

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ И ПЕРИНАТОЛОГИИ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА В.И. КУЛАКОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Родченко Юлия Валериевна

**Грибы *Malassezia furfur* у новорождённых отделений хирургии, реанимации и
интенсивной терапии: оптимизация микробиологической диагностики**

03.02.03 – Микробиология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:
доктор медицинских наук
Припутневич Татьяна Валерьевна
доктор медицинских наук, профессор
Зубков Виктор Васильевич

Москва - 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. Обзор литературы.....	16
1.1.Современные представления о грибковых инфекциях у новорождённых, отделений реанимации и интенсивной терапии, в том числе хирургического профиля.....	16
1.1.1.Общие положения о грибковых инфекциях.....	16
1.1.2.Классификация микозов.	19
1.1.3.Характеристика <i>M. furfur</i> как возбудителя грибковых инфекций (морфология и патогенез)..	22
1.2.Современные принципы диагностики грибковых заболеваний новорождённых	26
1.3.Методы определения чувствительности дрожжевых грибов к антимикотическим препаратам и антисептикам.....	32
ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования.....	37
2.1.Общий объём проведённых исследований.....	37
2.2.Клинический материал.....	43
2.3.Микробиологические методы диагностики грибковых инфекций.....	45
2.3.1. Микроскопическая диагностика.....	45
2.3.2. Микробиологическое исследование.....	45
2.3.3.Определение чувствительности клинических изолятов <i>M. furfur</i> к противогрибковым препаратам.....	47
2.3.4.Определение чувствительности клинических изолятов <i>M. furfur</i> к антисептикам.....	52
2.4.Протеомные методы в идентификации дрожжевых грибов.....	53
2.5. Молекулярно - генетические методы исследования изолятов	54
2.6.Статистическая обработка полученных результатов.....	56
ГЛАВА 3. Результаты собственных исследований.....	59

3.1.Ретроспективный анализ эпидемиологических и клинических особенностей колонизации <i>M. furfur</i> новорождённых, находящихся на лечении в отделении реанимации и интенсивной терапии, в том числе хирургического профиля.....	59
3.2. Сравнительный анализ различных методов идентификации грибов <i>M. furfur</i> (биохимический, масс-спектрометрический и молекулярно-генетический).....	67
3.3.Анализ чувствительности in vitro к антимикотическим препаратам и антисептикам клинических штаммов <i>M. furfur</i>	73
3.4.Разработка селективной питательной среды для культивирования грибов <i>M.furfur</i>	82
ГЛАВА 4.Описание коллекции клинических штаммов <i>M. furfur</i> , на основании фенотипических и молекулярно-генетических свойств.....	97
ГЛАВА 5.Алгоритм микробиологического мониторинга и диагностики инфекций, вызванных <i>M. furfur</i> , у новорождённых отделений реанимации и интенсивной терапии, в том числе хирургического профиля.....	103
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	109
ВЫВОДЫ.....	114
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	115
СПИСОК ИСПОЛЪЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	117
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	119
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	132

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Грибковые заболевания 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. Тенденции к уменьшению заболеваемости микозами в настоящее время не выявлено [1, 8, 17]. В качестве внутрибольничных возбудителей, приводящих к системным микозам, стали выступать естественные обитатели кожи, ассоциированные с грибковыми заболеваниями. К таким возбудителям можно отнести грибы рода *Malassezia*, семейство *Malasseziaceae*. Ранее представители этого рода грибов причислялись к роду *Pityrosporum* [2, 3, 10, 99]. Большая часть видов рода *Malassezia* являются диморфными грибами и могут существовать в двух формах: дрожжевой и мицеллярной. В культуре *in vitro* основной формой является дрожжевая форма, но у ряда видов образуются и гифы мицелия. Виды рода *Malassezia* способны расти в микроаэрофильных и анаэробных условиях, формировать биопленки на поверхностях различных материалов, что крайне актуально в условиях отделения реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), поскольку пребывание в стационарах данного профиля сопряжено с проведением пациентам большого количества инвазивных процедур, использованием сосудистых катетеров и искусственных имплантов [7]. Различные виды *Malassezia* входят в состав нормальной микрофлоры человека и некоторых теплокровных животных, но при определённых условиях они могут являться и причиной грибковых заболеваний [1, 13, 14].

В литературе описаны случаи фунгемии, вызванной *Malassezia furfur* (*M. furfur*), чаще у пациентов с иммунодефицитом: как у взрослых, так и у детей [2-4, 6, 9, 10, 99]. Главным фактором риска развития фунгемии, связанной с *M. furfur*, у

пациентов со сниженным иммунитетом является введение липидных растворов при парентеральном питании. Причина заключается в особенностях метаболизма – для поддержания жизнедеятельности *M. furfur* необходимы липиды [11, 19, 99]. Наиболее вероятный источник инфицирования *M. furfur* центральных венозных катетеров (ЦВК) – кожа, колонизированная грибами [13, 14, 99]. Колонизация кожи новорождённых грибами *M. furfur* чаще происходит уже в учреждении родовспоможения [10, 16, 99]. У детей способствует колонизации и, как следствие, развитию инфекции контакт с медицинским персоналом и родителями [17, 18, 99].

Значение *M. furfur* в возникновении диссеминированной грибковой инфекции у онкологических больных, пациентов хирургического профиля, новорождённых с ОНМТ и ЭНМТ при рождении (пациенты с иммуносупрессией), остаётся во многом недооцененным из-за дефектов в микробиологической диагностике этих инфекций [2, 3, 99]. *M. furfur* практически не культивируется на селективных для дрожжевых грибов плотных питательных средах. Эти грибы не размножаются в питательных средах для гемокультивирования и соответственно не могут быть выделены и идентифицированы из крови. Кроме того, выявление данного возбудителя крайне затруднено из-за отсутствия сертифицированных и зарегистрированных тест-систем, основанных на методе полимеразной цепной реакции (ПЦР).

В настоящее время актуальным представляется усовершенствование микробиологической диагностики грибковых инфекций, вызванных *M. furfur* и проведение динамического мониторинга за колонизацией новорождённых, находящихся на лечении в отделениях реанимации и интенсивной терапии, с целью получения объективной картины роли *M. furfur* в патологии новорождённых при современных возможностях лечения и профилактики.

Степень разработанности темы

Идея данного исследования основана на анализе научных работ по использованию современных культуральных, молекулярно-биологических и протеометрических методов диагностики грибковых инфекций [73-76, 90], а также детерминированна необходимостью усовершенствования микробиологической диагностики грибковых инфекций у новорождённых отделений реанимации в связи с изменением видового состава выявляемых дрожжевых грибов.

В структуре грибковых инфекций в неонатологии появились новые возбудители, и соответственно, назрела необходимость в их культивировании, точной и быстрой идентификации и определении чувствительности к используемым антимикотическим препаратам [71, 83]. Некоторые виды грибов (например *M. furfur*) не культивируются на обычных питательных средах используемых для выделения грибов, так как имеют особенный метаболизм, в связи с чем требуется разработка селективной среды для её выделения и определения чувствительности к антимикотикам.

Показано, что *MALDI-TOF MS* анализ является лучшим методом в идентификации дрожжевых грибов [73-76, 78, 79, 87-89, 91, 92], при этом возможность идентификации дрожжевых грибов рода *Malassezia* этим методом требует уточнения.

Одними из передовых способов идентификации микроорганизмов на сегодня считаются молекулярные методы (ПЦР в режиме «реального времени»), однако существует небольшое количество тест-систем для детекции дрожжевых грибов и не в одну из из них не внесены грибы рода *Malassezia*, что также диктует необходимость в разработке современных тест-панелей, основанных на методе ПЦР.

На протяжении последних десятилетий вопрос микробиологического мониторинга за возбудителями грибковых инфекций у новорождённых является

актуальной проблемой [77, 81, 82, 85, 86]. Назрела необходимость определения методологических основ для микробиологической диагностики грибковых инфекций и внедрение алгоритмов обследования новорождённых, находящихся на выхаживании в ОРИТН и ОХРИТН.

Цель исследования

Усовершенствовать микробиологическую диагностику и профилактику грибковых инфекций, вызванных *Malassezia 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 методами (биохимический, масс-спектрометрический и молекулярно-генетический).
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 детей 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 и секвенирование видоспецифического участка гена 26S рРНК): определена роль методов в диагностике грибковых инфекций у новорождённых детей, вызванных *M.furfur*, показаны преимущества и недостатки каждого из них.
3. Впервые экспериментальным путём изучена чувствительность клинических изолятов *M. furfur* 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 биологического 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. 04. 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 биологического материала новорождённых и медицинского персонала. Штамм *Malassezia furfur* Y147 задепонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, РАН (Московская обл., г. Пушкино) (Номер заявки 191-2-02.1-2181от 04.03.2020 года).

Теоретическая и практическая значимость

Проведённое исследование показало целесообразность внедрения в практику клинической микробиологии разработанной (модифицированной) селективной питательной среды для культивирования и определения чувствительности грибов *M.furfur* к антимикотическим препаратам с использованием Е-тестов: состав питательной среды может быть предложен в дальнейшем к промышленному производству.

Показана недостаточно высокая эффективность метода *MALDI–TOF MS* анализа в рутинной работе микробиологических лабораторий для решения задач видовой идентификации дрожжевых грибов вида *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 родоспецифический праймер для детекции грибов рода *Malassezia* и видоспецифический 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 впервые задепонированный штамм *M. furfur* Y147 использоваться как контрольный штамм при производстве питательных сред и контроле качества микробиологических исследований.

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 диссертационной работы нашли применение в лекционном материале при обучении клинических ординаторов и аспирантов, на курсах повышения квалификации врачей, а также на конференциях и семинарах, проводимых в ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

Национальное руководство Неонатология. (М.: Общество с ограниченной ответственностью Издательская группа "ГЭОТАР-Медиа", 2019, 320 стр.) используется для диагностики грибковых инфекций в неонатологии в Российской Федерации.

Материалы исследования и рекомендации нашли отражение в разработанном и внедрённом в практику стационара 3 уровня алгоритме микробиологического мониторинга, диагностики и профилактики инфекций, вызванных дрожжевыми грибами *M. furfur*, у новорождённых находящихся на выхаживании в отделениях хирургии, реанимации и интенсивной терапии (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 методики *MALDI-TOF MS* анализа.

2.2 ПЦР в режиме «реального времени» с использованием разработанной экспериментальной панели для детекции дрожжевых грибов.

2.3. Секвенирование видоспецифического участка гена 26S рРНК дрожжевых грибов.

2.4 Определение чувствительности клинических изолятов *M. furfur* к противогрибковым препаратам и антисептикам.

3. Статистическая обработка полученных результатов.

Основные положения, выносимые на защиту

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

2. Усовершенствованные микробиологические методы (*MALDI-TOF-MS* – пополнение базы данных масс-спектрометра масс-спектрами различных штаммов *M. furfur*), молекулярно-генетические методы (включение в тест-систему для выявления методом ПЦР в режиме «реального времени» дрожжевых грибов *Malassezia spp.*), а также полученные данные по чувствительности *M. furfur* к антимикотическим препаратам и разработанная селективная питательная среда, позволили повысить качество и скорость диагностики грибковых инфекций, вызванных *M. furfur* у новорождённых.

3. Внедрение микробиологического мониторинга с включением в алгоритм обследования исследование на *M. furfur* является обязательным условием для профилактики грибковых инфекций в отделениях реанимации и интенсивной

терапии, в том числе хирургического профиля, в особенности у глубоконедоношенных детей с ЭНМТ и после оперативных вмешательств, при проведении парентерального питания с включением липидных растворов.

База проведения научного исследования

1. Институт микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова» Минздрава России (руководитель д.м.н., Т.В. Припутневич).
2. Институт репродуктивной генетики ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова» Минздрава России (директор д.м.н., профессор РАН, Д.Ю. Трофимов).
3. Институт неонатологии и педиатрии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова» Минздрава России (директор д.м.н., професор В.В. Зубков).

Работа утверждена на Учёном совете Федерального Государственного Бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика в.и. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24 января 2018 г. и заседании комиссии по этике биомедицинских исследований при Федеральном Государственном Бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика в.и. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации от 15 июня 2017 года.

Форма внедрения

Выступления на международных и российских конгрессах, статьи и тезисы в журналах, заявка на патент на изобретение, тест-система, контрольный штамм.

Внедрение результатов исследования в практику здравоохранения:

Алгоритм микробиологического исследования на *M.furfur* внедрён в практическую работу 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 диссертационной работы используются в качестве лекционного материала при обучении клинических ординаторов и аспирантов, на курсах повышения квалификации врачей, на конференциях и семинарах, проводимых в ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова» Минздрава России. Национальное руководство Неонатология. (М.: Общество с ограниченной ответственностью Издательская группа "ГЭОТАР-Медиа", 2019 год, 320 стр.) используется для диагностики грибковых инфекций в неонатологии в Российской Федерации.

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), 2016. Bali. Indonesia.
- X Юбилейного регионального научно-образовательного форума Мать и Дитя 28-30 июня, 2017 г. Геленджик. Россия.
- X Всероссийского образовательного конгресса Анестезия и реанимация в акушерстве и неонатологии, 22-24 ноября, 2017, Москва. Россия.
- Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, 2018, Amsterdam, Netherlands.

- XIX всероссийский научно-образовательный форум "Мать и дитя", г. Москва, Россия. Сентябрь 2018 г.
- XVII Научно-практическая конференция "Внутриутробные инфекции в медицинских учреждениях различного профиля, риски, профилактика, лечение осложнений". Москва. Россия. 2019.
- Первый международный конгресс с международным участием "Лабораторные технологии в репродуктивной медицине и неонатологии: от науки к практике", Москва, 22-23 апреля 2019 г.
- 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 2019, Amsterdam, Netherlands.
- Региональные образовательные школы Российского общества акушеров-гинекологов XXVIII школа "Перинатальная медицина" с курсом неонатологии: Хабаровск. 2019.
- Всероссийский конгресс по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии, 13-15 июня 2019 г., Санкт-Петербург, Россия.
- Всероссийский конгресс по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии "XXII Кашкинские чтения", 2019. Санкт-Петербург. Россия.

Обсуждение диссертационной работы Родченко Ю.В. состоялось на межклинической конференции сотрудников Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии, Института неонатологии и педиатрии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России 08.08. 2020 года, заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России протокол №27 от 07.09.2020 года и Учёном Совете ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России протокол №13 от 18.09.2020 года. В составе совета 115 человек, присутствовали 78 членов Учёного совета.

Публикации

В рамках диссертационной работы опубликовано 15 научных работ, в том числе 6 статей в рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК РФ и Scopus.

Структура и объём диссертации

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

Работа изложена на 137 страницах компьютерного набора, иллюстрирована 26 таблицами, 18 рисунками и 4 приложениями. Указатель литературы состоит из 45 отечественных и 54 зарубежных источников.

ГЛАВА 1. Обзор литературы

1.1. Современные представления о грибковых инфекциях у новорождённых отделений хирургии, реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ)

1.1.1. Общие положения о грибковых инфекциях

Согласно статистическим данным ВОЗ, частота заболеваний грибковыми инфекциями в мире составляет от 20 до 70%. От тяжёлых или хронических микозов на планете страдает более 300 миллионов людей, у 25 миллионов больных микозами существует угроза инвалидности или смерти [1,2,99]. Согласно определению Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) микоз – это заболевание, вызванное грибами (рода *Candida*, другими дрожжевыми грибами, такими как *Saccharomyces*, *Malassezia* и плесневыми грибами). Кандидоз – грибковое заболевание, вызываемое дрожжевыми грибами рода *Candida* [3, 99]. Грибковые заболевания часто встречаются среди следующих групп пациентов: ожоговых больных, пациентов отделений онкологии, гематологии, реанимации и интенсивной терапии, в том числе и у пациентов неонатального профиля. Отдельную группу составляют недоношенные новорождённые, в том числе с ОНМТ и ЭНМТ при рождении. У пациентов из данной группы чаще развивается инфекционный процесс, в том числе инфекции кровотока. У лиц этой категории выше частота смертности и атрибутивной заболеваемости [2, 4, 19, 99].

По результатам отечественных и зарубежных работ, грибковые инфекции у недоношенных новорождённых, находящихся на лечении в условиях реанимации, занимают третье место среди госпитальных инфекций и идут после вирусных и бактериальных инфекций [2, 6, 7, 10, 99]. Глубоконедоношенные новорождённые с ОНМТ и ЭНМТ при рождении являются уязвимой и наиболее сложной для лечения группой пациентов из-за незрелости иммунной системы [99].

В последние годы появилась возможность выхаживать со значительным

повышением шансов выживаемости недоношенных детей, начиная с 22-24 недель гестации, и с массой тела при рождении от 500 граммов. Но необходимость применения инвазивных методов медицинской помощи, таких как длительная искусственная вентиляция лёгких (ИВЛ), длительное парентеральное питание (в том числе, с использованием липидных растворов), массивная антибактериальная терапия, пролонгированная катетеризация центральных вен. способствует колонизации госпитальными штаммами бактерий и грибов слизистых оболочек новорождённых, а также развитию инвазивного кандидоза (ИК) [8, 13, 14, 99]. По данным зарубежной литературы частота ИК составляет 2,6-3,1% у новорождённых с ОНМТ при рождении, и от 10-16% у новорождённых с ЭНМТ, летальность при этом может достигать 40% [8,9,13,14, 99]. По данным отечественных авторов частота ИК в отделениях реанимации у новорождённых с ОНМТ может составлять до 18% [6, 10, 13, 99]. Наряду с инвазивными кандидозами у таких пациентов высок и риск развития инвазивных микозов (ИМ), вызванных плесневыми и дрожжевыми грибами (*Aspergillus*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Moniliaceae*, *Dematiaceae*, *Penicillium*, *Scytalidium dimidiatum*, *Onychocola canadensis*), и дрожжевыми грибами *Malassezia* и *Saccharomyces* [27-31, 99].

У взрослых людей, детей старшего возраста, а также у здоровых доношенных новорождённых имеется естественная защита организма от грибковых инфекций. Такая защита обусловлена фагоцитарной активностью, а также другими факторами врождённого и специфического иммунитета. Недоношенные новорождённые, наоборот, обладают незрелой и недостаточно адаптированной иммунной системой из-за сниженной способности к выработке иммуноглобулинов, включая иммуноглобулин А. Из-за этого в критическом состоянии недоношенные новорождённые становятся особенно уязвимыми в плане развития грибковых инфекций [2, 16, 99].

Основными факторами, увеличивающими риск развития кандидемии, являются следующие факторы: длительное пребывание новорождённых в

условиях стационара, некротизирующий энтероколит (НЭК) и операции на органах брюшной и грудной полостей, гестационный возраст менее 27 недель и массой тела при рождении менее 1000 граммов, терапия антибиотиками, включая карбапенемы и цефалоспорины III поколения, а также антациды, глюкокортикоиды и H₂-блокаторы. Факторы риска развития кандидоза следующие: длительное функционирование центрального венозного катетера, полное или продолжительное парентеральное питание, искусственная вентиляция лёгких, наличие любых видов дренажей (вентрикулярный, перитонеальный, плевральный). Кроме того, частые инвазивные манипуляции нарушают естественные защитные барьеры организма, создавая условия, благоприятные для адгезии грибов с последующей инвазией в стерильные локусы микроорганизма [1, 2, 4, 15, 99].

Как показано в ряде исследований, наиболее значимыми факторами риска развития ИК являются венозные катетеры, а также эндотрахеальная интубация [2, 3, 7, 97, 98, 99]. До 2000 годов по данным литературы главным этиологическим агентом, приводящим к инвазивному кандидозу, были *Candida albicans* [2, 4, 10, 13, 99]. В результате некорректного и профилактического применения грибковых препаратов видовой состав грибов в структуре возбудителей ИК претерпел существенные изменения. Вследствии чего при инвазивных микозах новорождённых чаще всего встречаются грибы, относящиеся к *Candida non-albicans* видам, такие как *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *C. krusei*. Кроме того, возрастает роль других дрожжевых грибов, в частности *M. furfur* [2, 4, 22, 99].

Диагностика грибковых инфекций является сложной проблемой. Лабораторное подтверждение диагноза грибковой инфекции нередко затруднено из-за нетипичной локализации очага инфекции или тяжести состояния пациента, а клинические признаки микозов у иммунокомпрометированных пациентов часто неспецифичны [99]. К тому же, в ряде случаев симптомы грибковой инфекции выявляются достаточно поздно, тогда как многие грибковые заболевания у

новорождённых отличаются агрессивным и стремительным течением. Основной причиной летальности при ИК становится назначенная несвоевременно противогрибковая терапия. Своевременная диагностика грибковых инфекций является главным фактором для снижения летальности [99].

Диагностика инвазивных микозов, вызванных грибами рода *Malassezia*, осложнена рядом факторов. Несмотря на то, что у пациентов могут отмечаться все клиничко-лабораторные признаки грибковой инфекции: нарушение функции сердечно-сосудистой системы (тахикардия), нарушения функции желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) (дискинезия, отягощение или развитие НЭЖ), дыхательные нарушения (лабильность сатурации, апноэ), а также лейкоцитоз и повышение уровня эозинофилов крови.

Из-за того, что грибы *Malassezia* достаточно плохо растут на селективных традиционных питательных средах, выделение возбудителя затруднено, и соответственно, затруднена этиологическая верификация заболевания и своевременная этиотропная терапия [4, 12, 28, 99].

1.1.2. Классификация микозов

Единая, общепринятая классификации микозов отсутствует, но существует множество классификаций в зависимости от этиологии, патогенеза, локализации и глубины поражения.

В классификациях микозов R. Sabourough и A. Castellani пытались учитывать клинические признаки дерматомикозов и особенности морфологии возбудителей. Существующие биологические классификации не подходят для клинической практики. Профессор Уна в 1880 году различал три группы дерматомикозов: сапрофитии, эпидермомикозы и дерматомикозы. [19, 20].

В 1976 году Н.Д. Шеклаковой разработана классификация микозов по степени патогенности возбудителя, в соответствии с данной классификацией выделяют четыре группы микозов и пятую группу – псевдомикозы:

1) Дерматомикозы. Возбудители: *Trichophyton spp.*, *Microsporum spp.*, *Epidermophyton spp.*);

2) Глубокие (системные, висцеральные) микозы: геотрихоз, хромомикоз, гистоплазмоз, кокцидиоидоз, бластомикозы, криптококкоз, риноспоририоз, аспергиллёз, пенициллиноз, мукороз;

3) Кератомикозы. Возбудители: *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichophyton* и другие;

4) Кандидоз (поверхностный кандидоз кожи и слизистых оболочек, хронический генерализованный, гранулематозный кандидоз, висцеральный кандидоз). Возбудители: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*;

5) Псевдомикозы: поверхностные формы (эритразма, подмышечный трихомикоз) и глубокие формы (актиномикоз, нокардиоз, мицетомы, микромоноспоров).

В данной классификации условно-патогенные грибы, к которым относится *M.furfur*, выделены отдельно.

По клинической картине микозы подразделяются:

- поверхностный микоз;
- инвазивный микоз [16, 30, 99].

В соответствии с международной классификацией 10 пересмотра (МКБ–10) выделяют следующие типы микозов: дерматофития (B36), аспергиллёз (B44), кандидоз (B37), гистоплазмоз (B39), микозы, не классифицированные в других рубриках (B48), микоз неуточненный (B49), другие поверхностные микозы (B36) [23].

С 2005 года принята классификация кандидозов у детей. В соответствии с этой классификацией кандидозы подразделяются на группы в зависимости от степени патогенности возбудителей, клинической картины, а также в соответствии с системой МКБ-10. Микозом новорождённых считают инфекционное заболевание органов и систем новорождённого, вызванное грибами. Все микозы (грибковые заболевания) в зависимости от особенностей клинической картины заболевания подразделяются на две большие группы: поверхностные микозы и инвазивные микозы, отличающиеся друг от друга

глубиной поражения и видовой принадлежностью возбудителя. К поверхностным относят следующие виды микозов: микозы кожи, вагины, полости рта, вульвы, кишечника, пищевода и другие. Тяжёлую грибковую инфекцию, которая проявляется кандидемией с вовлечением в процесс каких-либо внутренних органов ребёнка, называют инвазивным кандидозом (ИК). К инвазивным кандидозам относят следующие виды микозов: кандидемию, хронический диссеминированный кандидоз, острый диссеминированный кандидоз, кандидоз центральной нервной системы и другие. В свою очередь, ИК новорождённых по времени возникновения грибкового заболевания подразделяют на врождённый инвазивный микоз, при котором симптомы ИК развиваются в первые шесть суток жизни и приобретённый инвазивный микоз – симптомы которого развиваются после 6 суток жизни [1, 2, 4, 23, 99].

ИК новорождённых разделяют на:

- кандидоз полости рта и глотки;
- кандидемию и острый диссеминированный кандидоз;
- кандидоз пищевода, желудка, кишечника (кандидозный эзофагит, гастрит, энтерит);
- кандидозный перитонит;
- кандидозный менингит;
- кандидоз мочевыводящих путей (кандидозный цистит, кандидозный пиелонефрит);
- кандидозный эндокардит, перикардит, флебит;
- кандидозная пневмония (лёгочный кандидоз, инвазивный кандидоз лёгких);
- кандидозный эндофтальмит [1, 99].

Следует уточнить, что в данной классификации представлены только инвазивные кандидозы, а классификации инвазивных микозов, возбудителями которых являются *M.furfur*, в настоящее время отсутствуют [99].

1.1.3. Характеристика *M. furfur* как возбудителя грибковых инфекций (морфология и патогенез)

Рост числа пациентов с ослабленным иммунитетом привёл к частому появлению ИМ. Естественные обитатели кожных покровов, с которыми обычно ассоциированы локальные грибковые инфекции, могут при определённых условиях выступать как внутрибольничные возбудители системных микозов. К числу таких патогенов относят дрожжевые грибы рода *Malassezia* из семейства *Malasseziaceae*, ранее известные как *Pityrosporum* [4, 6, 13, 99].

Систематическое положение *Malassezia*:

- надцарство *Eukaryota*
- царство *Fungi*
- отдел *Basidiomycota*
- подотдел *Ustilaginomycotina*
- класс *Exobasidiomycetes*
- порядок *Malasseziales*
- род *Malassezia*
- виды *Malassezia species* (17 видов): к липидозависимым относят: *M. dermatis*, *M. furfur*, *M. japonica*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*, *M. yamatoensis* и *M. cuniculi*, к зоофильным видам – *M. caprae*, *M. nana*, *M. dermatis*, *M. cuniculi* [21, 28].

Морфологические особенности *Malassezia* представлены дрожжеподобными клетками, обладающими грушевидной, эллиптической, цилиндрической, овальной, реже округлой формой, размеры клеток варьируют в диапазоне от 2–3 до 3–5 мкм (Рисунок 1).

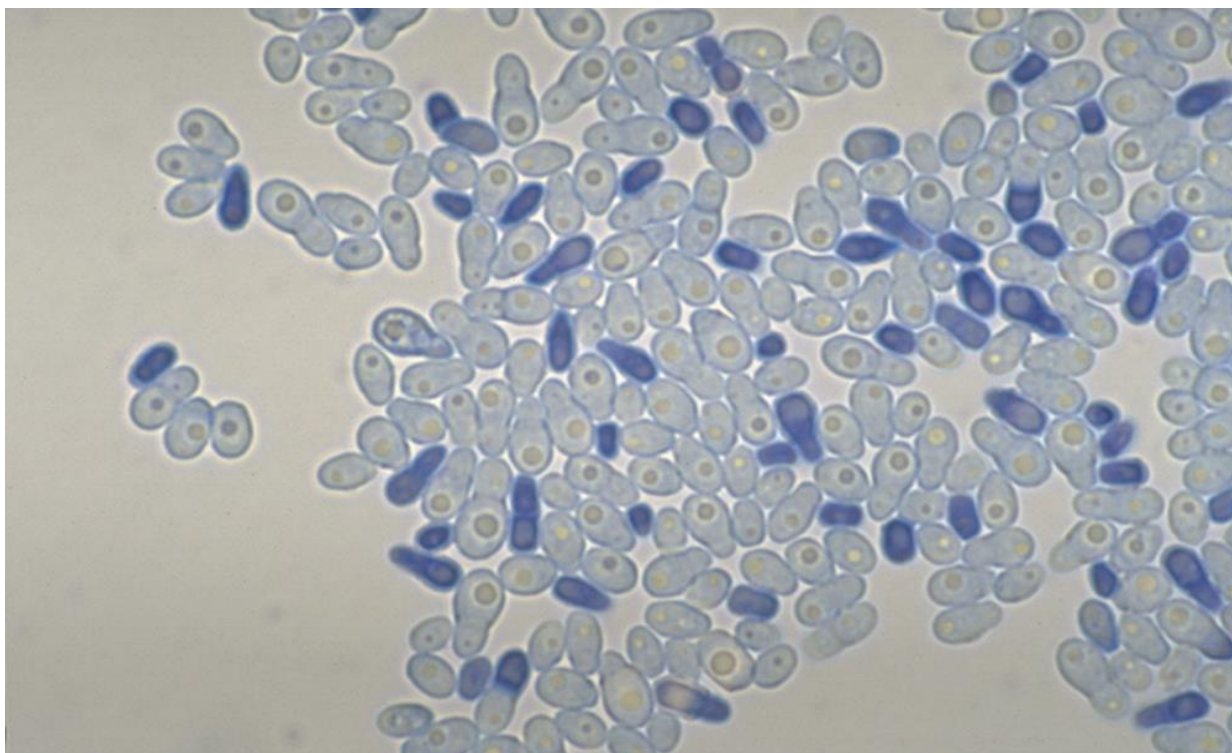


Рисунок 1 – Клетки дрожжевых грибов *Malassezia furfur* (<https://sobakipesiki.ru/malasseziya-u-sobak.html>).

