

# ОСОБЕННОСТИ АНТИФУНГАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ИНФЕКЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ: КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ ГРИБКОВОГО КЕРАТИТА И АНАЛИЗ ПРОФИЛЯ ПРОТИВОГРИБКОВОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С УЧЕТОМ ФОРМИРОВАНИЯ БИОПЛЕНОК

Р.И. Валиева<sup>1,2</sup>, С.А. Лисовская<sup>1,2</sup>, К.А. Маянская<sup>3</sup>, Д.В. Самигуллин<sup>4</sup>, Г.Ш. Исаева<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФБУН Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Казань, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия

<sup>3</sup> Офтальмологическая клиника «Глазная хирургия Расческов», г. Казань, Россия

<sup>4</sup> Казанский институт биохимии и биофизики, Казанский научный центр РАН, г. Казань, Россия

**Резюме.** Среди инфекционных болезней оппортунистические микозы занимают особое место. В литературе появляется все больше сведений о клинических и эпидемиологических аспектах инфекции, вызванных *Fusarium* spp. Частота встречаемости данной инфекции среди микробных кератитов в мире колеблется от 2 до 40% в зависимости от географического расположения страны. Колонизируя слизистые, грибы могут существовать не только в виде планктонных форм, но и, прикрепляясь к поверхности, образовывать биопленки, что приводит к возрастанию резистентности ко многим антифунгальным препаратам. В статье описан случай грибкового кератита, обусловленного грибами *Fusarium solani*, с определением профиля противогрибковой чувствительности выделенных штаммов грибов с учетом их способности к биопленкообразованию. В исследовании использовали культуру *F. solani*, выделенную от пациента, и тест-культуру *F. solani*, полученную из Всероссийской коллекции микроорганизмов. При определении чувствительности планктонных культур грибов к противогрибковым препаратам группы азолов (флуконазол, вориконазол), амфотерицина В и тербинафина выявлено, что выраженной противогрибковой активностью в отношении клинического штамма обладают антимикотики амфотерицин В и вориконазол, тогда как для планктонной культуры тест-штамма *F. solani* характерна более выраженная чувствительность ко всем группам препаратов. В связи с длительным прогрессирующим течением инфекционного процесса и высокой биопленкообразующей способностью клинического штамма *F. solani* исследована активность противогрибковых препаратов на клетки в составе биопленок, смоделированных *in vitro*. Показано, что в отношении биопленок показатели минимально ингибирующих кон-

## Адрес для переписки:

Валиева Рита Илнуровна  
420015, Россия, г. Казань, ул. Б. Красная, 67,  
ФБУН Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии.  
Тел.: 8 (927) 403-15-07.  
E-mail: valievarita@yandex.ru

## Contacts:

Rita I. Valieva  
420015, Russian Federation, Kazan, Bol'shaya Krasnaya str., 67,  
Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology.  
Phone: +7 (927) 403-15-07.  
E-mail: valievarita@yandex.ru

## Для цитирования:

Валиева Р.И., Лисовская С.А., Маянская К.А., Самигуллин Д.В., Исаева Г.Ш. Особенности антифунгальной терапии при длительном инфекционном процессе: клинический случай грибкового кератита и анализ профиля противогрибковой чувствительности с учетом формирования биопленок // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 4. С. 789–796. doi: 10.15789/2220-7619-FOA-1495

## Citation:

Valieva R.I., Lisovskaya S.A., Mayanskaya K.A., Samigullin D.V., Isaeva G. Sh. Features of antifungal therapy during long-lasting infectious process: a clinical case of fungal keratitis and profile of antifungal sensitivity based on assessing biofilm formation // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 4, pp. 789–796. doi: 10.15789/2220-7619-FOA-1495

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 200400247. Часть работы с применением конфокальной микроскопии проводилась в рамках исследований по госзаданию ФИЦ КазНЦ РАН (№ госрегистрации ААААА181180227900839).

This work was supported by Grant No. 200400247 of the Russian Foundation for Basic Research. Part of the work with the use of confocal microscopy was carried out within the framework of research on the state order of the Federal Research Center "Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences" (state registration No. ААААА181180227900839).

центраций превышают в 100 раз значения для планктонных культур. Проведен анализ механизмов действия противогрибковых препаратов на жизненную активность клеточных структур с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Окрашивание проводили с использованием пропидия йодида и акридина оранжевого в течение 15 мин для выявления различия между неповрежденной и поврежденной клеточной поверхностью гриба. Обнаружено, что в составе биопленки клетки сохраняли жизненную активность и под воздействием высоких концентраций веществ. Кроме того, несмотря на деструктивное воздействие значительных концентраций препарата на клеточную мембрану биопленки, ядра клеток оставались жизнеспособными. Необходимо учитывать наличие описанного в данной работе механизма резистентности у мицелиальных грибов и исследовать чувствительность биопленок к препаратам с целью оптимизации антимикотической терапии.

**Ключевые слова:** грибы *Fusarium*, грибковый кератит, инфекционный процесс, противогрибковые препараты, биопленка, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, пропидий йодид, акридин оранжевый.

## FEATURES OF ANTIFUNGAL THERAPY DURING LONG-LASTING INFECTIOUS PROCESS: A CLINICAL CASE OF FUNGAL KERATITIS AND PROFILE OF ANTIFUNGAL SENSITIVITY BASED ON ASSESSING BIOFILM FORMATION

Valieva R.I.<sup>a,b</sup>, Lisovskaya S.A.<sup>a,b</sup>, Mayanskaya K.A.<sup>c</sup>, Samigullin D.V.<sup>d</sup>, Isaeva G.Sh.<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russian Federation

<sup>b</sup> Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation

<sup>c</sup> Ophthalmological Clinic "Eye Surgery of Rascheskov", Kazan, Russian Federation

<sup>d</sup> Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center of RAS, Kazan, Russian Federation

