На правах рукописи

БАННИКОВ
Сергей Анатольевич

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ДИАГНОСТИКИ НЕИНВАЗИВНЫХ МИКОЗОВ ОКОЛОНОСОВЫХ ПАЗУХ

14.01.03 – болезни уха, горла и носа

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург
2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном военном образовательном учреждении высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук доцент **Миронов Василий Геннадьевич**

Официальные оппоненты:

Пискунов Геннадий Захарович - Заслуженный врач РФ, Заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН, профессор кафедры оториноларингологии ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного последипломного образования» Министерства Здравоохранения Российской федерации.

Рязанцев Сергей Валентинович – доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научно-координационной работе ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт уха, горла, носа и речи» Министерства Здравоохранения Российской федерации.

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства Здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «21» сентября 2020г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета Д 215.002.09 на базе ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации (194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6).

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке и на сайте ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации.

Автореферат разослан «___» _____ 2020г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук профессор С.В. Чурашов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. За последнее десятилетие микозы стали важнейшей клинической проблемой (Багирова Н.С., 2013; Beule A., 2016; Еремеева К.В., 2016; Comacle P., 2016).

Все более и более увеличивается количество пациентов с высоким риском развития грибковых заболеваний. Это происходит из-за стремительного развития медицинских технологий (цитостатической и иммуносупрессивной терапии и других отраслей, приводящих к иммуносупрессии), необоснованного применения антибактериальных препаратов широкого спектра действия и увеличения количества больных с персистирующей вирусной инфекцией, в том числе и пациентов с ВИЧ – инфекцией (Крюков А.И., Кунельская В.Я., Шадрин Г.Б., 2011; Редько Д.Д., Шляга И.Д., 2012; Denning D.W., Chakrabarti A., 2017).

Прогресс в микологии, серологии, гистопатологии и радиологии улучшил диагностику грибкового поражения полости носа и околоносовых пазух (Бойко Н.В. 2018).Вместе с тем, проведенные в нашей стране и за рубежом клинические исследования показали реальное увеличение случаев заболеваемости синуситами грибковой этиологии (Морозова О.В., 2015).

В связи с вероятностью недоступной локализации процесса лабораторное подтверждение неинвазивного микоза околоносовых пазух (ОНП) будет затруднен или даже невозможен. Кроме того, клинические признаки поражения микозом не являются специфичными. В связи с указанными выше причинами наблюдается частое возникновение трудностей с диагностикой данного заболевания (Mohammadi A., 2017).Серологические методы диагностики разработаны лишь для немногих микозов. Всё вышесказанное объясняет и достаточно широкий разброс показателей частоты грибкового поражения ОНП, а именно от 7-14% (Кунельская В.Я., Мачулин А.И., Щадрин Г.Б., 2008) до 56% по данным различных авторов (Мустафаев Д.М., 2007).

Вышеизложенные данные позволили определить цель и основные задачи данного исследования.

Степень разработанности темы исследования. И хотя эпидемиологические данные о грибковых синуситах в публикациях зарубежных и российских авторов довольно различаются (Кунельская В.Я., Мачулин А.И., Щадрин Г.Б., 2008; Нестерова К.И., 2010), нельзя спорить о том, что распространенность грибковых синуситов однозначно выросла за

последние десять лет и имеет тенденцию к продолжению своего роста (Бойко Н.В. 2015; Морозова О.В., 2015). Благодаря внедрению эндоскопических методов, компьютерной и магнитно-резонансной томографии в ринологическую практику отмечено возрастание этиологической роли грибов в развитии воспалительных заболеваний носа и околоносовых пазух, что, по всей вероятности, объясняется улучшением диагностики данной патологии. Однако многие вопросы диагностики, лечебной тактики и профилактики рецидивов грибковых заболеваний остаются неразрешенными.

Цель исследования. Повышение качества диагностики неинвазивных грибковых синуситов на основании анализа данных клинических и лабораторных исследований грибковых тел околоносовых пазух.

Задачи:

1. Изучить особенности клинических проявлений грибковых тел и частоту бессимптомных форм грибковых поражений околоносовых пазух.
2. Провести сравнение чувствительности и специфичности микроскопических, микробиологических и патоморфологических методов диагностики грибковых заболеваний околоносовых пазух.
3. Определить возможности повышения диагностической чувствительности методов, применяемых для выявления грибковых тел в околоносовых пазухах.
4. Изучить частоту присутствия сопутствующей бактериальной микрофлоры при неинвазивных микозах околоносовых пазух и характер взаимодействия ее с грибковой флорой.
5. Проанализировать частоту подтверждения клинического диагноза неинвазивный микоз околоносовых пазух при лабораторных исследованиях операционного материала.

Научная новизна.

Изучена частота бессимптомных форм неинвазивного грибкового поражения околоносовых пазух.

Впервые дан сравнительный анализ чувствительности и специфичности различных методов исследования, применяемых для диагностики грибковых тел.

Определены пути повышения диагностической чувствительности используемых методов исследования для выявления грибковых тел.

Впервые изучено взаимовлияние компонентов грибково-бактериальной ассоциации при поражении околоносовых пазух.

Доказана целесообразность выделения понятия «бактериальное тело», как отдельной формы поражения околоносовых пазух.

Впервые определен видовой состав микрофлоры при бактериальных телах околоносовых пазух.

В соавторстве получен Патент РФ на полезную модель № 185778 «Инструмент для удаления мицетомы из верхнечелюстной пазухи», заявка № 2018121688. Дата государственной регистрации 18.12.2018 года.

Практическая и теоретическая значимость. На основании сравнительного анализа чувствительности и специфичности различных методов исследования, определены наиболее значимые из них для идентификации грибкового синусита (грибкового тела пазухи). Указано на достаточно большой процент выявления бактериальных тел при исследовании бесструктурных масс из околоносовых пазух, полученных при хирургическом лечении, которые не требуют применения антимикотических препаратов в послеоперационном периоде. Предложен новый инструмент для облегчения удаления грибковых тел из околоносовых пазух.

