведущий научный сотрудник

Багирова Наталья Сергеевна, доктор медицинских наук, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, лаборатория микробиологии, старший научный сотрудник

Ведущая организация:

Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита состоится «16» февраля 2021 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.08 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте организации: www.sechenov.ru

Автореферат разослан «___» _____ 202__ года

Учёный секретарь диссертационного совета,

доктор медицинских наук, профессор



Калужин Олег Витальевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Грибковые инфекции широко распространены среди пациентов со сниженным иммунитетом, в особенности у глубоко недоношенных новорождённых с очень низкой или экстремально низкой массой тела (ОНМТ и ЭНМТ) при рождении. Естественные обитатели кожных покровов, с которыми обычно ассоциированы грибковые заболевания кожи, стали проявляться как внутрибольничные возбудители системных микозов [Приходько Н.А., 2015]. К числу таких возбудителей относят дрожжевые грибы рода *Malassezia* из семейства *Malasseziaceae*. Различные виды *Malassezia* входят в состав нормальной микрофлоры человека и некоторых теплокровных животных, но они могут являться и причиной грибковых заболеваний [Антонов А.Г. 2013; Barton M. 2014]. Такие заболевания кожи, как отрубевидный лишай, фолликулит, себорейный и атопический дерматиты, распространены повсеместно, и определенная роль в их этиологии принадлежит *Malassezia* [Арзуманян В.Г., 2002; Miceli M.H., 2011].

В медицинской литературе описаны случаи фунгемии, вызванной *Malassezia furfur* (*M. furfur*), у пациентов с иммунодефицитом: у взрослых и детей [Iatta R., 2014; Ezenwa B., 2017; Greenberg R.G., 2012]. Основным фактором риска фунгемии, ассоциированной с *M. furfur* у пациентов со сниженным иммунитетом, является проведение парентерального питания с включением липидных растворов, которые необходимы для поддержания жизнедеятельности пациента, что в то же время является питательной средой для данного вида грибов.

Роль *M. furfur* в возникновении диссеминированной грибковой инфекции у пациентов с иммуносупрессией, с онкологическими заболеваниями, пациентов хирургического профиля, новорождённые дети с ОНМТ и ЭНМТ при рождении, остаётся во многом недооценённой из-за дефектов в микробиологической диагностике этих инфекций. *M. furfur* практически не культивируется на селективных для дрожжевых грибов плотных питательных средах, не размножается в стандартных питательных средах для гемокультивирования и соответственно не может быть выделена и идентифицирована. В связи с этим является актуальным усовершенствование микробиологической диагностики грибковых инфекций, вызванных *M. furfur*, и проведение динамического мониторинга за колонизацией слизистых у новорождённых, находящихся на лечении в отделениях хирургии, реанимации и интенсивной терапии (ОХРИТН) и реанимации и интенсивной терапии (ОРИТН), с целью получения объективных данных о значимости *M. furfur* в патологии новорождённых и проведения рациональной терапии и профилактики.

Степень разработанности темы

Идея исследования основана на анализе имеющихся в научной литературе работ по использованию современных культуральных, протеометрических и молекулярно-биологических

методов диагностики грибковых инфекций [Арзумян В.Г., 2002; Припутневич Т.В.; 2014; Kornienko M., 2016], а также обусловлена необходимостью усовершенствования микробиологической диагностики грибковых инфекций у новорождённых ОРИТН и ОХРИТН в связи с изменением видового состава выявляемых дрожжевых грибов. В структуре грибковых инфекций у пациентов неонатального профиля появились новые возбудители, ранее не имевшие клинического значения, и соответственно, возникла необходимость в их культивировании, идентификации и определении чувствительности к используемым антимикотическим препаратам [Galvis-Marín J.C., 2017; Iatta R., 2014]. Учитывая тот факт, что *M. furfur* не культивируется на обычных питательных средах, актуальным является разработка селективной среды для её выделения и определения чувствительности к антимикотикам.

Показано, что *MALDI-TOF-MS* является лучшим методом в идентификации дрожжевых грибов [Припутневич Т.В., 2014], при этом возможность определения грибов рода *Malassezia* этим методом требует уточнения.

Одним из современных способов идентификации микроорганизмов в настоящее время являются молекулярные методы, однако в мире существует небольшое количество тест-систем для детекции дрожжевых грибов и ни в одну из них не включены *Malassezia*, поэтому актуальным является разработка современных тест-панелей, основанных на методе ПЦР.

Проблема микробиологического мониторинга за возбудителями грибковых инфекций у новорождённых на протяжении последних десятилетий является нерешённой до настоящего времени. В связи с этим требуется определение методологии микробиологической диагностики грибковых инфекций и создание единых алгоритмов и протоколов обследования новорождённых, находящихся на выхаживании в ОРИТН и ОХРИТН.

Цель исследования: усовершенствовать микробиологическую диагностику и профилактику грибковых инфекций, вызванных *M. furfur* у новорождённых детей отделений реанимации и интенсивной терапии, в том числе хирургического профиля.

Задачи исследования:

1. Изучить эпидемиологические и клинические особенности колонизации *M. furfur* новорождённых отделений реанимации и интенсивной терапии, в том числе хирургического профиля.
2. Провести сравнительный анализ идентификации грибов *M. furfur* различными микробиологическими (биохимическим, масс-спектрометрическим и молекулярно-генетическим) методами.
3. Экспериментально определить и проанализировать чувствительность выделенных изолятов *M. furfur* к антимикотическим препаратам и антисептикам.

4. Модифицировать питательную среду Диксона для выделения дрожжевых грибов *M. furfur* и внедрить её в рутинную клиническую практику медицинских учреждений.
5. Создать коллекцию клинических штаммов *M. furfur*, охарактеризованную фенотипическими и молекулярно-генетическими методами.
6. Разработать и внедрить алгоритм микробиологического мониторинга и диагностики инфекций, вызванных *M. furfur*, у новорождённых, находящихся на лечении в отделениях реанимации и интенсивной терапии, в том числе хирургического профиля.