**Abstract.** Among infectious diseases, opportunistic mycoses hold a special place. There has been accumulating a lot of evidence regarding the clinical and epidemiological aspects of infection caused by *Fusarium* spp., which global incidence rate among microbial keratitis ranges from 2 to 40% depending on the geographical location of the country. Colonizing mucous membranes, fungi can exist not only in the form of plankton, but form biofilms after surface attachment, which leads to elevated resistance to multiple antifungal agents. Here we describe a clinical case of fungal keratitis due to *Fusarium solani* by determining profile of the antifungal sensitivity for isolated fungal strains, by taking into account their potential for biofilm formation. We used an *F. solani* culture isolated from the patient as well as *F. solani* test culture obtained from the Russian National Collection of Microorganisms. While determining the sensitivity of fungal planktonic cultures to antifungal agents from the azole group (fluconazole, voriconazole), amphotericin B and terbinafine, it was revealed that antimycotics amphotericin B and voriconazole exerted a marked antifungal activity against clinical isolate, whereas the plankton *F. solani* test culture was more sensitive to all groups of antifungal agents. Due to a long-lasting progressive course of the infectious process and the high biofilm-forming ability of the clinical strain *F. solani*, the activity of antifungal agents on biofilm cells was modeled and examined *in vitro*. It was shown that regarding to the fungal biofilms, value of the minimally inhibitory concentration exceeded those for planktonic cultures by 100-fold. The mechanisms of action for antifungal agents on vital parameters of fungal cell structures were analyzed by using confocal laser scanning microscopy after staining samples with propidium iodide and acridine orange for 15 min to detect changes between intact and damaged cell surface. It was found that within the biofilm fungal cells preserved viability even after exposure to high concentrations of antifungals. In addition, despite the fungicidal drug activity at substantial concentrations acting on the biofilm cell membrane, the cell nuclei remained viable. Owing to the presence of the mechanism of resistance in mycelial fungi shown in the study, it is necessary to take into account and investigate characteristics of biofilms in terms of drug sensitivity that will allow to optimize a choice of antimicrobial therapy.

**Key words:** *Fusarium*, fungal keratitis, infectious process, antifungal agents, biofilm, confocal laser scanning microscopy, propidium iodide, acridine orange.

## Введение

Среди инфекционных болезней оппортунистические микозы занимают особое место, поскольку число условно-патогенных микромицетов значительно больше, чем истинных патогенов [35]. В литературе появляется все больше сведений о клинических и эпидемиологических аспектах инфекции, вызванных *Fusarium* spp. [10, 11, 14, 15, 16]. Грибковые кератиты, обусловленные данными микромицетами, регистрировались в основном в тропических и субтропических

странах, преимущественно в агропромышленных регионах, но в последнее время в связи с активным использованием контактных линз часто выявляются и в регионах с умеренным климатом, в том числе и в России [1, 2, 4, 17, 36]. Основным предрасполагающим фактором для кератитов данной этиологии является механическая травма глаза, чаще всего обусловленная длительным использованием мягких контактных линз [33, 35]. На поврежденной поверхности роговицы происходит инвазия грибов, в результате чего они могут проникать в нижележащие

слои, осложняя течение заболевания [10, 16]. К тому же имеются данные о том, что длительное использование антибиотиков и кортикостероидов способствует быстрой колонизации микромицетов на месте внедрения [13, 36].

Грибы рода *Fusarium* имеют выраженную устойчивость к большинству противогрибковых препаратов. По своей природе они устойчивы к эхинокандинам, у некоторых видов выявлены высокие значения минимально ингибирующей концентрации (МИК) для противогрибковых препаратов группы азолов [1, 36]. Необходимо учитывать тот факт, что грибы, колонизируя слизистые, могут существовать не только в виде планктонных форм, но и, прикрепляясь к поверхности, образовывать биопленки [3, 5]. Согласно данным Центра по контролю и профилактике заболеваний США (CDC), в период с 2005 по 2006 гг. было выявлено 318 случаев грибкового кератита, обусловленного *Fusarium* spp. [20]. Важно отметить, что на поверхности мягких контактных линз обследованных пациентов микромицеты образовали биопленки [33]. Способность к биопленкообразованию — один из основных механизмов, приводящих к возрастанию резистентности ко многим антифунгальным препаратам [6, 22].

В этой статье мы описываем клинический случай кератита, обусловленного *Fusarium solani*. Целью исследования является анализ профиля противогрибковой чувствительности штаммов грибов *in vitro* с оценкой их способности к биопленкообразованию.

## Материалы и методы

В исследовании использовалась культура *F. solani* (FSSC-17), выделенная от пациента, и тест-культура *F. solani* (F-819), полученная из Всероссийской коллекции микроорганизмов.

**Выделение культуры *F. solani* и условия роста.** Микропрепарат из содержимого передней камеры глаза пациента готовили с применением раствора, состоящего из 10%-ного раствора гидроксида калия (КОН), 400 мл/л диметилсульфоксида (DMSO), 600 мл/л 0,001% метиленового синего и дистиллированной воды. Препараты просматривали в световом и люминесцентном микроскопах. Отмечали наличие или отсутствие морфологических структур.

Исследуемый биоматериал культивировали на модифицированной среде Сабуро с давлением ципрофлаксоцина в количестве 50 ед/мл среды при температуре  $+30\pm 2^\circ\text{C}$  в течение 2–5 суток. Производили расчет численности клеток грибов в смыве с 1 тампона в 1 мл дистиллированной воды. Выделенные штаммы идентифицировали по основным микроскопическим и культуральным критериям [24], а также

по характеру протеомного профиля, который определяли с помощью MALDI-TOF масс-спектрометра MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Германия) [15].

**Формирование биопленок.** Конидиальную суспензию штаммов *F. solani*, выращенных на среде Сабуро, доводили до конечной концентрации  $1 \times 10^6$  конидии/мл в жидкой среде Сабуро. Затем по 200 мкл этой суспензии добавляли в каждую лунку 96-луночного полистирольного микротитровального планшета с плоским дном. Для получения зрелой биопленки суспензию инкубировали при  $30^\circ\text{C}$  в течение 5 суток. В лунки со сформированными биопленками добавляли 125 мкл водного раствора 1%-ного кристаллического фиолетового и инкубировали 20 мин при  $37^\circ\text{C}$ . Оптическую плотность регистрировали с использованием планшет-ридера (Biotek EL  $\times$  808, США) со светофильтром 620 нм. Каждый опыт проводили в 10 повторах.