Методология и методы исследования. Методология, использованная в данной диссертационной работе, основывается на современных принципах научного познания. Был проведен тщательный последовательный, интегративный, проблемный и структурный анализ полученных в ходе исследования результатов. Проделанная работа реализована в дизайне долгосрочного исследования, с использованием статистического анализа, общеклинических, лабораторных и инструментальных методов исследования.

Источники и глубина проработки. Поиск информационных материалов по теме данного научного исследования проведен глубиной до 15 лет по публикациям отечественных и зарубежных авторов хранящихся в электронных базах данных библиотеки РостГМУ, а также полученным в реферативных сборниках PubMed (www.pubmed.com), на сайте Российской государственной библиотеки (www.rsl.ru; www.medline.ru; www.elibary.ru), на сайте www.cyberleninka.ru и других баз данных. Всего проработано более 800 источников отечественных и зарубежных авторов (20% из которых представлено в списке литературы).

Внедрение результатов научно-исследовательской работы в практику. Результаты исследования используются в последипломном образовании клинических ординаторов, слушателей ФРМС и слушателей ФДПДО ВМедА им. С.М. Кирова. МО РФ. Материалы данной работы внедрены в учебный процесс студенческого стационара и ФПК ППС кафедры болезней уха, горла, носа ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России при чтении лекций и проведении практических занятий. Результаты работы внедрены в практическую медицину ЛОР отделения ГАУ РО ОКДЦ г.

Ростова-на-Дону, ЛОР отделений ГБУ РО Ростовской областной клинической больницы №1 г. Ростова-на-Дону, МБУЗ Городской больницы № 1 им. Н.А. Семашко г Ростова-на-Дону, МБУЗ Центральной городской больницы г. Азова.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Клинические проявления неинвазивных микозов с грибковыми телами ОНП неспецифичны и проявляются клиникой хронических риносинуситов соответствующей локализации.
2. Патоморфологическое исследование удаленного во время хирургического вмешательства материала и микроскопия препаратов с окраской калькофлюором белым являются наиболее чувствительными методами диагностики неинвазивных микозов ОНП.
3. Одним из факторов, обусловливающим низкую высеваемость грибов, является тормозящее влияние сопутствующей бактериальной микрофлоры –Pseudomonas aeruginosa.
4. Наличие бесструктурных масс в синусах характерно не только для неинвазивного микоза ОНП, но и для синусита, вызванного бактериальной микрофлорой.

Апробация работы. Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на заседаниях научного общества, научно-практических конференциях, конгрессах, форумах: Международной научно-практической конференции «Оториноларингология-Хирургия головы и шеи» (Казахстан, Астана, 2011), заседании Ростовского отделения Всероссийского научного общества оториноларингологов (Ростов-на-Дону, 2011, 2012, 2017, 2018), Всероссийской конференции «Прикладная фундаментальная наука - российской оториноларингологии» (Санкт-Петербург, 2011), VII Петербургском международном форуме оториноларингологов России (Санкт-Петербург, 2018), XXX международной конференции молодых ученых оториноларингологов (Санкт-Петербург, 2018), Ежегодной конференции Российского общества ринологов (Санкт-Петербург, 2018), II Всероссийском конгрессе Национальной медицинской ассоциации оториноларингологов России (Сочи, 2018).

Степень достоверности результатов. Достоверность работы диссертационного исследования подтверждается объемом наблюдений. Проведено ретроспективное исследование с участием 168 пациентов. Всем пациентам выполнено комплексное клиническое, отоларингологическое и иммунологическое, лабораторное и инструментальное обследование, а также хирургическое лечение.

Публикации по результатам исследования. По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ в центральной специализированной печати, из них 6 - в рецензируемых журналах, регламентированных перечнем Высшей Аттестационной Комиссии Министерства образования и науки Правительства Российской Федерации. В соавторстве получен Патент РФ на полезную модель № 185778 «Инструмент для удаления мицетомы из верхнечелюстной пазухи», заявка № 2018121688. Дата государственной регистрации 18.12.2018 года.

Личный вклад автора в исследование. С целью совершенствования диагностики неинвазивных микозов ОНП (грибковых тел), диссертант стал основным инициатором данных поисковых исследований. Обследование и лечение значительного количества пациентов, было проведено диссертантом лично, в том числе и выполнение хирургических вмешательств по поводу грибковых тел ОНП. Выполнен статистический анализ и рассмотрены результаты исследования, произведена формулировка выводов, определены наиболее значимые из методов исследования для идентификации грибкового синусита и разработаны практические рекомендации по диагностике и лечению данного заболевания, предложен новый инструмент для облегчения удаления грибковых тел из ОНП. В ходе работы над данным исследованием выполнен анализ отечественной и зарубежной литературы. Доля личного участия диссертанта в выполнении данного исследования, а также в анализе, систематизации и обосновании полученных выводов -100 %.

Объем и структура диссертационного исследования. Диссертация изложена на 124 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы, содержащей описание методов, использованных при выполнении работы, двух глав собственных исследований, заключения (главы обсуждения результатов), выводов, практических рекомендаций, списка сокращений, списка использованной литературы, включающего 160 работ, из них 87 отечественных и 73 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 12 таблицами и 25 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования. Нами проведено ретроспективное исследование с участием 168 пациентов в возрасте от 25 до 67 лет с установленным клиническим диагнозом «Грибковое тело околоносовых пазух». Исследование проводилось на базе ЛОР отделения ГАУ РО «Областной консультативно-диагностический центр» г. Ростова-на-Дону в период с января 2008 по январь 2018 года. Всего за данный период в

отделении было прооперировано 1449 пациентов с различной патологией ОНП.

Критерии включения в исследование:

- наличие симптомов хронического синусита с периодическими обострениями;
- обнаружение на СКТ патологического содержимого неоднородной плотности, содержащего гиперденсивные включения в одной или в нескольких околоносовых пазухах;
- выявление признаков грибкового тела ОНП при проведении СКТ головы по другим показаниям;
- обнаружение во время хирургического вмешательства в ОНП казеозных масс, по внешнему виду напоминающих грибковое тело.