Для дрожжевой стадии гриба характерен монополярный тип почкования. Дочерняя клетка при почковании отделяются перегородкой от материнской, отделившись, клетка оставляет рубец на материнской клетке, в месте появления которого в дальнейшем появляются другие дочерние клетки. В процессе деления клетка приобретает характерную форму кегли [21, 25, 30, 99]. Грибы рода *Malassezia* обладают более толстой клеточной стенкой, что гарантирует им большую устойчивость к воздействию защитных факторов макроорганизма и позволяет персистировать на коже. Липиды являются главными компонентом клеточной стенки *Malassezia*. Грибы рода *Malassezia* могут расти в микроаэрофильных и анаэробных условиях, формировать биоплёнки на поверхностях различных материалов. *Malassezia furfur* обладает особым метаболизмом, поэтому для роста грибов требуется наличие в питательной среде жирных кислот с длиной цепи 12-14 атомов углерода. Грибы рода *Malassezia* такие жирные кислоты не способны синтезировать самостоятельно. У грибов отсутствует потребность в углеводах, и в качестве единственного источника

углерода выступают липиды [99]. Малацезии не нуждаются в микроэлементах, электролитах, витаминах, не способны ферментировать сахара, в качестве единственного источника азота используют соли аммония, однако не могут ассимилировать KNO_3 . Успешно используют практически все аминокислоты, кроме цистеина, ассимилируют мочевины, креатинин, креатин. Грибы *Malassezia* способны расти в диапазоне pH 4,0-8,0. *Malassezia* продуцируют γ -лактоны, придающие этим микромицетам характерный фруктовый запах. Наличие липолитических ферментов обуславливает липофильность гриба, а значит способность гидролизовать липиды салных желёз до свободных жирных кислот. *M. furfur* обладает низкой чувствительностью к ультрафиолетовому облучению (УФО) [21, 25, 28-30].

Грибы рода *Malassezia* способны активировать иммунные реакции в макроорганизме. Иммуногенные свойства обусловлены наличием липидного слоя у этих грибов. Они могут взаимодействовать с иммунокомпетентными клетками, включая макрофаги, эозинофилы, антиген-презентирующие дендритные клетки, нейтрофилы, стимулируя синтез цитокинов и хемокинов, относящихся к различным функциональным группам. Известно, что грибы *Malassezia* способны как стимулировать, так и ингибировать синтез провоспалительных цитокинов, при этом при развитии инфекции воспалительная реакция может находиться в диапазоне от практически незаметной до ярко выраженной [25, 31, 70, 99].

В настоящее время нет единого общепринятого мнения, могут ли инфекции, вызванные грибами рода *Malassezia*, рассматриваться как самостоятельные заболевания, или же они являются лишь одним из факторов риска при других заболеваниях [99]. Различные виды *Malassezia* выделяют в составе нормальной микрофлоры человека и некоторых теплокровных животных. Грибы используют секрет салных желёз для развития и роста, поэтому локализуются вокруг желёз. [1, 2, 4].

В ряде случаев грибы *Malassezia* могут стать причиной развития грибковых инфекций [19, 21, 24, 99], таких как пёстрый лишай, фолликулит, псориаз, пустулёз новорождённых, себорейный и атопический дерматиты.

Значимость *Malassezia* как госпитальных патогенов в настоящее время остаётся недооценённой. В литературе описаны только единичные случаи системных микозов, в частности фунгемии, вызванной *M. furfur*, у взрослых пациентов с иммунодефицитом, а также у новорождённых с ОНМТ и ЭНМТ при рождении [1, 4, 12, 26, 27, 33, 99]. Впервые случай фунгемии у недоношенного новорождённого, вызванной *M. furfur*, был описан в 1981 году. С тех пор время от времени в литературе появляются публикации с описанием инвазивных микозов, вызванных этим грибом у пациентов с иммунодефицитами. Именно *Malassezia furfur* чаще всего ассоциируется с развитием системных микозов [4, 27, 31, 99]. Главным фактором риска фунгемии, ассоциированной с *M. furfur*, у пациентов с иммуносупрессией, в том числе у новорождённых с ОНМТ и ЭНМТ при рождении, является осуществление парентерального питания с включением липидных растворов через центральный венозный катетер (ЦВК). При этом колонизированная кожа пациентов является наиболее вероятным источником инфицирования ЦВК *M. furfur* [4, 34, 35, 99]. Колонизация кожи новорождённых *M. furfur* может происходить уже в учреждении родовспоможения в период контакта с медицинским персоналом и родителями и в дальнейшем приводить к развитию инфекции [24, 99]. Скопление *M. furfur* на поверхности кожи может приводить к последующей инвазии, что способно вызвать лимфогенное и гематогенное распространение грибов, генерализацию процесса и диссеминацию во внутренние органы [24, 99]. У здоровых доношенных новорождённых имеется естественная устойчивость организма к грибковой инфекции, что обусловлено высокой фагоцитарной активностью и другими факторами специфического и неспецифического иммунитета. У недоношенных новорождённых отмечают относительную незрелость механизмов противогрибковой защиты,

перечисленных выше, что делает их уязвимыми к данной грибковой инфекции [4, 88, 99].

1.2. Современные принципы диагностики грибковых заболеваний новорождённых

Клиническая картина кандидоза у новорождённых не имеет специфических признаков, но следует отметить, что для грибковых заболеваний нет патогномоничной симптоматики, а все клинические проявления являются неспецифичными, поэтому лабораторные тесты приобретают решающее значение для корректной этиологической диагностики [1, 99].

В соответствии с Европейскими рекомендациями по диагностике ИК 2012 года взятие крови у новорождённого для диагностики генерализованных грибковых инфекций рекомендуется брать не менее 2 мл крови с частотой не реже, чем 2 раза в сутки на протяжении 3-х дней [2, 4]. Принимая во внимание трудности, связанные с пункцией интактных вен у недоношенных новорождённых, а также учитывая малый объём крови, циркулирующей у детей с ОНМТ и ЭНМТ (при рождении 80–90 мл на 1 кг массы тела), допускается взятие на одно исследование от 1,0 до 2,0 мл крови. Кровь берут во флаконы для гемокультур в соответствии с инструкцией производителя [2, 4]. Однако в традиционно используемых бактериологических флаконах для гемокультивирования *M. furfur* может только сохранять свою жизнеспособность, но не размножаться, что оказалось серьёзным препятствием для её обнаружения с помощью существующих бактериологических гематологических анализаторов. Другие стерильные в норме биоматериалы засевают также на плотные питательные среды.

Основными в этиологической диагностике микозов остаются классические методы, такие как культивирование микроорганизмов на питательных средах, микроскопия биоматериала, выделение чистой культуры возбудителя с последующей его идентификацией.

При микроскопической диагностике используют как микроскопию нативного препарата, так и окрашенные мазки. При микроскопии нативных препаратов производят предварительное просветление мазков с помощью 10-30% КОН, а затем микроскопируют по методу «раздавленной капли». Фиксированные этиловым спиртом мазки окрашивают метиленовым синим, по Граму и по Романовскому-Гимзе [30].

Грибы рода *Malassezia* могут быть идентифицированы по способности расщеплять эскулин, использовать кремофор EL в качестве единственного источника липидов, проявлять каталазную активность и утилизировать твины. Существует несколько методов видовой идентификации грибов рода *Malassezia*, в основе которых лежат физиологические видовые особенности. Одним из них является метод S. De Hoog, основанный на изучении усвоения грибом различных твинов (полиэтилен (20) – сорбитан-эфиров) – Твин-40, Твин-80, Твин-60 [30]. Если гриб растёт на среде Сабуро с Твин-80 и при этом даёт рост на среде Сабуро с кремофором EL, то данный гриб относят к виду *M. furfur*. По мнению J. Faergmann [30] более точным является алгоритм, при котором учитывают сразу ряд критериев, таких как наличие каталазной активности, способность расти на среде Сабуро, гидролиз эскулина, ассимиляцию кремофора EL (содержит касторовое масло, главным компонентом которого является рициновая кислота) и рост при 38°C. *M. furfur* не даёт роста на среде Сабуро, обладает каталазной активностью и ассимилирует кремофор EL.

По мнению K. Hammer [30] одним из наиболее значимых критериев при идентификации является образование зоны преципитации на агаре Диксона. По данным авторов, зоны преципитации на агаре Диксона образуют следующие виды *M. sympodialis*, *M. globosa*, тогда как виды *M. furfur*, *M. obtusa*, *M. slooffiae* – не образуют зону преципитации. *M. furfur* довольно плохо растёт на обычных питательных средах, используемых при выделении грибов, однако имеются сбалансированные питательные среды, дающие возможность полноценного культивирования *M. furfur*. Одной из сред для культивирования грибов *M. furfur*

является среда Лиминга и Нотмана в состав которой входит: 8,0 г бычьей желчи, 10,0 г полипептона, 0,1 г дрожжевого экстракта, 5,0 г глюкозы, 1,0 мг глицерола, 0,5 г глицеролстеарата, 0,5 мг Твин 60, 10 мл молока и 12,0 г агара на литр среды [30, 37, 38, 99]. Для роста колоний на данной среде необходимо от 2 до 4 суток при температуре 34-37°C. Также большое распространение для выделения *M. furfur* приобрела среда Сабуро с добавлением оливкового масла, однако, как было отмечено выше, не все грибы рода *Malassezia* растут на данной среде, а кроме того едва заметный рост колоний образуется только на 3-4 сутки инкубации [30, 36]. Оптимальная среда для культивирования *M. furfur* – среда Диксона, в состав которой входят: экстракт солода 3,6%, желчь 2,0%, пептон 0,6 %, Твин 40 1,0%, глицерол 0,2%, олеиновая кислота 0,2% и агар 1,2% [36-38]. Однако на всех этих питательных средах кроме *Malassezia* растут и другие дрожжевые грибы, образующие более крупные колонии. Поэтому заметить рост *Malassezia* не всегда возможно, что значительно затрудняет выделение. Селективных сред для культивирования грибов *M. furfur* на сегодняшний день нет [99].

Кроме физиологических особенностей имеют значение и такие цитоморфологические и морфологические свойства, как цвет, рельеф колоний, форма, форма клетки, её размер, размер дочерней клетки по сравнению с материнской, наличие в культуре гиф гриба. В основе всех методов микробиологической диагностики находится культуральный метод, в ходе которого выделяют чистую культуру возбудителя. Применение культурального метода даёт возможность выявить видовую или родовую принадлежность гриба, изучить биологические свойства возбудителя и определить его чувствительность к антимикотическим препаратам [36, 99].

Для видовой идентификации *M. furfur* можно использовать и биохимические методы. Недостаток биохимических методов заключается в том, что такие методы не обладают достаточной селективной специфичностью. Из автоматических анализаторов наиболее часто используют следующие приборы: Vitek 2 Compact (bioMérieux, Франция), MicroScan plus WalkAway (Siemens,

Германия), Phoenix (Becton Dickinson, США) и другие. Недостатком использования автоматических анализаторов является длительность идентификации (18–48 часов), а также сравнительно невысокий процент корректной идентификации. Помимо этого, применяются и серологические методы диагностики [41, 42, 43, 99].

Алгоритмы лабораторной диагностики грибковых инфекций значительно изменились в последние годы. Появились новые тесты, основанные на молекулярно-генетических методах (ПЦР), разработаны протеомные методы идентификации микроорганизмов при помощи матрично-активированной лазерной десорбционно-ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) для прямого профилирования бактерий и грибов, внедряющиеся в работу микробиологических лабораторий, что произвело революцию в области видовой идентификации микроорганизмов.

MALDI-TOF масс-спектрометрия предоставляет возможность видовой идентификации большого числа грибов, а также позволяет детектировать их напрямую в клиническом материале (кровь, моча, ликвор) [99]. Метод основан на экстракции из клеток гриба пептидов и белков, работая по принципу «*finger print*» (молекулярного «отпечатка пальца»). Полученные в процессе MALDI-TOF MS масс-спектры сравнивают с эталонными спектрами, находящимися в базе данных MALDI Biotyper. Но, хотя и масс-спектры *M. furfur* имеются в базе данных масс-спектрометров, далеко не все изоляты данного вида грибов идентифицируются как *M. furfur* [40, 43-48, 63, 99].

Наиболее перспективной стратегией при проведении видовой идентификации грибов является метод секвенирования видоспецифических участков ДНК. В качестве таких участков часто используют локусы, расположенные между генами, кодирующими рибосомальные РНК (рРНК) – рибосомальные внутренние транскрибируемые спейсеры, также для проведения видовой идентификации используют и участки отдельных генов рРНК. В целом, этот подход обладает высокой эффективностью, но в некоторых случаях

близкородственные виды нельзя точно идентифицировать по результатам секвенирования таких локусов. В таких ситуациях требуется применять более эффективные гены-мишени [44, 47, 93, 94, 99].

Методы видовой идентификации грибов, связанные с секвенированием видоспецифических локусов-мишеней, хотя и являются эффективными, но имеют высокую стоимость и/или труднодоступны в современной клинической лаборатории [99].

Молекулярная диагностика с использованием метода ПЦР (в частности, ПЦР в режиме «реального времени») является перспективной и востребованной, в основе метода лежит обнаружение коротких участков ДНК гриба в исследуемом биологическом материале с последующей репликацией данных олигонуклеотидов [99].

ПЦР-диагностика по сравнению с классическими фенотипическими методами, используемыми в микробиологических лабораториях, является более быстрым методом (при классической микробиологической диагностике требуется не менее 48 часов). Кроме того, требуется значительно меньший объем биоматериалов, что при диагностике фунгемии у новорожденных (особенно у глубоко недоношенных) имеет большое значение; такие пациенты имеют малую массу тела, а значит и небольшой объем циркулирующей крови.

По сравнению с методами, связанными с секвенированием видоспецифических генов, ПЦР-методики дешевы, более доступны в клинической практике и занимают меньше времени.

Кроме того, помимо ПЦР и секвенирования видоспецифических локусов ДНК для видовой идентификации *Malassezia furfur* можно использовать и другие молекулярно-генетические подходы, такие как случайная амплификация полиморфной ДНК (RAPD), рестрикционный анализ ПЦР-ампликонов рибосомных последовательностей, анализ нуклеотидных последовательностей ДНК, гель-электрофорез в пульсирующем поле (PFGE), полиморфизм длины амплифицированных фрагментов (AFLP), полиморфизм длины терминальных

фрагментов (tFLP) и денатурирующий градиентный гель-электрофорез (DGGE) [99]. Такие методы в некоторых случаях могут быть полезны для видовой идентификации *Malassezia furfur*, эффективно отличив этот вид от других видов рода *Malassezia*, они пока малопригодны для активного использования в рутинной лабораторной практике [37, 39, 40, 63].

В пределах одного вида грибов различные изоляты отличаются друг от друга в той или иной степени и по совокупности отличий, а также по филогенетической близости могут быть разделены на группы, то есть возможно проведение внутривидового типирования. Методы внутривидового типирования грибов можно разделить на две группы: методы, связанные с отличиями на уровне белков, и методы, связанные с отличиями на уровне ДНК. Первая группа методов включает методы мультилокусного электрофореза ряда белков. Вторая группа более разнородна и включает несколько методик: гель-электрофорез в пульсирующем поле, анализ полиморфизма длины фрагментов после обработки препарата рестрикционными эндонуклеазами и последующей ПЦР, а также различные типы мультиплексного ПЦР-анализа. По ряду причин перечисленные методы имеют локальное значение. Гораздо чаще используются две другие методики: анализ полиморфизма длины микросателлитных последовательностей (MLP) и мультилокусное сиквенс-типирование (MLST). Разработаны и широко используются схемы мультилокусного сиквенс-типирования только для ряда видов грибов: *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* и *Aspergillus fumigatus* [44, 47].

В последние годы перспективным инструментом для типирования микроорганизмов становятся методы с применением высокопроизводительного секвенирования - next-generation sequencing (NGS). Такие методы обладают ощутимыми преимуществами по сравнению с классическим сиквенс-типированием, так как при соизмеримой точности они гораздо быстрее и дешевле. Однако в настоящее время не существует общепринятых методик типирования грибов с применением NGS. Поэтому разработка новых схем типирования грибов

с применением NGS представляется актуальной задачей.

Разработка тест-системы, основанной на методе ПЦР в режиме «реального времени», позволила бы упростить задачу идентификации основных возбудителей грибковых инфекций, повысив точность, эффективность и сократив время обнаружения возбудителей [99].

В России и в других странах мира разработаны молекулярно-генетические тест-панели для видовой идентификации грибов, направленные, в первую очередь, на детекцию *Candida albicans* и небольшого числа *Candida non-albicans* видов. Например, в компании ООО «ДНК-технология» (Россия) разработана тест-панель для идентификации *C. albicans* (набор реагентов «Канд-ген» для выявления ДНК *C. albicans*), компания «ИнтерЛабСервис» (Россия) разработала ПЦР-систему «Флороценоз», с праймерами [99] для детекции некоторых видов дрожжевых грибов рода *Candida* – это виды *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* и *C. tropicalis*, но этого набора видов часто бывает недостаточно для корректной и своевременной диагностики грибковых инфекций. В настоящее время нет ни одной зарегистрированной ПЦР тест-панели для детекции *M. furfur* в биологическом материале, полученном от новорождённых. Безусловно, это затрудняет выявление грибов – возбудителей инвазивных микозов [99].

1.3. Методы определения чувствительности дрожжевых грибов к антимикотическим препаратам и антисептикам

Существует ряд классификаций противогрибковых препаратов: по химической структуре, механизму действия, спектру активности, переносимости и особенностям клинического применения, а также по фармакокинетике препаратов.

Основные группы противогрибковых препаратов по химической структуре следующие:

- азолы (вориконазол, итраконазол, позаконазол, флуконазол, миконазол, кетоконазол и др.);

- эхинокандины (микафунгин, каспофунгин, анидулафунгин);
- полиены (амфотерицин В, амфотерицин В липидный комплекс, нистатин, , микогептин, леворин, натамицин и др.);
- флюоропиримидины (например, флуцитозин).

По особенностям клинического применения противогрибковые препараты делятся на три группы. В первую группу препаратов включают препараты для лечения глубоких (системных) микозов, во вторую группу – препараты для лечения трихофитий и эпидермофитий, а в третью – препараты для лечения кандидозов [12].

Чувствительность грибов к противогрибковым препаратам зависит от их видовой принадлежности. В связи с этим необходим постоянный мониторинг видового состава грибов. Выбор противогрибковых препаратов зависит от вида возбудителя, особенностей фармакокинетики, клинического состояния пациента. Многочисленные клинические данные свидетельствуют о клинической эффективности амфотерицина В в лечении системных микозов, вызванных *Malassezia* [49-53, 60, 65, 99].

Амфотерицин В – относится к группе полиенов, антимикотический препарат, имеющий природное происхождение (синтезируется актиномицетом вида *Streptomyces nodosus*) [49-53]. Амфотерицин В дезоксихолат является нефротоксичным для человека (повышает уровень креатинина) и даёт инфузионные реакции. Причиной инфузионных реакций является активация провоспалительных цитокинов [54, 55]. Существуют также три производные липид-ассоциированные формы амфотерицина В, обладающие меньшей нефротоксичностью: липидный комплекс амфотерицина В, липосомальный амфотерицин В и коллоидно-дисперсная форма амфотерицина В [54]. Амфотерицин В дезоксихолат в дозе 1 мг/кг/день разрешён для лечения ИК у новорождённых. В настоящее время нет достаточных клинических данных о его применении для терапии ИК и гематогенного кандидозного менингоэнцефалита у новорождённых, учитывая высокую его токсичность. Липосомальный

амфотерицин В в дозе 2,5-7 мг/кг в сутки можно использовать для терапии ИК у новорождённых, препарат является безопасным. Липосомальный амфотерицин В проникает в ЦНС и имеет противогрибковую активность в тканях головного мозга. Амфотерицин В липидный комплекс является препаратом выбора для лечения системных микозов, вызванных *M. furfur* у новорождённых, внутривенно в дозе 2,5-5 мг/кг/день [4, 19, 99].

Для определения чувствительности *M. furfur* к противогрибковым препаратам используются два основных метода: метод серийных разведений в жидкой или твердой питательной среде и диско-диффузионный метод [99]. В мире есть две организации, которые занимаются разработкой методов определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам, а также критериев интерпретации полученных результатов: *CLSI* (*Clinical Laboratory Standards Institute* – Институт клинических и лабораторных стандартов) в США и *EUCAST* (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* – Европейский комитет по определению чувствительности к антибиотикам) в Европе. Последней версией рекомендаций *EUCAST*, в том числе и рекомендаций по грибам, является версия 9.0, опубликованная в феврале 2018 года. Немаловажно отметить, что в этих рекомендациях нет информации по методам определения чувствительности *M. furfur* к антимикотикам и отсутствуют критерии интерпретации полученных результатов [56, 57, 99]. В России доступны клинические рекомендации по определению чувствительности к антимикробным препаратам, разработанные Межрегиональной ассоциацией по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ), созданные с использованием международных стандартов по определению чувствительности к антибиотикам: *EUCAST* и *CLSI* [58].

В рекомендациях описаны два основных метода определения чувствительности грибов к антимикотикам:

1. Количественное определение минимальной подавляющей концентрации (МПК) методом серийных разведений в жидкой питательной среде или методом

микроразведений в жидкой питательной среде. Метод базируется на последовательном разведении антимикотических препаратов в жидкой среде, в которую инокулируется микроорганизм. Инокулюм готовят методом суспендирования пяти отдельных колоний гриба, полученных из 18-24 часовых культур, в 3 мл стерильной дистиллированной воды, в конечной концентрации $0,5-2,5 \times 10^5$ КОЕ/мл или 0,5 МакФарланд клеточной плотности. Рекомендуется использовать среду RPMI-1640 с L-глутамином и добавлением глюкозы (концентрация 20 г/л (2%)). В качестве буфера к данной среде лучше использовать 3-(N-морфолино)-пропансульфоновая кислота (MOPS) в итоговой концентрации 0,165 моль/л при pH 7,0 [58].

2. Диско-диффузионный метод (ДДМ) оценки чувствительности дрожжей к противомикробным препаратам более доступен и прост, однако критерии интерпретации результатов исследования разработаны только для флуконазола и вориконазола. В качестве питательной среды для определения чувствительности лучше использовать агар Мюллера-Хинтон с добавлением глюкозы и метиленового синего, для активации роста дрожжей и более чёткого определения зон ингибирования роста [56-59, 99].

Кроме того, в рекомендациях представлены методики постановки тестов и критерии интерпретации для грибов родов *Aspergillus*, *Candida*. Для *Cryptococcus spp.* в рекомендациях дается примечание о том, что, так как этот гриб неферментирующий, питательная среда RPMI заменяется на дрожжевую азотистую основу и рекомендовано использование 0,2% вместо 2% глюкозы [58, 99]. Методы определения чувствительности к противогрибковым препаратам и критерии интерпретации для *M. furfur* в рекомендациях не описаны. Методы, перечисленные выше, не подходят в полной мере для культивирования *M. furfur*, так как этот гриб обладает особым метаболизмом, для жизнедеятельности *M. furfur* необходимы липиды, а указанные выше питательные среды не отвечают особенностям метаболизма данного гриба. Кроме того, в рекомендациях не отработаны пороговые значения МПК, необходимые для дифференциации

устойчивых и чувствительных штаммов *M. furfur*. Выбор оптимальных методов определения чувствительности *M. furfur* при назначении этиотропной терапии имеет решающее значение в повседневной практике, особенно для пациентов с внутрибольничным ИМ. Проблема остаётся нерешенной. Ряд исследователей для определения чувствительности изолятов *M. furfur* к антимикотическим препаратам предлагают использовать Сабуро-декстрозный агар с 1% Твина 80, либо уреазный бульон Кристенсена в качестве питательной среды [61, 62, 64, 99]. Такие подходы трудно применимы в повседневной практике микробиологических лабораторий, так как при постановке тестов необходимо использовать чистые субстанции антимикотических перпаратов, а постановка теста представляет собой крайне трудоёмкий процесс [99].

В настоящее время широкоиспользуются коммерческие тест-системы как ручные, так и автоматические: Е-тесты, АТВ Fungus 2 и Vitek (bioMerieux, Франция), MicroScan WalkAway (Siemens, Германия), Sensititre (ThermoFisher Scientific, США), но данные тесты также не адаптированы для идентификации и определения чувствительности *M. furfur* [99].

Таким образом, данные литературы позволяют полагать, что микозы, вызванные дрожжевым грибами вида *Malassezia furfur* в отделениях реанимации и интенсивной терапии новорождённых, в том числе хирургического профиля, являются актуальной проблемой. Методы культивирования, идентификации и определения чувствительности *M. furfur* к антимикотическим препаратам в полной мере в настоящее время не разработаны, в связи с чем затруднена своевременная постановка диагноза и целенаправленная антимикотическая терапия. Все это диктует острую необходимость разработки и стандартизации микробиологической диагностики грибковых инфекций, вызванных *M.furfur* у новорождённых [99].

ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования

2.1. Общий объем проведенных исследований

Исследование проводили в период с 2015 по 2019 годы на базе 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.) Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор академик РАН, д.м.н., профессор Сухих Г.Т.).

На начальном этапе в исследование были включены все новорождённые – пациенты отделения реанимации и интенсивной терапии новорождённых (ОРИТН) и отделения хирургии, реанимации и интенсивной терапии новорождённых (ОХРИТН), находившиеся на лечении более 7 дней.

В период с 2015 по 2018 год проведено микробиологическое обследование 4008 новорождённых: 65% (n=2604) из ОРИТН и 35% (n=1404) из ОХРИТН. Проанализированы посевы 24662 проб клинического материала, из них 19532 – со слизистых оболочек ЖКТ и 5130 из клинически значимых локусов (зев, кровь, моча, отделяемое конъюнктивы и др.). Проанализированы посевы 555 проб аутопсийного материала от 147 умерших пациентов отделения ОРИТН (n=61) и ОХРИТН (n=86).

Кроме того, однократно, с эпидемиологической целью, исследован биологический материал (соскобы с кожи заушных складок) на *M. furfur* медицинского персонала вышеперечисленных отделений. Обследовано 65 сотрудников, из них 22 сотрудника отделения ОХРИТН и 43 сотрудника ОРИТН (Таблица1).

Таблица 1 – Общее количество образцов клинического материала, исследованных на *M. furfur* за 2015-2018 годы.

Всего обследовано новорождённых	Общее число проб клинического материала	
	Биоматериал	Количество
4008	мазок из зева	9125
	Кал	9126
	Кровь	4004
	содержимое интубационной трубки	1285
	Моча	741
	центральный венозный катетер	154
	спинномозговая жидкость	64
	содержимое кисты	47
	отделяемое конъюнктивы	78
	жидкость из плевральной полости	25
	жидкость из брюшной полости	9
	жидкость из перикарда	4
	ВСЕГО проб	24662

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 том числе 30% из них – с пороками развития органов брюшной полости.

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

Учитывая, что все дети, имели факторы риска колонизации *M. furfur* (ЭНМТ и ОНМТ при рождении, парентеральное питание липидными растворами, операции на органах грудной или брюшной полости) и, тем самым, риск развития инвазивного микоза во время пребывания в стационаре, всем новорождённым проводили мониторинг колонизации слизистых оболочек условно-патогенными

микроорганизмами (УПМ), в том числе и дрожжевыми грибами *M. furfur*. Регулярно (1 раз в неделю) осуществляли сбор материала со слизистых оболочек ЖКТ (кал) и верхних дыхательных путей (мазок из зева). При подозрении на развитие инфекции проводили микробиологическое исследование материала, полученного из клинически значимых локусов (кровь, моча, ликвор, отделяемое ран, отделяемое конъюнктивы и др.).

В дальнейшее исследование включены новорождённые с положительными результатами посевов на *M. furfur* из различного клинического материала – всего 387 детей, что составило 9,7% от общего числа обследованных: из них 44% (n=169) детей, находившиеся на лечении в ОРИТН и 56% (n=218) в ОХРИТН.

В зависимости от массы тела при рождении:

- I группа – 164 новорождённых детей массой тела при рождении 1499 граммов и менее;
- II группа – 75 новорождённых детей массой тела при рождении 1500 - 2500 граммов;
- III группа – 148 новорождённых детей массой тела при рождении более 2500 граммов.

От новорождённых всех трёх групп получено 1369 образцов биологического материала: 1099 образцов кала и мазков из зева и 270 проб из предполагаемых очагов инфекций.

Всего выделено 1365 изолятов дрожжевых грибов. Посев осуществляли на модифицированный агар Диксона (mDixon).

Видовая принадлежность к *Malassezia furfur* подтверждалась следующими методами:

- по характерным морфологическим признакам: клетки гриба грушевидной (вид «кегли для боулинга»), реже овальной формы, размер клеток в диапазоне от 2–3 до 3–5 мкм (Рисунок 2).