**Определение чувствительности к противогрибковым препаратам.** Чувствительность планктонных культур и биопленок грибов к препаратам группы азолов (флуконазол, вориконазол), амфотерицину В и тербинафину *in vitro* проводили стандартным методом в микроразведениях по протоколам CLSIM38-A3 [12, 18]. Антимикотики добавляли к предварительно отмытым биопленкам методом серийных разведений в концентрации 1600–0,78 мкг/мл и инкубировали двое суток. Анализ механизмов действия противогрибковых препаратов на жизненную активность клеточных структур проводили с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (TCS SP5; Leica Microsystems, Германия) [9]. Образцы окрашивали с использованием пропидия йодида (PI — зеленый флуоресцентный) и акридина оранжевого (АО — зеленый флуоресцентный) в течение 15 мин для выявления различия между неповрежденной и поврежденной клеточной поверхностью гриба [26]. Максимум поглощения/испускания у PI, связанного с ДНК, — 538/617 нм, для АО — 502/525 нм. Максимум поглощения/испускания у АО, связанного с РНК, — 460/650 нм. Для контроля исследования оценивали рост и образование биопленок в отсутствии антимикотиков. Каждый опыт повторяли троекратно для уменьшения влияния случайных явлений на результат исследования.

## Описание клинического случая

Пациентка М., 1963 года рождения, обратилась в клинику на третий день заболевания с жалобами на ощущение инородного тела в левом глазу, слезотечение, светобоязнь. Из анамнеза выявлено, что за 2 дня до появления жалоб она купалась в лесном озере; ранее (2,5 недели назад) перенесла острый бактериальный кера-

тит и конъюнктивит обоих глаз; в связи с дефектами остроты зрения длительно носит мягкие контактные линзы. Пациентка самостоятельно начала лечение — закапывала в левый конъюнктивальный мешок капли «Комбинил» (антибактериальный препарат группы фторхинолонов) в течение нескольких дней, после чего состояние ухудшилось, затем обратилась к офтальмологу по месту жительства. По данным объективного осмотра были обнаружены поверхностные инфильтраты роговицы сероватобелого цвета в виде «пылинок», перикорнеальная инъекция (рис. 1, вклейка, с. IV). На фоне лечения левофлоксацином в виде инстилляций в конъюнктивальный мешок было отмечено значительное улучшение, однако через 2 недели сформировался серовато-желтоватый инфильтрат в форме диска, который очень быстро начал изъязвляться по краям в виде кольца.

Пациентка госпитализирована с предварительным диагнозом «острый кератоувеит», ей назначено местное консервативное лечение: ацикловир, офлоксацин, тобрамицин и системные препараты: внутривенное введение ацикловира и цефуросима. Выбранная тактика лечения оказалась неэффективной: сохранялись смешанная инъекция конъюнктивы, отек роговицы, складки десцеметовой оболочки, сероватый рыхлый округлый проминирующий инфильтрат с перифокальной поверхностной эрозией, гипопион, образовалась мацерация по верхнему веку. Результаты микробиологического анализа с поверхности конъюнктивы и роговицы, а также анализ крови на IgM вируса простого герпеса оказались отрицательными, после чего пациентке был проведен локальный кросслинкинг. Наблюдалась положительная динамика в виде остановки развития процесса и уменьшения размеров инфильтрата. Однако эффекта хватило ненадолго, процесс снова начал прогрессировать и распространяться по роговице.

Спустя месяц от начал заболевания пациентке была проведена глубокая послойная кератопластика (DALK). Уже через неделю при объективном осмотре было выявлено возникновение гипопиона и начало вторичной инфильтрации (рис. 2, вклейка, с. IV).

Через 2 недели пациентке была проведена сквозная кератопластика. В ходе операции выяснилось, что передняя камера полностью заполнена белой рыхлой массой, по типу смеси фибрина и продуктов жизнедеятельности грибов и самих грибов. Переднюю камеру очистили от этой массы, отделили ее от радужки, зрачка. Угол передней камеры также был запаян, его попытались распаковать и очистили от тягучей массы. Пересадка закончилась подшиванием трансплантата узловыми швами. Содержимое передней камеры глаза пациента было направ-

лено на микробиологическое исследование. До заключения микробиологической лаборатории назначено активное местное и системное лечение: инъекции 0,2% раствора амфотерицина В под конъюнктиву, массивные дозы антибактериальной (Сигницеф, Тобрекс) и гормональной противовоспалительной терапии внутривенно.

В результате исследования биоматериала, проведенного лабораторией микологии, был выявлен обильный рост грибов *F. solani* (FSSC) и определены *in vitro* МИК для противогрибковых препаратов, широко используемых для элиминации данных микромицет.

К этому моменту у пациента возник зрачковый блок, передние и задние синехии, хрусталик набухал, развилась офтальмогипертензия. В связи с этим было принято решение о проведении факоэмульсификации с имплантацией интраокулярной линзы и разделением всех спаек. В течение следующих двух недель, несмотря на антифунгальную местную и общую терапию, на новом трансплантате на границе «донор—реципиент» образовался инфильтрат, который также быстро распространился по всему трансплантату и лимбу. В связи с угрозой перфорации роговицы было принято решение о смене противогрибкового препарата и дозировки. Было начато активное местное и системное лечение вориконазолом (промывание передней камеры 5%-ным раствором вориконазола, приготовленным *ex tempore*, а также внутривенное введение вориконазола по 800 мкг/мл на два приема).

В ходе активного лечения произошло расплавление трансплантата и перфорация роговицы с тампонадой радужки. В течение суток пациентке была проведена urgentная пересадка роговично-склерального диска и задняя витректомия без поднятия внутренней пограничной мембраны (так как по В-сканированию намечались признаки витреита). Была продолжена терапия вориконазолом. Через 3 недели в соскобе с роговицы грибы *Fusarium* spp. или другие представители микробной флоры обнаружены не были.

На сегодняшний день прошло более 12 месяцев с момента последней пересадки (рис. 3, вклейка, с. IV). OS спокоен, признаков инфекции нет, признаков отторжения трансплантата также нет, эпителизация трансплантата произошла полностью.