Научная новизна:

1. Впервые показана значимость *M. furfur* в течении инфекционного процесса у новорождённых отделений реанимации и интенсивной терапии: дрожжевые грибы *M. furfur* могут вызывать диссеминированную грибковую инфекцию у детей с ОНМТ и ЭНМТ при рождении и у новорождённых с врождёнными пороками развития после хирургических вмешательств.
2. Впервые проведена комплексная сравнительная оценка микробиологических методов диагностики *M. furfur* (культуральный метод с идентификацией по биохимическим показателям и MALDI-TOF-MS, количественная ПЦР): определена роль методов в диагностике грибковых инфекций у новорождённых, вызванных *M. furfur*, показаны преимущества и недостатки каждого из них.
3. Впервые экспериментальным путём изучена чувствительность клинических изолятов *M. furfur* выделенных от новорождённых к антимикотическим препаратам и показана устойчивость к флюконазолу (более 256 мкг/мл) и чувствительность к амфотерицину В (менее 2 мкг/мл).
4. Разработана селективная питательная среда для выделения *M. furfur* из клинического материала, на основе модифицированного агара по прописи Диксона с добавлением флюконазола в качестве селективной добавки с целью подавления роста других дрожжевых грибов (Заявка на патент № 2020116304 от 29 апреля 2020 года).
5. Впервые разработана тест-панель, основанная на методе количественной ПЦР, для идентификации дрожжевых грибов, включающая праймеры для видовой идентификации грибов рода *Malassezia*, в том числе вида *M. furfur* (РУ № РЗН 2020/11088 от 06.07. 2020 года).
6. Впервые создана и охарактеризована коллекция штаммов *M. furfur*, выделенных из клинического материала новорождённых и медицинского персонала. Штамм *Malassezia furfur* Y147 депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, РАН (Московская обл., г. Пущино) (Номер заявки 191-2-02.1-2181 от 04.03.2020 года).

Теоретическая и практическая значимость

Проведённое исследование показало целесообразность внедрения в практику клинической микробиологии разработанной (модифицированной) селективной питательной среды для выделения грибов *M. furfur*: состав питательной среды может быть предложен в дальнейшем к промышленному производству.

Показана недостаточная эффективность метода *MALDI-TOF-MS* анализа в рутинной практике микробиологических лабораторий для видовой идентификации дрожжевых грибов *M. furfur* на современном этапе.

Показана целесообразность использования разработанной и апробированной комплексной диагностической тест-панели, основанной на методе количественной ПЦР, для идентификации дрожжевых грибов, в состав которой входят родоспецифические праймеры для детекции грибов рода *Malassezia* и видоспецифические праймеры для детекции *M. furfur* с целью быстрой диагностики грибковых инфекций у новорождённых.

Собранная и охарактеризованная коллекция дрожжевых грибов *M. furfur* может быть применена в дальнейших научных исследованиях, а первый депонированный отечественный штамм *M. furfur* Y147 рекомендуется использовать как контрольный штамм при производстве питательных сред и контроле качества микробиологических исследований.

Материалы исследования и рекомендации нашли отражение в разработанном алгоритме микробиологического мониторинга, диагностики и профилактики инфекций, вызванных дрожжевыми грибами *M. furfur* у новорождённых, находящихся на выхаживании в отделениях хирургии, реанимации и интенсивной терапии и внедренном, в практику стационара 3-го уровня (утверждён заместителем директора по научной работе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России).

Методология и методы исследования:

1. Микроскопия выделенных культур дрожжевых грибов.
2. Микробиологическое исследование:
 - 2.1 Посев биологического материала на твёрдые и жидкие неселективные и селективные питательные среды с дальнейшей идентификацией выделенных изолятов дрожжевых грибов по биохимическим показателям и с помощью метода *MALDI-TOF-MS* анализа.
 - 2.2 ПЦР в режиме реального времени с использованием разработанной экспериментальной панели «МикозоСкрин» для детекции дрожжевых грибов, в состав которой входят родоспецифические праймеры для детекции грибов рода *Malassezia* и видоспецифические праймеры для детекции *M. furfur*.
 - 2.3 Определение чувствительности клинических изолятов *M. furfur* к противогрибковым препаратам и антисептикам (методом серийных разведений в бульоне и эпсилометрическим

методом с помощью E-тестов).

2.4. Секвенирование видоспецифического участка гена 26S рРНК грибов.

3. Статистическая обработка полученных результатов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. *Malassezia furfur* имеет этиологическое значение в развитии и течении инфекционного процесса у новорождённых детей отделений реанимации: грибы *M. furfur* могут вызывать от лёгкой до диссеминированной формы грибковой инфекции у детей с ОНМТ и ЭНМТ при рождении и у новорождённых с врождёнными пороками развития после хирургических вмешательств.

2. Усовершенствованы микробиологические методы диагностики дрожжевых грибов: культуральный метод – разработана селективная питательная среда для выделения *M. furfur*; метод *MALDI-TOF-MS* – пополнена база данных масс-спектрами различных штаммов *M. furfur*; молекулярно-генетический метод – разработана и апробирована комплексная диагностическая ПЦР тест-система для идентификации дрожжевых грибов, в состав которой входят родоспецифические праймеры для детекции грибов рода *Malassezia* и видоспецифические праймеры для детекции *M. furfur*; что позволило повысить качество и скорость диагностики грибковых инфекций, вызванных *M. furfur* у новорождённых.

3. Внедрение микробиологического мониторинга с включением в диагностический алгоритм исследование на *M. furfur* является обязательным условием для профилактики грибковых инфекций в отделениях реанимаций новорождённых, в особенности у детей с ЭНМТ и после оперативных вмешательств, получающих липидные растворы.

Внедрение результатов исследования в практику здравоохранения

Алгоритм микробиологического исследования на *M. furfur* используется в практической работе лаборатории микробиологии Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Алгоритм обследования новорождённых на *M. furfur* внедрён в работу Института неонатологии и педиатрии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Материалы диссертации используются в лекционном материале при обучении на курсах повышения квалификации врачей, обучении клинических ординаторов и аспирантов, на семинарах и конференциях, проводимых в Центре.

Степень достоверности результатов исследования

Для решения поставленных задач в работе использованы современные методы проведения анализа полученных данных. Результаты исследования достоверны, что определяется достаточным объёмом выборки анализируемых данных и их адекватной статистической обработкой. Научные положения документированы таблицами и рисунками.