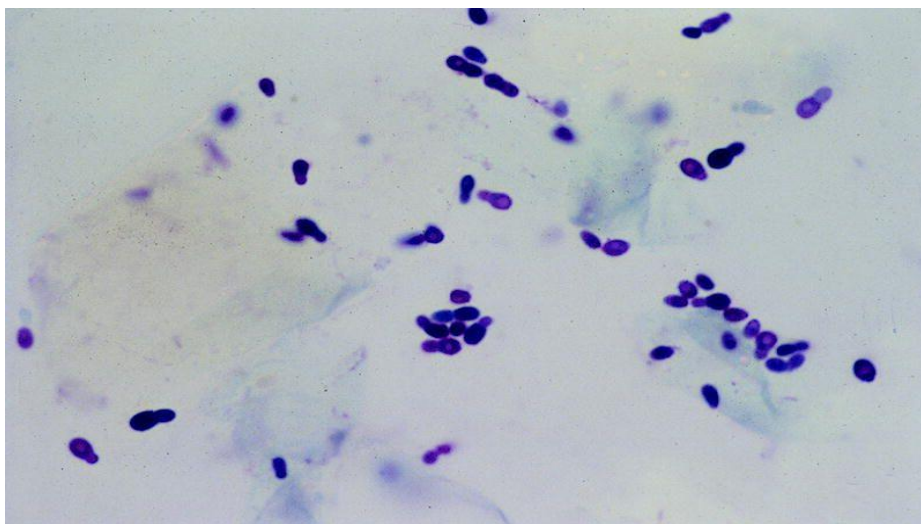


Рисунок 2 – Клетки дрожжевых грибов *Malassezia furfur* в мазках чистой культуры, окрашенных метиленовым синим (https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/_/viewer.aspx?path=vet&name=gr256.jpg&url=http%3A%2F%2Fmedical-dictionary.thefreedictionary.com%2FMalassezia).

- 50 изолятов по биохимическим показателям с помощью бактериологического анализатора Vitek 2 Compact 30 (bioMérieux, Франция) – пример полученного результата идентификации представлен на рисунке 3.

Клиент bioMérieux
Система №: _____

НМИЦ АГИП им. В.И. Кулакова
Лабораторный отчет

Напечатано: 01.05.2019 05:16 MSK
Автоматическая печать

Изолят: 175_19-1 (Подтверждено)

Тип карты: YST (Штрих-код: 2430834403212674) Прибор, используемый для тестирования: 000012C6E4F8 (5201)
Сотрудник: Laboratory Administrator (Labadmin)

Биономер: 4000000022000100
Обсемененность: _____

Микроорганизм: *Malassezia furfur*

Комментарии: _____

Идентификация	Карта: YST	Номер партии: 2430834403	Срок годности: 09.03.2020 12:00 MSK
Происхождение организма	VITEK 2	Завершено: 01.05.2019 05:16 MSK	Статус: Завершен
Микроорганизм	Вероятность 98% <i>Malassezia furfur</i>	Биономер: 4000000022000100	Достоверность: Отличная идентификация
SRF организм			
Микроорганизмы и тесты для их дифференциации:			
Сообщения об анализе:			
Нетипичный результат дифференцирующего теста <i>Malassezia furfur</i> XLTa(6).			

3	LysA	-	4	IMLTa	-	5	LeuA	+	7	ARG	-	10	ERYa	-	12	GLYLa	-
13	TyrA	-	14	BNAG	-	15	ARBa	-	18	AMYa	-	19	dGALa	-	20	GENa	-
21	dGLUa	-	23	LACa	-	24	MAdGa	-	26	dCELa	-	27	GGT	-	28	dMALa	-
29	dRAFa	-	30	NAGA1	-	32	dMNEa	-	33	dMELa	-	34	dMLZa	-	38	ISBEa	-
39	IRHAA	-	40	XLTa	+	42	dSORa	-	44	SACa	-	45	URE	+	46	AGLU	-
47	dTURa	-	48	dTREa	-	49	NO3a	-	51	IARAA	-	52	dGATa	-	53	ESC	-
54	IGLTa	-	55	dXYLa	-	56	LATa	-	58	ACEa	+	59	CITa	-	60	GRTa	-
61	IPROa	-	62	2KGA	-	63	NAGa	-	64	dGNTa	-						

Версия VITEK 2 Systems: 08.01
Стандарт интерпретации МИК:
Настройка AES:

Стандарт терапевтической интерпретации:
Последнее изменение: 11.01.2019

Рисунок 3 – Результат биохимической идентификации *M. furfur*, выделенной из клинического материала новорождённого

- 50 изолятов протеомными методами (MALDI-TOF MS) – пример полученного результата идентификации представлен на рисунке 4:

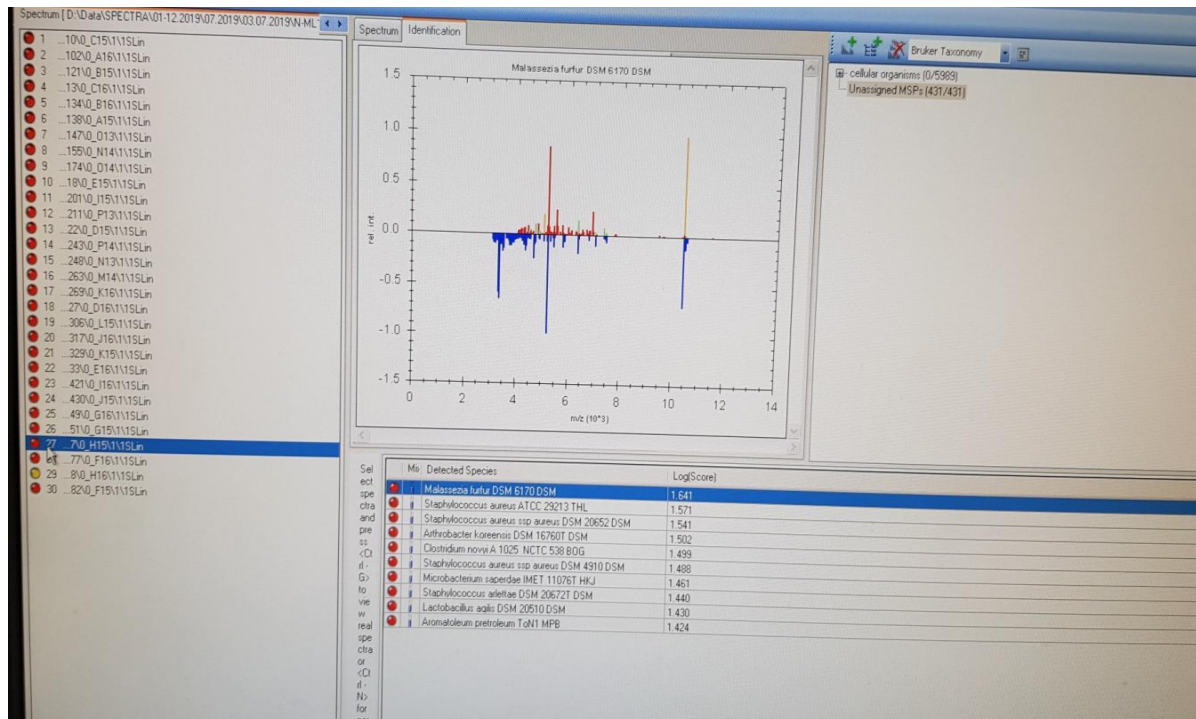


Рисунок 4 – Белковый спектр дрожжевого гриба, определенного как *M. furfur*, методом прямой идентификации с выросшей колонии

- 430 изолятов методом ПЦР в режиме реального времени, с помощью разработанной нами экспериментальной тест-панели на дрожжевые грибы, включающей праймеры для видовой идентификации *M. furfur*.

- 10 изолятов методом секвенирования участка видоспецифического гена 26S рРНК.

Проведена сравнительная оценка идентификации *M. furfur* (n=50) параллельно тремя методами:

- по биохимическим показателям на автоматическом анализаторе Vitek 2 Compact (BioMérieux, Франция);

- методом MALDI-TOF MS с помощью масс-спектрометров Autoflex III с программным обеспечением Maldi Biotyper, версии 3.0 (Bruker Daltonics, Германия) и SHIMADZU (Япония);

- методом ПЦР с использованием с помощью экспериментальной тест-панели для детекции дрожжевых грибов, включая праймеры на *Malassezia furfur* (ДТ-964 («ДНК-Технология», Россия)).

У 30 изолятов *M. furfur*, выделенных у новорождённых ОРИТН и медицинского персонала, экспериментально определили минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) к амфотерицину В, каспофунгину, флуконазолу и микафунгину методом серийных разведений в микропланшетах с использованием чистых субстанций антимикотиков. С помощью Е-тестов (Liofilchem, Италия) определили минимальную подавляющую концентрацию (МПК). Интерпретировали полученные результаты в соответствии с критериями CLSI 2018 года, EUCAST 2018 года и клинических рекомендации по определению чувствительности грибов к антимикробным препаратам 2018 года [57, 58, 59]. Для контроля качества использовали референтный штамм *Malassezia furfur* ATCC 14521 из американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection (ATCC)).

У 10 (из 30) изолятов *M. furfur* определена чувствительность к дезинфицирующим средствам. В исследовании использовали коммерческие дезинфицирующие средства с режимом гигиенической обработки рук или обработка поверхностей от дерматофитов: дезинфицирующее средство, содержащее 68,229% этанола, 5,0% изопропанола и 0,115% 1,3-бутандиола (Республика Беларусь); раствор, содержащий в качестве действующих веществ 1-пропанол - 30%, 2-пропанол - 45% и октенидин дигидрохлорид - 0,1 % (Германия); антисептик, содержащий изопропиловый спирт (2-пропанол) – 60 % и комплекс ЧАС - 0,15%, суммарно (Россия); антисептик в качестве действующих веществ в состав которого входит перекись водорода – 15%, полигексаметиленгуанидина гидрохлорид (ПГМГ) – 12% (Россия); спрей, содержащий синергетическую смесь ПГМГ, алкилдиметилбензиламмоний хлорид, додецилдиметиламмоний хлорид

(ЧАС) и N,N-бис (3-аминопропил) додециламина - суммарно $19 \% \pm 1$ (Россия), раствор, содержащий в качестве активно действующих веществ N,N – бис- (3-аминопропил) додециламин – 0,17%, алкилдиметилбензиламмоний хлорид – 0.25%, N,N – дидеция - N,N – диметиламмоний хлорид- 0,20% (Россия), средство, содержащее алкилдиметилбензиламмоний хлорид ($0,15 \pm 0,01\%$) и пропанол – 2 (изопропанол) ($55,0 \pm 1,0\%$) (Россия) (Приложение 3).

Создана и охарактеризованна коллекция, состоящая из 386 клинических штаммов *M. furfur* выделенных у новорождённых и медицинского персонала. Все штаммы хранятся в музее микроорганизмов лаборатории микробиологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова» Минздрава России в низкотемпературном холодильнике (Sanyo, Япония) при $t-80^{\circ}\text{C}$. Каждый штамм имеет свой микробиологический паспорт (Приложение 2). Один штамм *M. furfur* Y147 задепонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, РАН (г. Пущино).

2.2. Клинический материал

В соответствии с внутренним протоколом Института неонатологии и педиатрии по выполнению правил эпидемиологического надзора еженедельно, в рамках микробиологического мониторинга в реанимационных неонатальных отделениях, проводили отбор клинического биоматериала с соблюдением правил техники безопасности при работе с патологическим (клиническим) материалом (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).

Транспортировку биоматериала в лабораторию микробиологии осуществляли в контейнерах многоразового использования. Весь биоматериал маркировали с указанием фамилии, имени, отчества пациента и даты взятия материала. К каждой пробирке прикрепляли направление с указанием фамилии, имени, отчества матери, диагноза, массы тела при рождении, номера истории болезни, даты взятия

материала, даты родов, проводимой антимикробной терапии (приложение №1). Биологический материал регистрировали в журнале и заносили в информационную программу «Системы микробиологического мониторинга «Микроб-2», а далее в электронную карту пациента программы «Медиалог».

Мазки со слизистой зева и кал новорождённых помещали в стерильные пробирки с транспортной средой (Сорап, Италия) и незамедлительно доставляли в лабораторию. В случае невозможности немедленной доставки хранили клинический материал в транспортной среде при комнатной температуре в течение 24 часов. Соскобы с кожи, отделяемое конъюнктивы, отделяемое пупочных ранок и операционных ран, содержимое кист различной локализации в случаях подозрения на инфекцию брали стерильными одноразовыми тампонами, помещенными в стерильные пластиковые пробирки (производства Deltalab, Испания) и немедленно доставляли в лабораторию, а при невозможности быстрой транспортировки использовали пластиковые пробирки с транспортной средой (Сорап, Италия). Мочу для посева получали с помощью катетера в стерильные пробирки и в максимально короткие сроки доставляли в лабораторию. У пациентов при наличии клинических признаков инфекционно-воспалительного процесса (апноэ, вздутие живота, менингеальные симптомы) и лабораторных маркёров (лейкоцитоз, тромбоцитопения, повышенный уровень С-реактивного белка, повышение прокальцитонина (ПКТ)) собирали образцы крови и спинномозговой жидкости в коммерческие флаконы с питательной средой для культивирования (BioMerieux, США). Культивирование проводили в автоматическом гематологическом анализаторе Bact/Alert (BioMerieux, США).

На начальном 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*. С целью решения данной проблемы в дополнение к обычным флаконам для

гемокультивирования, мы стали использовать жидкую питательную среду собственного изготовления по модифицированной 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%, левомецитин – 0,08%, pH - 5,8 – 6,1. У постели больного проводили посев 1-1.5 мл крови параллельно во флакон с питательной средой для гемокультивирования и 0.5-1 мл крови в пробирку с 5 мл жидкой среды Диксона. При посеве содержимого венозных катетеров и мочи также дополнительно использовали жидкую среду Диксона.

2.3. Микробиологические методы диагностики грибковых инфекций

2.3.1. Микроскопическая диагностика

Мазки крови и чистую культуру клеток гриба фиксировали 96% этиловым спиртом (либо над пламенем горелки) в дальнейшем окрашивали 1% водным раствором метиленового синего или по Граму с использованием набора красителей производства BioMerieux (Франция) в соответствии с инструкцией производителя. Микроскопию мазков проводили на бинокулярном микроскопе «Olympus» (Германия) с иммерсионным маслом под объективом 100. Принадлежность дрожжевых грибов к роду *Malassezia* относили на основании морфолого-биологических особенностей *Malassezia*: клетки дрожжей имели эллиптическую, грушевидную (в виде кегли для боулинга), овальную, цилиндрическую форму, размер клеток от 2–3 до 3–5 мкм.

2.3.2. Микробиологическое исследование

Для выделения грибов из клинических образцов использовали Сабуро декстрозный агар (OXOID, United Kingdom) с 0.5% хлорамфениколом, для выделения *M. furfur* дополняли исследование посевом на плотный модифицированный агар Диксона собственного приготовления по прописи:

экстракт солода 3,6%, пептон 0,6%, высушенную бычью желчь 2,0%, Твин 40 1,0%, глицерол 0,2%, олеиновую кислоту 0,2%, агар 1,2%, pH 6.

Инкубировали грибы в термостате Binder (Германия) при температуре 30°C в течение 72 часов. В дополнение к вышеуказанным средам для сравнительной характеристики питательных сред использовали CHROMagar *Malassezia* (CHROMagar, Франция) в состав которой входит: агар - 15,0, пептон - 38,0, хлорамфеникол - 0,5, глицерол - 2 гр/л, Твин 40 - 10 гр/л.

Образцы крови, мочу, спинномозговую жидкость дополнительно помещали в 5 мл жидкой питательной среды Диксона в объеме 0.5-1 мл, инкубировали в течение 5 суток, ежедневно проводили высевы на плотную питательную среду Диксона с дальнейшей идентификацией выросших колоний. Для подтверждения видовой принадлежности грибов *Malassezia* и определения чувствительности к противогрибковым препаратам использовали 48-часовые культуры, выращенные на модифицированном агаре Диксона.

Идентификацию основывали на морфологических и биохимических признаках дрожжевых грибов. Изоляты идентифицировали до вида с помощью биохимического анализатора Vitek Compact 30 (BioMerieux, Франция), методом MALDI TOF MS на масс-спектрометре Autoflex III (Bruker Daltonics, Германия).

Видовую идентификацию *M.furfur* также проводили методом ПЦР в режиме «реального времени» с использованием родоспецифических (*Malassezia*) и видоспецифических (*M. furfur*) праймеров. Выделение ДНК из культур проводили с использованием набора реагентов для выделения ДНК «Проба-ЦиТо» («ДНК-технология»). Амплификацию проводили с помощью детектирующего амплификатора ДТ-прайм («ДНК-технология»).

2.3.3. 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) и минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) методом серийных разведений в микропланшетах с применением чистых субстанций антимикотиков. Для контроля качества использовали референтные штаммы *M. furfur* ATCC 14521, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis* ATCC 22019. Постановка антимикотикочувствительности проведена в соответствии с Клиническими рекомендациями по определению чувствительности к антимикробным препаратам. Версия - 2018-03.

Минимальная ингибирующая (подавляющая) концентрация (МПК) - наименьшая концентрация исследуемого вещества, которая подавляет видимый рост исследуемого микроорганизма *in vitro* (в бульонных или на агаровых питательных средах) в стандартных условиях постановки опыта и выражается в мкг/мл (мг/л) или ед/мл [58].

Минимальная бактерицидная концентрация (МБК) - наименьшая концентрация антибиотика, которая при исследовании *in vitro* вызывает гибель 99,9% микроорганизмов от исходного уровня в течение 24 часов [58].

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

Приготовление основного раствора

Расчёт массы субстанции препарата или объёма растворителя, необходимого для приготовления основного раствора, вычисляли по формулам [58]:

$$\text{Вес (г)} = \frac{\text{Объем (л)} \times \text{Концентрация (мг/л)}}{\text{Активность (мг/г)}}$$

$$\text{Объем (л)} = \frac{\text{Вес (г)} \times \text{Активность (мг/г)}}{\text{Концентрация (мг/л)}}$$

Субстанции противогрибковых препаратов взвешивались с использованием аналитических весов (Vibra, Shinko Denshi, Япония), готовили концентрацию основного раствора противогрибкового препарата в 200 раз большую чем максимальная необходимая концентрация. В качестве растворителя для амфотерицина В, каспофунгина, флуконазола и микафунгина использовали диметилсульфоксид (ДМСО), (Марбиофарм, Россия).

Для каждого антимикотика в соответствии с клиническими рекомендациями существуют диапазоны концентраций действующего вещества: для амфотерицина В, каспофунгина и микофунгина от 0,008 до 4 мг/л, для флуконазола от 0,12 до 64 мг/л (Таблица 2) [58].

Таблица 2 –Диапазоны исследуемых концентраций противогрибковых препаратов

Противогрибковый препарат	Исследуемые диапазоны (мг/л)
Амфотерицин В	0,008-4
Флуконазол	0,12-64
Микафунгин	0,008-4
Каспофунгин	0,008-4

Приготовление рабочих растворов

Серии разведений (из расчёта 1 мг/л) готовили в двойной концентрации RPMI (Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium) с 2% раствором глюкозы. Двукратную концентрацию среды RPMI разводили в планшетах с добавлением

инокулюма, приготовленного в дистиллированной воде. Разведения готовили согласно рекомендациям ISO (International Organization for Standardization) [66].

Схема разведения антимикотических препаратов представлена в таблице 3 [58].

Таблица 3 – Схема разведения чистых субстанций антимикотических препаратов

Шаг	Концентрация (мг/л)	Объём раствора (мкл)	Объём растворителя (мкл)	Промежуточная концентрация раствора (мг/л)	Концентрация окончательная (мг/л)
1	3200	200	0	3200	32
2	3200	100	100	1600	16
3	3200	50	150	800	8
4	3200	50	350	400	4
5	400	100	100	200	2
6	400	50	150	100	1
7	400	50	350	50	0,5
8	50	100	100	25	0,25
9	50	50	150	12,5	0,125

Приготовление инокулюма

Готовили взвесь микроорганизмов в физиологическом растворе с оптической плотностью 10^7 КОЕ/мл: конечная посевная доза исследуемого микроорганизма на поверхности питательной среды составляла 10^4 КОЕ/мл. Поскольку коммерческие инокуляторы или стандартная бактериологическая петля диаметром 3,0 мм переносят 1-2 мкл жидкости, концентрация грибов в исходной суспензии должна соответствовать 10^7 КОЕ/мл. Данную концентрацию получали путем десятикратного разведения стандартной микробной суспензии, соответствующей стандарту 0,5 по Мак-Фарланду.

Метод последовательных микроразведений в жидкой питательной среде

Для постановки чувствительности грибов вида *M. furfur* к антимикотическим препаратам в жидкой питательной среде использовали две среды:

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

Исследования выполняли в стерильных одноразовых, 96-луночных планшетах с U-образными лунками ёмкостью 300 мкл.

В лунки микропланшета вносили по 100 мкл из каждой пробирки, содержащей соответствующую концентрацию (2х-кратная концентрация) противогрибкового препарата, в каждый вертикальный ряд, от первого до десятого. В каждую лунку одиннадцатого и двенадцатого вертикального ряда вносили 100 мкл двойной концентрации RPMI 2%G. В результате каждая лунка в рядах с 1 по 10 содержала 100 мкл 2х-кратной концентрации антимикотического препарата в двойной концентрации RPMI 2%G с 1% растворителем [58].

Чашки с серийными разведениями антимикотиков готовили за сутки до постановки опыта.

Метод определения минимальной ингибирующей концентрации (Е-тесты)

Для постановки чувствительности грибов вида *M. furfur* к антимикотическим препаратам с помощью Е-тестов использовали модифицированные нами питательные среды:

- агар Мюллера-Хинтон (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 Medium 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.

Приготовление инокулюма для постановки Е-теста

Стерильным ватным тампоном равномерно наносили на поверхность питательной среды 500 мкл грибковой суспензии и растирали по всей поверхности агара в трёх направлениях. Полоски Е-теста с концентрацией амфотерицина В 0,002-32 мкг/мл, каспофунгина 0,002-32 мкг/мл, микофунгина 0,009-32 мкг/мл и флуконазола 0,016-256 мкг/мл (Liofilchem, Италия) помещали на поверхность агара, предварительно подсушенного при комнатной температуре на протяжении 15 минут. Конец полоски Е-теста с самой низкой концентрацией антимикотического препарата располагали первым на чашке. МИС каждого препарата определяли после инкубации в термостате при температуре 35°C в течение 24 и 48 часов.

Учёт результатов чувствительности выделенных изолятов оценивали согласно Клиническим рекомендациям по определению чувствительности к антимикробным препаратам (версия-2018-03) [58]. В качестве критерия при интерпретации результатов использовали результаты определения чувствительности дрожжей к противогрибковым препаратам и для *Candida parapsilosis* пограничные значения МПК (Таблица 4) [58].

Таблица 4 – Пограничные значения МПК для *C. parapsilosis*

Пограничные значения МПК (мг/л)		
Антимикотический препарат	<i>Candida parapsilosis</i>	
	Чувствительный Ч<	Резистентный Р>
Флуконазол	2	4
Микафунгин	0,002	2
Каспофунгин	0,002	2
Амфотерицин В	1	1

2.3.4. Определение чувствительности клинических изолятов *M. furfur* к антисептикам

Исследование проводили на базе лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии (заведующий к.б.н., Фурсова Н.К.) ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора (г.Оболensk) (Директор академик РАН, д.м.н., профессор Дятлов И.А.). Антимикробную активность определяли согласно Методическим указаниям (МУ) 3.5.1.3439-17 [68]. Для проведения исследований использовали тест-объекты размером 5×5 см из линолеума, которые стерилизуют фламбированием с помощью смоченного в спирте горящего ватного тампона. Из двух суточной культуры гриба готовили суспензию с концентрацией около 2×10^9 КОЕ/мл в физиологическом растворе NaCl=9 г/л, для контроля численности готовили десятичные разведения суспензии в физиологическом растворе с последующим высевом на плотную питательную среду и подсчёта КОЕ. Суспензию культуры гриба (0,1 мл) наносили на тест-объект, стерильным шпателем равномерно распределяли по поверхности и подсушивали до полного высыхания в стерильных условиях. Необходимую дозу дезинфицирующего препарата (приложение №3) наносили на тест-объект. В тех случаях, когда норма расхода препарата не была указана, наносили 0,1 мл исследуемого препарата на тест-объект. Препарат равномерно распределяли по поверхности тест-объекта и выдерживали необходимое время, согласно приложению №3. Поскольку предполагалось применение данных дезинфицирующих средств для обработки рук персонала ОРИТН и ОХРИТН - выбирали режим с минимальным временем обработки в соответствии с рекомендациями производителя. После окончания экспозиции тест-объект заливали 10 мл раствора нейтрализатора, соответствующего данному дезинфицирующему средству (приложение №3), через 10 минут тест-объект переворачивали и выдерживали ещё 10 минут. Далее по 0,1 мл нейтрализатора высевали на чашки Петри с плотной питательной

средой, растирали стерильным шпателем и инкубировали при температуре 37°C в течение 6 суток. Для контрольных образцов вместо дезинфицирующих средств использовали стерильную водопроводную воду, контроль производили для каждого штамма и каждого типа нейтрализатора, согласно приложению 3. Для дезинфицирующих средств, которые полностью подавляли рост микроорганизмов, эксперимент повторяли дважды.

2.4. Протеомные методы в идентификации дрожжевых грибов

Для идентификации выделенных изолятов дрожжевых грибов применяли метод прямого и с предварительной экстракцией (рис.5) *MALDI-TOF MS* анализа. Для метода прямого *MALDI-TOF MS* использовали 48-ми часовые культуры грибов, наносили их тонким слоем на металлические мишени, подсушивали в течение минуты и покрывали матрицей. В качестве матрицы применяли альфа-циано-4-гидроксикоричную кислоту (Bruker Daltonics, Германия) [22].

Предварительную экстракцию проводили следующим образом:

- изолированную колонию культуры гриба переносили в пробирку типа «Эппендорф», содержащую 200 мкл деионизированной воды, перемешивали и добавляли 900 мкл этанола. Осадок центрифугировали на 14000 об/мин. в течение 10 минут, а затем растворяли в 20 мкл смеси 50% ацетонитрила и 35% муравьиной кислоты (Рисунок 5) [22].



Рисунок 5 – Протокол предварительной экстракции

Для каждого образца записывался отдельный масс-спектр, полученный в результате суммирования шести серий измерений по сто импульсов лазера. Масс-спектрометрический анализ осуществлялся с помощью времяпролетного масс-спектрометра AutoflexIII (Bruker-Daltonics, Германия). Внешняя калибровка проводилась с использованием точных значений масс известных белков *E. coli*. Для анализов спектров использовали программное обеспечение версии 5.0 (Bruker- Daltonics, Германия) [22].

Достоверными считались результаты при значениях показателя *score* > 1,8. При значении *score* 2,0 и выше принималось решение о точной видовой идентификации; значения показателя *score* от 1,8 до 2,0 – об идентификации до рода; недостоверными считали результаты со *score* ниже 1,8. При отсутствии удовлетворительных спектров и низких показателях *score* использовали полуавтоматический режим, программным способом меняя мощность лазерного излучения [22].

2.5. Молекулярно - генетические методы исследования изолятов

Чистые культуры грибов для проведения молекулярного исследования помещали в штрих-кодируемые пробирки типа «Eppendorf» с транспортной средой (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). Осаждение клеток проводили путём центрифугирования при 13000 об/мин в течение 10 минут. Полученные клетки ресуспендировали в 100 мкл физиологического раствора. Для выделения ДНК использовали наборы «Проба ГС» («ДНК-Технология», Россия) [67, 69]. Определение ДНК грибов проводили методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени с помощью коммерческой тест-системы («ДНК-Технология», Россия). Мишень для видовой идентификации (молекулярного баркодирования) дрожжевых грибов предложена более десяти лет назад [67, 69]. Высокая межвидовая вариабельность и внутривидовая консервативность нуклеотидной последовательности нетранскрибируемых межгенных спейсеров ITS1/ITS2 и фрагмента D1/D2 гена для большой рибосомальной субъединицы

26SpРНК позволяют разработать ряд наборов видоспецифических праймеров и флуоресцентно меченых зондов для уверенной видовой дифференциации грибов. Для определения вида использовали видоспецифические гибридизационные флуоресцентно меченные зонды с флуоресцентной меткой и гасителем флуоресценции. При образовании специфичного продукта происходит разрушение ДНК-зонда, прекращается действие гасителя на флуоресцентную метку, что приводит к возрастанию уровня флуоресценции. Уровень флуоресценции фиксируется детектирующим амплификатором. Количество разрушенных зондов (и соответственно, уровень флуоресценции) увеличивается прямо пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов и измеряется на каждом цикле амплификации. В состав ДНК-зондов, которые используются для детекции продуктов амплификации фрагментов геномов определяемых возбудителей, были включены флуоресцентные метки Cy5 и Fam. В состав ДНК-зондов для детекции продуктов амплификации внутреннего контрольного образца (ВК) и контроля взятия материала (КВМ) входит флуоресцентный краситель Нех. Амплификацию проводили на приборе «ДТ-964» («ДНК-Технология», Россия) в режиме реального времени. Обработку результатов осуществляли с помощью программного обеспечения к приборам автоматически [67, 69].