Критерии исключения из исследования:

- наличие анамнестических данных о проведенной лучевой или химиотерапии, длительных курсов антибиотикотерапии;
- наличие вторичного иммунодефицита, тяжелых соматических заболеваний в стадии декомпенсации, хронических специфических воспалительных процессов.

Клинический диагноз устанавливался на основании жалоб, анамнеза, данных эндоскопического исследования и СКТ ОНП. Все пациенты предварительно перед операцией прошли обследование СКТ ОНП на мультиспиральном шестидесятичетырехсрезовом томографе. Исследование проводилось в стандартном режиме Sinus/Facial для носа и ОНП, с проведением последующей обработки данных с помощью программы многоплоскостных реформаций (MPR) с расстоянием между слоями 1,5 мм.

На СКТ в большинстве случаев отмечены одиночные или мелкоочаговые высокоплотные включения в значительном количестве случаев и содержимое в пораженных пазухах.

Всем пациентам было произведено эндоназальное эндоскопическое вскрытие пораженных пазух. В ходе операции во всех случаях в пазухах обнаружены казеозные массы, по внешнему виду напоминающие грибковое тело. Для удаления казеозных масс из верхнечелюстных пазух нами использовался инструмент нашей разработки (Патент РФ № 185778 от 18.12.2018 г.).

Содержимое пазух забирали интраоперационно в стерильный контейнер и транспортировали в лабораторию в течение 30 минут. Проводили первичную микроскопию нативного материала в окраске по

Граму. Далее проводили микроскопические и микробиологические исследования. Микробиологическое исследование содержимого пазух проводили с использованием специальных и элективных питательных сред для факультативно-анаэробных, анаэробных бактерий и грибов при температуре 28.0 ºС и 37.0 ºС в течение 72 часов и более. Для верификации выделенных микроорганизмов использовали морфологические, тинкториальные, культуральные и биохимические тесты.

Прямой микроскопии подвергались как нативные препараты, так и окрашенные по Романовскому-Гимзе и калькофлюором белым.

При гистоморфологическом исследовании использовали окраску гематоксиллином-эозином, по Граму и ШИК-метод. Также использовались окраска уротропином серебра по методу Гомори—Грокотта, муцикармином и по Цилю-Нильсену.

По результатам исследования удаленного во время операции патологического содержимого пациенты были разделены на 2 группы.

Первую группу образовали 148 пациентов с подтвержденным диагнозом грибкового тела различной локализации.

Во вторую группу вошло 20 пациентов, у которых при исследовании операционного материала присутствия грибов не обнаружено ни одним из применяемых для этого методов.

Статистический анализ результатов исследования проводился с помощью программы STATISTICA 10.0 (StatSoftInc., США) и MedCalc (версия 9.3.5.0). Оценку диагностической эффективности и специфичности методов осуществляли с помощью ROC – анализа.

Результаты собственных исследований и их обсуждение. Объектом исследования явились пациенты с хроническим риносинуситом, при проведении СКТ которых было обнаружено неоднородное включение в одной или нескольких пазухах (168 пациентов).

Анализ особенностей клинического течения заболевания. При анализе клинических симптомов пациентов 1 группы (с грибковыми телами ОНП 148 пациентов) было выделено 2 подгруппы:

1-а – пациенты с клинически манифестированным заболеванием – 128 человек.

1-б – пациенты, у которых грибковые тела были случайной находкой при проведении СКТ или МРТ – 20 человек.

В группе 1а грибковое тело верхнечелюстной пазухи было обнаружено в 98 случаях, причем в 95 случаях было изолированное поражение. В группе 1б изолированное поражение верхнечелюстной пазухи отмечено в 15 случаях.

Изолированное грибковое тело клиновидной пазухи в группе 1а было обнаружено в 20 случаях, а в группе 1б в 5 случаях.

В группе 1а изолированные грибковые тела в решетчатой пазухе были обнаружены у 2 пациентов, сочетанное поражение выявлено у 5 пациентов.

Изолированное грибковое поражение лобной пазухи обнаружено у 1 пациента из группы 1а, у 2 пациентов этой группы отмечено сочетанное грибковым поражением данной пазухи.

В группу 1-а включено 128 человек, которые имели симптомы заболеваний ОНП в виде периодического дискомфорта или боли в области пораженного синуса, какосмии, гнойных выделений из носа или постназального затека. На протяжении этого времени пациенты не раз проходили амбулаторное лечение по клиническому диагнозу «хронический синусит».

В подгруппу 1б входит 20 пациентов, со случайной находкой в виде патологии пазух при проведении СКТ перед дентальной имплантацией, синуслифтингом, при обследовании в неврологическом стационаре, перед хирургическим лечением катаракты и во время подготовки к тимпанопластике. Количество пациентов составили 10, 7, 2 и 1 человек соответственно.

Сопоставив число пациентов с верифицированными грибковыми телами и общим количеством пациентов, подвергнутых эндоназальным эндоскопическим вмешательствам за тот же период времени (их оказалось 1449), мы вычислили частоту поражения пазух грибами различных видов – она составила 10.2%.

Распространенность грибковых поражений околоносовых пазух при хроническом риносинусите составляет около 8% по данным различных авторов, изучавших данную проблему ранее. (Крюков А.И., 2011; Naghibzadeh B., 2011). Нами получены близкие к цифрам, указанным в литературе, данные. Недостаточным остается изучение частоты аспергиллеза, протекающего без какой-либо явной симптоматики.

В доступной нам литературе имеется одна публикация на эту тему (A. Aït-Mansouretal, 2015), определивших частоту бессимптомного неинвазивного аспергиллеза верхнечелюстной пазухи 1,6/1000.

Мы не располагаем результатами скринингового исследования лиц без клинических признаков синусита, поэтому не имеем возможности вычислить частоту неинвазивного бессимптомного аспергиллеза в популяции. Однако мы определили частоту бессимптомного протекания заболевания у пациентов с выявленными грибковыми телами – 13,5%, что несколько меньше частоты указанной авторами (16,9%).