Сделанные выводы строго обоснованы и вытекают из результатов проведённых собственных исследований.

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на:

- 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Amsterdam, Netherlands, 9-12 April 2016.
- The 6th Congress of Asia Pacific Society for Medical Mycology (APSM), Bali, Indonesia, 2016.
- Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, Amsterdam, Netherlands, 2018.
- XIX всероссийский научно-образовательный форум "Мать и дитя", Москва, 2018.
- Первый международный конгресс с международным участием "Лабораторные технологии в репродуктивной медицине и неонатологии: от науки к практике" (ЛАБРИН 2019), Москва, 2019.
- 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Amsterdam, Netherlands, 2019.
- Всероссийский конгресс по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии "XXII Кашкинские чтения", Санкт-Петербург, 2019.

Обсуждение диссертационной работы состоялось на межклинической конференции сотрудников Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии, Института репродуктивной генетики, Института неонатологии и педиатрии (протокол от 08.08.2020 года), заседании апробационной комиссии (протокол №27 от 07.09.2020 года) и Учёном Совете ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова» Минздрава России (протокол №13 от 18.09.2020г).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 03.02.03 – «микробиология», области исследований «Выделение, культивирование, идентификация микроорганизмов».

Личный вклад автора в исследование

Личный вклад автора осуществлялся на всех этапах исследования. Автором изучено этиологическое значение *Malassezia furfur* в развитии и течении инфекционного процесса у новорождённых детей отделений реанимации. Автором проведена комплексная сравнительная оценка микробиологических методов диагностики *M. furfur* (культуральный метод с идентификацией по биохимическим показателям и MALDI–TOF–MS, количественная ПЦР), экспериментально, на средах разработанных с учётом питательных особенностей гриба, изучена чувствительность клинических изолятов *M. furfur* к антимикотическим препаратам, создана и

охарактеризована коллекция штаммов *M. furfur*, выделенных из клинического материала новорождённых и медицинского персонала. Также автор участвовал в разработке и внедрении в практическое здравоохранение селективной питательной среды для выделения *M.furfur*.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 15 научных работ, в том числе 6 статей в рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (1 из них – в журнале, индексируемом в базе Scopus), 1 – заявка на патент РФ на изобретение.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, 5 глав, включающих обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований, заключения, списка используемой литературы, списка литературы, выводов, приложений.

Работа изложена на 137 страницах компьютерного набора, иллюстрирована 26 таблицами, 18 рисунками и 4 приложениями. Указатель литературы состоит из 44 отечественных и 54 зарубежных источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Материалы и методы исследования

Исследование проводили в период с 2015 по 2019 годы на базах Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии (руководитель д.м.н., Припутневич Т.В.) и Института неонатологии и педиатрии (директор д.м.н., профессор Зубков В.В.) ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор академик РАН, д.м.н., профессор Сухих Г.Т.).

В исследование были включены новорождённые дети – пациенты ОРИТН и ОХРИТН, находившиеся на лечении более 7 дней. Контингент пациентов ОРИТН представлен преимущественно недоношенными и глубоконедоношенными новорождёнными с ОНМТ и ЭНМТ при рождении, а ОХРИТН – новорождёнными с врождёнными пороками развития, которым проводилось хирургическое лечение.

В период с 2015 по 2018 год проведено микробиологическое обследование 4008 новорождённых: 65% (n=2604) из ОРИТН и 35% (n=1404) из ОХРИТН (Табл.1).

Объём проведённых исследований

| 2015-2018 гг. | | | | | | | |
|--|--------|--|--------|---|--------|---|--|
| Всего обследовано новорожденных | | Исследовано 555 проб аутопсийного материала от 147 пациентов | | Обследованы 65 сотрудников отделений реанимации | | Исследовано 24662 образцов биологического материала от 4008 пациентов | |
| ОРИТН | ОХРИТН | ОРИТН | ОХРИТН | ОРИТН | ОХРИТН | слизистых оболочек ЖКТ, мазки слизистой зева | клинически значимые локусы (кровь, ликвор, моча и др.) |
| 2604 | 1404 | 61 | 86 | 22 | 43 | 19532 | 5130 |
| Новорождённые с положительными результатами микробиологических исследований на <i>M. furfur</i> (387 новорожденных (9,7%)) | | | | | | | |
| ОРИТН | | | | ОХРИТН | | | |
| 169 (56%) | | | | 218 (44%) | | | |

При анализе клинических данных о пациенте учитывали информацию, указанную в направлениях на микробиологическое исследование, в электронных историях болезни системы «Медиалог» и посмертных эпикризах.

Всего выделено 1365 изолятов дрожжевых грибов. Культуральное исследование проводили с использованием декстрозного агара Сабуро (OXOID, United Kingdom) с 0,5% хлорамфеникола, для выделения *M. furfur* использовали плотный модифицированный агар по прописи Диксона и разработанную нами селективную среду для выделения *M. furfur*. Инкубировали грибы в термостате при температуре 30°C в течение 72 часов.

На первом этапе нашего исследования стало очевидным, что в традиционно используемых бактериологических флаконах для гемокультивирования *M. furfur* может сохранять свою жизнеспособность, но не размножаться, поэтому существующие бактериологические гематологические анализаторы оказались непригодными для культивирования *M. furfur*. Для решения данной проблемы в дополнение к обычным флаконам со средой для гемокультивирования, мы стали использовать жидкую питательную среду собственного изготовления по прописи Диксона (mDixon): экстракт солода – 3,6%, пептон – 0,6%, соли

желчных кислот – 2,0%, Твин 40 – 1,0%, глицерол – 0,2%, олеиновая кислота – 0,2%, агар – 1,2%, левомицетин – 0,08%, рН - 5,8 – 6,1). При посеве содержимого венозных катетеров и мочи дополнительно использовали жидкую среду Диксона.

Образцы крови, мочу, спинномозговую жидкость дополнительно помещали в 5 мл жидкой питательной среды по прописи Диксона в объеме 0,5-1 мл, инкубировали в течение 5 суток, ежедневно проводили высевы на плотную питательную среду Диксона и на разработанную нами селективную среду для выделения *M. furfur* с дальнейшей идентификацией выросших колоний.