Подтверждение принадлежности дрожжевого гриба к виду *M. furfur* проводили путём секвенирования по Сенгеру видоспецифического участка 26S рРНК. Выделение ДНК из культур проводили с использованием набора реагентов для выделения ДНК «Проба-ЦиТо» («ДНК-технология»). Для секвенирования использовали два фрагмента ДНК: первый ампликон длиной 770 п.н. соответствующий регионам ITS1-2, используемый для видовой идентификации грибов, второй - ампликон длиной 661 п.н., соответствующий региону D1-D2 (позиции 23-684 гена 26S рибосомальной РНК). Амплификацию проводили с использованием детектирующего амплификатора ДТ прайм («ДНК-технология»). Оценку качества полученных ампликонов производили в 2% агарозном геле.

Секвенирование проводили на приборе 3130 Genetic Analyzer с использованием набора BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit согласно протоколу производителя. Определение видовой принадлежности проводили с использованием программного пакета BLAST [67, 69].

2.6. Статистическая обработка полученных результатов

Все результаты исследования были занесены в таблицы *Microsoft Excel* и проанализированны.

Результаты были обработаны с помощью программы STATISTICA 10 (StatSoft Inc., USA) для Windows версия 10.0 и сайт <http://medstatistic.ru>. Использовали непараметрические и параметрические методы. Критерием статистической достоверности получаемых данных считали общепринятую в медицине величину $p < 0.05$. Для решения поставленных задач было произведено ретроспективное сплошное когортное исследование. Для описания в численном выражении того, насколько отсутствие или наличие определённого исхода связано с присутствием или отсутствием определённого фактора в конкретной статистической группе высчитывали отношение шансов (OR). Шансом является отношение числа исследуемых, имеющих определённый признак (исход или фактор), к числу исследуемых, у которых данный признак отсутствует. Отношение шансов рассчитывали по следующей формуле:

$$OR = \frac{A \cdot D}{B \cdot C}, \text{ где}$$

A-фактор риска есть, исход есть,

B-фактор риска есть, исхода нет,

C-фактор риска отсутствует, исход есть,

D-фактор риска отсутствует, исхода нет.

Для оценки значимости отношения шансов рассчитывали границы 95% доверительного интервала. Формула для нахождения значения верхней границы 95% CI:

$$e^{\ln(OR)+1,96 \cdot \sqrt{\frac{1}{A}+\frac{1}{B}+\frac{1}{C}+\frac{1}{D}}}$$

Формула для нахождения значения нижней границы 95% CI:

$$e^{\ln(OR)-1,96 \cdot \sqrt{\frac{1}{A}+\frac{1}{B}+\frac{1}{C}+\frac{1}{D}}}$$

- Если отношение шансов превышает 1, то это означает, что шансы обнаружить фактор риска больше в группе с наличием исхода. Т.е. фактор имеет прямую связь с вероятностью наступления исхода.
- Отношение шансов, имеющее значение меньше 1, свидетельствует о том, что шансы обнаружить фактор риска больше во второй группе. Т.е. фактор имеет обратную связь с вероятностью наступления исхода.
- При отношении шансов, равном единице, шансы обнаружить фактор риска в сравниваемых группах одинакова. Соответственно, фактор не оказывает никакого воздействия на вероятность исхода.

Дополнительно в каждом случае обязательно оценивали статистическую значимость отношения шансов исходя из значений 95% доверительного интервала.

- Если доверительный интервал не включает 1, т.е. оба значения границ или выше, или ниже 1, делали вывод о статистической значимости выявленной связи между фактором и исходом при уровне значимости $p < 0,05$.
- Если доверительный интервал включает 1, т.е. его верхняя граница больше 1, а нижняя - меньше 1, делается вывод об отсутствии статистической значимости связи между фактором и исходом при уровне значимости $p > 0,05$.

- Величина доверительного интервала обратно пропорциональна уровню значимости связи фактора и исхода, т.е. чем меньше 95% доверительный интервал, тем более существенной является выявленная зависимость.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Ретроспективный анализ эпидемиологических и клинических особенностей колонизации *M. furfur* новорождённых, находящихся на лечении в отделениях реанимации и интенсивной терапии, в том числе хирургического профиля

В неонатальных отделениях Центра мониторинг видового состава и чувствительности к антимикотическим препаратам дрожжевых грибов (преимущественно грибов рода *Candida*), выделенных из биологического материала новорождённых, проводится с 2000 года [71, 73, 81, 84, 96,]. Регулярный микробиологический мониторинг, позволяет оперативно выявлять динамику видового состава грибов, колонизирующих новорождённых.

Нами проанализированы эпидемиологические аспекты мониторинга колонизации новорождённых дрожжевыми грибами в отделениях интенсивной терапии Центра за период с 2000 по 2018 год: частота и видовой состав грибов, колонизирующих зев и кишечник новорождённых в процессе госпитализации, а также изолятов, выделенных у новорождённых за 2015-2018 годы из различных локусов при подозрении на диссеминацию грибковой инфекции (кровь, моча, СМЖ и другие). Установлена возможная связь этих показателей с особенностями клинического статуса, выхаживания и лечения новорождённых.

На рисунке 6 представлены данные о динамике видового состава дрожжевых грибов, выделенных у новорождённых ОРИТН за период с 2000 по 2018 годы.

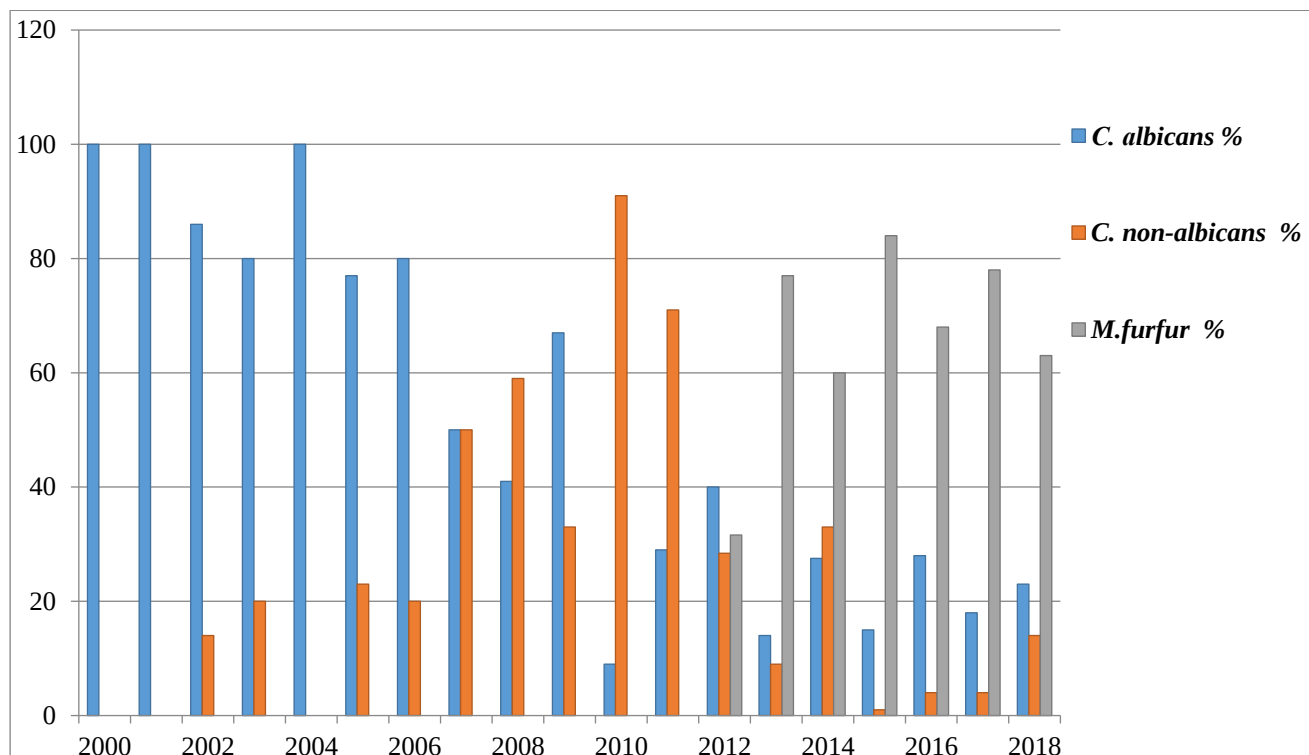


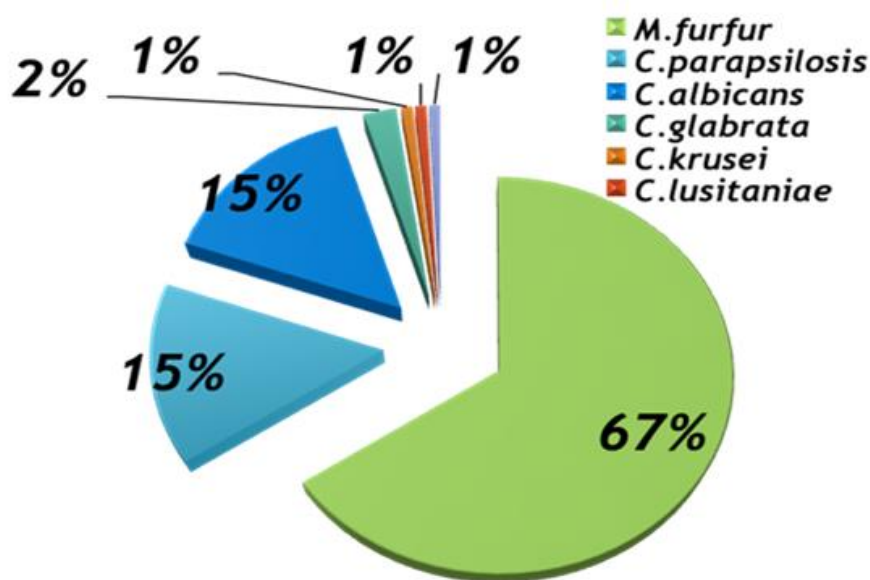
Рисунок 6 – Динамика видового состава дрожжевых грибов, выделенных у новорождённых ОРИТН И ОХРИТН

Как видно из графика, с 2000 года в структуре высеваемости грибов, выделенных от новорождённых, преобладали дрожжевые грибы *C.albicans*, с 2007 года на фоне широкого профилактического применения флуконазола, стали преобладать *Candida non-albicans* видов (*C. famata*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*), а на фоне широкого применения эхинокандинов для лечения инфекций, вызванных грибами *Candida non-albicans* видов, с 2012 года стали появляться и позже доминировать дрожжевые грибы *Malassezia furfur*.

В 2012 году из кала новорождённого, находящегося на выхаживании в отделении реанимации, впервые была выделена *M. furfur* на среде Лактобактагар (Оболенск), не являющейся специальной средой для выявления этого вида. Обнаружение «нового» гриба при рутинном исследовании стало основанием изменения алгоритма микробиологического обследования новорождённых с подозрением на развитие грибковой инфекции: к стандартному набору питательных сред добавлена среда лабораторного производства по прописи Диксона, для выделения *M. furfur*.

За период проспективного наблюдения (с 2015 по 2018 годы) в реанимационных отделениях новорождённых Центра дрожжевые грибы составили 8% от всех выделенных микроорганизмов (1808/22366). Начиная с 2014 года *M. furfur* стала преобладать в структуре дрожжевых грибов, выделяемых у новорождённых отделений реанимаций: её доля в видовой структуре дрожжевых грибов за период наблюдения составила 76% (1365/1808), а частота выделения - 5.5 на 100 выполненных анализов (Рисунок 7).

Рисунок 7 – Видовой состав дрожжевых грибов, выделенных у новорождённых ОРИТН



За период исследования нами проведено микробиологическое обследование 4008 новорождённых: из них 2604 новорождённых ОРИТН (65%) и 1404 – ОХРИТН (35%). *M. furfur* обнаружена у 9,7% обследованных детей (387/4008): из них 44% (n=169) – из ОРИТН и 56% (n=218) – ОХРИТН.

Проанализированы результаты 555 анализов аутопсийного материала, полученного от 147 умерших детей с различной соматической патологией и развитием инфекции в период с 2015 по 2018 годы: врождённые пороки развития,

недоношенные новорождённые с низкой массой тела при рождении (преимущественно с ОНМТ и ЭНМТ), врождённые инфекции и инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП). *M. furfur* выделена в 6 клинических наблюдениях (содержимое кишечника, кровь, лёгкое, печень) при следующих клинических диагнозах: недоношенность и синдром дыхательных расстройств (СДР) (n=4), стеноз двенадцатипёрстной кишки (n=1), врожденная диафрагмальная грыжа (n=1).

Частота выделения *M. furfur* у новорождённых в отделениях реанимации на протяжении четырёх анализируемых лет (таблица 5) 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 снизился до 7,6%, сравнявшись с показателем в ОРИТН (Таблица 5).

Таблица 5 – Частота выделения *M. furfur* у новорождённых в период с 2015 по 2018 годы.

Частота выделения <i>M. furfur</i> у обследованных новорождённых								
Года	2015		2016		2017		2018	
Отделения	ОРИТН	ОХРИТН	ОРИТН	ОХРИТН	ОРИТН	ОХРИТН	ОРИТН	ОХРИТН
Обследовано детей	562	226	680	225	710	390	652	563
Из них (+) результаты абс/%	36/6,4	42/18,5	32/4,7	73/32,0	50/7,0	60/15,0	51/7,8	43/7,6
Всего (+) результаты на <i>M. furfur</i> абс/%	788/10,0		905/12,0		1100/10,0		1215/57,7	

За четыре года проспективного наблюдения по данным историй болезни клинический диагноз инвазивный микоз (ИМ) был поставлен у 13

новорождённых в наблюдаемых отделениях, в том числе у 10 детей этиология процесса была связана с грибами рода *Candida* и только у трёх с *M. furfur*. Эти трое новорождённых имели ЭНМТ при рождении и были госпитализированы в ОРИТН.

Нам приходится констатировать, что оценка результата микробиологической диагностики инфекций, вызванных *M. furfur* чаще всего не находила отражения в клиническом или патологоанатомическом диагнозе. В определённой мере это можно объяснить новизной и неизученностью *M. furfur* в патологии новорождённых, а также с более привычной возможностью для врачей связать тяжесть состояния ребёнка с другими причинами и не усугублять отчётные эпидемиологические показатели по отделению. Поэтому при наличии клинических данных, косвенно подтверждающих этиологическую роль *M. furfur* в патологии новорождённых, мы считали адекватным провести анализ развития *M. furfur* – эпидемического процесса в наблюдаемых отделениях новорождённых в зависимости от результатов микробиологического исследования. С этой целью все новорождённые с положительными результатами посевов на *M. furfur* в зависимости от биологического локуса, из которого выделяли грибок, были разделены на три группы:

I - новорождённые, имеющие изолированную фунгемию, фунгурию или катетер-ассоциированную фунгемию без колонизации слизистых оболочек ЖКТ *M. furfur*.

II – новорождённые, имеющие *M. furfur* - фунгемию / фунгурию / катетер-ассоциированную фунгемию на фоне колонизации слизистых оболочек ЖКТ *M. furfur*.

III - новорождённые, у которых *M. furfur* колонизировала только ЖКТ и не была обнаружена ни в крови, ни в моче, ни в ЦВК.

У новорождённых I и II групп полученный результат микробиологической диагностики мы трактовали как «инвазивный микоз», а у новорождённых III группы обнаружение *M. furfur* в ЖКТ расценивали как «колонизация». Мы

полагали такой подход позволит более объективно оценить тяжесть состояния новорождённого при интерпретации микробиологического исследования для получения адекватных и достоверных выводов.

Таким образом нами установлено, что более чем у половины новорождённых 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.

Диссеминацию процесса – «инвазивный микоз» (группа I и II) обнаруживали у 25-38,5% новорождённых с положительными результатами исследования, при этом чаще всего она наблюдалась на фоне колонизации ЖКТ. Соотношение между детьми, у которых отмечалась только колонизация ЖКТ (группа III), с новорождёнными, у которых отмечалась диссеминация (группа I+II) на протяжении всего исследования была сопоставима и составляло 2:1.

Данные о частоте выделения *M. furfur* у новорождённых в зависимости от массы тела при рождении представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Частота выделения *M. furfur* у новорождённых с разной массой тела при рождении (абс.число/%)

Масса тела при рождении	менее 1500 граммов	1500 - 2500 граммов	более 2500 граммов
группы	n = 164	n = 75	n = 148
I-II	74 (45%)	21 (28%)	34 (23%)
III	90 (55%)	54 (72%)	114 (77%)

У новорождённых с ОНМТ и ЭНМТ при рождении диссеминация процесса наблюдалась практически в половине случаев (45%), в то время как в двух других группах (1500-2500 граммов и более 2500 граммов) была реже и составляла 28% и 23% соответственно) (Таблица 6).

ОНМТ и ЭНМТ при рождении – известный фактор риска развития системных микозов. В ходе нашего исследования также отмечено, что среди

детей с диссеминацией грибковой инфекции 57% (74/129) были новорождённые с ОНМТ и ЭНМТ при рождении.

Важным фактором риска развития грибковой инфекции, вызванной *M.furfur* являются оперативные вмешательства и парентеральное питание таких пациентов растворами, содержащими липидные смеси.

Нами проанализировано соотношение рисков диссеминации грибкового процесса у новорождённых, перенёсших любые оперативные вмешательства: сравнили группу пациентов ОХРИТН, перенесших оперативное лечение и группу пациентов ОХРИТН без оперативного лечения. Группу сравнения составили пациенты ОРИТН, в том числе рождённые с ЭНМТ и ОНМТ при рождении (Таблица 7).

Таблица 7 – Частота выделения *M. furfur* у детей после оперативного лечения (абс.)

	Новорождённые, перенесшие оперативное лечение	Новорождённые без оперативного лечения	Всего
I+II	61	69	130
III	123	134	257
Всего	184	203	387

Как видно из, представленных в таблице 7 данных, частота выделения *M.furfur* у детей после оперативных вмешательств не имеет выраженных достоверных различий. Установлено, что отношение шансов диссеминации *M.furfur* среди новорождённых, после оперативного лечения в 1,784 раза выше, чем среди новорождённых с ОНМТ и ЭНМТ при рождении. Наблюдаемая зависимость является статистически значимой, так как 95% доверительный интервал (CI) включает 1, значения его нижней и верхней границ больше 1 (Таблица 8, 9).

Таблица 8 – Расчёт отношения шансов выделения *M. furfur* с 95% доверительным интервалом

	Фактор риска есть (оперативные вмешательства)	Факторов риска нет	Всего
Исход есть (выделение <i>M. furfur</i>)	184	203	387
Исход отсутствует (контрольная группа)	1220	2401	3621
Всего	1404	2604	4008

Таблица 9 – Результаты статистического исследования

Шанс найти фактор риска в основной группе	0.906
Шанс найти фактор риска в контрольной группе	0.508
Отношение шансов (OR)	1.784
Стандартная ошибка отношения шансов (S)	0.108
Нижняя граница 95% ДИ (CI)	1.444
Верхняя граница 95% ДИ (CI)	2.203

Таким образом, существует статистически значимая связь между таким фактором риска как оперативные вмешательства и развитием диссеминации при уровне значимости $p < 0,05$. Оперативное вмешательство является значимым фактором риска по развитию системных микозов, вызванных *M. furfur*.

С эпидемиологической целью однократно на *M. furfur* был обследован медицинский персонал отделений. Для исследования брали соскобы с кожи заушных складок персонала ОХРИТН и ОРИТН.

Обследовано 65 сотрудников, из них 22 сотрудника отделения ОХРИТН и 43 сотрудника ОРИТН. У 2/65 сотрудников (3%) обнаружена *M. sympodialis*, у 3 /65 (4,6%) сотрудников - *M. furfur*.

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

Учитывая существующие проблемы выделения и идентификации дрожжевых грибов вида *M. furfur* и с целью оптимизации микробиологического исследования проведён сравнительный анализ идентификации 50 клинических изолятов дрожжевых грибов, отобранных путём случайной выборки, выделенных на агаре Диксона по морфологическим признакам (строение клеток) схожих с *M. furfur*.

Биохимический метод идентификации.

В базе данных бактериологического анализатора VITEK2Compact 30 имеются два вида малацезий - *Malassezia furfur* и *Malassezia pachydermatis*. По биохимическим показателям протестировано 50 изолятов, выделенных на среде Диксона и морфологически сходны с грибами вида *M. furfur*: идентификация подтверждена в 20 случаях (40%), что не позволяет использовать данный метод для идентификации *M. furfur* и диктует необходимость в дополнительных методах подтверждения видовой принадлежности малацезий.

Метод MALDI-TOF MS.

50 отобранных изолятов параллельно протестированы методом *MALDI-TOF* спектрометрии. Несмотря на то, что в базе данных версии 3.0 масс-спектрометра Autoflex III имеются масс-спектры дрожжевых грибов вида *M.furfur* все наши изоляты, выросшие на среде Диксона, не были идентифицированы. При культивировании на Лактобактагаре, в состав которого входит Твин (необходимый для культивирования *M. furfur*) мы получили следующие результаты: только один изолят был идентифицирован как *M. furfur*, из оставшихся 49 изолятов два определены с низкой степенью достоверности (*score*

менее 1,5) и 47 изолятов не были идентифицированы как *M. furfur* (Рисунок 8, 9, 10).

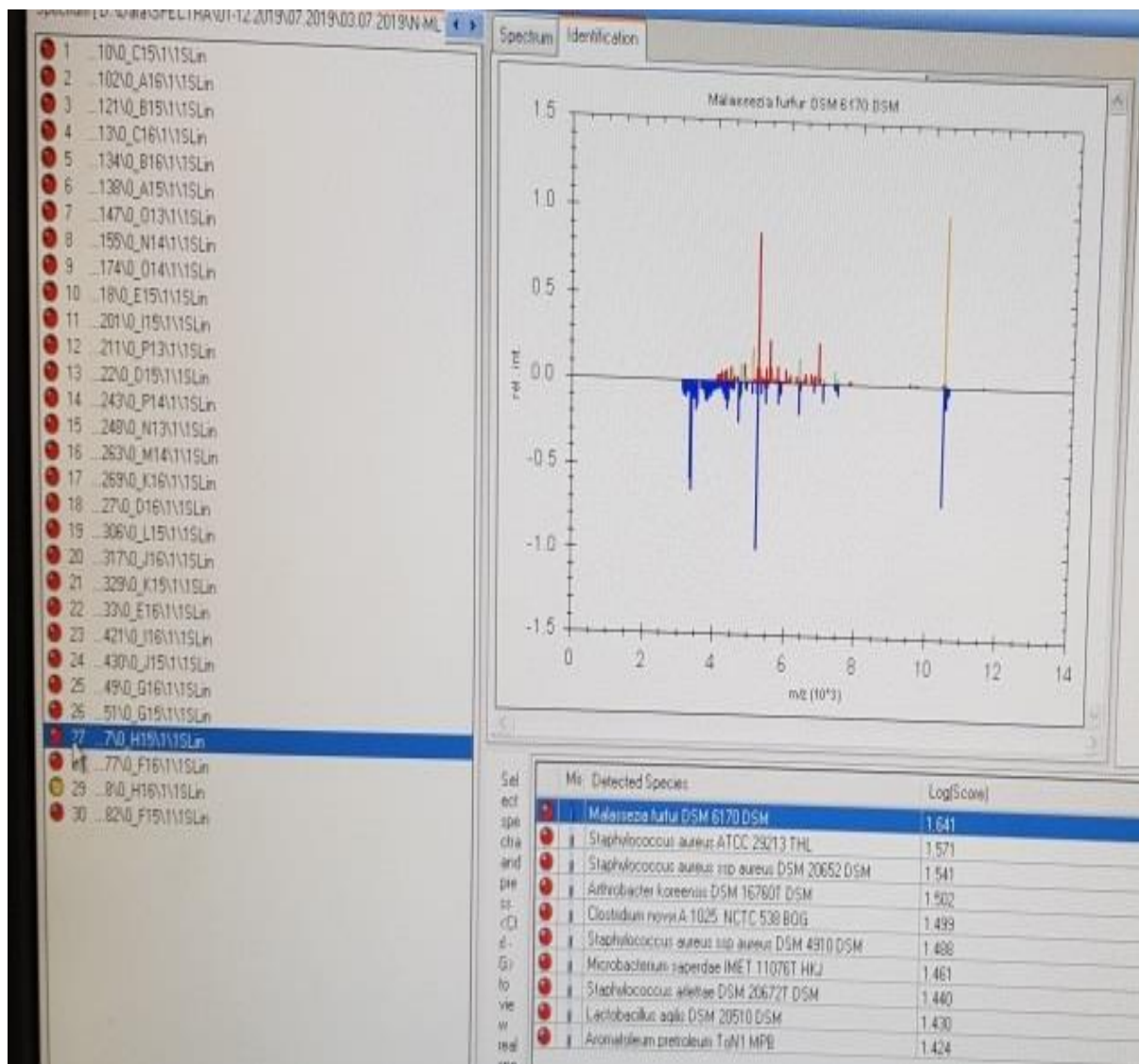


Рисунок 8 – Результат MALDI-TOF MS анализа идентификации *M. furfur* (score =1,6)

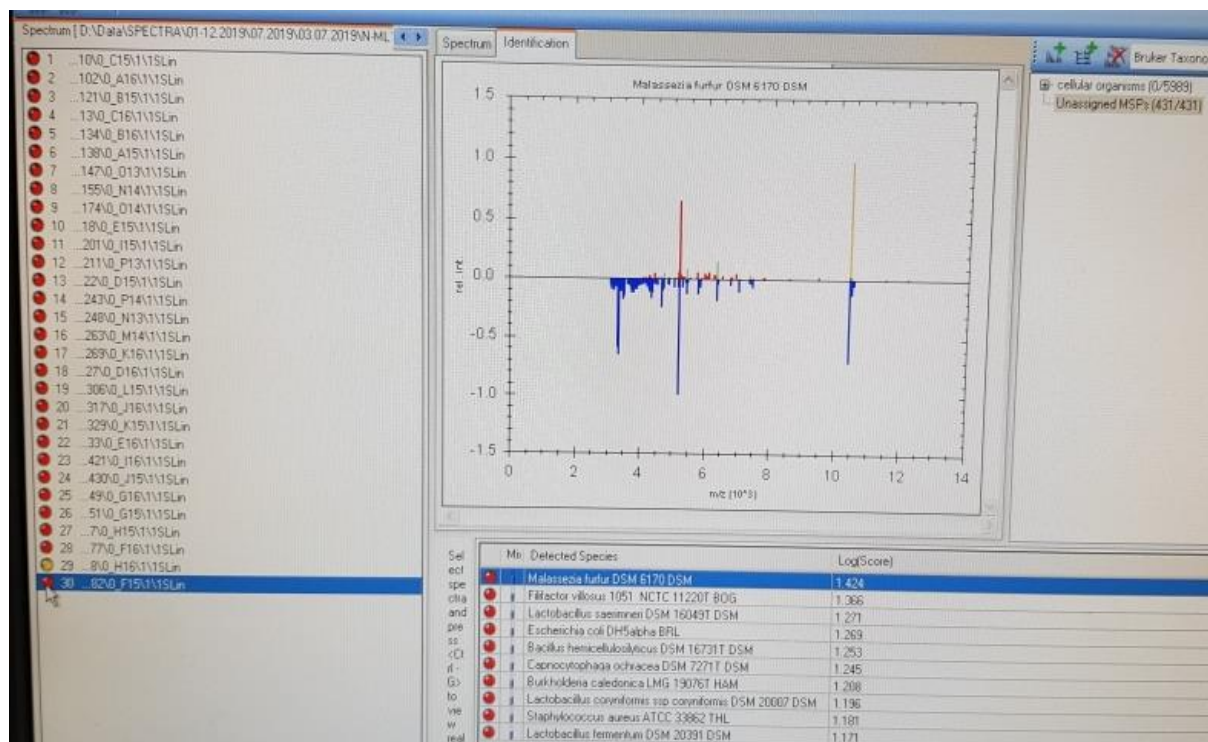


Рисунок 9 – Результат MALDI-TOF MS анализа идентификации *M. furfur* (score=1,4)

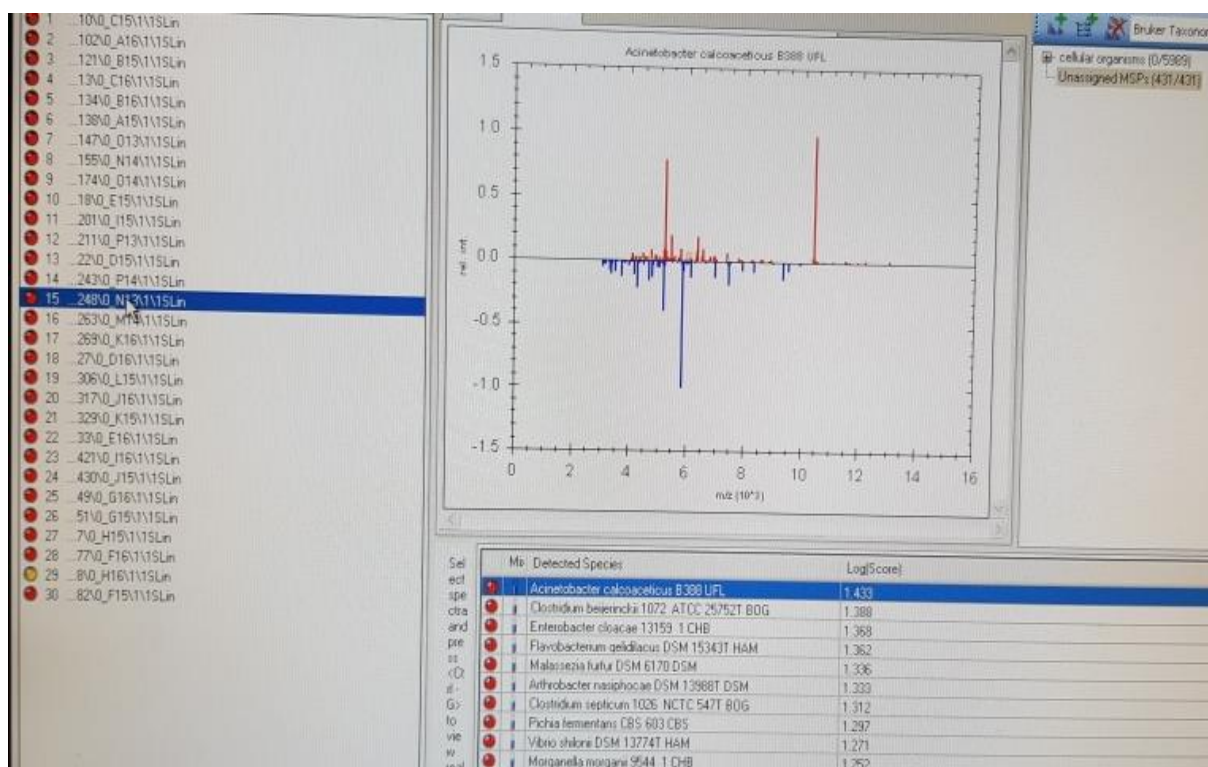


Рисунок 10 – Результат MALDI-TOF MS анализа идентификации *M. furfur* (score=1,3)

Методом случайной выборки из коллекции малацезий отобрано 50 клинических изолятов для идентификации на масс-спектрометре VitekMS (Shimadzu, Япония). Исследование проводили на базе кафедры микробиологии и вирусологии ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (заведующий кафедрой д.м.н., профессор Кафарская Л.И.) Результат идентификаций оказался схожим с проведённым ранее анализом на масс-спектрометре AutoflexIII (Bruker Daltonics, Германия) – только два изолята верифицированы как *M. furfur* (Рисунок 11).