## Результаты

В лаборатории микологии ФБУН Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии микроскопическим методом была проведена оценка окрашенного препарата содержимого передней камеры глаза пациента. Также выполнено прямое микроскопирование биоматериала в на-



тивном препарате, что позволило обнаружить микроморфологические особенности грибов (рис. 4, III обложка). На плотной среде Сабуро получен рост колоний микромицетов во всех пяти точках первичного посева (рис. 5, III обложка). Выросшие культуры нитчатых грибов по макро- и микроморфологическим признакам определены как *Fusarium* spp. и далее с помощью масс-спектрометра идентифицированы как *F. solani* (FSSC).

Оценка степени формирования биопленок исследуемых штаммов показала, что все штаммы грибов *F. solani* формируют биопленку. Проведенный анализ фаз формирования биопленок показал, что полное формирование и стабилизация биопленочных структур отмечается на 3 день инкубации и имеет существенные различия у изучаемых штаммов. Среднее значение оптической плотности биопленок у клинического штамма *F. solani*, выделенного из передней камеры глаза пациента, составило  $0,199 \pm 0,015$ , что существенно выше (в 1,5–3 раза), чем у тест-штамма *F. solani* ( $0,063 \pm 0,024$ ). Максимальные значения для исследуемой группы составили 0,317 оптических единиц для клинического штамма и 0,098 — для тест-культуры (табл. 1).

Минимальные подавляющие концентрации антимикотиков по отношению к планктонной культуре клинического штамма *F. solani* оказались высокими (табл. 2). Только в отношении амфотерицина В и вориконазола обнаружены низкие показатели МИК. Однако, несмотря на то что амфотерицин В и вориконазол проявляли антифунгальную активность к планктонным культурам, в отношении биопленок, сформированных на 96-луночных планшетах, показатели МИК были высокими (более 100 раз). Планктонная культура тест штамма *F. solani* обладала чувствительностью ко всем группам препаратов, кроме флуконазола, однако в составе биопленок МИК были низкими.

Анализ механизмов действия противогрибковых препаратов на жизненную активность клеточных структур показал, что в составе био-

пленок клетки сохраняли жизненную активность и под воздействием высоких концентраций веществ. Кроме того, несмотря на фунгицидную активность препарата в значительных концентрациях на клеточную мембрану биопленок грибов *F. solani*, ядра клеток оставались жизнеспособными (рис. 6, III обложка).

## Обсуждение

Кератиты, вызванные грибами рода *Fusarium*, ассоциированы с высокой распространенностью данных микромицетов в окружающей среде. Частота встречаемости данной инфекции среди микробных кератитов в мире колеблется от 2 до 40% в зависимости от географического расположения страны [34, 36]. В развивающихся странах с жарким влажным климатом грибковый кератит в основном связан с травмой глаза у работников сельского хозяйства, тогда как в странах с умеренным климатом ношение мягких контактных линз является предполагаемым фактором риска с частотой до 31,6% [16]. К тому же в ретроспективном анализе Wong T.Y. и соавт. было показано, что грибковый кератит, обусловленный *Fusarium* spp., с большей вероятностью приводит к перфорации роговицы, чем бактериальный кератит (OR = 5,86, 95%, ДИ, 2,06–16,69), и вызывает необратимые изменения [7].

В описанном клиническом случае симптомы заболевания у пациента появились после отдыха на озере, при тесном контакте с растительной лесной подстилкой, где могли находиться споры и микроконидии *Fusarium* spp., известные своей фитопатогенной активностью, широким ареалом обитания и высокой устойчивостью к воздействию неблагоприятных факторов [13]. На фоне недавно перенесенного острого бактериального кератита и конъюнктивита в комплексе с длительным использованием мягких контактных линз произошло повреждение поверхности роговицы, что послужило возможной причиной инвазии грибов в нижележащие слои, приводя к последующему некрозу тканей окружающей области. К тому же огромные воз-

**Таблица 1. Оптическая плотность биопленок, сформированных штаммами *F. solani*, M±SD**

Table 1. The optical density of biofilms formed by *F. solani* strains, M±SD

Культура Culture	Время инкубации, сутки Incubation time, days				
	1	2	3	4	5
<b>Клинический штамм FSSC-17</b> Clinical strain FSSC-17	0,056±0,001	0,116±0,018	0,225±0,015	0,281±0,018	0,317±0,013
<b>Тест-культура F-819</b> Test strain F-819	0,011±0,001	0,028±0,001	0,085±0,011	0,092±0,015	0,098±0,012

**Примечание.** Даны значения  $D_{620}$  (за вычетом фона) поглощения красителя в лунках микроплатели. Опыт проведен в 10 повторах.

Note.  $D_{620}$  values (background subtraction) for dye absorption in the microplate wells are shown. The experiment was conducted in 10 repeats.

**Таблица 2. Результаты чувствительности к противогрибковым препаратам штаммов *F. solani*, выращенных в состоянии планктонных клеток и в составе биопленок, мкг/мл**Table 2. Sensitivity to antifungal drugs in *F. solani* strains grown as plankton cells and within biofilm are shown, µg/ml

Противогрибковое средство Antifungal agent	Клинический штамм FSSC-17 Clinical strain FSSC-17		Тест-культура F-819 Test strain F-819	
	П-МИК P-MIC	Б-МИК B-MIC	П-МИК P-MIC	П-МИК B-MIC
<b>Амфотерицин В</b> Amphotericin B	2	1400	2	200
<b>Вориконазол</b> Voriconazole	8	800	4	100
<b>Тербинафин</b> Terbinafine	16	> 1600	4	100
<b>Флуконазол</b> Fluconazole	64	> 1600	32	50
<b>Итраконазол</b> Itraconazole	64	> 1600	6	50

**Примечание.** П-МИК — минимальная подавляющая концентрация у планктонных форм; Б-МИК — концентрация антимикотика, приводящая к снижению оптической плотности на 80% у биопленок.

Note. P-MIC — the minimum inhibitory concentration in plankton cultures; B-MIC — the concentration of antimicrobial agent resulting in decrease in optical 80% reduced biofilm density.

