

© Коллектив авторов, 2003

Г.О. Бронин^{1,3}, А.М. Дёмина², Т.А. Высоцкая³, А.М. Тимаков¹, Л.В. Харазова¹,
К.Л. Кондратчик^{1,4}, В.А. Минаев², А.В. Пахомов³, Д.Н. Балашов^{1,5}, В.В. Буянов²

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ ГРИБКОВОЙ ИНФЕКЦИИ

¹ НИИ детской гематологии Минздрава РФ, ² ФГУП ГосНИИ биологического приборостроения,
³ РГМУ, ⁴ Морозовская детская городская клиническая больница, ⁵ РДКБ, Москва

Было обследовано 30 детей, больных гемобластозами и апластической анемией, у которых на фоне лечения основного заболевания развился системный микоз. С целью определения возможности проведения мониторинга грибковой инфекции (ГИ) и оценки эффективности антифунгальной терапии у больных проводили забор сыворотки крови каждые 48 ч на протяжении всего периода аплазии кроветворения вплоть до нормализации гемограммы и клинического статуса больного (175 проб). Пробы сыворотки были проанализированы методом капиллярной газовой хроматографии (ГХ). Определяли уровни актуальных моносахаров — арабинитола, маннозы, фруктозы, галактозы, маннитола. Проводили корреляционный анализ клинических и ГХ-маркеров. Выявлена жесткая корреляция с уровнем маннозы ($p < 0,001$) и суммарным уровнем маннозы и фруктозы ($p < 0,001$). Корреляция с уровнем арабинитола сыворотки оказалась слабой ($p = 0,83$). Исследование показало, что метод ГХ может быть применен для мониторинга ГИ у больных с аплазией кроветворения и оценки эффективности противогрибковой терапии.

We examined 30 children, cured for leukemias, lymphomas and aplastic anemia, which developed systemic mycosis in the course of treatment of the main disease. We took samples of serum each 48 hours during all the period of aplasia until the normalization of clinical and haematological status for monitoring of fungal infection (FI) and estimation of the efficiency of antifungal therapy (175 tests). The samples were analyzed by capillary gas chromatography (GC). Serum levels of some monosaccharides (arabinitol, mannose, fructose, galactose, mannitol) were measured. Correlation between clinical and GC signs of mycosis was calculated. We revealed a strong correlation with mannose level ($p < 0,001$) and with total level of mannose and fructose ($p < 0,001$). Correlation with serum level of arabinitol was very weak ($p = 0,83$). This investigation showed, that GC method could be used for FI monitoring in patients with aplasia and for the estimation of the efficiency of antifungal therapy.

Актуальность проблемы грибковой инфекции (ГИ) в гематологических стационарах в последние годы не вызывает сомнений. Грибы рода *Candida* являются наиболее частым оппортунистическим возбудителем нозокомиальной инфекции у больных гемобластозами и апластической анемией. Частота инвазивного микоза в онкогематологических стационарах достигает 50% [1—3]. Даже в условиях интенсивной противогрибковой терапии смертность от микоза остается высокой. В детской популяции, по данным разных авторов, она составляет от 29% [4] до 39% [5]. Современные методы диагностики ГИ малоэффективны и не позволяют быстро и достоверно сделать заключение о наличии ГИ [6]. В большинстве случаев клиницисты вынуждены иметь дело с возможным микозом, о котором судят на основании

«грибкового» анамнеза, глубины и длительности аплазии кроветворения, выраженности специфического грибкового мукозита и лихорадки, ответа на системные антибактериальные и противогрибковые препараты. В этой ситуации общепринято начинать лечение больного со стартовой эмпирической терапии антимикотиками широкого спектра действия [7, 8]. Для этих целей используют препараты амфотерицина В, которые обладают известными побочными эффектами (нефротоксичность, дизэлектролитемия, гепатотоксичность, общетоксические явления) [9, 10]. Выходом из ситуации можно было бы считать использование липосомального амфотерицина В [11]. Однако стоимость препарата ограничивает его широкое применение для эмпирической терапии.