Видовая принадлежность к *M. furfur* подтверждалась характерными морфологическими признаками выросших колоний, по биохимическим показателям с помощью автоматического бактериологического анализатора Vitek 2 Compact 30 (bioMerieux, Франция), протеомными методами (MALDI-TOF-MS с помощью масс-спектрометра Autoflex III с программным обеспечением MalDI Biotyper, версии 3.0 (Bruker Daltonics, Германия), методом ПЦР в режиме реального времени, с использованием видоспецифических праймеров (ДТ-964 («ДНК-Технология», Россия)) и путём секвенирования по Сенгеру видоспецифического участка гена 26S рРНК.

Определение чувствительности клинических изолятов M. furfur к противогрибковым препаратам

Для исследования отобраны 30 изолятов *M. furfur*, выделенных из крови, мочи, аутопсийного материала, зева и кала новорождённых. Определяли минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) методом серийных разведений в бульоне с применением чистых субстанций антимикотических препаратов и с помощью Е-тестов. Для контроля качества использовали референтные штаммы *M. furfur* ATCC 14521, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, клинический штамм *M. furfur*. Постановка тестов проведена в соответствии с Клиническими рекомендациями по определению чувствительности к антимикробным препаратам. Версия - 2018-03.

Чувствительность *M. furfur* определяли к антимикотическим препаратам, представленным в виде чистых субстанций: амфотерицин В (Sigma Aldrich, Швеция), каспофунгин, флуконазол и микафунгин (EPRS, Франция) и тест - полосок Е-тест (Liofilchem, Италия).

Для постановки чувствительности *M. furfur* к антимикотическим препаратам методом последовательных микроразведений использовали две среды:

- Сабуро декстрозный бульон (OXOID, UK) обогатённый 1% Твином 40 (Sigma, Switzerland) и 0,2% олеиновой кислотой.
- Жидкий бульон PRMI 1640 с добавлением 2% глюкозы (в качестве буфера к данной среде использовали 3-N-MOPS в конечной концентрации 0,165 моль/л при рН 7,0), обогатённый 1% Твином 40 и 0,2% олеиновой кислотой.

Для постановки чувствительности *M. furfur* к антимикотическим препаратам Е-тестами использовали модифицированные нами питательные среды:

- агар Мюллера-Хинтон (МХ) (OXOID, United Kingdom), к которому были добавлены метиленовый синий (0,1 г в 20 мл дистиллированной воды), раствор глюкозы (0,1 г в 20 мл дистиллированной воды) + 1% Твин 40 (Sigma, Switzerland) и 0,2% олеиновой кислоты (в нашей модификации).
- жидкий PRMI 1640 с 2% глюкозой (в качестве буфера к данной среде использовали MOPS в конечной концентрации 0,165 ммоль\л при pH 7,0) + питательный агар (OXOID, United Kingdom), обогащённый 1% Твином 40 (Sigma, Switzerland) и 0,2% олеиновой кислотой.

Определение чувствительности *M. furfur* к антисептикам

Антимикробную активность определяли согласно Методическим указаниям (МУ) 3.5.1.3439-17.

Статистическая обработка полученных результатов

Результаты исследования обрабатывали с помощью программы STATISTICA 10 (StatSoft Inc., USA) для Windows версия 6.0 и сайт <http://medstatistic.ru>. Использовали непараметрические и параметрические методы.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Ретроспективный анализ особенностей колонизации *M. furfur* новорождённых, находящихся на лечении в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТН) и отделения хирургии новорожденных (ОХРИТН)

С 2000 года в структуре высеваемости грибов, выделенных у новорождённых ОРИТН и ОХРИТН, преобладали дрожжевые грибы *C. albicans*, с 2007 года на фоне широкого профилактического применения флуконазола стали преобладать грибы *Candida non-albicans* видов (*C. famata*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*), что потребовало провести смену антимикотической терапии на эхинокандины, на фоне широкого использования которых с 2012 года у детей стали выявляться и позже доминировать дрожжевые грибы *M. furfur*. Начиная с 2014 года, *M. furfur* стала преобладать в структуре дрожжевых грибов, выделяемых у пациентов ОРИТН и ОХРИТН, и в целом составила 76% (1365/1808), а частота выделения - 5.5 на 100 выполненных анализов.

Частота выделения *M. furfur* у новорождённых в ОРИТН на протяжении четырёх лет оставалась относительно постоянной и составляла около 10% (10% - в 2015 году, 12% - в 2016г., 10% - в 2017г., 7,7% - в 2018 году). При этом в ОРИТН частота выявления *M. furfur* была с тенденцией к нарастанию (от 6,4 до 7,8%), тогда как в ОХРИТН в первые три года наблюдения этот показатель был в 2,5 и более раз выше (18,5%, 32% и 15%) и только в 2018 году произошло снижение до 7,6%, что соответствовало показателям в ОРИТН.

За четыре года проспективного наблюдения по данным историй развития новорожденных клинический диагноз инвазивный микоз (ИМ) выставлен 13 новорожденным детям: у 10 детей этиология процесса связана с грибами рода *Candida* и 3 ребенка с ЭНМТ с *M.furfur*.

Следует отметить тот факт, что результаты микробиологических исследований инфекций, вызванных *M. furfur*, чаще всего не находили отражения в клиническом или патологоанатомическом диагнозе. В определённой мере это можно объяснить новизной и неизученностью *M. furfur* в патологии новорожденных, а также с более привычной возможностью для врачей связать тяжесть состояния ребёнка с другими причинами. Поэтому при наличии клинических данных, косвенно подтверждающих этиологическую роль *M. furfur* в заболеваниях у новорожденных детей, мы считали необходимым провести анализ эпидемического процесса у новорожденных в ОРИТН и ОХРИТН в зависимости от результатов микробиологического исследования. С этой целью все дети с положительными результатами на *M. furfur* в зависимости от биологического локуса выделения гриба были разделены на три группы:

- I – новорожденные дети, имеющие изолированную фунгемию, фунгурию или катетер-ассоциированную фунгемию без колонизации слизистых оболочек ЖКТ *M. furfur*;
- II – новорожденные, имеющие *M. furfur* - фунгемию / фунгурию / катетер-ассоциированную фунгемию на фоне колонизации слизистых оболочек ЖКТ *M.furfur*;
- III - новорожденные, у которых *M. furfur* колонизировала только ЖКТ и не была обнаружена ни в крови, ни в моче, ни в центральном венозном катетере.