Таким образом, диагностика грибковых тел на этапе клинического диагноза опиралась, в основном, на данные компьютерно-томографического исследования, что не противоречит современным тенденциям (Singh A.K. et al., 2017).

Во время хирургических вмешательств в пораженных пазухах обнаруживались чаще серо-черные, реже коричневые, желтоватые, зеленоватые бесструктурные массы. На основании рентгенологического исследования и хирургических находок во всех случаях было заподозрено наличие грибковых тел. Патологическое содержимое пазух подвергалось микроскопическому, культуральному и гистопатологическому исследованию.

Результаты микроскопического исследования удаленного патологического содержимого околоносовых пазух. Микроскопическое исследование включало первичное исследование содержимого пазух, удаленное во время операции и полное обследование культуры возбудителя, полученной также из содержимого пазух. С использованием прямой микроскопии возможно быстро подтвердить диагноз и выбрать оптимальные среды для культивирования возбудителя из полученного материала. Также, прямая микроскопия может стать единственным лабораторным исследованием подтверждающий диагноз при отсутствии росту культуры возбудителя на питательных средах.

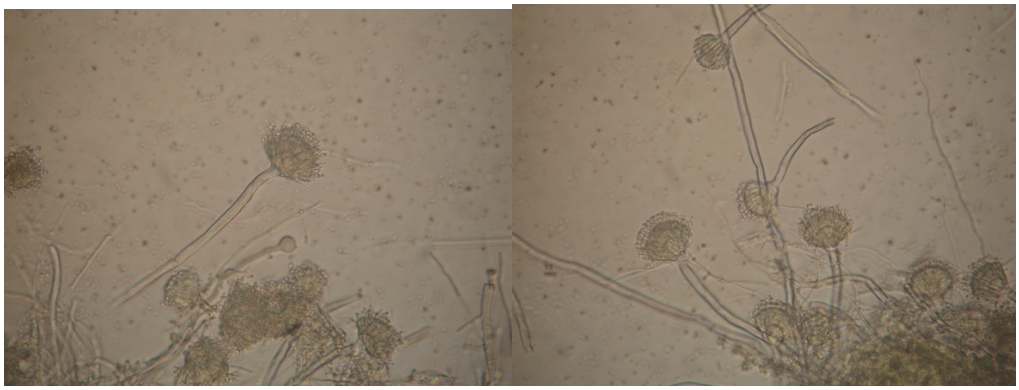

Рис. 1,2. Нативная микроскопия выявляет друзы грибов Aspergillus terreus и органы спороношения – конидиеносцы (Ув. х 400).

Наряду с прямой (первичной) микроскопией с исследованием материала непосредственно от пациента, применялась и вторичная микроскопия, с изучением культуры возбудителя, выращенной из данного материала.

Микроскопии подвергались нативные препараты, а также окрашенные по Романовскому-Гимзе и с использованием калькофлюором белым.

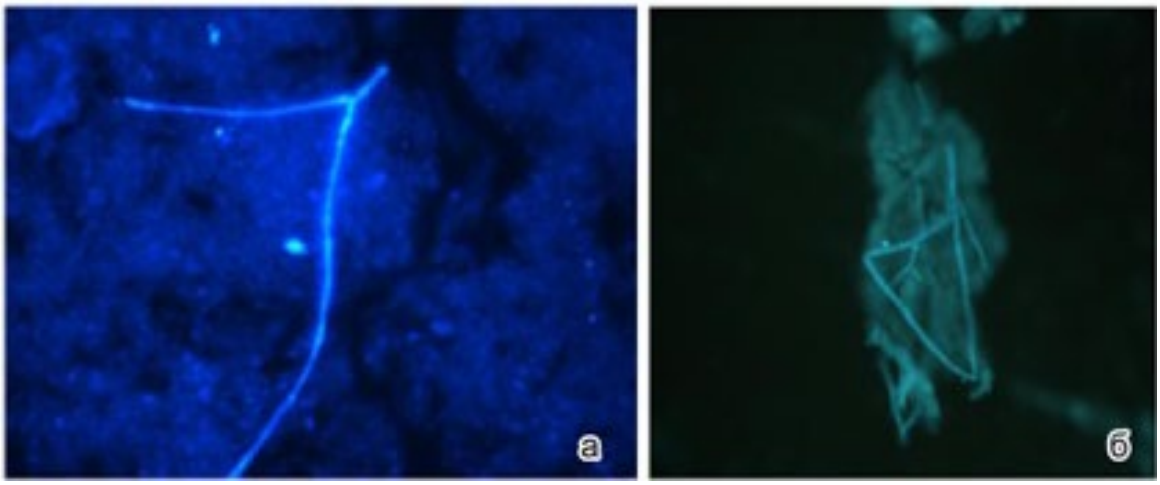

Рис. 3 а-б,. Прямая микроскопия препарата с окраской калькофлюором белым. Люминесцентная микроскопия. (Ув. х 400).

При прямой микроскопии препаратов с окраской по Романовскому-Гимзе грибы выявлены у 114 пациентов (77%), а при микроскопии препаратов, окрашенных калькофлюором белым, присутствие грибов выявлено у 135 пациентов (91,2%).

Результаты бактериологического исследования. При посеве содержимого пазух на элективные (Сабуро) и специальные (агар Чапека, картофельный, картофельно-морковный и рисовый агары) среды и культивировании в двух температурных режимах (28^{o} и 37^{o}) обнаружен рост мицелиальных грибов у 26 из 148 пациентов (17,6%) с гистопатологически и (или) микроскопически подтвержденным грибковым телом.

Среди выращенных культур преобладали Aspergillus spp (у 14 пациентов), в 11 случаях была определена их видовая принадлежность.

Во время проведения исследования были выделены грибы следующих видов и родов: Aspergillus spp (5 пациентов), Aspergillus niger (5 пац.), Aspergillus flavus (2 пац.), Aspergillus terreus (2 пац.), Aspergillus fumigatus (1 пац.), Aspergillus oryzae (1 пац.), Alternaria spp (1 пац.), Sporotrichum spp (2 пац.), Arthrographis kalrae (1 пац.), Rhizopus spp. (1 пац.), Fusarium spp. (1 пац.), Bipolaris spicifera (1 пац.), Candida albicans (2 пац.), недифференцируемый плесневый гриб (1 пац.)

