

# Криптококкоз: значение морфологического изучения возбудителя

Константинова А.М., кафедра патологии медицинского факультета СПбГУ, г. Санкт-Петербург; Цинзерлинг В.А., д.м.н., профессор кафедры патологии медицинского факультета СПбГУ, НИИ Медицинской микологии им. П.Н. Кашкина СПб МАПО, г. Санкт-Петербург; Михайлов В.И., к.б.н., НИИ Медицинской микологии им. П.Н. Кашкина СПб МАПО, г. Санкт-Петербург

## Cryptococcosis. Importance of causative agent's morphological study

Konstantinova A.M., Zinserling V.A., Mikhailov V.I.

### Резюме

Представлены различные способы детальной оценки морфологии возбудителей криптококкоза. Описание таких характеристик как форма возбудителя, наличие капсулы, ее толщина и др., на светополитическом уровне становится возможным при использовании различных видов окрасок, в том числе реактивом Шиффа и альциановым синим по Мури. Оценку ядерного материала возможно проводить, используя окраску по Циль-Нильсену. Важная информация также может быть получена при исследовании полутонких срезов и при электронной микроскопии. Морфологические характеристики позволяют судить о вирулентности штамма, особенностях течения инфекции и эффективности проводимой терапии.

**Ключевые слова:** криптококкоз, морфология, окраска в гистологических препаратах

### Summary

There are a lot of methods how to study *Cryptococcus* morphology in detail. It is possible to describe different descriptions of *Cryptococcus* using PAS-staining and alcian blue staining. Nucleus can be visualized after Ziehl-Nielson staining. Important information may be obtained also by investigation of semi-thin slices and electron microscopy. Morphological methods are useful to evaluate the virulence of the infectious agent, features of infectious process and efficiency of the treatment.

**Keywords:** cryptococcus, morphology, staining

### Введение

Прошло больше ста лет с того момента, как была довольно подробно описана патогистологическая картина криптококкоза [1,2]. За последние 20 лет интерес к этому заболеванию, которое является СПИД-маркерной инфекцией, значительно возрос.

По данным Центра по контролю за заболеваниями (CDC, США), в мире ежегодно регистрируют 1 млн. случаев криптококкоза у ВИЧ-инфицированных больных, из них 680 000 погибают [3]. Сведения о частоте криптококкоза в Российской Федерации отсутствуют. В последние годы отмечен рост числа зарегистрированных случаев этого заболевания в Санкт-Петербурге. В патологоанатомическом отделении Городской инфекционной больницы №30 им. С.П. Боткина в Санкт - Петербурге в период с 1988 по 2009 гг. было произведено 396 вскрытий умерших с основным диагнозом ВИЧ-инфекция в стадии СПИДа. За этот период криптококкоз имел несомненное

значение в наступлении летального исхода в 22 случаях; а первый случай криптококкоза был зарегистрирован в 1990 г. В 2010 году было зарегистрировано еще два случая криптококкоза [4].

Криптококкоз – это известный уже более столетия глубокий жизнеугрожающий микоз [5,6,7], приводящий к тяжелому менингоэнцефалиту и диссеминированным поражениям [8,9]. Возбудителями являются базидиомицетовые капсулированные дрожжи рода *Cryptococcus* двух видов: *Cryptococcus neoformans* и *C.gattii* [10]. *C. neoformans* включает три серотипа: *C.neoformans var. grubii* (серотип А), *C.neoformans var. neoformans* (серотип D) и гибрид (серотип AD), которые обнаруживаются повсеместно. *C. gattii* включает серотипы В, В/С и гибриды (ВD, АВ), вызывает заболевание в регионах с тропическим и субтропическим климатом [6,11]. Криптококк является обычным сапрофитом слизистых оболочек некоторых животных [1,6,8].

До сих пор не вполне ясным остается источник инфекции, т.к. при исследовании природных субстратов на наличие криптококка в Санкт- Петербурге, частота его выделения составила лишь 3,2%, причем возбудитель был обнаружен исключительно в помете голубей [12].