Кроме того, проводя лечение заболевания, не обладающего характерными клиническими симптомами, врач не может быть уверен в эрадикации возбудителя, т.е. ответить на вопрос о возможности прекращения противогрибковой терапии. Определяя время «окончания» микоза лишь эмпирически, клиницисты либо преждевременно отменяют препараты, что приводит в дальнейшем к обострению микоза, либо обрекают ребенка на более длительный, чем необходимо, курс высокотоксичного для него лекарства. Таким образом, решение этой клинической проблемы состоит не столько в диагностике и адекватной терапии, сколько в скором получении информации о «начале» инфекции, ответе на антимикотик и «окончании» процесса. То есть необходим мониторинг системного микоза у каждого конкретного больного.

В этом, по нашему мнению, могут помочь так называемые некультуральные методы диагностики: иммунологические (определение противогрибковых антител и антигенов — маннанов, гликанов и енолазы), молекулярные (газовая хроматография — ГХ), ферментативные методы, полимеразная цепная реакция — PCR, ядерно-магнитно-резонансная спектроскопия [6]. Общим преимуществом этих методов является быстрота получения результата, а также относительно большая по сравнению с рутинными посевами чувствительность. Относительно низкая специфичность, а также высокая частота ложноположительных результатов не позволяют использовать их для окончательной диагностики микоза. Основной сферой применения этих методов остается экспресс-диагностика и мониторинг ГИ у пациентов с аплазией кроветворения.

ГХ, как метод для диагностики микоза, используют достаточно давно, он прошел многочисленные клинические испытания [12—14], в том числе и в нашей стране [15]. ГХ позволяет определить концентрации серии моносахаров — маркеров ГИ в сыворотке крови и других биологических жидкостях [12]. Однако в предыдущих работах наибольший интерес представляло определение концентрации D-арабинитола [12, 14, 15], меньше внимания уделялось другим моносахарам — маннозе и маннитулу [13, 16]. Основной целью работ была экспресс-диагностика микоза. Действительно, сахарный спирт D-арабинитол является специфическим метаболитом грибов рода *Candida* и его уровень может свидетельствовать о наличии активных форм микроорганизма [17].

Дальнейшие исследования, проводимые в 90-е годы, показали заметно более низкую чувствительность определения D-арабинитола по сравнению с другими доступными тестами для экспресс-диагностики (PCR, латекс-агглютинация, определение маннанов и гликанов) от 10% [18] до 78% [19]. С целью повышения чувствительности и специфичности рекомендовалось определение уровня D-арабинитола на энантиоселективной колонке, а так-

же его оценка в соотношении с уровнями креатинина и L-арабинитола [20]. Был предложен ферментативный метод определения D-арабинитола, используя D-арабинитолдегидрогеназу [21]. Дальнейшее снижение чувствительности методики D.P. Eisen и соавт. [22] объяснили увеличением доли видов *Candida*, не продуцирующих D-арабинитол (например, *C. krusei*). Возможно также наличие непродуцирующих D-арабинитол штаммов наиболее распространенного вида *C. albicans*.

Еще в исследованиях 90-х годов отмечалось несомненное преимущество определения моносахаров перед другими некультуральными методами — возможность не только экспресс-диагностики, но и мониторинга эффективности терапии [23]. Моносахара — низкомолекулярные вещества, они стабильны в кровотоке, на их уровень не влияет концентрация антимикотика. Кроме того, ГХ позволяет количественно оценить одновременно серию моносахаров. Это позволяет избежать погрешности, связанной с неизбежными эволюционными изменениями метаболизма грибов.

Целью нашего исследования явилось определение возможности применения метода ГХ для мониторинга ГИ у детей с аплазией кроветворения и оценки эффективности антифунгальной терапии.

Материалы и методы исследования

Мы обследовали 30 больных в возрасте от одного года до 22 лет с гемобластозами и апластической анемией, проходивших лечение в гематологическом отделении Морозовской больницы и отделении трансплантации костного мозга РДКБ (табл. 1).