У новорожденных I и II групп полученный результат микробиологических исследований мы интерпретировали как «инвазивный микоз», а у новорожденных III группы обнаружение *M.furfur* в ЖКТ расценивали как «колонизация». Таким образом, нами установлено, что более чем у половины детей отмечалась «колонизация» только слизистых оболочек ЖКТ без признаков диссеминации и развития инвазивного микоза (III группа) – 61,5% в 2015 году, 64,7% - в 2016г., 54,6% в 2017г. и 75% в 2018 году соответственно.

Диссеминацию процесса – «инвазивный микоз» (группа I и II) обнаруживали у 25-38,5% новорожденных с положительными результатами микробиологического исследования, при этом чаще всего она наблюдалась на фоне колонизации ЖКТ. Соотношение между детьми, у которых отмечалась только колонизация ЖКТ (группа III), с новорожденными, у которых отмечалась диссеминация (группа I+II) на протяжении всего исследования было сопоставимо и составляло 2:1. У детей с ОНМТ и ЭНМТ при рождении диссеминация процесса наблюдалась в 45% случаев, в то время как в двух других группах (1500-2500 и более 2500 граммов) была реже и составляла 28% и 23% соответственно). Отмечено, что среди новорожденных с диссеминацией грибковой инфекции 57% (74/129) были дети с ОНМТ и ЭНМТ при рождении.

Частота выделения *M.furfur* у детей после оперативных вмешательств не имеет выраженных достоверных различий (Табл.2). Установлено, что отношение шансов диссеминации *M. furfur* среди новорождённых после оперативного лечения в 1,784 раза выше, чем среди новорождённых без оперативных вмешательств. Наблюдаемая зависимость является статистически значимой.

Таблица 2.

Частота выделения *M. furfur* у детей после оперативных вмешательств (абс.)

| | Новорождённые после хирургических операций | Новорождённые без оперативных вмешательств | Всего |
|-------|---|---|--------------|
| I+II | 61 | 69 | 130 |
| III | 123 | 134 | 257 |
| Всего | 184 | 203 | 387 |

Учитывая особенность грибов *M. furfur* колонизировать и здоровых людей, не вызывая клинических проявлений, нами параллельно проведено обследование сотрудников отделений, которые потенциально при несоблюдении санитарных правил могли стать причиной контаминации детей, инфузионной среды для парентерального питания. Обследование сотрудников проводилось однократно. Для исследования брали соскобы с кожи заушных складок у 65 сотрудников, из них 22 – из отделения ОХРИТН и 43 – из ОРИТН.

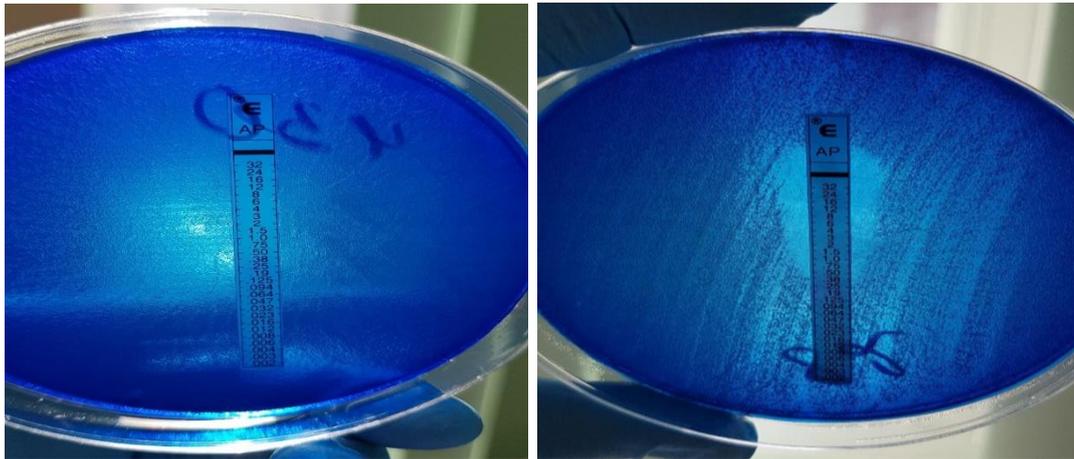
Следует отметить невысокую частоту носительства грибов у сотрудников, при анализе микробиологических исследований *M. simpodialis* была у двух из 65 человек (3%) и *M. furfur* у трёх из 65 (4,6%) сотрудников.

Сравнительный анализ различных методов идентификации грибов *M. furfur* (биохимический, масс-спектрометрический и молекулярно-генетический)

Достоверная идентификация *M. furfur* методом *MALDI-TOF-MS* анализа получена только у 3-х из 50 выделенных изолятов, биохимическим методом подтверждена в 40% (20/50) и методом ПЦР в 100% (430/430) случаев. Таким образом, метод идентификации с помощью ПЦР из выросшей колонии и детекции в биологическом материале пациентов обладал большей чувствительностью по сравнению с остальными методами.

Анализ чувствительности in vitro к антимикотическим препаратам и антисептикам *M. furfur*

Из 30 исследованных изолятов *M. furfur* два не были культивированы на данной среде, в том числе контрольный штамм *M. furfur* ATCC 14521. Повторные исследования высева контрольного штамма на среду МХ с метиленовым синим, Твином 40 и олеиновой кислотой не дали положительного результата. В результате исследования учёт полученных данных проведён без контроля (рис. 2).



А - контрольный штамм

Б - клинический штамм

Рисунок 2. - Результат чувствительности *M. furfur* к амфотерицину В контрольного штамма (А) и клинического штамма (Б)

У 28 исследованных штаммов МИК к флуконазолу составили более 256 мкг/мл, к каспофунгину – более 32 мкг/мл, к микафунгину – более 32 мкг/мл, что свидетельствовало о высокой устойчивости к вышеперечисленным антимикотикам. МИК амфотерицина В у этих штаммов находились в пределах диапазона от 0,25 до 0,75 мкг/мл, что свидетельствует о чувствительности изученных штаммов к амфотерицину В.