В 26 случаях указанных выше, при посеве обнаружены грибы в чистой культуре (8 образцов) или в ассоциации с бактериальной флорой (18 образцов). В остальных 122 случаях при посеве обнаружена только бактериальная флора (грибы у данных пациентов были выявлены другими методами исследования). Один вид аэробной бактериальной флоры обнаруживался в 76 случаях из 122. Два вида аэробной флоры в 39 случаях. Анаэробная флора обнаружена у 7 пациентов.

Таким образом, присутствие сопутствующей бактериальной флоры у пациентов с верифицированными грибковыми телами отмечено у 140 пациентов из 148 (в 94,6% случаев).

Учитывая, что в литературе имеются данные о подавляющем воздействии некоторых микроорганизмов на рост грибковой флоры (J.Zhangetal., 2015) мы провели анализ сопряженности их определения при микробиологическом исследовании.

Для оценки сопряжения между высеванием грибов и присутствием Pseudomonas aerugenosa в использованы статистические методы: критерии Пирсона Хи квадрат с поправкой Мантеля-Ханзеля на непрерывность (непараметрическая поправка) (значение критерия 7,74, p = 0,005); критерий Крамера для оценки силы сопряжения Cramer's V (0,24, p = 0,02); ранговый коэффициент корреляции Спирмена Spearman Rank R (-0,27, p = 0,03); коэффициент контингенции или сопряжения Contingency coefficient (0,26, p = 0,03).

Для оценки сопряжения между высеванием грибов и присутствием сочетанной флоры: Pseudomonas aeruginosa и Staphylococcus spp. использованы те же критерии: критерии Пирсона Хи квадрат с поправкой Мантеля-Ханзеля (6,99, p = 0,01); критерий Крамера (0,255, p = 0,02); ранговый коэффициент корреляции Спирмена (-0,25, p = 0,04); коэффициент контингенции (0,24, p = 0,04).

Статистический анализ показал, что рост грибов достоверно подавляется Pseudomonas aeruginosa как в монокультуре, так и в сочетании со стафилококком. Для остальных бактериальных возбудителей показатели сопряжения были недостоверными.

Результаты патоморфологического исследования патологического содержимого пазух. Во время выполнения данного исследования клинический диагноз «грибковое тело» был подтвержден у 86,5% пациентов подвергшихся хирургическому вмешательству, то есть у 128 из 148 пациентов.

Проведенные гистологические исследования операционного материала после эндоназального вскрытия ОНП в данных случаях показали наличие грибковых тел, образованных мицелием - скоплением плотно, компактно расположенных грибковых гиф.

Молодые, более тонкие (толщиной 3-5 мкм), редко септированные, дихотомически делящиеся под острым углом гифы становятся толще, некоторые приобретают коричневую окраску оболочки, иногда на их концах образуются органы плодоношения - вздутия (везикулы) со стеригмами и конидиями (цепочки спор), что формирует споровую конидиальную головку.

Таким образом, проведенные патоморфологические исследования грибкового тела и слизистой оболочки ОНП показали, что микроскопическое обнаружение:

- мицелия (с учетом его толщины и септированности);
- споровой конидиальной головки (или её компонентов, особенно спор), –

позволяет диагностировать грибковое тело (споры и мицелий гриба, в основном, рода Aspergillus) с развитием неинвазивного грибкового синусита.

Оценка диагностической ценности методов выявления грибов. Удаленный во время оперативного вмешательства материал был исследован микроскопическим, культуральным и гистопатологическим методами.

На первый взгляд, создается впечатление, что самым информативным методом выявления грибковых тел является микроскопия препаратов с окраской калькофлюором белым, обнаружившим присутствие грибов у 91,9% пациентов. Однако статистический анализ результатов исследования выявил другие закономерности.

Статистический анализ чувствительности и специфичности диагностических методов был проведен с помощью сопоставления составленной матрицы решения и соответствующих формул.

Таблица 1.

Макет матрицы решения для определения диагностической чувствительности и специфичности теста

Болезнь	Исход теста	
	Положительный	Отрицательный
Есть	a	b
Нет	c	d

Диагностическая чувствительность (ДЧ) метода (sensitivity) – вероятность выявления болезни при положительном результате теста - определялась как Se = a/(a+b) x 100%.

Диагностическая специфичность (ДС) метода (specificity) – вероятность отрицательного теста у здоровых лиц, определялась как Sp =d/(d+c) x 100%.

Исходя из значений чувствительности и специфичности, была построена характеристическая кривая с помощью ROC анализа (использован модуль программы Med Calc 9.3.5.0).

В зависимости от величины AUC оценивали способность теста распознавать наличие или отсутствие определенного состояния.

При интервале AUC1,0-0,9способность диагностического теста распознавать наличие или отсутствие определенного состояния расценивалась как отличная. При AUC 0,8-0,9 как хорошая; 0,7-0,8 удовлетворительная; 0,7-0,6 – посредственная и 0,6-0,5 – неудовлетворительная и меньше 0,5, как абсурдная.

По каждому методу составляли таблицу сопряженности для расчета прогностической значимости положительного и отрицательного результата исследования.

Таблица 2

Макет матрицы для определения прогностических коэффициентов

Результат	Болезнь есть	Болезни нет
+	a	b
-	c	d

где a- количество пациентов, у которых идентифицирована грибковая природа поражения и имеется положительный результат изучаемой методики;

b - количество пациентов, у которых грибковое поражение отсутствует, но изучаемый метод на их выявление дал положительный результат;

c - количество пациентов, у которых идентифицирована грибковая природа поражения и имеется отрицательный результат изучаемой методики;

d - количество пациентов, у которых грибковое поражение отсутствует, но изучаемый метод на их выявление дал отрицательный результат.

Для каждого фактора рассчитывался положительный и отрицательный прогностический коэффициент по следующим формулам:

$ПК(+) = 3*(\ln((a/(a+c))/(b/(b+d)))$

$ПК(-) = 3*(\ln((c/(a+c))/(d/(b+d)))$.