Осуществляли забор сыворотки крови каждые 48 ч после окончания блока полихимиотерапии (ПХТ) на протяжении всего периода аплазии кроветворения вплоть до нормализации гемограммы и клинического статуса больного. Пробы сыворотки были подвергнуты ГХ-анализу. Всего проанализировано 175 проб.

Уровень свободных сахаров определяли методом капиллярной ГХ с применением плазменно-ионизационного детектора. Анализ выполняли на кварцевой капиллярной

Таблица 1

Общая характеристика наблюдаемых больных

Показатели	n
Общее число больных	30
Мальчики	13
Острый нелимфобластный лейкоз	13
Острый лимфобластный лейкоз	12
Лимфомы	3
Приобретенная апластическая анемия	2
Реципиенты костного мозга	4
Гепатолиенальный кандидоз	3
Диссеминированный кандидоз легких	1

колонке с неподвижной метилсиликоновой фазой длиной 25 м и диаметром 0,2 мм. Моносахара анализировали в виде триметилсилильных производных. Силильные производные получали, применяя N-триметилсилилимидазол (ТСИМ) с последующей экстракцией гексаном. Одновременно фиксировали основные показатели состояния больного (лихорадка, мукозит, микотические очаги в органах, уровни гранулоцитов периферической крови и креатинина сыворотки), производили посевы из стерильных и нестерильных источников. У 18 пациентов микоз расценивался как вероятный, так как была получена культура грибов рода *Candida* из нестерильных источников; у 12 больных — как возможный — наличие клинических признаков ГИ без высева грибов. У всех пациентов гемокультура была отрицательной.

Полученные данные по всем больным были объединены в общую матрицу. Методом математической статистики находили корреляции парных переменных. Коэффициенты корреляции, а также уровень значимости (p) определяли с помощью различных методов для непараметрических критериев (Spearman, Gamma, Kendall—Tau)[24, 25]. Выбор статистического метода был обусловлен разнородностью оцениваемых признаков. В матрицу были включены количественные параметры: уровни моносахаров — маннозы, арабинитола, галактозы, фруктозы, маннитола, соотношение уровней арабинитола и креатинина сыворотки, температура тела в день забора крови, уровень гранулоцитов. Уровень арабинитола оценивали как сумму энантиомеров — D- и L-арабинитола. Качественно оценивали степень мукозита и аплазии кроветворения.

Результаты и их обсуждение

На рис. 1 видно, что наибольшая корреляция отмечалась между таким важным клиническим признаком микоза, как степень мукозита, и уров-

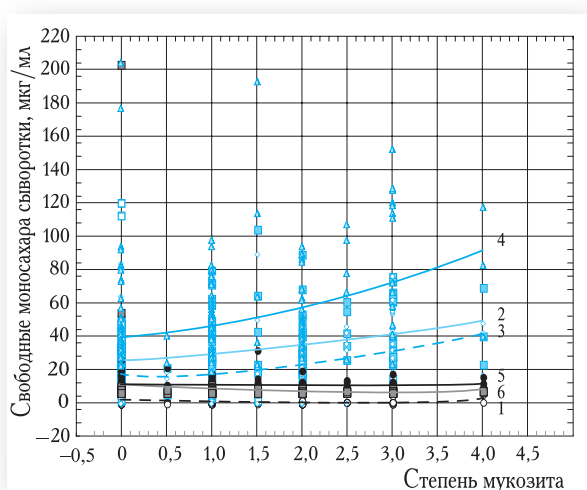


Рис. 1. Корреляция степени мукозита и уровней различных моносахаров в сыворотке у наблюдаемых больных. 1 — арабинитол, 2 — манноза, 3 — фруктоза, 4 — манноза+фруктоза, 5 — галактоза, 6 — маннитол; угол наклона кривых регрессии указывает на силу корреляционной связи; наибольший наклон имеют кривые, показывающие уровни маннозы и фруктозы, а также их суммарный уровень; наименьшая корреляционная связь отмечается между степенью мукозита и уровнями арабинитола и маннитола.