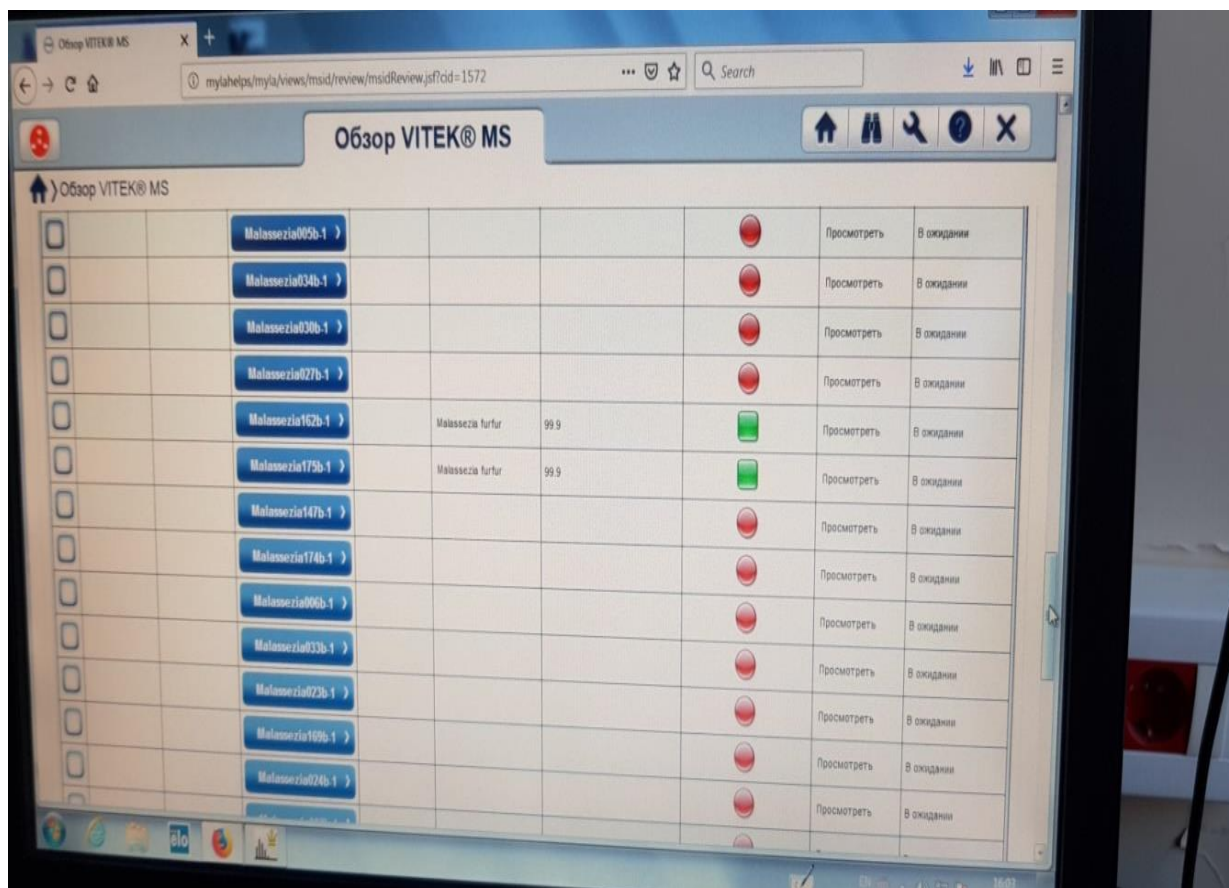


Рисунок 11 – Идентификации изолятов *M. furfur* на масс-спектрометре «Vitek MS»

Несмотря на то, что MALDI- масс-спектрометрия признана оптимальным методом для идентификации дрожжевых грибов [20], в настоящее время этот метод не может быть рекомендован в практике микробиологических лабораторий для идентификации *M. furfur*. Существующие базы данных масс-

спектрометров нуждаются в дополнении масс-спектрами различных штаммов *M.furfur*.

Молекулярно - генетический метод идентификации.

Разработка оптимальных для проведения исследований молекулярно-генетических тест-систем позволила бы упростить задачу выявления основных возбудителей грибковых инфекций и повысить скорость их обнаружения. В настоящее время комплексные тест-системы, основанные на методе ПЦР, имеющиеся в России и мире, способны определять только *Candida albicans* и ограниченное число дрожжевых грибов *Candida non-albicans* видов, тогда как тест-система должна иметь достаточно широкий спектр различных видов грибов, этиологически значимых для человека в современных условиях. В ходе нашего исследования совместно с Институтом репродуктивной генетики ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор, профессор РАН, д.б.н. Трофимов Д.Ю.) разработана экспериментальная комплексная тест-панель, основанная на методе мультиплексной ПЦР в режиме «реального времени». Тест-панель позволяет идентифицировать грибы, относящиеся к 14 таксонам, и включает родоспецифические и видоспецифические праймеры на малацезии: *Meyerozyma guilliermondii* (*Candida guilliermondi*), *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*), *Candida glabrata*, *Kluyveromyces marxianus* (*Candida kefyr*), *Pichia kudriavzevii* (*Candida krusei*), *Candida auris*, *Clavispora lusitaniae* (*Candida lusitaniae*), *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, ***Malassezia spp.***, ***Malassezia furfur***.

Параллельно, методом ПЦР, при помощи разработанной тест-панели провели идентификацию отобранных 50 изолятов, предварительно охарактеризованных нами как малацезии – в результате исследования все изоляты были идентифицированы как *M. furfur*. В качестве контроля использовали референтный штамм *M. furfur* ATCC 14521. Принадлежность изолятов к *M.furfur* подтверждена секвенированием видоспецифического участка гена 26S рРНК.

После идентификации 50 изолятов методом ПЦР с помощью, разработанной нами тест-панели, были протестированы все 430 изолятов дрожжевых грибов, выделенных из биологического материала новорождённых и отнесенных по морфологическим признакам к грибам рода *Malassezia*. Из 430 изолятов идентифицированы как *M. furfur* 412 изолятов, один из 430 изолятов оказался в смеси с культурой *Saccharomyces cerevisiae*, а один в смеси с *Candida parapsilosis*, 8 изолятов идентифицированы как *Malassezia sympodialis*, 5 - *Saccharochomyces cerevisiae* и 3 - *Candida parapsilosis* (Таблица 10).

Таблица 10 – Видовая идентификации 430 изолятов малацезий методом ПЦР с использованием разработанной тест-панели (абс. число)

Идентифицированный вид дрожжевого гриба	N
<i>Malassezia furfur</i>	412
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> + <i>M. furfur</i>	1
<i>Candida parapsilosis</i> + <i>M. furfur</i>	1
<i>Malassezia sympodialis</i>	8
<i>Saccharochomyces cerevisiae</i>	5
<i>Candida parapsilosis</i>	3
Всего	430

Все изоляты, не идентифицированные как *M. furfur* или обнаруженные в смеси были дополнительно культивированы, выделены чистые культуры и протестированы методом ПЦР и *MALDI-TOF-MS* анализа. В результате подтверждена принадлежность к указанным в таблице 10 видам дрожжевых грибов.

Таким образом, из представленных в таблице 11 данных, идентификация *M.furfur* методом *MALDI-TOF-MS* подтверждена в 6% (3/50), биохимическим методом в 40% (20/50) и методом ПЦР в 100% (430/430) исходя из этого мы можем сделать вывод, что идентификация дрожжевых грибов вида *M. furfur* с

помощью метода ПЦР из выросшей колонии и детекция её в биологическом материале пациентов, является перспективной и в дальнейшем может быть использована в рутинной практике.

Таблица 11 – Сравнительный анализ методов идентификации грибов *M. furfur*

Методы идентификации	Положительные результаты идентификации
Биохимический	40% (20/50)
<i>MALDI-TOF-MS</i> анализ	6% (3/50)
Молекулярно-генетический (ПЦР)	100% (430/430)

3.3 Анализ чувствительности in vitro к антимикотическим препаратам и антисептикам клинических штаммов M. furfur

Для постановки эксперимента по определению чувствительности к противогрибковым препаратам отобрано 29 изолятов *M. furfur*, выделенных у новорождённых ОРИТН и ОХРИТН. В качестве контроля использовали штамм *Malassezia furfur* ATCC 14521.

Чувствительность изолятов определяли методом диффузии в агар с использованием Е-тестов с антимикотиками (амфотерицин, флуконазол, миконазол, каспофунгин) в соответствии с Клиническими рекомендациями по определению чувствительности к антимикробным препаратам (Версия-2018-03) [58] на среде Мюллера Хинтон (МХ) с метиленовым синим и глюкозой, в нашей модификации с Твином и олеиновой кислотой для создания необходимых условий роста *M. furfur* (Таблица 12).

Таблица 12 – Результаты определения чувствительности штаммов *M. furfur* к противогрибковым препаратам на среде МХ с использованием Е-тестов

№ штамма	флуконазол мкг\мл	каспофунгин мкг\мл	микафунгин мкг\мл	амфотерицин мкг\мл
317	≥ 256	≥ 32	≥ 32	0,38
421	≥ 256	≥ 32	≥ 32	0,5

№ штамма	флуконазол мкг\мл	каспофунгин мкг\мл	микафунгин мкг\мл	амфотерицин мкг\мл
102	≥ 256	≥ 32	≥ 32	0,5
329	≥ 256	≥ 32	≥ 32	0,5
306	≥ 256	≥ 32	≥ 32	0,5
155	≥ 256	≥ 32	≥ 32	0,5
243	≥ 256	≥ 32	≥ 32	0,38
269	≥ 256	≥ 32	≥ 32	0,5
263	≥ 256	≥ 32	≥ 32	0,5
201	≥ 256	≥ 32	≥ 32	0,5
174	≥ 256	≥ 32	≥ 32	0,5
7	≥ 256	≥ 32	≥ 32	0,5
33	≥ 256	≥ 32	≥ 32	0,75
8	-	-	-	-
77	≥ 256	≥ 32	≥ 32	0,5
134	≥ 256	≥ 32	≥ 32	0,5
18	≥ 256	≥ 32	≥ 32	0,5
27	≥ 256	≥ 32	≥ 32	0,25
211	≥ 256	≥ 32	≥ 32	0,5
248	≥ 256	≥ 32	≥ 32	0,75
82	≥ 256	≥ 32	≥ 32	0,38
49	≥ 256	≥ 32	≥ 32	0,38
121	≥ 256	≥ 32	≥ 32	0,75
147	≥ 256	≥ 32	≥ 32	0,75
51	≥ 256	≥ 32	≥ 32	0,5
10	≥ 256	≥ 32	≥ 32	0,75
22	≥ 256	≥ 32	≥ 32	0,5
13	≥ 256	≥ 32	≥ 32	0,38
138	≥ 256	≥ 32	≥ 32	0,5
ATCC 14521	нет роста	нет роста	нет роста	нет роста

Из 30 исследованных изолятов два не были культивированы на данной среде в том числе контрольный штамм *Malassezia furfur* ATCC 14521. Повторная попытка посева контрольного штамма на питательную среду МХ не дала

положительного результата (Таблица 12). В результате учёт полученных данных эксперимента проведён без контроля (Рисунок 12).



А - контрольный штамм

Б - клинический изолят

Рисунок 12 – Результат чувствительности *M. furfur* к амфотерицину В контрольного штамма (А) и клинического изолята (Б).

У 28 исследованных изолятов минимальные ингибирующие концентрации (МИК) к флуконазолу составили более 256 мкг/мл, к каспофунгину более 32 мкг/мл, к микафунгину более 32 мкг/мл, что было расценено нами как устойчивость к вышеперечисленным антимикотикам. МИК амфотерицина В у этих изолятов находилась в пределах диапазона от 0,25 до 0,75 мкг/мл, что на наш взгляд свидетельствует о чувствительности изученных изолятов к амфотерицину В (Таблица 12).

Чувствительность 15 из 29 изолятов дополнительно определяли в соответствии рекомендациям EUCAST на среде PRMI1640 с MOPS, в нашей модификации с Твином и олеиновой кислотой с целью создания необходимых условий для роста *M. furfur*.

Таблица 13 – Результаты определения чувствительности *M. furfur* к противогрибковым препаратам на среде PRMI 1640

№ штамма	флуконазол мкг\мл	каспофунгин мкг\мл	микафунгин мкг\мл	амфотерицин мкг\мл
317	≥ 256	≥32	≥32	6
421	≥ 256	≥32	≥32	8
306	≥ 256	≥32	≥32	4

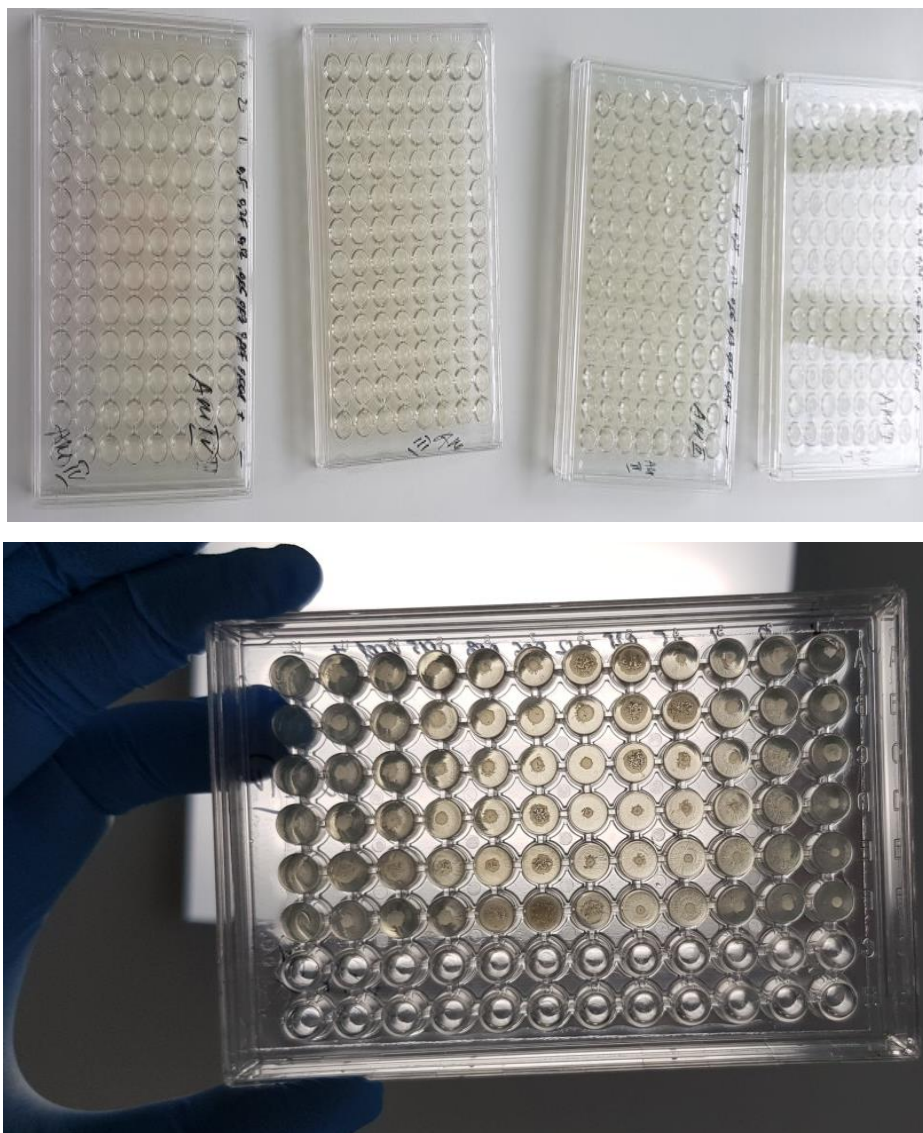
№ штамма	флуконазол мкг\мл	каспофунгин мкг\мл	микафунгин мкг\мл	амфотерицин мкг\мл
243	≥ 256	≥ 32	≥ 32	8
7	≥ 256	≥ 32	≥ 32	3
33	≥ 256	≥ 32	≥ 32	4
8	≥ 256	≥ 32	≥ 32	8
77	≥ 256	≥ 32	≥ 32	6
18	≥ 256	≥ 32	≥ 32	8
27	≥ 256	≥ 32	≥ 32	3
211	≥ 256	≥ 32	≥ 32	4
10	≥ 256	≥ 32	≥ 32	8
22	≥ 256	≥ 32	≥ 32	6
13	≥ 256	≥ 32	≥ 32	24
ATCC 14521	2	≥ 32	≥ 32	0,38

Из 15 исследованных изолятов все были культивированы на данной среде в том числе контрольный штамм *M. furfur* ATCC 14521. Проанализировав чувствительность 15 изолятов методом диффузии в агар с использованием E-тестов с антимикотиками (амфотерицин В, флуконазол, миконазол, каспофунгин) на среде PRMI 1640 мы получили следующие результаты (Таблица 13): МИК к флуконазолу контрольного штамма *M. furfur* ATCC 14521 составила 2 мкг\мл; МИК к флуконазолу 14 изолятов *M. furfur* составила более 256 мкг\мл, что свидетельствует об устойчивости к данному антимикотику. У всех 15 изолятов значения МИК к микафунгину и каспофунгину составили более 32 мкг\мл, что тоже было расценено как резистентность. МИК амфотерицина отличалась от полученных значений МИК на среде МХ с метиленовым синим и составляла в диапазоне от 0,38 мкг\мл (расценено как чувствительные штаммы) до 24 мкг\мл (возможно следует интерпретировать как резистентность, исходя из того, что максимальная суточная доза препарата составляет 1.5 мг\кг) (Таблица 13).

Необходимо учитывать, что истинные и утвержденные комитетами EUCAST и CLSI МИКи для *M. furfur* в настоящее время не определены, при этом мы расценили, полученные высокие значения МИК, как устойчивость изолятов и

рекомендуем принимать во внимание данный факт при назначении антимикотической терапии. Однако лечащим врачам не следует исключать антимикотики из использования, основываясь только на полученных данных МИК, а решение по терапии необходимо принимать в каждом конкретном случае.

Параллельно в эксперименте у 30 штаммов *M. furfur* определены МИК амфотерицина В, каспофунгина, флуконазола и микофунгина методом серийных разведений в микропланшетах с использованием чистых субстанций антимикотиков на среде 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 (Рисунок 13).



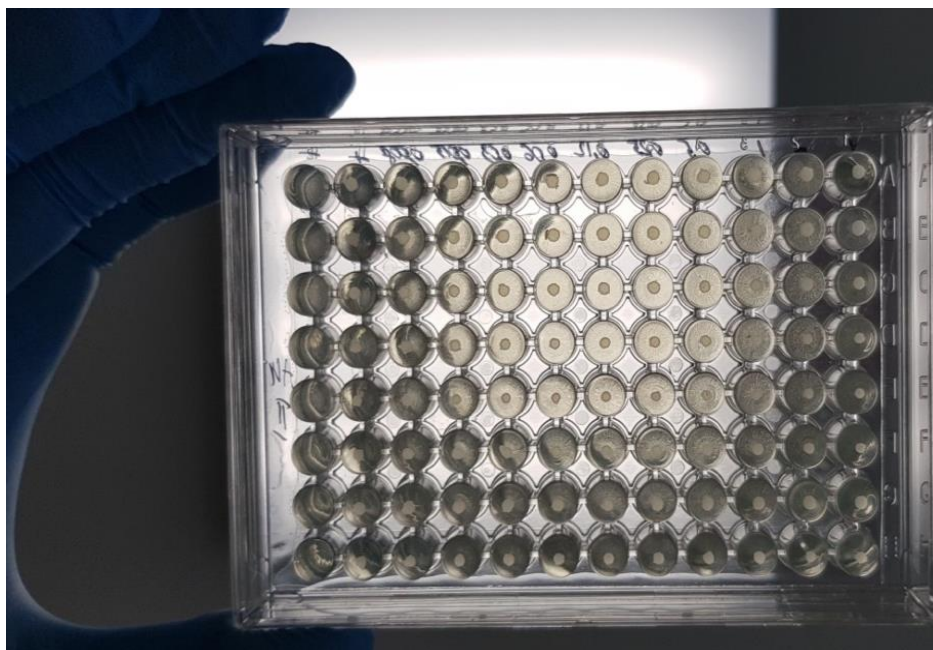


Рисунок 13 – Результаты определения чувствительности *M. furfur* к противогрибковым препаратам на среде PRMI 1640 в микропланшетах.

При подсчёте результатов обнаружен рост *M. furfur* во всех лунках в связи с чем интерпретация полученных данных не представлялась возможной.

Изучение антимикробной активности дезинфицирующих средств в отношении клинических штаммов *Malassezia furfur*

Изучено антимикробное действие дезинфицирующих средств, используемых в ежедневной практике ОРИТН и ОХРИТН.

Для исследования выбраны следующие дезинфицирующие средства: №1 - дезинфицирующее средство, содержащее 68,229% этанола, 5,0% изопропанола и 0,115% 1,3-бутандиола (Республика Беларусь); №2 - раствор, содержащий в качестве действующих веществ 1-пропанол - 30%, 2-пропанол - 45% и октенидин дигидрохлорид - 0,1 % (Германия); №3 - антисептик, содержащий изопропиловый спирт (2-пропанол) – 60% и комплекс ЧАС - 0,15%, суммарно (Россия); №4 - антисептик в качестве действующих веществ в состав которого входит перекись водорода – 15%, полигексаметиленгуанидина гидрохлорид (ПГМГ) – 12% (Россия); №5 - спрей, содержащий синергетическую смесь ПГМГ, алкилдиметилбензиламмоний хлорид, додецилдиметиламмоний хлорид (ЧАС) и N,N-бис (3-аминопропил) додециламина - суммарно 19 % $\pm$ 1 (Россия); №6 - раствор, содержащий в качестве активно действующих веществ N,N – бис- (3-аминопропил) додециламин – 0,17%, N,N – дидеция - N,N – диметиламмоний хлорид - 0,20%, алкилдиметилбензиламмоний хлорид – 0.25%, (Россия), №7 - средство, содержащее алкилдиметилбензиламмоний хлорид ($0,15 \pm 0,01\%$) и пропанол – 2 (изопропанол) ($55,0 \pm 1,0\%$) (Россия). Исследование проводили в соответствии с Методическими указаниям МУ3.5.1.3439-17 [68] на штаммах, выделенных из кала, зева, крови новорождённых Центра.

Наносимая на тест-объекты доза *M. furfur* составляла $2 \times 10^9 \pm 1 \times 10^9$ КОЕ/мл. Уровень КОЕ всех штаммов в контрольных экспериментах после высушивания снизился примерно в 10^5 раз (Рисунок 14, 15).

Препараты №5 и №3 в используемых режимах не оказывали значительного фунгицидного действия на тестируемые штаммы *M. furfur* (Рисунок 15). Действие препаратов №1, №7 и №6 оказалось штаммо-специфичным (часть изолятов оказались устойчивы к антисептику, а часть - чувствительны): *M. furfur* 090

устойчив к антисептикам №1 и №6; *M. furfur* 013 - к антисептику №1; *M. furfur* 008 - к №7 (Рисунок 14, 15). Препараты №2 и №4 оказывали фунгицидное действие на все тестируемые культуры (Рисунок 16). Повторные эксперименты подтвердили полученные данные.