Заражение происходит преимущественно аэрогенным путем, из легких *C. neoformans* попадает в кровенос-

Ответственный за ведение переписки -  
Константинова Анастасия Михайловна:  
199004 г. Санкт-Петербург, 4 линия В.О., д.39 кв.9;  
Anastasia.konstantynova@gmail.com

ное русло, откуда происходит его гематогенная диссеминация. Наиболее часто отмечается поражение центральной нервной системы, куда возбудитель проникает через гематоэнцефалический барьер, используя механизм «тройного коня» [13], или посредством трансцеллюлярного механизма за счет адгезии к выпячиваниям мембран эндотелия микрососудов мозга [14]. Несмотря на проводимую антифунгальную терапию, смертность от ВИЧ-ассоциированного криптококкового менингита до сих пор остается высокой – до 10-44% [6,15].

Прижизненная лабораторная диагностика криптококковой инфекции на сегодняшний день не представляет трудностей. «Золотым стандартом» является культуральный метод, однако он требует времени: *C. neoformans* растет на большинстве стандартных микологических или бактериологических сред в течение 48-72 часов. Наиболее быстрым остается обнаружение антигена методом латекс-агглютинации (показатели специфичности и чувствительности стандартных тестов превышают 90%); также в диагностике используется молекулярный метод определения ДНК возбудителя [6,16,17,18]. Наиболее простым, быстрым и дешевым методом является цитологическое исследование спинномозговой жидкости, аспиратов, секретов или другого материала [16,17].

Клетки криптококков имеет одинаковый вид в культуре и в срезах тканей: шаровидной формы, от 5 до 7 мкм в диаметре, с отчетливой оболочкой, с одной слегка удлиненной почкой и желатинообразной капсулой. Редко могут наблюдаться клетки необычных размеров, от 2 до 15 мкм, колоколообразные, серповидные, двоякоизогнутые и эллипсоидные формы криптококков, не имеющих капсулы; их считают дегенерирующими и отмирающими. Описан случай, когда в тканях наблюдались криптококки гигантских размеров (до 40–50 мкм) при их нормальных размерах в культуре. Толщина капсулы варьирует от нескольких микрометров до размеров, равных или превышающих размер клеток, 50–60 мкм [1,8,17,19,20].

В специализированных лабораториях для проведения цитологического исследования мазки заливают 1-2 каплями туши, на фоне которой обнаруживаются инкапсулированные дрожжевые клетки. Капсула не пропускает частички туши и формирует характерные ободки [19]. Чувствительность метода при исследовании ЦСЖ достигает 86% [5].

При рутинной окраске гематоксилином и эозином возбудитель криптококкоза выявляется недостаточно четко: диагностика часто затруднена из-за слабой сорбции красителей, а округлые безъядерные клетки могут напоминать пузырьки воздуха или гемолизированные эритроциты [1,8,21].

Из-за экономической выгоды и быстроты, морфологическое исследование ликвора и парафиновых срезов внутренних органов и головного мозга с применением окраски гематоксилином и эозином в патологоанатомических отделениях Санкт-Петербурга и других городов в подавляющем большинстве случаев является единственным способом диагностики криптококкоза. Это метод с низкой чувствительностью [16,17] не позволяет оценить

морфологию возбудителей, не окрашивают капсулу, фагоцитированные и отмирающие формы. При использовании этой окраски возможно лишь приблизительно оценить количество микромицетов (рис. 1А – рисунки к статье см. на цветной вкладке журнала). Доказано, что большое количество криптококков в цереброспинальной жидкости является фактором риска неблагоприятного исхода заболевания [5,6].

Для выявления возбудителей рекомендуется применять также PAS-метод. Реактив Шиффа окрашивает клетки грибов в розовый цвет [1,16,17], что дает возможность оценить морфологию клетки криптококков; оценка толщины капсулы при этом затруднена (рис. 1Б). Капсула, состоящая из гетерополисахаридов, становится отчетливо видной (приобретает синевато-зеленый цвет) при окраске альциановым синим по Моури (рис. 1В) [1,6,16,17,22]. Следует подчеркнуть, что только таким способом выявляется капсула фагоцитированных криптококков.

В литературе практически нет данных о значении для оценки морфологии криптококков окраски по методу Циль-Нильсена. При использовании указанного метода нами были выявлены ядра некоторых возбудителей как на экспериментальном материале (рис. 1Г), так и при исследовании ряда текущих секционных наблюдений. Таким образом, становится возможным оценка структурных изменений не только капсулы и клеток криптококков, но и их ядерного материала.