нем маннозы, а также суммарным уровнем маннозы и фруктозы сыворотки крови (табл. 2). Манноза является неотъемлемой частью маннанов клеточной стенки грибов рода *Candida* [6] и не участвует

Таблица 2

Корреляция между степенью мукозита и хроматографическими показателями, рассчитанная методом Kendall—Tau

Сравнительные показатели	Коэффициенты корреляции		p
	Kendall	Z	
Степень мукозита и арабинитол	-0,010722	-0,21064	0,833166
Степень мукозита и манноза	0,215879	4,24128	0,000022
Степень мукозита и фруктоза	0,216174	4,22225	0,000024
Степень мукозита и манноза+фруктоза	0,270424	5,31289	0,000000
Степень мукозита и галактоза	0,113349	2,22691	0,025953
Степень мукозита и маннитол	0,157970	3,10355	0,001912

в метаболизме макроорганизма. Таким образом, повышение уровня свободной маннозы в сыворотке крови может свидетельствовать о текущем кандидозном процессе. Учитывая то, что при ГХ манноза и фруктоза имеют близкое время удерживания на метилсиликоновой колонке, во избежание погрешности целесообразно оценивать не только уровень свободной маннозы, но и суммарный уровень маннозы и фруктозы.

Мы не отметили значимой корреляции между степенью мукозита и другими клиническими признаками и сывороточным уровнем популярного и распространенного в прошлом ГХ-маркера — арабинитола (p=0,83). Не отмечалось корреляции и между соотношением сывороточных уровней арабинитола и креатинина и клинических маркеров (p=0,92).

Более того, часто на высоте течения процесса и при наличии в крови повышенных уровней галактозы и маннозы уровень арабинитола оставался в пределах нормы, хотя в некоторых случаях фиксировались субнормальные пики концентрации арабинитола. Следует также отметить, что мы ни разу не отмечали повышения концентрации арабинитола у пациентов с нормально функционирующим костным мозгом, без лихорадки и без признаков мукозита. Не отмечалось значимого повышения суммарного уровня стереоизомеров арабинитола и в периоды активного течения микоза (табл. 3).

Таблица 3

Средние значения уровня арабинитола сыворотки крови у наблюдаемых больных

Группы больных	Арабинитол, мкг/мл
До развития ГИ (условно «здоровые»)	0,730±0,2496
До начала терапии ГИ	0,3581±0,0680
Терапия препаратом Фунгизон	1,044±0,2640
Терапия препаратом Амбизом	0,4750±0,1950

При определении уровня маннитола в сыворотке крови, являющегося маркером аспергиллезной инфекции, мы не обнаружили стойкого повышения данного показателя в серии проб у каждого исследуемого пациента. При этом мы не наблюдали и клинико-рентгенологических признаков инвазивного аспергиллеза ни у одного из исследуемой группы больных. У многих больных мы отмечали резкие спонтанные повышения уровня маннитола сыворотки, остававшиеся единичными и в серии проб в дальнейшем не повторявшиеся. Мы не отмечали при этом также никаких резких изменений в клиническом статусе больного, и лишь некоторые из этих пиков можно было связать с назначением содержащих маннитол препаратов. Это позволило сделать нам вывод о низкой специфичности маннитола при одновременном определении его уровня в сыворотке. Вместе с тем значение определения профиля маннитола, особенно для диагностики аспергиллезной инфекции, требует дальнейшего изучения.

При определении корреляции между степенью мукозита и уровнем галактозы сыворотки отмечалась меньшая, чем в случае с маннозой, однако также значимая сила связи ($p < 0,05$) (табл. 2).