возможности, заложенные в геноме грибов *Fusarium* spp., — крайне высокая адгезивность микроколониий, наличие широкого спектра протеолитических ферментов, способность к быстрому росту — способствуют возникновению клинических симптомов и осложнений [10, 16, 19, 23]. Экспериментальным путем на лабораторных животных было выявлено, что грибы *Fusarium* индуцируют выработку провоспалительных и хемотаксических цитокинов в слизистые роговицы, что приводит к активации нейтрофилов, и стероидная и/или антибактериальная терапия вызывает нерегулируемый рост грибов и последующее разрушение роговицы [21, 33, 37]. В связи с этим использование антибактериального препарата широкого спектра действия на начальном этапе инфицирования могло привести к быстрой колонизации микромицетами роговицы глаза.

Прямое микроскопическое исследование с последующим культивированием образцов роговицы до сих пор остается золотым стандартом для диагностики грибов. Полученную культуру, идентифицированную нами как *F. solani*, исследовали на чувствительность к противогрибковым препаратам, широко применяемым в клинической практике. Известно, что *Fusarium* spp. имеют низкую чувствительность к антифунгальным препаратам, причем вид *F. solani* обладает наибольшей устойчивостью [25, 29, 31, 32]. В опытах на лабораторных животных доказано, что *F. solani* обладает большей вирулентной активностью и плохо поддается терапии в отличие от распространенных видов *F. oxysporum* и *F. verticillioides* [27, 28]. В нашем исследовании у амфотерицина В

обнаружены низкие показатели МПК к планктонным культурам как клинического штамма, так и тест-культуры *F. solani*. Несмотря на то, что этот препарат рекомендуется для лечения инфекций, вызванных грибами *Fusarium* spp., многие исследования, в том числе и на лабораторных животных, доказывают его низкую эффективность [16, 21]. В связи с высокой биопленкообразующей способностью клинического штамма *F. solani* — и длительным, прогрессирующим течением инфекционного процесса соответственно — нами было принято решение исследовать активность противогрибковых препаратов на биопленочных структурах, смоделированных *in vitro*. Показано, что образованная биопленка клинического штамма увеличивает резистентность к антифунгальным препаратам в 100 и более раз, что проявляется выраженной резистентностью ко всем видам препаратов. Самая низкая МПК была обнаружена у вориконазола. Данный препарат был эффективен во многих клинических случаях микозов, вызванных *Fusarium* spp. [8, 14, 30]. В связи с полученными данными было принято решение о местном и системном применении вориконазола как эффективного препарата для элиминации биопленочной грибковой флоры.

В результате проделанной работы было показано наличие у грибов *F. solani* ведущего фактора патогенности — биопленкообразования, позволяющего быстро адаптироваться к факторам агрессии макроорганизма. Используемый широкий арсенал антимикробных препаратов в клинической практике не только не уменьшает клинические проявления заболевания,

но и порождает новую проблему, связанную с формированием биопленочных структур и многочисленных микроконидий, что может повысить инвазивность и колонизационную активность гриба. Таким образом, характерная мультифакторная патогенность грибов *F. solani* и их высокая биопленкообразующая способность могут стать поводом к пересмотру клинических рекомендаций по оценке противогрибковой активности препаратов.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

## Благодарности

Авторы благодарят ЦКП-САЦ ФИЦ КазНЦ РАН за техническую поддержку проведенных исследований.