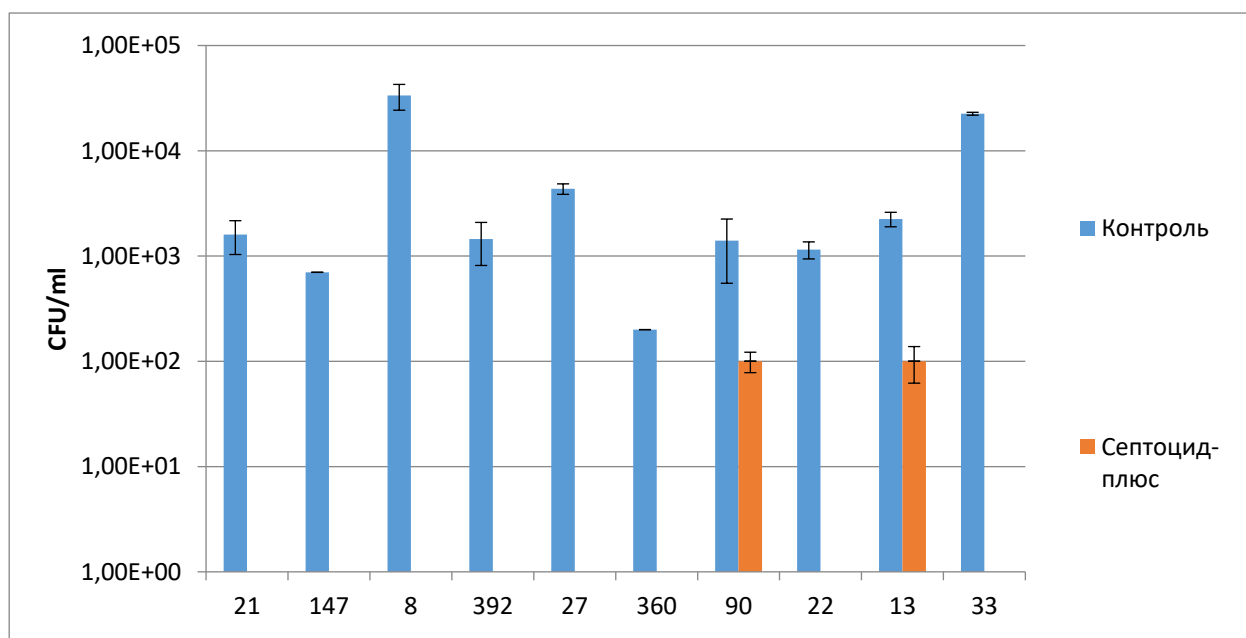


Рисунок 14 – Уровень КОЕ штаммов *M. furfur* после экспозиции дезинфицирующего средства №1 и в контрольном эксперименте

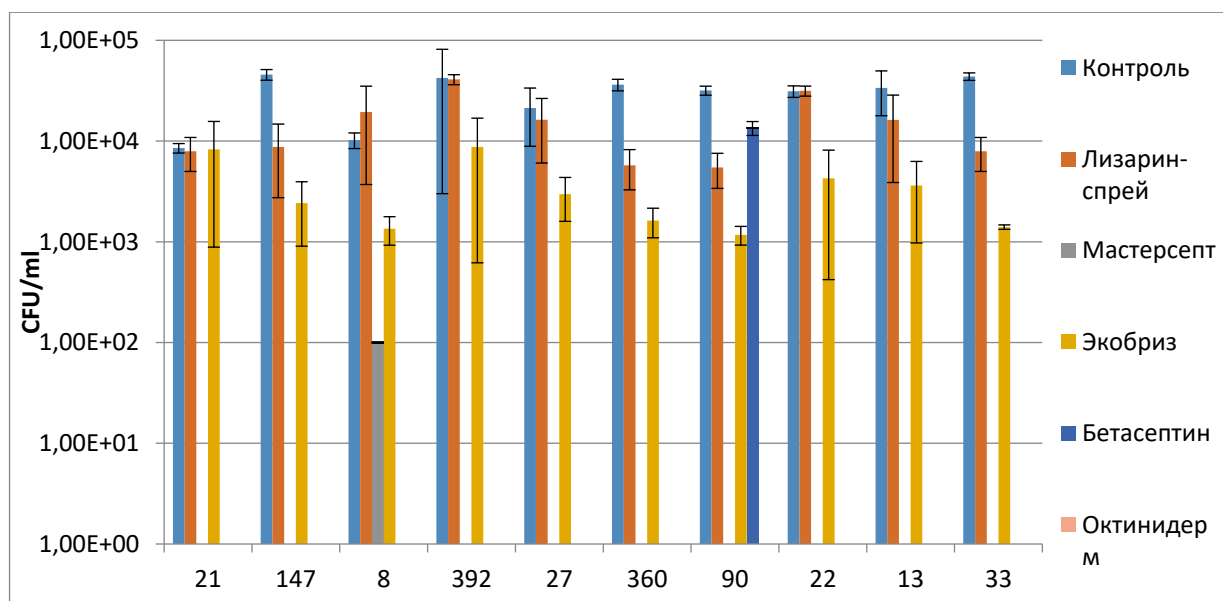


Рисунок 15 – Уровень КОЕ штаммов *M. furfur* при действии дезинфицирующих средств №5, №7, №3, №6, №2 и в контрольном эксперименте

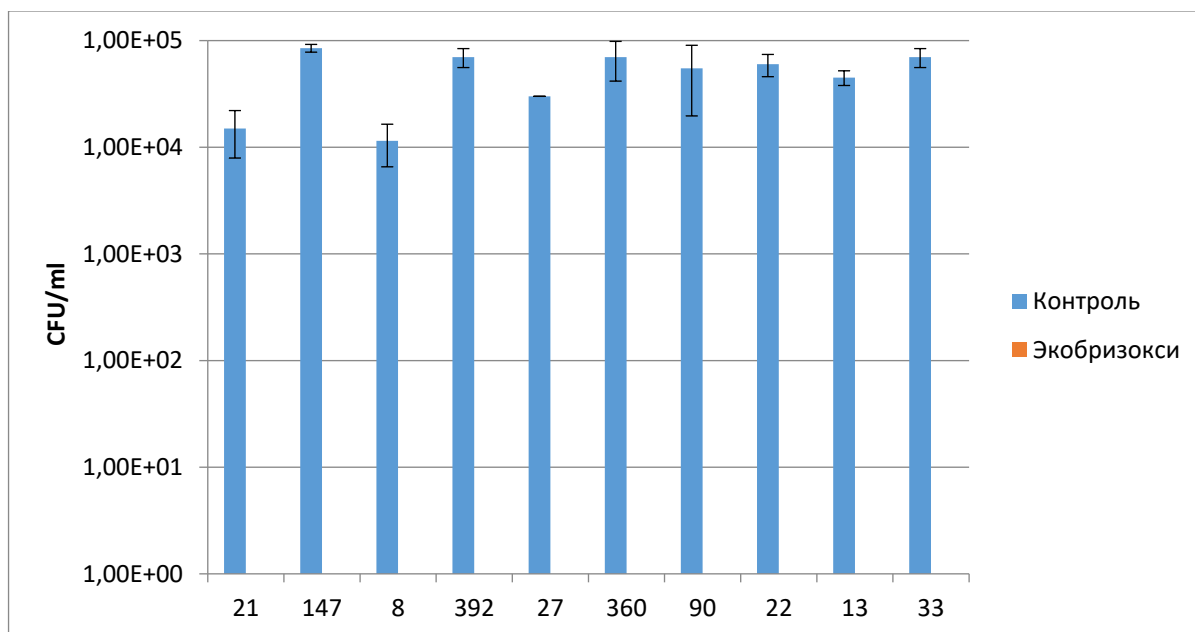


Рисунок 16 – Уровень КОЕ штаммов *M. furfur* при действии дезинфицирующего средства №4 и в контрольном эксперименте

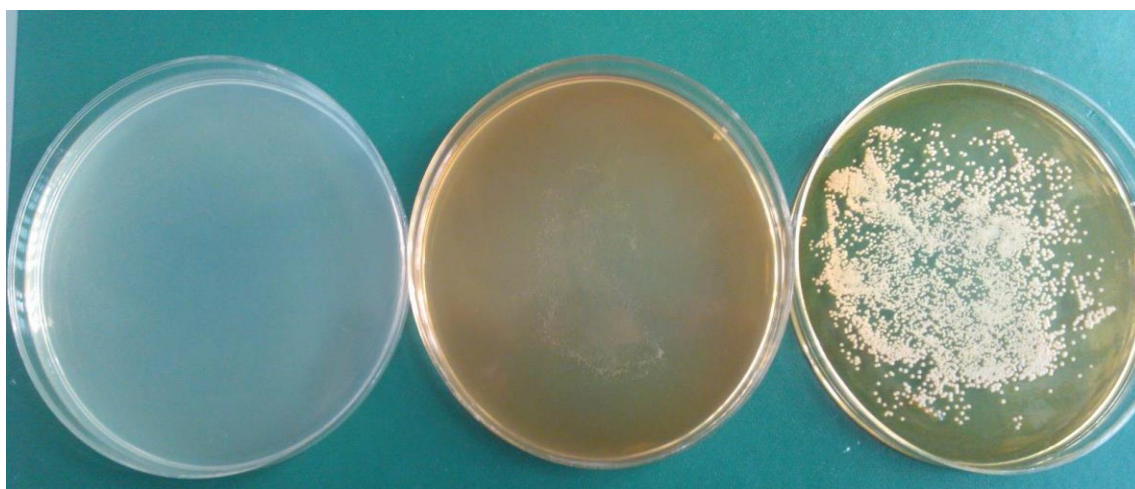
Полученные результаты позволили сделать следующие выводы:

- раствор, содержащий в качестве действующих веществ 1-пропанол - 30%, 2-пропанол - 45% и октенидин дигидрохлорид -0,1 % (Германия) подтвердил свое антисептическое действие на изолятах *M. furfur* и может быть рекомендован для обработки рук медицинского персонала для предотвращения распространения грибов.

- антисептик с действующими веществами - перекись водорода – 15%, полигексаметиленгуанидина гидрохлорид – 12% (Россия) может быть рекомендован для дезинфекции медицинских поверхностей в концентрации не менее 1% и экспозиции рекомендованной производителем.

3.4. Разработка селективной питательной среды для культивирования грибов *M. furfur*

В мире существует небольшое количество сред для культивирования *M. furfur*: среда Леминга-Нотмана, среда Сабуро с добавлением оливкового масла, среда Фергеманна-Фредексона, модифицированная среда Диксона, однако не всегда на этих средах может быть получен рост *M. furfur* [99], а селективной питательной среды для её выделения на данный момент не существует (Рисунок 17).



Среда Сабуро

Лактобакагар

Среда Диксона

Рисунок 17 – Рост грибов *M. furfur* на различных питательных средах.

Учитывая высокую частоту встречаемости *M. furfur* в человеческой популяции и её роль в развитии инвазивного микоза у новорождённых, целесообразна разработка селективной питательной среды для грибов *Malassezia* (среда Диксона, модифицированная), пригодной в рутинной практике микробиологических лабораторий. Была поставлена задача в лабораторных условиях подобрать оптимальный антимикотик и его концентрацию в составе модифицированной нами питательной среды по прописи Диксона и дать рекомендации к её промышленному производству.

В результате собственных экспериментальных исследований по определению чувствительности *M. furfur* к антимикотическим препаратам и основываясь на данных мировой литературы [64, 65, 66] об устойчивости *M. furfur* к флуконазолу, этот антимикотик был выбран в качестве селективной добавки в состав питательной среды по прописи Диксона. Экспериментальным путём подобрана навеска чистой субстанции флуконазола в концентрации 32 мг\л, ингибирующего рост большинства видов дрожжевых грибов рода *Candida*. МИК флуконазола у дрожжевых грибов (рода *Candida*) за исключением *M. furfur* по нашим данным и данным других исследований составляет менее 32 мг/л.

В условиях лаборатории микробиологии Центра, совместно с ООО «Центральная фабрика готовых сред» (ЦФГС, г.Москва) (Генеральный директор Авнерс В.Я.) разработана методика приготовления питательной среды по прописи Диксона с добавлением флуконазола. Использовали следующий состав среды:

- 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%;
- флюконазол – 32 мг/л;
- рН - 5,8 – 6,1.

Готовую среду автоклавировали 30 минут при температуре 121⁰С. Флуконазол добавляли в среду в виде стерильного водного раствора в концентрации 32 мг/л, предварительно остудив среду до 50⁰С. В качестве растворителя использовали дистиллированную воду, после автоклавирования, при температуре 55⁰С. Перемешивали среду и разливали в стерильные чашки Петри диаметром 90 мм так, чтобы высота слоя среды составляла не менее 4-5мм.

Эксперименты по подбору оптимальной концентрации флуконазола к селективной питательной среде для *Malassezia spp.*

Эксперимент №1

Исследовали три концентрации флуконазола – 128 мг/л, 64 мг/л и 32 мг/л. Готовили по 300 мл питательной среды с каждой из концентраций флуконазола и 300 мл среды без флуконазола. Проверляли ростовые свойства контрольных штаммов – *Malassezia furfur* (ATCC 14521), *Candida albicans* (ATCC 10231) и *Candida parapsilosis* (ATCC 22019). Проводили посевы штаммов как указано в таблице 14.

Таблица 14 – Подбор концентрации флуконазола к селективной питательной среде для *Malassezia spp.*

Концентрация флуконазола мг/л	0	32	64	128
<i>M. furfur</i> 10 ² КОЕ/мл	2 повтора	2 повтора	2 повтора	2 повтора
<i>C. albicans</i> 10 ² КОЕ/мл	2 повтора	2 повтора	2 повтора	2 повтора
<i>C. parapsilosis</i> 10 ² КОЕ/мл	2 повтора	2 повтора	2 повтора	2 повтора
<i>M. furfur</i> 10 ⁶ КОЕ/мл	2 повтора	2 повтора	2 повтора	2 повтора
<i>C. albicans</i> 10 ⁶ КОЕ/мл	2 повтора	2 повтора	2 повтора	2 повтора
<i>C. parapsilosis</i> 10 ⁶ КОЕ/мл	2 повтора	2 повтора	2 повтора	2 повтора

Методика посева:

1. Для каждого из штаммов, в стерильном физиологическом растворе готовили суспензию мутностью 0,5 по МакФарланду, принимали это разведение за концентрацию дрожжей 10⁶ КОЕ/мл.
2. Делали четыре десятикратных разведения в стерильном физиологическом растворе и получали концентрацию 10² КОЕ/мл.
3. Производили посев путём переноса 1 мл - 0,5 мл суспензии на поверхность питательной среды в чашке Петри и равномерно распределяли по поверхности

среды удаляя избыток суспензии. Параллельно производили посев по методу Голда, микробиологической петлёй.

4. Инкубировали культуры в термостате при $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, в течение 48 часов до первого считывания результатов и 6 суток до второго.

5. Рост штаммов на поверхности среды определяли визуально (Таблица 15, 16).

Селективная питательная среда должна частично или полностью ингибировать рост штаммов *C. albicans* и *C. parapsilosis* и обеспечивать появление видимого невооруженным глазом роста *M. furfur*.

Таблица 15. – Результаты эксперимента при посеве «газоном» после 48 часов и 6 суток инкубации

Концентрация флуконазола мг/мл	0		32		64		128	
	48 ч	6 с	48 ч	6 с	48 ч	6 с	48 ч	6 с
<i>M. furfur</i> 10^2 КОЕ/мл	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> 10^2 КОЕ/мл	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i> 10^2 КОЕ/мл	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>M. furfur</i> 10^6 КОЕ/мл	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> 10^6 КОЕ/мл	+	+	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+
<i>C. parapsilosis</i> 10^6 КОЕ/мл	+	+	-	-	-	-	-	-

Таблица 16 – Результаты эксперимента при посеве петлей по методу Голда после 48 часов и 6 суток инкубации

Концентрация флуконазола мг/мл	0		32		64		128	
	48 ч	6 с	48 ч	6 с	48 ч	6 с	48 ч	6 с
<i>M. furfur</i> 10^2 КОЕ/мл	-	+/-	-	-	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i> 10^2 КОЕ/мл	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>M. furfur</i> 10^6 КОЕ/мл	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i> 10^6 КОЕ/мл	-	-	-	-	-	-	-	-

В результате проведённого эксперимента нам не удалось получить рост *M.furfur* на испытуемой селективной среде. Принято решение увеличить концентрацию олеиновой кислоты в два раза и выполнить посев в качестве контроля роста *M. furfur* на среде mDixon собственного лабораторного производства (далее лабораторная среда mDixon) с флюконазолом. Исследуемые концентрации флюконазола ингибировали рост *M. furfur*, в связи с чем было принято решение снизить концентрацию флюконазола и готовить разведения субстанции флюконазола не в физиологическом растворе, а в растворе ДМСО.

Эксперимент №2

Исследовали две концентрации флюконазола – 16 мг/л и 32 мг/л. Готовили по 300 мл питательной среды с каждой из концентраций флюконазола и 300 мл без флюконазола. Дополнительно готовили два варианта среды – со стандартным количеством олеиновой кислоты и с количеством, увеличенным в двое. Чистую субстанцию флюконазола разводили в ДМСО. В качестве контроля производили посев *M. furfur* на поверхность лабораторной среды mDixon. Проверяли ростовые свойства контрольных штаммов – *M. furfur* (ATCC 14521), *C. albicans* (ATCC 10231) и *C. parapsilosis* (ATCC 22019). Проводили посевы штаммов как указано в таблице 17.

Таблица 17 – Методика эксперимента со сниженными концентрациями флюконазола и разведением субстанции антимикотика в ДМСО

Олеиновая к-та	1X			2X		
Концентрация флюконазола мг/л	0	16	32	0	16	32
<i>M. furfur</i>	1 повтор	1 повтор	1 повтор	1 повтор	1 повтор	1 повтор
<i>C. albicans</i>	1 повтор	1 повтор	1 повтор	1 повтор	1 повтор	1 повтор
<i>C. parapsilosis</i>	1 повтор	1 повтор	1 повтор	1 повтор	1 повтор	1 повтор

Методика посева:

1. Для каждого штамма, в стерильном физиологическом растворе готовили суспензию мутностью 0,5 по МакФарланду, принимали это разведение за концентрацию 10^6 КОЕ/мл.
2. Посев производили путём переноса 1 мл - 0,5 мл суспензии на поверхность питательной среды в чашке Петри, равномерно распределяли по поверхности среды и удаляли избыток суспензии.
3. Инкубировали культуры в термостате при $35 \pm 2^\circ\text{C}$, в течение 48 часов.
4. Рост штаммов на поверхности питательной среды определяли визуально (Таблица 18).

Среда должна частично или полностью ингибировать рост штаммов *C. albicans* и *C. parapsilosis* и обеспечивать появление видимого невооруженным глазом роста *M. furfur*.

Таблица 18. – Результаты эксперимента со сниженными концентрациями флюконазола и разведением субстанции в ДМСО

Олеиновая к-та	1X			2X		
Концентрация флуконазола мг/л	0	16	32	0	16	32
<i>M. furfur</i>	+	-	-	+	-	-
<i>C. albicans</i>	+	-	+/-	+	+/-	+/-
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	-	+	-	-

Из данных, представленных в таблице видно, что среда не обеспечивает рост *M. furfur* в количестве, сравнимом с неселективной лабораторной средой mDixon. Повышение концентрации олеиновой кислоты не повлияло на рост *M. furfur*, в связи с чем было принято решение приостановить эксперименты по подбору оптимальной концентрации флуконазола для селективной среды; добиться сопоставимого роста на испытуемой и контрольной средах, изменить температурный режим стерилизации среды с 30 минут при 121°C на 15 минут при 121°C и выполнять посев *M. furfur* в виде суспензии с концентрациями 10^6 КОЕ/мл

и 10^2 КОЕ/мл. Сравнение с контролем – лабораторной средой mDixon проводили визуально.

Эксперимент №3

Исследовали три режима стерилизации среды – 121°C , 15 минут; 112°C , 30 минут и 112°C , 15 минут. Готовили по 200 мл среды для каждого режима стерилизации. В качестве контроля проводили посев на лабораторную среду mDixon. Визуально проверяли ростовые свойства штаммов – *M. furfur* (клинический изолят) и *M. furfur* (ATCC 14521). Проводили посевы штаммов как указано в таблице 19.

Таблица 19 – Подбор режима автоклавирования

Штамм	<i>M. furfur</i> клинический изолят		<i>M. furfur</i> ATCC 14521	
	10^6	10^2	10^6	10^2
121°C , 15 мин	1 повтор	1 повтор	1 повтор	1 повтор
112°C , 30 мин	1 повтор	1 повтор	1 повтор	1 повтор
112°C , 15 мин	1 повтор	1 повтор	1 повтор	1 повтор
Контроль	1 повтор	1 повтор	1 повтор	1 повтор

Посев осуществляли аналогично методике Эксперимента №2. Ростовые характеристики среды должны были быть идентичны или превышать ростовые характеристики контроля для *M. furfur* (Таблица 20).

Таблица 20 – Результаты эксперимента с различными режимами автоклавирования.

Штамм	<i>M. furfur</i> клинический изолят		<i>M. furfur</i> ATCC 14521	
	10^6	10^2	10^6	10^2
121°C , 15 мин	++++	+++	+++	+
112°C , 30 мин	++++	+++	+++	++
112°C , 15 мин	+++	+	++	+
Контроль	++++	++++	++++	-

Исходя из данных, представленных в таблице, видно отсутствие роста в контрольной лабораторной среде mDixon, что расценено нами как дефект и не должно учитываться в результатах эксперимента. Принято решение для предотвращения подобной ситуации, в последующих экспериментах использовать как минимум два повтора. Несмотря на это, результаты эксперимента наглядно показали, что испытываемая среда не обеспечивает должный уровень роста *M. furfur* сопоставимый с контролем при всех использованных режимах стерилизации. Очевидно, что самым лучшим режимом стерилизации является 112⁰С, 30 минут и решено повторить на ней эксперимент №1 с небольшими изменениями. Были продолжены попытки получить среду сопоставимую по ростовым характеристикам с лабораторной средой mDixon и проведен эксперимент по определению оптимальной концентрации флуконазола в полученной среде.

Эксперимент №4

Исследовали три концентрации флуконазола – 128 мг/л, 64 мг/л и 32 мг/л. Субстанцию флуконазола разводили в растворе ДМСО. Готовили по 300 мл питательной среды с каждой из концентраций флуконазола и 300 мл среды без флуконазола. Проверяли ростовые свойства контрольных штаммов – *M. furfur* (ATCC 14521), *C. albicans* (ATCC 10231) и *M. furfur* клинический изолят. Проводили посеvy штаммов как указано в таблице 21.

Таблица 21 – Методика постановки эксперимента с тремя концентрациями флуконазола

Концентрация флуконазола	<i>M. furfur</i> (ATCC 10231)		<i>M. furfur</i> клинический изолят		<i>C. albicans</i> (ATCC 14521)	
	10 ²	10 ⁶	10 ²	10 ⁶	10 ²	10 ⁶
0 мг/л	2 повтора	2 повтора	2 повтора	2 повтора	2 повтора	2 повтора
32 мг/л	2 повтора	2 повтора	2 повтора	2 повтора	2 повтора	2 повтора
64 мг/л	2 повтора	2 повтора	2 повтора	2 повтора	2 повтора	2 повтора
128 мг/л	2 повтора	2 повтора	2 повтора	2 повтора	2 повтора	2 повтора

Посев осуществляли аналогично методике Эксперимента №2 и №3. Среда должна частично или полностью ингибировать рост *C. albicans* и обеспечивать появление видимого невооруженным глазом роста *M. furfur* (Таблица 22).

Таблица 22 – Результаты эксперимента с тремя концентрациями флуконазола.

Концентрация флуконазола	<i>M. furfur</i> (ATCC 10231)		<i>M. furfur</i> клинический изолят		<i>C. albicans</i> (ATCC 14521)	
	10 ²	10 ⁶	10 ²	10 ⁶	10 ²	10 ⁶
0 мг/л	17 КОЕ 53 КОЕ	10 ⁶ 10 ⁶	24 КОЕ 25 КОЕ	10 ⁶ 10 ⁶	4 КОЕ 7 КОЕ	10 ⁶ 10 ⁶
32 мг/л	0 0	0 0	36 КОЕ 26 КОЕ	10 ⁶ 10 ⁶	0 0	0 0
64 мг/л	0 0	0 0	18 КОЕ 20 КОЕ	10 ⁶ 10 ⁶	0 0	0 0
128 мг/л	0 0	0 0	20 КОЕ 16 КОЕ	10 ⁶ 10 ⁶	0 0	0 0

В результате эксперимента получено, что концентрация флуконазола 32 мг/л в среде полностью ингибирует рост *C. albicans* (ATCC 14521) и не влияет на рост клинических изолятов *M. furfur*. Принято решение использовать концентрацию флуконазола 32 мг/л, разведенную в среде, как рабочую и проверить рост десяти других клинических изолятов *M. furfur* с использованием данной концентрации.

Полученная методика приготовления питательной среды внедрена в рутинную практику Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

В дальнейшем нами проверен рост четырёхсот клинических изолятов *M.furfur* на разработанной среде и продолжена работа по выбору оптимального режима стерилизации при ручном и автоматическом приготовлении среды. Выполнен эксперимент по подбору оптимальных компонентов: заменен экстракт солода на подобранную концентрацию глюкозы и мясной пептон заменен на казеиновый.

Эксперимент №5.

Исследования проводили при концентрации флуконазола 32 мг/л. Флуконазол разводили в ДМСО. Готовили 600 мл среды. Проверляли ростовые свойства контрольных штаммов – *M. furfur* (ATCC 14521), *C. albicans* (ATCC 10231) и *M. furfur* клинические изоляты. Разведение всех штаммов осуществляли 10^2 КОЕ/мл. Проводили посевы штаммов как указано в таблице 23.

Таблица 23 – Испытание исследуемой селективной среды на музейных штаммах и клинических изолятах дрожжевых грибов

Штаммы дрожжевых грибов и изоляты малаецезий	Посев
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	2 повтора
<i>Malassezia furfur</i> (ATCC 14521)	2 повтора
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №8	2 повтора
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №13	2 повтора
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №51	2 повтора
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №7	2 повтора
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №49	2 повтора
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №82	2 повтора
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №77	2 повтора
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №33	2 повтора
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №10	2 повтора
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №82	2 повтора
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	2 повтора
<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22019)	2 повтора

Посев осуществляли аналогично методике Эксперимента №2, №3 и №4. Параллельно была высеяна смесь штаммов *M. furfur* клинический изолят №82, *C. albicans* (ATCC 10231) и *C. parapsilosis* (ATCC 22019) разведения 10^6 КОЕ/мл петлёй. Среда должна частично или полностью ингибировать рост штамма

C.albicans и обеспечивать появление видимого невооружённым глазом роста *M.furfur* (Таблица 24).

Таблица 24 – Результаты эксперимента на музейных штаммах и клинических изолятах дрожжевых грибов

Штаммы дрожжевых грибов и изоляты малацезий	Рост +/-
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	-
<i>Malassezia furfur</i> (ATCC 14521)	-
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №8	+
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №13	+
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №51	+
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №7	+
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №49	+
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №82	+
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №77	+
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №33	+
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №10	+
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №82	+
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	-
<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22019)	-

В результате проведённого эксперимента показана пригодность использования питательной среды с концентрацией флуконазола 32 мг/л для селективного выделения *Malassezia furfur*.

Эксперимент №6.

Исследования проводили при концентрации флуконазола 32 мг/л. Чистую субстанцию флуконазола разводили в ДМСО. Готовили 1200 мл питательной селективной среды. Проверяли ростовые свойства контрольных штаммов – *M. furfur* (ATCC 14521), *C. albicans* (ATCC 10231) и клинических изолятов *M.furfur*.

Разведение всех штаммов осуществляли до концентрации 10^2 КОЕ/мл. Проводили посевы штаммов как указано в таблице 25.

Таблица 25. – Контроль испытываемой среды на музейных штаммах и клинических изолятах дрожжевых грибов

Штаммы дрожжевых грибов и изоляты малацезий	Посев
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	1 повтор
<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22019)	1 повтор
<i>Malassezia furfur</i> (ATCC 14521)	1 повтор
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №14	2 повтор
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №16	2 повтор
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №17	2 повтор
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №18	2 повтор
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №19	2 повтор
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №20	2 повтор
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №21	2 повтор
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №22	2 повтор
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №23	2 повтор
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №24	2 повтор
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №25	2 повтор
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №27	2 повтор
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №30	2 повтор
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №67	2 повтор
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №192	2 повтор
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №211	2 повтор
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №298	2 повтор
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №306	2 повтор
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №308	2 повтор
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №316	2 повтор
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №322	2 повтор
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №324	2 повтор
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №416	2 повтор

Посев осуществляли аналогично методике Эксперимента №2, №3, №4, №5 и №6. Среда должна частично или полностью ингибировать рост штамма

C.albicans и обеспечивать появление видимого невооруженным глазом роста *M.furfur* (Таблица 26).

Таблица 26 – Результаты испытаний селективной питательной среды на музейных штаммах и клинических изолятах дрожжевых грибов

Штаммы дрожжевых грибов и изоляты малацезий	Рост +/-
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	-
<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22019)	-
<i>Malassezia furfur</i> (ATCC 14521)	-
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №14	+
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №16	++
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №17	++
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №18	++
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №19	++
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №20	++
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №21	++
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №22	++
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №23	++
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №24	++
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №25	++
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №27	++
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №30	++
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №67	++
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №192	++
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №211	++
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №298	++
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №306	++
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №308	++
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №316	++
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №322	++
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №324	++
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №416	--
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №8	++
<i>Malassezia furfur</i> клинический изолят №7	++

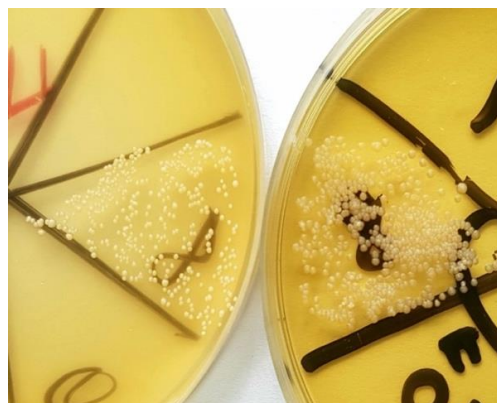
В результате проведенного эксперимента показана пригодность использования селективной питательной среды с концентрацией флуконазола 32

мг/л для селективного выделения клинических штаммов *M. furfur*, имеющих МИК к флуконазолу более 32 мг/л. Рост культур *M. furfur* на среде составил 97% (34/35). Изолят №416 не дал рост на среде, что требует дальнейшего уточнения его значения МИК другими микробиологическими методами. При обследовании клинического материала, полученного от 238 новорождённых, с использованием лабораторной среды mDixon (неселективной) у 22 пациентов обнаружена *M. furfur* и у 16 пациентов обнаружена *Candida spp.*, все изоляты грибов рода *Candida* имели МИК менее 32 мг/л.

В дальнейшем нами проведен эксперимент по изучению возможности использования разработанной селективной среды для исследований на клинических образцах биоматериала, полученных от новорождённых с подозрением на колонизацию или грибковую инфекцию, вызванную *M. furfur*. Показано, что во всех пробах, при положительном результате ПЦР был получен рост *M. furfur* на разработанной селективной питательной среде (Рисунок 18).



Пациент №F8



Пациент №F13



Пациенты №R17 и №R18



Пациенты №H1982, H1983



Пациенты №H1984, H1985 и H1995

Рисунок 18 – Испытание разработанной селективной среды на клиническом материале (контроль лабораторная среда mDixon).

В результате проведенного эксперимента можно сделать вывод о пригодности разработанной селективной питательной среды для выделения дрожжевых грибов вида *M. furfur* в клинической работе. Среда с 97% вероятностью позволяет селективно выделять *M. furfur* из биологического материала пациентов.

Глава 4. Описание коллекции клинических штаммов *M. furfur*, на основании фенотипических и молекулярно-генетических свойств

Начиная с 2012 года нами создавалась коллекция дрожжевых грибов морфологически схожих с *Malassezia furfur* – всего собрано 430 изолятов.

В ходе исследования принадлежность к виду *M. furfur* подтверждена у 414 штаммов (составили основную коллекцию *M. furfur*), 5 из 430 были идентифицированы как *C. parapsilosis*, 6 - как *M. sympodialis* и 5 - как *S. cerevisiae* (исключены из коллекции штаммов *M. furfur*).

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 Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова» Минздрава России в условиях низкотемпературного холодильника (Sanyo, Япония) при $t-80^{\circ}\text{C}$. Каждый штамм имеет свой микробиологический паспорт (Приложение 2).

Все штаммы получены в результате посева клинического материала на плотные питательные среды для культивирования дрожжевых грибов - среда Сабуро и модифицированный агар Диксона. Идентификация грибов проходила по вышеописанным методикам (см главу «Материалы и методы»).