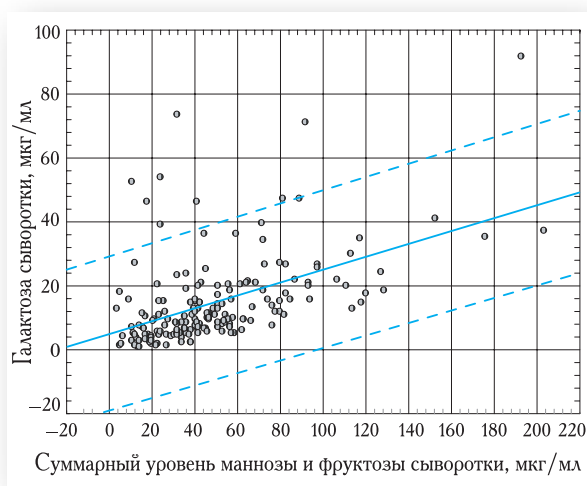


Рис. 2. Корреляция между уровнями маннозы и галактозы сыворотки крови ($p < 0,001$ по методу Kendall—Tau).

Корреляция между уровнями маннозы и галактозы была существенно более жесткой ($p < 0,001$) (рис. 2). Галактоза так же, как и манноза, входит в состав клеточной стенки гриба, однако при этом участвует в метаболизме макроорганизма. Этим можно объяснить более низкую силу связи ее уровня и степени мукозита. Замеченная взаимосвязь между уровнями галактозы и маннозы позволяет рекомендовать ее определение вместе с другими моносахарами, как вспомогательного маркера. Роль соотношения маннозы и галактозы требует дальнейшего изучения.

При определении парных корреляций ГХ-маркеров и температуры тела мы отметили гораздо более низкую силу связи между параметрами (табл. 4). Это можно объяснить тем, что температура тела является неспецифическим признаком инфекции в отличие от специфической картины мукозита. Однако следует заметить, что соотношения между коэффициентами корреляции были такими же,

Таблица 4

Корреляция между температурой тела и хроматографическими показателями, рассчитанная методом Kendall—Tau

Сравнительные показатели	Коэффициенты корреляции		p
	Kendall	Z	
Температура тела и арабинитол	0,098466	1,93452	0,053049
Температура тела и манноза	0,158134	3,10679	0,001891
Температура тела и фруктоза	0,101353	1,97959	0,047750
Температура тела и манноза+фруктоза	0,184255	3,61997	0,000295
Температура тела и галактоза	0,128729	2,52907	0,011436
Температура тела и маннитол	0,050936	1,00072	0,316964

как и в случае определения парных корреляций ГХ-маркеров и степени мукозита (табл. 2).

Аналогичные соотношения коэффициентов корреляции были выявлены и между ГХ-маркерами и степенью аплазии кроветворения (табл. 5). Сила связи и в этой группе оказалась меньшей. Действительно, глубина аплазии влияет на тяжесть ГИ опосредованно. Аплазия является одним из причинных факторов развития микоза, а не его проявлением. Следует также обратить внимание на более сильную корреляцию между степенью аплазии и уровнем галактозы, по сравнению с другими ГХ-маркерами и по сравнению с парными корреляция-

Таблица 5

Корреляция между степенью аплазии кроветворения и хроматографическими показателями, рассчитанная методом Kendall—Tau

Сравнительные показатели	Коэффициенты корреляции		p
	Kendall	Z	
Степень аплазии и арабинитол	0,001938	0,0375	0,970078
Степень аплазии и манноза	0,113374	2,1947	0,028184
Степень аплазии и фруктоза	0,036493	0,7022	0,482567
Степень аплазии и манноза+фруктоза	0,116017	2,2459	0,024712
Степень аплазии и галактоза	0,129841	2,5135	0,011954
Степень аплазии и маннитол	-0,107194	-2,0751	0,037980

ми уровня галактозы и степени мукозита и температуры тела.