## Список литературы/References

1. Астахов Ю.С., Скрыбина Е.В., Коненкова Я.С., Касымов Ф.О., Богомолова Т.С., Пинегина О.Н. Диагностика и лечение грибковых кератитов // Офтальмологические ведомости. 2013. Т. 6, № 2. С. 75–80. [Astakhov Yu.S., Scriabin E.V., Konenkova Y.S., Kasymov F.O., Bogomolova T.S., Pinegin O.N. Diagnosis and treatment of fungal keratitis. *Oftalmologicheskie vedomosti = Ophthalmology Journal*, 2013, vol. 6, no. 2, pp. 75–80. (In Russ.)] doi: 10.17816/OV11363-73
2. Делягин В.М., Мельникова М.Б., Першин Б.С., Серик Г.И., Джандарова Д.Т. Грибковые поражения глаз (диагностика, лечение) // Практическая медицина. 2015. Т. 1. С. 100–105. [Delyagin V.M., Melnikova M.B., Pershin B.S., Serik G.I., Dzhandarova D.T. Fungal eye lesions (diagnosis, treatment). *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*, 2015, vol. 1, pp. 100–105. (In Russ.)]
3. Мальцев С.В., Мансурова Г.Ш. Что такое биопленка? // Практическая медицина. 2011. Т. 5. С. 7–11. [Maltsev S.V., Mansurova G.Sh. What is a biofilm? *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*, 2011, vol. 5, pp. 7–11. (In Russ.)] doi: 10.21292/2075-1230-2016-94-8-48-53
4. Полтанова Т.И., Белоусова Н.Ю. Рецидив грибкового кератита в роговичном трансплантате // Казанский медицинский журнал. 2018. Т. 99, № 1. С. 148–150. [Poltanova T.I., Belousova N.Yu. Relapse of fungal keratitis in the corneal graft. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*, 2018, vol. 99, no. 1, pp. 148–150. (In Russ.)] doi: 10.17816/KMJ2018-148
5. Рахматулина М.Р., Нечаева И.А. Биопленки микроорганизмов и их роль в формировании резистентности к антибактериальным препаратам // Вестник дерматологии и венерологии. 2015. Т. 91, № 2. С. 58–62. [Rakhmatulin M.R., Nechaev I.A. Biofilms of microorganisms and their role in the formation of resistance to antibacterial drugs. *Vestnik dermatologii i venerologii = Bulletin of Dermatology and Venereologists*, 2015, vol. 91, no. 2, pp. 58–62. (In Russ.)] doi: 10.25208/0042-4609-2015-91-2-58-62
6. Шварц Т.А. Биопленки как микробное сообщество // Вестник КГУ. 2015. № 1. С. 41–44. [Schwartz T.A. Biofilms as a microbial community. *Vestnik KGU = Bulletin of KSU*, 2015, no. 1, pp. 41–44. (In Russ.)]
7. Ansari Z., Miller D., Galor A. Current thoughts in fungal keratitis: diagnosis and treatment. *Curr. Fungal Infect. Rep.*, 2013, vol. 7, no. 3, pp. 209–218. doi: 10.1007/s12281-013-0150-110.1007/s12281-013-0150-1
8. Aoun M. Voriconazole: a new weapon against invasive fungal infections. *Rev. Med. Brux.*, 2004, vol. 25, no. 3, pp. 166–171.
9. Bayguinov P.O., Oakley D.M., Shih C.C., Geanon D.J., Joens M.S., Fitzpatrick J.A.J. Modern laser scanning confocal microscopy. *Curr. Protoc. Cytom.*, 2018, vol. 85, no. 1, pp. 39–45. doi: 10.1002/cpsc.39
10. Bigley V.H., Duarte R.F., Gosling R.D., Kibbler C.C., Seaton S., Potter M. Fusarium dimerum infection in a stem cell transplant recipient treated successfully with voriconazole. *Bone Marrow Transplant.*, 2004, vol. 3, no. 9, pp. 815–817. doi: 10.1038/sj.bmt.1704660
11. Bograd A., Seiler T., Droz S., Zimmerli S., Früh B., Tappeiner C. Bacterial and fungal keratitis: a retrospective analysis at a university hospital in Switzerland. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.*, 2019, vol. 236, no. 4, pp. 358–365. doi: 10.1055/a-0774-7756
12. CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. 3<sup>rd</sup> ed. *Pennsylvania: CLSI*, 2017. 63 p.
13. Coleman J.J. The Fusarium solani species complex: ubiquitous pathogens of agricultural importance. *Mol. Plant. Pathol.*, 2016, vol. 17, no. 2, pp. 146–158. doi: 10.1111/mp.12289
14. Consigny S., Dhedin N., Detry A., Choquet S., Leblond V., Chosidow O. Successful voriconazole treatment of disseminated fusarium infection in an immunocompromised patient. *Clin. Infect. Dis.*, 2003, vol. 37, no. 2, pp. 311–313. doi: 10.1086/375842
15. De Carolis E., Posteraro B., Lass-Flörl C., Tortorano A.M., Sanguinetti G., Fadda M. Species identification of Aspergillus, Fusarium and Mucorales with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2012, vol. 18, no. 5, pp. 475–484. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03599.x
16. Dignani M.C., Anaissie E. Human fusariosis. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2004, vol. 10, no. 1, pp. 67–75. doi: 10.1111/j.1470-9465.2004.00845.x
17. Dóczy I., Gyetvai T., Kredics L., Nagy E. Involvement of Fusarium spp. in fungal keratitis. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2004, vol. 10, no. 9, pp. 773–776. doi: 10.1111/j.1469-0691.2004.00909.x
18. Espinel-Ingroff A., Colombo A.L., Cordoba S. International evaluation of MIC distributions and epidemiological cutoff value (ECV) definitions for Fusarium species identified by molecular methods for the CLSI broth microdilution method. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2015, vol. 60, no. 2, pp. 1079–1084. doi: 10.1128/AAC.02456-15
19. Fernandes M., Vira D., Dey M., Tanzin T., Kumar N., Sharma S. Comparison between polymicrobial and fungal keratitis: clinical features, risk factors, and outcome. *Amer. J. Ophthalmol.*, 2015, vol. 160, no. 5, pp. 873–881. doi: 10.1016/j.ajo.2015.07.028
20. Chang D.C., Grant G.B., O'Donnell K., Wannemuehler K.A., Noble-Wang J., Rao C.Y., Jacobson L.M., Crowell C.S., Sneed R.S., Lewis F.M., Schaffzin J.K., Kainer M.A., Genese C.A., Alfonso E.C., Jones D.B., Srinivasan A., Fridkin S.K., Park B.J. Multistate outbreak of Fusarium keratitis associated with use of a contact lens solution. *JAMA*, 2006, vol. 296, no. 8, pp. 953–963. doi: 10.1001/jama.296.8.953

21. Guarro J., Pujol I., Mayayo E. In vitro and in vivo experimental activities of antifungal agents against *Fusarium solani*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999, vol. 43, no. 5, pp. 1256–1257. doi: 10.1128/AAC.43.5.1256
22. Gupta A.K., Foley K.A. Evidence for biofilms in onychomycosis. *Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia*, 2019, vol. 154, no. 1, pp. 50–55. doi: 10.23736/S0392-0488.18.06001-7
23. Homa M., Galgóczy L., Manikandan P., Narendran V., Sinka R., Csernetics A., Vágvölgyi C., Kredics L., Papp T. South Indian isolates of the *Fusarium solani* species complex from clinical and environmental samples: identification, antifungal susceptibilities, and virulence. *Front. Microbiol.*, 2018, vol. 9: 1052. doi: 10.3389/fmicb.2018.01052
24. Hoog G.S., Guarro J., Gene J., Figueras M.J. Atlas of Clinical Fungi. 2<sup>nd</sup> edition. *Centraalbureau voor Schimmelcultures, Universitat Rovira i Virgili*, 2000. 1126 p.
25. Lewis R.E., Wiederhold N.P., Klepser M.E. In vitro pharmacodynamics of amphotericin B, itraconazole, and voriconazole against *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Scedosporium* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, vol. 49, no. 3, pp. 945–951. doi: 10.1128/AAC.49.3.945-951.2005
26. Mascotti K., McCullough J., Burger S.R. HPC Viability Measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. *Transfusion*, 2000, vol. 40, no. 6, pp. 693–696. doi: 10.1046/j.1537-2995.2000.40060693.x
27. Mayayo E., Pujol I., Guarro J. Experimental pathogenicity of four opportunist *Fusarium* species in a murine model. *J. Med. Microbiol.*, 1999, vol. 48, no. 4, pp. 363–366.
28. Ortoneda M., Capilla J., Pastor F.J., Pujol I., Guarro J. Efficacy of liposomal amphotericin B in treatment of systemic murine fusariosis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, vol. 46, no. 7, pp. 2273–2275. doi: 10.1128/AAC.46.7.2273-2275.2002
29. Paphitou N.I., Ostrosky-Zeichner L., Paetznick V.L., Rodriguez J.R., Chen E., Rex J.H. In vitro activities of investigational triazoles against *Fusarium* species: effects of inoculum size and incubation time on broth microdilution susceptibility test results. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, vol. 46, no. 10, pp. 3298–3300. doi: 10.1128/AAC.46.10.3298-3300.2002
30. Perfect J.R., Marr K.A., Walsh T.J., Greenberg R.N., DuPont B., de la Torre-Cisneros J., Just-Nübling G., Schlamme H.T., Lutsar I., Espinel-Ingroff A., Johnson E. Voriconazole treatment for less-common, emerging, or refractory fungal infections. *Clin. Infect. Dis.*, 2003, vol. 36, no. 9, pp. 1122–1131. doi: 10.1086/374557
31. Pujol I., Guarro J., Gené J., Sala J. In-vitro antifungal susceptibility of clinical and environmental *Fusarium* spp. strains. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1997, vol. 39, no. 2, pp. 163–167. doi: 10.1093/jac/39.2.163
32. Sabatelli F., Patel R., Mann P.A., Mendrick C.A., Norris C.C., Hare R., Loebenberg D., Black T.A., McNicholas P.M. In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006, vol. 50, no. 6, pp. 2009–2015. doi: 10.1128/AAC.00163-06
33. Tarabishy A.B., Aldabagh B., Sun Y. MyD88 regulation of *Fusarium* keratitis is dependent on TLR4 and IL-1R1 but not TLR2. *J. Immunol.*, 2008, vol. 181, no. 1, pp. 593–600. doi: 10.4049/jimmunol.181.1.593
34. Thomas P.A., Kaliyamurthy J. Mycotic keratitis: epidemiology, diagnosis and management. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2013, vol. 19, no. 3, pp. 210–220. doi: 10.1111/1469-0691.12126
35. Van Burik J.A., Magee P.T. Aspects of fungal pathogenesis in humans. *Ann. Rev. Microbiol.*, 2001, vol. 55, pp. 743–772. doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.743
36. Walther G., Stasch S., Kaerger K., Hamprecht A., Roth M., Cornely O.A., Geerling G., Mackenzie C.R., Kurzai O. *Fusarium* Keratitis in Germany. *J. Clin. Microbiol.*, 2017, vol. 55, no. 10, pp. 2983–2995. doi: 10.1128/JCM.00649-17
37. Wu T.G., Keasler V., Mitchell B.M., Wilhelmus K.R. Immunosuppression affects the severity of experimental *Fusarium solani* keratitis. *J. Infect. Dis.*, 2004, vol. 190, pp. 192–198. doi: 10.1086/421300