Все штаммы *M. furfur* выделены из клинических локусов новорождённых (кал, мазок из зева, содержимое интубационных трубок, кровь, моча, центральные и периферические венозные катетеры, аспират из трахеи и перитонеальная жидкость, отделяемое конъюнктивы), а также из аутопсийного материала (содержимое кишечника, кровь, лёгкие, печень). В коллекции собраны штаммы,

выделенные со смывов окружающей среды и из смывов заушных складок медицинского персонала ОРИТН и ОХРИТН:

- 37 штаммов – из полости зева, аспирата из трахеи и содержимого интубационных трубок от 38 новорождённых, из них 17 детей находились на лечении в ОРИТН: 16 – с основным диагнозом «недоношенность» и «синдром дыхательных расстройств (СДР)»; 21 ребёнок находился на лечении в ОХРИТН со следующими диагнозами: «врождённая диафрагмальная грыжа», «атрезия тощей кишки», «врождённый порок сердца», «гастрошизис», «гидронефроз», «мегауретер», «пиелэктазия», «экстрофия мочевого пузыря».
- 181 штамм получен из содержимого кишечника 174 новорождённых, из них 79 детей – находились на лечении в ОХРИТН с диагнозами: «врождённая диафрагмальная грыжа», «атрезия лёгкого», «стеноз двенадцатиперстной кишки», «некротизирующий энтероколит (НЭК)», «гастрошизис», «синдром Ледда», «множественные врождённые пороки развития», «мегауретер», «уретрогидронефроз», «атрезия пищевода», «перитонит», «поликистоз почек», «кишечная непроходимость», «аденоматоз лёгкого», «трахеопищеводный свищ»; 95 новорождённых – ОРИТН со следующими диагнозами: «врождённая пневмония», «недоношенность», «РДС», «НЭК».
- 85 штаммов, выделены из нативной крови и крови, собранной через ЦВК 72 новорождённых, из них 43 – ребёнка ОХРИТН с диагнозами: «врождённая диафрагмальная грыжа», «атрезия лёгкого», «стеноз двенадцатиперстной кишки», «НЭК», «гастрошизис», «множественные врождённые пороки развития», «мегауретер», «уретрогидронефроз», «атрезия пищевод», «перитонит», «поликистоз почек», «кишечная непроходимость», «аденоматоз лёгкого», «хилоперитонеум», «врождённый сепсис»; 19 новорождённых – ОРИТН с диагнозом «недоношенность». Четыре штамма от 4-х детей выделены из крови полости сердца посмертно: 2 детей с диагнозом

«недоношенность», 1 ребёнок – «стеноз двенадцатиперстной кишки», 1 – «врождённая диафрагмальная грыжа».

- 59 штаммов – из мочи 42 новорождённых, из них 41 – ОРИТН с диагнозами «недоношенность» и «врождённая пневмония» и 1 ребёнок ОХРИТН с диагнозом «гастрошизис».
- 1 штамм – из перитонеальной жидкости ребёнка ОРИТН с основным клиническим диагнозом «недоношенность».
- 3 штамма – из отделяемого конъюнктивы трёх детей ОРИТН с диагнозами «недоношенность» и «врождённая пневмония».
- 1 штамм – из гидроперикарда ребёнка ОХРИТН с диагнозом «кишечная непроходимость».
- 6 штаммов – из аутопсийного материала (печень), из них 2 от новорождённых ОРИТН и ОХРИТН с диагнозами «недоношенность» и «стеноз двенадцатиперстной кишки» и 1 - при аутопсии лёгкого новорождённого ОРИТН с диагнозом «недоношенность и РДС».
- 2 штамма – из отделяемого носа новорождённых ОРИТН с диагнозом «недоношенность».
- 1 штамм – выделен из влагалища пациентки во время обследования на сроке 31 неделя беременности.
- 1 штамм – со смывов поверхности кровати новорождённого ОХРИТН.
- 1 штамм – со смыва кожи новорождённого ОРИТН с диагнозом «недоношенность».
- 6 штаммов – выделены со смывов заушных складок медицинского персонала ОРИТН и ОХРИТН. (*M. sympodialis* – 2 изолята от 2 сотрудников, *S. cerevisiae* + *M. furfur*-изоляты выделенные от одного сотрудника, *M. furfur* - 2 изолята от 2 сотрудников).

Один штамм *Malassezia furfur* Y147 в качестве российского эталонного штамма депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, РАН

(Московская обл., г. Пушкино) (Номер заявки 191-2-02.1-2181 от 04.03.2020 года) (приложение 4).

Эталонный штамм *Malassezia furfur* Y147 был выделен из крови новорождённого ОРИТН с экстремально низкой массой тела при рождении (800 граммов).

Видовую идентификацию эталонного штамма *Malassezia furfur* Y147 проводили по морфологическим признакам, по биохимическим показателям, методом MALDI-TOF MS анализа, ПЦР с детекцией результатов в режиме «реального времени», с помощью разработанной в ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова» Минздрава России тест-панели на дрожжевые грибы. Методом секвенирования видоспецифического участка гена 26S рРНК подтверждена принадлежность штамма к *Malassezia furfur*.

ХАРАКТЕРНЫЕ ПРИЗНАКИ ЭТАЛОННОГО ШТАММА:

I. Культурально-морфологические:

Колонии *Malassezia furfur* выросшие на агаре Диксона, выпуклые, белые, округлой формы с нечеткими краями. При микроскопии препарата, приготовленного из культуры *M. furfur* и окрашенного по Граму, визуализируются клетки дрожжей, имеющих эллиптическую форму, размер клеток в диапазоне от 2–3 до 3–5 мкм.

II. Физиолого-биохимические:

M. furfur обладает особым метаболизмом: для роста этих грибов необходимо наличие жирных кислот с длиной цепи 12-14 атомов углерода в питательной среде. Однако такие жирные кислоты *Malassezia* не способны синтезировать самостоятельно. У них нет потребности в углеводах, в качестве единственного источника углерода выступают липиды [99].

III. Данные молекулярно-генетического анализа:

Методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени, с помощью разработанной тест-панели на дрожжевые грибы подтверждена принадлежность эталонного штамма к *Malassezia furfur*.

В результате проведенного секвенирования эталонного штамма также подтверждена принадлежность его к *Malassezia furfur* и получена следующая последовательность:

147 ITS

ACTGCAGAGGWCATTAGTGAAGCAAGGGCCAGCCATACGGACGGCGCTACTCGCGTACA
ACGTCTCTGGCGCCCAACTTTACACAATATCCACAAACCCGTGTGCACCGTTTGGATGAGT
TGGACCTCGCAAGAGGCCTGGCTCTCCAATCCATTTCTACCAAACCTCGTATGGTTGTATGA
ACGTGGAAATCGTTGGACCGTAACTGGCCAACAACCAATAATACTTTTCGACAACGGA
TCTCTTGGTTCTCCCATCGATGAAGAACGCAGCGAAACGCGATAGGTAATGTGAATTGCA
GAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCATGGTATTCCGTGGAGCA
TGCCTGTTTGAGTGCCGTGAATTCTCTCTCCCCAAGCGGTTGCGATTGCACTGCTTTGGCG
GACGAGGTTGGATGGGTGCTTCTGCCTGTTTCGCAAGAAACAGGCTCGCCCGAAATGCAT
TAGCGCCTTTGGGACACACTCTGCAAACCGCTCTGAAAGGGAGGGCGGCAGAGGGGATG
GAGGAACTCCGCCCCGTCAGCTATACCAAACCTTTGCCCCAGGCAAGCGCATGGCATGATAC
GTCATTTGCTGTGTGTGCGTCCTGAGGCAAGGGGGCCGATGTGGTGCCTTTGTCACTCTGTG
GGTGTGTTGGTGCGCTACCAATCCTGCGTGGAGGCTGGTCTGTGCGCAAGCATGGAGCAG
TTCTTGTGAACGCATTCCCTTTTTTCATTTCTGGTCTCAAATCAGGTAGAT

Рекомендуемые среда и условия культивирования *M. furfur* Y147:

Предпочтительной средой для культивирования *M. furfur* является питательная среда по прописи Диксона, в состав которой входят: экстракт солода 3,6%, пептон 0,6 %, желчь 2,0%, Твин 40 1,0%, глицерол 0,2%, олеиновая кислота 0,2% и агар 1,2%.

Инкубировать грибы необходимо в термостате при температуре 30°C в течение 72 часов.

Образцы крови, мочи, ликвора дополнительно необходимо засеивать в 5 мл жидкой питательной среды по прописи Диксона в объеме 0.5-1 мл., и инкубировать в термостате в течение 5 суток с ежедневным высевом на плотную питательную среду по прописи Диксона.

Рекомендуемые метод / условия хранения *M. furfur* Y147:

Условия морозильной камеры с температурным режимом -80 °С в среде сохранения. В качестве среды для хранения рекомендуем использовать триптиказо-соевый бульон (Tryptcase Soy broth), с добавлением криопротектора - 20% глицерина.

Допускается хранение в низкотемпературном режиме до пяти лет.

Эталонный штамм *M. furfur* Y147 в нашем исследовании был использован при разработке селективной питательной среды для культивирования *Malassezia furfur*. Селективная среда позволит выделять штаммы грибов данного вида из различного клинического материала. В дальнейшем штамм *M. furfur* Y147 может быть использован для контроля качества питательных сред и проведения микробиологических исследований.

Глава 5. 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.

Одной из задач диссертационной работы являлось определение оптимального способа проведения микробиологического мониторинга грибковых инфекций у новорождённых в отделениях реанимации и интенсивной терапии.

Микробиологический мониторинг в ОРИТН и ОХРИТН необходим, так как отражает объективное течение эпидемического процесса. Мониторинг дает возможность своевременно реагировать на конкретную эпидемиологическую ситуацию путем проведения соответствующих ситуации профилактических мероприятий. Микробиологический мониторинг включает в себя постоянное слежение за колонизацией новорождённых. При подозрении на развитие системного воспалительного процесса грибкового генеза проводят культуральное исследование патологического материала, взятого из очага инфекции, а также посев крови.

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



В случае отсутствия клинических признаков инфекции микробиологический мониторинг в ОРИТ и ОХРИТ новорождённых проводится один раз в неделю, для исследования отбираются мазок из зева и кал.

При клинических признаках инфекции в дополнение к посеву кала и зева проводят посев крови на стерильность, а также посев отделяемого из предполагаемого очага инфекции (аспират из трахеи, моча, спинномозговая жидкость, отделяемое пупочной ранки, конъюнктивы и др.).

Алгоритм микробиологической диагностики *M. furfur*



Средой, оптимальной для культивирования *M. furfur*, является селективная среда для выделения *M. furfur*, 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%;
- левомицетин - 0,08%;
- флюконазол – 32 мг/л;
- pH - 5,8 – 6,1.

Посевы кала, зева, содержимого интубационных трубок и другой биологический материал необходимо высевать на селективную среду для выделения *M. furfur* с последующей инкубацией до 72 часов при температуре 30-36°C.

Посевы мочи, крови и других биологических жидкостей рекомендуется проводить на селективную питательную среду для выделения *M. furfur* и на жидкий бульон Диксона (качественный метод), инкубировать до 72 часов при 30-36°C. Посевы из бульона проводить на твёрдый агар Диксона через 48 и 72 часа.

Следующим этапом микробиологической диагностики является микроскопия методом окраски митиленовым синим мазка выросших колоний. Все колонии морфологически схожие с *M. furfur* могут считаться идентифицированными.

Идентификация молекулярно-генетическими методами (количественной ПЦР) с использованием ПЦР панели «МикозоСкрин» может проводиться непосредственно из биологического материала пациентов и в случаях необходимости подтверждения идентификации выросших культур дрожжевых грибов.

«Набор реагентов для выявления и типирования возбудителей грибковых инфекций рода *Candida*, *Malassezia*, *Saccharomyces* и *Debaryomyces* методом ПЦР в режиме реального времени (МикозоСкрин) по ТУ 21.20.23-104-46482062-2018».

Назначение: Набор реагентов предназначен для выявления и типирования возбудителей грибковых инфекций рода *Candida*, *Malassezia*, *Saccharomyces* и *Debaryomyces* в препаратах ДНК, полученных из биологического материала человека (кровь, мокрота, моча, мазки/соскобы из дыхательных путей, желудочно-кишечного и урогенитального тракта, фекалии, биоптаты), из смывов с катетеров и эндотрахеальных трубок, а также из культур возбудителей микозов методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Функциональное назначение: изделие предназначено для диагностики *in vitro* (выявление и типирование возбудителей грибковых инфекций в препаратах ДНК, полученных из биологического материала человека, из смывов с катетеров и эндотрахеальных трубок, а также из культур возбудителей микозов).

Метод: ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени; качественный и полуколичественный мультиплексный анализ.

Принцип метода: в основе работы набора реагентов лежит принцип амплификации ДНК методом ПЦР.

Область применения: Набор может быть использован в клинко-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике. Применение медицинского изделия не зависит от популяционных и демографических аспектов. Противопоказаний к применению нет.

Анализируемые образцы: В качестве биологического материала для анализа используется кровь, мокрота, моча, мазки/соскобы из дыхательных путей, желудочно-кишечного и урогенитального тракта, фекалии, биоптаты, смывы с катетеров и эндотрахеальных трубок, а также культуры возбудителей микозов.

Потенциальные пользователи: Квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории.

Набор реагентов выпускается в стандартной фасовке и предназначен для одноразового применения и рассчитан на проведение 24 определений, что соответствует исследованию не более 20 неизвестных образцов, отрицательного контрольного образца и положительного контрольного образца.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние десятилетия в реанимациях новорождённых грибковые инфекции, вызванные грибами рода *Malassezia* стали выявляться значительно чаще, а в последнее время превратились в серьёзную проблему, в связи чем, возникла необходимость в микробиологическом мониторинге колонизации *M.furfur* слизистых новорождённых детей. Учитывая имеющиеся сложности в диагностике данного вида гриба настала необходимость в разработке алгоритма микробиологической диагностики, что и сделано в рамках данной работы.

В данном исследовании подробно проанализированы эпидемиологические аспекты мониторинга колонизации новорождённых грибами вида *M.furfur* в ОРИТН и ОХРИТН с 2012 по 2018 годы. Выявлены причины видового изменения грибов в структуре высеваемости с 2000 года и обнаружено, что с 2007 на фоне широкого профилактического флуконазола стали преобладать *C. non-albicans* виды (*C. famata*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*) резистентные к флуконазолу, а на фоне использования эхинокандинов с 2013 для лечения инфекций, вызванных грибами *C. non-albicans* видов, года стали появляться и позже доминировать дрожжевые грибы *M. furfur* (составляли 76% от всех выделенных грибов). Частота выделения *M. furfur* среди новорождённых в среднем за исследованный период составляла 10%, что стало основанием к изменению алгоритма обследования новорождённых с подозрением на развитие грибковой инфекции: к стандартному набору питательных сред добавлена неселективная среда лабораторного производства по прописи Диксона и разработана селективная среда, отвечающая всем питательным свойствам *M. furfur*.

В ходе исследования доказано, что использование жидкой среды Диксона позволило выявлять *M. furfur* в крови. Поскольку в традиционно используемых бактериологических флаконах для гемокультивирования *M. furfur* может сохранять свою жизнеспособность, но не размножаться, это оказалось серьёзным

препятствием для её обнаружения с помощью существующих бактериологических гематологических анализаторов. Ограничением является лишь то, что дополнительное использование среды Диксона увеличивает потребность в большем объеме крови, необходимом для анализа, и делает затруднительным проведение исследования у недоношенных новорождённых, у которых объём циркулирующей крови составляет примерно 90 мл на 1000 граммов массы тела. Учитывая возможную этиологическую роль *M. furfur* в развитии системных микозов у новорождённых, целесообразно в состав питательных сред для гемокультивирования, используемых в бактериологических анализаторах, включить ингредиенты, необходимые для роста *M. furfur*.

В проведённом исследовании представлены результаты четырёхлетнего проспективного наблюдения за данными историй болезни новорождённых и была доказана роль *M. furfur* в развитии инвазивного микоза у новорождённых отделений реанимации и интенсивной терапии, в том числе хирургического профиля. Однако, нами констатировано, что оценка результатов микробиологической диагностики малацезийных инфекций чаще всего не находила отражения в клиническом или патологоанатомическом диагнозе. В определённой мере это объясняется новизной и не изученностью *M.furfur* в патологии новорождённых, а также с более привычной возможностью для врачей связать тяжесть состояния ребёнка с другими причинами и не усугублять отчётные эпидемиологические показатели по отделению. Оценка эпидемической и клинической роли *M.furfur* на основании результатов микробиологического анализа позволила выяснить, что диссеминацию процесса – «инвазивный микоз» обнаруживали у 25-38,5% новорождённых с положительными результатами исследования, при этом чаще всего она наблюдалась на фоне колонизации ЖКТ, что даёт нам основание оценивать данного возбудителя как этиологического агента грибковых инфекций. Установлено, что количество новорождённых с диссеминацией *M.furfur* не было выше в группе новорождённых после оперативного лечения, хотя дети данной категории находятся на более

длительным полным парентеральным питанием липидными растворами. Несмотря на полученные результаты, наше исследование имеет некоторые ограничения: мы не сравнивали длительность и состав парентерального питания у новорождённых с ОНМТ и ЭНМТ и детей с врождёнными пороками.

Наиболее важными факторами, обуславливающими патогенность *Malassezia*, являются следующие факторы: липофильность, способность грибов данного рода к утилизации различных липидов, гликолипидов, а также липопротеинов. Результатом выработки грибковых липаз может быть повреждение клеточных мембран организма-хозяина с последующим развитием воспалительного процесса. Грибы рода *Malassezia* заселяют кожные покровы преимущественно в зоне расположения сальных желез, используя экскретируемые ими липиды для поддержания собственного метаболизма [4, 25, 29, 99]. Наиболее вероятным источником инфицирования грибом вида *M. furfur* ЦВК являются колонизированные кожные покровы пациентов. Колонизация кожных покровов новорождённых может происходить уже в учреждениях родовспоможения, во время контакта с медицинским персоналом или родителями, что в дальнейшем может привести к развитию грибковых инфекций [30, 99]. Выделение *M. furfur* из смывов с кожи заушных складок взятых от медицинского персонала отделений реанимаций новорождённых, проведённого в рамках данной работы подтвердил возможность передачи данного гриба от медицинского персонала к пациентам. Грибы рода *Malassezia* могут расти в микроаэрофильных и анаэробных условиях, формировать биопленки на поверхностях различных материалов, что особенно актуально для отделений хирургии, реанимации и интенсивной терапии новорождённых, поскольку пребывание в отделениях данного профиля сопряжено с проведением большого количества инвазивных процедур, использованием сосудистых катетеров, парентерального питания, что является основным фактором риска [85, 86].

Поскольку *M. furfur* является одним из комменсалов кожи здорового человека [29, 30] и колонизация всех детей происходила в условиях стационара,

можно предположить госпитальную природу инфекции и циркуляцию ограниченного количества штаммов внутри стационара, а также внутрибольничный путь его передачи. В связи с этим актуальным внедрение дополнительных принципов профилактики распространения, асептики и антисептики в отношении данного возбудителя. В рамках исследования, определена чувствительность *M. furfur* к антисептикам и дезинфектантам используемым в отделениях детских реанимаций и в результате которого раствор, содержащий 1-пропанол - 30%, 2-пропанол - 45% и октенидин дигидрохлорид - 0,1 % (производства Германии) показал антисептическое действие на изолятах *M. furfur* и может быть рекомендован для обработки рук медицинского персонала с целью предотвращения распространения дрожжевых грибов, а антисептик, содержащий перекись водорода – 15%, полигексаметиленгуанидина гидрохлорид – 12% (производства России) может быть рекомендован для дезинфекции медицинских поверхностей.

Дополнение рутинного микробиологического обследования селективными средами для выделения *M. furfur* демонстрирует достаточно высокую частоту выделения данного гриба в реанимациях при целенаправленном скрининге, которая достигает 9,7% среди всех новорождённых ОРИТ. Частота диссеминации у колонизированных *M. furfur* пациентов, составляет 25-38,5%, при этом наиболее высока (45,8%) частота диссеминации в группе детей с ЭНМТ. Это является важным диагностическим показателем, поскольку, несмотря на отсутствие методики определения чувствительности *M. furfur* к антимикотикам, известно, что клинически эффективными в отношении данного возбудителя являются амфотерицин В и вориконазол [54, 60, 95]. В связи с этим определение данного возбудителя может играть решающую роль при выборе препаратов для своевременной адекватной целенаправленной антимикотической терапии. В данной работе мы экспериментально определили чувствительность *M. furfur* к амфотерицину, каспофунгину, микофунгину и флуконазолу, разработав при этом среды для постановки антимикотикочувствительности исходя из питательных

свойств данного гриба. Обнаружили, что *M. furfur* является резистентной к флуконазолу, микофунгину, каспофунгину и чувствительна к амфотерицину.

Учитывая существующие проблемы выделения и идентификации дрожжевых грибов вида *M. furfur* и с целью оптимизации микробиологического исследования нами проведён сравнительный анализ идентификации клинических изолятов. В результате получено, что биохимический метод не может быть использован для идентификации *M. furfur* и, несмотря на то, что MALDI-TOF MS является одним из лучших методов для идентификации дрожжевых грибов [20], в настоящее время этот метод также не может быть рекомендован в рутинной практике микробиологических лабораторий для идентификации *M. furfur*. Существующие базы данных масс-спектрометров нуждаются в дополнении масс-спектрами различных штаммов *M. furfur*. При этом, в нашей работе доказано, что идентификация дрожжевых грибов вида *M. furfur* с помощью метода ПЦР из выросшей колонии и детекция её в биологическом материале пациентов, является перспективной и в дальнейшем может быть использована в рутинной практике.

В рамках работы собрана и описана коллекция штаммов *M. furfur* включающая 384 изолята. Один штамм *M. furfur* Y147 из данной коллекции в качестве российского эталонного штамма задепонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов и в дальнейшем может быть использован для контроля качества питательных сред, проведения как рутинных, так и научных микробиологических исследований.

Совершенствование методических подходов к выделению и идентификации *Malassezia furfur*, а также разработка и внедрение алгоритма мониторинга за колонизацией новорождённых позволили расширить наши представления об этиологической значимости этого микроорганизма и своевременно выявлять *M. furfur* у пациентов, а определив чувствительность данного возбудителя к антисептикам применяемым в реанимационных отделениях, проводить профилактические мероприятия, направленные на предотвращение распространения возбудителя и целенаправленную антимикотическую терапию.

ВЫВОДЫ:

1. В результате микробиологического мониторинга в ОРИТ и ОХРИТ новорожденных отмечена высокая высеваемость *M. furfur* - 76% от всех выделенных грибов (1365/1808): *M. furfur* выявлена у 9,7% обследованных детей (387/4008), что свидетельствует 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 входит видоспецифический праймер 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 резистентность 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 97% случаев позволяет культивировать дрожжевые грибы вида *M. furfur* из любого биологического материала.

6. Созданная коллекция изолятов *M. furfur* и задепонированный 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 детей с подозрением на развитие грибковой инфекции.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Микробиологический мониторинг *M. furfur* в ОРИТ и ОХРИТ новорождённых перинатальных центров является необходимым 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 рекомендованно считать селективную среду для выявления *M.furfur*. При подозрении на развитие системного воспалительного ответа следует проводить микробиологическое исследование патологического материала, взятого из предполагаемого очага инфекции (спинномозговая жидкость, моча, трахеальный аспират 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 вида *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. furfu*.
5. Дезинфицирующий раствор, содержащий в качестве действующих веществ 1-пропанол - 30%, 2-пропанол - 45% и октенидин дигидрохлорид -0,1 % (Германия) 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% (Россия) может быть рекомендован для дезинфекции медицинских антисептик 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. Задепонированный контрольный штамм *M. furfur* Y147 может быть рекомендован к использованию в научных целях и как контрольный штамм для нужд микробиологических лабораторий.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АМП	-Антимикробные препараты
АВД	-Амфотерицин В дезоксихолат
ВУИ	-Внутриутробные инфекции
ВОЗ	-Всемирной Организации Здравоохранения
ДДМ	-Диско-диффузионный метод
ДМСО	-Диметилсульфоксид
ДНК	-Дезоксирибонуклеиновая кислота
ЖКТ	-Желудочно-кишечный тракт
ИВЗ	-Инфекционно-воспалительные заболевания
ИВЛ	-Искусственная вентиляция лёгких
ИК	-Инвазивный кандидоз
ИМ	-Инвазивный микоз
ИМП	-Инфекции мочевыводящих путей
ИСМП	-Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи
КДАВ	-Коллоидно-дисперсная форма амфотерицина В
МАКМАХ	-Межрегиональной ассоциацией по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии
МПК	-Минимально подавляющая концентрация
МУК	-Методические указания
НЭК	-Некротизирующий энтероколит
ОРИТ	-Отделение реанимации и интенсивной терапии новорожденных
ОХРИТ	-Отделение хирургии, реанимации и интенсивной терапии новорождённых
ОПН	-Отделение патологии новорожденных
ПЦР	- Полимеразная цепная реакция
РНК	-Рибонуклеиновая кислота
СДР	-Синдром дыхательных расстройств
УПМ	-Условно-патогенные микроорганизмы
УФО	-Ультрафиолетовое облучение
ЦВК	-Центральный венозный катетер
ЭНМТ	-Экстремально низкая масса тела
α-CHCA	-α-циано-4-гидроксикоричная кислота
ABLC	-Амфотерицин В липидный комплекс

AFLP	-Амплифицированный фрагмент
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)
MLP	-Анализ полиморфизма длины микросателлитных последовательностей
MLST	-Multilocus Sequence Typing (мультилокусное секвенирование)
NGS	-Next-generation sequencing
PFGE	-Гель-электрофорез в пульсирующем поле
PRMI	-Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
RAPD	-Случайная амплификация полиморфной ДНК
Real-Time PCR	-Real-time Polymerase Chain Reaction

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Острейков И.Ф., Мельникова Н.И., Бабаев Б.Д., Штатнов М.К. Грибковая инфекция у детей с хирургической патологией в ОИТ // Анестезиология и реаниматология.- 2017.- Т. 62. -№ 4.- С. 310-315.
2. Антонов А.Г., Никитина И.В., Митрохин С.Д. Клинические рекомендации по профилактике и лечению грибковых инфекций у новорожденных в условиях отделения реанимации и интенсивной терапии // Неонатология. - 2013. -№2. - С. 80-82.
3. Ostrosky-Zeichner L., Sable C., Sobel J., Alexander B.D., Donowitz G., Kan V., et al. Multicenter retrospective development and validation of a clinical prediction rule for nosocomial invasive candidiasis in the intensive care setting // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. - 2007. - V. 26. - PP. 271-276.
4. Приходько Н.А., Припутневич Т.В., Никитина И.В., Ионов О.В., Любасовская Л.А., Антонов А.Г. и др. Применение препарата микафунгин при лечении инвазивных кандидозов у недоношенных детей в условия отделения реанимации и интенсивной терапии новорожденных // Неонатология: новости, мнения, обучение. -2015. - № 4.- С. 84-90.
5. Lovero G., De Giglio O., Montagna O., Diella G., Divenuto F., Lopuzzo M., et al. Epidemiology of candidemia in neonatal intensive care units: a persistent public health problem // Journal of Hospital Infection. - 2018. - December - 100(4) - PP. 246-252.
6. Руднов В.А., Бельский Д.В., Дехнич А.В. Инфекции в ОРИТ России: результаты национального многоцентрового исследования // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2011. - Т. 13. - № 4. - С. 294-303.
7. Lucignano B., Ranno S., Liesenfeld O., Pizzorno B., Putignani L., Bernaschi P., et al. Multiplex PCR allows rapid and accurate diagnosis of bloodstream infections in newborns and children with suspected sepsis // Journal of Clinical Microbiology. - 2011. - V. 49(6). - PP. 2252-2258.

8. Bell S.G. Micafungin. Neonatal network // J. National Nurs. - 2011. - V. 30(5). - PP. 329-333.
9. Greenberg R.G., Benjamin D.K. Neonatal candidiasis: diagnosis, prevention, and treatment // J. Infect. - 2014. - V. 69. - PP. 19-22.
10. Любасовская Л.А., Припутневич Т.В., Анкирская А.С., Дегтярев Д.Н., Антонов А.Г., Ионов О.В. и др. Особенности микробной колонизации новорожденных в отделении реанимации и интенсивной терапии // Рос. вестн. перинатологии и педиатрии. - 2013. - № 3. - С. 87-91.
11. Aliaga S., Clark R.H., Laughon M., Walsh T.J., Hope W.W., Benjamin D.K., et al. Changes in the incidence of candidiasis in neonatal intensive care units // Pediatrics. 2014. - V. - 133(2). - PP. 236-242.
12. Никитина И.В., Ионов О.В., Приходько Н.А., Припутневич Т.В., Антонов А.Г., Любасовская Л.А. и др. Инвазивные микозы в неонатологии: профилактика, диагностика и терапия // Акушерство и гинекология. - 2015. - № 4. - С. 84–90.
13. Barton M., O'Brien K., Robinson J.L., Davies D.H., Simpson K., Asztalos E., et al. Invasive candidiasis in low birth weight preterm infants: risk factors, clinical course and outcome in a prospective multicenter study of cases and their matched controls // BMC Infect. Dis.- 2014.- V. 14.- P. 327.
14. Ezenwa B.N., Oladele R.O., Akintan P.E., Fajolu I.B., Oshun P.O., Oduyebo O.O., et al. Invasive candidiasis in a neonatal intensive care unit in Lagos, Nigeria // Niger. Postgrad. Med. J. - 2017. - V. 24(3). - PP. 150-154.
15. Caggiano G., Lovero G., De Giglio O., Barbuti G., Montagna O., Laforgia N., et al. Candidemia in the Neonatal Intensive Care Unit: a retrospective, observational survey and analysis of literature data // Biomed. Res. Int. - 2017. - P: 7901763.
16. Бережнова И.А. Инфекционные болезни: Учебное пособие.// М.: РИОР.- 2007. - С. 319.
17. Meersseman W., Lagrou K., Maertens J., Wilmer A., Hermans G., Vanderschueren S., et al. Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid: a tool for

diagnosing aspergillosis in Intensive Care Unit patients // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* - 2008. - V. 177. - P. 27-34.