Полезная информация может быть получена и при исследовании полутонких срезов, приготовленных по стандартной методике с целью выбрать место для дальнейшего приготовления ультратонких срезов. Однако, при использовании этого метода значительно чаще и четче определяются так называемые ростковые трубки (рис. 1Д), наличие которых свидетельствует об активной репликации гриба. При световой микроскопии такие структуры описываются лишь в единичных исследованиях [23,24].

Применение электронной микроскопии позволяет более детально изучить ультраструктуры микромицетов: установлено, что штаммы *C. neoformans* отличаются по строению и толщине капсулы и клеточной стенки, степени конденсации ядерного материала; а в зависимости от вирулентности штамма значительно отличаются число, форма и топография митохондрий [25]. (рис. 1Е)

Таким образом, комплексное исследование как на светооптическом уровне с применением различных видов окрасок, так и электронная микроскопия, позволяют в полной мере оценить не только количество возбудителей, которое является прогностическим фактором, но и важнейшие морфологические характеристики криптококков, изменяющиеся в течение инфекции, при различных видах проводимой терапии и отражающие свойства самих возбудителей.

В процессе развития инфекции возбудитель может увеличиваться в размерах, его капсула – утолщаться, менять электронную плотность и даже разрушаться [26]. При разрушении криптококков мукополисахаридная кап-

сула не выявляется [8]. Толщина капсулы не коррелирует с вирулентностью [25], однако, более вирулентные микромицеты чаще капсулированные, округлой формы. Клетки менее вирулентных штаммов криптококков преимущественно бескапсульные, деформированные [4].

До сих пор мало изученным и противоречивым остается вопрос, чем обусловлены «in vivo» те или иные размеры клетки и толщина капсулы криптококков. Существовало мнение, что размеры *S. neoformans* не зависят от локализации возбудителя в различных органах, а также от разновидности иммунодефицитного состояния [27]. Позднее было показано, что существуют различия в диаметре клеток криптококков и в толщине их капсулы в легких и головном мозге; в том числе и при различных видах проводимой терапии. Выявлено, что толщина капсулы криптококков в легких умерших, не получавших при жизни никакой терапии, оказалась достоверно больше, чем в головном мозге [28], что совпадает с описанными в литературе данными о толщине капсулы *S. neoformans* в различных органах у мышей [29]. Механизм этого явления до конца не ясен, однако уже более 60 лет известно, что на толщину капсулы влияют условия среды: так, различную толщину капсулы криптококка в ткани головного мозга и легких связывают с различными уровнями концентрации железа в этих органах [30]. В нервной системе также выше уровень «сброса» полисахарида в ткань. Воспалительный ответ в легких более выражен, чем в мозге, что может замедлять рост дрожжей в легких, и соответственно, так как доказана связь между ростом капсулы и замедленной репликацией, объяснить большую толщину капсулы криптококков в ткани легкого [31]. Некоторые авторы связывают этот феномен с возможностью так называемого «переключения фенотипа», при котором спонтанно, с частотой выше, чем происходят соматические мутации, появляются колонии другой морфологии, что значительно оказывает влияние как на размер клетки гриба, так и на толщину капсулы [32,33]. Есть данные и о том, что при низких концентрациях кислорода изменяется морфология грибов [34], однако характер этих измене-

ний в отношении криптококков в доступной нам литературе обнаружить не удалось.

В опытах на культуре клеток антимикотическая терапия (амфотерицином В и флуконазолом) уменьшала размер клетки и капсулы *S. neoformans* [35]. В экспериментах на зараженных криптококкозом мышках при терапии амфотерицином В отмечено значительное снижение толщины капсулы и диаметра клетки в легких [36]. Морфометрическое исследование, проведенное у умерших, получавших при жизни антимикотические препараты, показало, что толщина капсулы и диаметр клеток криптококков в легких были достоверно больше, чем те же показатели у не получавших при жизни никакой терапии. Противоположные данные, полученные при морфометрии в срезах тканей мозговых оболочек, могут быть связаны с более низкой концентрацией препарата в центральной нервной системе [28].

В отношении противовирусной терапии, в литературе есть данные лишь о том, что индинавир подавляет капсулообразование *in vitro* [37]. Более высокая толщина капсулы у пациентов, получавших ВААРТ, чем у пациентов, не получавших терапии или получавших только антимикотики, вероятно, связана либо с неэффективностью проводимой терапии, либо с тем, что капсула является не только фактором вирулентности, но и защиты криптококка от макроорганизма [28].