**Авторы:**

**Валиева Р.И.**, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии ФБУН Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии, г. Казань, Россия; ассистент кафедры микробиологии им. академика В.М. Аристовского ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия;

**Лисовская С.А.**, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории микологии, ФБУН Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии, г. Казань, Россия; доцент кафедры микробиологии им. академика В.М. Аристовского ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия;

**Маянская К.А.**, врач-офтальмолог, офтальмологическая клиника «Глазная хирургия Расческов», г. Казань, Россия;

**Самигуллин Д.В.**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории биофизики синаптических процессов, Казанский институт биохимии и биофизики, Казанский научный центр РАН, г. Казань, Россия;

**Исаева Г.Ш.**, д.м.н., профессор, зам. директора ФБУН Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии, г. Казань, Россия; зав. кафедрой микробиологии им. академика В.М. Аристовского ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия.

**Authors:**

**Valieva R.I.**, Junior Researcher, Laboratory of Microbiology, Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russian Federation; Assistant Professor, V.M. Aristovskiy Department of Microbiology, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation;

**Lisovskaya S.A.**, PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Microbiology, Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russian Federation; Associate Professor, V.M. Aristovskiy Department of Microbiology, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation;

**Mayanskaya K.A.**, Ophthalmologist, Ophthalmological Clinic "Eye Surgery of Rascheskov", Kazan, Russian Federation;

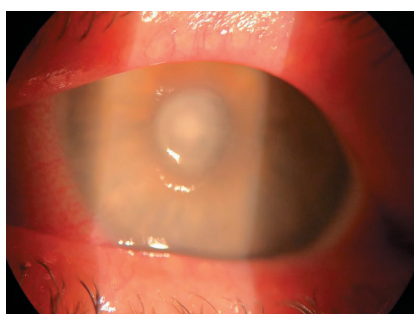
**Samigullin D.V.**, PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Biophysics of Synaptic Processes, Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of RAS, Kazan, Russian Federation;

**Isaeva G.Sh.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director of the Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russian Federation; Head of the V.M. Aristovskiy Department of Microbiology, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation.



**Иллюстрации к статье «Особенности антифунгальной терапии при длительном инфекционном процессе: клинический случай грибкового кератита и анализ профиля противогрибковой чувствительности с учетом формирования биопленок» (авторы: Р.И. Валиева, С.А. Лисовская, К.А. Маянская, Д.В. Самигуллин, Г.Ш. Исаева) (с. 789–796)**

Illustrations for the article “Features of antifungal therapy during long-lasting infectious process: a clinical case of fungal keratitis and profile of antifungal sensitivity based on assessing biofilm formation” (authors: Valieva R.I., Lisovskaya S.A., Mayanskaya K.A., Samigullin D.V., Isaeva G.Sh.) (pp. 789–796)



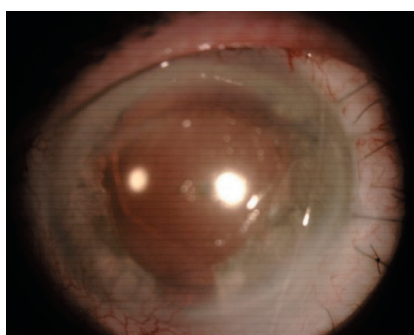
**Рисунок 1. Первичные проявления заболевания. Наблюдаются симптомы переднего увеита в виде гипопиона. Микроскопия щелевой лампой HS-5000**

Figure 1. Primary disease manifestations. Symptoms of anterior uveitis in the form of hypopyon are observed. HS-5000 Slit Lamp Microscopy



**Рисунок 2. Состояние спустя неделю после первой глубокой послойной кератопластики. Скопление гноя и выпадение фибрина в передней камере глазного яблока, начало вторичной инфильтрации на границе «донор–реципиент». Микроскопия щелевой лампой HS-5000**