Дополнительно нами проведено исследование по определению чувствительности у 15 из 29 штаммов в соответствии с рекомендациям EUCAST на среде PRMI 1640 с MOPS, в нашей модификации с Твином 40 и олеиновой кислотой. Из 15 исследованных штаммов все были культивированы на данной среде, в том числе и контрольный штамм *M. furfur* ATCC 14521. Определение чувствительности у 15 штаммов с использованием E-тестов с антимикотиками на среде PRMI 1640 показало следующие результаты: МИК к флуконазолу штамма *M. furfur* ATCC 14521 составила 2 мкг/мл; МИК к флуконазолу 14 штаммов *M. furfur* составила более 256 мкг/мл, что свидетельствует об устойчивости к данному антимикотику. Все 15 штаммов имели МИК к микафунгину и каспофунгину более 32 мкг/мл, что было интерпретировано нами как наличие устойчивости у исследованных штаммов к антимикотическим препаратам. МИК амфотерицина у штаммов *M. furfur* отличались от МИК на среде МХ с метиленовым синим и составляли от 0,38 мкг/мл до 24 мкг/мл. Исходя из инструкции по медицинскому применению амфотерицина В при стандартном дозировании, суточная доза составляет 1,5 мг/кг, а максимальная концентрация в плазме после введения суточной дозы достигает 0,5-2 мкг/мл, то штаммы с МИК более 2 мкг/мл считали устойчивыми. Необходимо учитывать, что истинные и утвержденные EUCAST и CLSI МИК для *M. furfur* в настоящее время не определены, при этом мы расценили выявленные высокие МИК как устойчивость штаммов и рекомендуем принимать во внимание данный факт при назначении антимикотической терапии.

Разработка селективной питательной среды для культивирования *M. furfur*

Экспериментальным путём, проведя ряд исследований, было подобрано антимикотическое средство, для подавления роста дрожжевых грибов рода *Candida* – флюконазол в концентрации 32 мг\л, в результате чего нами модифицирована питательная среда по прописи Диксона для культивирования *M.furfur*. Выполнено исследование по выбору оптимального режима автоклавирования при ручном и автоматическом приготовлении среды и по подбору оптимальных компонентов: заменен экстракт солода на подобранную концентрацию глюкозы и мясной пептон заменен на казеиновый.

Оптимальной средой для культивирования *M. furfur* является селективная питательная среда в состав которой входят: экстракт солода - 3,6%; пептон - 0,6%; соли желчных кислот - 2,0%; Твин 40 - 1,0%; глицерол - 0,2%; олеиновая кислота - 0,2%; агар - 1,2%; левомецетин - 0,08%; флюконазол – 32 мг/л; рН - 5,8 – 6,1 (Заявка на патент №2020116304 от 29.04.2020г.). На разработанной селективной питательной среде показан рост 400 клинических изолятов *M.furfur*. Среда с 97% вероятностью позволяет выделять *M.furfur* из образцов биологического материала

Описание коллекции клинических штаммов *M. furfur* на основании фенотипических и молекулярно-генетических свойств

В ходе исследования создана и охарактеризована коллекция, состоящая из 384 клинических штаммов *M. furfur*, выделенных у новорождённых и медицинского персонала, смывов из окружающей среды. Все штаммы хранятся в музее микроорганизмов лаборатории микробиологии Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова» Минздрава России при t-80⁰С. Один штамм *Malassezia furfur* Y147 в качестве эталонного задепонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, РАН (г.Пушино). Эталонный штамм выделен из крови новорождённого ОРИТН с ЭНМТ при рождении (800 граммов), видовая принадлежность подтверждена методом секвенирования видоспецифического участка гена 26S рРНК.

Алгоритм микробиологического мониторинга и диагностики инфекций, вызванных *M.furfur*, у новорождённых, находящихся на лечении в отделениях реанимации и интенсивной терапии, в том числе хирургического профиля

В результате поведенной работы и анализа данных нами был определен и предложен алгоритм мониторинга грибов *M. furfur* у новорождённых детей, находящихся на лечении в ОРИТН и ОХРИТН.

Алгоритм микробиологического мониторинга на *M. furfur* новорождённых ОРИТН и ОХРИТН



При проведении микробиологического исследования посеvy кала, зева, содержимого интубационных трубок и другого биологического материала необходимо производить на селективную среду для выделения *M. furfur* с последующей инкубацией до 72 часов при температуре 30-36°C.

Алгоритм микробиологической диагностики *M. furfur* из образцов биологического материала



Микробиологические исследования мочи, крови и других биологических жидкостей

рекомендуется производить на селективную питательную среду для выделения *M. furfur* и на жидкий бульон Диксона (качественный метод), инкубировать до 72 часов при 30-36°C, высевы из бульона проводить на твёрдую селективную питательную среду для выделения *M. furfur* с дальнейшей идентификацией выросших колоний следующими методами: микроскопия по Граму и метиленовым синим, биохимическим методом. При отсутствии положительных результатов показана идентификация методом ПЦР, с использованием тест-системы «МикозоСкрин» (ДНК-Технология).