18. Greenberg R.G., Benjamin D.K. Jr., Gantz M.G., Cotten C.M., Stoll B.J., Walsh M.C., et al. Empiric antifungal therapy and outcomes in extremely low birth weight infants with invasive candidiasis // *J. Pediatr.* - 2012. - V. 161(2). - PP. 264 - 269.

19. Веселов А.В. Эмпирическая, превентивная и профилактическая терапия инвазивных микозов: современное состояние // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* - 2009. - Т. 11. - № 4. - С. 286-304.

20. Miceli M.H., Díaz J.A., Lee S.A. Emerging opportunistic yeast infections // *Lancet Infect. Dis.* - 2011. - V. 11(2). - PP. 142 - 151.

21. Buentke E., Heffler L.C., Wallin R.P.A., Lofman C., Ljunggren H.G., Scheynius A., et al. The allergenic yeast *Malassezia furfur* induces maturation of human dendritic cells // *Clinical & Experimental Allergy.* - 2001. - Т. 31.- № 10. - С. 1583-1593.

22. Припутневич Т.В. Оптимизация микробиологической диагностики оппортунистических инфекций у беременных и новорожденных на основе протеометрических и молекулярно-генетических методов // Автореф. дис. доктора мед. наук. - М.: 2014.

23. Международная классификация болезней десятого пересмотра МКБ-10 (принята 43-й Всемирной Ассамблеей Здравоохранения).

24. Benjamin M.D., Jolivet E., Desbois N., Pignol J., Ketterer-Martinon S., Pierre-Louis L., et al. Fungal colonization in preterm neonates weighing less than 1500 g admitted to the neonatal intensive care unit // *Arch. Pediatr.* - 2016. - V. 23(9). - PP. 887-894.

25. Овчинников Р.С., Маноян М.Г., Гайнуллина А.Г., Панин А.Н., Ершов П.П. Грибы рода *Malassezia* в заболеваниях животных. Клинические формы, диагностика, терапия // *Vetpharma.* - 2013.- №1. - С. 30-36.

26. Ianiri G., Heitman J., Scheynius A. The skin commensal yeast *Malassezia globosa* thwarts bacterial biofilms to benefit the host // *J. Invest. Dermatol.* - 2018. - V. 138(5). - PP. 1026-1029.

27. Iatta R., Cafarchia C., Cuna T., Montagna O., Laforgia N., Gentile O., et al. Bloodstream infections by *Malassezia* and *Candida* species in critical care patients // *Medical Mycology*. - 2014. - V. 52(3). - PP. 264 - 269.
28. Batra R., Boekhout T., Guého E., Cabañes F.J., Dawson T.L. Jr., Gupta A.K. *Malassezia* Baillon, emerging clinical yeasts // *FEMS Yeast Res.* - 2005. - V. 5(12). - PP. 1101 - 1113.
29. Ashbee H.R., Evans E.G. Immunology of diseases associated with *Malassezia* species // *Clin. Microbiol. Rev.* - 2002. - V. 15(1). - PP. 21 - 57.
30. Богданова Т.В., Елинов Н.П. Физиологические характеристики дрожжевых организмов – *Malassezia* species (Malassez, 1874) Bailon, 1889 (обзор) // *Проблемы медицинской микологии*. - 2011. - Т. 13. - № 1. - С. 3-13.
31. Baroni A., Perfetto B., Paoletti I., Ruocco E., Canozo N., Orlando M., et al. *Malassezia furfur* invasiveness in a keratinocyte cell line (HaCat): effects on cytoskeleton and on adhesion molecule and cytokine expression // *Arch. Dermatol. Res.* - 2001. - V. 293(8). - PP. 414 - 419.
32. Quereux G. Seborrheic dermatitis // *J. EMC-Dermatologie Cosmetologie*. - 2005. - V. 2. - PP. 147-159.
33. Oliveri S., Trovato L., Betta P., Romeo M.G., Nicoletti G. *Malassezia furfur* fungaemia in a neonatal patient detected by lysis-centrifugation blood culture method: first case reported in Italy // *Mycoses*. - 2011. - V. 4. - PP. e638–640.
34. Barton M., O'Brien K., Robinson J.L., Davies D.H., Simpson K., Asztalos E., et al. Invasive candidiasis in low birth weight preterm infants: risk factors, clinical course and outcome in a prospective multicenter study of cases and their matched controls // *BMC Infect. Dis.* - 2014. - V. 14. - P. 327.
35. Nguyen S.T., Lund C.H., Durand D.J. Thrombolytic therapy for adhesion of percutaneous central venous catheters to vein intima associated with *Malassezia furfur* infection // *J. Perinatol.* - 2001. - V. 21(5). - PP. 331 - 333.

36. Кашкин П.Н., Лисин В.В. //Практическое руководство по медицинской микологии.- М.: Медицина.- 1983. – 192 с.
37. Theelen B., Cafarchia C., Gaitanis G., Bassukas ID., Boekhout T., Dawson TL Jr. *Malassezia* ecology, pathophysiology, and treatment // *Med Mycol.* - 2018.- April 1.- 56(suppl_1):S10-S25.
38. Leeming J.P., Notman F.H. Improved methods for isolation and enumeration of *Malassezia furfur* from human skin // *J. Clin. Microbiol.* - 1987. - V. 25(10). - PP. 2017 - 2019.
39. Diongue K., Kébé O., Faye M.D., Samb D., Diallo M.A., Ndiaye M., et al. MALDI-TOF MS identification of *Malassezia* species isolated from patients with pityriasis versicolor at the seafarers' medical service in Dakar, Senegal // *J. Mycol. Med.* - 2018. - V. 28(4).- PP. 590-593.
40. Honnavar P., Ghosh A.K., Paul S., Shankarnarayan S.A., Singh P., Dogra S., et al. Identification of *Malassezia* species by MALDI-TOF MS after expansion of database // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* - 2018. - V. 92(2). - PP. 118 - 123.
41. Melhem M.S., Bertoletti A., Lucca H.R., Silva R.B., Meneghin F.A., Szeszs M.W. Use of the VITEK 2 system to identify and test the antifungal susceptibility of clinically relevant yeast species // *Braz. J. Microbiol.* - 2014. - V. 44(4). - PP. 1257 - 1266.
42. Vogiatzi L., Ilia S., Sideri G., Vagelakoudi E., Vassilopoulou M., Sdougka M., et al. Invasive candidiasis in pediatric intensive care in Greece: a nationwide study // *Intensive Care Med.* - 2013. - V. 39(12). - PP. 2188 - 2195.
43. Colombo A.L., Cortes J.A., Zurita J., Guzman-Blanco M., Alvarado Matute T., de Queiroz Telles F., et al. Recomendaciones para el diagnóstico de la candidemia en América Latina [Recommendations for the diagnosis of candidemia in Latin America. Grupo Proyecto Épico] // *Rev. Iberoam. Micol.* - 2013. - V. 30(3 Suppl 1). - PP. 150 - 157.

44. Припутневич Т.В., Мелкумян А.Р., Любасовская Л.А., Муравьева В.В., Ильина Е.Н., Сухих Г.Т. Масс-спектрометрия в микробиологической практике научного центра акушерства, гинекологии и перинатологии // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. - 2016.- № 1. - С. 52-58.
45. Kornienko M., Ilina E., Lubasovskaya L., Priputnevich T., Falova O., et al. Analysis of nosocomial *Staphylococcus haemolyticus* by MLST and MALDI-TOF mass spectrometry // Infection, Genetics and Evolution. - 2016. - V. 39. - PP. 99-105.
46. Муравьева В.В., Припутневич Т.В., Завьялова М.Г., Анкирская А.С., Ильина Е.Н., и др. Сравнительная оценка видовой идентификации вагинальных изолятов дрожжевых грибов методом MALDI-TOF MS и традиционными (биохимическим и фенотипическим) методами // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2014. - Т. 16. - №1. - С. 10-17.
47. Припутневич Т.В., Мелкумян А.Р., Бурменская О.В., Непша О.С., Никитина И.В., Любасовская Л.А., и др. Использование методов MALDI-TOF масс-спектрометрии и количественной ПЦР для быстрой диагностики септических состояний // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2014. - Т. 16. - №1. - С. 4-9.
48. Припутневич Т.В., Трофимов Д.Ю., Завьялова М.Г., Мелкумян А.Р. Прямая идентификация микроорганизмов в гемокультуре с помощью метода MALDI-TOF MS // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2013. - Т. 15. - №2(S1). - С. 35.
49. Vinciguerra V., Rojas F., Tedesco V., Giusiano G., Angiolella L. Chemical characterization and antifungal activity of *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* essential oils and carvacrol against *Malassezia furfur* // Nat. Prod. Res. - 2019. - V. 33(22). - PP. 3273 - 3277.
50. Leong C., Buttafuoco A., Glatz M., Bosshard P.P. Antifungal susceptibility testing of *Malassezia* spp. with an optimized colorimetric broth microdilution method // J. Clin. Microbiol. - 2017. - V. 55(6). - PP. 1883 - 1893.

51. Iatta R., Caggiano G., Cuna T., Montagna M.T. Antifungal susceptibility testing of a 10-year collection of *Candida* spp. isolated from patients with candidemia // *J. Chemother.* - 2011. - V. 23(2).- PP. 92 - 96.
52. Peano A., Pasquetti M., Tizzani P., Chiavassa E., Guillot J., Johnson E. Methodological issues in antifungal susceptibility testing of *Malassezia pachydermatis* // *J. Fungi (Basel)*. - 2017. - V. 3(3). - P. 37.
53. Álvarez-Pérez S., García M.E., Blanco J.L. In vitro activity of amphotericin B-azole combinations against *Malassezia pachydermatis* strains // *Med. Mycol.* - 2019. - V. 57(2). - PP. 196 - 203.
54. Дмитриева Н.В., Петухова И.Н. Сравнительная эффективность и переносимость липидного комплекса амфотерицина В и липосомального амфотерицина В при лечении инвазивных грибковых инфекций у онкогематологических больных: обзор литературы // *Онкогематология*. - 2014. - Т. 9. - № 1. - С. 35-41.
55. Sau K., Mambula S.S., Latz E., Henneke P., Golenbock D.T., Levitz S.M. The antifungal drug amphotericin B promotes inflammatory cytokine release by a Toll-like receptor- and CD14-dependent mechanism // *J. Biol. Chem.* - 2003. - V. 278(39). - PP. 37561 - 37568.
56. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Version 8.1, valid from 2018-05-15.
57. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antifungal agents. Version 9.0, valid from 2018-02-12.
58. Клинические рекомендации по определению чувствительности к антимикробным препаратам. Версия 2018-03.
59. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI M44-A2). August 2010.
60. Iatta R., Immediato D., Montagna M.T., Otranto D., Cafarchia C. In vitro activity of two amphotericin B formulations against *Malassezia furfur* strains recovered from patients with bloodstream infections // *Med. Mycol.* - 2015.- V. 53(3). - PP. 269 - 274.

61. Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Boyken L, Hollis R.J., Kroeger J., Messer S.A., et al. Comparison of the broth microdilution (BMD) method of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing with the 24-hour CLSI BMD method for testing susceptibility of *Candida* species to fluconazole, posaconazole, and voriconazole by use of epidemiological cutoff values // *J. Clin. Microbiol.* - 2011.- V. 49(3).- PP. 845 - 850.
62. Cafarchia C., Iatta R., Immediato D., Puttilli M.R., Otranto D. Azole susceptibility of *Malassezia pachydermatis* and *Malassezia furfur* and tentative epidemiological cut-off values // *Med. Mycol.* - 2015. - V. 53(7). - PP. 743 - 748.
63. Kolecka A., Khayhan K., Arabatzis M., Velegraki A., Kostrzewa M., Andersson A., et al. Efficient identification of *Malassezia* yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) // *Br. J. Dermatol.* - 2014. - V. 170(2). - PP. 332 - 341.
64. Iatta R., Figueredo L.A., Montagna M.T., Otranto D., Cafarchia C. In vitro antifungal susceptibility of *Malassezia furfur* from bloodstream infections // *J. Med. Microbiol.* - 2014. - V. 63(Pt 11). - PP. 1467 - 1473.
65. Galvis-Marín J.C., Rodríguez-Bocanegra M.X., Pulido-Villamarín A.D.P., Castañeda-Salazar R., Celis-Ramírez A.M., Linares-Linares M.Y. Actividad antifúngica in vitro de azoles y anfotericina B frente a *Malassezia furfur* por el método de microdilución M27-A3 del CLSI y Etest® [In vitro antifungal activity of azoles and amphotericin B against *Malassezia furfur* by the CLSI M27-A3 microdilution and Etest® methods] // *Rev. Iberoam. Micol.* - 2017. - V. 34(2). - PP. 89 - 93.
66. ISO. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems – susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices – part 1: Reference methods for testing the in vitro activity of antimicrobials. Geneva, Switzerland. 2006.
67. Seifert K.A. Progress towards DNA barcoding of fungi // *Mol. Ecol. Resour.* - 2009. - V. 9(S1).- PP. 83 - 89.

68. МУ 3.5.1.3439-17 Оценка чувствительности к дезинфицирующим средствам микроорганизмов, циркулирующих в медицинских организациях.
69. Klein S., Zimmermann S., Kohler C., Mischnik A. Integration of matrix-assisted laser desorption/ionization time-offlight mass spectrometry in blood culture diagnostics: a fast and effective approach // J Med Microbiol. – 2012. – Vol. 61, N 3. – P. 323 – 31.
70. Бачурская Н.С., Грудинин Д.А., Ишмухаметова З.А., Брудастов Ю.А. и др. Современные проблемы биологии грибов рода *Malassezia* // Вестник Оренбургского государственного университета. - 2007. - № 12 (79).- С. 8-17.
71. Кудашов Н.И., Анкирская А.С., Александровский А.В., Любасовская Л.А. Клиническая значимость микробиологического мониторинга бактериальных агентов в условиях отделения патологии новорожденных // Детские инфекции.- 2009. - №1. - С. 24-29.
72. Рюмина И.И., Зубков В.В., Милая О.В., Анкирская А.С., Любасовская Л.А. Целесообразность проведения бактериологического исследования крови у новорожденных детей с бронхолегочной патологией // Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием, посвященной 80-летию кафедры эпидемиологии и доказательной медицины "Актуальные проблемы эпидемиологии на современном этапе". - М.- 2011. - С.344-345.
73. Антонов А.Г., Бабак О.А., Рудакова А.А., Приходько Н.А., Ионов О.В., Дегтярев Д.Н., и др. Профилактика и лечение микозов у глубоко недоношенных детей в условиях ОРИТ//Неонатология.- ноябрь.- 2011.- г. Москва.
74. Анкирская А.С., Припутневич Т.В., Муравьева В.В., Завьялова М.Г., Любасовская Л.А., Королева Т.Е., и др. Использование масс-спектрометрии для идентификации клинических изолятов дрожжевых грибов // Проблемы медицинской микологии. - 2011. - Т.13. - №2. - С. 61-62.
75. Ankirskaya A., Priputnevich T., Muravjeva V., Zavjalova M., Lubasovskaya L., Bairamova G. Mass-spectrometry analysis VS classical methods for identification of clinically relevant yeast // Abstract book: 12th IUSTI World Congress, 2-5 November 2011, New Delhi, India. P. 147.

76. Анкирская А.С., Ильина Е.Н., Муравьева В.В., Любасовская Л.А., Мелкумян А.Р., Завьялова М.Г., и др. Внедрение масс-спектрометрии для улучшения качества микробиологической диагностики в практике акушерства, гинекологии и перинатологии // XVII научно-практическая конференция «Интеграция в лабораторной медицине» 27-29 марта 2012 г.- г. Москва.
77. Припутневич Т.В., Любасовская Л.А., Анкирская А.С., Рюмина И.И., Зубков В.В. Колонизация неферментирующими бактериями детей, госпитализированных в отделение патологии новорожденных перинатального центра 3 уровня // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2012. - Т. 14. - №2. - приложение 1.- С. 43-44.
78. Сухих Г.Т., Анкирская А.С., Завьялова М.Г., Говорун В.М., Ильина Е.Н. Опыт практического применения масс-спектрометрии в рутинной микробиологической диагностике центра акушерства, гинекологии и перинатологии // Материалы V научно-практической конференции «Современные технологии и методы диагностики различных групп заболеваний, лабораторный анализ», Москва, 2012. С. 30-31.
79. Припутневич Т.В., Зайцева С.А., Завьялова М.Г., Мелкумян А.Р., Тетерина Т.А., Ильина Е.Н., и др. Сравнительный анализ применения масс-спектрометрии и автоматизированной проточной цитометрии для скрининга бактериурии // Акушерство и гинекология. - 2013. - № 9. - С. 53-58.
80. Reich M., Bosshard P.P., Stark M., Beyser K., Borgmann S. Species identification of bacteria and fungi from solid and liquid culture media by MALDI-TOF mass spectrometry // J Bacteriol Parasitol. – 2013. – Vol. 5. – P. 4 –8.
81. Любасовская Л.А., Припутневич Т.В., Анкирская А.С., Дегтярев Д.Н., Антонов А.Г., Ионов О.В., и др. Особенности микробной колонизации новорожденных в отделении реанимации и интенсивной терапии // Российский вестник перинатологии и педиатрии. - 2013. - №3. - С. 87-91.
82. Любасовская Л.А., Корниенко М.А., Припутневич Т.В., Ильина Е.Н., Щеголев А.И. Микробиологическая и молекулярно-генетическая характеристика

коагулазонегативных стафилококков, выделенных у новорожденных отделения реанимации и интенсивной терапии // Антибиотики и химиотерапия. - 2013. - Т. 58.- № 3-4. - С. 25-32.

83. Зубков В.В., И.И. Рюмина, Т.В. Припутневич, Н.В. Евтеева, С.Д. Митрохин, В.Л. Тютюнник. Обзор потребления антимикробных препаратов у новорожденных с инфекционно-воспалительными заболеваниями // Перинатология и неонатология. - 2013.- Т.58. - № 2. - С.12-16.

84. Ионов О.В., Никитина И.В., Бурменская О.В., Непша О.С., Трофимов Д.Ю., Донников А.Е, и др. Роль метода полимеразной цепной реакции в диагностике врожденных и нозокомиальных инфекций у новорожденных // Акушерство и гинекология. - 2013. - № 11. - С. 59-64.

85. Ионов О.В., Никитина И.В., Зубков В.В., Митрохин С.Д., Крохина К.Н., Киртбая А.Р., и др. Порядок обследования новорожденных с подозрением на инфекционную патологию и правила назначения антибактериальной терапии, принятые в отделении реанимации и интенсивной терапии новорожденных ФГБУ "Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова" Минздрава России // Неонатология: новости, мнения, обучение. – 2014- № 1. - С. 95-106.

86. Зубков В.В., Любасовская Л.А., Рюмина И.И., Припутневич Т.В., Анкирская А.С., Тютюнник В.Л. Микробиологический мониторинг в системе инфекционного контроля неонатальных стационаров // Российский вестник перинатологии и педиатрии. - 2014. - № 1. - С. 51-56.

87. Припутневич Т.В., Мелкумян А.Р., Бурменская О.В., Непша О.С., Никитина И.В., Любасовская Л.А., и др. Использование методов MALDI-TOF масс-спектрометрии и количественной ПЦР для быстрой диагностики септических состояний // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2014. - Т. 16.- №1.- С. 4-9.

88. Мелкумян А.Р., Ильина Е.Н., Митрохин С.Д., Трофимов Д.Ю., Непша О.А., Бурменская О.А. Прямая идентификация микроорганизмов из гемокультур с

помощью метода MALDI–TOF–MS в сравнении с методом ПЦР // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2014.- Т. 16. - №1. - С. 21-26.

89. Clark A.E., Kaleta E.J., Arora A., Donna M. Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology // Clin Microbiol Rev. – 2013. – Vol. 26, N.3. – P. 547.

90. Шагдилеева Е.В., Файзуллина Р.Р., Белова О.А., Кузнецова Т.Н., Воронович С.Э., Рубин Г.В., и др. Инвазивный кандидоз у новорожденных с Санкт-Петербурге: описание клинического случая и результаты проспективного исследования // Проблемы медицинской микологии. - 2019.- Т. 21.- № 4. - С. 17-23.

91. El-Bouri K., Johnston S., Rees E., Thomas I., Bome-Mannathoko N., Jones C. Comparison of bacterial identification by MALDI-TOF mass spectrometry and conventional diagnostic microbiology methods: agreement, speed and cost implications // Br J Biomed Sci. – 2012. – Vol. 69, N 2 – P. 47–55.

92. Fournier P.E., Drancourt M., Colson P., Rolain J.M., La Scola B., Raoult D. Modern clinical microbiology: new challenges and solutions // Nature reviews Microbiology. – 2013. – Vol. 11. – P. 574 – 85.

93. Дубоделов Д.В., Любасовская Л.А., Шубина Е.С., Мукосей И.С., Коростин Д.О., Кочеткова Т.О., и др. Генетические детерминанты резистентности к β -лактамным антибиотикам госпитальных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных у новорожденных // Генетика. - 2016. - Т. 52. - № 9. - С. 1097-1102.

94. Гордеев А.Б., Любасовская Л.А., Родченко Ю.В., Дубоделов Д.В., Мукосей И.С., Кочеткова Т.О., и др. Генетический полиморфизм госпитальных штаммов *Staphylococcus epidermidis*, выделенных у новорожденных отделения реанимации и интенсивной терапии // Вестник РГМУ. - 2017.- №1. - С. 31-38.

95. Любасовская Л.А., Майкова Г.Б., Мелкумян А.Р., Зубков В.В., Ионов О.В., Киртбая А.Р., и др. Оценка потребления антимикробных препаратов в неонатологии с помощью альтернативных DDD методик // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2017. - Т. 19. - №1. - С. 31-36.

96. Т.В. Припутневич, Л.А. Любасовская, Д.В. Дубоделов, А.Р. Мелкумян, Е.П. Игоница, Д.Н. Дегтярев, Г.Т. Сухих. Эффективная профилактика и лечение ИСМП в родовспомогательных учреждениях Российской Федерации: нерешенные вопросы организации и контроля // Вестник росздравнадзора. - 2017. - № 4. - С. 34-41.
97. Ионов О.В., Киртбая А.Р., Балашова Е.Н., Никитина И.В., Ленюшкина А.А., Скворцова М.А., и др. Система профилактики и контроля госпитальной инфекции в отделениях (палатах) реанимации и интенсивной терапии для новорожденных в акушерских стационарах и детских больницах. Методические рекомендации // Неонатология: новости, мнения, обучение. - 2017. - №3.- С. 108-126.
98. Ионов О.В., Никитина И.В., Соколова Е.В., Припутневич Т.В., Любасовская Л.А., Родченко Ю.В., и др. Сравнение эффективности 0,1% раствора октенидина дигидрохлорида и 2% феноксиэтинола и 70% раствора этилового спирта в качестве кожных антисептиков при катетеризации вен у новорожденных // Неонатология: новости, мнения, обучение. - 2018. - Т. 6. - № 3. - С. 99-108.
99. Родченко Ю.В., Припутневич Т.В., Зубков В.В. *Malassezia furfur* в отделениях реанимации и интенсивной терапии новорожденных (обзор литературы) // Проблемы медицинской микологии.- 2019.- Т. 21.- №3. – С. 9-12.

ПРИЛОЖЕНИЯ**Приложение №1****Направление в лабораторию микробиологии**

1. Ф.И.О. новорождённого: _____
2. № истории болезни новорождённого _____ Гестационный
возраст новорождённого _____
- Пол _____ Вес при рождении _____
- Вес на момент обследования _____
3. Исследуемый биологический материал

4. Диагноз основной _____

5. Диагноз
сопутствующий _____

6. Антимикробная терапия: нет / да; указать препараты:

6. Пробиотики _____
7. _____

ФИО, должность, подпись и личная печать врача

8. Дата и время взятия материала « ____ » _____ г.

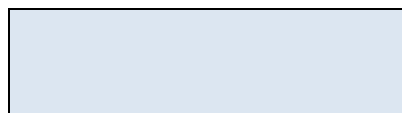
Приложение 2

Микробиологический паспорт штамма



ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова»
Минздрава России

Микробиологический паспорт штамма



единый код штамма

Номер в журнале отделения	
----------------------------------	--

Вид	
------------	--

номер истории болезни

Локус	
--------------	--

Диагноз	
----------------	--

ФИО	
------------	--

Отделение	
------------------	--

Полный геном	
---------------------	--

ПЦР отдельных генов	
----------------------------	--

ST	
-----------	--

Приложение 3. Дезинфицирующие препараты и антисептики и режимы их применения

Название (производитель)	Состав	Тестируемый режим	Метод обработки	Наносимый объем или концентрация (выделенные режимы тестировались)	Экспозиция (выделенные режимы тестировались)	Расход
Септоцид Р плюс (ЗАО «БелАсептика», Республика Беларусь)	этанол 68,229 %, бутандиол 0,115 %, пропанол-2 5 %, компоненты, улучшающие состояние кожи	гигиеническая обработка рук	проти- вание	3 мл	0,5 мин	-
Октенидерм («Шюльке и Майр ГмбХ», Германия)	N-пропанол 30 %, изопропиловый спирт 45 %, октенидин дигидрохлорид 0,1 %, вспомогательные компоненты	гигиеническая обработка рук	проти- вание	3 мл	0,5 мин	-
Экобризокси (ООО «Мир дезинфекции», Россия)	перекись водорода 15 %, полигексаметиленгуанидин гидрохлорид 12 %, вспомогательные компоненты	дезинфекция поверхностей по дерматофитам	проти- вание	0,5 % 1 %	120 мин 60 мин	-
Лизарин спрей (ООО «Гигиена плюс», Россия)	N,N-бис(3-аминопропил)додециламин 5 %, активатор , алкилдиметилбензиламмоний хлорид 8 %, дидецилдиметиламмоний хлорид 1 %, полигексаметиленгуанидин гидрохлорид 5 %, вспомогательные компоненты , ПАВ	дезинфекция поверхностей по дерматофитам	проти- вание	0,2 % 0,5 % 0,75 % 1 %	60 мин 45 мин 30 мин 15 мин	1 0 0 м л/ м

						2
Бетасептин (ЗАО «МЕДЛЕКСПРОМ», Россия)	N,N-бис(3-аминопропил)додециламин 0,17 %, алкилдиметилбензиламмоний хлорид 0,25 %, дидецилдиметиламмоний хлорид 0,2 %, компоненты, улучающие состояние кожи	гигиеническая обработка рук	проти рание	3 мл	0,5 мин	5 0 мл/ м 2
Экобриз (ООО «Мир дезинфекции», Россия)	N,N-бис(3-аминопропил)додециламин 2,3 %, алкилдиметилбензиламмоний хлорид + дидецилдиметиламмоний хлорид 1,8 %, вспомогательные компоненты	дезинфекция поверхностей по дерматофитам	проти рание	4 % 7,5 % 10 %	120 мин 90 мин 60 мин	-
Мастерсепт (ЗАО «МЕДЛЕКСПРОМ», Россия)	алкилдиметилбензиламмоний хлорид 0,15 %, изопропиловый спирт 55 %, вспомогательные компоненты	гигиеническая обработка рук	проти рание	3 мл	0,5 мин	3 0 мл/ м 2

Состав нейтрализаторов для дезинфицирующих средств

Название	Состав нейтрализатора
Септоцид Р плюс	Вода
Октинидерм, Лизарин спрей, Бетасептин, Экобриз, Мастерсепт	Твин 80 (3 %), сапонин (0,3-3 %), гистидин (0,1 %), цистеин (0,1 %)
Экобризокс	Твин 80 (3 %), сапонин (0,3-3 %), гистидин (0,1 %), цистеин (0,1 %), тиосульфат натрия (0,1-1,0 %)

Приложение 4. Свидетельство о депонировании микроорганизма.

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Федеральный исследовательский центр
«Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»
(ФИЦ ПНЦБИ РАН)
142290, г. Пушкино Московской обл., проспект Науки, д.3.
Тел. (495)632-78-68, тел/факс: (4967)73-26-36
ОКПО 02699688, ОГРН 1025007768983, ИНН/КПП 5039002841/503901001
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина
Российской академии наук
– обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН
(ИБФМ РАН)
142290, г. Пушкино Московской обл., проспект Науки, д.5
Тел./факс (4967)73-39-62, тел.(495)956-33-70, e-mail: adm@ibpm.ru
<http://www.ibpm.ru>

04.03.2020 № 191-2-02.1-2181

На № _____ от _____

СВИДЕТЕЛЬСТВО о депонировании

Кому Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4

(имя депозитора и наименование организации, адрес)

1. Микроорганизм Malassezia furfur Y147
(наименование микроорганизма и опознавательная ссылка, присвоенная депозитором [номер, символ и т.д.])

Регистрационный номер, присвоенный ВКМ BKM Y-3051D

2. Микроорганизм, поименованный в графе 1, сопровождался Ходатайством о депонировании, включавшем:

научное описание	☐
таксономическое определение	☐
научное описание и таксономическое определение	☒
справку о непатогенности	☐

3. Настоящим подтверждается, что микроорганизм, поименованный в графе 1, депонирован Всероссийской коллекцией микроорганизмов ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН в связи с подачей заявки на оформление национального патента.

Настоящее свидетельство действительно в течение 5 (пяти) лет от даты его регистрации

Дата депонирования 31.01.2020

Зам. директора ИБФМ РАН
д.б.н., профессор





М. Б. Вайнштейн