Каждый выявленный индивидуально положительный результат методики увеличивал вероятность прогноза появления изучаемой болезни, а отрицательный результат уменьшал такую вероятность.

Индивидуально для всех пациентов вычисляли алгебраическую сумму ПК по результатам трех методик с достоверной диагностической эффективностью ($p<0,05$): патморфологическое исследование, микроскопия с окраской по Романовскому-Гимзе, микроскопия с окраской калькофлуором белым. На заключительном этапе путем ROC анализа

определяли диагностическую точку разделения суммы ПК, которая имела диагностическую значимость.

Были определены параметры эффективности использованных диагностических методов, а именно диагностическая чувствительность и диагностическая специфичность. Для патоморфологического исследования 95,4% и 39,4%, соответственно ($p<0,0001$); для посева на грибы 17,6% и 100% ($p<0,2$); для микроскопии с калькофлуором белым 89,9% и 100% ($p<0,0001$); для микроскопии с окраской по Романовскому-Гимзе 76,9% и 100%, соответственно ($p<0,0001$).

Таким образом, наибольшая чувствительность зарегистрирована у патоморфологического метода исследования, хотя специфичность данного метода невысока (39,4%). Высокая чувствительность патоморфологического метода отмечена и другими исследователями (Das A. et. al., 2009; Navya B.N. et. al., 2015; Granvillae L. et. al., 2004), что позволяет считать его «золотым стандартом» диагностики грибковых тел (Singh A.K. et. al., 2017).

Посев на грибы, наоборот, продемонстрировал 100% специфичность при низкой чувствительности (17,6%). Это можно объяснить тем, что в центральной части грибкового тела мицелий дегенерирует (Митрофанов В.С., Свирщевская Е.В., 2013) и утрачивает способность к росту. Возможно, забор материала для культурального микологического исследования в случаях отсутствия роста был произведен именно из этой части грибкового тела, поскольку при его эндоскопическом удалении трудно идентифицировать полученный фрагмент мицелия. Помимо этого, известно, что грибковое тело проходит в своем развитии несколько стадий (Климко Н.Н., 2007), конечной стадией является гибель грибов. Возможно, грибковые тела, обнаруженные нами у длительно болеющих людей, содержали только мертвые грибы. Также рост грибов, возможно, подавляется сопутствующей бактериальной микрофлорой (достоверно Pseudomonas aeruginosa, как в монокультуре, так и в сочетании со стафилококком).

Микроскопия препаратов в окраске калькофлюором белым повышает чувствительность метода по сравнению с окраской по Романовскому-Гимзе с 76,9% до 89,9% при 100% специфичности метода.

Анализ величины площади под ROC кривыми (AUC) позволил уточнить, какая методика обладает наибольшей диагностической ценностью при ее отдельном использовании.

При патоморфологическом исследовании AUC составила $0,948\pm0,017$ ($p<0,0001$); при микроскопия с окраской калькофлуоромбелым$0,881\pm0,028$($p<0,0001$); с окраской по Романовскому-Гимзе$0,763\pm0,065$($p<0,0001$) и при посеве на грибы $0,599\pm0,061$ ($p=0,103$).

Качественная оценка ROC кривых соответствующих методик представлена на рис. 4.

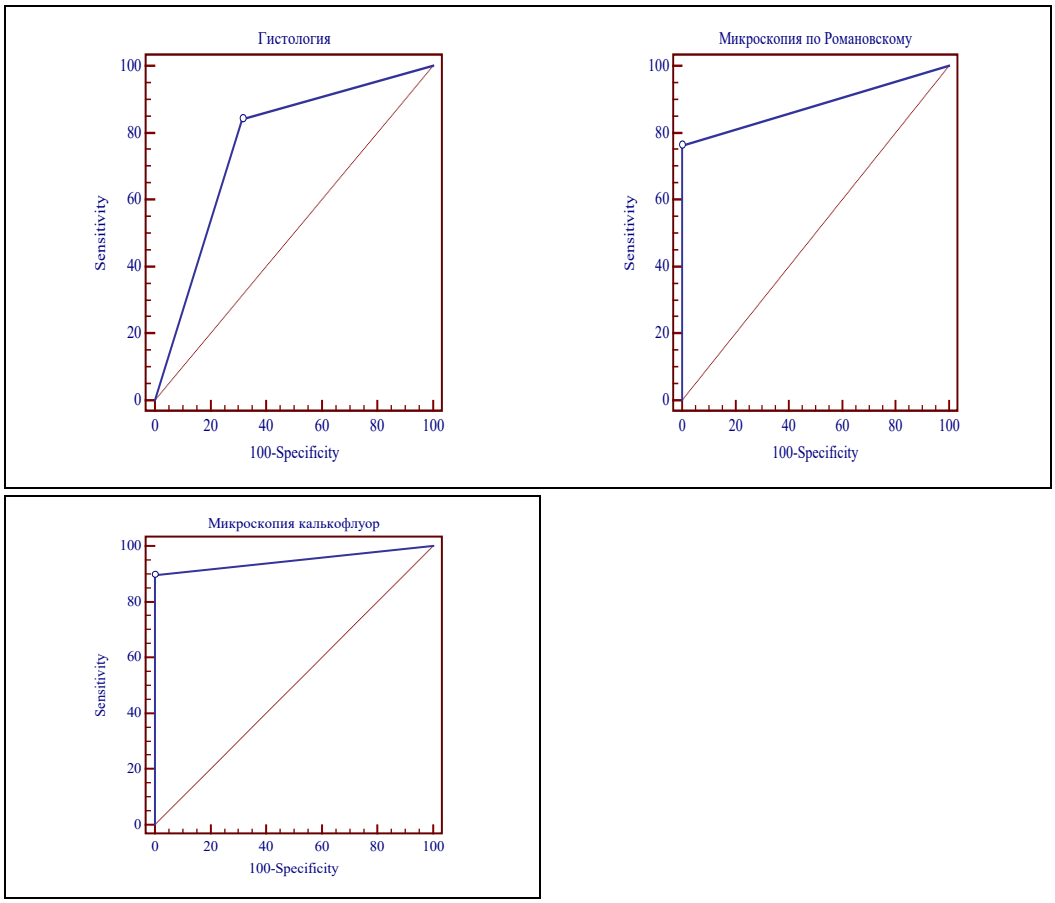

Рис. 4. ROC – кривая прогноза различных диагностических методов

Для каждой из методик были определены прогностические коэффициенты в случае положительного (ПК+) и отрицательного результата (ПК-) теста.