Figure 2. A state of fungal keratitis one week after conducting the first deep layer keratoplasty. Pus accumulation and loss of fibrin in the anterior chamber of the eyeball, onset of the secondary infiltration at the “donor–recipient” border. HS-5000 Slit Lamp Microscopy

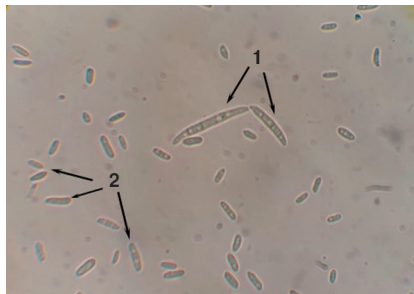


**Рисунок 3. Состояние спустя более 9 месяцев после пересадки роговично-склерального диска. Отсутствуют признаки отторжения трансплантата, полная эпителизация трансплантата. Микроскопия щелевой лампой HS-5000**

Figure 3. A state of fungal keratitis more than 9 months after conducting transplantation of the corneal scleral disk. No signs of transplant rejection are observed, with full transplant epithelization. HS-5000 Slit Lamp Microscopy

**Иллюстрации к статье «Особенности антифунгальной терапии при длительном инфекционном процессе: клинический случай грибкового кератита и анализ профиля противогрибковой чувствительности с учетом формирования биопленок» (авторы: Р.И. Валиева, С.А. Лисовская, К.А. Маянская, Д.В. Самигуллин, Г.Ш. Исаева) (с. 789–796)**

Illustrations for the article "Features of antifungal therapy during long-lasting infectious process: a clinical case of fungal keratitis and profile of antifungal sensitivity based on assessing biofilm formation" (authors: Valieva R.I., Lisovskaya S.A., Mayanskaya K.A., Samigullin D.V., Isaeva G.Sh.) (pp. 789–796)



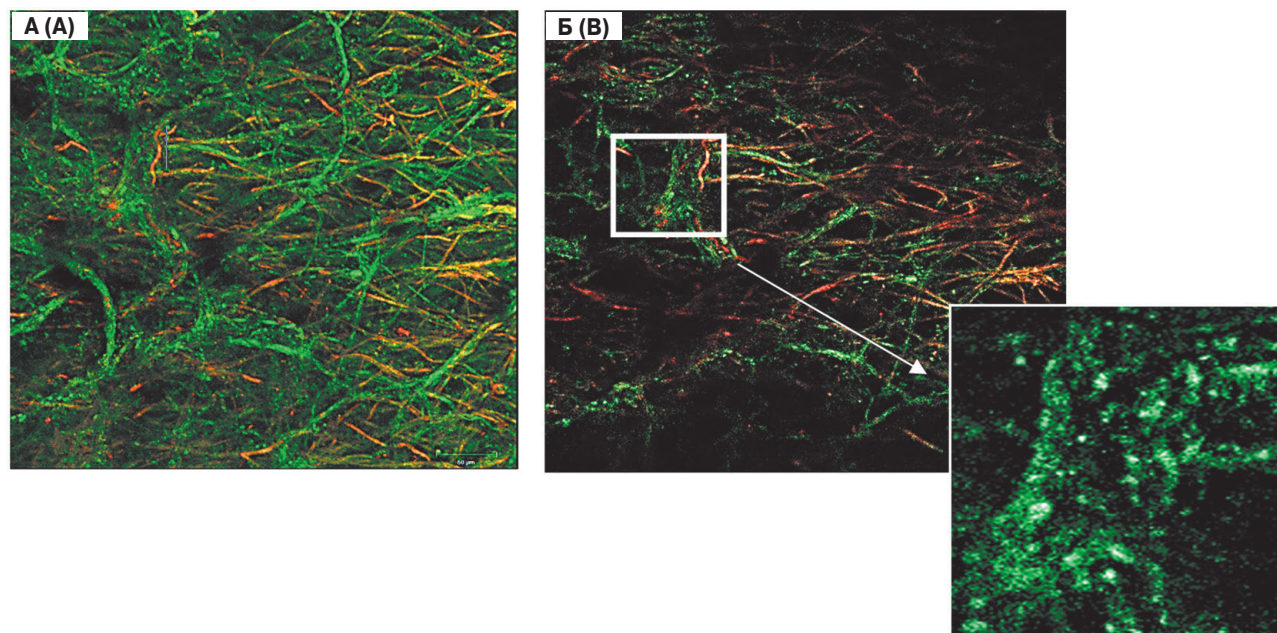
**Рисунок 4. Содержимое передней камеры глаза пациента. Обнаружены изогнутые тонкостенные макроконидии (1) и многочленные булавовидные микроконидии (2) с поперечными перегородками и зернистой поверхностью. Нативный препарат, увеличение 20×40**

Figure 4. Contents of the patient eye anterior chamber. Thin-walled curved macroconidia (1) and multiple oval microconidia (2) with transverse septa and a granular surface were found. Native sample, magnification 20×40



**Рисунок 5. Клинический штамм *F. solani*, выращенный на модифицированной среде Сабуро при температуре +30°C в течение 3 суток. Колонии хлопьевидные, обильный воздушный мицелий белого цвета; кремовая пигментация реверса**

Figure 5. *F. solani* clinical strain grown on a modified Saburo medium, at +30°C, for 3 days. Flaky colonies, abundant air mycelium of white color; cream pigmentation of the reverse are observed



**Рисунок 6. Архитектура 5-дневной биопленки клинического штамма *F. solani***

Figure 6. Architecture of a 5-day biofilm for a *F. solani* clinical strain

А — контроль, рост биопленки на среде Сабуро без добавления антимикробных препаратов; Б — после воздействия вориконазола в концентрации 400 мкг/мл. Стрелкой показаны жизнеспособные ядра. Окрашивание красителями PI (красный флуоресцентный) и АО (зеленый флуоресцентный). Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия Carl Zeiss LSM 780 (Carl Zeiss, Германия).

A — control, biofilm growth on Saburo medium added with no antimicrobial agents; B — after exposure to voriconazole at a concentration of 400 µg/ml. The arrow indicates at viable nuclei. Stained with PI (red fluorescent) and AO (green fluorescent). Confocal laser scanning microscopy Carl Zeiss LSM 780 (Carl Zeiss, Germany).