## Выводы

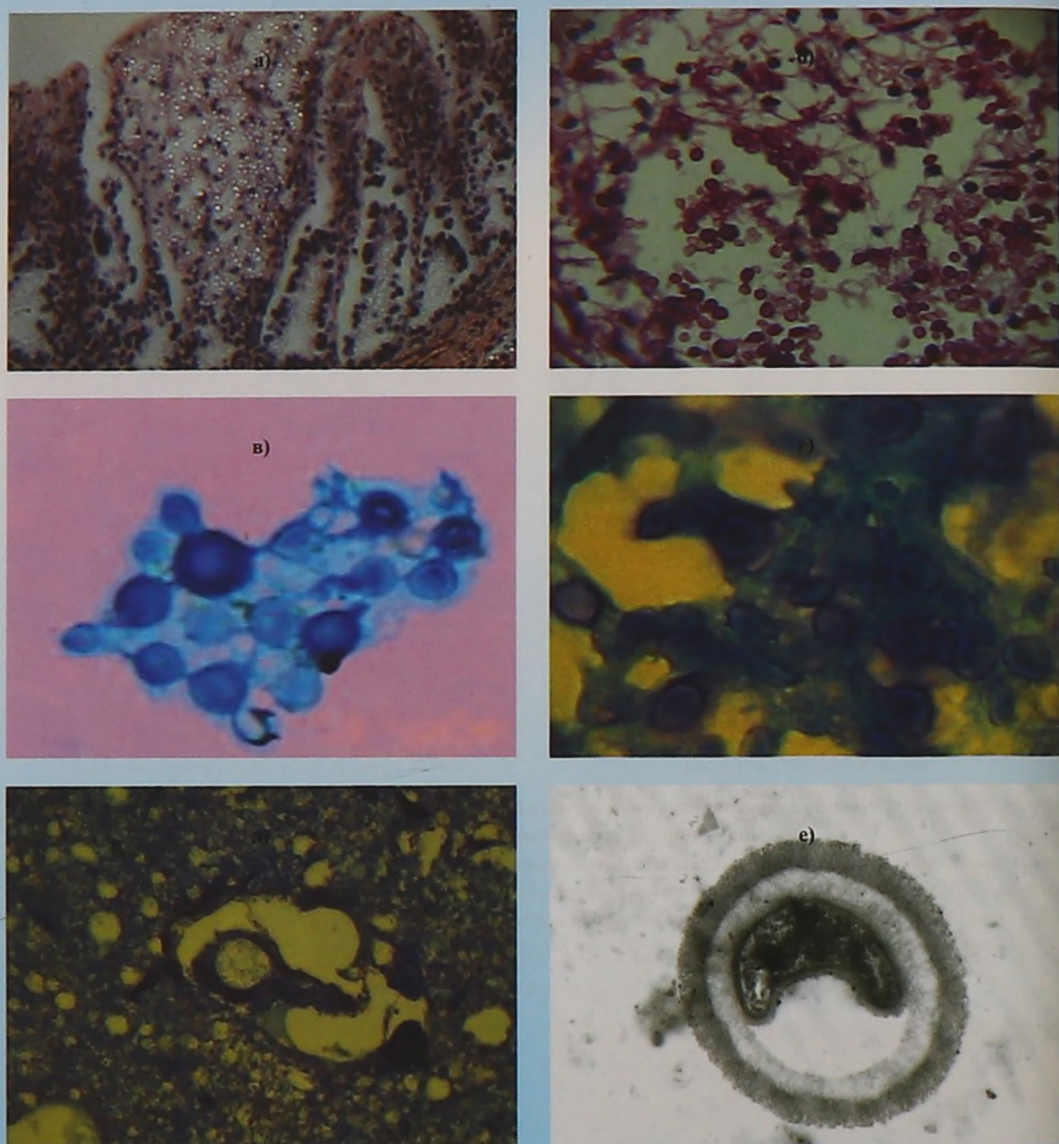
Таким образом, оценка не только количества возбудителей, но и детальная оценка их морфологии может быть осуществлена при гистологическом исследовании тканевых образцов при окраске реактивом Шиффа, суждение о толщине капсулы – при окраске аляциановым синим по методу Моури, характеристика ядерного материала – при окраске по Циль-Нильсену. Наконец, исследование полутонких срезов и электронная микроскопия позволяют судить о вирулентности штамма, особенностях течения инфекции и эффективности проводимой терапии. ■