Для патоморфологическое исследование ПК+ составил 3,1, а ПК- (-4,5). Для микроскопии с окраской калькофлуором белым 8,3 и -4,4, а с окраской по Романовскому-Гимзе7,8 и -3,2, соответственно.

У всех пациентов рассчитывался общий ПК в зависимости от общего результата трех методов исследования. Путем ROC анализа определяли диагностическую точку разделения общего ПК, которая позволяет выявить грибковую природу поражения.

Если общая сумма ПК ≥ - 4,5 балла, то принимается решение о грибковом поражении, а если меньше - 4,5 балла, то отрицается факт грибкового поражения. Диагностическая чувствительность метода 90,48% (доверительный интервал 84-95%) и специфичность 100% (доверительный интервал 82,4%-100%). Эффективность прогноза по сумме ПК характеризуется «отличным» качеством, поскольку AUC имел величину

0,977±0,011 (доверительный интервал 0,956-0,998) (z=44,2 p<0,0001). Соответствующая ROC кривая отражена на рис. 5.

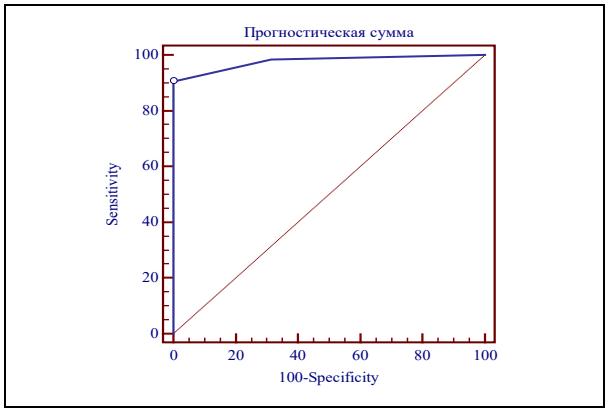

Рис. 5. ROC – кривая прогноза по сумме ПК.

Таким образом, статистический анализ результатов различных методов выявления грибов в содержимом пазух показывает, что наиболее информативными из них являются патоморфологическое исследование и микроскопическое с окраской препаратов калькофлюором белым.

Особый интерес, на наш взгляд, представляют результаты анализа показателей пациентов 2 группы.

В эту группу включено 20 пациентов, не имевших принципиальных клинических отличий от пациентов 1й-группы. У всех пациентов на СКТ патологическое содержимое неоднородной плотности, часто с гиперденсивными включениями, что позволяло заподозрить наличие грибкового тела. Во время операции содержимое пазух представляло собой бесструктурные массы чаще серого цвета, в большей или меньшей степени заполняющие полость пазухи. В казеозных массах, полученных во время операции, не было обнаружено присутствия грибов ни при микроскопическом, ни при культуральном, ни при гистологическом исследованиях. При этом у 19 пациентов обнаружено присутствие бактериальной микрофлоры в диагностически значимых титрах (у 14 пациентов – аэробная флора, у 1 пациента – анаэробная, у 4 пациентов – смешанная аэробно-анаэробная), а в 1 случае – микрофлора вообще не обнаружена. Чаще всего выделены следующие микроорганизмы: Bacteroides spp – у 5 пациентов, стафилококки – у 5 пациентов, Pseudomonas aeruginosa – у 3 пациентов и по 2 случая Klebsiella pneumonia и Actinomyces spp.

Обнаружение бесструктурных масс в пазухе во время операции не всегда является свидетельством наличия грибкового тела. Впервые это было

отмечено (Braun J.J. et.al., 1997). Авторы предложили использовать для таких случаев термин «казеозный синусит». В дальнейшем D.K. Kimetal. в 2016 году описали необычные с точки зрения авторов находки при вскрытии верхнечелюстных пазух у 2 пациентов. Обнаруженный в пазухах бесструктурный матрикс содержал колонии бактерий, в то время как признаков грибковой инфекции обнаружено не было. В 2017 году теми же авторами была опубликована работа с описанием 6 случаев подобных находок в верхнечелюстных пазухах, что составило 2,4% от общего числа пациентов (247 человек), подвергнутых FESS. Следует отметить, что в исследованиях Kimetal D.K. (2017) наличие бактериальной флоры в казеозных массах было установлено при патоморфологическом исследовании, но их идентификация проведена не была. В своих дальнейших работах D.K. Kimetal предложил называть патологическое содержимое пазух, содержащее бесструктурные массы, в которых обнаруживается бактериальная микрофлора «бактериальным шаром» по аналогии с распространенным в англоязычной литературе термином «fungal ball», то есть, грибковый шар, или грибковое тело. Возможно, бактериальный шар - это отдельный фенотип хронического синусита или новый вариант формирования сообщества микроорганизмов, повышающий их выживаемость.

Бактериальная микрофлора играет важную роль в возникновении воспалительных заболеваний пазух. Известно, что большинство бактерий in vivo чаще существуют в виде биопленок, нежели в планктонной форме (Al-Mutairi D., Kilty S.J., 2011). Биопленки обнаруживаются от 20,9 до 100% при хроническом синусите и представляют собой один из механизмов формирования антибактериальной устойчивости микроорганизмов.