Таким образом, можно отметить, что наибольшая корреляция степени мукозита и ГХ-показателей выявлялась при определении уровня маннозы, а наименьшая — с уровнем арабинитола. Были определены примерные нормативы сывороточных уровней актуальных моносахаров у детей до разви-

Таблица 6

Средние значения уровней свободных моносахаров сыворотки крови у наблюдаемых больных до развития ГИ

Показатели	Концентрация моносахаров, мкг/мл
Арабинитол	0,730±0,2496
Манноза	22,750±2,3450
Фруктоза	11,226±2,2130
Манноза + фруктоза	33,978±4,0526
Галактоза	12,817±3,8761
Маннитол	0,435±0,2503

тия ГИ (табл. 6). Исследование также показало, что метод позволяет проводить не только экспресс-диагностику и мониторинг микоза, но и оценивать адекватность проводимой терапии.

На рис. 3 представлены средние значения уровней маннозы сыворотки для 4 групп проб. 1-я группа была отобрана у клинически здоровых (от

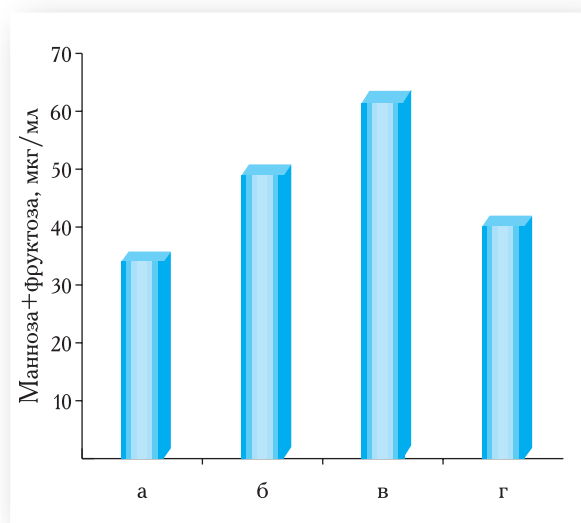


Рис. 3. Динамика суммарного уровня маннозы и фруктозы в сыворотке крови у наблюдаемых больных на фоне лечения микоза Фунгиноном и Амбизомом. а — «здоровые», б — до лечения, в — на фоне лечения Фунгиноном, г — на фоне лечения Амбизомом.

микоза) пациентов; 2-я группа — от больных с развившейся клинической картиной микоза, но до постановки диагноза и начала противогрибковой терапии; 3-я и 4-я группы — от детей, получавших терапию соответственно стандартным (Фунгизон) и липосомальным (Амбизом) амфотерицином В. Из рис. 3 видно, что после начала лечения уровень маннозы сыворотки существенно снижается. Следует также отметить, что в случае лечения

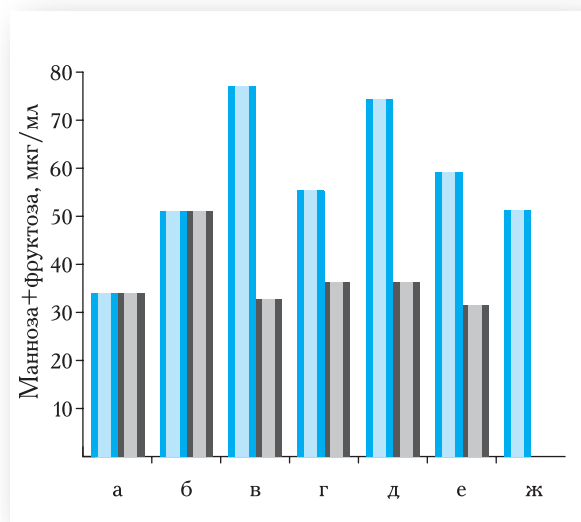


Рис. 4. Динамика суммарного уровня маннозы и фруктозы в сыворотке у наблюдаемых больных на фоне лечения различными препаратами Амфотерицина В. а — «здоровые», б — до лечения, в — 1—2-й день лечения, г — 3—4-й день лечения, д — 5—6-й день лечения, е — 7—10-й день лечения, ж — 11—21-й день лечения, 1-й столбик — Фунгизон, 2-й столбик — Амбизом.