## Литература:

1. Хмельницкой О.К., Хмельницкая Н.М. Патоморфология микозов человека. СПб: Издательский дом СПбМА-ПО; 2005.
2. Steenbergen J.N., Casadevall A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microb Infect* 2003; 5:667–75.
3. Bianic T., Boehhout T., Del Poeta M. et al. Special report on 7th International Conference on *Cryptococcus* and *Cryptococcosis*. *Mycol Newslett* 2008; 10–24.
4. Константинова А.М. Криптококкоз при ВИЧ-инфекции (обзор литературы). *Вестник СПбГУ* 2010; 3: 37–45.
5. Antinori S., Galimberti L., Magni C. et al. *Cryptococcus neoformans* infection in a cohort of italian AIDS patients: natural history, early prognostic parameters, and autopsy findings. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20: 711–7.
6. Bicanic T., Harrison T. *Cryptococcal meningitis*. *Brit Med Bull* 2005; 72(1): 99–118.
7. Chretien F., Lortholary O., Kansau I., Neuville S., Gray F., Dromer F. Pathogenesis of cerebral *Cryptococcus neoformans* infection after fungemia. *J Infect Dis* 2002; 186: 522–0.
8. Пархоменко Ю.Г., Зюзя Ю.Р., Тишкевич О.А. Патология легких при ВИЧ-ассоциированных инфекциях. *Архив патологии* 2008; 70(6): 44–8.
9. Покровская А.В., Ладная Н.Н., Соколова Е.В. Система регистрации и анализа данных о СПИДе в России. *Эпидемиология и инфекционные болезни* 2008; 3: 13–6.
10. Kwon-Chung K.J., Varma A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*?. *FEMS Yrast Res* 2006; 6: 574–87.