На сегодняшний день нами накоплен самый большой материал по обнаружению в ОНП содержимого, по внешнему виду напоминающего грибковые тела, но фактически являющегося проявлением бактериальной колонизации пазухи – 20 из 1449 оперированных пациентов (1,4%). Нами впервые произведена идентификация микроорганизмов, формирующих это патологическое содержимое пазух. Не исключено, что бесструктурные массы в пазухах представляют собой гигантские биопленки, поскольку обнаруженные нами микроорганизмы: Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumonia, Enterococcus faecalis обладают повышенной способностью к пленкообразованию (Беляева Е.В. и соавт, 2014; Соколова Т.Н. , 2014), которая даже внутри одного вида зависит от экспрессии соответствующих генов и коррелирует со степенью вирулентности (Marsh P.D., 2006). Оппортунистические патогенные бактерии

Pseudomonas aeruginosa могут длительное время размножаться без ущерба для макроорганизма, пока они не достигнут определенной концентрации (Шварц Т.А. 2015), что может объяснить возможность латентного, субклинического течения заболевания, сходного с клиникой грибкового тела.

Выводы.

1. Клинические проявления грибковых тел ОНП неспецифичны и соответствуют симптомам хронического риносинусита соответствующей локализации; бессимптомное пребывание грибковых тел в ОНП отмечено в 13,5% случаев.
2. Наиболее чувствительным методом идентификации грибковых тел околоносовых пазух является гистопатологическое исследование патологического содержимого, полученного при хирургическом вмешательстве (95,4%).
3. Окраска препаратов калькофлюором белым повышает диагностическую чувствительность метода микроскопического исследования патологического содержимого пазух с 76,9% до 89,9%, по сравнению с рутинными способами окраски.
4. Присутствие сопутствующей бактериальной флоры у больных с верифицированными грибковыми телами отмечено в 94,6% случаев. Ряд бактериальных возбудителей, в частности, Pseudomonas aeruginosa, достоверно подавляют рост грибковой флоры при посеве.
5. В 11,9% случаев (у 20 пациентов из 168) клинический диагноз неинвазивный микоз ОНП не подтвердился. Это составило 1,4% случаев от всех прооперированных больных. Обнаруженные казеозные массы содержали только бактериальную флору. Такие формы поражения ОНП могут быть квалифицированы как «бактериальное тело».

Практические рекомендации

1. Для улучшения диагностики грибковых тел ОНП полученный материал необходимо направлять не только на патоморфологическое исследование, но и на микроскопию с окраской калькофлюором белым.
2. Полученные бесструктурных массы из ОНП необходимо направлять на посев, как на грибковую флору так и на бактериальную.
3. С целью удаления грибковых тел из верхнечелюстных пазух, показано применение предложенного инструмента (Патент РФ № 185778).

Список печатных работ, опубликованных по теме диссертации

1. Бойко Н.В. Распространенность микозов околоносовых пазух/Н.В. Бойко, С.А. Банников, В.Н. Колесников //Российская оториноларингология. Приложение, № 2. 2010. Матер конф «Прикладная фундаментальная наука – рос. оториноларингологии». С.255-258
2. Бойко Н.В. Диагностика мицетом околоносовых пазух /Н.В. Бойко, С.А. Банников, В.Н. Колесников //Российская оториноларингология. Приложение, № 2. 2010. Матер конф «Прикладная фундаментальная наука - российской оториноларингологии» С.249-254.
3. **Бойко Н.В. Неинвазивный микоз околоносовых пазух / Н.В. Бойко, С.А. Банников // Российская ринология. 2010. Т. 18. No 2. С. 39-41.**
4. **Бойко Н.В. Клинико-лабораторная диагностика грибковых тел околоносовых пазух / Н.В. Бойко, С.А. Банников, В.Н. Колесников//Российская ринология, 2011, № 1, стр. 4-7.**
5. Бойко Н.В. Диагностическая ценность различных методов исследования больных с неизвазивными микозами околоносовых пазух/ Н.В. Бойко, С.А. Банников, В.Н. Колесников//Оториноларингология - Хирургия Головы и Шеи, журнал Национальной академии наук респ. Казахстан, 2011, № 1-2, стр. 19-20.
6. Бойко Н.В. Частота обнаружения грибковых тел в околоносовых пазухах / Н.В. Бойко, С.А. Банников, В.Н. Колесников //Оториноларингология - Хирургия Головы и Шеи - журнал Национальной академии наук респ. Казахстан, 2011, № 1-2, стр. 20-21.
7. **Бойко Н.В. Изолированные и сочетанные микозы полости носа и околоносовых пазух / Н.В. Бойко, С.А. Банников, В.Н. Колесников //Российская ринология, 2011, № 2, с. 8.**
8. **Бойко Н.В. Особенности клинических проявлений грибковых тел околоносовых пазух / Н.В. Бойко, С.А. Банников, О.Е. Лодочкина, В.В. Мареев// Российская ринология, 2018; 26(1):18-21**
9. Банников С.А. Локализация грибковых тел в околоносовых пазухах /Н.В. Бойко, С.А. Банников, В.Г. Миронов //Клиническая больница. 2018. Т. 23. № 1. С. 6-8.
10. Банников С.А. Распространенность неинвазивного микоза околоносовых пазух в Ростовской области /С.А. Банников, В.Ю. Толстик// Синергия наук, 2018. № 23. С. 973-979.
11. **Бойко Н.В. Видовой состав и родовая принадлежность грибов, выделенных из грибковых тел околоносовых пазух/Бойко Н.В.,**

Банников С.А., В.Г. Миронов //Российская ринология 2018, т. 26, № 3. С. 37-40.

12. **Бойко Н.В. Два случая грибкового поражения полости носа./Н.В. Бойко, С.А. Банников, В.Г. Миронов // Российская ринология, 2018, т. 26, № 3. С. 57-59.**

13. Бойко Н.В. Информативность различных методов выявления грибов при неинвазивном микозе околоносовых пазух / Н.В. Бойко, С.А. Банников, В.Г. Миронов //Вестник российской военно-медицинской академии. 2018, №3 (63). С. 111-113.

Патенты

1. **Бойко Н.В. «Инструмент для удаления мицетомы верхнечелюстной пазухи»: Патент РФ № 185778 на полезную модель №2018121688.; заявл. 13.06.2018; опубл. 18.12.2018. Бюл. // Бойко Н.В., Миронов В.Г., Банников С.А., Шелудько Н.Г., Синельников Р.И.**