**Г.О. Бронин, А.М. Дёмина, Т.А. Высоцкая, А.М. Тимаков, Л.В. Харазова, К.Л. Кондратчик,
В.А. Минаев, А.В. Пахомов, Д.Н. Балашов, В.В. Буянов**

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ
ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ ГРИБКОВОЙ ИНФЕКЦИИ**

ЛИТЕРАТУРА

1. Hennequin C. // Rev. Med. Interne. — 1996. — Vol. 17, № 9. — P. 754—760.
2. Шизон Ж. // Гематол. и трансфузиол. — 1998. — № 6. — С. 21—25.
3. Клясова Г/А. // Инфекции и антимикроб. тер. — 2002. — Т. 2, № 6. — С. 184—189.
4. Pappas P.G., Rex J.H., Lee J. et al. // Clin. Infect. Dis. — 2003. — Vol. 37, № 5. — P. 634—643.
5. Peman J., Canton E., Otero A. et al. // Rev. Iberoam. Micol. — 2002. — Vol. 19, № 1. — P. 30—35.
6. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Кандидоз: природа инфекции, механизмы агрессии и защиты, лабораторная диагностика, клиника и лечение. — М., 2000.
7. Pizzo P.A. // N. Engl. J. Med. — 1993. — Vol. 328, № 18. — P. 1323—1332.
8. Richardson M., Kokki M. // Brit. J. Haematol. — 1998. — Vol. 100. — p. 619—628.
9. Deray G., Mercadal L., Bagnis C. // Nephrologie. — 2002. — Vol. 23, № 3. — P. 119—122.
10. Costa S., Nucci M. // Curr. Opin. Crit. Care. — 2001. — Vol. 7, № 6. — P. 379—383.
11. Tiphine M., Letscher-Bru V., Herbrecht R. // Transpl. Infect. Dis. — 1999. — Vol. 1, № 4. — P. 73—83.
12. Miller G.G et al. // J. Clin. Invest. — 1974. — Vol. 54. — P. 1235—1240.
13. Monson T.S.P., Wilkinson K.P. // J. Clin. Microbiol. — 1981. — Vol. 14. — P. 557—562.
14. Lehtonen L., Rantala A., Oksman P. et al. // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. — 1993. — Vol. 12, № 5. — P. 330—335.
15. Дёмина А.М., Поздоровкина В.В., Радюшина Т.В. и др. // Антибиот. и химиотерапия. — 1994. — № 2—3. — С. 17—21.
16. Repentigny L., Kuykendall R.J., Reiss E. // J. Clin. Microbiol. — 1980. — Vol. 17. — P. 1166.
17. Malivan N. et al. // Arch. Pathol. Lab. Med. — 1984. — Vol. 108. — P. 108—111.
18. Kume H., Muramatsu H. // Rinsho Byori. — 1996. — Vol. 44, № 6. — P. 505—511.
19. Tokunaga S., Ohkawa M., Takashima M. et al. // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. — 1995. — Vol. 14, № 2. — P. 118—121.
20. Larsson L., Pehrson C., Wieb T., Christenson B. // J. Clin. Microbiol. — 1994. — Vol. 32. — P. 1855—1859.
21. Quong M.W., Miyada C.G., Switchenko A.C., Goodman T.C. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1993. — Vol. 196, № 3. — P. 1323—1329.
22. Eisen D.P., Bartley P.B., Hope W. et al. // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. — 2002. — Vol. 42, № 1. — P. 39—42.
23. Walsh T.J., Merz W.G., Lee J.W. et al. // Am. J. Med. — 1995. — Vol. 99, № 2. — P. 164—172.
24. Siegel S., Castellar N.J. Non-parametric statistics for the behavioral sciences — 2^d ed. — McGraw-Hill, NYC, 1988.
25. Glantz S.A. Primer of biostatistics. — 4th ed. — McGraw-Hill, NYC, 1994.