ВЫВОДЫ:

1. В результате микробиологического мониторинга в ОРИТН и ОХРИТН отмечена высокая высеваемость *M. furfur* – 76% от всех выделенных грибов (1365/1808): *M. furfur* выявлена у 9,7% обследованных новорождённых (387/4008), что говорит о клинической значимости данного микроорганизма. Диссеминация процесса подтверждена у 25-38,5% новорождённых с положительными результатами исследования, при этом чаще всего она наблюдалась на фоне колонизации ЖКТ.
2. Доказано, что очень низкая и экстремально низкая масса тела при рождении и оперативные вмешательства являются важными факторами риска по развитию системных микозов вызванных *M. furfur* у новорождённых.
3. Показана необходимость усовершенствования метода *MALDI-TOF-MS* анализа и биохимических методов для видовой идентификации дрожжевых грибов вида *M. furfur*. С целью быстрой диагностики грибковых инфекций у новорождённых целесообразно использование комплексной диагностической тест-системы, основанной на методе количественной ПЦР для идентификации дрожжевых грибов, в состав которой входят видоспецифические праймеры для детекции *M. furfur*.
4. Экспериментально на средах, разработанных с учётом питательных особенностей гриба, с использованием метода серийных разведений в микропланшетах и Е-тестов, показана высокая устойчивость клинических изолятов *M. furfur* к флуконазолу (более 256 мкг/мл), каспофунгину (более 32 мкг/мл), микафунгину (более 32 мкг/мл) и чувствительность к амфотерицину В (0,25-0,75 мкг/мл).
5. Разработанная селективная питательная среда, в состав которой входит: экстракт солода - 3,6%; пептон - 0,6%; соли желчных кислот - 2,0%; твин 40 - 1,0%; глицерол - 0,2%; олеиновая кислота - 0,2%; агар - 1,2%; левомецетин - 0,08%; флюконазол – 32 мг/л; рН - 5,8 – 6,1, в 97% случаев позволяет культивировать дрожжевые грибы вида *M. furfur* из любого клинического материала.

6. Созданная коллекция изолятов *M. furfur* и депонирован контрольный штамм *Malassezia furfur* Y147 могут быть использованы для контроля качества питательных сред, проведения рутинных и научных микробиологических исследований.

7. Дополнение к стандартному набору питательных сред селективной среды для выделения *M. furfur* и внедрение ПЦР метода с использованием тест-системы «МикозоСкрин» позволили повысить эффективность микробиологической диагностики новорождённых с подозрением на развитие грибковой инфекции.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ:

1. Микробиологический мониторинг *M. furfur* в ОРИТН и ОХРИТН новорождённых детей перинатальных центров является целесообразным и должен стать повседневной практикой. Целью его должна стать профилактика госпитальных инфекций вызванных *M. furfur*. Кратность проведения мониторинга должна зависеть от факторов риска, к которым следует относить: ОНМТ и ЭНМТ у новорождённых при рождении, парентеральное питание липидными растворами, длительно поставленный центральный и периферический венозный катетер, длительная антибактериальная терапия, оперативные вмешательства.

2. Микробиологический мониторинг должен включать плановое слежение за колонизацией слизистых ЖКТ новорождённых (мазки из зева, кал на культуральное исследование). Средой выбора рекомендовано считать селективную среду для выявления *M. furfur*. При подозрении на развитие системного воспалительного процесса следует проводить микробиологическое исследование патологического материала, взятого из предполагаемого очага инфекции (ликвор, моча, трахеальный аспират, содержимое кожных элементов и т.д.). Культивирование рекомендовано проводить на селективной среде для выявления *M. furfur*, а также на жидком бульоне Диксона с последующим высевом через 24, 48, 72 часа на селективную среду для выделения *M. furfur*.

3. Для выделения *M. furfur* разработана и рекомендована к применению в рутинной практике микробиологических лабораторий селективная питательная среда.

4. В рутинной практике микробиологических лабораторий для видовой идентификации дрожжевых грибов *M. furfur* на современном этапе не рекомендовано использование метода MALDI-TOF-MS анализа и биохимических методов. Показана целесообразность использования разработанной комплексной ПЦР тест-системы «МикозоСкрин», дающей возможность быстро и точно идентифицировать *M. furfur*.

5. Дезинфицирующий раствор, содержащий в качестве действующих веществ 1-пропанол - 30%, 2-пропанол - 45% и октенидин дигидрохлорид - 0,1 %, показал антисептическое действие

на изолятах *M. furfur* и может быть рекомендован для обработки рук медицинского персонала для предотвращения распространения грибов *M. furfur*. Антисептик в качестве действующих веществ в состав которого входит перекись водорода – 15%, полигексаметиленгуанидина гидрохлорид – 12%, может быть рекомендован для дезинфекции медицинских поверхностей для предотвращения распространения грибов *M.furfur*.

6. Предложенный алгоритм микробиологической диагностики инфекций, связанных с *M.furfur*, стандартизирует и оптимизирует микробиологическую диагностику грибковых инфекций.

7. Депонированный контрольный штамм *M. furfur* Y147 может быть рекомендован к использованию в научных целях и как контрольный штамм для нужд микробиологических лабораторий.

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Lyubasovskaya L. Association between fungemia and colonization of gastrointestinal tract of the infants. / L.Lyubasovskaya, T.Priputnevich, **J. Rodchenko**, A. Gordeev, D.Dubodelov, A. Melkumyan, V. Muravieva, V. Zubkov // Abstracts # P 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID).- Netherlands, Amsterdam.- April 2016.- P. 9-12.
2. Припутневич Т.В. Использование геля с бактериофагами для санации носоглотки у носителей золотистого стафилококка среди персонала родовспомогательного учреждения. /Припутневич Т.В., **Родченко Ю.В.**, Любасовская Л.А., Чубаров В.В., Зубков В.В., Шмаков Р.Г.// Акушерство и гинекология. – 2016. - №3.- С. 111-115.
3. Любасовская Л.А. Колонизация центрального венозного катетера у новорожденных отделения реанимации и интенсивной терапии: факторы риска и клиническая значимость./Любасовская Л.А., Припутневич Т.В., Никитина И.В., Корниенко М.А., **Родченко Ю.В.**, Гордеев А.Б., Ионов О.В., Зубков В.В., Ильина Е.Н., Дубоделов Д.В., Сафановская А.А., Мелкумян А.Р.// **Акушерство и гинекология.**- 2016.- №12. С. 114-120.
4. Антонов А.Г. Инвазивный кандидоз у новорожденных (клинические рекомендации) /Антонов А.Г., Байбарина Е.Н., Балашова Е.Н., Володин Н.Н., Дегтярев Д.Н., Зубков В.В., Иванов Д.О., Ионов О.В., Карпова А.Л., Киртбая А.Р., Климко Н.Н., Крючко Д.С., Ленюшкина А.А., Любасовская Л.А., Нароган М.В., Никитина И.В., Припутневич Т.В., Приходько Н.А., **Родченко Ю.В.**, Рындин А.Ю., Чубарова А.И.// **Неонатология.**- 2017.- №4.- С. 120-132.
5. Ионов О.В. Раствор хлоргексидина биглюконата и этиловый спирт: какой из антисептиков эффективнее у новорожденных? / Ионов О.В., Никитина И.В., Киртбая А.Р., Балашова Е.Н., Ленюшкина А.А., Любасовская Л.А., **Родченко Ю.В.**, Припутневич Т.В., Зубков В.В., Дегтярев Д.В.// **Неонатология**, 2017, №1, С. 79-85.