11. Bovers M, Hagen F, Kuramae E.E. et al. AIDS patient death caused by novel *Cryptococcus neoformans* x *C. gattii* hybrid. *Emerg Infect Dis* 2008; 14(7): 1105-8.
12. Босак И.А. Выделение и характеристика изолятов *Cryptococcus neoformans* из окружающей среды г. Санкт-Петербурга. *Ж Пробл Мед Микол* 2009; 11(3): 43-6.
13. Drevets D.A., Leenen P.J.M. Leukocyte-facilitated entry of intracellular pathogens into central nervous system. *Microb Infect* 2000; 2: 1609-18.
14. Chang Y.C., Stins M.F., McCaffery M.J. et al. Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier. *Infect Immun* 2004; 72(9): 4985-5.
15. Shibuya K., Hirata A., Omuta J. et al. Granuloma and cryptococcosis. *J Infect Chemother* 2005; 11: 115-2.
16. Аравийский Р.А., Клычко Н.Н., Васильева Н.В. Диагностика микозов. СПб: Издательский дом СПбМАПО; 2004.
17. Mitchell T.G., Perfect J.R. Cryptococcosis in the era of AIDS - 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev* 1994; 8(4): 515-48.
18. Saldanha Dominic RM, Prashanth HV, Shenoy S, Baliga S. Diagnostic value of latex agglutination in cryptococcal meningitis. *J Lab Physicians* 2009; 1: 67-8.
19. Bose I, Reese A.J., Ory J.J., Janbon G., Doering T.L. A yeast under Cover: the Capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot cell* 2003; 2(4): 655-3.
20. Gruickshank J.G., Cavill R., Jelbert M. *Cryptococcus neoformans* of unusual morphology. *Appl Microbiol* 1973; 25(2): 309-12.
21. Рогов К.А., Ивашева И.Л., Гришнина А.В. Легочный криптококкоз. *Архив патологии* 2009; 71(5): 55-7.
22. Benesova P., Buchta V., Cerman J. and Zak P. Cryptococcosis - a review of 13 autopsy cases from a 54-year period in a large hospital. *APMIS* 2007; 115: 177-83.
23. Gazzoni A.F., Oliveira F., Salles E.F. et al. Unusual morphologies of *Cryptococcus* spp. in tissue specimens: report of 10 cases. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2010; 52(3): 145-9.
24. Williamson J.D., Silverman J.F., Mallak C.T., Christie J.D. Atypical cytomorphologic appearance of *Cryptococcus neoformans*: a report of five cases. *Acta Cytol* 1996; 40(2): 363-70.
25. Васильева Н.В. Факторы патогенности *Cryptococcus neoformans* и их роль в патогенезе криптококкоза: Автореф. дисс...доктор биол. наук СПб; 2005.
26. Charlier C., Chretien F., Baudrimont M., Mordelet E., Lorthjary O., Dromer F. Capsule structure changes associated with *Cryptococcus neoformans* crossing of the blood-brain barrier. *Am J Pathol* 2005; 166(2): 421-2.
27. Khmelinskiy O.K., Tretyakova M.S., Vasilyeva N.V. Comparative pathomorphology of cryptococcosis in patients with AIDS and other immunodeficiencies. *Abstr. I International congress of pathology. Portugal; 2000. p. 203.*
28. Константина А.М. Криптококкоз при ВИЧ-инфекции в стадии СПИД: анализ аутопсий. *Ж Пробл Мед Микол* 2010; 12(2): 101-2.
29. Rivera J., Feldmesser M., Cammer M., Casadevall A. Organ-dependent variation of capsule thickness in *Cryptococcus neoformans* during experimental murine infection. *Infect Immun* 1998; 66(10): 5027-30.
30. McFadden D., Zaragoza O., Casadevall A. The capsule dynamics of *Cryptococcus neoformans*. *TRENDS in Microbiology* 2006; 14(11): 497-5.
31. Zaragoza O., Casadevall A. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. *Biological Procedures Online* 2004; 6(1): 10-5.
32. Fries B.C., Taborda C.P., Serfass E., Casadevall A. Phenotypic switching of *Cryptococcus neoformans* occurs in vivo and influences the outcome of infection. *J Clin Invest* 2001; 108(11): 1639-48.
33. Jain N., Li Li, McFadden D.C. et al. Phenotypic switching in a *Cryptococcus neoformans* variety gattii strain is associated with changes in virulence and promotes dissemination to the central nervous system. *Infect Immun* 2006; 74(2): 896-3.
34. Ernst J.F., Tielker D. Responses to hypoxia in fungal pathogens. *Cell Microbiol* 2009; 11(2): 183-90.
35. Nosanchuk J.D., Cleare W., Franzot S.P., Casadevall A. Amphotericin B and Fluconazole affect cellular charge, macrophage phagocytosis, and cellular morphology of *Cryptococcus neoformans* at subinhibitory concentrations. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(2): 233-9.
36. Zaragoza O., Mihu C., Casadevall A., Nosanchuk J.D. Effect of Amphotericin B on capsule and cell size in *Cryptococcus neoformans* during murine infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(10): 4358-1.
37. Monari C., Pericolini E., Bistoni G., Cenci E., Bistoni F., Vecchiarelli A. Influence of Indinavir on virulence and growth of *Cryptococcus neoformans*. *J Infec Dis* 2005; 191: 307-1

**Криптококкоз: значение морфологического  
изучения возбудителя**  
Константинова А.М., Цинзерлинг В.А., Михайлов В.И.



**Рис.1. Рис. 1. Патоморфология криптококков.**

*А. Замещение ворсины тонкого кишечника криптококками у ВИЧ-инфицированного пациента со СПИДом и генерализованным криптококкозом. Окраска гематоксилином и эозином. х125. Б. Массивное ареактивное скопление криптококков в лимфатическом узле (аутопсийное наблюдение). Окраска реактивом Шиффа. х1000В. Многочисленные полиморфные криптококки, большей частью с утолщенной капсулой в мозговой оболочке больного с ВИЧ-инфекцией в стадии СПИДа, длительно получавшего антиретровирусную и противогрибковую терапию. Окраска альциановым синим. х1000. Г. Окрашенные ядра криптококков (экспериментальное наблюдение). Окраска по методу Циль-Нильсена. х1000. Д. Криптококк с ростковой трубкой (аутопсийное наблюдение). Полутолстый срез. Окраска толуидиновым синим. Х1000Е. Криптококк с капсулой, состоящей из двух слоев и деформированной цитоплазмой полукруглой формы. Электроннограмма (аутопсийное наблюдение) X 40 000*