6. Ионов О.В. Сравнение эффективности раствора хлоргексидина биглюконата и этилового спирта при использовании в качестве антисептиков у новорожденных./ О.В., Никитина И.В., Киртбая А.Р., Балашова Е.Н., Ленюшкина А.А., Любасовская Л.А., **Родченко Ю.В.**, Припутневич Т.В., Зубков В.В., Дегтярев Д.Н.// Тезисы X Юбилейного регионального научно-образовательного форума Мать и Дитя 28-30 июня, 2017 г. Геленджик, С. 151.
7. Ионов О.В. Оценка эффективности растворов кожных антисептиков октенидина гидрохлорида и феноксиэтанола и 70% раствора этилового спирта у новорожденных./ Ионов О.В., Никитина И.В., Соколова Е.В., Припутневич Т.В., Любасовская Л.А., **Родченко Ю.В.**// Тезисы X Всероссийского образовательного конгресса Анестезия и реанимация в акушерстве и неонатологии, 22-24 ноября, 2017, Москва, С. 40-41.
8. Rodchenko J.V. Morbidity of fungal infections caused by *Malassezia furfur* in neonatal intensive care units./ **Rodchenko J.V.**, Lyubasovskaya L.A., Gordeev A.B., Isaeva E.L., Dubodelov D.V., Zubkov V.V., Ionov O.V., Nikitina I.V., Podurovskaya J.L., Burov A.A., Pripudnevich T.V, Sukhikh G.T.// Medical Mycology, 2018, 56, S71 (Impact factor (2016): 2.377).
9. Muravieva V.V. Comparative analysis of yeast species identification using phenotypic methods and real-time PCR./ Muravieva V.V., Gordeev A.B., Lyubasovskaya L.A., **Rodchenko J.V.**, Ogneva L.V., Donnikov A.E., Kirillov M.Y., Dubodelov D.V., Trofimov D.Y., Pripudnevich T.V., Sukhikh G.T.// Medical Mycology, 2018, 56, S68 (Impact factor (2016): 2.377).
10. Ионов О.В. Сравнение эффективности 0,1% раствора октенидина дигидрохлорида и 2% феноксиэтинола и 70% раствора этилового спирта в качестве кожных антисептиков при катетеризации вен у новорожденных./ Ионов О.В., Никитина И.В., Соколова Е.В., Припутневич Т.В., Любасовская Л.А., **Родченко Ю.В.**, Киртбая А.Р., Балашова Е.Н., Зубков В.В., Дегтярев Д.Н.// **Неонатология: новости, мнения, обучение.**-2018.-Т.6.-№ 3(21).-С.99-108.
11. Степанова А.А. Морфологические особенности дрожжевых клеток изолятов *Malassezia furfur*. /Степанова А.А., Богданова Т.В., **Родченко Ю.В.**, Мелкумян А.Г., Любасовская Л.А., Игнатъева С.М., Алексеев А.Ю., Гольцева И.С., Босак И.А., Пчелин И.М.// **Проблемы мед. микологии.** – 2019. – Т. 21. № 4. - С. 43-47.
12. L. Lyubasovskaya *Malassezia furfur* as one of the causes of invasive mycoses in neonatal intensive care unit patients: analysis of risk factors. / L. Lyubasovskaya, **J. Rodchenko**, L. Lyubasovskaya, O. Ionov, V. Zubkov, T. Pripudnevich.// Abstracts # P 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. - Amsterdam, Netherlands. – 2019. - P2254.
13. Родченко Ю.В. *Malassezia furfur* в отделениях реанимации и интенсивной терапии новорожденных (обзор литературы) / **Родченко Ю.В.**, Припутневич Т.В., Зубков В.В.// **Проблемы медицинской микологии.** -2019.-№ 21(3).- С. 9-14.

14. Антонов А.Г. Клинические рекомендации. Неонатология./ Антонов А.Г., Авдеева О.В., Бабак О.А., Балашова Е.Н., Байбарина Е.Н., Буров А.А., Володин Н.Н., Горев В.В., Горелик К.Д., Грошева Е.В., Дегтярева А.В., Дегтярев Д.Н., Дегтярева М.Г., Жиркова Ю.В., Зубков В.В., Припутневич Т.В., **Родченко Ю.В.** и др. // М.: Общество с ограниченной ответственностью Издательская группа "ГЭОТАР-Медиа".- 2019.- С. 320.
15. Слукин П.В. Оценка эффективности препаратов дезинфектантов и антисептиков в отношении клинических штаммов *Malassezia furfur*/ Слукин П.В., **Родченко Ю.В.**, Ермоленко З.М., Любасовская Л.А., Фурсова Н.К., Припутневич Т.В.// Проблемы медицинской микологии. – 2019.- Т. 21, №2.- С. 129.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

| | |
|--------------|---|
| ЖКТ | Желудочно-кишечный тракт |
| МИК | Минимальную ингибирующую концентрацию |
| МХ | Мюллера-Хинтона |
| ОРИТН | Отделение реанимации и интенсивной терапии новорожденных |
| ОХРИТН | Отделение хирургии, реанимации и интенсивной терапии новорождённых |
| ПЦР | Полимеразная цепная реакция |
| РНК | Рибонуклеиновая кислота |
| ЭНМТ | Экстремально низкая масса тела |
| ATCC | American Type Culture Collection (Американская коллекция типовых культур) |
| EUCAST | European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing |
| CLSI | Clinical and Laboratory Standards Institute (Институт клинических и лабораторных стандартов) |
| MALDI-TOF-MS | Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass-Spectrometry (Матрично-активированная лазерная десорбционная/ионизационная времяпролетная масс-спектрометрия) |
| MOPS | 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid |
| PRMI | Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium |