

EDITORIAL BOARD

Chief Editor —

N.P. Yelinov — Ph.D., prof. (Russia)

Deputies Chief Editor —

N.V. Vasilyeva — Ph.D., prof. (Russia)

N.N.Klimko — M.D., prof. (Russia)

Responsible secretary —

T.S. Bogomolova — Ph.D. (Russia)

SCIENTIFIC EDITORIAL BOARD

R.A. Araviyskiy — M.D., prof. (Russia), N.A. Belyakov — M.D., academician of RAMS, prof. (Russia), J. Bennett — M.D. (USA), S.A. Burova — M.D., prof. (Russia), B. Dupont — M.D. (France), O.G. Hurzilava — M.D., prof. (Russia), V.I. Golubev — Ph.D. (Russia), K.P. Kashkin — M.D., academician of RAMS, prof. (Russia), V.G. Kubas' — M.D., prof. (Russia), V.M. Leschenko — M.D., prof. (Russia), A.V. Lipnizky — M.D., prof. (Russia), V.I. Mazurov — M.D., academician of RAMS, prof. (Russia), Iu.A. Medvedev — M.D., prof. (Russia), A.K. Mirzabalaeva — M.D., prof. (Russia), S.M. Ozerskaya — Ph.D. (Russia), I. Polachek — M.D. (Israel), A.G. Rakhmanova — M.D., prof. (Russia), K.I. Raznatovsky — M.D., prof. (Russia), F.P. Romanyuk — M.D., prof. (Russia), A.V. Samzov — M.D., prof. (Russia), N.V. Shabashova — M.D., prof. (Russia), M.A. Shevyakov — M.D., prof. (Russia), A.V. Sobolev — M.D., prof. (Russia), A.A. Stepanova — Ph.D. (Russia), H.J. Tietz — M.D. (Germany), T.N. Trofimova — M.D., prof. (Russia), M.A. Viviani — M.D. (Italy), V.A. Zinzerling — M.D., prof. (Russia)

PROBLEMS IN MEDICAL MYCOLOGY

Vol. 15, № 3, 2013

North-Western State Medical University
named after I.I. Mechnikov
Kashkin Research Institute
of Medical Mycology (KRI MM)

ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

Том 15, № 3, 2013

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (СЗГМУ)
Научно-исследовательский институт
медицинской микологии им. П.Н.Кашкина
(НИИ ММ)

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор —

Н.П. Елинов — д.б.н., профессор (Россия)

Заместители главного редактора:

Н.В. Васильева — д.б.н., профессор (Россия),

Н.Н. Климко — д.м.н., профессор (Россия)

Ответственный секретарь —

Т.С. Богомолова — к.б.н. (Россия)

НАУЧНО-РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Р.А. Аравийский — д.м.н., профессор (Россия),
Н.А. Беляков — д.м.н., акад. РАМН, профессор (Россия),
Дж. Беннетт — доктор медицины (США), С.А. Бурова —
д.м.н., профессор (Россия), М.А. Вивиани — доктор
медицины (Италия), В.И. Голубев — д.б.н., вед.н.с.
(Россия), Б. Дюпон — доктор медицины (Франция),
К.П. Кашкин — д.м.н., академик РАМН, профессор
(Россия), В.Г. Кубась — д.м.н., профессор (Россия),
В.М. Лещенко — д.м.н., профессор (Россия),
А.В. Липницкий — д.м.н., профессор (Россия),
В.И. Мазуров — д.м.н., акад. РАМН, профессор
(Россия), Ю.А. Медведев — д.м.н., профессор (Россия),
А.К. Мирзабалаева — д.м.н., профессор (Россия),
С.М. Озерская — д.б.н. (Россия), И. Полачек —
доктор медицины (Израиль), К.И. Разнатовский —
д.м.н., профессор (Россия), А.Г. Рахманова — д.м.н.,
профессор (Россия), Ф.П. Романюк — д.м.н.,
профессор (Россия), А.В. Самцов — д.м.н., профессор
(Россия), А.В. Соболев — д.м.н., профессор (Россия),
А.А. Степанова — д.б.н. (Россия), Х.Й. Титц — доктор
медицины (Германия), Т.Н. Трофимова — д.м.н.,
профессор (Россия), О.Г. Хурцилава — д.м.н., проф.
(Россия), В.А. Цинзерлинг — д.м.н., профессор
(Россия), Н.В. Шабашова — д.м.н., профессор (Россия),
М.А. Шевяков — д.м.н., профессор (Россия)

Проблематика журнала: Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской микробиологии — биология возбудителей, клиника, диагностика, эпидемиология, иммунитет, терапия и профилактика инфекций, микроорганизмы-контаминанты в лабораторных, клинических и других условиях.

Editorial policy: The Journal «Problems in Medical Mycology» specializes in original articles that describe innovative research on all aspects of Medical Mycology — biology of pathogens, clinic, diagnostic, epidemiology, immunity, therapy and prophylaxis of infections, microorganisms — contaminants in laboratory, clinical and other conditions.

СОДЕРЖАНИЕ

ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

Елинов Н.П. Вирусы бактерий и грибов, или бактериофаги и миковирусы (quinta essentia из доклада на XVI Кашкинских чтениях 20 июня 2013 г.) . . . 3

КЛИНИЧЕСКАЯ МИКОЛОГИЯ

Аак О.В., Фролова Е.В., Учеваткина А.Е., Филиппова Л.В., Соболев А.В., Котрехова Л.П. Микогенная сенсibilизация и степень тяжести atopического дерматита	10
Бухарин О.В., Перунова Н.Б., Челпаченко О.Е., Иванова Е.В., Черных Л.П. Роль межмикробных взаимодействий <i>Candida</i> spp. при патологии опорно-двигательного аппарата у детей	14
Оришак Е.А., Бойцов А.Г., Щеглов В.С. Обоснование расширения спектра выявляемых микроорганизмов при исследовании на дисбиоз кишечника	18
Райденко О.В., Иванова Ю.А. Микозы кожи и ногтей у ВИЧ-инфицированных больных в Алтайском крае	22
Исаев Р.Т., Караев З.О. Исследование действия эритромицина и изотретинона на экспрессию toll-подобных рецепторов 2 и 4 (TLR-2 и TLR-4) моноцитами периферической крови у пациентов с угревой болезнью	25
Медведева Т.В., Леина Л.М., Чилина Г.А., Рублева И.А. Особенности течения микроспорийной инфекции (микроспороза) у новорожденных: описание клинического случая	28
Зиядуллаев У.Х. Цитокиновый профиль при кандидозном вульвовагините у девочек-подростков	31

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МИКОЛОГИЯ

Васильева Н.В., Полищук А.Г., Руднева М.В., Дакс А.А., Шуртицкая О.А., Зайцева М.М. ПЦР с электроспрей-ионизационной масс-спектрометрией в обнаружении и идентификации патогенных микроорганизмов в гемокультурах	35
Еремина Н.В., Жанатаев А.К., Чайка З.В., Васильева Н.В., Елинов Н.П., Богомолова Т.С., Выборнова И.В., Босак И.А., Богданова Т.В., Рябинин И.А., Казей В.И., Рыдкина Е.Б., Пурмаль А.А., Гурова Е.В., Дурнев А.Д. Скрининг противогрибковой активности карбазол-замещенных соединений и оценка генотоксичности молекул-лидеров	42
Леденева М.А., Ткаченко Г.А., Шпак И.М., Вьючнова Н.В., Гришина М.А., Антонов В.А. Изучение генетического полиморфизма коллекционных штаммов <i>Histoplasma capsulatum</i> S. Darling с помощью реакции амплификации с произвольными праймерами и анализа нуклеотидных последовательностей маркерных участков генома	48
Тихомирова О.М., Иванова Е.А. Антагонизм микроорганизмов природной ассоциации «Тибетский рис» в отношении некоторых мицелиальных грибов	55
Доршакова Е.В., Павлова И.Э., Елинов Н.П., Богомолова Т.С., Чилина Г.А., Выборнова И.В., Босак И.А., Васильева Н.В. Антифунгальная активность «строительных биоцидов» в отношении <i>Stachybotrys</i> spp.	60
Ананьева Е.П., Гурина С.В., Козчмыкина Н.В. Сравнительная характеристика эндо- и экзополисахаридов <i>Trametes pubescens</i> (Schumach.) Pilat.	65
Кузикова И.А., Сухаревич В.И., Медведева Н.Г. Сочетанное действие температуры и антимикотиков на фосфолипазную активность оппортунистических микромицетов	69
Иоакимова К.Г., Степанова А.А., Богомолова Т.С., Хостелиди С.Н., Шапочник А.П., Босак И.А., Клишко Н.Н. <i>Mucor</i> species и его ассоцианты – <i>Aspergillus</i> spp. и <i>Candida</i> spp. при диссеминированном микозе у пациента с лейкозом	73

ХРОНИКА И ИНФОРМАЦИЯ

К 85-летию со дня рождения Николая Петровича Елинова	79
Памяти профессора Василия Михайловича Лещенко	81
Правила для авторов	82
Частично обновлённый состав Российской комиссии по номенклатуре патогенных и условно-патогенных грибов (РКНПУГ), утверждённый 21 июня 2013 года на 16 Кашкинских чтениях	84

CONTENTS

PROBLEM ARTICLES

Yelinov N.P. Bacterial and fungal vira, or bacteriophages and mycovira (quinta essentia from the report at XVth Kashkin readings, June 20, 2013). 3

CLINICAL MYCOLOGY

Aak O.V., Frolova E.V., Filippova L.V., Uchevatkina A.E., Sobolev A.V., Kotrakhova L.P. Mold sensitization and the severity of atopic dermatitis	10
Bukharin O.V., Perunova N.B., Chelpachenko O.E., Ivanova E.V., Chernyh L.P. Role of <i>Candida</i> spp. intermicrobial interactions in pathology of locomotor apparatus in children	14
Orishak E.A., Boitsov A.G., Shcheglov V.S. Justification for extension of the revealed microorganisms spectrum in intestinal dysbiosis research	18
Raydenko O.V., Ivanova U.A. Mycoses of skin and nails at the HIV-infected patients in Altay region	22
Isayev R.T., Karaev Z.O. The study of the erythromycin and isotretinoin actions on the expression of toll-like receptors 2 and 4 (TLR-2 and TLR-4) on the surface of monocytes in periferic blood of patients with acne vulgaris	25
Medvedeva T.V., Leina L.M., Chilina G.A., Rubleva I.A. Microsporium infections (microsporiasis) in newborns: a clinical case	28
Ziyadullaev U.K. Cytokine profile in vulvovaginal candidosis at young girls	31

EXPERIMENTAL MYCOLOGY

Vasilyeva N.V., Polischouk A.G., Rudneva V.V., Daks A.A., Shurpickaya O.A., Zajceva M.V. PCR-electrospray ionization mass-spectrometry for detection and identification of pathogenic microorganisms from blood culture	35
Yerjomina N.V., Zhanatayev A.K., Chayjka Z.V., Vasilyeva N. V., Yelinov N.P., Bogomolova T.S., Vybornoiva I.V., Bosak I.A., Bogdanova T.V., Ryabinin I.A., Kazey V.I., Rydkina E.B., Purmal' A.A., Gurova E.V., Durnev A.D. Antifungal activity screening of carbazole-substituted compounds and assessment of genotoxicity of lead molecules	42
Ledenyova M.L., Tkachenko G.A., Shpak I.M., Vyuchnova N.V., Grishina M.A., Antonov V.A. The study of genetic polymorphism in <i>Histoplasma capsulatum</i> S. Darling strains from collection center via random amplification of polymorphic DNA and analysis of genome marking nucleotide sequences	48
Tikhomirova O.M., Ivanova E.A. Antagonistic activity of microorganisms from natural association «Tibetan rice» against some filamentous fungi	55
Dorshakova E.V., Pavlova I.E., Yelinov N.P., Bogomolova T.S., Chilina G.A., Vybornoiva I.V., Bosak I.A., Vasilyeva N.V. Antifungal activity of «construction biocides» concerning <i>Stachybotrys</i> spp.	60
Ananjeva E.P., Gurina S.V., Kozchmyakina N.V. The comparative characteristics of endo- and exopolysaccharides of <i>Trametes pubescens</i> (Schumach.) Pilat.	65
Kuzikova I.L., Sukharevich V.I., Medvedeva N.G. The combined effect of temperature and antifungal agents at phospholipase activity of opportunistic fungi	69
Ioakimova K.G., Stepanova A.A., Bogomolova T.S., Khostelidi S.N., Shapochnik A.P., Bosak I.A., Klimko N.N. <i>Mucor</i> species and its associations – <i>Aspergillus</i> spp. and <i>Candida</i> spp. at disseminated mucosis in patient with leukosis	73

CHRONICLE AND INFORMATION

To 85 years since birthday of Nikolii Pyetrovich Yelinov	79
To the memory of professor Vasyliy Mikhailovich Leschenko	81
Rules for authors	82
Partially updated composition of the Russian Commission on nomenclature of pathogenic and conditionally pathogenic fungi, approved on 21 June 2013 on 16 Kashkin readings	84

ВИРУСЫ БАКТЕРИЙ И ГРИБОВ, ИЛИ БАКТЕРИОФАГИ И МИКОВИРУСЫ (QUINTA ESSENTIA ИЗ ДОКЛАДА НА XVI КАШКИНСКИХ ЧТЕНИЯХ 20 ИЮНЯ 2013 Г.)

Елинов Н.П. (профессор кафедры)*

НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (кафедра медицинской микробиологии), Санкт-Петербург, Россия

© Елинов Н.П., 2013

*Микробный мир заметно возрос к настоящему времени за счёт таких агентов, как бактериофаги, миковирусы, вириоды, прионы и, как следствие, происходят существенные «подвижки» в наших представлениях об их местоположении среди живых существ на планете Земля, о фундаментальных и прикладных проблемах, связанных с их структурой и функцией. В представленных материалах затронуты штрихи истории, происхождения названий (вирус, бактерия, гриб, бактериофаг, миковирус), общая характеристика понятий (микроб, микроорганизм, организованные частицы – вирусы; место организованных частиц в системе микробного мира с приведением классификации вирусов по Балтимору. Рассмотрены вириоды и прионы, приведено строение прионов и вирусов бактерий, а также взаимодействие бактериофага с бактериальными клетками и перспективы использования бактериофагов на практике. Акцент сделан на миковирусах, находящихся в сапробных и/или паразитических ассоциациях с грибами-сапробами или патогенами для разных макроорганизмов; отмечен факт открытия сотрудниками НИИ мед микологии миковируса у *Fusarium javanicum* var. *radicicola* [1].*

Ключевые слова: ассоциации, бактерии, бактериофаги, вириоды, вирусы, грибы, микробный мир, миковирусы, патогены, прионы

BACTERIAL AND FUNGAL VIRA, OR BACTERIOPHAGES AND MYCOVIRA (QUINTA ESSENTIA FROM THE REPORT AT XVITH KASHKIN READINGS JUNE 20, 2013)

Yelinov N.P. (professor of the chair)

Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-Western State Medical University named

* Контактное лицо: Елинов Николай Петрович, Тел.: (812) 303-51-40

after I.I. Mechnikov (Chair of Medical Microbiology), St. Petersburg, Russia

© Yelinov N.P., 2013

*Microbial university has been grown to present time for such agents as bacteriophages, micovira, viroids, prions and, as consequence, essential changes take places essential «mobile actions» in our imagines about their position amongst living beings on planet Land, about fundamental and applied problems connected with their structure and function. In presented materials are affected the touches of history, an origin of names (virus, bacterium, fungus, bacteriophage, mycovirus), general characteristic of ideas (microb, microorganism, organized particles - vira; place of organized particles in system of microbial universe since the bringing of Baltimor' s classification of vira, viroids and prions are considered, It is cited the structure of prions and vira of bacteria, and also an interaction of the bacteriophage with the bacterial cells and perspectives of using of bacteriophages in a practice. The accent has done at mycovira stating in saprobe and/or parasitic associations with fungi - saprobes or pathogens for different macroorganisms; it was marked the fact of the mycovirus discovery by collaborators of KRIMM in *Fusarium javanicum* var. *radicicola* [1].*

Key words: associations, bacteria, bacteriophages, viroids, vira, fungi, microbial university, mycovira, pathogens, prions

ШТРИХИ К ИСТОРИИ:

Шарль Шамберлан в 1884 г. изобрел фильтр с порами меньших размеров, чем размеры бактериальных клеток; Дмитрий Иосифович Ивановский в 1892 г. впервые описал небактериальный патоген растений табака; Николай Фёдорович Гамалея – в 1897 г. обнаружил факт лизиса сибиреязвенных бацилл за счет другого живого агента; голландский ученый Мартин Бейеринк в 1898 г. повторил эксперименты Д.И. Ивановского и доказал, что фильтрующийся материал и есть «вирус», дословно названный им *Contagium vivum fluidum* (живой растворимый микроб).

Английский бактериолог Фредерик Туорт в 1915 г. открыл группу вирусов, инфицирующих бактерии; теперь они известны как бактериофаги, или просто фаги; французско-канадский микробиолог Феликс Д' Эрель в 1917 г. сообщил об открытии бактериофагов (микробы и саранча); В.К. Зворыкин в 1924 г. высказал и реализовал идею создания оптического сканирующего микроскопа на примере современного телевидения, а в 1935 г. принципиально новую идею построения электронного микроскопа сформулировал М. Кноль.

✓ Электронная микроскопия и ультраструктура фагов, особенно фагов Т-группы (Т1-Т7), размножающихся на *Escherichia coli*.

✓ Работы российских и грузинских научно-практических исследователей.

✓ Состояние Проблемы «вирусы бактерий и грибов» в настоящее время в мире.

1. ПРОИСХОЖДЕНИЕ НАЗВАНИЙ:

ВИРУС – от лат. *Virus* – яд

БАКТЕРИЯ – от греч. *Bacteria* – пал(оч)ка

ГРИБ – от лат. *Fungus* – гриб, губка

БАКТЕРИОФАГ – (*Bacteria* – см. выше); от греч.

Phagein – есть, пожирать

МИКОВИРУС – от греч. Mykés – гриб, (Virus – см. выше).

2. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОНЯТИЙ: микроб, микроорганизм, организованные частицы (вирусы, вириды, прионы).

МИКРОБ – (от греч. μικρός – малый). Термин *микробы* впервые произнёс в 80-х годах XIX в. французский хирург Ч.Э. Седилло (1804-1883 гг.) в докладе Французской Академии Наук «О влиянии открытий Л. Пастера на прогресс хирургии». Почти в тот же период (1878 г.) термин *микробы* ввёл В.Ф. Кюне из Гейдельберга. Л. Пастер предложил назвать науку, изучающую организацию и свойства мельчайших существ, *Микробией* (от греч. μικρός – малый, βίωσις – жизнь), но прижился и вошёл в практику термин «*Микробиология*», предложенный Р. Дюкло (от греч. μικρός – малый, βίωσις – жизнь, λωγωσις – учение).

В большинстве своём микробы различимы в микроскопе(-ах). К микробам относят: бактерии, грибы (грибки), одноклеточные водоросли и протисты (простейшие организмы), вирусы, вириды и прионы, составляющие самостоятельные Царства: *Bacteria, Fungi, Planta, Animalia, Vira* и *Organized particles (Viroids, Prions)*, другие организованные частицы – вириды и прионы, соответственно.

Бактерии – чаще одноклеточные организмы, грибы (грибки) и водоросли могут быть одноклеточными и многоклеточными, протисты чаще также одноклеточны.

Функционально микробы различны; с медицинской точки зрения, важными являются их свойства патогенности, то есть способность вызывать заболевания у разных макроорганизмов, включая людей. В научной литературе отмечен тот факт, что только 1% существующих на планете Земля бактерий вызывают болезни человека. Следовательно, сапробные бактерии во много раз численно превышают патогенные бактерии.

МИКРООРГАНИЗМ (от греч. μικρός – малый, от лат. organismus – организм, живое существо). Как правило, микроорганизмы способны развиваться (расти и размножаться) на искусственных и(или) естественных питательных средах, включая и способность паразитировать на (в) живых существах, но такие микробы, как вирусы, вириды и прионы не способны развиваться *ex vivo* (вне живых существ), то есть они являются *облигатными (обязательными)* – от англ. obligator) паразитами. Структурно их нельзя называть организмами – вирусы и вириды фактически являются *организованными частицами, содержащими какой-либо один тип нуклеиновой кислоты -ДНК или РНК (никогда вместе), а прионы – это одиночные инфекционные белковые молекулы.*

3. МЕСТО ОРГАНИЗОВАННЫХ ЧАСТИЦ В СИСТЕМЕ МИКРОБНОГО МИРА (см. ниже)

3.1. ВИРУСЫ

Происхождение вирусов остается неизвестным до сих пор – нет их ископаемых источников, и поэтому *гипотетически* пытаются обосновать возникновение этих частиц, а родственные связи между вирусами доступны изучению лишь с помощью методов молекулярной филогенетики.

Гипотезы о происхождении вирусов:

А) ДЕГЕНЕРАЦИИ, ИЛИ РЕДУКЦИИ (вирусы когда-то были мелкими клетками, паразитирующими в более крупных клетках, и со временем утратившими гены, оказавшиеся «лишними» при паразитическом существовании). В качестве примера называют риккетсии и хламидии (ОБЛИГАТНЫЕ ПАРАЗИТЫ), размножающиеся только внутри другой клетки.

Б) КОЧЕВАНИЯ ИЛИ ПОБЕГА, когда некоторые вирусы появились из фрагментов ДНК или РНК, «высвободившихся» из генома более крупного организма. Например, они могли происходить от плазмид, способных передаваться от клетки к клетке или от транспозонов – молекул ДНК, реплицирующихся и перемещающихся с места на место внутри генома («прыгающие гены», открытые Б. Мак-Клинтон в кукурузе в 1950 г.).

В) КОЭВОЛЮЦИИ, согласно которой вирусы возникли из сложных комплексов нуклеиновых кислот и белков в то же историческое время, что и первые на Земле живые клетки, и зависят от клеточной жизни уже миллиарды лет, включая современную эпоху.

Классификация вирусов по Д. Балтимору (1971) на группы по содержащейся НК [2]:

- 1.1. Класс I - вирусы, содержащие двухцепочечные ДНК.
- 1.2. Класс II - вирусы, содержащие одноцепочечные ДНК.
- 1.3. Класс III - вирусы, содержащие двухцепочечную РНК.
- 1.4. Класс IV - вирусы, содержащие одноцепочечные РНК.
 - 1.4.1. Класс IV - вирусы, содержащие одноцепочечные (+)РНК.
 - 1.4.2. Класс V - вирусы, содержащие одноцепочечные (-)РНК.
- 1.5. Класс VI - вирусы, содержащие одноцепочечные (+)РНК, реплицирующиеся через стадию ДНК.
- 1.6. Класс VII - вирусы, содержащие двухцепочечные ДНК, реплицирующиеся через стадию одноцепочечной РНК.



Фото 1. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине в 1975 г. Дэйвид Балтимор

3.2. ВИРОИДЫ

Это молекулы РНК, у которых нет белковой оболочки, и их не расценивают вирусами. Однако по некоторым свойствам они приближаются к отдельным вирусам, и поэтому их рассматривают **субвирусными частицами**, или **виридами**, оказавшимися заметными патогенами растений. Они не кодируют собственные белки, но взаимодействуют с клетками-хозяевами, используя их в ходе репликации собственной РНК. Кстати заметим, что вирус гепатита D содержит РНК-геном, сходный с геномом виридов, но не способный синтезировать белок оболочки. Чтобы сформировать вирусные частицы, он прибегает к использованию белка капсида вируса гепатита В и, следовательно, может реплицироваться лишь в клетках, зараженных этим вирусом. Вот почему вирус гепатита D является **дефектным**. Однако любая гипотеза остаётся гипотезой, а не аксиомой!

3.3. ПРИОНЫ – инфекционные белковые молекулы, не содержащие нуклеиновых кислот (НК), то есть это – **самокодирующиеся белки**.

Стенли Б. Прузинер впервые в 1982 г. предложил слово «**Прион**», составленное им из первых двух букв в слове **protein** и последних трех букв в слове **infection**. Он – лауреат Нобелевской премии по медицине в 1997 г. – за открытие прионов, **нового биологического принципа инфекции!** [3].



Фото 2. Лауреат Нобелевской премии по медицине в 1997 г. Стенли Б. Прузинер

Прионы выступают патогенами-возбудителями губчатой энцефалопатии у млекопитающих. Так, **прион скрейпи** индуцирует болезнь скрейпи у коз и овец; **прион ТЭН** вызывает трансмиссионную энцефалопатию у норок; **прион CWD** – хроническое опустошающее заболевание у лосей и оленей; **прион ГЭКРС** – губчатую энцефалопатию у крупного рогатого скота (коров); **прион ГЭ** – губчатую энцефалопатию у кошачьих; **прион куру** – болезнь куру у людей (связана с ритуальным каннабализмом народности Форе в восточной части Новой Гвинеи); **прион БКЯ** и новый вариант **vБКЯ** – болезнь Крейтцфельда-Якоба у людей; **прион GSS** – синдром Герстмана-Штойслера-Шейнкера у людей; **прион ФСБ** – фатальную семейную бессонницу у людей.

Прионы способны стимулировать процесс самокопирования. Прионный белок существует в двух изоформах: нормальной – PrP^c и прионной – PrP^{Sc}.

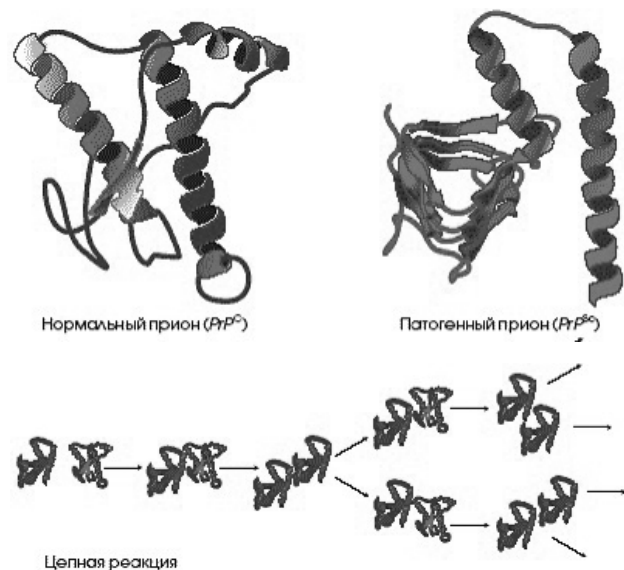


Рис. 1. Две изоформы прионного белка: нормальная – PrP^c и прионная – PrP^{Sc}

Поскольку прионная форма при взаимодействии с нормальным белком способствует его превраще-

нию в исходную прионную форму, можно предполагать, что вирусы могли произойти от самовоспроизводящихся молекул.

4. СТРОЕНИЕ ВИРУСОВ

4.1. СТРОЕНИЕ ВИРУСОВ БАКТЕРИЙ, ИЛИ БАКТЕРИОФАГОВ.

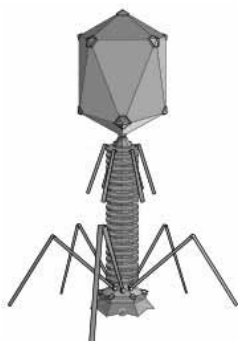


Рис. 2. Бактериофаг

По размеру бактериофаги в сотни и тысячи раз меньше микробных клеток. Наиболее типичная форма их – головка с хвостом (отростком). По длине хвост в 2-4 раза больше диаметра головки, в которой содержится **одноцепочечная или двухцепочечная РНК или ДНК (генетический материал) с транскриптазой в неактивном состоянии**. Головка окружена белковой или липопротеиновой оболочкой – **капсидом**, сохраняющим геном вне клетки. **НК + Капсид = Нуклеокапсид!**

Согласно номенклатуры и классификации вирусов (2000) фаги подразделили на РНК-содержащие и ДНК-содержащие, из которых первые включают 2 семейства (*Cystoviridae* и *Leviviridae*), а вторые – 10 семейств: *Corticoviridae*, *Fusselloviridae*, *Inviridae*, *Lipothrixviridae*, *Myoviridae*, *Plasmaviridae*, *Plectovirus*, *Podoviridae*, *Siphoviridae*, *Tectiviridae* [4].

Бактериофаги могут иметь икосаэдрический капсид – правильный двадцатигранник, собранный из множества копий одного или двух специфических белков. Углы структуры головки преимущественно состоят из пентамеров белка, а опора каждой стороны – из гексамеров того же или сходного белка.

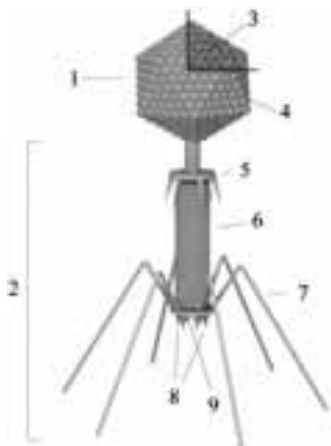


Рис. 3. Структура бактериофага: 1 - головка, 2 - хвост, 3 - нуклеиновая кислота, 4 - капсид, 5 - «воротничок»,

6 - белковый чехол хвоста, 7 - фибрилла хвоста, 8 - шипы, 9 - базальная пластинка

Хвост (отросток) фага представлен белковой трубкой, являющейся своеобразным продолжением белковой оболочки головки; в основании хвоста содержится АТФ-аза, регенерирующая энергию для инъекции генетического материала.

Известны также фаги с коротким отростком или без него, а также нитевидные. К тому же по форме различают фаги сферические, овальные или плеоморфные.

4.2. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БАКТЕРИОФАГА С БАКТЕРИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ [5, 6].

Подобно всем вирусам, фаги являются облигатными (внутриклеточными) паразитами. Несмотря на то, что они переносят всю информацию для запуска собственной репродукции в соответствующем хозяине, они лишены механизмов выработки энергии и рибосом для синтеза белка. По типу взаимодействия бактериофагов с бактериальными клетками различают **вирулентные** и **умеренные** фаги.

Первые только возрастают в количестве посредством литического цикла, включающего 5 последующих стадий: адсорбция фага на клетке, проникновение в клетку, биосинтез компонентов фага и их сборка, выход бактериофага из клетки.



Рис. 4. Взаимодействие бактериофага с бактериальными клетками

Продолжительность этого процесса во времени может составлять от нескольких минут до нескольких часов. После лизиса клеток освобождаются новые частицы зрелого бактериофага. Альтернативой рассмотренному литическому циклу выступает **лизогенный цикл**, при котором фаг, вместо репликации, обратимо взаимодействует с генетической системой клетки-хозяина, интегрируясь в хромосому или сохраняясь в форме плазмиды. В этом цикле вирусный геном реплицируется синхронно с ДНК клетки-хозяина и ее делением. Фаг в подобном состоянии называю **профагом**.

Бактерия, содержащая профаг, становится лизогенной до тех пор, пока при определенных условиях или спонтанно профаг не будет стимулирован на

реализацию **лизирующего цикла репликации**. Этот переход от лизогении к лизису именуют **лизогенной индукцией** или **индукцией профага**. Отметим, что скудные условия для роста и развития клетки-хозяина способствуют **возникновению лизогенного пути** и, напротив, хорошие условия способствуют **развитию литической модели**. По специфичности бактериофаги различают: видовые, типовые и поливалентные (лизируют бактерии разных видов).

Белоксинтезирующий аппарат бактерии «эксплуатируется» НК-й фага, направляющей синтез ферментов фага, любым способом инактивирующих ДНК и РНК клетки-хозяина. В итоге РНК фага переключает на себя клеточный аппарат синтеза белка; происходит спонтанная самосборка капсида (белковой оболочки головки) фага и синтез лизоцима. Последний катализирует реакцию лизиса клетки с высвобождением порядка 200-1000 новых частиц, инфицирующих другие бактерии.

4.3. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ НА ПРАКТИКЕ

4.3.1. В генной инженерии в качестве векторов, переносящих участки ДНК или трансдукторов при естественной передаче генов между бактериями.

Фаговые векторы обычно создают на базе умеренного бактериофага λ , содержащего двухцепочечную линейную молекулу ДНК [7].

Определенные модифицированные фаги λ проходят литический цикл без лизогении. Примечательно, что фаги без вставок (менее 38 000 пар нуклеотидов) или, напротив, со слишком большими вставками (более 52 000 пар) не развиваются и не поражают бактерии.

4.3.2. Репликация бактериофагов происходит только в живых клетках, и поэтому их используют для определения жизнеспособности бактерий, например, в клеточной биотехнологии.

4.3.3. В медицине как альтернатива антибиотикотерапии. На практике сравнительно давно применяют следующие бактериофаги: дизентерийный, клебсиеллезный, колипротейный, колифаг, пшибактериофаг, поливалентный, протейный, стафилококковый, стрептококковый и др. Сравнительная оценка фагов и антибиотиков при лечении патологических бактериальных процессов у людей.

ВИРУСЫ ГРИБОВ, ИЛИ МИКОВИРУСЫ

У большинства грибов вирусы существуют преимущественно как сапробы. Отдельные грибные штаммы могут поражаться многими вирусами, однако большинство миковирусов тесно связаны со своим единственным хозяином, передаваемым вирус своим потомкам. Ныне вирусы изолированы из 73 видов 57 родов, относящихся к 5 классам; детально описано свыше 5 000 видов их, но предполагают что вирусов существуют миллионы [8]. Отдельные систематики и таксономисты полагают, что вирусы

– это одна из наиболее многочисленных биологических форм, имеющих почти в каждой экосистеме на Земле (начиная от вирусов и архей, и кончая растениями и животными).

Основные таксономические единицы вирусов представлены: отрядами (-virales), семействами (-viridae) подсемействами (virinae), родами (-virus), видами (-virus). По современной классификации ICTV в неё включены 7 отрядов, 87 семейств, 19 подсемейств, 349 родов, около 2 300 видов и более 3 000 ещё не классифицированных вирусов. Специальный комитет в составе ICTV, занимающийся классификацией миковирусов, выделяет 3 семейства их с наиболее изученными в семействе Totiviridae [9].

Как установлено, пенициллы проявляют антивирусную активность вследствие индукции интерферона двухцепочечной РНК от вирусов, поражающих грибы. В тех же случаях, когда миковирус при попадании в гриб проявляет вирулентность, то «организм-хозяин-патоген» проявляет себя либо повышением вирулентности, либо снижением её; дегенерацией мицелия и плодовых тел, изменением окраски, подавлением спороношения. Некапсидированные вирусные РНК передаются через анастомозы независимо от митохондрий.

Миковирусы, индуцирующие гиповирулентность грибов – патогенов, могут быть использованы для борьбы с микотическими заболеваниями у людей, животных или растений, вызываемых такими гиповирулентными возбудителями.

Вирусные заболевания грибов могут наносить ущерб грибоводческим предприятиям (потеря товарного вида у целевого продукта – например, побурение плодовых тел шампиньонов, изменение окраски у зимнего опёнка, выраженное снижение плодовой массы и др.).

Вирусы имеют генетические связи с представителями флоры и фауны на Земле. Принято считать, что геном человека более чем на 30% состоит из вирусоподобных элементов, транспозонов и их остатков.

Вирусам принадлежит важная роль в молекулярной и клеточной биологии. Как системы – они просты, их можно использовать для изучения и управления функционированием клеток.

Открытый нами миковирус у *Fusarium javanicum* var. *radicicola*, являющийся двунитовой РНК-содержащей структурой, потенциально заманчив для индукции противовирусного интерферона *in vivo*.

Не так давно открыто явление **РНК-интерференции** – как **важный защитный механизм**, помогающий клеткам эукариот бороться с вирусами и подавлять активность эгоистических фрагментов ДНК – транспозонов. В 2006 г. это открытие было отмечено Нобелевской премией (фото 3).

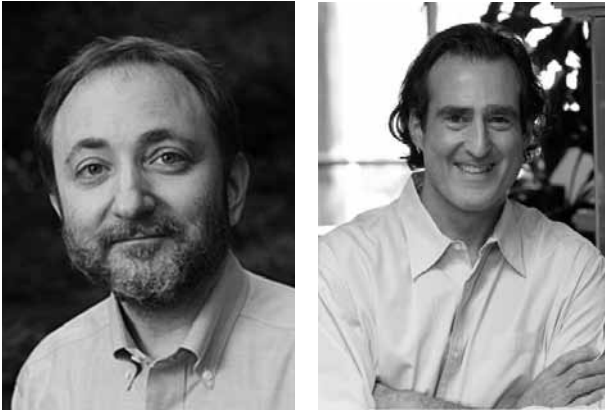


Фото 3. Лауреаты Нобелевской премии по физиологии и медицине в 2006 г. Эндрю Файр (слева) и Крейг Мело за открытие механизма РНК-интерференции (подавления экспрессии) генов двухцепочечной РНК

Однако дрожжи и некоторые другие грибы утратили систему РНК-интерференции, что позволяет им содержать в своих клетках симбиотический вирус, который помогает таким грибам уничтожать конкурентов [10].

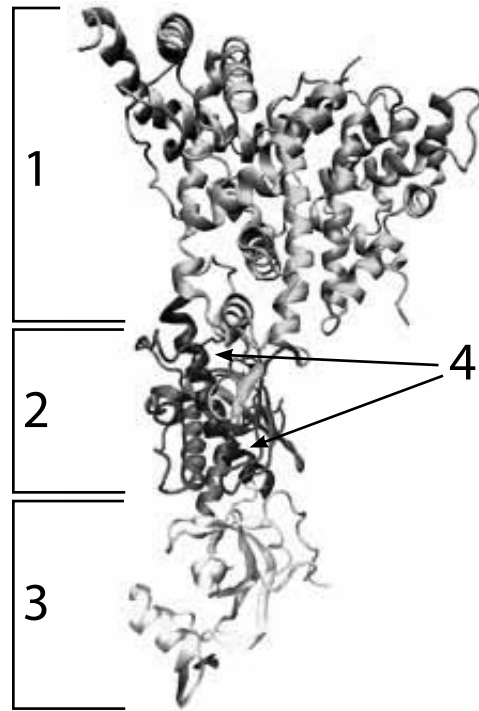


Рис. 6. РНК-интерференция вирусов, второй этап. Домен с РНК-азной активностью (Dicer) – 1, домен первично-зависимые РНК-полимеразы – 2; основной домен – 3; соединительная спираль – 4

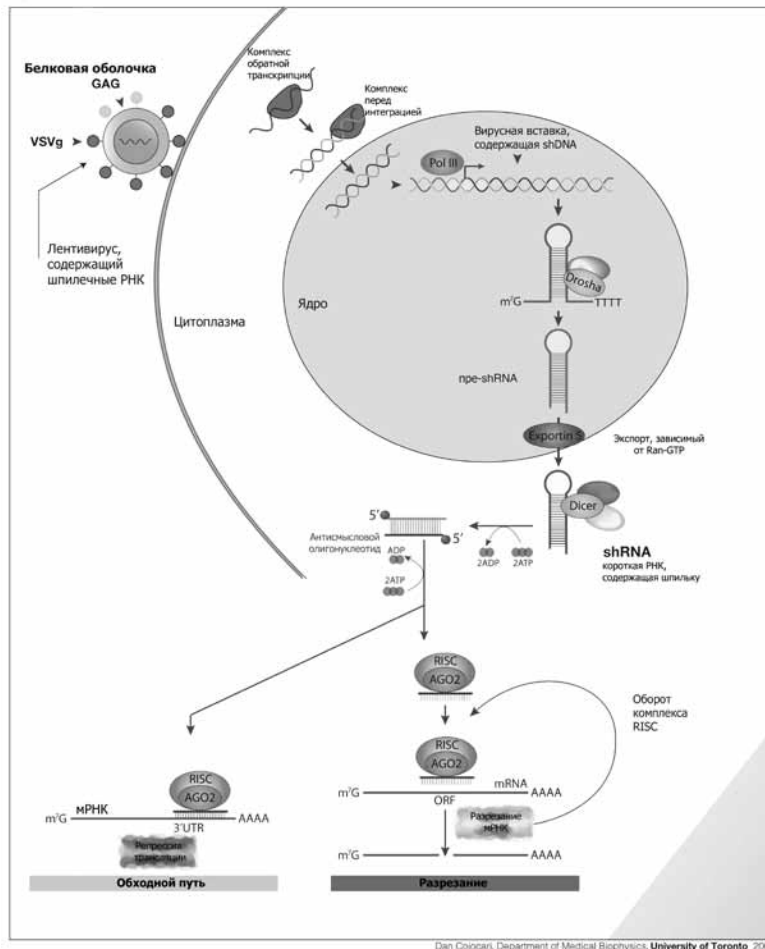


Рис.5. РНК-интерференция вирусов, первый этап

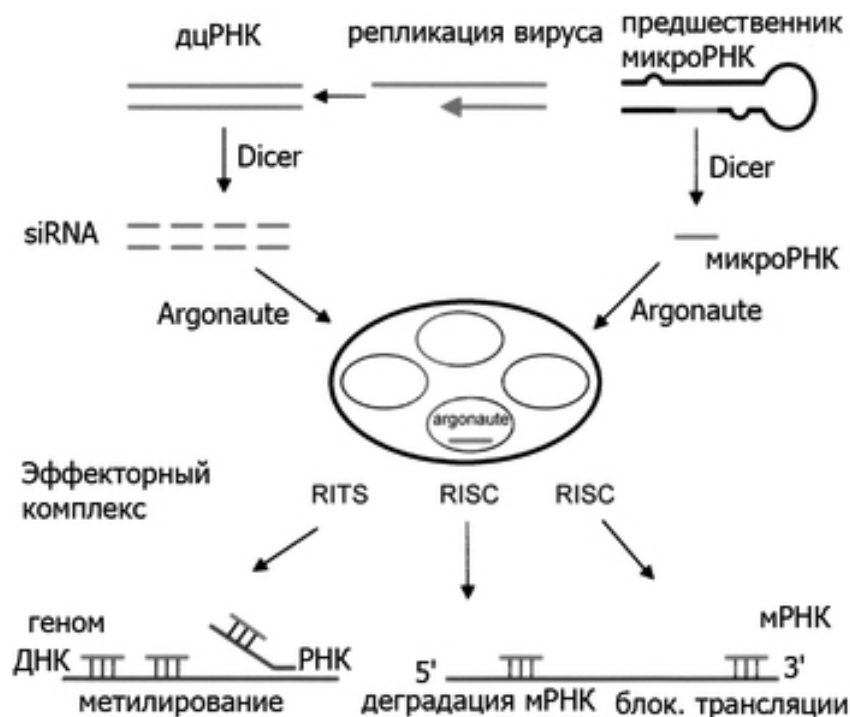


Рис. 7. Общая схема РНК-интерференции вирусов, дцРНК - двухцепочечная РНК; Dicer и Argonaute - белки-ферменты; RITS-RNA - индуцированные transcriptional silencing; RISC-RNA - индуцированный silencing complex

Ключевую роль в работе системы РНК-интерференции играют белки Dicer и Argonaute (Рис. 5-7). Первый атакует двухцепочечную РНК и вырезает из нее короткие фрагменты, которые затем присоединяются ко второму белку Argonaute. Образовав-

шийся комплекс из белка и короткой РНК находит и уничтожает любые молекулы РНК, содержащие такую же последовательность нуклеотидов, как в коротком фрагменте.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Диплом № 326 на открытие «Внутриклеточный вирус WR». Авторы: Журавлёва Н.П., Елинов Н.П., Васильева Н.В., Семёнов В.В., Сироткин А.К., Давыденко С.Г. Приоритет открытия 1 июля 1999 г. 5 февраля 2007 г. – Москва. – Регистрационный № 406.
2. Baltimore D. Expression of animal virus genomes // *Bacteriol. Rev.* – 1971. – Vol. 35, N3. – P. 235-241.
3. Prusiner S.B., Scott M.B. Genetics of prions // *Annual. Rev. Genet.* – 1997. – Vol. 31. – P. 139-175.
4. Van Regenmontal M.H.V., et al. Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Seven report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. – San Diego: Academic Press. – 2000. – P. 43-53, 64-129.
5. Guttman B., Reya R., Kutter E. Basic Phage Biology/ in: *Bacteriophages: Biology and Applications* (Kutter E. and Sulakvelidze A. ed). – CRP Press. – 2005. – P. 29-66.
6. Raya R.R., Hebert E.M. Isolation of phage via induction of lysogens. *Bacteriophages: methods and protocols*, vol. 1: isolation, characterization and interaction (Clokie M.R.J., Kropinski A.M, eds). – 2009. – Vol. 501. – P. 23-32.
7. Мирошников К.А. Бактериофаги. – 2013. – Postnauka – 465 с.
8. Breitbart M., Rohver F. Здесь вирус, там вирус, везде те же вирусы? // *Trends Microbiol.* – 2005. – Vol. 13, №6. – P. 278-284.
9. McGraw-Hill. Science & Technology Encyclopedia: Fungal virus. – 2013.
10. Fire A., Xu S., Montgomer M., et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* // *Nature.* – 1998. – Vol. 391 (6669). – P. 806-811.

Поступила в редакцию журнала 27.08.2013

Рецензент: М.А. Шевяков



МИКОГЕННАЯ СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ И СТЕПЕНЬ ТЯЖЕСТИ АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА

¹ Аак О.В. (в.н.с.)*, ¹ Фролова Е.В. (зав. лаб.), ¹ Учеваткина А.Е. (с.н.с.), ¹ Филиппова Л.В. (н.с.), ² Соболев А.В. (проф. кафедры), ³ Котрехова Л.П. (доцент кафедры)

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова: ¹ НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина; ² Кафедра клинической микологии, аллергологии и иммунологии; ³ Кафедра дерматовенерологии, Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2013

149 больным atopическим дерматитом было проведено микологическое, а также аллергологическое и иммунологическое обследование. Определен спектр сенсibilизации к 36 распространенным аллергенам, включая 6 грибковых. Установлена достоверная связь тяжести заболевания с микогенной сенсibilизацией. У больных с микогенной сенсibilизацией выявлено достоверное повышение продукции ИЛ-6.

Ключевые слова: atopический дерматит, микогенная сенсibilизация, SCORAD, цитокины

MOLD SENSITIZATION AND THE SEVERITY OF ATOPIC DERMATITIS

¹ Aak O.V. (leading scientific collaborator), ¹ Frolova E.V. (head of the laboratory), ¹ Filippova L.V. (scientific collaborator), ¹ Uchevatkina A.E. (senior scientific collaborator), ² Sobolev A.V. (professor of the chair), ³ Kotrekhova L.P. (associate professor of the chair)

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov: ¹ Kashkin Research Institute of Medical Mycology; ² Chair of Clinical Mycology, Allergology and Immunology; ³ Chair of Dermatoveneorology, St. Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2013

To 149 patients with atopic dermatitis mycological, allergy and immunological study was conducted. The spectra of sensitization to 36 common allergens, including 6 fungal have been obtained. There was a significant relationship between the severity of the disease and mold sensitization. Patients with mold sensitization showed a significant increase in IL-6 production.

Key words: atopic dermatitis, cytokines, mold sensitization, SCORAD

* Контактное лицо: Аак Олег Владимирович, тел.: (812) 303-51-40

Актуальность проблемы atopического дерматита (АД) определена значительным ростом частоты заболевания. За последние 20 лет распространенность аллергических заболеваний возросла в 3-4 раза и охватывает в разных странах около 10% взрослого и 25% детского населения [1-3].

Основными звеньями патогенеза АД считают генетическую предрасположенность, нарушение барьерной функции кожи, нейровегетативные расстройства, нарушения обмена веществ, сенсibilизацию к продуктам питания и аллергенам окружающей среды, а также бактериальную и микогенную сенсibilизацию [2-4].

Европейская академия аллергологии и клинической иммунологии и Американская академия аллергии, астмы и иммунологии в 2006 г. приняли согласованный документ, в котором сказано: «Атопический дерматит – хроническое воспалительное заболевание кожи, развитие которого связано с комплексным процессом, включающим взаимодействие генетических факторов, факторов окружающей среды, дефектов барьерной функции кожи и иммунологического ответа» [4]. Таким образом, АД имеет сложную многофакторную патогенетическую основу, обусловленную взаимодействием неиммунных (неспецифических) и иммунных (специфических) факторов.

В последнее время большое внимание обращают на дефекты эпителиального барьера кожи как исходное событие в возникновении АД. Однако считают, что ключевая роль в развитии АД принадлежит иммунологическому воспалению с вовлечением в процесс различных иммунокомпетентных клеток и ряда биологически активных веществ [4, 5, 6-8].

Как известно, иммунный ответ представляет собой комплекс эффекторных и супрессорных механизмов. Дисбаланс в данной системе приводит к различным иммунным нарушениям. В результате проводимых в последнее десятилетие клинических и экспериментальных исследований отметили значимую роль в развитии аллергической патологии разных компонентов клеточного и гуморального иммунитета и их взаимодействия. Так, при изучении особенностей иммунного ответа при АД выявили нарушение соотношения Т-хелперов 1 и 2 типов [9]. Наличие изменений врожденного и приобретенного иммунных ответов у пациентов с АД индуцирует повышенную чувствительность к бактериальной, грибковой и вирусной инфекциям. В то же время, некоторые участники нормобиоты кожи, например, дрожжевые грибы перхоти (*Malassezia* spp.), могут быть источниками аллергенов и причиной обострения и/или осложнений болезни. По данным некоторых авторов, у больных АД уровень специфического IgE (sIgE) к *M. furfur* выше, чем у здоровых лиц [8, 10-13].

Однако, несмотря на достигнутый прогресс в понимании патогенеза АД, остаются без ответа вопросы, касающиеся условий возникновения и развития

иммунологических нарушений, особенностей регуляторных механизмов аллергического воспаления и степени участия в этих процессах аллергенов, поступающих в организм человека перорально, ингаляционно и транскутанно (микро- и микобиота кожи).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили среди пациентов микологической клиники НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, госпитализированных по программе оказания высокотехнологичной медицинской помощи в период с 2007 по 2012 гг. Критерии включения: возраст от 18 лет и старше, диагноз атопического дерматита с давностью установления не менее 6 месяцев; критерии исключения: возраст младше 18 лет, беременность, лактация, алкогольная и наркотическая зависимости. В исследование включили 149 больных АД: 89 женщин (59,7% от числа всех обследованных лиц) в возрасте от 18 до 68 лет (медиана – 27 лет) и 60 мужчин (40,3%) в возрасте от 18 до 73 лет (медиана – 26 лет).

Всем пациентам проводили микологическое исследование кожных чешуек, ногтей, длинных и пушковых волос с целью выявления грибов-комменсалов, затем – прямую микроскопию патологического материала с КОН. Видовую идентификацию возбудителей осуществляли с помощью культурального исследования [14].

В сыворотках крови пациентов определяли уровни общего (с использованием наборов ООО «Полигност») и специфических иммуноглобулинов E (с использованием наборов аллергопанелей «Russian Panel IV» Hitachi Diagnostics на 36 аллергенов).

Продукцию интерферона-γ (ИФН-γ), интерлейкинов (ИЛ) ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-17 определяли в супернатантах клеток крови после 24-часовой индукции фитогемагглютинином с использованием коммерческих иммуноферментных тест-систем («Цитокин»,

«Вектор-Бест», Россия).

Степень тяжести АД оценивали по индексу SCORAD (Severity Scoring of Atopic Dermatitis), который определяли по общепринятой методике [15].

Полученные данные проанализировали с помощью программы STATISTICA for Windows (версия 6.0) с использованием методов и критериев непараметрической статистики.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Грибы-комменсалы в образцах кожи и придатков обнаружили у 81 больного. В 71 случае при посеве удалось идентифицировать носительство: *Malassezia* spp. – у 53 пациентов (74,7%), *Candida albicans* – у 14 (19,7% случаев), *Rhodotorula mucilaginosa* – у 3 (4,2%) и *Ttichophyton rubrum* – у 1 (1,4%).

Общий IgE определяли у всех обследованных лиц. Минимальное значение составило 1 МЕ/мл, максимальное – 1576 МЕ/мл. sIgE (в панелях по 36 аллергенов) исследовали у 106 больных АД. Сенсibilизацию к грибковым аллергенам выявили у 61 пациента (57,5% случаев).

Уровень sIgE в аллергопанелях оценивают в баллах – от 0 до 4. Полный спектр сенсibilизации (1 балл и выше) приведен на рисунке 1. Его вид характерен для исследуемой патологии. АД является единственной формой атопии, при которой сенсibilизация к грибковым аллергенам сравнима с сенсibilизацией к пыльцевым и бытовым аллергенам. Из пищевых аллергенов сенсibilизация наиболее выражена к молоку, яйцу, сое и треске.

Согласно расчету критерия Колмогорова-Смирнова для распределений величины уровня общего IgE и sIgE к отдельным аллергенам, установили, что во всех рассматриваемых случаях эти распределения нельзя принять нормальным.

Расчет индексов SCORAD проводили для всех больных на момент госпитализации; по его резуль-

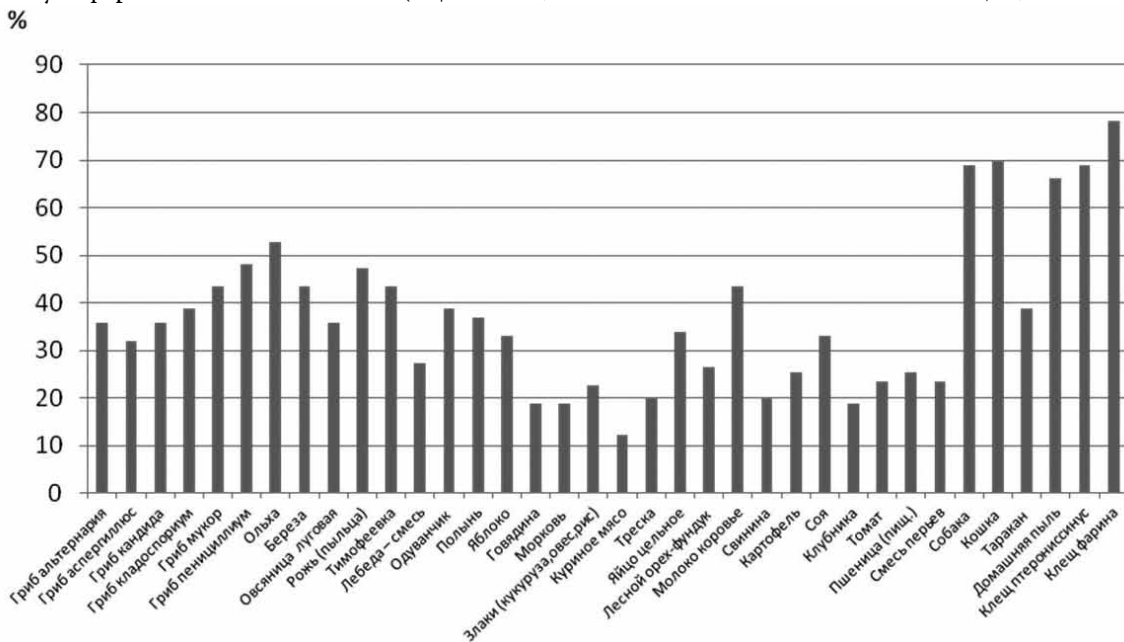


Рис. 1. Спектр сенсibilизации у больных АД

татам оценивали состояние больных АД, как легкое (SCORAD =0-14), средней тяжести (SCORAD >14-40) и тяжелое (SCORAD >40) [16]. В исследуемой группе выявили 1 человека с легкой формой заболевания, 21 – со средней тяжести, остальные – с тяжелой формой АД.

С учетом того, что большинство полученных в ходе исследования показателей не обладали нормальным распределением, анализ проводили с помощью непараметрических методов. Для выявления связи полученных данных с тяжестью АД выполняли парный корреляционный анализ с вычислением коэффициента ранговой корреляции Спирмена (табл. 1).

Таблица 1

Связь тяжести АД с микогенной сенсibilизацией

Специфичность иммуноглобулинов E	Коэффициент корреляции Спирмена, $p < 0,05$
	SCORAD
IgE общ.	0,366
<i>Alternaria</i> spp.	0,444
<i>Aspergillus</i> spp.	0,377
<i>Candida</i> spp.	0,281
<i>Cladosporium</i> spp.	0,475
<i>Mucor</i> spp.	0,457
<i>Penicillium</i> spp.	0,466
Яйцо цельное	0,301
<i>D. fariniae</i>	0,320

Была выявлена умеренная степень корреляции между уровнем сенсibilизации к грибам и SCORAD (а также его составляющими). Корреляция для разных грибов различалась. Самой слабой она была для дрожжей, а наиболее сильной – для микромицетов родов *Cladosporium*, *Mucor* и *Penicillium*.

Во всех случаях корреляция тяжести заболевания и сенсibilизации к аэроаллергенам грибов была выше, нежели корреляция с сенсibilизацией к продуктам питания или же бытовым аллергенам. Так, в случае SCORAD коэффициент корреляции для продуктов питания не превышал 0,330, а для бытовых аллергенов – 0,320.

Достоверная корреляция индекса SCORAD и обнаружения микромицетов при культуральном исследовании патологического материала (включая *Malassesia* spp.) не выявлена, однако это не исключает возможность установления роли микобиоты кожи в патогенезе АД методами количественной ПЦР и определения sIgE в сыворотке крови.

На основании проведенного корреляционного анализа, из общего числа больных АД были выделены две группы: I группу составили пациенты без сенсibilизации к грибам, II группу – больные, у которых была выявлена сенсibilизация, по меньшей мере, к одному из грибковых аллергенов, входящих в состав аллергопанели. В качестве контрольной группы было обследовано 20 практически здоровых людей, (медиана возраста – 29 лет), у которых в анамнезе не было указаний на аллергические проявления, и отсутствовала отягощенная наследственность.

Установлены достоверно высокие показатели SCORAD – 74,5 (60,9÷85,8) и общего IgE – 895,0

(768,5÷951,5) МЕ/мл у больных II группы, по сравнению с данными I группы, – 54,7 (42,8÷65,9) и 409,5(84,0÷842,0) МЕ/мл соответственно.

При оценке функциональной активности лейкоцитов периферической крови выявили, что у всех обследованных больных АД снижена продукция ключевого цитокина клеточного иммунного ответа ИФН- γ и не изменена выработка ИЛ-17 и ИЛ-10 по сравнению с показателями контрольной группы (табл. 2).

Таблица 2.

Цитокиновый профиль различных групп больных АД

Показатели	Пациенты		
	без микогенной сенсibilизации (n=26)	с микогенной сенсibilизацией (n=23)	контрольной группы (n=20)
	Медиана (25%÷75%)	Медиана (25%÷75%)	Медиана (25%÷75%)
ИФН- γ инд (пг/мл)	365,0 (314,0÷498,0) *0,000	398,0 (195,0÷530,0) *0,000	749,0 (544,0÷1258,0)
ИЛ-6 (пг/мл)	271,0 (271,0÷300,0)	477,0 (294,0÷796,0) *0,015 **0,045	279,5 (233,0÷367,0)
ИЛ-17 (пг/мл)	174,0 (123,0÷207,0)	218,0 (65,0÷300,0)	150,0 (123,0÷186,0)
ИЛ-10 (пг/мл)	332,0 (187,0÷415,0)	334,0 (188,0÷416,0)	333,0 (302,0÷411,0)

Представлены медианные значения с интерквартильным размахом (25% ÷ 75%);

* - достоверность различий показателей по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$);

** - достоверность различий показателей между группами пациентов ($p < 0,05$).

Полученные данные согласуются с представлением о том, что именно ИФН- γ , активируя нейтрофилы и макрофаги, играет ведущую роль в защите от различных микроорганизмов, колонизирующих кожные покровы [17].

У больных АД II группы обнаружили достоверное повышение синтеза ИЛ-6 по сравнению с показателями I группы (табл.2). Известно, что ИЛ-6 является одним из наиболее активных цитокинов, участвующих в реализации иммунного ответа и воспалительной реакции. Т-хелперы, моноциты-макрофаги, фибробласты, эндотелиальные клетки и кератиноциты участвуют в его продукции. Активный синтез ИЛ-6 начинается сразу после воздействия на клетки различных микроорганизмов, аллергенов и медиаторов иммунного ответа. Основное действие ИЛ-6 связано с его участием в качестве кофактора при дифференцировке В-лимфоцитов, их созревании и преобразовании в плазматические клетки, секретирующие иммуноглобулины. Важность ИЛ-6 в течение АД подтверждено положительной корреляционной связью между способностью клеток крови к его продукции и степенью тяжести АД, оцениваемой по SCORAD ($r = 0,55$, $p < 0,05$). Полученные данные согласуются с результатами других авторов [18], но нами впервые выявлена данная взаимосвязь при изучении влияния микогенной сенсibilизации на особенности течения АД. Вероятно, способность клеток крови к продукции ИЛ-6 может служить маркером тяжести

заболевания, а также показателем эффективности лечения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. При обследовании пациентов с тяжелой формой АД сенсibilизацию к грибковым аллергенам выявили в 57,5% случаев.

2. Установлена достоверная связь микогенной сенсibilизации и тяжести течения атопического

дерматита.

3. Корреляция степени тяжести заболевания и уровня сенсibilизации к аэроаллергенам микромицетов была выше, чем для пищевых и бытовых аллергенов.

4. У пациентов с АД и при наличии микогенной сенсibilизации обнаружили достоверно высокую продукцию ИЛ-6 по сравнению с показателями, выявленными у больных без сенсibilизации.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Гевазиева В.Б., Самойликов П.В., Сверановская В.В. Современные аспекты иммунопатогенеза атопического дерматита // Российский аллергологический журнал. – 2006. – №3. – С. 5-12.
2. Tao Z., Jinho Y., Min H.O., et al. The atopic march: progression from atopic dermatitis to allergic rhinitis and asthma // Allergy Asthma Immunol. Res. – 2011. – Vol. 3, №2. – P. 67-73.
3. Hanifin J.M. Evolving concepts of pathogenesis in atopic dermatitis and other eczemas // J. of Investigative Dermatology. – 2009. – Vol. 129. – P. 320-322.
4. Akdis C., et al. Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL Consensus Report // J. Allergy Clin. Immunol. – 2006. – Vol. 118, №1. – P. 152-169.
5. Ong P.Y., Leung D.Y.M. The infectious aspects of atopic dermatitis // Immunol. Allergy Clin. North. Am. – 2010. – Vol. 30, №3. – P. 309-321.
6. Khosravi M., Hedayati T., Mansouri P., et al. Immediate hypersensitivity to *Malassezia furfur* in patients with atopic dermatitis // Mycoses. – 2007. – Vol. 50. – P. 297-301.
7. Brandt E.B., Sivaprasad U. Th2 cytokines and atopic dermatitis // J. Clin. Cell. Immunol. – 2011. – Vol. 2, №3. – P. 143-152.
8. Baker B.S. The role of microorganisms in atopic dermatitis // British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology. – 2006. – Vol. 144. – P. 1-9.
9. Jutel M., Akdis C.M. T-cell subset regulation in atopy // Curr. Allergy Asthma Rep. – 2011. – Vol. 11. – P. 139-145.
10. Takuji N., Yoshimi N. Fungus as an exacerbating factor of atopic dermatitis, and control of fungi for the remission of the disease, atopic dermatitis – disease etiology and clinical management. – InTech, 2012. – 414 p.
11. Faergemann J. Atopic Dermatitis and Fungi // Clin. Microbiol. Rev. – 2002. – Vol. 15, №4. – P. 545-563.
12. Мокроносова М.А. Грибы рода *Malassezia* и атопический дерматит // Российский аллергологический журнал. – 2008. – №1. – С. 12-18.
13. Takahata Y., Sugita T., Kato H., et al. Cutaneous *Malassezia* flora in atopic dermatitis differs between adults and children // Br. J. Dermatol. – 2007. – Vol. 157, №6. – P. 1178-1182.
14. Елинов Н.П., Васильева Н.В., Разнатовский К.И. Дерматомикозы, или поверхностные микозы кожи и её придатков – волос и ногтей. Лабораторная диагностика // Проблемы медицинской микологии. – 2008. – Т. 10, №1. – С. 27-34.
15. Oranje A.P., Glazenburg E.J., Wolkerstorfer A., de Waard-van der Spek F.B. Practical issues on interpretation of scoring atopic dermatitis: the SCORAD index, objective SCORAD and the three-item severity score // British J. Dermatology. – 2007. – Vol. 157. – P. 645-648.
16. Willemsen M.G., van Valburg R.W.C., Dirven-Meijer P.C., et al. Determining the severity of atopic dermatitis in children presenting in general practice: an easy and fast method // Dermatology Research and Practice. – 2009. – Article ID 357046. – 5 p.
17. Учеваткина А.Е., Котрехова Л.П., Разнатовский К.И., Гурбанова М.Г. Иммунопатогенез атопического дерматита и роль грибов-комменсалов кожи // Проблемы медицинской микологии. – 2012. – Т. 14, №4. – С. 11-19.
18. Satochoki Z., Alifler M., Boderia P., et al. T-regulatory cells in severe atopic dermatitis: alterations related to cytokines and other lymphocyte subpopulations // Arch. Dermatol. Res. – 2012. – Vol. 304. – P. 795-801.

Поступила в редакцию журнала 17.09.2013

Рецензент: Я.И. Козлова



РОЛЬ МЕЖМИКРОБНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ *CANDIDA* SPP. ПРИ ПАТОЛОГИИ ОПОРНО- ДВИГАТЕЛЬНОГО АППАРАТА У ДЕТЕЙ

¹Бухарин О.В. (г.н.с.), ¹Перунова Н.Б.* (зав. лаб.), ¹Челпаченко О.Е. (в.н.с.), ¹Иванова Е.В. (в.н.с.), ²Черных Л.П. (зав. отд.)

¹ Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург; ² Муниципальная городская клиническая больница № 6 г. Оренбурга, Россия

© Коллектив авторов, 2013

Представлены результаты клинико-бактериологические исследования кишечной микробиоты детей с патологией опорно-двигательного аппарата (ОДА) в сравнении со здоровыми детьми. Выявлена гиперколонизация *Candida* spp., поддерживаемая ассоциацией условно-патогенной микробиоты, и ее антагонистический эффект в биокоммуникативных взаимоотношениях с доминантными микросимбионтами – бифидобактериями у детей с патологией ОДА. При изучении межмикробных связей в микросимбиозе кишечника у детей с данной патологией установлен синергидный эффект *Candida* spp. в отношении персистентного потенциала ассоциативных микросимбионтов. Представленные материалы служат основой для патогенетического обоснования формирования стойкого дисбиоза у детей с нарушениями ОДА и рассмотрения его в качестве фактора риска развития этой патологии.

Ключевые слова: биокоммуникация, дисбиоз кишечника, *Candida* spp., патология опорно-двигательного аппарата, персистенция

ROLE OF *CANDIDA* SPP. INTERMICROBIAL INTERACTIONS IN PATHOLOGY OF LOCOMOTOR APPARATUS IN CHILDREN

¹Bukharin O.V. (chief scientific officer),
¹Perunova N.B. (head of the laboratory),
¹Chelpachenko O.E. (leading scientific
collaborator), ¹Ivanova E.V. (leading
scientific collaborator), ²Chernyh L.P. (head
of the department)

¹ Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis of Ural Department for the Russian Academy of Sciences, Orenburg; ² Orenburg Municipal Clinical Hospital № 6, Russia

© Collective of authors, 2013

* Контактное лицо: Перунова Наталья Борисовна, Тел.: 8 (3532) 77-59-08

*Clinico-bacteriological investigations of intestinal microbiota were carried out in children with pathology of locomotor apparatus (LMA) in comparison with healthy children. Hypercolonization of *Candida* spp. was revealed that was supported by opportunistic pathogenic microbiota and antagonistic effect of fungi in biocommunicative interactions with dominant microsymbionts (bifidobacteria) in children with pathology of LMA. While investigating intermicrobial links in microsymbiogenesis of the bowels in children with the given pathology, synergic effect of *Candida* spp. on the persistent potential of associative microsymbionts was established. Obtained materials provided insight into pathogenetic formation of persistent dysbiosis in children with a disorder of LMA, and allowed to consider dysbiosis as a microbial risk factor for the development of this pathology.*

Key words: biocommunication, *Candida* spp., dysbiosis of the bowel, pathology of locomotor apparatus in children, persistence

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время имеются работы, указывающие на связь между дисбиозом кишечника с гиперколонизацией *Candida* spp. и дисплазией соединительной ткани (ДСТ) у детей [1, 2], определяющие роль микробного фактора в формировании соматической патологии. Известно, что дети с патологией опорно-двигательного аппарата (ОДА) имеют симптомы соединительнотканной дисплазии [3, 4], что обусловлено особенностями анатомо-гистологического строения опорно-двигательной системы, представленной преимущественно элементами соединительной ткани [5]. Согласно многочисленным данным, существует связь патологии ОДА с микробиотой, в частности, с дрожжевыми грибами, обладающими набором ферментов (гиалуронидаза, хондроитинсульфатаза), разрушающих соединительную ткань, влияя на ламинин, фибронектин, фибриноген, 4 тип коллагена [6, 7]. В этих исследованиях объяснена высокая частота встречаемости у детей с дисплазией соединительной ткани патологии ОДА и связь с микробиотой человека.

Учитывая, что в структуре микросимбиоза, наряду с грибами *Candida* spp., присутствует и бактериобиота, роль которой при данной патологии далека от своего разрешения, мы предприняли попытку расшифровать значение микробного фактора в регуляции гомеостаза организма и функционировании опорно-двигательного аппарата у детей. При этом, наряду с изучением видового состава и биохарактеристиками микросимбионтов кишечного тракта детей, были определены их биокоммуникативные связи, имеющие существенное значение в условиях ассоциативного симбиоза [8] человека, способствуя пониманию особенностей патогенеза обозначенной патологии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения клинического и бактериологического обследования были сформированы две группы детей и подростков в возрасте от 4 до 17 лет: 1 группа – 38 пациентов с патологией ОДА (остеоартроз, сколиотическая болезнь); 2 группа (сравнения) – 25 условно-здоровых детей. Группы детей с патологией опорно-двигательного аппарата формировали на ос-

новании стандартного клинического и ортопедического обследования с проведением рентгенографии и УЗИ ОДА. Клиническое исследование включало такие параметры, как гиббательная подвижность позвоночника (симптомы Отта, Шобера, Томайера), тест «подбородок – грудина» и тест Ли. Болевой синдром диагностировали по визуально-аналоговой шкале (ВАШ) и индексу Ричи.

Исследование микросимбиоза кишечника осуществляли в соответствии с «Методическими рекомендациями по применению бактериальных биологических препаратов в практике лечения больных кишечными инфекциями. Диагностика и лечение дисбактериоза кишечника» (1986 г.). Оценку состояния микробиоты дистального отдела толстого кишечника (дисбиоз/эубиоз) по степеням проводили в соответствии с приказом МЗ РФ № 231 [9]; выделение и идентификацию анаэробных микроорганизмов – в соответствии с руководством [10]. Выделенные штаммы факультативно-анаэробных микроорганизмов идентифицировали общепринятыми методами на основании морфологических, тинкториальных и культуральных свойств. Биохимический профиль изучаемых культур факультативно-анаэробных бактерий и дрожжевых грибов определяли с помощью коммерческих тест-систем фирмы «Lachema» (Чехия) и «API20CAUX» (bioMérieux, Франция).

Численность изолированных микроорганизмов выражали в колониеобразующих единицах в пересчете на грамм исследуемого материала (КОЕ/г). Антилизозимную (АЛА) и антикомплементарную (АКА) активности определяли фотометрическим методом по Бухарину О.В. с соавт. (1999 г.). Биокоммуникативные связи оценивали через изменения показателей двух базовых функций – размножение и адаптацию (персистентные характеристики) микроорганизмов. Исследование изменений АЛА и АКА микробиоты в условиях межмикробных взаимодействий проводили при добавлении к изучаемым культурам стерильных супернатантов (продуктов жизнедеятельности) микроорганизмов-симбионтов в питательный бульон [11].

Статистическая обработка результатов исследования включала применение общепринятых методов вариационной статистики с использованием программы Excel и SPSS Statistics. При исследовании микросимбиоза кишечника вычисляли критерий Стьюдента-Фишера, данные по определению регулирующего влияния экзометаболитов дрожжевых грибов и микроорганизмов-симбионтов в ассоциации оценивали с помощью непараметрического метода вариационной статистики по критерию Манна-Уитни. Разницу между сравниваемыми величинами считали достоверной при значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении бактериологического исследования микробиоты дистального отдела толстого кишечника у $94,8 \pm 2,6\%$ пациентов с патологией ОДА

был выявлен дисбиоз кишечника (преимущественно II-III степени). В группе условно-здоровых детей без патологии ОДА отмечали нарушение микросимбиоза кишечника (I-II степени) только у 3 из 25 обследуемых детей ($12,2 \pm 1,2\%$) ($p < 0,001$).

При анализе видового состава микробиоты кишечника выявили высокую частоту встречаемости *Candida* spp. у пациентов с патологией ОДА против группы сравнения ($70,1 \pm 5,6\%$ против $12 \pm 0,5\%$). Кроме того, установили, что в группе больных с патологией ОДА, численность дрожжевых грибов, в среднем, составляла $7,1 \pm 1,5$ lg КОЕ/г и более, тогда как в группе условно-здоровых детей показатель микробной обсемененности не превышал $3,2 \pm 1,1$ lg КОЕ/г.

При оценке видового состава изолированных дрожжевых грибов в микросимбиозе у детей с патологией ОДА обнаружили высокую частоту встречаемости *Candida albicans* (в $49,1 \pm 8,1\%$ случаев) и *C. krusei* ($15,7 \pm 2,6\%$), тогда как *C. tropicalis* выявлялись только в $5,3 \pm 0,8\%$ случаев. В группе сравнения *C. albicans* наблюдали в $0,7 \pm 0,1\%$ случаев, *C. krusei* – в $0,5 \pm 0,08\%$; других видов дрожжевых грибов не отмечали.

Исходя из концепции ассоциативного симбиоза, где симбиотические взаимоотношения организма и его микробиоты оценивают в условиях микросимбиоза (совокупность доминантных и ассоциативных микросимбионтов), и имеет место модификация биологических свойств микросимбионтов, определяющая гомеостаз хозяина [8], мы исследовали состав бактериально-грибковых ассоциаций под контролем персистентного потенциала грибов, изолированных от пациентов сравниваемых групп.

В результате исследования структуры микросимбиоза кишечника в группе сравнения дрожжевые грибы изолировали преимущественно в ассоциации с одним представителем условно-патогенной микробиоты (УПМ) ($88,2 \pm 12,1\%$ случаев) и значительно реже – с двумя и более видами УПМ ($11,7 \pm 2,2\%$), в отличие от пациентов с патологией ОДА, где грибы высевали чаще с двумя и более представителями условно-патогенных бактерий ($84,8 \pm 14,4\%$), и лишь в $15,2 \pm 3,2\%$ случаев микромицеты ассоциировались с одним представителем УПМ.

При изучении видового состава ассоциаций дрожжевых грибов с УПМ были установлены отличия в составе микросимбиоза у пациентов обследуемых групп. В группе условно-здоровых лиц в $11,2 \pm 1,8\%$ случаев в ассоциации с *Candida* spp. обнаруживали *E. faecalis*, в $7,2 \pm 1,2\%$ – коагулазонегативные стафилококки. Частота выявления бактерий-ассоциантов других видов (*S. aureus*, *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp.) была значительно ниже и варьировала в пределах $3,6-4,8\%$ случаев ($p < 0,05$).

У обследуемых лиц с патологией ОДА, также как и в группе сравнения, в ассоциации с грибами чаще изолировали микроорганизмы вида *E. faecalis* (в $60,1 \pm 6,8\%$ случаев). Высокая частота встречаемо-

сти была характерна для ассоциаций микромицетов с лактозонегативными (lac⁻) (в 57,5±3,6% случаев) и гемолитическими (hly⁺) кишечными палочками (в 41,9±3,6% случаев) ($p < 0,05$). Частота встречаемости ассоциаций грибов с другими видами бактерий (*Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp. и *S. aureus*) варьировала в пределах 8,6-26,3% случаев, превышая аналогичные показатели в группе условно-здоровых лиц в 2-7 раз.

При изучении персистентного потенциала грибов показано, что для штаммов *Candida* spp., изолированных из микросимбиоза лиц с патологией ОДА, были характерны более высокие значения антилизоцимной (АЛА) и антикомплементарной (АКА) активностей, в сравнении с контингентом условно-здоровых детей. Так, АЛА дрожжевых грибов, выделенных от пациентов с патологией ОДА, составляла 2,0±0,3 мкг/мл*ОП, от здоровых лиц – 0,8±0,06 мкг/мл*ОП. Различия в экспрессии антикомплементарной активности *Candida* spp. у детей исследуемых групп носили аналогичный характер: более высокие значения признака были характерны для пациентов с нарушениями ОДА (2,0±0,2 анти-ЛЕК) в сравнении с группой условно-здоровых детей (1,0±0,2 анти-ЛЕК).

Таким образом, установили, что патология опорно-двигательного аппарата у детей сопровождается дисбиотическими изменениями микросимбиоза дистального отдела толстого кишечника с характерным увеличением численности *Candida* spp. (гиперколонизация), формированием бактериально-грибковых ассоциаций и усилением персистентного потенциала грибов, что обеспечивает длительное сохранение (персистенцию) микромицетов в условиях кишечного микросимбиоза.

Учитывая, что при формировании и функционировании микросимбиоза имеет значение характер межмикробных взаимодействий, что рассматривают в настоящее время с позиций биокоммуникативной активности микроорганизмов, мы оценили симбиотические взаимоотношения (биокоммуникацию) в бактериально-грибковых ассоциациях. В качестве критерия оценки биокоммуникативной активности акцент сделали на антилизоцимной активности микросимбионтов – универсальном показателе, одной из базовых физиологических функций – адаптации микробиоты в организме [8].

По результатам исследований выявили, что для ассоциаций *C. albicans* с условно-патогенными бактериями, преобладающими в микросимбиозе у пациентов с патологией ОДА, был характерен преимущественно синергидный тип взаимоотношений. Под действием супернатантов грибов возникало усиление экспрессии антилизоцимной активности у 90±12,1% исследуемых штаммов гемолитических *E. coli* и *Klebsiella* spp., у культур лактозонегативных эшерихий – 87,5±10,2% и у штаммов золотистых стафилококков – 75,8±7,4% ($p < 0,01$) (Рис.).

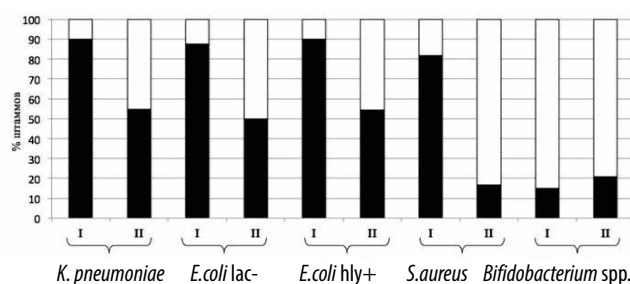


Рис. Биокоммуникативная активность *Candida* spp. и бактериаль-симбионтов при патологии ОДА у детей

Условные обозначения:

I - влияние метаболитов *Candida* spp. на АЛА бактерий;
II - влияние метаболитов бактерий на АЛА *Candida* spp.

■ - снижение экспрессии АЛА микросимбионтов
□ - увеличение экспрессии АЛА микросимбионтов

Аналогичные данные об усилении АЛА были получены при изучении влияния супернатантов грамотрицательных бактериальных ассоциантов на антилизоцимную активность *C. albicans*. Стимуляцию экспрессии АЛА грибов при соинкубировании с супернатантом гемолитических эшерихий отмечали в 54,3±8,4% случаев, под действием экзометаболитов лактозонегативных кишечных палочек – в 50±14,4% и под влиянием супернатантов клебсиелл – в 54,6±8%. Что же касается исследуемых штаммов *S. aureus*, то его метаболиты только в 16,7±6,2% случаев стимулировали АЛА культур *C. albicans*, а в 83,3±6,2% – оказывали ингибирующее воздействие на антилизоцимную активность микромицетов.

Противоположный – антагонистический тип межмикробных взаимоотношений был установлен при взаимодействии *Candida* spp. в ассоциации с нормобиотой (*B. bifidum* и *B. longum*), составляющей доминантную группу микробиоты условно-здоровых лиц. Оказалось, что метаболиты *C. albicans* в 79±7,6% случаев ингибировали антилизоцимную активность бифидобиоты ($p < 0,05$), которая, в свою очередь, в 85±8,8% случаев снижала экспрессию АЛА исследуемых штаммов грибов (Рис.).

Исходя из полученных данных, установили роль микробного фактора и состава микросимбиоза в патологии опорно-двигательного аппарата у детей. С позиции концепции ассоциативного симбиоза, формирование патологии ОДА сопряжено не только с нарушениями метаболического статуса и работы различных органов и систем (в том числе и системы иммунитета), но и взаимосвязано с нарушениями микросимбиоза, сопровождающееся дисбиозом кишечника с гиперколонизацией данного биотопа *Candida* spp. При изучении биокоммуникативных взаимодействий в бактериально-грибковых ассоциациях выявили способность условно-патогенной микробиоты усиливать персистентные характеристики *C. albicans*, что, вероятно, и объясняет феномен гиперколонизации грибов у пациентов с патологией ОДА, определяя роль грибкового фактора в нарушении регуляции гомеостаза при данной патологии. Подтверждением тому служит и резкое уменьшение

доминантной микробиоты (бифидобактерий), неспособной выполнять защитную функцию в данных условиях. Выявленные симбиотические взаимоотношения доминантной ассоциативной микробиоты определяют дисбиоз как «мишень», устранение которой в клинических условиях представляется первоочередной задачей клинициста.

ВЫВОДЫ

1. Патология опорно-двигательного аппарата у детей сопровождается гиперколонизацией *Candida* spp. за счет усиления экспрессии персистентных свойств грибов (антилизоцимной и антикомплементазной активности) и образования бактериально-грибковых ассоциаций, способствуя формированию дисбиоза дистального отдела толстого кишечника.

2. Экспериментально *in vitro* установлено, что условно-патогенные бактерии усиливают персистентный потенциал (антилизоцимную активность) *S.*

albicans, которые, в свою очередь, оказывают синергидный эффект на АЛА бактериальных ассоциантов, что обеспечивает длительное переживание грибов в кишечном микросимбиозе в условиях дисбиоза.

3. Биокommунитивная активность *Candida* spp., в ассоциации с доминантной микробиотой (бифидобактериями), характеризуется антагонистическим типом взаимоотношений, что также объясняет факт формирования стойких дисбиотических изменений микросимбиоза кишечника у детей с патологией ОДА, обусловленное снижением защитного действия представителей нормобиоты.

Работа выполнена по проектам фундаментальных исследований программ Президиума РАН № 12-П-4-1015 «Инфектологические механизмы ассоциативного симбиоза человека» и № 12-П-4-1045 «Изучение интеграционных механизмов межмикробных взаимодействий микросимбиотом кишечника микробиоты в паре «доминант-ассоциант».

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Бухарин О.В., Вальшев А.В., Перунова Н.Б. и др. Бактериально-грибковые ассоциации кишечника в условиях колонизации дрожжеподобными грибами рода *Candida* // Журн. микробиол. – 2002. – № 5. – С. 45-48.
2. Челпаченко О.Е. Патогенетическое значение микробиоценоза кишечника у детей с синдромом дисплазии соединительной ткани и возможные пути коррекции: Автореф. дисс... док. мед. наук. – О., 2003. – 42 с.
3. Правдюк Н.Г., Шостак Н.А. Гипермобильный синдром: клинические проявления, дифференциальный диагноз, подходы к терапии // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2008. – №3. – С. 70-75.
4. Кадурина Т.И., Горбунова В.Н. Дисплазия соединительной ткани. – СПб., 2009. – 722 с.
5. Денисов-Никольский Ю.И., Омеляненко Н.П., Миронов С.П., Матвейчук И.В. Костная ткань. Структурно-функциональная характеристика её основных компонентов // Актуальные проблемы теоретической и клинической остеопатологии. – М., 2005. – С. 335-336.
6. Souza-Moreira T.M., Severi J.A., Lee K., et al. Anti-Candida targets and cytotoxicity of casuarinin isolated from *Plinia cauliflora* leaves in a bioactivity-guided study // Molecules. – 2013. – Vol. 18, №7. – P. 8095-8108.
7. van Asbeck E.C., Clemons K.V., Stevens D.A. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility // Critical Rev. in Microbiol. – 2009. – Vol. 35, №4. – P. 283-309.
8. Бухарин О.В., Лобакова Е.С., Перунова Н.Б. и др. Симбиоз и его роль в инфекции. – Екатеринбург: УрО РАН, 2011. – 301 с.
9. Отраслевой стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» (ОСТ 91500.11.0004-2003, утвержден Приказом Министерства здравоохранения РФ № 231 от 09.06.2003)
10. Jousimies-Somer H.R., Sittmanen P., Varon E.J., et al. Wadsworth-KTL anaerobic bacteriology manual. 6th ed. – Belmont, CA: Star Publishing. – 2002. – 287 p.
11. Перунова Н.Б., Иванова Е.В. Влияние бифидобактерий на антилизоцимную активность микроорганизмов и их способность к образованию биоплёнок // Журн. микробиол. – 2009. – № 4. – С. 46-49.

Поступила в редакцию журнала 02.09.2013

Рецензенты: Т.Х. Тимохина, А.В. Лазарева



ОБОСНОВАНИЕ РАСШИРЕНИЯ СПЕКТРА ВЫЯВЛЯЕМЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ НА ДИСБИОЗ КИШЕЧНИКА

¹ Оришак Е.А. (доцент кафедры)*, ¹ Бойцов А.Г. (профессор кафедры), ² Щеглов В.С. (зав. отд.)

¹ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (кафедра медицинской микробиологии); ² ЗАО «Ситилаб», Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2013

Обоснована необходимость расширения спектра выявляемых микроорганизмов при диагностике дисбиоза кишечника. С введением полимеразной цепной реакции как элемента рутинного исследования на дисбиоз частота регистрации возбудителей кишечных инфекций, включая вирусы и кампилобактеры, выросла с 2,4% до 23,3%. При этом возбудителей кишечных инфекций бактериальной этиологии в разных возрастных группах выявляли в 4,4-14,0% случаев, вирусной этиологии – у 8-20% лиц, обследованных на дисбиоз кишечника. Рассмотрены изменения микробиоценоза в случаях выявления возбудителей кишечных инфекций.

Ключевые слова: астровирусы, дисбиоз кишечника, кампилобактериоз, кишечные инфекции, норовирусы, ПЦР, ротавирусы

JUSTIFICATION FOR EXTENSION OF THE REVEAL MICROORGANISMS SPECTRUM IN INTESTINAL DYSBIOSIS RESEARCH

¹ Orishak E.A. (associate professor), ¹ Boitsov A.G. (professor of the chair), ² Shcheglov V.S. (head of the department)

¹ North-Western Medical University named after I.I. Mechnikov (Chair of Medical Microbiology); ² ЗАО «CITILAB», Saint-Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2013

The necessity of expanding of the reveal microorganisms spectrum in the intestinal dysbiosis diagnostics was justified. After the introduction of polymerase chain reaction as part of routine dysbiosis research the frequency of registered agents of intestinal infections, including viruses and Campylobacter, increased from 2,4% to 23,3%. The intestinal infections agents of bacterial etiology were identified in different age groups in the 4,4-14,0% of cases, the intestinal infections agents of viral etiology – in 8-20% of patients. The changes in intestinal microbiota in cases of enteric infection agents identification have been described.

* Контактное лицо: Оришак Елена Александровна, тел. (812) 543-19-20

Key words: astrovirus, campylobacteriosis, dysbiosis, intestinal infections, norovirus, PCR, rotavirus

ВВЕДЕНИЕ

Заболевания, протекающие с синдромом диареи, продолжают оставаться актуальной проблемой в Российской Федерации. Частота эпизодов диареи у грудных детей колеблется от одного до трех в течение первого года жизни. В зависимости от степени нарушения самочувствия, тяжести диспепсического синдрома и данных анамнеза эти эпизоды расценивают по-разному: чаще – как транзиторную ферментативную недостаточность либо дисбиоз, реже – как инфекционную диарею [1].

Как первичное состояние дисбиоз, как правило, встречается только у детей до года при нарушении формирования кишечного микробиоценоза. Однако дисбиоз кишечника может маскировать острые кишечные инфекции (ОКИ), усиливаясь или появляясь на их фоне. В ходе исследования на дисбиоз кишечника иногда диагностируют кишечные инфекции, возбудители которых влекут изменения в составе микробиоты. Патогенные энтеробактерии могут быть обнаружены не менее чем у 0,7% лиц, обследованных по поводу дисбиоза [2]. При отсутствии расширенного микробиологического исследования лечение может быть безуспешным. При рутинном исследовании на дисбиоз кишечника, без целенаправленного выявления прочих возможных возбудителей ОКИ – кампилобактеров, вирусов, простейших, патогенные микроорганизмы выявляют у ничтожно малого количества пациентов. Большой интерес представляют работы, обосновывающие взаимосвязь неинфекционной патологии с перенесенными ранее кишечными инфекциями, которые часто протекают под маской обострения основного неинфекционного заболевания или под маской дисбиоза, как, например, синдрома раздражённого кишечника (СРК) [3]. Установлено, что риск развития СРК выше после перенесенного кампилобактериоза, сальмонеллеза, шигеллеза [4, 5]. В последние годы вирусные агенты занимают ведущее место среди этиологических факторов острых кишечных инфекций у детей во всем мире [6]. Доля бактериальных кишечных инфекций значительно снизилась и составляет 7-10%. Возросло число микст-инфекций (вирусно-бактериальных) до 15-17% [7]. Вклад возбудителей вирусной этиологии в общую структуру кишечных инфекций детей раннего возраста составляет 57,9% (ротавирусы – 35%, норовирусы – 16,7%, астровирусы – 6,2%) [8].

По данным ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, структура заболеваемости ОКИ в РФ за 2012 г. выглядела следующим образом: сальмонеллез – 6,5%, шигеллез – 1,8%, другие острые кишечные инфекции установленной этиологии – 27,4%, кишечные инфекции неустановленной этиологии – 64,3% [9].

Возможность использования ПЦР для установления этиологической структуры ОКИ существенно увеличивает процент расшифровки. ПЦР для диа-

гностики вирусных инфекций имеет ряд таких преимуществ перед другими методами диагностики (культуральный и серологический), как универсальность методики для широкого спектра возбудителей, высокая чувствительность и специфичность, невысокая себестоимость. Разработанные системы для обнаружения кампилобактеров и иерсиний также упрощают процесс диагностики инфекций, вызванных трудно культивируемыми микроорганизмами, и позволяют своевременно начать антибактериальную терапию. Учитывая высокий уровень распространения острых кишечных инфекций у детей, данная возрастная группа особенно нуждается в комплексном микробиологическом обследовании с поиском наиболее вероятных возбудителей кишечных инфекций и оценкой микробиоценоза кишечника.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С целью бактериологической диагностики дисбиоза кишечника за период 2009-2010 гг. стандартной методикой было проведено обследование 8174 человек: 5092 ребенка в возрасте до 12-ти месяцев, 2101 – от одного года до шести лет и 981 – старше шести лет. Исследуемый материал поступал из 59 многопрофильных клиник Санкт-Петербурга в клинико-диагностическую лабораторию ЗАО «СИТИ-ЛАБ».

Обследование включало выделение бифидобактерий, лактобактерий, кишечных палочек с типичными и атипичными свойствами, условно-патогенных и патогенных энтеробактерий, неферментирующих грамотрицательных бактерий, стафилококков, гемолитических форм микроорганизмов, энтерококков, *Candida* spp. Посевы на плотные среды производили по методу Gold, на полужидкие среды однорядным «титрационным» методом [10]. Результаты оценивали в соответствии с нормативами, приведенными в Отраслевом стандарте «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» 91500.11.0004- 2003 [11].

При комплексном обследовании на дисбиоз и кишечные инфекции, наряду с бактериологическим методом, применяли ПЦР с использованием набора праймеров «АмплиСенс® ОКИ скрин-FL» для выявления следующих возбудителей: *Adenovirus*, *Norovirus*, *Astrovirus*, *Rotavirus*, *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp., ЕИЕС (энтероинвазивные кишечные палочки / *Shigella* sp.), *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*. С использованием ПЦР обследовано 150 пациентов в трех возрастных группах: 1) дети до года – 55 человек; 2) дети от года до шести лет – 45; 3) взрослые и дети старше шести лет – 50.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе стандартной бактериологической диагностики дисбиоза проанализировали эффективность выявления возбудителей кишечных инфекций по результатам 8174 исследований фекалий. Во всех возрастных группах суммарно было выделено 114 штаммов диареогенных кишечных палочек, 60 иер-

синий и 25 сальмонелл (Рис. 1).



Рис.1. Выявление возбудителей ОКИ при стандартной методике исследований на дисбиоз

57% находок диареогенных *E.coli* (65 изолятов) обнаружили у детей до года, 35% (40 изол.) – у детей 1-6 лет и только 8% – у лиц старше 6 лет (9 изол.). 50 штаммов иерсиний были представлены *Y. enterocolitica* и 10 штаммов – *Y. pseudotuberculosis*. Отметим, что несомненный вклад в столь значительное количество находок иерсиний при проведении непрофильного исследования было связано с тем, что посев на иерсинии осуществляли на отдельную чашку с предварительной обработкой материала щелочью в соответствии с МР «Псевдотуберкулез и иерсиниоз» № 11-3/8-09 [12]. Эта методика не входит в спектр обязательных при рутинном проведении микробиологического исследования на дисбактериоз, при её отсутствии выявляемость иерсиний при исследовании на дисбактериоз значительно ниже. Находки иерсиний преобладали в группе детей старше 6 лет и взрослых – 42 штамма (70% от общего числа). В группе детей от года до 6 лет выделено 16 штаммов иерсиний (26,7%), в группе детей младше года – 2 штамма (3,3%). Сальмонеллы выявляли в возрастных группах равномерно: у детей от года до 6 лет – 10 (40% находок), до 1 года – 7 (28%), старше 6 лет и взрослых – 8 (32%).

Одновременно в микробиоценозе кишечника пациентов с выявленными диареогенными серотипами *E.coli* кишечными палочками наблюдали дисбиотические изменения. В группе детей до года отмечали возрастание количества условно-патогенных энтеробактерий (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp.) – у 35 человек (53,8% от числа пациентов с находками диареогенных кишечных палочек), присутствие *Staphylococcus aureus* – у 30 (48,4%), появление штаммов *E. coli* с гемолитическими свойствами – у 36 (55,4%), увеличение количества *Candida* spp. – у 6 (9,2%). В группе детей 1-6 лет выявляли возрастание числа условно-патогенных энтеробактерий в 14 пробах (35% от количества находок диареогенных кишечных палочек в данной группе), появление *E. coli* с гемолитической активностью – в 27 (67,5%), появление *S. aureus* – в 5 (12,5%), увеличение количества *Candida* spp. – в 1 (2,5%). В возрастной группе

детей старше 6 лет и взрослых изменение микробного пейзажа характеризовалось появлением гемолитических *E. coli* в 5 из 9 проб.

У лиц с положительным результатом на иерсинии дисбиотические изменения отмечали в 83% случаев (50 из 60). При этом в группе до года наблюдали увеличение количества условно-патогенных микроорганизмов: энтеробактерий – в 2 случаях, *S. aureus* и *E. coli* с гемолитической активностью – по одному случаю. В группе детей от 1 до 6 лет превышение числа условно-патогенных энтеробактерий имело место в 3 пробах (33,3%), *S. aureus* – в 3 (18,75%), *Candida* spp. – в 2 (12,5%), *E. coli* с гемолитической активностью – в 2 (12,5%), неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОб) (*Acinetobacter* spp.) – в 1 (6,7%). У группы детей старше 6 лет и взрослых также установили возрастание условно-патогенных энтеробактерий в 8 пробах (19,1%), НГОб (*P. aeruginosa*) – в 1 (2,3%), *E. coli* с гемолитическими свойствами – в 1 (2,3%), *Candida* spp. – в 3 (7,2%).

В группе детей до года при выявлении сальмонелл отмечали увеличение количества условно-патогенных энтеробактерий у 4 человек, наличие *S. aureus* – у 3, *E. coli* с гемолитическими свойствами – у 2. В группе детей 1-6 лет возрастание условно-патогенных энтеробактерий наблюдали в 5 образцах, наличие *S. aureus* – в 2, *E. coli* с гемолитической активностью – в 3, увеличение числа *Candida* spp. – в 1. В группе детей старше 6 лет и взрослых возрастание условно-патогенных энтеробактерий было у 1 пациента, появление *S. aureus* – также у 1.

При введении ПЦР в протокол исследования на дисбиоз кишечника количество выявляемых патогенов значительно возросло, преимущественно за счет дополнительного обнаружения вирусов и кампилобактера (Рис. 1, Рис. 2).

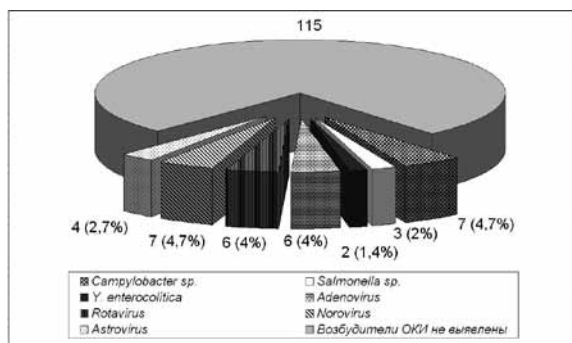


Рис. 2. Выявление возбудителей ОКИ при комплексном обследовании на дисбиоз

Обследованные пациенты представляли собой случайную выборку лиц, направленных врачами разного профиля для исследования на дисбиоз кишечника. Отбор по специфическим жалобам или клиническим проявлениям, указывающим на наличие кишечной инфекции, не производили с целью отразить истинную значимость расширения исследования. У 12 больных (8%) были выявлены бактериальные возбудители кишечных инфекций, в том числе: кампилобактер – у 7 человек (4,7%), сальмонеллы – у 3

(2%), *Y. enterocolitica* – у 2 (1,3%). У 23 обследованных лиц (15,3%) были обнаружены вирусные возбудители кишечных инфекций: *Adenovirus* – у 6 (4% обследованных), *Rotavirus* – у 6 (4%), *Norovirus* – у 7 (4,7%), *Astrovirus* – у 4 (2,7%). В группе детей до года вирусные возбудители имели место в 9 случаях (16,4% от числа детей до года), а бактериальные – в 3-х (5,4%). При этом *Y. enterocolitica* выявили у 2 детей (3,6%), кампилобактер – у 1 (1,8%), *Astrovirus* – у 2 (3,6%), *Rotavirus* – у 3 (5,4%), *Norovirus* – у 3 (5,4%), *Adenovirus* – у 1 (1,8%). В группе детей от года до шести лет вирусные возбудители определяли у 9 пациентов (20%), бактериальные – у 2 (4,4%), а именно: сальмонеллы – у 2 (4,4%), *Adenovirus* – у 1 (1,1%), *Norovirus* – у 3 (6,7%), *Astrovirus* – у 1 (2,2%), *Rotavirus* – у 1 (2,2%).

В 4,4% случаев в группе детей 1-6 лет наблюдали наличие микст-инфекции: у одного ребенка были одновременно выделены сальмонеллы и *Adenovirus*, а в одном случае обнаружили два вируса-возбудителя кишечных инфекций – *Rotavirus* и *Norovirus*. В группе детей старше шести лет и взрослых вирусные возбудители выявляли в 4 случаях (8% от числа обследованных в данной группе), а бактериальные – в 7 (14%); кампилобактер – у 6 человек (12%), сальмонеллы – у 1 (2%), *Astrovirus* – у 1 (2%), *Norovirus* – у 1 (2%), *Rotavirus* – у 2 (4%).

Согласно полученным данным, микробоценоз кишечника детей до года наиболее часто подвержен дисбиотическим изменениям. Для оценки влияния бактерий и вирусов-возбудителей кишечных инфекций на формирование атипичного микробоценоза сравнивали изменения в составе микробоценоза кишечника лиц с выявленными возбудителями ОКИ и без них. Снижение количества бифидобактерий при дисбиозе с одновременным выявлением кишечных патогенов было наиболее выражено в группе детей до одного года – в 90 случаях (98,9%). Это подтверждает значительную роль дефицита бифидобактерий в развитии или поддержании дисбиоза, колонизации условно-патогенными микроорганизмами кишечного биотопа, так как снижению количества бифидобактерий сопутствовали изменения в количестве и составе УПМ, включая ассоциации последних. В группе от года до шести лет и в группе детей старше шести лет и взрослых снижение количества бифидобактерий отмечали значительно реже (44,2% и 56,9% соответственно). Не было выявлено ни одного случая снижения количества лактобактерий в группе детей до одного года, тогда как в группах детей 1-6 лет и в группе детей старше шести лет и взрослых этот признак был представлен более значительно (61% и 54,2%). Примечательно также снижение количества *E. coli* с типичными свойствами и энтерококков в группе детей старше 6 лет и взрослых в 27,8% и 20,9% случаев соответственно, что не наблюдали в других возрастных группах. Снижение местной составляющей в разных возрастных группах имело определенные закономерности. Так, единственным значимым показателем изменений в индигенной

составляющей в группе детей до одного года было снижение количества бифидобактерий, в группе детей 1-6 лет – снижение количества лактобактерий; в группе пациентов старше шести лет – снижение всех индигенных микроорганизмов, однако определяющими показателями являлись снижение количества *E. coli* с типичными свойствами и энтерококков. И, напротив, в группе детей до одного года количество энтерококков не только не снижалось, но увеличивалось более чем в какой-либо другой группе (41,7%). При анализе возрастания числа условно-патогенных микроорганизмов (УПЭ, *Candida* spp., *S. aureus*, НГОБ) основные различия отмечали в показателях «увеличение количества условно-патогенных энтеробактерий» и «появление *S. aureus*». В группе детей до одного года увеличение количества УПЭ наблюдали у 56% детей, тогда как усредненный показатель при кишечных инфекциях составил 35,3%. В группе детей 1-6 лет данный показатель был сопоставим с усредненным значением при кишечных инфекциях и составил 32,6%. В группе детей до одного года *S. aureus* был выявлен у 41,7% детей, в остальных группах встречаемость *S. aureus* была незначительна. *E. coli* с гемолитической активностью преимущественно отмечали в группе детей до одного года (46,2%) и детей 1-6 лет (38,9%). Это единственный показатель, встречаемость которого в случаях выявления возбудителей кишечных инфекций была выше, чем при дисбиозах в целом. В группе детей старше шести лет и взрослых увеличение количества любых групп УПМ было крайне незначительным, т.е. имело место тенденция уменьшения вклада УПМ в формирование дисбиоза при наличии возбудителей кишечных инфекций по мере возрастного становления кишечного биоценоза.

Учитывая отсутствие характерных показателей в дисбиотических изменениях, которые позволили бы предположить наличие возбудителей кишечных инфекций, во всех случаях при обследовании на дисбиоз кишечника необходим поиск наиболее часто встречающихся патогенов. На основании полученных результатов можно говорить о необходимости введения в рутинную практику микробиологических лабораторий расширенного спектра исследований при диагностике дисбиоза с целью максимально полного выявления возбудителей кишечных инфекций.

ВЫВОДЫ

1. При рутинном исследовании на дисбиоз кишечника без целенаправленного обнаружения возбудителей кишечных инфекций (патогенных энтеробактерий, кампилобактеров, вирусов) патогенные микроорганизмы определяют у незначительного количества пациентов (2,4%). При использовании молекулярно-генетического метода исследования в комплексе с бактериологическим методом диагностики возрастает выявляемость кишечных инфекций (до 23,3%) у обследованных пациентов по поводу дисбиоза кишечника.

2. Дисбиотические изменения, развивающиеся на фоне кишечных инфекций, отличаются в разных возрастных группах. В группе детей до 12 месяцев имеет место снижение количества бифидобактерий у 98,9% человек и увеличение количества энтерококков – у 41,7%. В группе детей от года до шести лет наблюдали снижение лактобактерий у 61% больных. В группе пациентов старше шести лет установили снижение количества типичных кишечных палочек в 27,8% случаев и снижение количества энтерококков – в 20,9%.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Гончар Н.В., Березина Л.В., Тихомирова О.В. и др. Выбор пробиотика для рациональной терапии клебсиеллезной инфекции у детей // Ж. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2009. – №2. – С. 85-89.
2. Войтенкова Е.В., Матвеева З.Н., Кафтырева Л.А. Находки возбудителей острых кишечных инфекций при исследовании на дисбиоз кишечника/ В кн.: Идеи Пастера в борьбе с инфекциями. – СПб.: НИИЭМ, 2008. – С. 113.
3. Симаненков В.И., Суворов А.Н., Захаренко С.М. и др. Пробиотики в терапии постинфекционного синдрома раздраженного кишечника // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2009. – № 4. – С. 25-28.
4. Парфенов А.И., Ручкина И.Н. Синдром раздраженного кишечника // Медицинский вестник. – 2006. – №16. – С. 359.
5. Ruigomez A., Garcia Rodriguez L.A., Paris J. Risk of irritable bowel syndrome after an episode of bacterial gastroenteritis in general practice: influence of comorbidities // Clin. Gastroenterol. Hepatol. – 2007. – Vol. 5, №4. – P. 465-469.
6. Горелов А.В. Терапия острых кишечных инфекций у детей в современных условиях // Вопросы современной педиатрии. – 2004. – №4. – С. 72-78.
7. Горелов А.В., Милютин Л.Н., Рейз А.Р. и др. Пути и перспективы изучения проблемы острых кишечных, респираторных инфекций и гепатитов у детей // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2009. – №2. – С. 51-57.
8. Боднев С.А., Малеев В.В., Жираковская Е.В. и др. Нововирусы как этиологический фактор острых кишечных инфекций у детей раннего возраста в Новосибирске // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2010. – №1. – С. 40-45.
9. Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях (Форма 1) за январь - декабрь 2011 // Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии - <http://www.fcgsen.ru/> дата обращения: 20.08.2013.
10. Иванов В.Л. и др. Совершенствование методов диагностики дисбактериоза толстого кишечника: информационное письмо. – СПб., 2002. – 31 с.
11. ОСТ 91500.11.004–2003 (приложение) Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника. – Утв. 09.06.03 г. – М., 2003. – 82 с.
12. Методические рекомендации «Псевдотуберкулез и иерсиниоз» № 11-3/8-09. утв. 11.05.04

Поступила в редакцию журнала 18.09.2013

Рецензент: Е.Б. Авалуева

МИКОЗЫ КОЖИ И НОГТЕЙ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ БОЛЬНЫХ В АЛТАЙСКОМ КРАЕ

Райденко О.В. (дерматовенеролог)*, Иванова Ю.А. (ассистент кафедры)

Алтайский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИДом, Алтайский государственный медицинский университет (кафедра дерматовенерологии), Барнаул, Россия

© Райденко О.В., Иванова Ю.А., 2013

Представлены данные о структуре микозов кожи и ногтей у ВИЧ-инфицированных пациентов в Алтайском крае. Проведен анализ структуры дерматомикозов в зависимости от стадии ВИЧ-инфекции. Описаны результаты лабораторной диагностики поверхностных микозов.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, микозы кожи и ногтей, структура микозов, этиология

MYCOSES OF SKIN AND NAILS AT THE HIV-INFECTED PATIENTS IN ALTAI REGION

Raydenko O.V. (dermatovenereologist), Ivanova U.A. (assistant of the chair)

Altai Regional Center for Prevention and Against AIDS, Altai State Medical University (Chair of Dermatovenereology), Barnaul, Russia

© Raydenko O.V., Ivanova U.A., 2013

Data of skin and nails mycosis of HIV infected patients in Altai region has been displayed. Analysis of structure of epidermomycoses regarding the phase of HIV infection was done. The results of laboratory research of skin surface mycoses are provided.

Key words: etiology, HIV-infection, skin and nails mycosis, structure of mycoses

ВВЕДЕНИЕ

Россия по темпам прироста числа ВИЧ-позитивных людей занимает одно из первых мест [1]. По данным Федерального центра СПИД, за период с 1987 по 2011 г. количество зарегистрированных ВИЧ-позитивных лиц составило 695484; зарегистрированных новых случаев ВИЧ-инфекции среди российских граждан в 2011 г. – 62384, что на 7,0% больше, чем в предыдущем году [2].

ВИЧ-инфицированные больные находятся в группе риска по возникновению микозов кожи и кандидоза полости рта. В России не исследовали структуру и этиологию микозов кожи и ногтей у этой категории пациентов.

В данной работе мы представляем результаты проведенного в Алтайском краевом центре по борьбе и профилактике со СПИДом клинико-лабораторного исследования ВИЧ-инфицированных лиц на предмет наличия у них поверхностных микозов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были проспективно включены ВИЧ-инфицированные пациенты, состоящие на диспансерном учете в Алтайском краевом центре по профилактике и борьбе со СПИДом и проходившие профилактический осмотр у врача-дерматовенеролога в течение 2010-2012 гг. ВИЧ-инфекция была диагностирована на основании эпидемиологических данных и подтверждена путем обнаружения антител методами ИФА и иммунного блоттинга на тест-системе New Lav Blot 1 к белкам вируса иммунодефицита человека I типа. Для верификации диагноза дерматомикоза проводили клинический осмотр больных, микроскопию и посев патологического материала, пробу с 5% раствором йода, а также осмотр в лучах лампы Вуда. Для микроскопии брали соскобы с пораженных участков ногтей и кожи при помощи скальпеля. У больных онихомикозом патологический материал для исследования забирали с поверхностных и средних слоев ногтевых пластин. Забранные образцы помещали в пробирку с раствором едкой щелочи (20% раствор КОН) на 3 часа, после чего переносили на предметное стекло, наложив покровное стекло, и выполняли микроскопию в световом микроскопе. Культивирование проводили на картофельном агаре при 28 °С. Полученные культуры идентифицировали с учетом роста колоний и микроморфологическим признакам. Анализировали структуру микозов кожи и ногтей и особенности этиологии у данной категории больных. Полученные данные вводили в стандартные электронные таблицы Excel. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента. Различия средних величин считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Из 669 осмотренных ВИЧ-инфицированных пациентов, микозы кожи и ногтей выявили у 240 че-

* Контактное лицо: Райденко Ольга Васильевна, Тел.: (903) 911-35-70

ловек (34%) в возрасте от 18 до 73 (медиана – 45,5); среди них – 174 мужчины (73%) и 66 женщин (27%) ($p < 0,05$).

Структура дерматомикозов у ВИЧ-инфицированных больных: онихомикоз стоп – 47%, отрубевидный лишай – 12%, микоз стоп – 5%, микоз гладкой кожи – 4%, онихомикоз кистей – 1%, а также сочетание двух и более микозов кожи и ногтей – 31% (Рис 1).

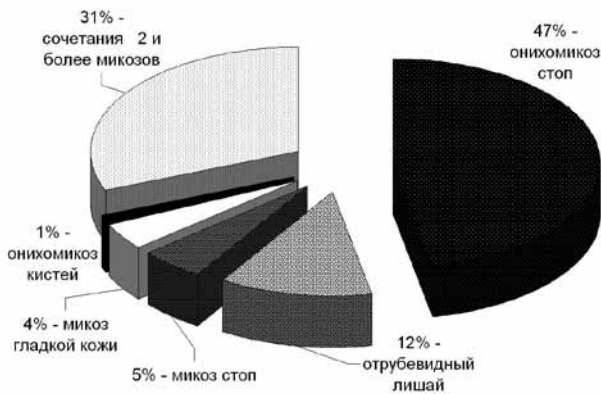


Рис. 1. Структура дерматомикозов у ВИЧ-инфицированных пациентов

Исследовали изменение структуры дерматомикозов в III и IV стадии ВИЧ-инфекции. Результаты представлены на рисунке 2.

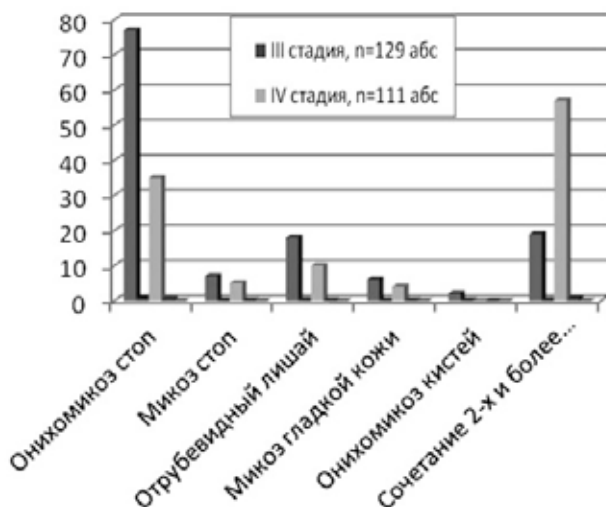


Рис. 2. Структура микозов кожи и ногтей в зависимости от стадии

У ВИЧ-инфицированных пациентов в III стадии в структуре дерматомикозов преобладал онихомикоз стоп ($p < 0,05$), тогда как в IV стадии достоверно чаще регистрировали сочетания двух и более микозов кожи и ногтей. Такие формы поверхностных микозов, как микоз стоп, отрубевидный лишай, микоз гладкой кожи и онихомикоз кистей диагностировали без достоверных различий в обе стадии ВИЧ-инфекции.

У 240 больных, включенных в исследование, было выявлено 326 случаев дерматомикозов и, соответственно, такое же количество проб направлено на микологическое исследование. Из данных образцов,

в 90 (27,4%) случаях получены отрицательные результаты микроскопии и культуральной диагностики. В 236 (72,6%) пробах диагноз был подтвержден лабораторно, среди них в 204 (62,5%) образцах получили рост колоний. Данные представлены в таблице.

Таблица

Соотношение результатов микроскопии и культуральной диагностики микозов кожи и ногтей

Микроскопия	Культура		Всего
	положительная	отрицательная	
Положительная	149 (45,7%)	32 (9,9%)	181 (55,5%)
Отрицательная	55 (16,9%)	90 (27,5%)	145 (44,5%)
Всего	204 (62,6%)	122 (37,4%)	326 (100%)

Грибы-дерматомицеты были выделены из 137 изолятов (67%), плесени – из 55 проб (27%) и дрожжи – из 12 (6%). Из 137 положительных культур были следующие дерматомицеты: *Trichophyton rubrum* – 63, *T. mentagraphites* – 16, *T. interdigitale* – 8, неидентифицированные *Trichophyton* spp. – 50. Из 55 культур плесневых грибов: *Aspergillus* spp. – 26, *Penicillium* spp. – 17, *Trichoderma* spp. – 8, *Rhizopus* spp. – 4. Из 12 дрожжевых культур: *C. krusei* – 4, *C. glabrata* – 3, неидентифицированные *Candida* spp. – 5.

ОБСУЖДЕНИЕ

Мы впервые в России провели исследование структуры и этиологии дерматомикозов у ВИЧ-инфицированных пациентов. В результате установили, что распространенность микозов кожи и ногтей у ВИЧ-позитивных больных в Алтайском крае составляет 34%. В структуре дерматомикозов у данной категории больных преобладает онихомикоз стоп (47%), отрубевидный лишай (12%), микоз стоп (4%) и сочетания двух и более микозов (31%). По данным индийских исследователей, распространенность дерматомикозов составляет 22,2%; из них самый распространенный клинический вариант поверхностных микозов – микоз туловища (53,7%), затем – микоз паховый (49,9%), микоз стоп (17,1%), микоз лица (14,7%), и у одного пациента был зарегистрирован микоз кистей [3].

В России и за рубежом среди возбудителей поверхностных микозов главенствующую роль играют дерматомицеты, являющиеся причиной 95% всех микозов стоп. Наиболее распространенными считают *T. rubrum* – 70-95%, *T. interdigitale* составляют от 7 до 34%, *Epidermophyton floccosum* – лишь 0,5-1,5%. Также возбудителями микозов могут выступать дрожжевые и плесневые грибы [4, 5].

У пациентов, инфицированных ВИЧ, на фоне иммунодефицита этиологические факторы микозов кожи и ногтей могут существенно отличаться от возбудителей дерматомикозов у иммунокомпетентных лиц.

При исследовании мы выявили, что основным этиологическим фактором микозов кожи и ногтей были дерматомицеты (67%), однако у трети пациентов возбудителями были плесни (27%) и дрожжи (6%). Полученные нами данные сопоставимы с за-

рубежными исследованиями. Так, по данным Surjushe A. et al., возбудителями поверхностных микозов у ВИЧ-инфицированных пациентов выступают: около 40% дерматомицеты (*T. rubrum* – 84,6%, *T. mentagrophytes* – 15,4%) и 59,4% –недерматомицеты (*Candida* spp., *Aspergillus niger*, *Cladosporium* spp., *Scytalidium hyalinum*, *Penicillium* spp. и *Gymnoascus dankaliensis*) [6].

Украинские исследователи установили, что у 67,6% больных возбудителем дерматомикозов являлся *T. rubrum*, у 8,8% – *T. mentagrophytes*, у 5,9% – *E. floccosum*. У 87,3% пациентов с поражением кожи и слизистых оболочек обнаружили *Candida* spp. [7].

В исследованиях, проведенных в клиниках Канады и Бразилии, отмечали следующее соотношение этиологических факторов микозов стоп и онихомикоза: дерматомицеты/дрожжевые грибы/недерматомицеты – 73/2/2 соответственно, причем в Канаде дерматомицеты – 95,5% против 90,9% в Бразилии, дрожжевые виды – 3% против 0%, а недерматомицеты – 1,5% против 9% (Gupta A.K. et al., 2000).

ВЫВОДЫ

1. Частота микозов кожи и ногтей у ВИЧ-инфицированных пациентов в Алтайском крае составляет 34%.
2. У мужчин частота дерматомикозов выше, чем у женщин (72% vs 28%).
3. У пациентов III стадии ВИЧ-инфекции достоверно чаще регистрировали онихомикоз стоп.
4. У ВИЧ-инфицированных больных IV стадии статистически значимо чаще диагностировали сочетания двух и более микозов и ногтей.
5. При культуральной диагностике идентифицировали возбудителей дерматомикоза у 60% пациентов.
6. Основным возбудителем микозов кожи и ногтей у ВИЧ-инфицированных лиц в Алтайском крае являлись *Trichophyton* spp. (67%)
7. Плесневые микромицеты обнаружили у 27% больных.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Рахманова А.Г., Виноградова Е.Н., Воронин Е.Е., Яковлев А.А. ВИЧ-инфекция: клиника и лечение, химиопрофилактика передачи ВИЧ от матери к ребенку. Метод. рекомендации. – СПб., 2005 – С. 4.
2. Покровский В.В., Ладная Н.Н., Соколова Е.В., Буравцова Е.В. ВИЧ-инфекция // Информационный бюллетень № 36. – М., 2012 – С. 53.
3. Kaviarasan P.K., Jaisankar T.J., Thappa D.M., Sujatha S. Clinical variations in dermatophytosis in HIV- infected patients // Indian J. Dermatol. Leprol. – 2002.– Vol. 68, №4. – P. 213-6.
4. Климко Н.Н. Микозы: диагностика и лечение. Руководство для врачей. – М., 2008. – С. 3-19.
5. Потеекаев Н.Н. Онихомикоз. – М., 2009. – 92 с.
6. Surjushe A., et al. A clinical and mycological study of onychomycosis in HIV-infection // Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol. – 2007. – Vol. 73, №6. – P. 397-401.
7. Проценко О.А., Борисенко А.В. Менеджмент дерматомикозов кожи у ВИЧ-позитивных больных // Таврический медико-биологический вестник. – 2009. – Т. 12, №4. – С. 169-73.

Поступила в редакцию журнала 29.08.2013

Рецензент: Н.Н. Климко



ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ЭРИТРОМИЦИНА И ИЗОТРЕТИНОНА НА ЭКСПРЕССИЮ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ 2 И 4 (TLR-2 И TLR-4) МОНОЦИТАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С УГРЕВОЙ БОЛЕЗНЬЮ

Исаев Р.Т. (врач-дерматолог)*, Караев З.О.
(зав. кафедрой)

Азербайджанский медицинский университет
(кафедра микробиологии и иммунологии), г. Баку

© Исаев Р.Т., Караев З.О., 2013

При угревой болезни бактериальное инфицирование Propionibacterium acnes, а также P. acnes + Staphylococcus aureus, стимулирует на моноцитах периферической крови преимущественно экспрессию TLR-2; при Candida-бактериальной инфекции – экспрессию TLR-2 и TLR-4. Эритромицин стимулирует экспрессию TLR-2, изотретинон оказывает противоположный эффект. Оба препарата вместе не влияют на экспрессию TLR-4.

Ключевые слова: изотретинон, *Propionibacterium acnes*, toll-подобные рецепторы, угревая болезнь

THE STUDY OF THE ERYTHROMYCIN AND ISOTRETINON ACTIONS ON THE EXPRESSION OF TOLL-LIKE RECEPTORS 2 AND 4 (TLR-2 AND TLR-4) ON THE SURFACE OF MONOCYTES IN PERIFERIC BLOOD OF PATIENTS WITH ACNE VULGARIS

Isayev R.T. (dermatologist), Karaev Z.O.
(head of the chair)

Azerbaijan Medical University (Chair of Microbiology
and immunology), Baku

© Isayev R.T., Karaev Z.O., 2013

* Контактное лицо: Исаев Рашад Тофиг оглы
Тел.: (0099 412) 495-49-78

Results of peculiarity expression of TLR-2 and TLR-4 receptors with monocytes in patients with Acne vulgaris diseases treated with erythromycin and isotretinon have been presented in the article. As results of the surveys revealed that erythromycin stimulates the expression of TLR-2, but isotretinon influences opposite effect. Both of preparations don't have any effects on the expression of TLR-4.

Key words: acne vulgaris, erythromycin, isotretinon, TLR-2 and TLR-4 in monocytes

ВВЕДЕНИЕ

Угревая болезнь по распространенности занимает одно из ведущих мест среди дерматозов человека и является важной медико-социальной проблемой [1]. По многочисленным сообщениям из научной литературы, акне выявляют у 60-96% лиц юношеского возраста, в целом, до 42% консультаций дерматолога связаны с этой патологией. Одной из основных причин развития заболевания у мужчин является увеличение продукции кожного сала и его вязкости под действием андрогенов. При закупорке протока сально-волосяного фолликула создаются благоприятные условия для размножения анаэробных микроорганизмов, в первую очередь – *Propionibacterium acnes*. Переполнение сальной железы детритом приводит к ее разрыву, а поступление антигенов *P. acnes* в толщу дермы вызывает ответную воспалительную реакцию, протекающую обычно по клеточному типу.

В последние годы доказана важная роль Toll-подобных рецепторов (TLR) в инфекционных процессах, обусловленных вирусными, бактериальными и грибковыми микроорганизмами. Считают, что особенности ответной реакции организма определяются связями патогена с теми или иными рецепторами. На клетках иммунной системы в норме к настоящему времени обнаружены 13 Toll-подобных рецепторов. Наиболее изученными являются TLR-2 и TLR-4. Они участвуют в распознавании многих видов инфекционных агентов, в том числе – грамположительных и грамотрицательных бактерий, включая *P. acnes* (преимущественно посредством TLR-2 совместно с рядом других структур) [2, 3], а также *Candida* spp. Такие же рецепторы участвуют в распознавании липопротеинов и пептидогликанов *S. aureus* [4].

В развитии инфекции, вызванной *C. albicans*, принимают участие TLR-2 и TLR-4. TLR-4 (совместно с CD14) распознают маннан дрожжевой формы гриба, TLR-2 – β-1,6 глюкан гифальной формы, и таким образом эти рецепторы могут связывать обе формы *C. albicans*. В лечении угревой болезни широко применяют антибиотики и изотретинон, последний считают наиболее активным средством. В то же время, влияние этих препаратов на факторы естественного иммунитета при инфицировании акне элементов смешанной микробиотой изучено недостаточно [5, 6].

Цель работы – определение эффекта эритромицина и изотретинона на экспрессию TLR-2 и TLR-4 на моноцитах периферической крови пациентов с угревой болезнью.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследовали 30 практически здоровых лиц в качестве контроля (группа I) и 136 пациентов с угревой болезнью в фазе обострения, из которых 40 человек с моноинфекцией очагов акне (группа II), вызванной *P. acnes*; 54 – со смешанной бактериальной инфекцией, обусловленной *P. acnes* в ассоциации с *S. aureus* (группа III); 42 – с *Candida*-бактериальным инфицированием: *P. acnes* в сочетании с *S. aureus* и *Candida albicans* (группа IV). Возраст пациентов составлял от 16 до 27 лет. В течение 2 месяцев перед обследованием больных не подвергали медикаментозному лечению.

Влияние эритромицина и изотретинона на экспрессию TLR-2 и TLR-4 на моноцитах периферической крови пациентов осуществляли методом проточной цитометрии с использованием флуоресцентной метки. Выделение моноцитов из суммарной фракции мононуклеаров крови проводили адгезионным методом, который основывается на избирательной способности их (в отличие от большинства лимфоцитов) быстро прикрепляться к поверхности стекла или пластика. При инкубации взвеси моноцитов и лимфоцитов в течение 2-24 ч в стеклянной (не обработанной силиконом) или пластиковой посуде клетки разделяются на прилипающую (моноциты) и неприлипающую (лимфоциты) фракции.

При выделении моноцитов мы использовали полистероловые чашки Петри для культуры клеток (TC – treated culture dishes) с высокими адгезивными свойствами (Fisher Scientific, BD Falcon TM). В чашку вносили отмытые в среде Игла мононуклеары ($1-3 \cdot 10^7$ клеток), ресуспендированные в среде RPMI 1640 (Sigma), содержащей 10% FCS (Sigma), пенициллин (100 ЕД/мл и 2 мм глутамин, и взвесь инкубировали в течение 1ч при 37°C в условиях CO_2 – инкубатора (5% CO_2). После инкубации чашки промывали от несвязавшихся клеток ФБР pH 7,2. Прилипшие к пластику клетки снимали буферным раствором Enzyme free Cell Dissociation Buffer (Invitrogen). Чистота выделения моноцитов составляла около 90%. Определяли рабочую дозу эритромицина и изотретинона общепринятым методом [7-9].

Выделенные вышеописанным способом моноциты дважды отмывали культуральной средой, определяли рабочую дозу эритромицина и изотретинона общепринятым методом [7, 8]. Инкубировали моноциты в течение 3 ч с рабочей дозой эритромицина или изотретинона, разведенных в культуральной среде, а также в культуральной среде без добавления лекарственного средства (контроль). Затем клетки трижды отмывали, добавляли 50 мкл полной культуральной среды, и в каждую пробирку вносили по 50 мкл предварительно разведенных образцов антител к соответствующим TLR, меченых флюорохромами. Концентрация клеток составляла 10^4 клеток в образце. Материал инкубировали с антителами в

течение 40 минут, отмывали дважды полной культуральной средой центрифугированием при 900 g в течение 5 мин. Для фиксации меченых клеток в каждую пробу добавляли по 100 мкл 2% параформальдегида с последующей инкубацией при 4 °C в течение 30 мин и анализировали на проточном цитометре. Контрольные пробирки содержали клетки с культуральной средой. Использовали меченые античеловеческие моноклональные антитела (FACS Calibur; BD Biosciences): мышиные IgG2a TLR-2-FITC, мышиные IgG1 TLR-4-PE. Результаты выражали средней интенсивностью свечения (у.ед. СИС). Вычисляли средние арифметические величины (M), средние квадратичные отклонения (m). Для оценки статистической значимости различий между соответствующими показателями вычисляли критерий Стьюдента. Достоверными считали значимость различий $P \leq 0,05$. Для определения связи между отдельными показателями был использован корреляционный анализ по Пирсону.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мы исследовали действие эритромицина и изотретинона на экспрессию TLR-2 и TLR-4 на моноцитах периферической крови у обследуемых нами больных. Результаты представлены в таблице.

Таблица

Влияние эритромицина и изотретинона на экспрессию TLR-2 и TLR-4 при угревой болезни

Условия опыта	Группы пациентов			
	I	II	III	IV
TLR-2 _{исх} (у.ед. СИС)	0,5±0,04	2,2±0,19*	2,7±0,16*	2,9±0,21*
TLR-2 _{эр} (у.ед. СИС)	1,9±0,19***	2,8±0,17***	3,5±0,19***	3,7±0,25***
TLR-2 _{итр} (у.ед. СИС)	0,3±0,02**	1,3±0,12***	1,5±0,17***	2,0±0,19***
TLR-4 _{исх} (у.ед. СИС)	0,6±0,05	1,1±0,14*	1,4±0,18*	3,4±0,32*
TLR-4 _{эр} (у.ед. СИС)	0,6±0,06	1,3±0,12*	1,5±0,14*	3,5±0,37*
TLR-4 _{итр} (у.ед. СИС)	0,5±0,05*	1,0±0,15*	1,3±0,17*	3,2±0,31*

Примечание: 1) исх. – исходный; эр. – эритромицин; итр. – изотретинон; 2) различия $P < 0,05$ * – по сравнению с контрольной группой, ** – по сравнению с исходными показателями в группе.

Минимальные значения TLR-2 и TLR-4 были выявлены в группе контрольных лиц (0,5±0,04 у. ед. СИС и 0,6±0,05 у. ед. СИС соответственно) на моноцитах.

В то же время во всех группах больных отмечали достоверное ($P \leq 0,05$) возрастание экспрессии обоих рецепторов. В частности, у пациентов с инфицированием очагов акне *P. acnes* этот показатель возрастал до 2,2±0,19 у. ед. СИС. При смешанной бактериальной инфекции экспрессия TLR2 увеличивалась еще более значительно – до 2,7±0,16 у. ед. СИС, что, видимо, определялось различной выраженностью антигенной нагрузки у отдельных групп больных. Максимальных значений (2,9±0,21 у. ед. СИС) этот показатель достигал у IV группы пациентов с *Candida*-

бактериальной инфекцией очагов акне.

При исследовании TLR-4 установили, что хотя и имело место некоторое повышение экспрессии этих рецепторов на моноцитах, при бактериальных инфекциях оно было менее значительным по сравнению с уровнем TLR-2. Так, если у больных II группы с моноинфекцией, обусловленной *P. acnes*, количество экспрессированных TLR-2 возрастало, по сравнению с контрольной группой, в 4,4 раза, то TLR-4 – только в 1,8 раза. Подобную закономерность выявляли и у лиц со смешанной бактериальной инфекцией патологических очагов. Напротив, в группе больных с *Candida*-бактериальной инфекцией возрастание TLR-4 было максимальным и составляло $3,4 \pm 0,32$ у. ед. СИС, что превышало значения этого показателя в контрольной группе обследованных в 5,7 раз.

При инкубации моноцитов с эритромицином наблюдали выраженное увеличение экспрессии TLR-2 рецепторов на моноцитах всех групп обследованных лиц. Так, в группе контроля средняя интенсивность свечения достигала $1,9 \pm 0,19$ у. ед. СИС, у больных угревой болезнью с моноинфекцией – $2,8 \pm 0,17$ у. ед. СИС, у III и IV групп пациентов – $3,5 \pm 0,19$ у. ед. СИС и $3,7 \pm 0,25$ у. ед. СИС соответственно. Существенной экспрессии TLR-4 под действием эритромицина ни в одной из обследуемых групп отмечено не было.

Изотретинон оказывал на TLR-2 эффект, противоположный эритромицину. Под влиянием изотретинона значительно снижалась экспрессия этих рецепторов на моноцитах как у практически здоровых лиц, так и у всех обследованных групп больных. Так,

в группе контроля этот показатель TLR-2 снижался с $0,5 \pm 0,04$ у. ед. СИС до $0,3 \pm 0,02$ у. ед. СИС. У больных II группы выявили снижение этого показателя в 1,7 раза, у пациентов III и IV – в 1,8 и 1,6 раз соответственно. В то же время, значимого влияния изотретинона на TLR-4 не обнаружили ни в группе контроля, ни у больных угревой болезнью.

Таким образом, при исследовании экспрессии TLR-2 и TLR-4 на моноцитах установили, что при угревой болезни бактериальное инфицирование элементов акне *P. acnes*, а также *P. acnes* в сочетании с *S. aureus*, стимулирует на моноцитах периферической крови преимущественно экспрессию TLR-2, при *Candida*-бактериальной инфекции выявили стимуляцию экспрессии TLR-2 и TLR-4. Эритромицин стимулирует экспрессию TLR-2, изотретинон оказывает противоположный эффект. Оба препарата не влияют на экспрессию TLR-4. Эритромицин имеет важное клиническое значение в лечении пациентов с угревой болезнью, но изотретинон обладает более высоким терапевтическим эффектом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение эритромицина у пациентов с угревой болезнью при бактериальном инфицировании элементов акне *P. acnes*, а также *P. acnes* в ассоциации с *S. aureus* стимулирует экспрессию TLR-2 на моноцитах периферической крови, изотретинон оказывает оппозитный эффект. Оба препарата не влияют на экспрессию TLR-4.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. James W.D. Clinical practice. Acne// N. Engl. J. Med. – 2005. – Vol. 352, №14. – P. 1463-1472.
2. Amal Fathy, Roshdy Wasfi Mohamed, Nader Ali Ismael. Expression of toll-like receptor 2 on peripheral blood monocytes of patients with inflammatory and noninflammatory acne vulgaris// Egyptian J. of Immunol. – 2009. – Vol.16, №1. – P. 127-134.
3. Nagy I., Pivarcsi A., Kis K., et al. Propionibacterium acnes and lipopolysaccharide induce the expression of antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines/chemokines in human sebocytes// Microbes Infect. – 2006. – №8. – P. 2195-2205.
4. Лебедев К.А., Понякина И.Д. Иммунология образраспознающих рецепторов. – М.: URSS, 2008. – 252 с.
5. Метляева Н.Б. Патогенетическое обоснование комплексной терапии вульгарных угрей: Автореф. дис...канд. мед. наук. – Владивосток, 2007. – 23 с.
6. Орлова Н.А. Выбор лечебной тактики у больных различными формами акне: Автореф. дис... канд. мед. наук. – М., 2006. – 23 с.
7. Dispenza M.C., Wolpert E.B., Gilliland K.L., et al. Systemic isotretinoin therapy normalizes exaggerated TLR-2-mediated innate immune responses in acne patients// J. of Investigative Dermatology. – 2012. – №4. – P. 19-23.
8. Jarrousse V., Castex-Rizzi N., Khammari A., et al. Zinc salts inhibit in vitro Toll-like receptor 2 surface expression by keratinocytes //Europ. J. of Dermatol. – 2011. – Vol. 17, №6. – P. 492-496.
9. Ross J.L., Snelling A.M., Carnegie E., et al. Antibiotic-resistant acne: Lessons from Europe// Br. J. Dermatol. – 2003. – №148. – P. 457-478.

Поступила в редакцию журнала 08.07.2013

Рецензент: Н.В. Шабашова



ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ МИКРОСПОРИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ (МИКРОСПОРОЗА) У НОВОРОЖДЕННЫХ: ОПИСАНИЕ КЛИНИЧЕСКОГО СЛУЧАЯ

¹Медведева Т.В. (дерматовенеролог),
²Леина Л.М. (доцент кафедры),
¹Чилина Г.А. (зав. лаб.), ³Рублева И.А.
(дерматовенеролог)

¹НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова; ²Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия; ³СПб ГБУЗ КВД№4, Санкт-Петербург, Россия

©Коллектив авторов, 2013

В статье представлен случай микроспории у новорожденного ребенка.

Ключевые слова: микроспория, новорожденные

MICROSPORUM INFECTIONS (MICROSPOROSIS) IN NEWBORNS: A CLINICAL CASE

¹Medvedeva T.V. (dermatovenereologist), ²
Leina L.M. (associate professor of the chair),
¹Chilina G.A. (head of the laboratory), ³
Rubleva I.A. (dermatovenereologist)

¹Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov; ²St. Petersburg State Pediatric Medical Academy; ³St. Petersburg Skin-Venereal Dispensary №4, St. Petersburg, Russia

©Collective of authors, 2013

The article presents a case of a newborn baby microsporia.

Key words: microsporum infections, newborn

ВВЕДЕНИЕ

Инфекционные поражения кожи у новорожденных, в основном, связаны с бактериальными агентами (преимущественно – со стафилококками). Из грибковых заболеваний в данной группе преобладают нозологические формы, обусловленные *Candida* spp. и *Malassezia* spp. Описания случаев у новорожденных поверхностных микозов, вызванных грибами-дерматомицетами, достаточно редки.

Предрасполагают к возникновению дерматомикозов у детей раннего возраста следующие факторы: недостаточная плотность и компактность рогового слоя эпидермиса (состояние физиологического паракератоза), сдвиг pH кожи в нейтральную и слабощелочную фазу, повышенная потливость, своеобразие состава пота. Самое раннее описание случая поверхностного микоза у новорожденного в возрасте 6-ти часов было сделано Lynch J.R. в работе «Case of ringworm occurring in an infant within 6 hours of birth» в 1876 году. В силу понятных причин соответствующего микологического подтверждения диагноза не было.

Микроспорию (микроспороз) относят к часто регистрируемым заболеваниям микотического происхождения у человека. По частоте встречаемости она уступает только микозам стоп с онихомикозом. В 2011 году доля микроспории среди других заболеваний грибковой этиологии в Российской Федерации составила 21,2% [2], являясь доминирующим по выявляемости микозом в данной группе; у детей её регистрируют значительно чаще, чем у взрослых. Так, заболеваемость микроспорией в 2011 г. в Российской Федерации составила 44,2 на 100 тыс. населения, а в возрастной группе от 0 до 14 лет – 229,1 на 100 тыс.; регионы с самой высокой заболеваемостью – Южный, Приволжский и Центральный федеральные округа [2]. Чаще всего микроспорией болеют дети от 2-х до 7-ми лет [3]. Доминирующий возбудитель на территории России – зоофильный гриб *Microsporum canis*; также возбудителями могут быть антропофильные грибы *M. audouinii* и *M. gypseum*.

Весьма незначительно в научной литературе количество описаний случаев микроспории у новорожденных, так как вероятность встречи с возбудителем данной инфекции, в силу соблюдения особых гигиенических норм, значительно ниже, чем у детей старшего возраста. Если источником заражения детей старших возрастов становятся преимущественно животные (чаще всего – кошки), то у новорожденных в этом качестве чаще всего выступают родители или медицинский персонал, контактирующий с ребенком, либо инфицированное белье и предметы обихода. Snider R. с соавторами в 1993 г. описали случай заражения грибами рода *Microsporum* (возбудитель – *M. canis*) медсестрой отделения новорожденных шести пациентов. К группе риска по возможному возникновению инфекции, вызванной *Microsporum* spp., относят недоношенных детей. Этому способствует

незрелость эпидермального барьера и наличие иммунодефицита у данной категории новорожденных [3, 4]. Также предрасполагают к развитию микотической инфекции высокая частота назначения антибиотиков широкого спектра действия, возможность травмы кожи при катетеризации, использование канюль и лейкопластыря, иммуносупрессия [5].

Лечение данного заболевания у новорожденных представляет сложную задачу в связи с отсутствием стандартных подходов к терапии, что объяснимо редкой встречаемостью данного микоза в этой возрастной группе. В большинстве публикаций авторы указывают, что предпочтительным вариантом лечения является использование топических противогрибковых средств. Это связано с более высоким уровнем безопасности по сравнению с системными антифунгальными препаратами. По данным из научной литературы, в качестве топических антифунгальных средств применяли: клотримазол 1% – в течение 4-х недель, 1% бифоназол – в течение 8 недель, 2% крем миконазола – в течение 8 недель [5, 6].

Gilaberte Y. с соавторами приводят опыт лечения 4-х месячного ребенка гризеофульвином в дозе 15 мг/кг (суточная доза в течение 8 недель в сочетании с использованием 2% шампуня кетоконазола) [7]. Aste A.C. с соавторами в качестве системного антифунгального препарата у ребенка в возрасте 40 дней использовали тербинафин по 62,5 мг в сутки в течение 4-х недель [8]. Имеется сообщение о лечении микроспории новорожденного 25 дней флуконазолом в дозе 5 мг/кг в сутки в течение 15 дней [9].

В нашем наблюдении родители новорожденной девочки (возраст – 24 дня) обратились к дерматологу по месту жительства с жалобами на наличие очага поражения в теменной области волосистой части головы в течение нескольких дней (дата обращения – 5.10.11 г.). Эпидемиологический анамнез: дома есть котенок, которого подобрали на улице.

При осмотре: в теменной области волосистой части головы слева – эритемато-сквамозный очаг овальной формы, 3 см в диаметре, с эрозиями, корочками бело-желтого цвета, волосы в очаге поражения разрезаны. При осмотре под лампой Вуда – характерное изумрудное свечение. При проведении микологического исследования обнаружили мицелий гриба, выделена культура *M. canis*. Девочке назначили наружную антифунгальную терапию. В ноябре 2011 г. ребенок консультирован в СПбГПМА, диагноз подтвержден. С ноября по апрель 2012 г. родители девочки в лечебные учреждения не обращались, проводили самолечение. При обращении в апреле 2012 г. в КВД по месту жительства рекомендована консультация в НИИ медицинской микологии.

При осмотре 17.04.12 г.: очаг в теменной области сохраняется, волосы в очаге поражения склеены между собой, частично отсутствуют, имеются множественные корочки белого цвета (Рис. 1).



Рис. 1. Внешний вид очага поражения

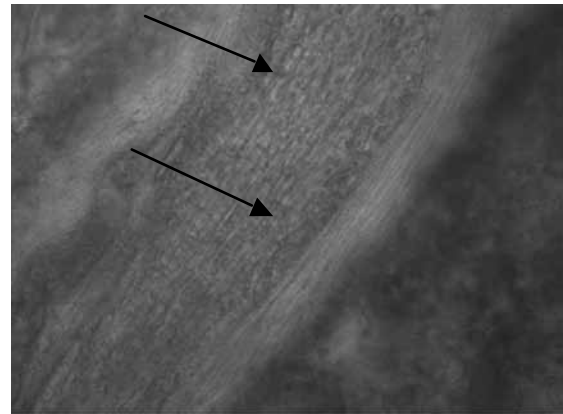
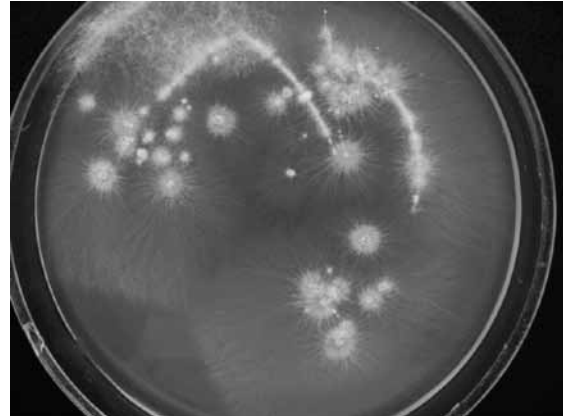


Рис. 2. Мицелий и споры гриба внутри волоса

Рис. 3, 4. Выделенная культура гриба *M. canis* и его микроскопия

Свечение под лампой Вуда сохраняется. При микроскопии обнаружили мицелий гриба, выделена культура *M. canis* (Рис. 2-4).

Установлен диагноз: Микроспория (микроспороз) волосистой части головы, вызванная *M. canis*, хроническое течение. Атипичная форма (по типу асбестовидного лишая). От назначения системных

антифунгальных препаратов родители отказались.

Данной публикацией хотелось привлечь внимание дерматологов и педиатров к редко встречающейся у новорожденных такой поверхностной микотической инфекции, как микроспория (микроспороз) волосистой части головы.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. *Ресурсы и деятельность* медицинских организаций дерматовенерологического профиля. Заболеваемость инфекциями, передаваемыми половым путем, заразными кожными болезнями и болезнями кожи за 2010-2011 (Статистические материалы). – М., 2012.
2. Scerlev M, Miklic P. The changing face of *Microsporum* spp. *Infections // Clin. in Dermatology*. – 2010. – Vol. 28. – P. 146-150.
3. Atanasovski M., El Tal A.K., Hamzavi F, Mehregan D.A. Neonatal dermatophytosis: report of a case and review of the literature // *Pediatric Dermatology*. – 2011.– Vol. 28, №2. – P. 185-188.
4. Smolinski K., Shah S., Honig P, et al. Neonatal cutaneous fungal infections // *Curr. Opin. Pediatr*. – 2005. – Vol. 17. – P. 486-493.
5. Mulholland A., Casey T., Cartwright D. *Microsporum canis* in a neonatal intensive care unit patient // *Australas. J. of Dermatol*. – 2008. – Vol. 49. – P. 25-6.
6. Mosseri R., Finkelstein Y., Garty B. Topical treatment of Tinea capitis in a neonate // *Cutis*. – 2002. – Vol. 69. – P. 88-89.
7. Gilaberte Y., Rezusta A., Coscojuela C. Tinea capitis in a newborn infected by *Microsporum audouinii* in Spain // *J. of the Europ. Academy of Dermatol. and Venereol*. – 2003. – Vol. 17, №2. – P. 239-240.
8. Aste N., Pinna A.L., Pau M., Biggio P. Kerion Celsi in a newborn due to *Microsporum canis* // *Mycoses*. – 2004. – Vol. 47. – P. 236-237.
9. Metkar A., Joshi A., Vishalakshi V, et al. Extensive neonatal dermatophytoses // *Pediatr. Dermatol*. –2010. – Vol. 27, №2. – P. 189-191.

Поступила в редакцию журнала 07.08.2013

Рецензент: И.О. Смирнова



ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ ПРИ КАНДИДОЗНОМ ВУЛЬВОВАГИНИТЕ У ДЕВОЧЕК-ПОДРОСТКОВ

Зиядуллаев У.Х. (с.н.с.)*

Ташкентский педиатрический медицинский институт (кафедра акушерства и гинекологии, детской гинекологии), Ташкент, Узбекистан

© Зиядуллаев У.Х., 2013

Целью исследования было установить патогенетическую информативность степени продукции цитокинов сыворотки крови интерлейкин-6 (ИЛ-6) и интерлейкин-8 (ИЛ-8) у больных кандидозным вульвовагинитом (КВВ) для оптимизации диагностических и лечебно-профилактических мероприятий. Нами обследовано 64 девочки с КВВ в возрасте от 12 до 18 лет и установили, что выявленные особенности продукции цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-8 могут служить дополнительными и объективными критериями направленности воспалительной реакции у пациенток с различными формами Candida-инфекции влагалища. Очевидно, что изменение уровня изучаемых параметров отражает состояние иммунной системы и выраженность воспалительной реакции, характерное для каждой формы Candida-инфекции влагалища.

Ключевые слова: девочки, кандидозный вульвовагинит, патогенез, цитокины

CYTOKINE PROFILE IN VULVOVAGINAL CANDIDOSIS AT YOUNG GIRLS

Ziyadullaev U.K. (senior scientific collaborator)

Tashkent Pediatric Medical Institute (Chair of Obstetrics and Gynecology, Child Gynecology), Tashkent, Uzbekistan

© Ziyadullaev U.K., 2013

The aim of this study was to establish the degree of descriptiveness pathogenic cytokine production of serum interleukin-6 (IL-6) and interleukin-8 (IL-8) in patients with VVC to optimize diagnostic and therapeutic measures. We examined 64 young girls suffering from VVC in age from 12 to 18 years. Thus, the revealed features of the production of cytokines IL-6 and IL-8 may serve as additional objective criteria and orientation of the inflammatory response in patients with various forms of Candida infection vagina. It should be noted that changes in the parameters studied, presumably reflects the state of the immune system and the severity of the inflammatory response characteristic of each form Candida infection vagina.

Key words: cytokines, girls, pathogenesis, vulvovaginal candidosis

Кандидозный вульвовагинит (КВВ) – частая причина обращения за медицинской помощью, с ней связано около 6 млн. визитов к врачу в год. Симптомы, ассоциированные с КВВ, могут вызывать значительный дискомфорт, сопровождаться потерей рабочего времени и изменением самооценки [1-3]. В США около миллиарда долларов затрачивают ежегодно на самолечение и посещение медицинских учреждений [4]. Согласно современным представлениям об иммунологических аспектах патогенеза инфекционных заболеваний, в том числе кандидозного вульвовагинита, ключевую роль играет дисбаланс в системе субпопуляций Th1/Th2-лимфоцитов, опосредованный цитокиновым профилем [5-7]. В последние десятилетия открытие цитокинов и их регулирующих роли в иммунном ответе определили приоритеты их исследования при различных патологических процессах. Спектр и уровень синтезируемых цитокинов связаны с природой этиологического фактора, тяжестью и распространенностью патологического процесса [8-10].

Патогенез КВВ сложен и недостаточно изучен. Учитывая тот факт, что штаммы *Candida albicans*, выделенные у больных КВВ и у носителей, существенно не различаются по ряду биохимических характеристик, можно сделать заключение о ведущей роли состояния макроорганизма в развитии КВВ, а не свойств возбудителя. По данным из научной литературы [11-14], дисбаланс продукции цитокинов, в частности ИЛ-6 и ИЛ-8, является наиболее значимым в патогенезе многих заболеваний. Так, ИЛ-6 – один из наиболее активных цитокинов, участвующих в реализации иммунного ответа и воспалительной реакции. Источником ИЛ-6 являются многие типы клеток: Т-хелперы, моноциты-макрофаги, фибробласты, эндотелиальные клетки, кератиноциты. В качестве дифференцирующего фактора ИЛ-6 определяет переход предшественников антигенспецифических цитотоксических Т-клеток в зрелые эффекторы реакции клеточного лизиса. Дифференцирующая активность ИЛ-6 проявляется и по отношению к В-клеткам. Не являясь индуктором пролиферации, он обеспечивает трансформацию клеток, подготовленных к синтезу антител, в активные их продуценты. В исследованиях последних лет установлено [10, 15-17], что высокое содержание ИЛ-6 позволяет рассматривать этот цитокин в качестве маркера агрессивности течения заболевания при злокачественном новообразовании яичников. ИЛ-8 относят к цитокинам провоспалительного каскада; его оценивают самым ранним медиатором воспаления (хемокином). Основная роль ИЛ-8 состоит в хемотаксическом и активирующем воздействии на нейтрофилы: в дегрануляции и стимуляции лейкоцитов, а также в усилении миграции фагоцитов в место внедрения чужеродного микроорганизма и активации ими синтеза молекул адгезии. Как и другие цитокины, ИЛ-8 рассматривают неизменным звеном биологической мультисистемы – цитокиновой сети, необходимой

* Контактное лицо: Зиядуллаев Уктам Худайбердиевич, e-mail: uktamn@rambler.ru

организму для осуществления межклеточных взаимодействий, что служит основой поддержания клеточного гомеостаза [18]. Показано, что этот хемокин играет важную роль при различных воспалительных и инфекционных заболеваниях, например при псориазе, ревматоидном артрите, респираторном дистресс-синдроме, менингите, острых формах некротизирующего панкреатита. Считают, что определение уровня ИЛ-8 более информативно, чем исследование уровня С-реактивного белка (СРБ), для прогнозирования тяжести болезни, так как пик его концентрации наступает раньше, чем у СРБ [19-21]. Таким образом, совокупность свойств ИЛ-6 и ИЛ-8 как факторов дифференцировки ставит их в единый ряд с наиболее важными эндогенными регуляторами иммунных и воспалительных процессов в организме [22-24].

Цель настоящей работы – установить патогенетическую информативность степени продукции цитокинов сыворотки крови ИЛ-6 и ИЛ-8 у больных КВВ для оптимизации диагностических и лечебно-профилактических мероприятий.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Нами обследовано 64 девочки подросткового возраста (от 12 до 18 лет), страдающих КВВ. Верификацию диагноза КВВ проводили согласно международной классификации ВОЗ (МКБ-Х, рубрики В 37.3 и N 77.1). Диагноз кандидоза гениталий устанавливали на основании клинических и лабораторных признаков. На этапе клинического обследования проводили анализ анамнеза жизни и болезни, общий и гинекологический осмотр пациенток. Диагноз кандидоза считали подтвержденным при наличии вегетирующих форм *Candida* spp. (почкующихся дрожжевых клеток, псевдомицелия и/или мицелия) в окрашенных по Граму мазках со слизистых оболочек вульвы, уретры. Контрольную группу составили 20 практически здоровых девочек от 12 до 18 лет. Уровень ИЛ-6 и ИЛ-8 в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа с использованием тест-системы для ИФА «ИФА-ИНТЕРЛЕЙКИН-6» и «ИФА-ИНТЕРЛЕЙКИН-8» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия, 2011).

Полученные данные подвергали статистической обработке на персональном компьютере Pentium-IV по программам, разработанным в пакете EXCEL, с использованием библиотеки статистических функций с вычислением среднеарифметической (M), стандартной ошибки (m), критерий Стьюдента (t) с вычислением вероятности ошибки (p).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Выявили следующие клинические признаки КВВ: выделения из половых путей различного характера и интенсивности, зуд, жжение наружных половых органов, болезненность мочеиспускания; объективные признаки: выделения из половых путей различного характера, отечность и гиперемия слизистых оболочек

чек вульвы, уретры, кожи перианальной области.

При исследовании наблюдали повышение уровня ИЛ-6 в сыворотке крови у больных КВВ в подростковом возрасте: содержание цитокина ИЛ-6 составило $21,7 \pm 2,4$ пг/мл при $9,4 \pm 1,5$ пг/мл в контроле ($p < 0,02$), содержание ИЛ-8 – $51,2 \pm 2,1$ пг/мл при $23,9 \pm 1,04$ пг/мл в контроле ($p < 0,01$) (табл.1).

Таблица 1

Показатели ИЛ-6 и ИЛ-8 у больных КВВ

Группы	Здоровые (n=20)	Общая группа больных КВВ (n=64)	t	p
ИЛ-6, пг/мл	$9,4 \pm 1,5$	$21,7 \pm 2,4$	4,34	<0,02
ИЛ-8, пг/мл	$23,9 \pm 1,04$	$51,2 \pm 2,1$	11,6	<0,01

Для уточнения характера продукции ИЛ-6 и ИЛ-8, в зависимости от состояния вагинального микроценоза, мы провели сопоставительный анализ (табл. 2).

Таблица 2

Показатели ИЛ-6 и ИЛ-8 в зависимости от состояния вагинального микроценоза

Группы	Бессимптомное <i>Candida</i> -носительство (n=16)	Острая форма КВВ (n=37)	Хр. рецидивирующая форма КВВ (n=11)	p2-1	p3-1	p3-2
ИЛ-6, пг/мл	$16,6 \pm 1,5$	$37,9 \pm 1,3$	$32,1 \pm 1,1$	<0,01	<0,01	<0,05
ИЛ-8, пг/мл	$28,9 \pm 2,2$	$53,5 \pm 1,8$	$40,6 \pm 1,4$	<0,01	<0,05	<0,05

Установили, что у подростков с бессимптомным *Candida*-носительством, имеет место лишь тенденция к повышению уровня ИЛ-6 и ИЛ-8, составляя, соответственно, $16,6 \pm 1,5$ пг/мл и $28,9 \pm 2,2$ пг/мл в сыворотке периферической крови. У больных с острой формой кандидозного вульвовагинита, наоборот, отмечали резкое увеличение уровня продукции цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-8 до $37,9 \pm 1,3$ пг/мл и $53,5 \pm 1,8$ пг/мл соответственно, что отражает выраженность глубины воспаления в этой группе пациенток. Интересен факт обнаружения некоторого подавления уровня продукции ИЛ-6 и ИЛ-8 у пациенток с хронической рецидивирующей формой КВВ, по сравнению с его острой формой, что имеет важное патофизиологическое значение в патогенезе развития хронизации и рецидивирования заболевания.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время к системе цитокинов относят около 300 индивидуальных полипептидных веществ. Они образуются практически во всех клетках организма для осуществления межклеточного взаимодействия и регуляции биохимических процессов в самой клетке [12, 19] и участвуют в регуляции специфического иммунного ответа. От того, какие из цитокинов находятся в окружении Т-лимфоцитов во время контакта с патогеном, зависит по какому типу (клеточному или гуморальному) будет происходить дальнейший процесс иммунного ответа орга-

низма [9, 13]. По данным Nickoloff B.J., Karabin G.D. (1991), при микотической инфекции активаторами фунгицидности полиморфно-ядерных лейкоцитов на «предиммунном» этапе выступают медиаторы макрофагов – TNF- α , IL-1, IL-6, хемокины (IL-8) [26]. Именно они обеспечивают защиту от «оппортунистических микозов» при полноценной иммунной системе. Одним из основных факторов регуляции защитных механизмов организма человека является ИЛ-6. Он синтезируется, в основном, моноцитами и обладает как провоспалительными, так и противовоспалительными функциями [1, 2]. Современными исследователями было показано, что эндогенный ИЛ-6 крайне важен для эффективной защиты против тяжелых инфекций с грамотрицательными и грамположительными бактериями. При диссеминированном кандидозе у ИЛ-6-дефицитных мышей (ИЛ-6-/-) выявили более массивную обсемененность органов грибом и повышенную летальность по сравнению с контрольной группой животных ИЛ-6+/+ [17]. При изучении мононуклеарных клеток периферической крови и цельных клеток крови на способность к пролиферации и продукции ИЛ-6 у больных с рецидивирующей формой КВВ для оценки иммунного ответа, установили, что подавление клеточного иммунного ответа у всех пациенток по сравнению с контролем [4, 16]. ИЛ-8 – низкомолекулярный цитокин воспаления, принадлежащий к семейству хемокинов, продуцируется под воздействием бактериальных эндотоксинов и цитокинов, главным образом, TNF и ИЛ-1. Образуюсь из общего для различных хемокинов предшественника, состоящего из 99 аминокислотных остатков (АКО), ИЛ-8 содержит 72 АКО и существует в растворе в виде димера. Он известен как NAP-1 (активирующий нейтрофилы пептид-1), NAF (фактор активации нейтрофилов), GCF (хемотактильный фактор гранулоцитов) и NCF (хемотактиль-

ный фактор нейтрофилов). Активирует нейтрофилы, в меньшей мере – другие гранулярные лейкоциты, вызывает их хемотаксис в очаг воспаления. Точиевой М.Х. и соавторами изучены уровни про- и противовоспалительных цитокинов на локальном и системном уровнях в I триместре беременности у женщин с различными формами генитального кандидоза и невынашиванием беременности [20]. Авторы [24] рекомендуют проведение определения активности уровня ИЛ-8 в слизи цервикального канала у беременных с КВВ в I триместре для выявления критериев риска невынашивания беременности. Установлена обратная связь концентрации ИЛ-8 с уровнем специфических IgA к грибам, т.е. усиление синтеза ИЛ-8 сопровождалось снижением концентрации в крови специфических IgA к грибам. В научной литературе практически отсутствуют данные относительно цитокинового профиля при КВВ у девочек подростков. В связи с этим нами изучены особенности продукции цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-8 сыворотки крови для установления их патогенетической информативности у девочек подростков больных КВВ.

ВЫВОДЫ

Выявленные особенности продукции цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-8 могут служить дополнительными и объективными критериями оценки воспалительной реакции у пациенток с *Candida*-контаминацией и *Candida*-инфекцией влагалища (бессимптомное *Candida*-носительство, острая и рецидивирующие формы). Отметим, что изменение уровня изучаемых параметров, по-видимому, отражает состояние иммунной системы и выраженность воспалительной реакции, характерное для каждой формы *Candida*-инфекции влагалища, что имеет значение в патогенезе развития хронического течения и развития кандидозного вульвовагинита у девочек-подростков.

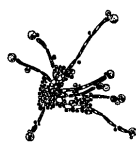
ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Климко Н.Н. Микозы: диагностика и лечение: руководство для врачей. – М., 2008. – 245 с.
2. Мелёхина Ю.Э., Фролова Е.В., Мирзабалаева А.К. Хронический рецидивирующий кандидоз слизистых оболочек // Проблемы медицинской микологии. – 2011. – Т. 13, №1. – С. 49-53.
3. Павликова Е.П., Мерай И.А. Клиническое значение интерлейкина-6 и фактора некроза опухоли при ишемической болезни сердца // Кардиология. – 2003. – №8. – С. 68-71.
4. Серов О.Ф. Острый вульвовагинальный кандидоз. Современный взгляд на проблему, инновации в лечении // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2007. – №1. – С. 60-62.
5. Романова Н.В., Шилкина Н.П., Ильиной Н.Ю. Интерлейкин-1, интерлейкин-4, интерлейкин-6 и фактор некроза опухоли у больных дискоидной и системной формами красной волчанки // Иммунология. – 2006. – Т. 26, №6. – С. 360-363.
6. Конгуров Н.В., Герасимова Н.М., Вишневецкая Н.Ф. Актуальные проблемы лечения урогенитального кандидоза // Акушерство и гинекология. – 2005. – №4. – С. 50-53.
7. Мирзабалаева А.К. Кандидоз гениталий в гинекологической практике // Доктор.Ру. – 2010. – Т. 58, №7. – С. 16-20.
8. Жорж О.Н., Мирзабалаева А.К. Новые возможности иммуномодулирующей терапии при хроническом рецидивирующем кандидозе гениталий и папилломавирусной инфекции // Акушерство и гинекология. – 2010. – №6. – С. 80-84.
9. Кадагидзе З.Г. Цитокины // Практическая онкология. – 2005. – Т. 4, №3. – С. 131-139.
10. Лебедева Т.Н. Иммунитет при кандидозе (обзор) // Проблемы медицинской микологии. – 2004. – Т. 6, №4. – С. 8-16.
11. Азрумнян В.Г. Местный противогрибковый иммунитет при вульвовагинальном кандидозе у беременных // Акушерство и гинекология. – 2008. – №6. – С. 23-26.
12. Галактионов В.Г. Иммунология. – М.: Академия, 2009. – 560 с.
13. Закиева В.А., Куценко И.И., Боровиков И.О. Цитокины в терапии рецидивирующих вульвовагинальных кандидозов. Сб. статей «Иммунотерапия в гинекологии». – СПб.: «Новая Альтернативная Полиграфия», 2007. – С. 24-25.

14. *Witkin S.S.* An altered immunity hypothesis for the development of symptomatic bacterial vaginosis // *Clin. Infect. Dis.* – 2007. – Vol. 44, №4. – P. 554-557.
15. *Кашкин К.П.* Иммунологические исследования в клинике инфекционных заболеваний // *Новости прикладной иммунологии и аллергологии.* – 2004. – №8. – С. 1-10.
16. *Прилепская В.Н., Байрамова Г.Р.* Вульвовагинальный кандидоз. Клиника, диагностика, принципы терапии. – М.: «ГЭОТАР-Медиа», 2010. – 80 с.
17. *Wasiela M.* Correlation between levels of selected cytokines in cervico-vaginal fluid of women with abnormal vaginal bacterial flora // *Med. Dosw. Microbiol.* – 2005. – Vol. 57, №33. – P. 327-333.
18. *American Academy of Pediatrics.* Group A streptococcal infections // *Pickering- LK, ed. Red Book: Report of the Committee of Infectious Diseases, 25th eds.* Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics. 2010. – P. 526-536.
19. *Долгушин И.И., Долгушин И.И., Телешева Л.Ф. и др.* Провоспалительные цитокины цервикального секрета и сыворотки крови у женщин с генитальной инфекцией // *Ж. микробиологии.* 2004. – №4. – С. 43-46.
20. *Симбарская М.А., Долго-Сабурова Ю.В., Мирзабалаева А.К. и др.* Иммуномодулирующая терапия в комплексном лечении рецидивирующего кандидозного вульвовагинита // *Проблемы медицинской микологии.* – 2012. – Т. 14, №3. – С. 32-37.
21. *Шабашова Н.В., Кузьмина Д.А., Фролова Е.В. и др.* Нарушение местного иммунитета и иммунотерапия гепоном при хроническом воспалении слизистых оболочек разной локализации // *Вестник СЗГМУ им. И.И.Мечникова.* – 2010. – Т. 2, № 4. – С. 59-64.
22. *Бурменская О.В., Байрамова Г.Р., Непша О.С.* Состояние локального иммунитета при хроническом рецидивирующем вульвовагинальном кандидозе // *Иммунология.* – 2011. – Т. 32, №3. – С. 154-159.
23. *Воропаева Е.А., Афанасьев С.С., Кудрявцева М.В., Алешкин В.А.* Микроэкология и показатели гуморального иммунитета влагалища женщин с неспецифическими воспалительными заболеваниями гениталий // *Микробиол.* – 2005. – №3. – С. 65-69.
24. *Anton G.* Evidence of a TH1-Shift of local vaginal inflammatory response during bacterial vaginosis // *Infection.* – 2008. – Vol. 36, №2. – P. 147-152.

Поступила в редакцию журнала 29.08.2013

Рецензент: А.К. Мирзабалаева



УДК57.083.18:577.214.3:543.51

ПЦР С ЭЛЕКТРОСПРЕЙ-ИОНИЗАЦИОННОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЕЙ В ОБНАРУЖЕНИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ГЕМОКУЛЬТУРАХ

¹Васильева Н.В. (директор института),
¹Полищук А.Г. (зав. лаб.)*, ¹Руднева М.В.
(м.н.с.), ¹Дакс А.А. (н.с.), ¹Шурпицкая О.А.
(зав. лаб.), ²Зайцева М.М. (студент)

¹НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова; ²Санкт-Петербургский государственный политехнический университет (отделение медицинской физики и биоинженерии), Санкт-Петербург, Россия

©Коллектив авторов, 2013

Цель данного исследования – оценка эффективности PLEX-ID платформы, основанной на технологии полимеразной цепной реакции (PCR) с электроспрей-ионизационной время-пролетной (ESI-TOF) масс-спектрометрией (МС), для обнаружения, идентификации и выявления видового разнообразия патогенных микроорганизмов в образцах крови пациентов с подозрением на инфекцию кровотока. 168 гемокультур, полученные в течение трех месяцев, были исследованы с использованием PLEX-ID. Из них 74 были зарегистрированы в аппарате BacT/Alert 3D (bioMérieux) как положительные и 94 – как отрицательные. При сравнении полученных результатов с результатами классической микробиологической идентификации выявили их совпадение в 90,8% и 76% случаев на уровне рода и вида соответственно. Более одного вида микроорганизма было обнаружено в 10 из 74 (13,5%) образцов с помощью PLEX-ID и в 4-х образцах (4%) – с помощью культурального метода. Время идентификации бактерий с использованием PLEX-ID платформы уменьшилось, как минимум, на 24 часа, а грибов рода *Candida* – на 48 ч.

Ключевые слова: гемокультура, пациенты с сепсисом, PLEX-ID, ПЦР с электроспрей-ионизационной время-пролетной масс-спектрометрией

PCR-ELECTROSPRAY IONIZATION MASS-SPECTROMETRY FOR DETECTION AND IDENTIFICATION OF PATHOGENIC MICROORGANISMS FROM BLOOD CULTURE

¹Vasilyeva N.V. (director of the institute), ¹Polischouk A.G. (head of the laboratory), ¹Rudneva M.V. (junior scientific collaborator), ¹Daks A.A. (scientific collaborator), ¹Shurpickaya O.A. (head of the laboratory), ²Zajceva M.V. (student)

¹Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov; ²St. Petersburg State Polytechnical University (Department of medical physics and bioengineering), St. Petersburg, Russia

©Collective of authors, 2013

The aim of this study was to evaluate the performance of the PLEX-ID platform based on PCR amplification coupled with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry (PCR/ESI-TOF MS) for detection, identification, and determination of the distribution of pathogenic microorganisms in blood specimens obtained from patients with suspected bloodstream infections. A total of 154 whole blood cultures (74 positive and 80 negative determined by the BacT/Alert 3D instrument, bioMérieux) collected during 3 month period were evaluated using PLEX-ID and the results were compared with those obtained by microbiology culture. PLEX-ID and microbiology culture reached an agreement of 90,8% at the genus and 76% at the species levels in bacterial and candidal identification. Multiple organisms were detected in 10 out of 74 (13.5%) specimens by PLEX-ID, and in 4 (4%) by culture. Time required for bacteria and *Candida* species identification decreased at least for 24 h and for 48 h, respectively, when using PLEX-ID platform.

Key words: blood culture, PCR/ESI-TOF MS, PLEX-ID, septic patients

* Контактное лицо: Полищук Анна Генриховна,
Тел.: (812) 303-51-40

ВВЕДЕНИЕ

Необходимость внедрения новых технологий быстрой и точной диагностики инфекций кровотока человека – это веление времени. Идеальная технология диагностики должна обеспечивать быстрое начало направленной этиотропной терапии, для чего необходимо быстро и точно определить микроорганизм–возбудитель инфекции и оценить его устойчивость к антимикробным препаратам. В случае сепсиса у пациентов скорость диагностики – ключевой фактор, поскольку каждый час задержки эффективного лечения существенно снижает выживаемость больных [1].

Ныне культуральная диагностика является стандартом для обнаружения микроорганизмов в крови, однако существует ряд ограничений в ее применении. Видовая идентификация возбудителя бактериальной инфекции кровотока и определение его чувствительности к антибактериальным препаратам с помощью традиционных культуральных методов занимает до 3-5 суток. Для возбудителей микозов тот же анализ занимает 5-10 суток. Кроме того, культуральная диагностика не достаточно чувствительна. Результаты посева крови отрицательны более чем в 50% случаев, когда имеются клинические или/и лабораторные данные в пользу генерализованной инфекции [2]. Чувствительность культурального метода существенно снижается в случае, когда образцы крови забирают у пациента на фоне антимикробной терапии. И, наконец, с помощью классических бактериологических методов невозможно обнаружить многие потенциально опасные микроорганизмы (например, *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Tropheryma whipplei*) [3].

ПЦР с электроспрей-ионизационной время-пролетной (PCR-ESI-TOF) масс-спектрометрией (МС) – это новейшая молекулярная технология. Как следует из названия, она сочетает две молекулярные технологии – полимеразную цепную реакцию и электроспрей-ионизационную время-пролетную масс-спектрометрию. PCR-ESI-TOF МС технология обеспечивает возможность скрининга всех присутствующих в образце патогенных микроорганизмов (бактерий, вирусов, грибов и простейших) как предполагаемых, так и неизвестных без предварительного посева. Основной отличительной чертой PCR-ESI-TOF МС системы, с точки зрения технологического преимущества, является ее супермультиплексность, которая обеспечивается на стадии проведения ПЦР. Она достигается использованием праймеров к фрагментам генома, общим для представителей разных царств микроорганизмов, в сочетании с праймерами, специфичными для отдельных групп микроорганизмов, родоспецифичных праймеров и праймеров к участкам генома бактерий, определяющим их устойчивость к антибиотикам (обеспечивая тем самым возможность определения резистентности бактерий к данным антибиотикам). После амплификации со-

ответствующих геномных фрагментов на электроспрей-ионизационном масс-спектрометре производится автоматизированный масс-спектрометрический анализ продуктов амплификации, в ходе которого устанавливают молекулярные массы ПЦР ампликона и/или смеси ампликонов. Затем с помощью специального программного обеспечения прибор вычисляет нуклеотидный состав ампликона (количественное соотношение каждого нуклеотида). На основании сравнения полученных композиций нуклеотидов с имеющимися в базе данных прибора нуклеотидными композициями, специфичными для известных видов микроорганизмов, анализируемые композиции нуклеотидов автоматически преобразуются в видовые названия микроорганизмов [4].

До 2011 года технологии PCR-ESI-TOF МС, в основном, применяли для расследования вспышек инфекционных заболеваний (например, при вспышках респираторных инфекций среди новобранцев американских вооруженных сил, находившихся в военных условиях) и генотипирования отдельных видов патогенных микроорганизмов [5, 6]. Совсем недавно опубликованы работы по характеристике генома микробов при различных локализациях у пациентов, включая пациентов лечебных стационаров [7-10].

В данном исследовании (впервые в России) использовали диагностическую платформу PLEX-ID (Abbott Molecular, США), основанную на PCR-ESI-TOF МС технологии. PLEX-ID была сертифицирована для клинического применения в Европейском Союзе (CE-mark) в апреле 2012 г.

Цель данного исследования – сравнение результатов PLEX-ID анализа и культуральных методов по точности и скорости идентификации бактерий и грибов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

МАТЕРИАЛЫ

В работе использовали венозную кровь от:

- 1) пациентов стационаров с клиническими признаками инвазивных микозов;
- 2) пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) с клиническими признаками системной воспалительной реакции или с наличием клинических признаков тяжелой пневмонии, перитонита, эндокардита;
- 3) гематологических больных и реципиентов после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) с нейтропенией или иммуносупрессией, или клиническими признаками системной воспалительной реакции.

МЕТОДЫ

Забор клинического материала и получение культур.

Взятие материала осуществляли согласно МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории».

5 мл крови помещали во флаконы с питательной

средой BacT-Alert (BioMérieux, Франция). Флаконы, в которых не обнаруживали рост микроорганизмов в течение 7 суток, считали отрицательными.

Классические методы идентификации микроорганизмов.

Из положительных флаконов незамедлительно проводили высеv на плотные питательные среды, и выделенные культуры микроорганизмов дифференцировали по совокупности свойств с помощью классических методов.

Чувствительность бактерий к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом (диски Becton Dickinson, США) и на аппарате WalkAway-40 (Siemens).

Изучение микробиоты биообразцов с помощью ПЦР-ESI-TOF MS.

Экстракция ДНК микроорганизмов из гемокультур.

ДНК выделяли из 1100 мкл гемокультуры по протоколу производителя. Лизис клеточного содержимого образцов проводили при помощи механического разрушения на гомогенизаторе Precellys (Bertin Technologies, Франция) с использованием лизирующего буфера, содержащего магнитные частицы, от производителя (Abbott Molecular). Выделение и очистку ДНК производили на экстракторе Plex-ID SP (Abbott Molecular) по технологии магнитной сепарации.

Амплификация ДНК

В исследовании применяли планшеты PLEX-ID платформы VAC Spectrum BC (Рис. 1), VAC Detection и Broad Fungal планшеты.

С помощью планшетов VAC Spectrum BC и VAC Detection, имеющих 96-луночный формат, можно обнаруживать 3000 видов бактерий, 40 видов грибов

рода *Candida*, маркеры резистентности бактерий к антибиотикам: *Staphylococcus* spp. – к метициллину (*mecA*), *Enterococcus* spp. – к ванкомицину A и B (*vanA/B*) и грамм-негативных бактерий – к карбапенемам (*kpc*). В каждой планшете можно производить анализ одновременно 6 клинических образцов, причем каждый образец наносят в 16 лунок, содержащих разные пары праймеров. Каждая лунка планшеты содержит ПЦР смесь (от производителя), состоящую из праймеров (универсальные бактериальные, специфичные для отдельных групп бактерий и для грибов рода *Candida*), ДНК-полимеразу, нуклеотиды, внутренний контроль (ДНК тыквы). Внутренний контроль помогает детектировать контаминацию ПЦР и обеспечивает возможность полуколичественного анализа ДНК в образцах. Универсальные праймеры связываются с консервативными областями генома всех видов патогенных бактерий. Нуклеотидные последовательности, фланкируемые универсальными праймерами, варьируют в зависимости от вида бактерии, что дает возможность осуществлять видовую идентификацию. Наличие дополнительных пар групп и родоспецифичных праймеров повышает точность идентификации. Очищенная ДНК каждого образца была перенесена в 16 лунок планшеты с помощью роботизированного пипеттора для раскапывания планшет (Plex-ID Fluid Handler, Abbott/Tecan). На основе планшеты Broad Fungal идентифицируют различные виды грибов, т.к. она содержит универсальные и родоспецифичные праймеры к фрагментам генома грибов и устроена аналогично, описанной выше. Амплификацию ДНК проводили на термоциклере Plex-ID TC (Eppendorf, Германия) по программам циклирования от производителя.

Масс-спектрометрический анализ.

Клинические образцы (6 образцов /планшета)

	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	
16S rDNA Broad Bacterial	A	346	346	346	346	346	879	879	879	879	879	879	<i>mecA</i>
	B	348	348	348	348	348	3767 4675	3767 4675	3767 4675	3767 4675	3767 4675	3767 4675	<i>vanA</i> KPC ESBL
	C	361	361	361	361	361	3768	3768	3768	3768	3768	3768	<i>vanB</i>
23S rDNA Firmicutes	D	349	349	349	349	349	3030	3030	3030	3030	3030	3030	Candida identification & speciation
	E	3350	3350	3350	3350	3350	3031	3031	3031	3031	3031	3031	
Staphylococcus Enterobacteriaceae	F	2249 358	2249 358	2249 358	2249 358	2249 358	3766	3766	3766	3766	3766	3766	
Gammaproteobacteria	G	3346	3346	3346	3346	3346	3865	3865	3865	3865	3865	3865	
Beta/Gammaproteobacteria	H	3921	3921	3921	3921	3921	4437	4437	4437	4437	4437	4437	Pumpkin DNA Extraction Control

Рис. 1. VAC spectrum BC планшета. Каждый образец наносят в 16 ячеек. Четыре ячейки содержат универсальные бактериальные праймеры (к участкам 16S и 23S рибосомальной ДНК бактерий), 4 ячейки - праймеры для отдельных групп и родов бактерий, 3 ячейки - праймеры к участкам генома бактерий, определяющим устойчивость к антибиотикам, 4 - праймеры к участкам ДНК грибов рода *Candida*, 1 - к участкам ДНК тыквы (для контроля эффективности экстракции ДНК). Цифры в кружочках – названия пар праймеров (так, например, для 16S рДНК используют 3 пары праймеров, - 346, 348, 361, для амплификации трех различных участков)

После стадии амплификации, закрытые герметичнопланшеты переносили в ESI-TOF масс-спектрометр для дальнейшего масс-спектрометрического анализа амплифицированных последовательностей. На первом этапе в масс-спектрометре проводили обессоливание ПЦР-продуктов, затем – анализ очищенной ДНК.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика полученного материала.

Материал был получен от 156 пациентов (209 образцов крови, 4 – диализата из брюшной полости, 1 – гноя из раны, 1 – ликвора) в течение мая – ноября 2012 года из отделений интенсивной терапии и реанимации СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 15-ти клиник Санкт-Петербурга и 1 клиники Москвы (табл. 1).

Таблица 1.

Медицинские учреждения, из которых поступил клинический материал

Клиника	Кол-во пациентов
Санкт-Петербург	
СЗГМУ им. И.И. Мечникова	64
Институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой	20
СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова	19
Городская клиническая больница №31	7
Городская Мариинская больница	6
Городская психиатрическая больница № 3 им. И. И. Скворцова-Степанова	6
Ленинградская Областная Клиническая больница	3
Городская Покровская больница	2
Городская больница Святой преподобномученицы Елизаветы	2
Микологическая клиника НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина	2
Детская городская больница №1	2
Российский нейрохирургический НИИ им. проф. А.Л. Поленова	1
Городская многопрофильная больница №2	1
Городская туберкулезная больница №2	1
Другие	5
Москва	
НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского	15
Всего	156

Из учреждений Санкт-Петербурга большинство образцов были получены от пациентов с онкологическими заболеваниями (27%), гнойно-некротическими процессами в костях и суставах (26%) и острой почечной недостаточностью на фоне сахарного диабета 1 типа (17%) (Рис. 2).



Рис. 2. Клинические диагнозы пациентов, включенных в исследование

* - пациенты с неустановленным диагнозом или с несколькими диагнозами

Сравнительная характеристика ПЦР-ESI-TOF МС и культуральных методов идентификации микроорганизмов.

С помощью PLEX-ID системы было проанализировано 154 образца крови, из которых 74 были положительными и 80 – отрицательными в системе гемокультивирования BacT-Alert. Все положительные в системе BacT-Alert образцы были также положительны при посеве.

Для 138 образцов крови результаты PCR-ESI-TOF МС были сравнены с результатами определения вида при помощи посева на питательные среды. Для положительных образцов крови результаты идентификации микроорганизмов PCR-ESI-TOF МС и культуральным методом не совпали по виду обнаруженных микроорганизмов в 24% случаев, а по роду – в 9,2% (табл.2).

Таблица 2.

Случаи несовпадений идентификации микроорганизмов при использовании технологии PCR-ESI-TOF МС и культурального метода

№	Образец	ПЦР- ESI-TOF МС	Посев
1	кровь	<i>Corynebacterium coyleae</i>	Рост есть (затруднения с идентификацией м/о)
2	кровь	<i>Candida glabrata</i>	Роста нет
3	кровь	<i>C. parapsilosis</i>	Роста нет
4	кровь	<i>Staphylococcus capitis</i> , <i>S. saccharolyticus</i>	<i>S. epidermis</i>
5	кровь	<i>S. haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>
6	кровь	<i>S. haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>
7	кровь	<i>S. hominis</i> , <i>Aerococcus viridans</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>
8	кровь	<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>
9	кровь	<i>Micrococcus lylae</i> , <i>M. luteus</i>	<i>Micrococcus spp.</i>
10	кровь	<i>M. luteus</i>	<i>Micrococcus spp.</i>
11	кровь	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>A. genomospecies</i>
12	гной	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus spp.</i>
13	диализат из брюшной полости	<i>Trichosporon inkin</i>	Рост есть (затруднения с идентификацией м/о)
14	кровь	<i>S. hominis</i> , <i>Aerococcus viridans</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>
15	кровь	<i>S. aureus mecA</i> положительный (MRSA), <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Burkholderia cepacia</i>
16	кровь	Коагулазонегативный <i>Staphylococcus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>S. epidermis</i> , <i>Enterococcus spp.</i>
17	кровь	<i>Propionibacterium acnes</i>	Анаэробные кокки
18	кровь	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. famata</i>

Причины несовпадения были следующие: идентификация при посеве ограничивалась родовой принадлежностью микроорганизма (№ 5-10, 12, 14, 16), микроорганизм не вырос при посеве (№ 2,3), микроорганизм вырос при посеве, но его идентификация была затруднена (№ 1, 13), несовпадение в определении вида при использовании технологии PCR-ESI-TOF МС и культурального метода (№ 4, 11, 15, 18).

Подтвердить видовую идентификацию бактерий, полученной с помощью PCR-ESI-TOF МС, можно используя две молекулярные технологии – ДНК секвенирование и MALDI-TOF масс спектрометрию. В настоящем исследовании результаты идентификации

микроорганизмов в образцах №15 и № 18 с помощью MALDI-TOF MC и PLEX-ID анализов совпали. Отметим, что другими авторами показано также соответствие результатов идентификации бактерий/грибов с использованием PCR-ESI-TOF MC и MALDI-TOF MC технологий [11].

Для того чтобы понять, какова вероятность появления положительных результатов при PLEX-ID анализе в случае, если гемокультура отрицательна в системе гемокультивирования BacT-Alert, мы проанализировали 80 BacT-Alert отрицательных гемокультур. Оказалось, что все отрицательные в BacT-Alert системе образцы были также отрицательны при анализе с помощью PLEX-ID системы, что позволяет предположить одинаковую аналитическую чувствительность обеих систем и рекомендовать BacT-Alert систему для обнаружения микроорганизмов в гемокультурах в рутинной практике. Данные образцы также были отрицательны и при исследовании культуральным методом. Таким образом, результаты всех трех методов детекции микроорганизмов из отрицательных в BacT-Alert системе гемокультур совпали.

Выявление смешанных инфекций.

В настоящем исследовании более чем один микроорганизм был выявлен в десяти из 74 образцов (13,5%) при использовании PLEX-ID системы и в трех образцах из 74 – при посеве (4%) (табл. 3).

Таблица 3.

Идентификация смеси микроорганизмов в образцах крови с использованием технологии PCR- ESI-TOF MC

№ образца	ПЦР- ESI-TOF MC	Посев
1	<i>S. capitis, S. saccharolyticus</i>	<i>S. epidermis</i>
2	<i>M. lylae, M. luteus</i>	<i>Micrococcus sp.</i>
3,4	<i>S. epidermidis, S. lugdunensis</i>	<i>S. epidermidis</i>
5	<i>S. hominis, A. viridans</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>
6	<i>M. luteus, C. xerosis</i>	<i>M. luteus</i>
7	<i>Pseudomonas putida, S. haemolyticus</i>	<i>P. putida</i>
8	<i>S. epidermidis, S. hominis, C. parapsilosis</i>	<i>S. epidermidis, S. hominis</i>
9	<i>S. aureus mecA</i> положительный (MRSA), <i>K. pneumoniae</i>	<i>S. aureus, Burkholderia cepacia</i>
10	Коагулазонегативный <i>Staphylococcus, E. faecalis</i>	<i>S. epidermis, Enterococcus sp.</i>

При использовании PLEX-ID в одном из этих трех образцов была обнаружена дополнительно *Candida parapsilosis*, в другом – *E. faecalis*, в двух оставшихся обоими методами были выявлены 2 микроорганизма, но принадлежавшие к разным видам. Таким образом, PLEX-ID анализ более эффективен, чем культуральный метод, для выявления смешанных культур в крови. Этот результат согласуется с результатами исследований других лабораторий, применявших PCR-ESI-TOF MC для обнаружения микроорганизмов в гемокультурах [4, 9, 12]. С учетом того, что успешное выявление микроорганизмов при использовании метода культивирования напрямую зависит от состава питательной среды, нельзя исключить вероятность

того, что более низкая эффективность культурального метода по выявлению смеси микроорганизмов связана с субоптимальными условиями культивирования. С другой стороны, большая эффективность выявления микроорганизмов может быть связана с более высокой вероятностью ложно-положительного результата при PLEX-ID анализе. Для получения определенного заключения по этому вопросу необходимо подтверждение полученных в PLEX-ID данных результатами еще одной технологии, когда напрямую, без этапа культивирования, удастся идентифицировать все находящиеся в биообразце микроорганизмы. При этом также проводят PCR-ESI-TOF MC, но работают с набором всех ДНК, находящихся в образце. В настоящее время сиквенирование «нового поколения» широко используют для анализа генома микробных сообществ окружающей среды и самого человека.

Скорость идентификации.

При использовании PCR-ESI-TOF MC время видовой идентификации бактерий в гемокультурах сократилось, как минимум, на 12-24 часа, а грибов рода *Candida*, как минимум, на 24-48 часов.

Выявление резистентных к антибиотикам бактерий.

Выявление резистентности к антибиотикам в PLEX-ID анализаторе происходило одновременно с видовой идентификацией. С помощью использовавшейся в исследовании аналитической панели существовала возможность выявить устойчивые к метициллину золотистые стафилококки – Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), к ванкомицину А и В – энтерококки, к карбапенемам – грамотрицательные бактерии. При использовании PLEX-ID (как и культурального метода) были обнаружены 2 штамма MRSA. Резистентность бактерий была подтверждена диско-диффузионным методом. Других резистентных к антибиотикам изолятов бактерий не было выявлено.

Корректность определения чувствительности бактерий к антибиотикам с помощью PCR-ESI-TOF MC, согласно работам двух авторских коллективов, колеблется от 69% до 100% для MRSA [7, 13]. Другими авторами показано полное отсутствие соответствия между результатами определения чувствительности золотистого стафилококка к метициллину и энтерококков к ванкомицину А и В при использовании PCR-ESI-TOF MC и традиционных методов определения чувствительности микроорганизмов [10]. В данном исследовании маркер резистентности к метициллину (*mecA*) детектировали в группе коагулазонегативных стафилококков, а маркеры резистентности к ванкомицину А и В (*van A/B*) – у лактобацилл. Подобная ситуация описана и в статье [14].

Спектр выявленных патогенных микроорганизмов.

Всего в положительных образцах гемокультур было выявлено 25 видов микроорганизмов, принадлежавших к шести группам патогенных бактерий (ко-

Таблица 4.

Спектр патогенных микроорганизмов, выявленных в гемокультурах больных с подозрением на сепсис при использовании PCR-ESI-TOF MC

Группы пациентов	Название микроорганизма	Процентное содержание				
		Данное исследование (2013)	Ecker (2010)	Kaleta (2011)	Jordana-Lluch (2013)	
Группа 1	Коагулазонегативный <i>Staphylococcus</i>	39,3	30,5	7,8	14,1	
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	9,5	2,2	3,7	2	
Группа 2	<i>E. faecalis</i>	4,8	4	5,3	8,9	
	<i>Escherichia coli</i>	4,8	10,2	3,7	20,5	
	<i>K. pneumoniae</i>	4,8	5,5	2,9	-	
	<i>Micrococcus</i> spp.	4,8	0,8	2,9	-	
	<i>Candida</i> sp.	4,8	2,3	2,9	-	
	<i>S. aureus</i>	3,6	13,3	15,6	14,1	
	<i>C. albicans</i>	3,6	1,8	1,6	1,2	
	<i>Corynebacterium</i> spp.	3,6	1	1,2	-	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,4	3	2,5	5	
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2,4	0,9	2	-	
	Общий %	49,1	45	44,3	51,7	
	Группа 3	<i>E. faecium</i>	1,2	4,1	6,1	6,4
		<i>Bacillus</i> spp.	1,2	0,9	1,2	1,3
<i>Klebsiella oxytoca</i>		1,2	0,9	1,2	-	
<i>Acinetobacter lwoffii</i>		1,2	0,2	0,4	-	
<i>T. inkin</i>		1,2	-	-	-	
<i>A. viridans</i>		1,2	-	-	-	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>		1,2	0,1	-	-	
<i>Pseudomonas putida</i>		1,2	0,2	-	-	
<i>Rhodococcus</i> spp.		1,2	-	-	-	
<i>Burkholderia cepacia/cepnocepacia</i>		1,2	-	-	-	
<i>Propionibacterium acnes</i>		1,2	-	-	-	
<i>Leuconostoc</i> spp.		1,2	-	-	-	
Общий %		14,4	6,4	8,9	7,7	
Всего полож. гемокультур	74	138	244	78		

агулазонегативные стафилококки, грамположительные каталазоотрицательные кокки, представители семейства *Enterobacteriaceae*, неспорообразующие анаэробные бактерии, неферментирующие грамотрицательные бактерии, кислотоустойчивые актинобактерии) и грибы 2 родов – *Candida* и *Trichosporon*.

Для сравнения наших данных о встречаемости микроорганизмов с результатами других авторов, также использовавших метод PCR-ESI-TOF MC для выявления микроорганизмов в гемокультурах, приводим таблицу 4. В исследования Ecker (2010), Kaleta (2011) и Jordana-Lluch (2013) включены положительные образцы крови от пациентов с разнообразными диагнозами из клиник разного профиля, что соответствует дизайну нашего исследования.

Все выявленные нами микроорганизмы можно разделить по встречаемости на 3 условные группы. Большую группу (39,3%) в нашей выборке составили коагулазонегативные стафилококки (КНС), в исследованиях других авторов доля этих микроорганизмов варьирует от 8 до 30%. Как показано ранее, КНС часто являются контаминантами гемокультур [ссылки в 15, 16]. Группа 2 составляет во всех исследованиях примерно равную долю в 45-50%. Однако встречаемость некоторых видов внутри группы значительно различается в сравниваемых исследованиях. Так, например, доля *Staphylococcus aureus* в нашем исследовании 3,6%, тогда как в других исследованиях – 13-15%. Показано, что такие представители группы 2, как *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, в большинстве случаев являются истинными возбудителями бактериемий [17, 18]. Третью группу в нашем исследовании и в исследованиях других авторов составили виды с низкой встречаемостью. Среди этой группы отдельные виды (*Bacillus* spp., *Propionibacterium acnes*) редко вызывают бактериемию и не считаются клинически значимыми [17].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В соответствии с целью данного исследования проведен сравнительный анализ результатов обнаружения/идентификации бактерий и *Candida* spp. культуральным методом и с использованием платформы PLEX-ID.

В результате исследования показано, что с помощью PLEX-ID можно существенно сократить время идентификации бактерий и *Candida* spp. в образцах крови, что будет способствовать своевременному назначению этиотропной терапии у пациентов с признаками сепсиса.

В исследовании установлено, что PLEX-ID платформа значительно эффективнее культурального метода в выявлении смешанных инфекций.

Это важное свойство PCR-ESI-TOF технологии позволит врачам эффективно выявлять смешанные инфекции, а в совокупности с клинической картиной и лабораторными исследованиями определять клиническую значимость выявленных патогенов и на-

значать адекватную антимикробную терапию.

Что касается возможности применения PLEX-ID платформы для одновременного определения резистентности некоторых групп бактерий к антибиотикам, то необходимы дальнейшие исследования по данной проблеме.

Результатами нашего исследования подтверждена эффективность PCR-ESI-TOF MC в изучении разнообразия микроорганизмов в биообразцах. Таким образом, PCR-ESI-TOF MC-технология представляется перспективной с точки зрения ее использования для быстрого анализа микробиоты различных биообразцов в рутинной практике.

БЛАГОДАРНОСТИ

Мы благодарим сотрудников СЗГМУ им. И.И. Мечникова: ассистента кафедры медицинской микробиологии Пинегину О.Н. и ординатора кафедры медицинской микробиологии Степанова А.С. за помощь в коллекционировании и транспортировке образцов крови; сотрудников отделения лабораторной диагностики микологической клиники НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина – лаборантов Киселеву Л.А. и Цветкову Г.В. и врача-бактериолога Ремневу Н.П. за проведение идентификации бактерий и грибов культуральными методами; заведу-

ющего кафедрой клинической микологии, аллергологии и иммунологии, профессора Клишко Н.Н., профессора кафедры медицинской микробиологии Сидоренко С.В., профессора кафедры медицинской микробиологии Бойцова А.Г. и аспиранта кафедры медицинской микробиологии Рябинина И.А. за консультативную помощь; а также всех врачей клинических отделений больниц за предоставление образцов крови для данного исследования.

Также благодарим наших московских коллег из НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Годкова М.А. – заведующего отделом лабораторной диа-

гностики, Черненко Т.В. – заведующую лабораторией клинической микробиологии и Баженова А.И. – заведующего лабораторией клинической иммунологии и диагностики СПИД за предоставление клинического материала и проведение идентификации бактерий культуральными методами.

Работа была выполнена в рамках государственного задания на 2012-2014 гг.

«Изучение эпидемиологии, микробиологический мониторинг внутрибольничных грибковых инфекций, актуальных госпитальных штаммов возбудителей внутрибольничных инфекций».

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Kumar A., Roberts D., Wood K., et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock // *Critical Care Medicine* – 2006. – Vol. 34, № 6. – P. 1589-1596.
2. Dellinger R., Levy M., Carlet J., et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock // *Crit. Care Med.* – 2008. – Vol. 36. – P.296-327.
3. Fenollar E., Raoult D. *Molecular diagnosis of bloodstream infections caused by non-cultivable bacteria*// *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2007. – Vol. 30, *Suppl. 1.* – S7-S15.
4. Ecker D.J., Sampath R., et al. New technology for rapid molecular diagnosis of bloodstream infections // *Expert Rev. Mol. Diagn.* – 2010. –№10(4). – P. 399-415.
5. Ecker D., Sampath R., Blyn L., et al. Rapid identification and strain-typing of respiratory pathogens for epidemic surveillance // *Proceeding of the NAS of the USA.* – 2005. – Vol. 102. – P. 8012-8017.
6. Wolk D., Kaleta E., Wysocki V. PCR-electrospray ionization mass spectrometry. The potential to change infectious disease diagnostics in clinical and public health laboratories // *The J. of Molecular Diagnostics.* – 2012. – Vol. 14, №4. – P. 295-304.
7. Brinkman C., Vergidis P., Uhl J. PCR-electrospray ionization mass spectrometry for direct detection of pathogens and antimicrobial resistance from heart valves in patients with infective endocarditis // *J.of Clin. Microbiol.* – 2013. – Vol. 51, №7. – P. 2040-2046.
8. Shin J., Ranken J., Sefers S. Detection, identification, and distribution of fungi in bronchoalveolar lavage specimens by use of multilocus PCR coupled with electrospray ionization/mass spectrometry // *J. of Clin. Microbiol.* – 2013. – Vol. 51, №1. – P. 136-141.
9. Laffler T., Cummins L., McClain C., et al. Enhanced diagnostic yields of bacteremia and candidemia in blood specimens by PCR/electrospray ionization mass spectrometry // *J. of Clin. Microbiol., JCM Accepts*, published online ahead of print on 21 August 2013.
10. Yun H., Kreft R., Castillo M. Comparison of PCR/electron spray ionization-time-of-flight-mass spectrometry versus traditional clinical microbiology for active surveillance of organisms contaminating high-use surfaces in a burn intensive care unit, an orthopedic ward and healthcare workers // *BMC Infectious Diseases.* – 2012. – Vol. 12.
11. Kaleta E., Clark A., Cherkaoui A. Comparative analysis of PCR-electrospray ionization/mass spectrometry (MS) and MALDI-TOF/MS for the identification of bacteria and yeast from positive blood culture bottles // *Clin. Chem.* – 2011. – Vol. 57, №7. – P. 1057-1067.
12. Kaleta E.J., Clark A. E., Johnson D.R., et al. Use of PCR coupled with electrospray ionization mass spectrometry for rapid identification of bacterial and yeast bloodstream pathogens from blood culture bottles // *J. of Clin. Microbiol.* – 2011. – Vol. 49, №1. – P. 345-353.
13. Jordana-Lluch E., Carolan H., Giménez M., et al. Rapid diagnosis of bloodstream infections with PCR followed by mass spectrometry // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, № 4, published online on 23 April 2013.
14. Shaw A., Vento T., Mende K., et al. Detection of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* colonization of healthy military personnel by traditional culture, PCR, and mass spectrometry // *Scand J. Infect. Dis.*, published online ahead of print on 19 August 2013 published online ahead of print on 21 August 2013.
15. Hall K., Lyman J. Updated review of blood culture contamination // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2006. – Vol. 19, №4. – P. 788-802.
16. Tsalik E., Jones D., et al. Multiplex PCR to diagnose bloodstream infections in patients admitted from the emergency department with sepsis // *J. of Clin. Microbiol.* – 2010. – Vol. 48, №1. – P. 26-33.
17. Weinstein M. Blood culture contamination: persisting problems and partial progress // *J. of Clin. Microbiol.* – 2003. – Vol. 41, №6. – P. 2275-2278.
18. Baldwin C. D., Howe G. B., Sampath R., et al. Usefulness of multilocus polymerase chain reaction followed by electrospray ionization mass spectrometry to identify a diverse panel of bacterial isolates // *Diagnostic Microbiol. and Infect. Dis.* – 2009. – Vol. 63. – P. 403-408.

Поступила в редакцию журнала 10.09.2013

Рецензент: А.А. Кафтырева



СКРИНИНГ ПРОТИВОГРИБКОВОЙ АКТИВНОСТИ КАРБАЗОЛ- ЗАМЕЩЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ И ОЦЕНКА ГЕНОТОКСИЧНОСТИ МОЛЕКУЛ-ЛИДЕРОВ

¹Еремина Н.В. (специалист по доклиническим исследованиям), ²Жанатаев А.К. (с.н.с.), ²Чайка З.В. (н.с.), ³Васильева Н.В. (директор института), ³Елинов Н.П. (проф. кафедры), ³Богомолова Т.С. (зав. лаб.), ³Выборнова И.В. (н.с.), ³Босак И.А. (врач-лабораторный миколог), ³Богданова Т.В. (ассистент кафедры), ³Рябинин И.А. (аспирант), ¹Казей В.И. (директор по доклиническим исследованиям), ¹Рыдкина Е.Б. (в.н.с.), ⁴Пурмаль А.А. (вице-президент по химическому развитию), ⁵Гурова Е.В. (адъюнкт-профессор), ²Дурнев А.Д. (руководитель лаб.)

¹ ООО «Панацела Лабс», МО, г. Одинцово; ² ФГБУ «НИИ Фармакологии им. В.В. Закусова» РАМН, Москва; ³Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова: НИИ медицинской микробиологии, Санкт-Петербург, Россия; ⁴ Cleveland BioLabs, Inc., Нью-Йорк, США; ⁵ Roswell Park Cancer Institute, Нью-Йорк, США

©Коллектив авторов, 2013

В ряду соединений карбазольного ряда проведен скрининг активности в отношении ряда патогенных грибов: *Microsporium canis*, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *Candida albicans* в условиях *in vitro* в диапазоне концентраций 0,125-100 мкг/мл с целью выбора наиболее активного «кандидата» для дальнейшей разработки антимикотического препарата. Наиболее низкими минимальными ингибирующими концентрациями (3,14-100 мкг/мл) обладали три соединения (CBL0100, CBL0159, CBL0253), антифунгальные свойства самого активного соединения CBL0100 были подтверждены методом серийных микроразведений по протоколу CLSI M38-A2 на культуре *T. mentagrophytes*.

Оценка генотоксичности трех указанных соединений была проведена в тесте Эймса на штаммах *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 и TA1537 в вариантах с метаболической активацией S9 и без таковой в концентрациях 1,25-40 мкг/мл. Соединение CBL0100 не проявило мутагенной активности в этом тесте. Ее отсутствие у этого соединения было подтверждено методом учета поврежденных ДНК (метод ДНК-комет) и хромосомных aberrаций в культурах лимфоцитов периферической крови человека *in vitro* и клетках костного мозга мышей *in vivo*.

Таким образом, в результате фармакологического и генотоксического скрининга было отобрано перспективное соединение

* Контактное лицо: Богомолова Татьяна Сергеевна,
Тел.: (812) 303-51-40

CBL0100, которое обладает противогрибковой активностью и не проявляет мутагенных свойств.

Ключевые слова: антифунгальная активность, генотоксичность, карбазольные соединения

ANTIFUNGAL ACTIVITY SCREENING OF CARBAZOLE- SUBSTITUTED COMPOUNDS AND ASSESSMENT OF GENOTOXICITY OF LEAD MOLECULES

¹Yerjomina N.V. (preclinical research associate), ²Zhanatayev A.K. (senior scientific collaborator), ²Chayjka Z.V. (scientific collaborator), ³Vasilyeva N. V. (director of the institute), ³Yelinov N.P. (professor of the chair), ³Bogomolova T.S. (head of the laboratory), ³Vybornova I.V. (scientific collaborator), ³Bosak I.A. (physician - laboratory mycologist), ³Bogdanova T.V. (assistant of the chair), ³Ryabinin I.A. (postgraduate student), ¹Kazey V.I. (preclinical director), ¹Rydкина E.B. (program director), ⁴Purmal' A.A. (vice president of chemistry), ⁵Gurova E.V. (associate professor), ²Durnev A.D. (head of the laboratory)

¹JSC Panatsela Labs, MO, Odintsovo; ²V.V. Zakusov Scientific Research Institute of Farmakology of RAMS, Moscow; ³North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov: Kashkin Research Institute of Medical Mycology and Chair of Medical Microbiology, St. Petersburg; Russia; ⁴Cleveland BioLabs, Inc., NY, USA; ⁵Roswell Park Cancer Institute, NY, USA

©Collective of authors, 2013

In order to select a lead compound for antimycotic drug development the *in vitro* antifungal activity of series of compounds with carbazole core was tested at concentrations 0,125-100 mg/ml against a number of pathogenic fungi (*Microsporium canis*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *Candida albicans*). Three compounds (CBL0100, CBL0159, CBL0253) revealed the lowest minimum inhibitory concentrations (3,14-100 µg/ml). Antifungal properties of the most active compound CBL0100 were confirmed by the microdilution method according to CLSI M38-A2 Protocol using *T. mentagrophytes*.

The genotoxic activity of three active compounds was evaluated using the Ames test (strains *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 and TA1537 both with and without S9 metabolic activation) in concentrations of 1.25-40 mg/ml. CBL0100 did not show mutagenic activity in this test. Lack of CBL0100-induced mutagenicity was confirmed by DNA-comet assay and chromosome aberrations assay *in vitro* in human peripheral blood lymphocytes and *in vivo* in mouse cells.

Thus, based on the results of pharmacological and genotoxic screening CBL0100 was selected for further development because of its antifungal activity and lack of mutagenic properties.

Key words: antifungal activity, carbazole compounds, genotoxicity

ВВЕДЕНИЕ

Грибковые заболевания кожи и слизистых оболочек являются одними из наиболее распространенных инфекционных заболеваний [1]. Поверхностными микозами поражены почти 25% населения, поэтому поиск новых антифунгальных агентов является крайне важным [2]. Высокая токсичность многих антимикотических препаратов, используемых в медицинской практике, ограничивает их применение [3]. Эти причины, а также возникновение резистентности возбудителей к существующим антимикотикам делает актуальным поиск новых веществ, оказывающих фунгицидное действие и не обладающих выраженной токсичностью, в том числе, генотоксичностью.

Перспективной группой соединений, проявляющих противомикробную активность в отношении ряда бактерий и грибов, являются производные карбазола. Эти соединения были открыты и охарактеризованы компанией Cleveland Biolabs, Inc. [4, 5]. Механизм действия этих соединений, заключающийся в интеркаляции молекулы в двойную спираль ДНК [4], позволяет сделать предположение об аналогичном механизме их действия против различных возбудителей инфекционных заболеваний, что снижает вероятность возникновения резистентности, однако повышает вероятность мутагенности.

Цель данного исследования – скрининг противогрибковой активности 11 производных карбазола в отношении ряда патогенных грибов и оценка генотоксичности наиболее активных молекул-фунгицидов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все соединения выбранной группы были синтезированы компанией Dalton Pharma (Canada). Ядро всех соединений представляет собой замещенный по атому азота и несколькими атомами углерода карбазол [6]. Препарат сравнения (изоконазол) для тестов *in vitro* был предоставлен сотрудниками НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ГБОУ ВПО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России.

Для *in vitro* скрининга антифунгальной активности были выбраны следующие виды грибов как наиболее часто встречающиеся возбудители поверхностных микозов [7] (по пять различных штаммов каждого вида): *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *Candida albicans*. Тест-культуры были получены из Российской коллекции патогенных грибов НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ГБОУ ВПО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России и представляли собой клинические изоляты. Исследование осуществляли методом серийных разведений в жидкой среде Сабуро [8]. Исходные растворы готовили последовательными двукратными разведениями исследуемых веществ в диметилсульфоксиде (ДМСО), начиная с максимальной концентрации соединений – 4 мг/мл

и до минимальной концентрации – 0,0078 мг/мл. В пробирки, содержащие 975 мкл жидкой среды Сабуро, добавляли по 25 мкл каждого из приготовленных разведений. В каждом исследовании ставили 3 контроля: 1. культуры (975 мкл среды + 25 мкл ДМСО + 100 мкл рабочей взвеси тест-культуры); 2. питательной среды (975 мкл среды + 25 мкл ДМСО); 3. субстанции (975 мкл среды + 25 мкл исходного раствора субстанции). Все ряды подготовленных разведений с тест-культурами дерматомицетов и контрольные пробирки выдерживали при 28 °С в течение 10-14 суток до появления роста гриба в первом контроле, а подготовленные разведения с тест-культурами грибов рода *Candida* – при 37 °С в течение 48 часов. Минимальной фунгистатической (ингибирующей или подавляющей) концентрацией (МИК) исследуемого вещества считали разведение в последней пробирке ряда, в которой визуально отсутствовал рост микромицета. Минимальной фунгицидной концентрацией (МФК) считали минимальное разведение соединения в пробирке с визуально отсутствующим ростом тест-культуры, высеив из которой на плотную питательную среду Сабуро не сопровождался ростом культуры.

МИК соединения-лидера CBL0100 в отношении культуры *T. mentagrophytes*, в сравнении с изоконазолом, определяли методом серийных микроразведений по протоколу CLSI M38-A2 [9]. Тест-штамм *T. mentagrophytes* РКПГ F 1457 субкультивировали на картофельно-глюкозном агаре в течение 5 суток при 30 °С, с интенсивно спорулирующей культуры делали смыв 0,85% стерильным раствором NaCl. Через 5-10 мин после оседания в пробирке крупных частиц мицелия концентрацию микроконидий гриба определяли с помощью гемоцитометра и довели путем разбавления 0,85 % стерильным раствором NaCl до концентрации $2 \cdot 10^3$ - $6 \cdot 10^3$ КОЕ/мл (конечная концентрация в лунках микропланшета – 10^3 - $3 \cdot 10^3$ КОЕ/мл). Исходные растворы CBL0100 в ДМСО готовили в концентрациях 12,5–6400 мкг/мл путем последовательного двукратного разбавления. Дальнейшие разведения препарата осуществляли, приливая по 0,1 мл соответствующего разведения CBL0100 в пробирки, содержащие по 4,9 мл среды RPMI-1640. Полученные разведения в объеме 100 мкл переносили в лунки 96-луночного U-образного микропланшета, после чего вносили по 100 мкл инокулюма тест-штамма. Контроли для исследования готовили следующим способом: 1) 100 мкл смеси ДМСО в среде RPMI 1640 1:50 без CBL0100 и 100 мкл инокулюма (контроль инокулюма); 2) 200 мкл смеси ДМСО в среде RPMI 1640 1:50 без CBL0100 (контроль среды); 3) 100 мкл 0,85 % стерильного раствора NaCl и 100 мкл смеси ДМСО и среды RPMI 1640 в соотношении 1:50 (контроль среды для спектрофотометрического определения МИК). Планшет инкубировали в течение 4 суток при 35 °С.

МИК₁₀₀ (концентрацию субстанции в последней лунке, в которой отсутствует видимый рост культу-

ры гриба) определяли визуально, MIC_{50} (наименьшую концентрацию субстанции, при которой рост культуры уменьшается на 50% от положительного контроля) определяли спектрофотометрически (при $\lambda=405$ нм). Показатели задержки роста тест-штамма (%) для опытных лунок рассчитывали по формуле:

$$Y = 100\% - \frac{(D_i - D_{кк}) \times 100\%}{(D_{кк} - D_{кс})}$$

где: Y – величина задержки роста, выраженная в %, $D_{кк}$ – значение оптической плотности неинкубированной среды («контроль среды»); $D_{кс}$ – оптическая плотность тест-культуры в среде RPMI 1640 без препарата («контроль культуры»); D_i – оптическая плотность в опытной лунке с известным разведением антифунгального препарата.

Для определения МФК делали высевы на чашки Петри со средой Сабуро из лунок, в которых отсутствовал видимый рост культуры, а также из контрольных лунок, после чего инкубировали при 28 °C в течение 4 суток.

Проверку мутагенной активности трех наиболее активных соединений осуществляли с помощью теста Эймса в соответствии с Руководством по доклиническим исследованиям [10] и инструкцией производителя тест-наборов [11]. Исследование было проведено на штаммах *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 и TA1537 с применением наборов AmesMPFTM производства XenometrixAG (Швейцария). В экспериментах с метаболической активацией (МА) использовали лиофилизированную микросомальную фракцию S9 печени. Для предотвращения возможного токсического действия фракции S9 на штаммы TA100 и TA1537, в среду для экспозиции добавляли раствор S9 100/1537 Booster. Соединения исследовали в концентрациях 40, 20, 10, 5, 2.5 и 1.25 мкг/мл. Все тестируемые соединения растворяли в ДМСО; конечная концентрация ДМСО в среде для экспозиции составила 2%. В экспериментах без метаболической активации в качестве положительного контроля для штамма TA98 использовали 2-нитрофлуорен (2 мкг/мл); для TA100 – N-оксида-4-нитрохиолин (0.1 мкг/мл); для TA1537 – 9-аминоакридин (15 мкг/мл). В экспериментах с метаболической активацией S9 для всех штаммов применяли 2-аминоантрацен, в конечной концентрации 5 мкг/мл. В качестве негативного контроля во всех сериях эксперимента использовали 2% ДМСО. Статистическую обработку проводили с помощью одностороннего, непарного *t*-критерия Стьюдента.

Перед *in vitro* исследованием генотоксичности была проведена прескрининговая оценка цитотоксичности соединения, которую осуществляли методом комбинированной окраски смесью красителей акридиновый оранжевый/этидий бромид и методом ДНК-диффузии [12].

Для оценки ДНК-повреждающей активности методом ДНК-комет в клетках периферической крови человека *in vitro* [10] соединение вносили в конечных

концентрациях 0.2, 0.02 и 0.002 мг/мл в суспензию клеток, включающую 1 часть цельной крови, 3 части эмбриональной телячьей сыворотки и 12 частей среды RPMI 1640. В экспериментах с метаболической активацией использовали микросомальную фракцию S9 в конечной концентрации в среде 2%. В качестве позитивного контроля в эксперименте без метаболической активации применяли метилметансульфонат в конечной концентрации 4 мкг/мл, в эксперименте с метаболической активацией – 7,12-диметилбензо[а]антрацен (7,12-ДМБА) в конечной концентрации 10 мкг/мл. Непосредственно перед микроскопированием препараты окрашивали флуоресцирующим красителем SYBR Green I (1:10000 в ТЕ-буфере с 50% глицерином) в течение 20 минут в темноте. Полученные с микропрепаратов изображения ДНК-комет анализировали при помощи программного обеспечения CometD (ДиаМорф, Россия). В качестве показателя поврежденности ДНК использовали процентное содержание ДНК в хвосте ДНК-комет (%ДНК в хвосте). С каждого микропрепарата анализировали не менее 100 клеток. Полученные показатели сравнивали с показателем для негативного контроля. Результаты обрабатывали с применением одностороннего, непарного *t*-критерия Стьюдента.

Культивирование клеток цельной крови для оценки кластогенной активности методом учета хромосомных aberrаций в клетках периферической крови человека *in vitro* выполняли согласно рекомендациям [10]. Культуральная среда содержала следующие компоненты: среда RPMI 1640 – 75%, телячья эмбриональная сыворотка – 15%, цельная кровь – 10% объема. Для стимуляции деления лимфоцитов в среду вносили фитогемагглютинин в конечной концентрации 10 мкг/мл. Общее время культивирования клеток до фиксации клеточного материала составило 54 часа. Эксперименты проводили в двух вариантах:

1) тестируемое соединение в конечных концентрациях 0.2, 0.02 и 0.002 мг/мл вносили в культуру клеток на 50 час культивирования, спустя 4 часа проводили фиксацию клеточного материала; в экспериментах с метаболической активацией использовали микросомальную фракцию S9 в конечной концентрации в среде 2%, в качестве позитивного контроля в эксперименте без метаболической активации – диоксидин в конечной концентрации 10 мкг/мл, в эксперименте с метаболической активацией – циклофосфамид в конечной концентрации 20 мкг/мл;

2) тестируемое соединение в конечных концентрациях 0.5, 0.05 и 0.005 мкг/мл вносили в культуральную среду с покоящимися клетками перед началом культивирования (0 час) и инкубировали в течение 1 часа, по окончании клеточные суспензии дважды отмывали от тестируемого соединения (а также компонентов S9) средой RPMI-1640, добавляли фитогемагглютинин, чем стимулировали выход клеток (лимфоцитов) из стадии G0 (стадия покоя) в стадию G1, S и далее в фазу митоза – M, и культивировали 54 часа (максимальное накопление клеток на стадии

митоза); в качестве позитивного контроля в эксперименте без метаболической активации применяли митомицин С в конечной концентрации 0.1 мкг/мл, в эксперименте с метаболической активацией – циклофосфамид в конечной концентрации 20 мкг/мл.

При цитогенетическом анализе учитывали клетки с одиночными и парными фрагментами хромосом, хромосомными и хроматидными обменами, согласно методическим рекомендациям (1974). Статистическую обработку данных выполняли путем сравнения (j-критерий Фишера) долей поврежденных метафаз в контрольной и каждой из экспериментальных групп.

Исследование генотоксичности в экспериментах *in vivo* выполняли на самцах и самках мышей F₁ CBAxС₅₇Bl/6 массой 18-20 г в возрасте 8-12 недель. Метод ДНК-комет проводили в щелочной версии [13]. Исследуемое соединение растворяли в дистиллированной воде и в дозах 0.1, 1 и 10 мг/кг вводили подкожно в область холки животного. В качестве негативного контроля использовали мышей, которым вводили дистиллированную воду в эквивалентных объемах. Эвтаназию животных осуществляли смещением шейных позвонков через 18 часов после введения. В качестве позитивного контроля использовали мышей, которым вводили внутривентриально метилметансульфонат, в дозе 40 мг/кг, за 3 часа до эвтаназии.

Для оценки цитогенетической активности в клетках костного мозга мышей *in vivo* тестируемое соединение вводили подкожно в область холки животного: однократно, в дозах 1 и 10 мг/кг самцам мышей, с фиксацией клеточного материала через 24 часа после введения и в дозе 1 мг/кг самцам и самкам мышей, один раз в сутки в течение 5 дней, с фиксацией клеточного материала через 6 часов после последнего введения [10]. В экспериментах с многократным введением во избежание индукции локального отека тканей тестируемое соединение растворяли в физиологическом растворе. В эксперименте с однократным введением в дозе 10 мг/кг, ввиду плохой растворимости в физиологическом растворе соединение растворяли в дистиллированной воде. Мышам контрольной группы вводили эквивалентный объем физиологического раствора. В качестве позитивного контроля использовали циклофосфамид, который вводили внутривентриально в дозе 20 мг/кг, с эвтаназией через 24 часа после обработки. Во всех вариантах экспериментов за 2.5 часа до убоя животным вводили колхицин из расчета 2.5 мг/кг с целью подавления формирования ахроматинового веретена клеточного деления и накопления метафаз. Цитогенетические препараты костного мозга бедренных костей готовили стандартным суховоздушным методом (Preston R.J., 1987). Анализ проводили при увеличении x1000 в иммерсионном масле. Учитывали клетки с ахроматическими пробелами (гепами), одиночными и парными фрагментами хромосом и обменами различного типа. В отдельную категорию – клетки с множественными повреждениями

– выделяли метафазы, имеющие более пяти хромосомных повреждений. Статистическую обработку (j-критерий Фишера) проводили путем сравнения долей поврежденных метафаз в контрольной и экспериментальной группах.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рисунке 1 представлены результаты скрининга фунгистатической активности соединений *in vitro* в виде средних значений МИК. Наибольшей фунгистатической активностью обладают соединения CBL0100, CBL0159 и CBL0253. Минимальные фунгицидные концентрации для этих соединений находятся в пределах 3,14-25 мкг/мл – для CBL0100, 12,5-100 мкг/мл – для CBL0159 и для CBL0253 в отношении различных патогенных грибов, включенных в исследование. Эти три наиболее активных соединения были выбраны для дальнейших исследований генотоксической активности.

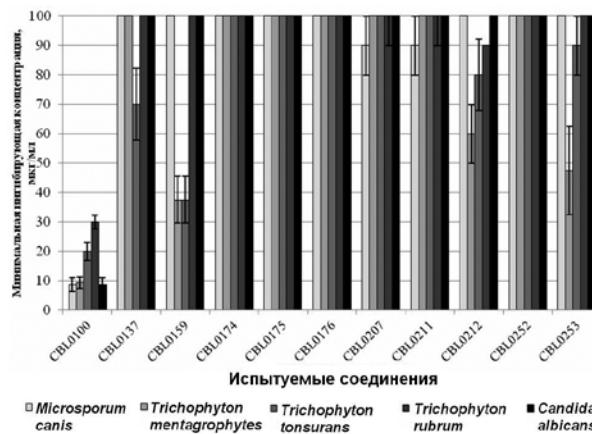


Рис. 1. Фунгистатическая активность (МИК, мкг/мл) наиболее эффективных соединений в отношении дерматомицетов и *C.albicans in vitro*

Результаты определения минимальной ингибирующей и минимальной фунгистатической концентраций CBL0100 и изоконазола в отношении тест-культуры *T. mentagrophytes* РКПГ F 1457 представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Минимальные ингибирующие и минимальные фунгицидные концентрации Изоконазола и CBL0100 в отношении штамма *T. mentagrophytes* РКПГ F 1457, определенные методом микроразведений (CLSI M38-A2) и методом серийных разведений в жидкой среде Сабуро (MP №2)

Препарат	Концентрации (мкг/мл)					
	CLSI M38-A2				MP №2	
	МИК50	МИК80	МИК100	МФК	МИК	МФК
Изоконазол	0,75	1,0	4,0	4,0	1,57	6,25
CBL0100	0,375	0,5	0,5	0,5	12,5	25

МИК и МФК CBL0100 были ниже таковых для изоконазола в 2-8 раз. Как следует из представленных данных, CBL0100 проявил более высокую антифунгальную активность *in vitro* в отношении протестированной тест-культуры, чем изоконазол.

В ходе генотоксического исследования отобранных соединений в тесте Эймса было установлено, что

соединение CBL0253 проявляет мутагенную активность при тестировании на штаммах TA98 и TA100 с метаболической активацией S9 и без таковой и на штамме TA1537 – в условиях с метаболической активацией; соединение CBL0159 проявляет мутагенную активность при тестировании на штаммах TA98 без метаболической активации S9 и на штамме TA1537 – в вариантах с метаболической активацией S9 и без таковой; соединение CBL0100 во всех тестируемых концентрациях, не вызывающих цитотоксического эффекта, не проявляет мутагенную активность при тестировании на штаммах TA98, TA100 и TA1537 в вариантах с метаболической активацией S9 и без таковой.

В таблице 2 представлены результаты цитотоксичности соединения CBL0100 *in vitro*. В качестве высшей концентрации при тестировании была отобрана концентрация 0.2 мг/мл. Как в тесте комбинированной окраски смесью красителей акридиновый оранжевый/этидиум бромид, так и в тесте методом ДНК-диффузии тестируемое соединение не оказывало цитотоксического действия на клетки периферической крови человека.

Таблица 2.

Цитотоксическое действие соединения CBL0100 на клетки периферической крови человека *in vitro*

Метод/условия эксперимента	Концентрация CBL0100, мг/мл					
	0	1	0,2	0,04	0,008	0,0016
Комбинированная окраска АО/ЭБ*	97.9**	выпадение в осадок	99.3	100	99.6	96.4
Комбинированная окраска АО/ЭБ; +S9	99.8		98.9	99.3	98.9	95.1
Метод ДНК-диффузии	98.7		100	100	98.2	96.7
Метод ДНК-диффузии; +S9	99.0		98.7	97.6	98.0	95.7

* - акридиновый оранжевый/этидиум бромид;

** живых клеток (%)

Проведение этих экспериментов было необходимо для определения концентраций исследуемого вещества в генотоксических тестах *in vitro*. Исходя из представленных в таблице 2 данных, для дальнейших экспериментов в тесте на индукцию ДНК-повреждений методом ДНК-комет *in vitro* и в тесте на индукцию хромосомных aberrаций *in vitro* были отобраны концентрации соединения 0.2, 0.02 и 0.002 мг/мл. В дальнейшем было выявлено, что при 1 и 3-х часовой экспозиции, в условиях с метаболической активацией S9 и без таковой, соединение CBL0100 не индуцирует ДНК-повреждения в клетках периферической крови человека в выбранных концентрациях, однако полностью подавляет митотическую активность клеток, поэтому оценку кластогенной активности методом учета хромосомных aberrаций проводили в меньших концентрациях – 0.5, 0.05 и 0.005 мкг/мл, с внесением соединения перед началом культивирования и отмывкой культур от соединения через 1 час инкубирования. В концентрации 0.5 мкг/мл соединение CBL0100 также полностью подавляло митотическую активность клеток, однако в концентрациях 0.005 и 0.05 мкг/мл соединение не проявило

антимитотической активности. При этом уровень хромосомных aberrаций составил 1,7±0,7 и 3,8±1,0% aberrантных метафаз в эксперименте без метаболической активации и 2,0±0,8 и 1,8±0,7% в условиях с метаболической активацией S9 соответственно. При статистическом сравнении полученных показателей с показателем негативного контроля не выявили статистически значимых отличий.

Исходя из полученных данных об отсутствии ДНК-повреждающей активности соединения при 1 и 3-х часовой экспозиции, целесообразным представилось в экспериментах *in vivo* методом ДНК-комет соединение CBL0100 исследовать при 18-часовой экспозиции. По результатам проведенного исследования, представленного в таблице 3, можно заключить, что соединение CBL0100 в дозах 0.1, 1 и 10 мг/кг не обладает генотоксической активностью в клетках костного мозга, печени, почек и крови экспериментальных животных.

Таблица 3.

Влияние соединения CBL0100 на уровень ДНК-повреждений в клетках костного мозга, печени, почек и крови экспериментальных животных (данные представлены в виде среднего значения поврежденных клеток и его среднеквадратического отклонения)

Группа	Клетки костного мозга	Клетки печени	Клетки почек	Клетки крови
Негативный контроль	4.6±2.1	4.7±1.4	3.8±1.6	2.6±1.0
CBL0100, 0.1 мг/кг	3.4±0.8	2.5±0.3	4.0±1.0	2.3±0.8
CBL0100, 1 мг/кг	3.2±0.5	2.8±0.8	3.3±0.9	2.4±0.5
CBL0100, 10 мг/кг	4.5±1.4	5.4±1.8	4.7±2.5	3.3±0.8
Метилметансульфонат, 40 мг/кг	14.7*±2.6	16.1*±1.8	20.6*±0.2	

* - p<0.01 по сравнению с негативным контролем

Результаты оценки цитогенетической активности в клетках костного мозга мышей *in vivo* представлены в таблице 4. Соединение CBL0100 в дозах 1 и 10 мг/кг не обладает цитогенетической активностью в клетках костного мозга мышей.

Таблица 4.

Влияние соединения CBL0100 на уровень хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей

Условия эксперимента	клеток	на 100 клеток					Всего поврежденных мета-фаз (%)	p
		гепов	одиночных фрагмент.	парных фрагмент.	обменов	клеток с МП*		
Самцы								
Контроль	500	0.4	0.8	0	0	0	1.2±0.5	
Циклофосфамид 20 мг/кг	500	1.2	16.6	0.6	2.4	7.6	21.6±1.8	pk <0.001
CBL0100 1 мг/кг, однократно	500	0.6	0.4	0	0	0	1.0±0.5	pk >0.05
CBL0100 10 мг/кг, однократно	500	0.2	1.4	0	0	0	1.6±0.6	pk >0.05

СВL0100 1 мг/кг, 5-кратно	500	0.4	0.8	0	0	0	1.2±0.5	p_k >0.05
Самки								
Контроль	500	0.8	0.4	0	0	0	1.2±0.4	
СВL0100 1 мг/кг, 5-кратно	500	0.6	0.8	0	0	0	1.4±0.4	p_k >0.05

P_k – при сравнении с негативным контролем

МП* – клеток с множественными повреждениями (более 5 на метафазу)

ОБСУЖДЕНИЕ

Результатом проведенных исследований стал выбор молекулы-кандидата СВL0100, а также проверка его мутагенных свойств в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

МИК молекулы-лидера (3,14 – 50 мкг/мл) в отношении спектра патогенных грибов сравнима с МИК субстанций, входящих в качестве активного компонента в противогрибковые препараты для лечения дерматомикозов, лидирующих в настоящее время на рынке – изоконазола (0,39–12,5 мкг/мл) [14] и итраконазола (0,0625 – 16 мкг/мл) [15]. Тот факт, что соединение активно в отношении большого числа патогенных грибов, свидетельствует о том, что препарат будет обладать широким спектром действия, а низкий МИК позволит создать препарат с низкой

эффективной концентрацией активного соединения.

Отсутствие мутагенной активности в проведенных тестах свидетельствует о том, что соединение СВL0100 может быть допущено к дальнейшим испытаниям по программе доклинических исследований в соответствии с рекомендациями руководства [10]. Однако соединение СВL0100 проявляло цитостатическое влияние на делящиеся клетки в концентрациях, соответствующих его МИК и МФК, что может быть косвенно связано с его механизмом фунгистатического и фунгицидного действий.

Чаще всего антимикотический эффект достигается за счет взаимодействия лекарственных веществ с клеточной стенкой гриба, тогда как механизм действия СВL0100, вероятно, связан с интеркаляцией в молекулу ДНК клетки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании результатов проведенного исследования можно заключить, что СВL0100 обладает высокой антифунгальной активностью в отношении *Microsporum canis*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *C. albicans* и не проявляет нежелательные генотоксические свойства. Таким образом, представляется перспективной дальнейшая разработка соединения СВL0100 в качестве эффективного антимикотика без генотоксической активности.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Иванова М.А., Огрызенко Е.В., Бендриковская И.А. и др. Динамика заболеваемости дерматомикозами в Российской Федерации в 2003-2007 гг. // Клиническая дерматология и венерология. – 2009. – №2 – С. 26-31.
2. Разнатовский К.И., Родионов А.Н., Котрехова Л.П. Дерматомикозы. – СПб.:МАПО, 2003. – 158 с.
3. Иванова Л.В., Баранцевич Е.П., Шляхто Е.В. Резистентность грибов-патогенов к антимикотикам (обзор)//Проблемы медицинской микологии. – 2011. – Т. 13, №1. – С. 14-17.
4. Gasparian A.V., et al. Curaxins: Anticancer Compounds That Simultaneously Suppress NF-kB and Activate p53 by Targeting FACT// Science Translational Medicine. – 2011. – Vol. 3. – 95ra74.
5. Gurova K.V., Hill J. E., Guo C., et al. Small molecules that reactivate p53 in renal cell carcinoma reveal a NF-kBdependent mechanism of p53 suppression in tumors // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2005. – Vol. 102. – P. 17448–17453.
6. Патент РСТ/US2009/059558 «Carbazole compounds and therapeutic uses of the compounds» (авторы: Tucker J., Sviridov S., Brodsky L., et al.) от 15.04.2010 г.
7. Елинов Н.П., Васильева Н.В., Разнатовский К.И. Дерматомикозы, или поверхностные микозы кожи и её придатков – волос и ногтей. Лабораторная диагностика // Проблемы медицинской микологии. – 2008. – Т. 10, №1. – С. 27-34.
8. Методические рекомендации №2 «Микологическое исследование объектов окружающей среды и определение противогрибковой активности различных веществ». – СПб., 2008.
9. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi M-38-A2. – CLSI, USA, 2008.
10. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М.: Изд-во «Медицина», 2005.
11. Flückiger-Islera S., Baumeister M., Braun K., et al. Assessment of the performance of the Ames II™ assay: a collaborative study with 19 coded compounds// Mutation Research. – 2004. – Vol. 558, №1-2. – P. 181-197.
12. Vasquez M.Z. Combining the *in vivo* comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation// Mutagenesis. – 2010. – Vol. 25, №2. – P. 187-199.
13. Жанатаев А.К., Никитина В.А., Воронина Е.С., Дурнев А.Д. Методические аспекты оценки ДНК-повреждений методом ДНК-комет// Прикладная токсикология. – 2011. – № 2(4). – С. 28-37.
14. Васильева Н.В. и др. Результаты многоцентрового наблюдательного проспективного исследования по оценке эффективности, безопасности и переносимости крема Травоген® (изоконазол) и крема Травокорт® (изоконазол, дифлулортолон) у больных ограниченными микозами кожи разной этиологии и локализации // Проблемы медицинской микологии. – 2009. – Т. 11, №1. – С. 15-21.
15. Патент EP2293787 A1 «Nanoemulsions for treating fungal, yeast and mold infections» (авторы: Baker J.R., Flack M.R., Ciotti M., Sutcliffe J.A) от 16.03. 2011 г.

Поступила в редакцию журнала 19.09.2013

Рецензент: О.В. Аак

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ *HISTOPLASMA CAPSULATUM* S. DARLING С ПОМОЩЬЮ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ С ПРОИЗВОЛЬНЫМИ ПРАЙМЕРАМИ И АНАЛИЗА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ МАРКЕРНЫХ УЧАСТКОВ ГЕНОМА

Леденева М.Л. (м.н.с.)*, Ткаченко Г.А. (зав. лаб.), Шпак И.М. (н.с.), Вьючнова Н.В. (н.с.), Гришина М.А. (зав. лаб.), Антонов В.А. (руководитель института)

ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Волгоград, Россия

©Коллектив авторов, 2013

Проведено изучение геномного полиморфизма 20 коллекционных штаммов возбудителя гистоплазмоза (*Histoplasma capsulatum*) с помощью реакции амплификации с произвольными праймерами (RAPD). На основании анализа 64 полиморфных фрагментов была получена матрица генетических расстояний между изучаемыми штаммами с использованием коэффициента М. Nei и W. Li. На дендрограмме, построенной невзвешенным парногрупповым методом, выделялись три основных кластера. Установлен высокий уровень полиморфизма штаммов. Для проверки результатов RAPD-анализа, а также для более глубокого изучения генетического разнообразия штаммов *H. capsulatum*, был апробирован метод прямого сравнения секвенированных фрагментов генома. Показано, что кластеризация штаммов возбудителя гистоплазмоза, выявленная с помощью метода RAPD, согласовывалась с классификацией на основе секвенирования, но обладала большей разрешающей способностью. Следовательно, амплификация с произвольными праймерами может служить перспективным экспресс-методом для расшифровки возможных вспышек гистоплазмоза.

Ключевые слова: генетические маркеры, *Histoplasma capsulatum*, RAPD, секвенирование ДНК, типирование

THE STUDY OF GENETIC POLYMORPHISM IN *HISTOPLASMA CAPSULATUM* S. DARLING STRAINS FROM COLLECTION CENTER VIA RANDOM AMPLIFICATION OF POLYMORPHIC DNA AND ANALYSIS OF GENOME MARKING NUCLEOTIDE SEQUENCES

Ledenyova M.L. (junior scientific collaborator), Tkachenko G.A. (head of the laboratory), Shpak I.M. (scientific collaborator), Vyuchnova N.V. (scientific collaborator), Grishina M.A. (head of the laboratory), Antonov V.A. (head of the institute)

Volgograd Research Institute for Plague Control, Volgograd, Russia

©Collective of authors, 2013

The study of genomic polymorphism of 20 collection strains of histoplasmosis causative agent (*Histoplasma capsulatum*) has been performed using random amplified polymorphic DNA (RAPD). Based on the analysis of 64 polymorphic fragments the matrix of genetic distances between strains used in this study with M. Nei and W. Li coefficient has been obtained. According to the dendrogram constructed by unweighted pair-group method (UPGMA), three main clusters have been found. The high level of polymorphism between strains has been established. For checking results of the RAPD-analysis, as well as for more detail analysis of a genetic variety between *H. capsulatum* strains, the method of direct comparison of sequenced fragments of genome was approved. It has been shown that the clusterization of histoplasmosis agent strains, discovered by RAPD was similar to those obtained by sequencing, but had greater resolution. Consequently, amplification with arbitrary primers can serve as perspective express-method for decoding of possible histoplasmosis outbreaks.

Key words: DNA sequencing, genetic markers, *Histoplasma capsulatum*, RAPD, typing

ВВЕДЕНИЕ

Гистоплазмоз относят к особо опасным глубоким микозам, и его возбудитель может поражать различные виды млекопитающих, включая человека. Возбудитель заболевания – *Histoplasma capsulatum* – диморфный грибок, способный существовать в мицелиальной или дрожжеподобной форме. В естественных условиях обитания, а также в лабораторных условиях при 25-27 °С грибок растет в мицелиальной форме; дрожжеподобная фаза гриба формируется в организме млекопитающих, а *in vitro* может быть получена лишь при 37 °С на специальных питательных средах. В природных условиях возбудитель гистоплазмоза обитает в почве эндемичных районов, и болезнь возникает при ингаляции почвенной пыли,

* Контактное лицо: Леденева Маргарита Леонтьевна, тел.: (8442) 37-37-74

содержащей фрагменты мицелия или споры [1, 2].

Аэрогенный механизм заражения, высокая инфекционность спор, отсутствие у человека в разных регионах естественного иммунитета к данному грибному патогену определяют возможность его использования в качестве биологического оружия [3].

Вид *H. capsulatum*, на основании морфологии дрожжевой формы клеток и патогенности, подразделяют на 3 разновидности, две из которых – *var. capsulatum* и *var. duboisii* способны вызывать заболевание у человека и животных. Третья разновидность – *var. farciminosum* – вызывает подкожные и язвенные поражения кожи только у лошадей и мулов. Предполагают, что первичные грибные патогены занимают дискретные экологические ниши: *H. capsulatum* (*Hc*) *var. capsulatum* эндемичен для южных и восточных штатов США, Мексики и многих стран Южной Америки; *H. var. duboisii* – для тропических районов Африки, а *Hc. var. farciminosum* – для Южной Азии [2, 4].

Позднее, на основании данных, полученных с помощью сиквенирования, было обнаружено, что *H. capsulatum* состоит из 8 филогенетических групп. При этом ареал распространения штаммов, идентифицированных как *H. var. duboisii*, был ограничен Африкой, но африканская группа включала также особей, морфологически идентифицированных как *H. var. capsulatum* и *var. farciminosum*. Изоляты, идентифицированные как *Hc. var. farciminosum*, были размещены в трех различных группах. Это подтверждало предположение о том, что *H. var. farciminosum* представляет собой набор отдельных особей из различных групп, способных вызывать заболевание у лошадей. Штаммы *Hc. var. capsulatum* были выявлены во всех 8 группах [5]. Согласно результатам данных исследований, выделение в структуре вида *H. capsulatum* трех разновидностей является филогенетически бессмысленным. Вместо этого необходимо признать наличие генетически обособленных географических популяций или филогенетических видов.

В эндемичных регионах распространенность гистоплазмоза довольно высока. При эпидемиологических исследованиях, проведенных Fava S.C., Fava N.C. (1998) с использованием гистоплазмин-кожной пробы, установили, что этот микоз является эндемичным для всех обследованных районов Бразилии. Wheat L.J. с соавторами (1981; 1992) описали ряд зарегистрированных вспышек гистоплазмоза, крупнейшие из которых имели место в 1978-1979 гг. в Индианаполисе.

Не исключено, что со временем, в связи со значительным ростом грузо- и пассажиропотоков, распространение этого гриба в неэндемичные районы с загрязненной почвой будет возрастать. Отсутствие зарегистрированных достоверных случаев данного заболевания на территории России и стран дружества можно объяснить низким уровнем начальной распространенности медицинского персонала и сложностью в

проведении дифференциальной диагностики гистоплазмоза, обусловленной высокой вариабельностью клинической картины.

В этих условиях развитие и использование новых методов высокоэффективной дифференциации штаммов приобретает особое значение. Типирование *H. capsulatum* на основе фенотипических признаков ограничено ввиду их относительно низкой вариабельности. В связи с этим, на сегодняшний день ни один из фенотипических маркеров не обеспечивает необходимую эффективность при расшифровке вспышек гистоплазмоза [6]. В настоящее время для дифференциации штаммов возбудителя этого заболевания решающую роль играют молекулярно-биологические методы.

Арсенал маркеров и методов современного генотипирования достаточно обширен. Все они имеют свои положительные и отрицательные стороны и разную степень разрешающей способности в зависимости от целей конкретного исследования.

В настоящей статье изучена возможность использования реакции амплификации полиморфных последовательностей ДНК с помощью произвольных праймеров (RAPD) и метода прямого сравнения сиквенированных фрагментов генома для изучения генетического разнообразия коллекционных штаммов возбудителя гистоплазмоза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили 15 штаммов *Hc. var. capsulatum*, 4 штамма *Hc. var. duboisii* и 1 штамм *Hc. var. farciminosum*, предоставленные коллекционным центром живых культур ФКУЗ Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора.

Штаммы *H. capsulatum* в мицелиальной фазе роста выращивали на агаре Сабуро с 3% дрожжевым экстрактом (Difco, США) при 28 °С в течение 30 суток. Исследования проводили с обеззараженными клеточными взвешями чистых культур грибов. Для обеззараживания к пробам добавляли раствор натрия мертиолата до конечной концентрации 0,1 мг/мл с последующим прогреванием на водяной бане 56 °С – 40 минут и инкубацией при комнатной температуре в течение 24 ч.

ДНК выделяли из клеток мицелиальной формы после предварительного воздействия фермента хитиназы из *Trichoderma viride* («Sigma-ALDRICH», Германия) методом гуанидин-фенольной экстракции с пересадением ДНК изопропанолом [7]. Затем ДНК растворяли в ТЕ-буфере, определяли концентрацию на спектрофотометре Gene Quant («Amersham Biosciences», США) и хранили препарат при 4 °С.

Для проведения RAPD-типирования коллекционных штаммов были выбраны три произвольных праймера, которые успешно применяли для дифференциации изолятов *H. capsulatum*, выделенных из почвы, от людей и животных: 1281 (5'-AACGCGCAAC-3'), 1283 (5'-GCGATCCCA-3'),

1253 (5'-GTTTCCGCC-3') [8-10]. Праймеры синтезированы фирмой ЗАО «Синтол» (Москва). Амплификацию ДНК с использованием «горячего старта» проводили в объеме 25 мкл. Реакционная смесь содержала: 10 ÷ 20 нг геномной ДНК изучаемого штамма, 15 пмоль каждого олигонуклеотидного праймера при проведении двухпраймерной RAPD-реакции или 20 пмоль – в случае однопраймерной реакции, 200 мкМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата и 1 ед. Taq-полимеразы. В целях предупреждения испарения на поверхность смеси наслаивали 30 мкл минерального масла. Для проведения ПЦР использовали набор реактивов производства ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (Москва). Амплификацию проводили на термоциклере «Терцик» (ЗАО «НПФ ДНК-технология», Москва) в режиме: предварительный прогрев 94 °С – 7 мин, 45 циклов (94 °С – 30 с., 35 °С – 30 с, 72 °С – 60 с), финальная элонгация 72 °С – 5 мин. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 3% агарозном геле с добавлением этидиум бромид и документировали с помощью системы «GelDoc XR» (BioRad, США). Размеры фрагментов определяли с помощью программы RFLP-scan 3.12 из пакета программ Gene Profiler 4.03 путем сравнения со стандартом GeneRuler 100 bp DNA Ladder («Fermentas Life Sciences», США).

Статистический анализ включал составление бинарных матриц по каждому из праймеров или их комбинаций, в которых отмечали «присутствие» (1) или «отсутствие» (0) фрагментов одинаковой длины на электрофореграмме. Каждый RAPD-фрагмент рассматривали как отдельный генетический локус. Кластерный анализ выполняли на основе коэффициента генетической дистанции M. Nei и W.H. Li (1979 г.) с помощью программы Treecon for Windows v.1.3b (Peer V.Y., Wachter R., 1994 г.). Построение дендрограмм осуществляли невзвешенным парно-групповым методом с арифметическим усреднением (UPGMA - Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) (Sneath P.H.A., Sokal R.R., 1973 г.). Для оценки достоверности топологии полученных дендрограмм использовали бутстрэп (bootstrap) тест для 1000 повторностей в программе Treecon (Felsenstein J., 1985 г.).

В качестве ДНК-мишеней для сиквенирования применяли внутренние фрагменты генов, которые являются наиболее часто используемыми маркерами для оценки эволюционных связей различных изолятов *H.capsulatum*: предшественника H-антигена – *H-anti* (H antigen precursor) и альфа-тубулина – *tub1* (alpha-tubulin) [5, 10, 11]. Для амплификации целевых фрагментов использовали праймеры и условия ПЦР, предложенные Kasuga T. с соавторами (1999 г.). Сиквенирование ПЦР-продуктов проводили в обоих направлениях с применением набора реактивов «Big-Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit» и автоматического сиквенатора «ABI 3130 Genetic Analyzer» («Applied Biosystems», США).

Сравнительный анализ сиквенированных после-

довательностей коллекционных штаммов между собой, а также с аналогичными последовательностями возбудителя гистоплазмоза, представленными в генетических базах данных, выполняли с помощью модуля ClustalW программы Unipro UGENE v1.8.0. Для количественной оценки различий между штаммами использовали модель Jukes-Cantor (1969 г.). Группирование штаммов и построение дендрограмм осуществляли методом UPGMA при помощи программы MEGA 5.0., включая бутстрэп анализ. Индексы бутстрэпа подсчитывали для 1000 псевдореплик.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярное маркирование генома на основе метода RAPD – один из наиболее распространенных способов выявления внутривидовой гетерогенности *H. capsulatum*. Особенности данного метода являются возможность анализа генетического разнообразия в пределах всего образца и отсутствие при этом необходимости в знании конкретных нуклеотидных последовательностей генома исследуемого организма.

В результате проведенного RAPD-анализа, в зависимости от праймеров и штаммов, было зарегистрировано 12-21 фрагментов ДНК, размер которых находился в пределах от 114 до 1206 п.н. При анализе электрофоретических профилей ДНК выявили, что все 20 коллекционных штаммов *H. capsulatum*, независимо от используемых праймеров, имели коэффициент подобия < 40%, что свидетельствовало о высокой степени гетерогенности изучаемых штаммов.

Наиболее эффективным для внутривидового типирования возбудителя гистоплазмоза оказался праймер 1283, так как с ним амплифицировалось большее количество фрагментов ДНК, отражающих межштаммовые различия. Ну J. с соавторами (1995 г.) отмечали, что дифференцирующую способность RAPD можно существенно повысить при проведении реакции амплификации с двумя праймерами. Так, при использовании праймера 1283 все штаммы нами были объединены в 8 групп (75% гомологии). Причем в 3 группах, общей численностью 8 штаммов, наблюдали 100% гомологию RAPD-профилей, что не позволяло проводить дифференциацию штаммов в этих группах (Рис. 1а). Комбинирование праймера 1283 с праймером 1281 позволило при этом же коэффициенте подобия разделить штаммы на 9 групп, при этом не дифференцировались 6 штаммов (Рис. 1б).

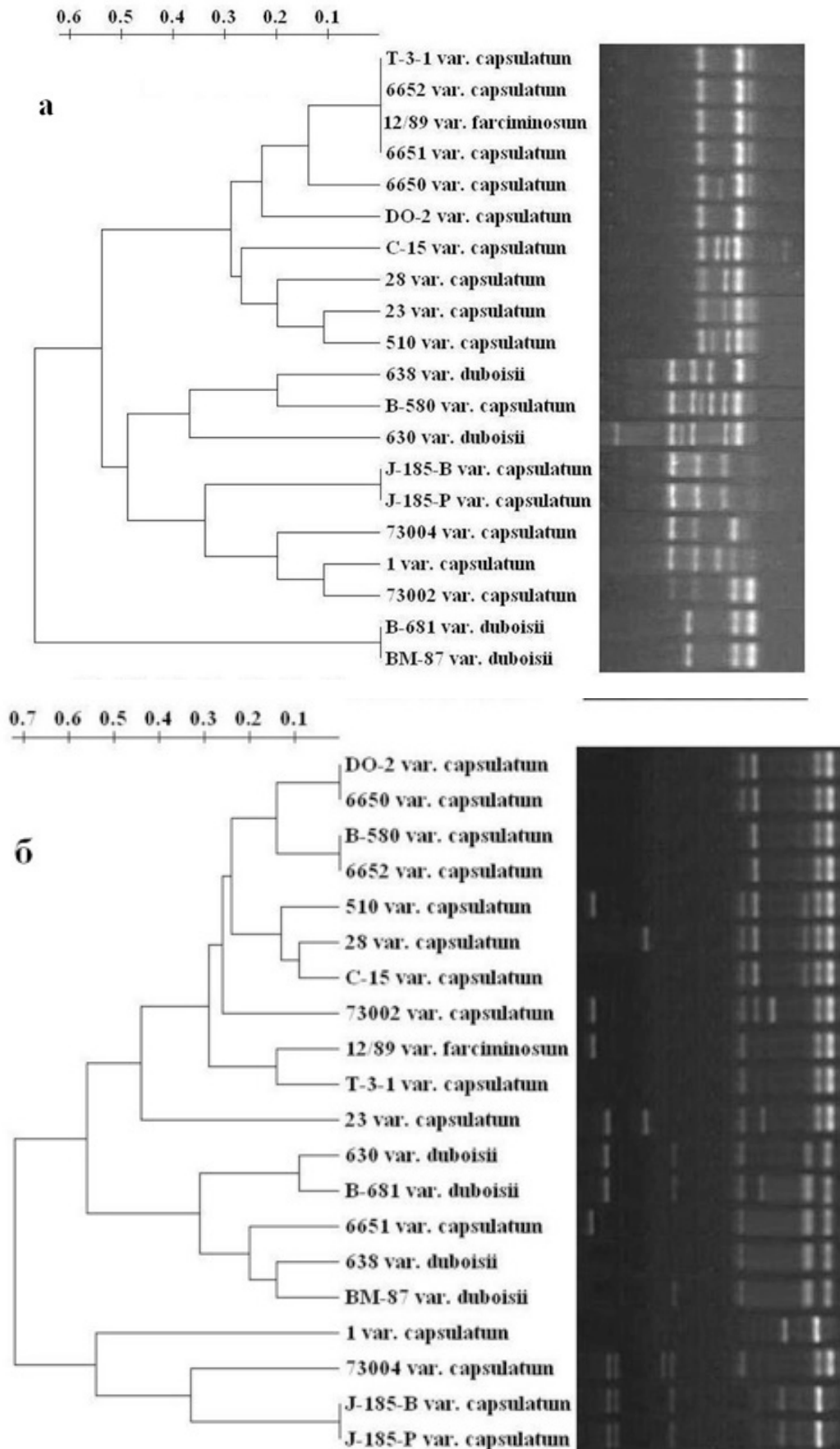


Рис.1. Электрофореграмма RAPD-паттернов и UPGMA-дендрограмма штаммов возбудителя гистоплазмоза при амплификации с праймером 1283 (а) и комбинацией праймеров 1283 и 1281 (б). Шкала показывает генетическую дистанцию по Nei и Li

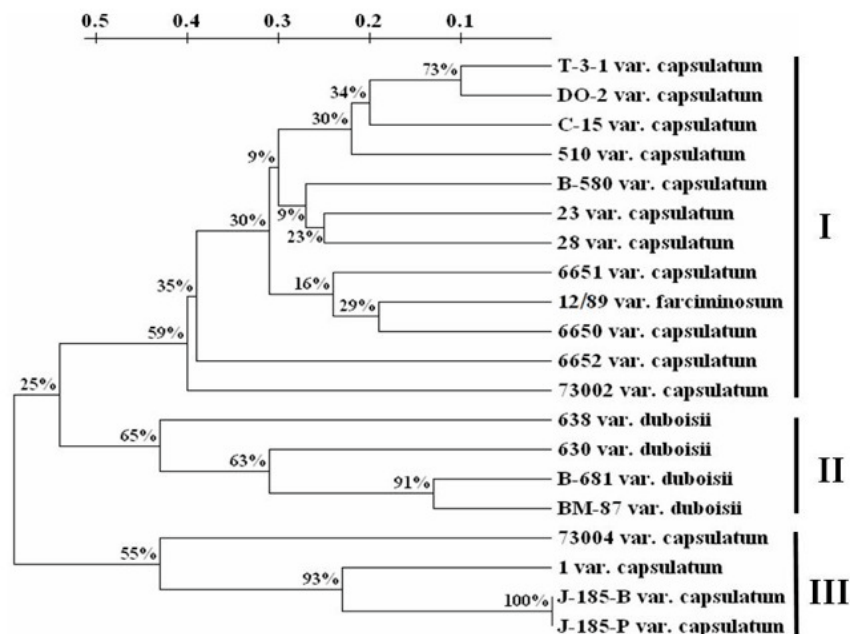


Рис.2. UPGMA-дендрограмма сходства штаммов возбудителя гистоплазмоза по результатам комбинированной RAPD-матрицы (генетические дистанции по Nei и Li). Цифрами указаны показатели поддержки ветвей (Bootstrap value)
*Примечание: комбинированная матрица получена при суммировании результатов RAPD-типирования с праймером 1283 и комбинациями праймеров: 1281 и 1283, 1281 и 1253, 1283 и 1253

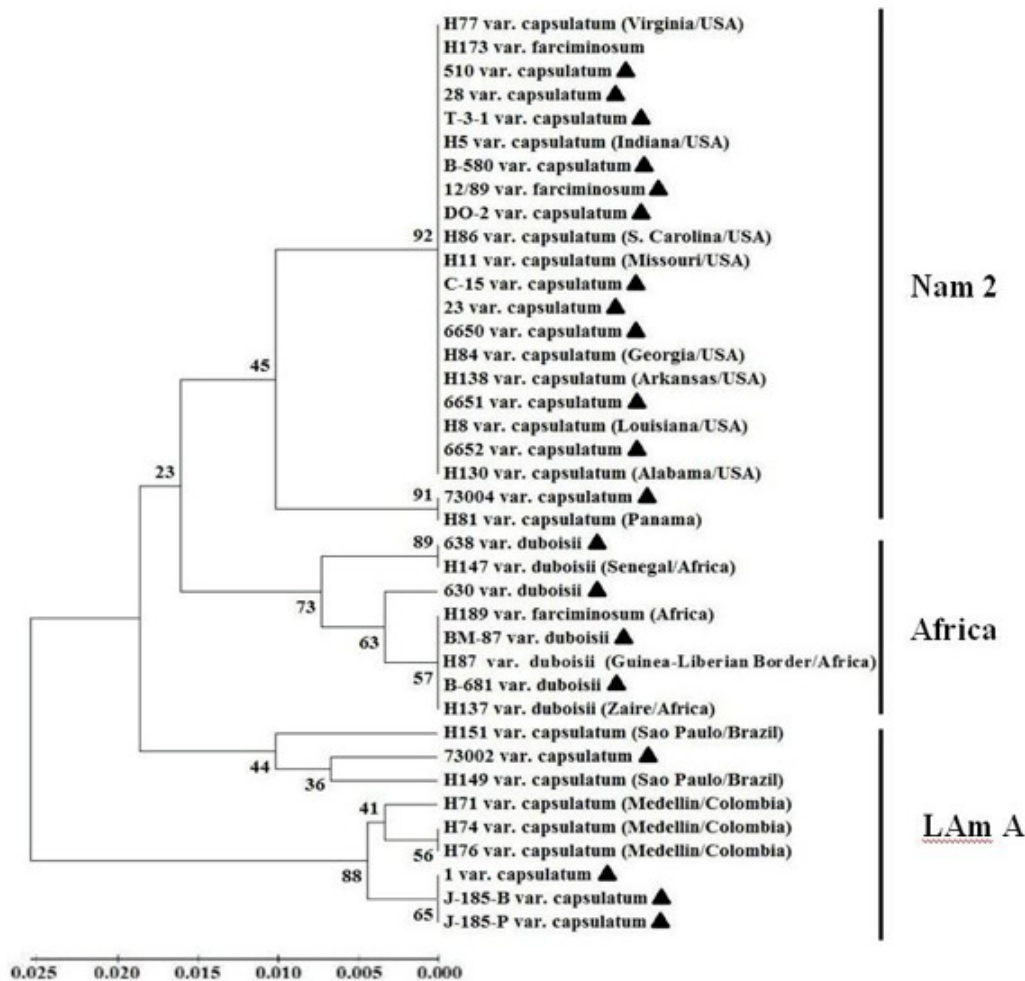


Рис. 3. Филогенетические взаимоотношения штаммов *H. capsulatum*, основанные на сравнительном анализе последовательностей фрагментов генов *H-anti* и *tub1*. Символом ▲ обозначены последовательности коллекционных штаммов. В скобках указан географический регион выделения штаммов, ранее депонированных в генетических базах данных

Применяя праймеры в разных комбинациях, каждый штамм был выделен в уникальную кластерную группу, за исключением *H. capsulatum* J-185-P и J-185-B. Идентичность электрофореграмм RAPD-спектров ДНК этих штаммов может свидетельствовать об их клональном происхождении.

Для повышения дифференцирующей способности RAPD-типирования полученные данные были представлены в виде суммарной матрицы состояния бинарных признаков, на основании которой построили дендрограмму, демонстрирующую филогенетические отношения между коллекционными штаммами. Благодаря данному методическому подходу мы смогли более детально исследовать генетический полиморфизм, т.к. кластеризация штаммов проводится одновременно с использованием 64 полиморфных RAPD-фрагментов (Рис. 2).

В результате исследованные штаммы образовали 3 четко разделенные группы. Важно отметить, что все штаммы *H. capsulatum* var. *duboisii* оказались в одной кластерной группе. Среднее значение попарных генетических расстояний между проанализированными RAPD-спектрами составило 0,4716, внутри групп: 0,3177 – для I группы, 0,3394 – для II и 0,2931 – для III. Величина генетического расстояния между группами: 0,4112 (пара I – II), 0,4155 (пара I – III) и 0,6538 (пара II – III). Незначительное отличие величин средних генетических расстояний внутри и между группами, наряду с низкой статистической поддержкой топологии дерева (индексы бутстрепа для групп < 70%), служит основой необходимости использования дополнительных методов для подтверждения достоверности полученных результатов внутривидового типирования методом RAPD.

С этой целью было проведено прямое сравнение сиквенированных фрагментов генов *H-anti* и *tub1*. Полученные в ходе работы последовательности коллекционных штаммов *H. capsulatum* сравнили с данными GenBank и сервера <http://www.treebase.org/>. В результате штаммы распределили в североамериканскую, южноамериканскую и африканскую группы в соответствии с географическим происхождением штаммов сайта TreeBASE (Рис. 3).

Kasuga Т. с соавторами [5] разделили вид *H. capsulatum* по результатам сиквенирования четырех белок-кодирующих генов на 8 филогенетических групп, коррелирующих с географической областью распространения: Североамериканский класс 1 (Nam 1), Североамериканский класс 2 (Nam 2), Латиноамериканская группа А (LAm А), Латиноамериканская группа В (LAm В), Австралийская, Индонезийская, Евразийская и Африканская группы. В наших исследованиях была выявлена ассоциация коллекционных штаммов возбудителя гистоплазмоза с 3 филогенетическими группами: Nam 2, Африканская группа и LAm А (Рис. 3).

При сравнении дендрограмм установили, что кластеризация возбудителя гистоплазмоза на основе комбинированной RAPD-матрицы согласовывалась

с классификацией на основе сиквенирования, но обладала большей разрешающей способностью. Например, из рисунка 3 видно, что 11 коллекционных штаммов *H. capsulatum* были отнесены по результатам сиквенирования к группе Nam 2 и не дифференцировались внутри этой группы. При проведении амплификации с произвольными праймерами смогли выделить каждый из этих штаммов в уникальную кластерную группу.

Спорной осталась локализация только штаммов *H. capsulatum* 73002 и *H. capsulatum* 73004, положение которых отличалось на дендрограммах, построенных на основе использованных нами методов генотипирования. Штамм *H. capsulatum* 73002 группировался вместе с бразильскими изолятами *H. capsulatum* H149 и *H. capsulatum* H151, принадлежащими LAmA сайта TreeBASE. Однако значения Bootstrap test, равные 36% и 44% соответственно, свидетельствуют о статистической недостоверности расположения этих штаммов.

Интересна позиция штамма *H. capsulatum* 73004. По результатам сиквенирования, данный штамм был идентифицирован как панамский и при значении бутстрэп-индекса 45% образовывал единую группу со штаммами из группы Nam2. На основании данных RAPD-типирования, штамм *H. capsulatum* 73004 попадал в одну группу со штаммами, отнесенными к LAmA. В исследованиях, проведенных Kasuga Т. с соавторами в 1999 г., изоляты из Панамы были выделены в отдельный класс. Однако позднее, путем значительного увеличения количества анализируемых штаммов, было установлено, что штаммы из Панамы относятся к LAmA, что согласуется с результатами проведенного нами RAPD-анализа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, методом молекулярно-генетического анализа смогли разделить изученную коллекцию штаммов *H. capsulatum* ФКУЗ Волгоградского научно-исследовательского противочумного института на внутривидовые группы, в основном, соответствующие эволюционному развитию и филогенетической концепции вида, выдвинутой Kasuga Т. с соавторами [5]. С помощью использованного нами в работе набора произвольных праймеров выявили высокий уровень полиморфизма коллекционных штаммов, что подтверждает его эффективность для проведения внутривидового типирования возбудителя гистоплазмоза. Что касается ДНК-мишеней, выбранных для сиквенирования, то их вариабельность оказалась недостаточной для дифференциации штаммов *H. capsulatum*. Возможно, сравнение нуклеотидных последовательностей большего числа локусов позволит достичь оптимального для внутривидового типирования разрешения топологии древа.

В целом, кластеризация коллекционных штаммов, полученная с помощью RAPD маркеров, согласуется с дифференциацией на основе сравнения нуклеотидных последовательностей ДНК, что сви-

детельствует о достоверности результатов внутри-видового типирования на основе реакции амплификации с произвольными праймерами. Однако RAPD-анализ обладает гораздо большей дифференцирующей способностью, что позволяет использовать его в

качестве экспресс-метода выявления генетического полиморфизма штаммов *H. capsulatum*, и является перспективным для расшифровки возможных вспышек гистоплазмоза.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Hwang L., Hocking-Murray D., Bahrami A.K., et al. Identifying phase-specific genes in the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum* using a genomic shotgun microarray // Mol. Biol. Cell. – 2003. – Vol. 14. – P. 2314-2326.
2. Kauffman C.A. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update // Clin. Microbiol. Rev. – 2007. – Vol. 20, №1. – P. 115-132.
3. МУ 3.1.2... «Лабораторная диагностика, лечение и профилактика особо опасных микозов». – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия, ФГУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, 2009. – 18 с.
4. Guimaraes A.J., Nosanchuk J.D., Zancoppe-Oliveira R.M. Diagnosis of histoplasmosis // Brazilian J. of Microbiology. – 2006. – Vol. 37. – P. 1-13.
5. Kasuga T., White T.J., Koenig G., et al. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum* // Molecular. Ecology. – 2003. – Vol. 12. – P.3383-3401.
6. Zarnowski R., Miyazaki M., Dobrzyn A., et al. Typing of *Histoplasma capsulatum* strains by fatty acid profile analysis // Med Microbiol. – 2007. – Vol. 56, №6 – P. 788-797.
7. Вьючнова Н.В., Ткаченко Г.А., Гришина М.А. и др. Сравнительный анализ методов выделения ДНК из клеток *Histoplasma capsulatum* // Проблемы мед. микологии. – 2009. – Т.11, №3. – С. 38-41.
8. Muñoz B., Martínez M.Á, Palma G., et al. Molecular characterization of *Histoplasma capsulatum* isolated from an outbreak in treasure hunters // BMC Infect. Dis. – 2010. – Vol. 10. – P. 264-271.
9. Reyes-Montes M.R., Rodriguez-Arellanes G., Perez-Torres A. Identification of the source of histoplasmosis infection in two captive maras (*Dolichotis patagonum*) from the same colony by using molecular and immunologic assays. // Revista Argentina de Microbiología. – 2009. – Vol. 41. – P. 102-104.
10. Taylor M.L., Chavez-Tapia C.B., Rojas-Martinez A., et al. Geographical distribution of genetic polymorphism of the pathogen *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in a central zone of Mexico // FEMS Immunology and Medical Microbiology. – 2005. – Vol. 45. – P. 451-458.
11. Muniz M.M., Tavares M.S.P., Meyer W., et al. Comparison of different DNA-based methods for molecular typing of *Histoplasma capsulatum* // Appl. Environ. Microbiol. – 2010. – Vol. 76, №13. – P. 4438-4447.

Поступила в редакцию журнала 12.08.2013

Рецензент: А.Г. Полищук



АНТАГОНИЗМ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИРОДНОЙ АССОЦИАЦИИ «ТИБЕТСКИЙ РИС» В ОТНОШЕНИИ НЕКОТОРЫХ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

**Тихомирова О.М. (доцент кафедры)*,
Иванова Е.А. (дипломант)**

ГБОУ ВПО Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия, Санкт-Петербург, Россия

© Тихомирова О.М., Иванова Е.А., 2013

Проведено исследование влияния микроорганизмов природной ассоциации «Тибетский рис» на рост мицелиальных грибов родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Absidia*, *Rhizopus*, *Cunninghamella*. Установлено, что микроорганизмы-ассоцианты проявляют антагонизм в отношении всех исследованных штаммов, при этом аскомицеты оказались более чувствительными, чем зигомицеты. Метаболиты, образуемые микробиотой «Тибетского риса» в процессе ферментации, оказывали разнонаправленное действие на рост грибов. Наиболее выраженную ингибирующую активность в отношении мицелиальных грибов отмечали, начиная с 72 ч культивирования ассоциации, в то время как метаболиты, образуемые на 1 сутки ферментации, напротив, стимулировали рост ряда штаммов грибов. Показано, что ассоциация «Тибетский рис» является перспективным источником получения продуктов, активных против мицелиальных грибов, однако следует строго учитывать особенности динамики образования действующих компонентов.

Ключевые слова: *Aspergillus*, *Zygomycota*, *Penicillium*, противогрибковая активность, «Тибетский рис», ферментированные продукты, *Fusarium*

ANTAGONISTIC ACTIVITY OF MICROORGANISMS FROM NATURAL ASSOCIATION «TIBETAN RICE» AGAINST SOME FILAMENTOUS FUNGI

**Tikhomirova O.M. (assistant professor of
chair), Ivanova E.A. (graduated student)**

SBEI HPE Saint-Petersburg Chemical-Pharmaceutical Academy, St. Petersburg, Russia

© Tikhomirova O.M., Ivanova E.A., 2013

* Контактное лицо: Тихомирова Ольга Михайловна,
Тел.: (812) 315-24-96

*The influence of natural association «Tibetan rice» microbiota on growth of filamentous fungi of genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Absidia*, *Rhizopus*, *Cunninghamella* has been investigated. Associates exhibited inhibitory activity against all strains of fungi, but ascomycetes were more susceptible than zygomycetes. Activity of metabolites synthesized by «Tibetan rice» microbiota on the fungal growth was different during the fermentation period. The highest levels of inhibition were recorded after 72 h of associates cultivation while metabolites formed on the first day of fermentation opposite stimulated the growth of some fungal strains. The results showed that natural microbial association «Tibetan rice» is a perspective source of the products active against filamentous fungi but dynamics of antifungal metabolites formation should be strictly taken into account.*

Key words: antifungal activity, *Aspergillus*, fermented products, *Fusarium*, *Penicillium*, «Tibetan rice», *Zygomycota*

ВВЕДЕНИЕ

Традиционные ферментированные продукты, полученные с использованием микробных ассоциаций, в настоящее время интенсивно исследуют во всем мире, при этом их рассматривают не только в качестве продуктов функционального питания, но и как источники оригинальных штаммов микроорганизмов [1, 2]. Особое внимание привлекают ассоциации с доминированием молочнокислых бактерий (МКБ), для которых характерен широкий спектр биологической активности – антимикробное, иммуномодулирующее, антиатеросклеротическое, гипотензивное и другие виды благоприятного действия при введении в макроорганизм самих микробов или их метаболитов [3, 4].

В связи с возрастающей актуальностью микозов в современной клинической практике, распространением резистентности возбудителей к антигрибковым препаратам, возможности развития неблагоприятных побочных эффектов этих препаратов [5] возрастает интерес к продуктам природного происхождения, в том числе пробиотическим, как эффективным средствам для лечения и профилактики микозов различной локализации [6].

Одной из оригинальных природных микробных ассоциаций является «Тибетский рис» (ТР), в состав которого входят МКБ, уксуснокислые бактерии и дрожжи [7]. На кафедре микробиологии СПбХФА в течение ряда лет проводят изучение микробиоты ТР и его биологической активности. В частности, была выявлена выраженная ингибирующая активность ассоциантов ТР в отношении дрожжей *Candida albicans* [8]. В то же время, влияние микробиоты ТР и продуктов ее метаболической активности на жизнедеятельность мицелиальных грибов оставалась неизученной.

Цель данного исследования – оценка антагонистической активности микроорганизмов, входящих в состав ассоциации ТР, в отношении мицелиальных грибов – представителей отделов *Ascomycota* и *Zygomycota*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования избрали природную ассоциацию микроорганизмов ТР, а также культураль-

ную жидкость (КЖ) и нативный раствор (НР), полученные при культивировании ТР на молочно-сахарной среде МСВ [7].

Антагонизм микробиоты ассоциации ТР в отношении мицелиальных грибов исследовали с использованием метода агаровых блоков. В качестве тест-культур выступали штаммы из коллекции культур кафедры микробиологии СПХФА: *Aspergillus niger* 2а, *A. nidulans* 4, *A. oryzae* 6, *Penicillium expansum* 14, *P. funiculosum* 16, *Fusarium culmorum* 27, *Absidia* sp. 30, *Mucor racemosus* 31, *Rhizopus nigricans* 33, *Cunninghamella* sp. 37.

Для подготовки тест-культур агаризованную среду Сабуро разливали в чашки Петри диаметром 90 мм по 20 мл и давали застыть при комнатной температуре. На поверхность среды наносили фрагменты мицелия соответствующих грибов и выращивали при $22,0 \pm 0,5$ °С в течение 72-96 ч (для аскомицетов) и 36-48 ч (для зигомицетов). Из периферических областей выросших колоний с помощью стерильного сверла вырезали агаровые блоки диаметром 6 мм, которые и использовали в работе.

Гомогенат зёрен ТР готовили, как описано ранее [8], после чего получали разведение гомогената 1:10 (по объёму) в стерильном физиологическом растворе. КЖ разводили стерильным физиологическим раствором в таком же соотношении. Полученные разведения высевали поверхностным методом по 0,1 мл на агаризованные среды МРС (де Мана-Рогоза-Шарп) и Бригс, заранее разлитые в чашки Петри диаметром 90 мм по 20 мл. Часть посевов выращивали при $22,0 \pm 0,5$ °С, другую часть – при $32,5 \pm 0,5$ °С в течение 72 ч до получения сливного роста. Из среды с проросшими колониями с помощью стерильного сверла вырезали агаровые блоки диаметром 6 мм.

Для исследования антагонизма агаризованную среду Сабуро разливали по 20 мл в чашки Петри диаметром 90 мм. После застывания среды в центр чашки помещали агаровый блок с тест-культурой гриба. На равном расстоянии друг от друга и на расстоянии 25 мм от блока с тест-культурой размещали агаровые блоки с ассоциантами ТР. Чашки инкубировали при $22,0 \pm 0,5$ °С: с блоками аскомицетов – 72-96 ч, зигомицетов – 36-48 ч. По окончании инкубации отмечали наличие и измеряли радиус зоны полного ингибирования роста тест-культуры гриба вокруг блоков с микробиотой ТР.

Влияние НР, полученного на разных сроках культивирования ассоциации, на рост мицелиальных грибов оценивали по интенсивности радиального разрастания колоний [9].

Ферментацию проводили на среде МСВ при $22,0 \pm 0,5$ °С в течение 9 сут. Пробы отбирали на следующих сроках культивирования ассоциации ТР: 0 ч, 24 ч, 36 ч, 48 ч, 96 ч, 120 ч, 9 сут.

Тест-культуры мицелиальных грибов выращивали на агаризованной среде Сабуро при $22,0 \pm 0,5$ °С в течение времени, достаточного для получения колоний диаметром 3-4 см (36-120 ч в зависимости от

штамма). Из периферической части колонии с помощью стерильного сверла вырезали агаровые блоки диаметром 6 мм.

В стерильную чашку Петри диаметром 90 мм вносили 5 мл исследуемого варианта НР (в контроле брали 5 мл стерильной очищенной воды), заливали 5 мл расплавленной и охлажденной до 45-50 °С средой Сабуро двойной концентрации (на 1 л среды: пептона – 20 г; глюкозы – 80 г, агар-агара – 40 г; стерилизация при 0,152 МПа в течение 30 мин, рН 5,6-5,8) и перемешивали. После застывания питательной среды в центр чашки помещали вырезанный из культуры тест-гриба агаровый блок и термостатировали: *R. nigricans* в течение 33-24 ч; *M. racemosus* 31, *Absidia* sp. 30, *Cunninghamella* sp. – 37-48 ч; *P. expansum* – 14-72 ч; *A. niger* 2а, *A. oryzae* 6, *F. culmorum* – 27-96 ч; *P. funiculosum* 16 – 7 сут.; *A. nidulans* 4 – 14 сут. По окончании инкубации измеряли радиус колонии гриба (в миллиметрах). Степень ингибирования радиального разрастания колоний рассчитывали по формуле [10]:

$$RGI = \frac{r_k - r_{НР}}{r_k} \times 100, \text{ где}$$

RGI (radial growth inhibition) – ингибирование радиального разрастания колоний, %;

r_k – радиус колонии гриба в контроле, мм;

$r_{НР}$ – радиус колонии гриба в присутствии соответствующего варианта НР, мм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании активности микробиоты ТР в отношении мицелиальных грибов методом агаровых блоков выявили выраженное ингибирование разрастания колоний тест-культур. В то время как в контроле формировались четко выраженные колонии грибов диаметром не менее 30 мм, вокруг блоков, вырезанных из сред МРС или Бригс после культивирования на них ассоциантов ТР при двух разных температурах, отмечали наличие зон задержки роста грибов. Полученные данные представлены в таблице.

Таблица

Ингибирование роста мицелиальных грибов микроорганизмами-ассоциантами ТР, выращенными при различных условиях

Тест-культура	Радиус зоны ингибирования роста тест-культуры гриба, мм			
	среда МРС		среда Бригс	
	22,0±0,5 °С	32,5±0,5 °С	22,0±0,5 °С	32,5±0,5 °С
<i>A. niger</i>	16,3±0,8	15,4±0,5	16,2±0,6	16,4±1,5
<i>A. nidulans</i>	15,5±0,8	14,2±0,6	14,8±0,8	14,0±0,4
<i>A. oryzae</i>	14,3±1,3	9,2±0,3	15,2±0,3	10,3±0,8
<i>P. expansum</i>	18,2±0,3	10,3±1,8	14,7±0,3	10,8±0,3
<i>P. funiculosum</i>	15,3±0,3	16,2±0,4	15,2±0,9	15,5±0,4
<i>F. culmorum</i>	13,4±0,9	11,5±0,5	12,4±1,2	10,6±0,6
<i>Absidia</i> sp.	6,5±0,4	6,2±0,6	5,7±0,3	5,3±0,3
<i>M. racemosus</i>	5,8±0,6	5,2±0,8	5,1±0,7	5,0±0,5
<i>R. nigricans</i>	6,8±1,0	6,2±0,8	5,8±0,8	5,5±0,4
<i>Cunninghamella</i> sp.	4,2±0,8	4,2±0,6	4,4±0,7	4,0±0,6

Было установлено, что метаболиты ассоциантов ТР, диффундирующие из агаровых блоков в среду Сабуро, ингибируют (в разной степени) все включён-

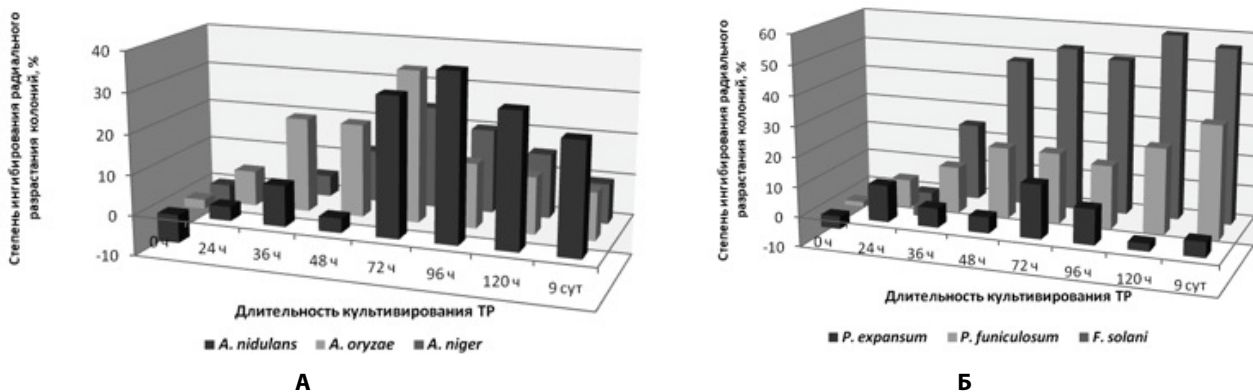


Рис. 1. Влияние НР на степень радиального разрастания колоний некоторых грибов отдела *Ascomycota* в зависимости от длительности культивирования ассоциации ТР. А – действие на грибы рода *Aspergillus*; Б – действие на грибы родов *Penicillium* и *Fusarium*

ные в план исследования тест-культуры мицелиальных грибов. При этом рост зигомицетов угнетается в существенно меньшей степени, чем рост аскомицетов. Достоверных различий в антагонистической активности микробиоты ТР, в зависимости от состава питательной среды и температуры культивирования ассоциантов против большинства исследованных штаммов грибов, обнаружить не удалось, за исключением *A. oryzae* и *P. expansum*, в отношении которых большую активность проявляли ассоцианты, выращенные при $22,0 \pm 0,5$ °С.

Поскольку на предыдущем этапе работы было установлено выраженное (в разной степени) подавление роста всех исследованных тест-культур мицелиальных грибов микроорганизмами ассоциации ТР, представляло интерес изучение динамики изменения антигрибковой активности в процессе культивирования этой ассоциации на среде МСВ.

Исследованиями, проведёнными ранее на кафедре микробиологии СПХФА, показано, что на разных стадиях ферментации соотношение ассоциантов в зерне ТР и КЖ существенно различается [7]. Такие вариации состава, очевидно, могут привести к значительным изменениям антигрибковой активности НР в связи с изменением спектра образуемых метаболитов [2, 11].

Влияние НР, полученного на разных сроках культивирования ассоциации, на рост мицелиальных грибов оценивали по степени ингибирования радиального разрастания колоний. Данный метод нагляден и широко используется при оценке влияния веществ различной природы на рост фитопатогенных грибов [9, 10]. Результаты представлены на рис. 1 и 2. На рис. 3 приведены изменения в характере и интенсивности роста мицелиальных грибов в присутствии НР на примере *F. culmorum*.

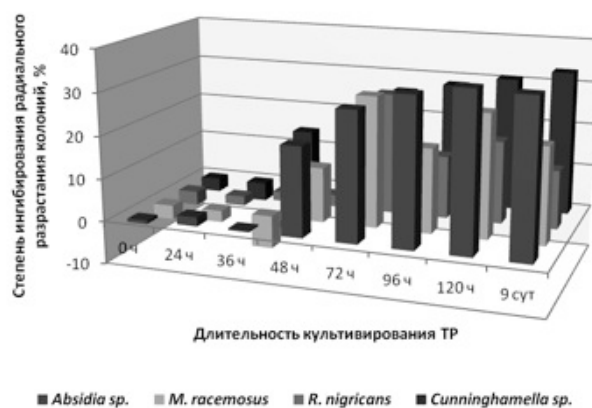


Рис. 2. Влияние НР на степень радиального разрастания колоний грибов отдела *Zygomycota* в зависимости от длительности культивирования ассоциации ТР

В результате выявили, что наиболее выраженным действием на все исследованные 10 штаммов грибов обладает НР, полученный на 72-96 ч культивирования ассоциации, также активность (в разной степени) проявлялась и у НР на более поздних сроках культивирования. Обращает на себя внимание тот факт, что НР, полученный на начальном этапе культивирования (1 сут.), в ряде случаев, не только не угнетал, но и, наоборот, стимулировал рост мицелиальных грибов. Особенно это выражено для *F. culmorum* (Рис. 2, 3): интенсивность роста мицелия в присутствии НР, полученного через 24 ч культивирования ассоциации, составила $108,5 \pm 1,8\%$ в сравнении с контролем. Поскольку штаммы мицелиальных грибов, которые были взяты для исследования, не являются ауксотрофами, можно предположить, что такое усиление роста гиф связано с повышением доступности органического источника азота в среде – свободных аминокислот – в результате активного протеолиза белков молока на ранних стадиях ферментации. Известно, что смеси аминокислот более эффективно обеспечивают питательные потребности грибов, чем отдельные аминокислоты, причём многие грибы лучше всего усваивают именно смесь аминокислот гидролизата казеина [2].

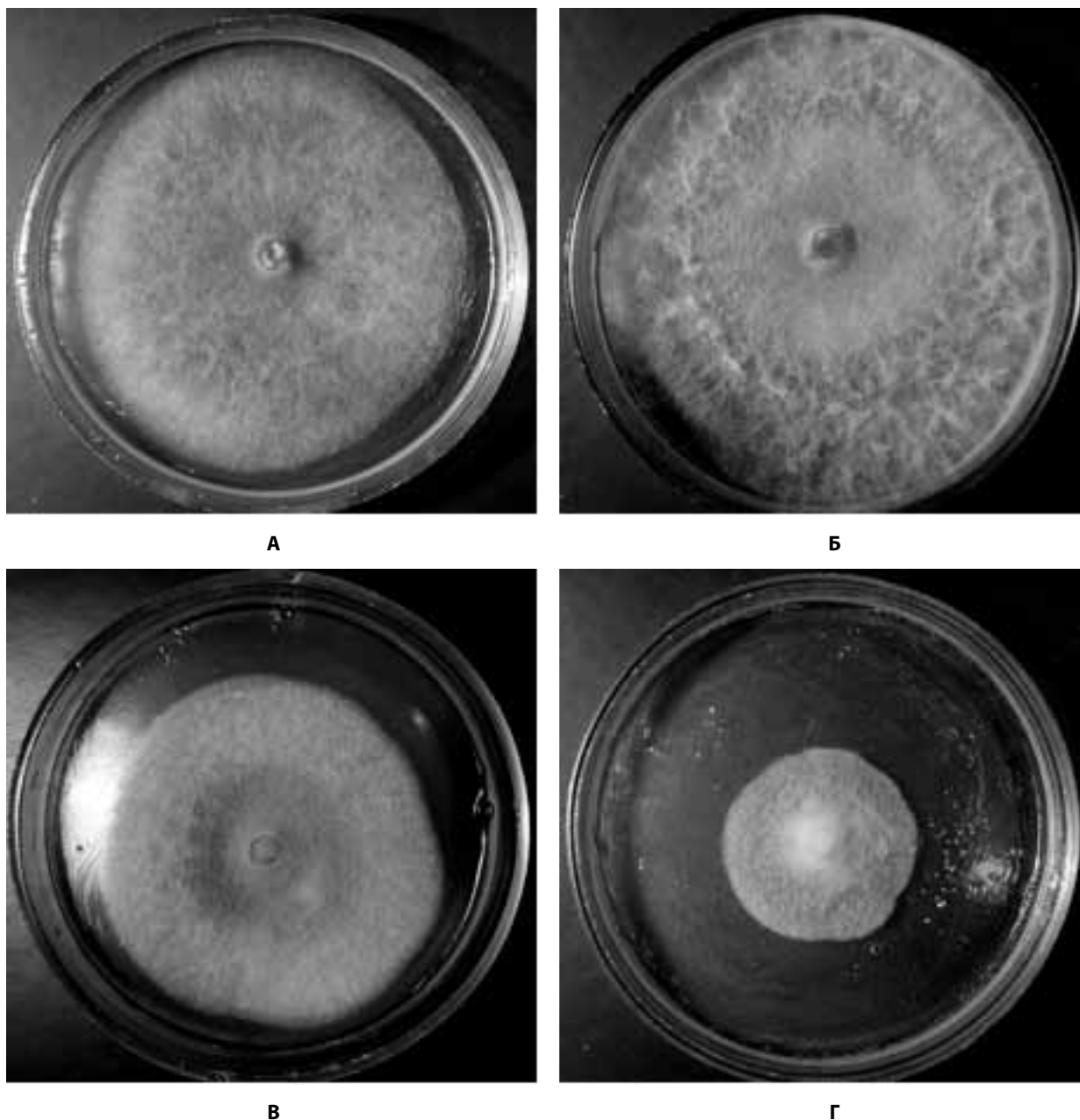


Рис. 3. Влияние НР, полученного на разных сроках культивирования ассоциации ТР на среде МСВ, на рост колоний *F. culmorum* 27. А – контроль; Б – культивирование ТР в течение 24 ч; В – 48 ч; Г – 72 ч

ВЫВОДЫ

1. Микроорганизмы, входящие в состав ассоциации ТР, проявляют антагонизм в отношении широкого спектра мицелиальных грибов – представителей родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Absidia*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Cunninghamella*, что указывает на перспективность проведения дальнейших исследований с представителями других родов и видов грибов. Природа антигрибковых метаболитов-ассоциантов требует отдельного изучения.

2. НР, полученный на разных сроках культивирования ассоциации ТР на среде МСВ, может оказывать разнонаправленное действие на рост грибов. Наиболее выраженную ингибирующую активность отмечали, начиная с 72 ч культивирования ассоци-

ции, в то время как НР, полученный на 1 сутки культивирования, напротив, способен стимулировать рост отдельных штаммов грибов. В связи с этим при получении на основе ассоциации ТР продуктов, активных против мицелиальных грибов, следует строго учитывать особенности динамики образования действующих компонентов.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Gazzani G., Grusak M.A. Functional foods and their expanding applications in the improvement of human health // Curr. Opin. Biotechnol. – 2012. – Vol. 23. – P. 127-128.
2. *Fermented foods and beverages of the world* / Eds. J. P. Tamang, K. Kailasapathy. – Boca Raton etc.: CRC Press, 2010. – 434 pp.
3. Горелов А.В., Усенко Д.В. Современный взгляд на место пробиотических продуктов в профилактике заболеваний и сохранении здоровья человека // Лечение и профилактика. – 2011. – № 1. – С. 56-64.
4. Granato D., Branco G.F., Gomes C.A., et al. Probiotic dairy products as functional foods // Compr. Rev. Food Sci. Food Safety. – 2010. – Vol. 9, №5. – P. 455-470.
5. Климко Н.Н. Микозы: диагностика и лечение. Руководство для врачей. 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Ви Джи Групп, 2008. – 336 с.
6. Mailänder-Sánchez D., Wagener J., Schaller M. Potential role of probiotic bacteria in the treatment and prevention of localized candidosis // Mycoses. – 2012. – Vol. 55, №1. – P. 17-26.
7. Ларина О.Г. Микробиология природной ассоциации «Тибетский рис»: дис... канд. биол. Наук. – СПб., 2000. – 180 с.
8. Тихомирова О.М., Иванова Е.А. Противогрибковая активность микроорганизмов природной ассоциации «Тибетский рис» // Проблемы мед. микологии. – 2011. – Т. 13, № 4. – С. 39-42.
9. Quiroga E.N., Sampietro A.R., Vattuone M.A. In vitro fungitoxic activity of *Larrea divaricata* cav. extracts // Lett. Appl. Microbiol. – 2004. – Vol. 39, №1. – P. 7-12.
10. Rodríguez M.A., Cabrera G., Godeas A. Cyclosporine A from a nonpathogenic *Fusarium oxysporum* suppressing *Sclerotinia sclerotiorum* // J. Appl. Microbiol. – 2006. – Vol. 100, №3. – P. 575-586.
11. Strom K. Fungal inhibitory lactic acid bacteria. Characterization and application of *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393: doct. thesis / Strom Katrin. – Uppsala: Swedish Univ. Agr. Sci., 2005. – 39 p.

Поступила в редакцию журнала 02.09.2013

Рецензент: Н.П. Журавлева



АНТИФУНГАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ «СТРОИТЕЛЬНЫХ БИОЦИДОВ» В ОТНОШЕНИИ *STACHYBOTRYS* SPP.

Доршакова Е.В. (н.с.)*, Павлова И.Э. (н.с.), Елинов Н.П. (проф. кафедры), Богомолова Т.С. (зав. лаб.), Чилина Г.А. (зав. лаб.), Выборнова И.В. (н.с.), Босак И.А. (врач-лабораторный миколог), Васильева Н.В. (директор института)

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова: НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина и кафедра медицинской микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

©Коллектив авторов, 2013

*Изучена и оценена эффективность действия имеющихся в продаже «строительных биоцидов» в отношении токсикообразующих микромицетов-биодеструкторов из рода *Stachybotrys*. Изучены штаммные различия чувствительности *Stachybotrys* spp. к исследуемым биоцидам.*

Ключевые слова: биодеструкция, биоциды, фунгистатическое действие, фунгицидное действие

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF «CONSTRUCTION BIOCIDES» CONCERNING *STACHYBOTRYS* SPP.

Dorshakova E.V. (junior scientific collaborator), Pavlova I.E. (scientific collaborator), Elinov N.P. (professor of the chair), Bogomolova T.S. (head of the laboratory), Chilina G.A. (head of the laboratory), Vybornova I.V. (scientific collaborator), Bosak I.A. (physician - laboratory mycologist), Vasilyeva N.V. (director of institute)

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov: Kashkin Research Institute of Medical Mycology and Chair of Medical Microbiology, St. Petersburg, Russia

©Collective of authors, 2013

Efficiency of action of commercially available «building biocides» concerning of toxigenic micromycetes-biodestructors of the genus

* Контактное лицо: Доршакова Евгения Владимировна, Тел.: (812) 303-51-40

Stachybotrys have been studied and estimated. Strains distinctions of sensitivity of *Stachybotrys* spp. to tested biocides were studied.

Key words: biocides, biodestruction, fungistatic action, fungicide action

ВВЕДЕНИЕ

Stachybotrys spp., способные синтезировать микотоксины, представляют опасность для здоровья людей. Наиболее токсичными являются макроциклические трихотеценовые микотоксины, оказывающие на организм цитотоксическое, нейротоксическое действия [1-7]. Штаммы *Stachybotrys chartarum*, продуцирующие макроциклические трихотецены, были отнесены к группе «хемотипа S» [8]. Штаммы *S. chartarum*, неспособные к синтезу макроциклических трихотеценов, продуцирующие простые трихотеценовые микотоксины (триходермин, триходермол), а также атраноны, были отнесены в группу «хемотипа А». Было обнаружено, что *S. chlorochalonata* имеет сходный спектр метаболитов с микромицетами «хемотипа А» *S. chartarum* [8, 9].

Stachybotrys spp. обладают целлюлозолитической активностью, широко распространены в природе и антропогенной среде. Умеренный климат и повышенная влажность в Санкт-Петербурге благоприятствуют росту биомассы микромицетов в почве, а также контаминации микобиотой стен зданий [10-12]. На сегодняшний день имеет место необходимость борьбы с микромицетами рода *Stachybotrys* в связи с их негативным воздействием на здоровье людей. Важно оценить эффективность действия имеющихся в продаже «строительных биоцидов» в отношении *Stachybotrys* spp.

В связи с распространенностью *Stachybotrys* spp. в жилых, офисных и больничных помещениях, их потенциальной опасностью для здоровья людей, актуально изучение эффективности действия имеющихся на рынке противогрибковых средств, используемых в качестве антифунгальных, предупреждающих возникновение грибов и для устранения очагов биоповреждений от них.

Цель исследования – оценить чувствительность *Stachybotrys* spp. к средствам, предназначенным для профилактики и уничтожения роста микромицетов «строительными биоцидами», выпускаемым различными производителями.

МАТЕРИАЛЫ

1. Техногенные субстраты помещений (штукатурка, гипсокартон, обои, минеральная вата, цементно-песчаная смесь).

2. Штаммы *Stachybotrys* spp.: 13 штаммов *S. chartarum* (12 – выявлены в техногенных субстратах в помещениях г. Санкт-Петербурга и 1 – в помещении г. Краснодара – штамм № 7); 1 штамм *S. chlorochalonata* (№ 11) – из отделочных материалов в жилом помещении Санкт-Петербурга.

3. Для оценки антифунгальной активности были выбраны следующие «строительные биоциды»:

«Антиплесень» фирмы «Лакра», «Санатекс» фирмы «Текс», «Декопроф», «Neomid bio ремонт» и «Neomid 600» фирмы Neomid. Все биоциды были включены в исследование в виде рабочих растворов, рекомендованных производителями.

4. В исследовании были использованы следующие питательные среды:

- сусло-агар («НИЦФ» – научно-исследовательский центр фармакотерапии);
- картофельный агар: картофель 300 г, вода дистиллированная – 1 л, глюкоза – 2 г, агар-агар – 20 г;
- картофельный отвар: картофель 300 г, вода дистиллированная – 1л, глюкоза – 2 г.

МЕТОДЫ

1. Выделение культур *Stachybotrys* spp. из техногенных субстратов.

Взятие проб с пораженных микромицетами поверхностей осуществляли ватным тампоном, смоченным в 0,9% растворе натрия хлорида, а с грубого и шероховатого – скальпелем. Образцы помещали в герметичные упаковки с сопроводительными этикетками и засеивали на питательные среды – сусло-агар и Сабуро-агар в лабораторных условиях. Посевы инкубировали в термостатах при +28 °С и +37 °С в течение 14 суток [12], затем идентифицировали колонии *Stachybotrys* spp. по морфологическим и культуральным признакам.

Выделение *Stachybotrys* spp. в чистые культуры из ассоциаций с другими микромицетами осуществляли путем пересева колоний микробиологической иглой на картофельный агар в целях ускорения роста.

Видовую идентификацию чистых культур *Stachybotrys* spp. проводили по морфологическим признакам [13] с дальнейшим подтверждением методом сиквенирования в НИЛ молекулярно-генетической микологии (и.о. зав. лаб. Полищук А.Г.).

2. Метод определения антифунгальной (фунгицидной и фунгистатической) активности «строительных биоцидов».

Действие «строительных биоцидов» изучали методом серийных разведений в жидкой питательной среде (картофельном отваре). Данная питательная среда выбрана в связи с быстрым ростом на ней *Stachybotrys* spp. и низкой вероятностью контаминации другими микромицетами. Метод основан на выполнении последовательных двукратных разведений [14] вышеперечисленных «строительных биоцидов».

Оценка действия «строительных биоцидов» в отношении *Stachybotrys* spp. была проведена в диапазоне разведений рабочих растворов 1:1 – 1:64000. Для каждого биоцида были поставлены ряды пробирок, в первые пробирки каждого ряда исследуемые вещества вносили в минимальном разведении, затем проводили их титрование до 8 пробирки. В пробирки с питательной средой и биоцидом соответствующего разведения вносили взвеси спор *Stachybotrys* spp. в количестве 0,1 мл. Для приготовления взвесей спор

культуры 14 штаммов *Stachybotrys* spp. выращивали в течение 2 недель при +28 °С в пробирках на сусло-агаре. С поверхностей культур брали смывы конидий с постепенным добавлением 0,85% стерильного раствора натрия хлорида до густоты рабочих взвесей 1 ЕД по МакФарланду.

В исследовании каждого биоцида ставили 3 пробы контроля:

- 1 – контроль культуры (1 мл питательной среды + 0,1 мл рабочей взвеси тест-культуры);
- 2 – контроль питательной среды (1 мл питательной среды);
- 3 – контроль препарата (0,5 мл питательной среды + 0,5 мл исходного раствора препарата).

Все ряды подготовленных разведений с культурами и образцами контроля выдерживали при 28 °С в течение 7-10 суток до появления роста гриба в первом контроле. Минимальной фунгистатической (подавляющей) концентрацией (МПК) препарата считали концентрацию в последней пробирке ряда (максимальное разведение), в которой отсутствовал визуально определяемый рост микромицета (Рис. 1).



Рис.1. Ряд разведений биоцида после инкубации в течение 7 дней

Для определения фунгицидного действия препарата делали высев штрихами микробиологической петлей на секторы сусло-агара в чашках Петри из каждой пробирки, в которой визуально отсутствовал рост тест-культуры, а также из первой контрольной пробирки. Чашки с посевами ставили в термостат при 28 °С на срок – до появления роста колоний в контрольном секторе, после чего вели учет роста микроскопических грибов во всех секторах (Рис. 2).

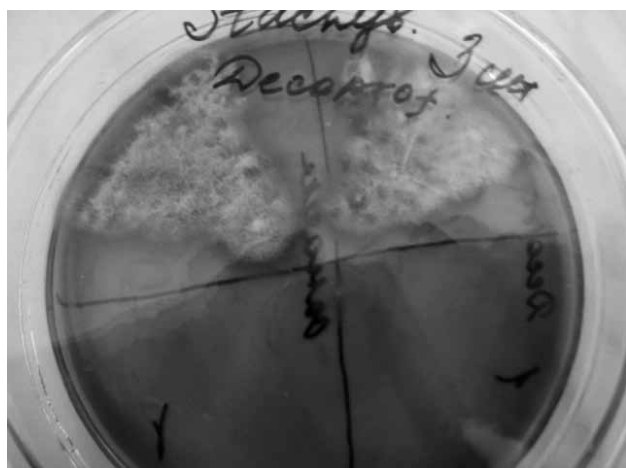


Рис. 2. Рост *S. chartarum* в секторах чашки Петри для определения его фунгицидного действия

Минимальной фунгицидной концентрацией (МФК) считали минимальную концентрацию (максимальное разведение) препарата в пробирке, высев из которой на плотную питательную среду не давал роста *Stachybotrys* spp. Проводили расчет МПК и МФК в объемных процентах для соответствующих активных разведений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

За период 2009-2012 гг. нами было обследовано 116 помещений Санкт-Петербурга и Ленинградской области. В 13 помещениях (11,2% от общего количества обследованных помещений) была обнаружена контаминация техногенных субстратов *Stachybotrys* spp. в количестве 2-687500 КОЕ/дм² (в образцах строительных и отделочных материалов). В наименьшем количестве *Stachybotrys* spp. наблюдали в образце виниловых обоев без следов биопоражения, а в наибольшем – в образце бумажных обоев, покрытых темными пятнами и налетом серого цвета. Среди выявленных 19 очагов биопоражения строительных и отделочных материалов *Stachybotrys* spp., имела место контаминация штукатурки в 6 случаях (31,6%), гипсокартона – в 6 (31,6%), обоев – в 5 (26,3%), а также минеральной ваты – 1 (5,3%) и цементно-песчаной смеси 1 (5,3%).

Таким образом, потенциально токсигенные микромицеты *Stachybotrys* spp. обнаружили в значительной части обследованных помещений, с преимущественным поражением целлюлозосодержащих отделочных материалов – гипсокартона, а также штукатурки.

Таблица №1

Фунгицидная и фунгистатическая активности «строительных биоцидов» по отношению к *Stachybotrys* spp.

№ штамма <i>Stachybotrys</i> spp.	«Строительные биоциды» (минимальные активные разведения)									
	Neomid 600		Neomid bio ремонт		Санатекс		Декопроф		Антиплесень (Лакра)	
	МПК	МФК	МПК	МФК	МПК	МФК	МПК	МФК	МПК	МФК
1	1:32	1:32	1:500	1:250	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000	1:2000	1:1000
2	1:16	1:16	1:500	1:250	1:1000	1:1000	1:2000	1:1000	1:2000	1:1000
3	1:32	1:32	1:1000	1:500	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000
4	1:64	1:32	1:1000	1:500	1:4000	1:4000	1:4000	1:4000	1:8000	1:4000
5	1:64	1:64	1:2000	1:1000	1:4000	1:4000	1:4000	1:4000	1:4000	1:4000
6	1:64	1:32	1:640	1:320	1:1000	1:1000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000
7	1:64	1:64	1:640	1:620	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000	1:4000	1:2000
8	1:16	1:16	1:640	1:640	1:2000	1:1000	1:2000	1:2000	1:8000	1:4000
9	1:32	1:16	1:320	1:320	1:1000	1:1000	1:500	1:500	1:2000	1:2000
10	1:64	1:64	1:640	1:320	1:1000	1:500	1:1000	1:1000	1:2000	1:2000
11	1:64	1:64	1:640	1:640	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000	1:4000	1:2000
12	1:64	1:32	1:320	1:160	1:1000	1:1000	1:1000	1:500	1:1000	1:500
13	1:16	1:16	1:160	1:160	1:500	1:500	1:500	1:500	1:200	1:200
14	1:8	1:8	1:320	1:320	1:1000	1:1000	1:500	1:500	1:1000	1:1000

Таблица №2

Активность «строительных биоцидов» против *Stachybotrys* spp. (в объемных % рабочего раствора)

№ штамма <i>Stachybotrys</i> spp.	«Строительные биоциды»									
	Neomid 600		Neomid bio ремонт		Санатекс		Декопроф		Антиплесень (Лакра)	
	МПК (%об.)	МФК (%об.)	МПК (%об.)	МФК (%об.)	МПК (%об.)	МФК (%об.)	МПК (%об.)	МФК (%об.)	МПК (%об.)	МФК (%об.)
1	3,13	3,13	0,2	0,4	0,1	0,1	0,1	0,1	0,05	0,1
2	6,25	6,25	0,2	0,4	0,1	0,1	0,05	0,1	0,05	0,1
3	3,13	3,13	0,1	0,2	0,1	0,1	0,05	0,1	0,1	0,1
4	1,56	3,13	0,1	0,2	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03
5	1,56	1,56	0,05	0,1	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
6	1,56	3,13	0,16	0,31	0,1	0,1	0,05	0,05	0,05	0,05
7	1,56	1,56	0,16	0,31	0,1	0,1	0,1	0,1	0,03	0,05
8	6,25	6,25	0,16	0,16	0,05	0,1	0,05	0,05	0,02	0,03
9	3,13	6,25	0,31	0,31	0,1	0,1	0,2	0,2	0,05	0,1
10	1,56	1,56	0,16	0,31	0,1	0,2	0,1	0,2	0,05	0,05
11	1,56	1,56	0,16	0,16	0,1	0,1	0,1	0,1	0,03	0,05
12	1,56	3,13	0,31	0,63	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2
13	6,25	6,25	0,63	0,63	0,2	0,2	0,2	0,2	0,05	0,05
14	12,5	12,5	0,31	0,31	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1
Средн. значение	5,14	7,88	0,24	0,29	0,09	0,1	0,10	0,13	0,05	0,06

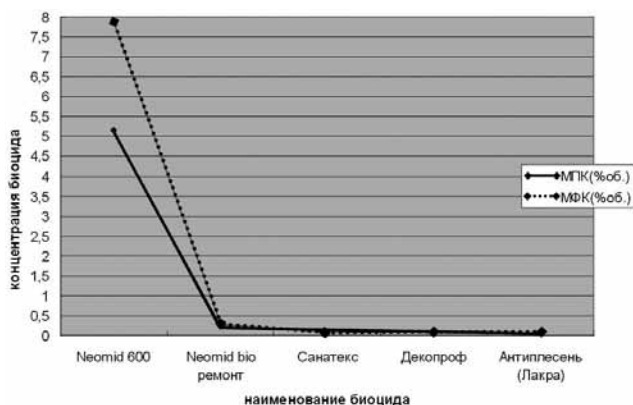


Рис.3. Средние значения МПК (% об.) и МФК (% об.) исследованных «строительных биоцидов» в отношении 14 штаммов *Stachybotrys* spp.

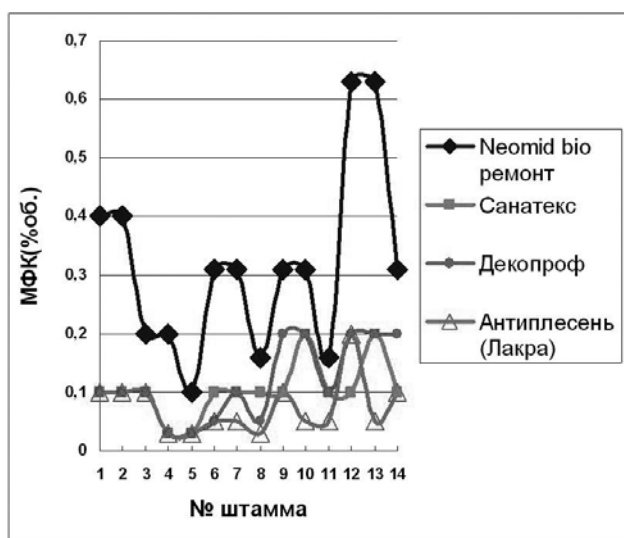


Рис. 4. Различия чувствительности *Stachybotrys* spp. к «строительным биоцидам»

Все изученные биоциды обладают фунгицидной и фунгистатической активностями в отношении *Stachybotrys* spp. Исходя из полученных значений МПК (% об.) и МФК (% об.), биоциды можно расположить в порядке убывания их активности: «Антиплесень» («Лакра»), «Санатекс», «Декапроф», «Neomid bio ремонт», «Neomid 600» (Рис. 3). Значительно более низким фунгистатическим и фунгицидным действиями обладает «Neomid 600», его средняя подавляющая концентрация составляет 5,14%, а средняя фунгицидная – 7,88%.

Наибольшими фунгицидной и фунгистатической активностями обладает «Антиплесень» («Лакра»), его средняя подавляющая концентрация на все штаммы *Stachybotrys* spp. – 0,05% об., а средняя фунгицидная – 0,06% об. Средние значения МПК (% об.) и МФК (% об.) биоцида Антиплесень («Лакра») достоверно отличаются от таковых значений других биоцидов $P \leq 0,0002$ - $P \leq 0,0003$. Отметим близкие значения минимальных показателей – фунгицидной и фунгистатической концентраций с акцентом на преимущественно фунгицидное действие. Разница меж-

ду МФК и МПК при серийном титровании составляла не более 1 разведения. Обнаружили значительные отличия средних значений МПК (% об.) и МФК (% об.) действия Neomid 600 от таковых показателей других биоцидов. Разницы между средними значениями МПК (% об.) и МФК (% об.) остальных четырех биоцидов статистически не значимы.

Анализ штаммного различия устойчивости микромицетов к биоцидам целесообразно проводить в отношении четырех из них: «Антиплесень» («Лакра»), «Neomid bio ремонт», «Санатекс», «Декопроф», исключив значительно менее активный «Neomid 600». Достоверных отличий чувствительности различных штаммов *Stachybotrys* spp. к 4 «строительным биоцидам» не выявили. Среди штаммов *Stachybotrys* spp. можно выделить штаммы №4 и №5 как наиболее чувствительные к действию «строительных биоцидов», а также №12 и №13 как наиболее устойчивые. Однако отметим меньшую устойчивость 4 штамма к биоциду «Neomid bio ремонт», чем штаммов 8, 11, а также меньшую чувствительность 13 штамма к биоциду «Антиплесень» («Лакра»), по сравнению с таковой 14, 9, 3, 2, 1, и штамма 12 к биоциду «Санатекс» по сравнению с 10. Восприимчивость других штаммов к «строительным биоцидам» отличается незначительно.

В дальнейшем запланировано продолжить работу по тестированию «строительных биоцидов» в связи с регулярным обновлением ассортимента противогрибковых средств на российском рынке.

ВЫВОДЫ

1. Встречаемость *Stachybotrys* spp. в жилых, офисных и больничных помещениях Санкт-Петербурга и Ленинградской области за 2009-2012 гг. составила 11,2%.
2. Все исследуемые «строительные биоциды» активны в отношении изучаемых штаммов *Stachybotrys* spp. в диапазоне разведений 1:16 – 1:4000.
3. Наиболее эффективным противогрибковым средством в отношении *Stachybotrys* spp. является «Антиплесень» производства фирмы «Лакра».

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Pestka J.J., Yike I., Dearborn D.G., et al. *Stachybotrys chartarum*, trichothecene mycotoxins and damp building – related illness: new insights into a public health enigma // Toxicological Sciences. – 2008. – Vol. 104. – P. 4-26.
2. Cameron D.G. Toxicity profile of *Stachybotrys chartarum* // A Thesis In Environmental toxicology/ Submitted to the Graduate Faculty of Texas Tech University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of science.– 2009. Andersen, B., Nielsen, K.F., and Jarvis, B.B. Characterization of *Stachybotrys* from water-damaged buildings based on morphology, growth, and metabolite production // Mycologia. –2002. – Vol. 94. – P. 392-403.
3. Scott A.M. *Stachybotrys chartarum* (or *S. atra* or *S. alternans*): Review of Toxicological Literature. Integrated Laboratory Systems, Inc. Research Triangle Park.– North Carolina, 2004.
4. Jarvis B.B. *Stachybotrys chartarum*: A fungus for our time// Phytochemistry. – 2003. – Vol. 64. – P. 53-60.
5. Hossain M.A., Ahmed M.S. and Ghannoum M.A. Attributes of *Stachybotrys chartarum* and its association with human disease // J. Allergy Clin Immunol. – 2004. – Vol. 113. – P.2 00-208.
6. Васильева Н.В., Елинов Н.П. Микроорганизмы - контаминанты и патогены - индукторы процессов старения больших зданий и помещений медицинского назначения, а также возбудители некоторых заболеваний людей (учебное пособие) / Под ред. Н. П. Елинова. – СПб.: КОСТА, 2009. – 224 с.
7. Доршакова Е.В. Морфолого-физиологические особенности токсинообразующих грибов - биодеструкторов из рода *Stachybotrys* // Проблемы медицинской микологии. – 2011. – Т. 13, №3. – С. 13-21.
8. Andersen B., Nielsen K.F. and Jarvis B.B. Characterization of *Stachybotrys* from water-damaged buildings based on morphology, growth, and metabolite production // Mycologia. – 2002. – Vol. 94. – P. 392-403.
9. Andersen B., Nielsen K.F. and Thrane U. Molecular and phenotypic descriptions of *Stachybotrys chlorohalonata* sp. nov. and two chemotypes of *Stachybotrys chartarum* found in water-damaged buildings // Mycologia. – 2003. – Vol. 95. – P. 1227-1238.
10. Хабибуллина Ф.М. Микологическая характеристика подзолистых и болотно-подзолистых почв // Микология и криптогамная ботаника в России: традиции и современность: Тр. Междунар. конф., посвященной 100-летию организации исследований по микологии и криптогамной ботанике в Ботаническом институте им. В.Л. Комарова РАН. – СПб.: Изд-во СПб ГХФА, 2000. – С. 270-273.
11. Хабибуллина Ф.М. Почвенная микобиота естественных и антропогенно нарушенных экосистем северо-востока европейской части России: Автореф. дисс... док. биол. наук. – Сыктывкар, 2009. – 40 с.
12. Доршакова Е.В., Елинов Н.П., Павлова И.Э. и др. Микромицеты в естественной среде обитания и в помещениях – их потенциальная опасность для здоровья людей// Проблемы медицинской микологии. – 2012. – Т.14, №3. – С. 53-57.
13. Samson R.A., Houbraken J., Thrane U., et al. Food and indoor Fungi: CBS laboratory manual series. CBS. KNAW. Fungal biodiversity Centre Utrecht The Netherlands. – 2010.
14. XII государственная Фармакопея Российской Федерации: Часть I. – М.: Медицина, 2007. – 684 с.

Поступила в редакцию журнала 04.09.2013

Рецензент: С.М. Игнатьева



СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭНДО- И ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ *TRAMETES PUBESCENS* (SCHUMACH.) PILAT.

**Ананьева Е.П. (зав. кафедрой)*, Гурина
С.В. (доцент кафедры), Кожемякина Н.В.
(старший преподаватель кафедры)**

Санкт-Петербургская государственная химико-
фармацевтическая академия (кафедра
микробиологии), Санкт-Петербург, Россия

©Коллектив авторов, 2013

*Из мицелия базидиального гриба *Trametes pubescens* (Schumach.) Pilat. выделены растворимая и нерастворимая углеводные фракции, из нативного раствора – экзогликан; изучены их состав и иммунобиологическая активность. Установлено, что исследуемые полисахариды представляют собой сложные углеводные комплексы (смесь углеводных полимеров) с различной молекулярной массой, причем основным углеводным компонентом является глюкоза, а также обнаружены значительные количества маннозы и галактозы. Внеклеточные полисахариды, предположительно, являются результатом гиперпродукции растворимых полисахаридов клеточных стенок грибов, что подтверждается сходством данных молекулярно-массового распределения основных фракций ЭПС и растворимого клеточного полисахарида, полученных в результате гель-хроматографии. Полисахариды при внутрибрюшинном введении белым мышам оказывали стимулирующее действие на функциональную активность клеток системы мононуклеарных фагоцитов, причем более выраженным активизирующим эффектом обладал экзополисахарид.*

Ключевые слова: базидиомицеты, иммуностимулирующий эффект, макрофаги, мицелий, полисахарид, экзогликан

THE COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF ENDO- AND EXOPOLYSACCHARIDES OF *TRAMETES PUBESCENS* (SCHUMACH.) PILAT.

**Ananjeva E.P. (head of the chair), Gurina
S.V. (associate professor of the chair),
Kozhemyakina N.V. (senior lecturer of the
chair)**

St. Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy
(Chair of Microbiology), St. Petersburg, Russia

©Collective of authors, 2013

*From the mycelium of *Trametes pubescens* (Schumach.) Pilat. have been isolated soluble and insoluble carbohydrate fractions*

* Контактное лицо: Ананьева Елена Петровна,
e-mail: amar52@rambler.ru

exopolysaccharide – from the native solution; their composition and immunological activity were studied. Found that the investigated polysaccharides are complex of carbohydrate polymers (mixture of carbohydrate polymers) with different molecular masses, the main carbohydrate component is glucose, they also contained significant amounts of mannose and galactose. The molecular masses distribution of the carbohydrate components of the glycans shown that the basic exopolysaccharide and soluble fraction of cellular polysaccharide coincided output, probably extracellular polysaccharides were mainly the result of overproduction of soluble polysaccharides of the cell walls of fungi. Polysaccharides with intraperitoneal injection to white mice provided a stimulating effect at the functional activity of cells of mononuclear phagocytes with a more pronounced effect on activating macrophages provided exopolysaccharide.

Key words: basidiomycetes, exoglycan, immunostimulating effect, macrophages, mycelium, polysaccharide

ВВЕДЕНИЕ

Разработка и создание новых терапевтических препаратов для коррекции иммунной системы является актуальной проблемой иммунологии и медицины. Перспективными иммуностимуляторами являются полисахариды природного происхождения, в том числе выделенные из базидиальных грибов [1]. В основном, эти соединения относят к модификаторам биологических процессов, активность которых связана со стимуляцией различных звеньев иммунной системы макроорганизма [2]. Грибные полисахариды, в отличие от синтетических иммунокорректоров, нетоксичны, не подавляют кроветворную функцию костного мозга и селезенки. В этой связи, работа, посвященная исследованию новых представителей базидиальных грибов как перспективных источников средств лечебно-профилактической направленности для коррекции иммунной системы, имеет большой практический интерес.

Цель данной работы – выделение, характеристика и оценка иммунобиологической активности клеточных и внеклеточных полисахаридов, синтезируемых базидиомицетом *Trametes pubescens* (Schumach.) Pilat., 1939.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали базидиомицет *T. pubescens*. На сусло-агаре культура образовывала колонии белого цвета, выпуклые, округлые, опушенные, с ровным краем, воздушный мицелий – белый, ватообразный, при старении культуры появлялась кремовая или желтоватая окраска мицелия, росшего равномерно-радиально, со скоростью, в среднем, 2,5 мм/с при 24 °С. Микроскопически на септированном, разветвленном мицелии обнаружили одиночные крупные пряжки, крутоизогнутые, без просвета, характерные для базидиомицетов. В глубинной культуре гриб образовывал мицелиальные агрегаты сферической формы (пеллеты) диаметром 4-7 мм.

Мицелий получали методом глубинного культивирования в глюкозо-пептонной среде в течение 10 суток при 24 °С в динамических условиях. В качестве посевного материала использовали 4-х суточный

инокулят глубинной культуры, который вносили в среду для накопления мицелия в количестве 10% от объёма. После выращивания мицелий гриба отделяли от культуральной жидкости фильтрованием, промывали дистиллированной водой, обрабатывали этиловым спиртом (1:1), сушили при комнатной температуре до постоянного веса. Углеводные фракции выделяли водной экстракцией измельченного мицелия при 100 °С в течение 8 часов. Осадок и супернатант разделяли центрифугированием (15 мин., 5000 g). Осадок (нерастворимую фракцию) промывали 96% этиловым спиртом на центрифуге; супернатант упаривали в 2 раза, из упаренного раствора осаждали полисахарид (растворимую фракцию) 96% этиловым спиртом в соотношении 1:2, образовавшийся осадок отделяли центрифугированием (15 мин., 5000 g). Фракции сушили на воздухе, затем измельчали в стерильной фарфоровой ступке до порошкообразного состояния [3].

Экзогликан *T. pubescens* выделяли из культуральной жидкости, полученной в процессе культивирования гриба. Образующийся мицелий отделяли фильтрацией, фильтрат (нативный раствор) упаривали в 3-4 раза на ротационном вакуумном испарителе. Экзополисахарид осаждали из сконцентрированного нативного раствора 2 объемами 96% этанола. Осадок отделяли центрифугированием (15 мин., 5000 g). Полученный полисахарид обезвоживали 96% этиловым спиртом, сушили на воздухе и измельчали в ступке до порошкообразного состояния.

В полисахаридных фракциях и экзогликане определяли содержание редуцирующих веществ [4], белка – по методу Лоури [5] и минеральных примесей – методом сухого озоления [5]. Кислотный гидролиз образцов проводили 8Н раствором серной кислоты в течение 1 часа при кипячении. Качественный моносахаридный состав в гидролизатах определяли с помощью тонкослойной хроматографии на пластинках «Силуфол» (Silufol) в системе 40:49:10:1 (бутанол : вода : этанол : аммиак); количественный моносахаридный состав – методом ГЖХ в виде триметилсилильных (ТМС) производных сахаров на колонке HP-5 (SE-54) 30 м*0,25 мм*0,25 мкм на приборе «Кристалл» («Хромотек», Россия). В качестве свидетелей использовали растворы моносахаридов: глюкозы, ксилозы, маннозы, галактозы, фукозы, арабинозы, рамнозы, галактуроновой и глюкуроновой кислот. ИК-спектры поглощения фракций снимали на инфракрасном Фурье-спектрометре ФСМ 1201 (АО «СПб Инструментс», Россия). Показатели удельного вращения экзогликана и растворимой углеводной фракции устанавливали на автоматическом поляриметре Perkin-Elmer-241 (Perkin-Elmer, США). Характер молекулярно-массового распределения углеводных составляющих во фракциях определяли с помощью гель-хроматографии: использовали колонку (0,4*30 см), заполненную сефарозой - 4В. Содержание полисахаридов во фракциях выявляли реакцией с фенолом и серной кислотой.

Иммунобиологическое действие выделенных углеводных фракций и экзогликана определяли по их влиянию на показатели функциональной активности перитонеальных макрофагов белых мышей [3]. Углеводные фракции и экзогликан вводили мышам однократно внутрибрюшинно в дозе 50 мг/кг в стерильном физиологическом растворе. Макрофаги получали из перитонеальной полости мышей промыванием средой 199, содержащей 20% сыворотки крупного рогатого скота и гепарин в концентрации 5 Ед/мл (рН среды – 7,7). Клетки культивировали в монослое в течение 2 суток и затем оценивали их морфофункциональные изменения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При глубинном культивировании *T. pubescens* в глюкозо-пептонной среде выход биомассы мицелия и внеклеточного полисахарида составил 3,5 и 0,8 г/л соответственно. Из мицелия гриба были выделены растворимая (РФр) и нерастворимая (НФр) углеводные фракции в соотношении 1:12. Показано, что мицелий и выделенные из него фракции, а также экзогликан состояли из углеводов и белка. Фракции содержали от 50,0 до 82,0% углеводов (наибольшее количество – в РФр), экзогликан – 66,3%, в то время как в мицелии их количество не превышало 31,0%. Отмечали высокое содержание белка в мицелии (46,0%), тогда как его количество в выделенных фракциях и экзогликане существенно снижалось (до 8,2%). Содержание минеральных примесей в исследуемых образцах было незначительным (табл. 1).

Таблица 1

Характеристика химического состава мицелия, его углеводных компонентов и экзогликана *T. pubescens*

Образец	РВ, %	Белок, %	Зольность, %	Моносахаридный состав, %				
				Glu	Xyl	Man	Gal	Fuc
Мицелий*	31,0±4,2	46,0±1,9	0,2±0,05	+	сл**	сл	сл	сл
РФр	82,0±3,9	16,0±1,1	0,1±0,03	77,4	2,1	14,1	4,9	1,2
НФр	50,0±2,9	8,2±0,9	0,3±0,08	73,7	2,9	13,4	9,0	0,9
ЭПС	66,3±2,5	17,0±1,4	0,4±0,03	49,9	1,2	31,1	17,1	0,7

* В мицелии определяли только качественный моносахаридный состав

** сл – следовые количества

РВ – редуцирующие вещества

По результатам качественного анализа моносахаридного состава установлено, что в гидролизатах мицелия основным компонентом являлась глюкоза, остальные углеводы были представлены в следовых количествах (табл. 1). Был определен количественный моносахаридный состав выделенных фракций и экзогликана. Фракции незначительно отличались по составу: содержали 74-77% глюкозы, значительные количества маннозы (около 14,0%), а также следовые количества ксилозы и фукозы, содержание галактозы во фракциях различалось в 1,8 раза (табл. 1). В экзополисахаридах основным компонентом являлась глюкоза, однако ее содержание было в 1,5 раза ниже, чем в углеводных фракциях, содержание маннозы, напротив, в 2,3 раза превышало её содержание во

фракциях, ксилоза и фукоза были также представлены в следовых количествах.

При изучении показателей удельного вращения экзогликана и растворимой углеводной фракции мицелия *T. pubescens* определили, что значения данных показателей существенно не различались и варьировали в пределах (+9 – +12)°С. На основании полученных данных было сделано предположение о наличии в изучаемых полисахаридах как α-, так и β-гликозидных связей, что было подтверждено результатами проведенной ИК-спектроскопии.

При проведении сравнительного хроматографического анализа экзополисахарида и растворимой фракции мицелия гриба (на сефарозе 4В) установили, что исследуемые полисахариды представляют собой сложные углеводные комплексы (смесь углеводных полимеров) с различной молекулярной массой. Выявили наличие основных и нескольких минорных углеводных пиков, свидетельствующих о неоднородности состава изучаемых гликанов. При исследовании ЭПС *T. pubescens* было обнаружено 3 пика, соответствующих различным фракциям. Выход основной фракции совпадал по времени с максимальным выходом фракции растворимого клеточного полисахарида (Рис. 1, 2).

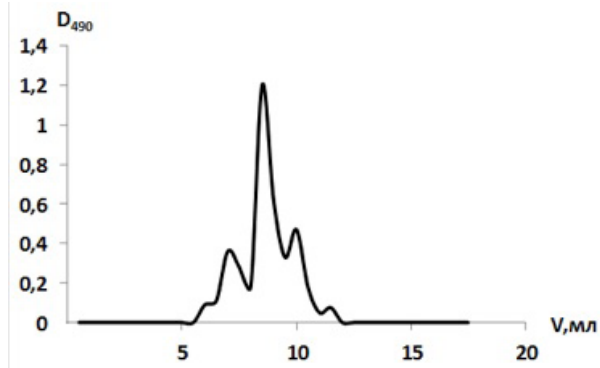


Рис. 1. Гель-хроматография ЭПС *T. pubescens*

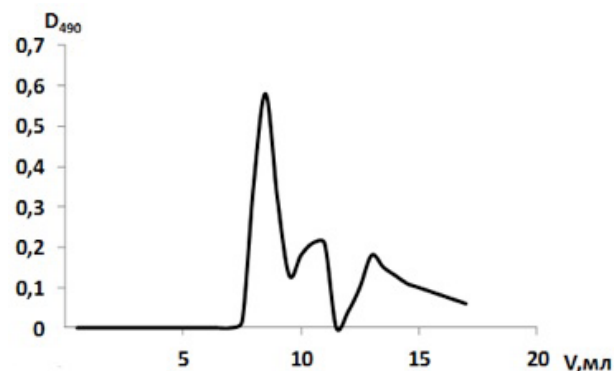


Рис. 2. Гель-хроматография Р/фр *T. pubescens*

В сравнении с экзогликаном, растворимый углеводный полимер мицелия дополнительно содержал низкомолекулярные компоненты. Вероятно, внеклеточные полисахариды, в основном, являлись результатом гиперпродукции растворимых полисахаридов клеточных стенок грибов.

Иммунобиологическое действие выделенных углеводных фракций и экзогликана устанавливали по их влиянию на показатели функциональной активности перитонеальных макрофагов белых мышей, которые являются чувствительной моделью для определения иммунобиологической активности различных препаратов.

Экзо- и эндополисахариды достоверно увеличивали показатели функциональной активности макрофагов, по сравнению с контролем, на все сроки наблюдения. На первом этапе изучали показатели, отражающие начальные стадии фагоцитоза. На 1-е сутки после введения эндополисахаридов наблюдали достоверное, хотя не очень активное увеличение значения хемотаксиса (в 1,3 раза для обеих фракций); под действием ЭПС этот показатель вырос в 2 раза по сравнению с контролем. Такой стимулирующий эффект гликанов сохранялся в течение 5 суток. Далее оценивали распластывание макрофагов на стекле как показатель активации цитоплазматической мембраны макрофагов и их готовности к фагоцитозу. Увеличение количества распластанных клеток под действием исследуемых гликанов отмечали достоверно выше контроля уже на 1-е сутки: под действием РФр и НФр показатель увеличился, соответственно, на 25 и 23%, а под действием ЭПС – на 28% по сравнению с контролем. К 5-м суткам после введения РФр и НФр этот показатель незначительно снижались, оставаясь достоверно выше контроля, а после введения ЭПС оставался на прежнем уровне.

Влияние полисахаридов на микрообидный эффект макрофагов по отношению к суточной культуре *Staphylococcus aureus* оценивали на 1-е и 5-е сутки после инъекций гликанов. Сравнивали выживаемость клеток *S. aureus* при контакте со стимулированными полисахаридами макрофагами и макрофагами, полученными от контрольной группы, и рассчитывали константу киллинга. Было установлено, что микрообидный эффект реализовался в течение 1 минуты контакта макрофагов с клетками *S. aureus*, а увеличение времени не приводило к усилению эффекта. Полисахариды достоверно увеличивали микрообидную способность макрофагов. Под влиянием РФр на 1-е сутки константа киллинга возрастала в 2,8 раза, а под влиянием НФр и ЭПС – в 2,0 раз по сравнению с контролем. На 5-е сутки наблюдали некоторое снижение микрообидного эффекта макрофагов, но с сохранением данного показателя достоверно выше контроля (в 1,6 раза – для РФр, в 1,7 для НФр, для ЭПС показатель остался на прежнем уровне).

В качестве объекта фагоцитоза использовали убитые нагреванием клетки *Candida albicans* и живые клетки *S. aureus*. Исследование поглотительной способности макрофагов проводили на 5-е сутки после введения гликанов, т.к. в ранее проведенных экспериментах на других объектах было показано, что именно в это время поглотительная способность была максимальна [3]. Установлено, что исследуемые гликаны достоверно увеличивали данный показатель

по отношению к *C. albicans*, причем более выраженный эффект оказывала РФр. Поглощительная способность макрофагов в отношении клеток *S. aureus* под действием гликанов также усиливалась, при этом количество фагоцитировавших клеток достоверно увеличилось. Показано, что активность поглощения *S. aureus* была выше, чем активность поглощения *C. albicans* под действием как эндо- так и экзополисахаридов. Вероятно, гликаны могут частично экранировать лектиноподобные рецепторы макрофагов, ответственные за связывание с углеводными компонентами клеточной стенки *C. albicans*, обуславливая менее интенсивное поглощение дрожжевых клеток.

На основании полученных результатов была построена диаграмма (Рис. 3), позволяющая дать сравнительную оценку иммуностимулирующей активности исследуемых гликанов. Наиболее выраженным иммуностимулирующим действием обладал экзогликан *T. pubescens*.

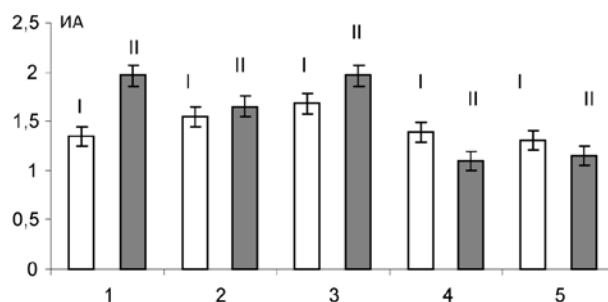


Рис. 3. Сравнительная характеристика действия фракций мицелия и экзогликана *T. pubescens* на показатели функциональной активности макрофагов: 1 – хемотаксис; 2 – активация ЦПМ; 3 – микробицидность; 4 – фагоцитоз *Staphylococcus aureus*; 5 – фагоцитоз *Candida albicans*. I – РФр; II – ЭПС; III – ЭПС; ИА – индекс активации.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что фракции глубинного мицелия и экзогликан базидиомицета *T. pubescens* преимущественно состояли из углеводов, небольшого количества белка и минеральных примесей. Основным углеводным компонентом полисахаридов являлась глюкоза, и были обнаружены значительные количества маннозы и галактозы.

2. Исследуемые полисахариды представляли собой комплекс углеводных полимеров с различными молекулярными массами. Основные фракции ЭПС и растворимого клеточного полисахарида совпадали по молекулярно-массовому распределению.

3. Экзо- и эндополисахариды достоверно увеличивали показатели функциональной активности макрофагов, более выраженным иммуностимулирующим действием обладал экзогликан.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Галынкин В.А., Заикина Н.А. и др. Основы биотехнологии высших грибов. – СПб.: Проспект науки, 2007. – 315 с.
2. Трещалина Е.М. Противоопухолевая активность веществ природного происхождения. – М.: Практическая Медицина, 2005. – 272 с.
3. Ананьева Е.П., Гурина С.В., Кожемякина Н.В. Характеристика компонентов мицелия *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat.; изучение их иммунобиологической и противоопухолевой активности // Проблемы медицинской микологии. – 2007. – Т.9, №1 – С. 30-33.
4. Кожемякина Н.В., Ананьева Е.П., Гурина С.В., Галынкин В.А. Условия культивирования, состав и биологическая активность мицелия *Flamulina velutipes* (Fr.)P. Karst. // Прикладная микробиология и биохимия. – 2010. – Т.46, №5 – С. 583-586.
5. Государственная Фармакопея Российской Федерации XII. Ч. 1. – М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2008. – 704 с.

Поступила в редакцию журнала 09.07.2013

Рецензент: Н.П. Елинов



СОЧЕТАННОЕ ДЕЙСТВИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ И АНТИМИКОТИКОВ НА ФОСФОЛИПАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ ОПОРТУНИСТИЧЕСКИХ МИКРОМИЦЕТОВ

Кузикова И.Л. (с.н.с.)*, Сухаревич В.И.
(г.н.с.), Медведева Н.Г. (зав. лаб.)

ФГБУН Санкт-Петербургский научно-исследовательский центр экологической безопасности Российской академии наук (НИЦЭБ РАН), Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2013

Определен характер влияния температуры и температуры в комплексе с антифунгальными препаратами на активность фосфолипаз – одного из важнейших факторов патогенности грибов. Показано, что при снижении температуры культивирования с 25 °C до 16 °C и 10 °C фосфолипазная активность оппортунистических грибов родов *Aspergillus* и *Penicillium* возрастает на 25-68%. Под влиянием антифунгальных препаратов, в условиях пониженной температуры, происходит значительное увеличение фосфолипазной активности за счет аддитивного эффекта воздействия температуры и фунгицида. Повышенная температура (37 °C) в меньшей степени активизирует фосфолипазную активность микромицетов. Сочетанное воздействие повышенной температуры 37 °C и фунгицидов приводит к сложению эффектов только у *Aspergillus spp.*, однако при этом фосфолипазная активность грибов остается ниже, по сравнению с более низкими температурами (16 °C и 10 °C).

Ключевые слова: оппортунистические грибы, температура, фосфолипазная активность, фунгициды

THE COMBINED EFFECT OF TEMPERATURE AND ANTIFUNGAL AGENTS AT PHOSPHOLIPASE ACTIVITY OF OPPORTUNISTIC FUNGI

Kuzikova I.L. (senior scientific collaborator),
Sukharevich V.I. (chief scientific
collaborator), Medvedeva N.G. (head of the
laboratory)

St. Petersburg Scientific Research Center for Ecological
Safety RAS, St. Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2013

The character of the temperature effect and temperature in

* Контактное лицо: Кузикова Ирина Леонидовна
тел.: (812) 499-64-62

combination with antifungal agents on the activity of phospholipase – one of the most important factors in the pathogenicity of fungi – have been defined. At lower of temperature cultivation from 25 °C to 16 °C and 10 °C the phospholipase activity of opportunistic fungi of the genera *Aspergillus* and *Penicillium* increase on 25-68%.

By the influence of antifungal agents at low temperatures there was a significant increase of the phospholipase activity additive effect due to temperature effects and fungicide. High temperature (37 °C) to a lesser extent activates phospholipase activity of micromycetes. The combined effect of high temperature 37 °C and fungicides results in effects only at *Aspergillus spp.*, however, the phospholipase activity of fungi is below as compared with lower temperatures (16 °C and 10 °C).

Key words: fungicide, opportunistic fungi, phospholipase, temperature

Температура культивирования микроорганизмов имеет важное значение как для роста культур, так и для регуляции их адапционных факторов, относящихся к факторам патогенности, – ферментов, полисахаридов, пигментов и др. [1, 2]. По данным Никольской Е.А., Синявской О.И. (1984), низкая температура культивирования (8-10 °C) псевдотуберкулезного микроба *Yersinia pseudotuberculosis*, по сравнению с 37 °C, способствует активации в 2-8 раз такого фактора патогенности, как каталаза. При этом вирулентность штаммов *Y. pseudotuberculosis*, выращенных при температуре 6-8 °C, выше, чем выращенных при 36-37 °C [3].

При изучении влияния температуры на вирулентность *Listeria monocytogenes*, контаминирующих пищевые продукты, показано, что низкая температура способствует повышению адгезивных свойств бактерий и приводит к увеличению вирулентности штаммов [4]. В работе [5], выполненной с *L. monocytogenes*, установлено, что под действием температуры происходит изменение в экспрессии структурных вариантов липотейхоевой кислоты (ЛТК) – ЛТК₁ и ЛТК₂. При росте бактерий в условиях комнатной температуры преимущественно образуется ЛТК₁, а при 37 °C – ЛТК₂. По мнению авторов, такая модификация ЛТК может отражать адаптацию бактерий к эндотермическим условиям в клетках организма - хозяина и повышение их вирулентности.

Вирулентность *Aeromonas salmonicida* – бактериального патогена рыб также зависит от температуры. При 22 °C и ниже культура высоко вирулентна, в то время как при 25 °C и выше это свойство утрачивается [6, 7].

При использовании изолятов энтомопатогенных грибов – *Beauveria bassiana* и *Metarhizium anisopliae* также показано, что температура оказывает существенное воздействие на их вирулентность [8], но, в данном случае, характер влияния температуры на уровень вирулентности зависит и от свойств отдельных изолятов. Так, у одного из изолятов *M. anisopliae* заражение личинок возрастает с повышением температуры до 35 °C, у других – максимальную скорость инфицирования наблюдали при 15-20 °C.

Однако основная часть исследований по влиянию температуры на факторы патогенности микроорганизмов была выполнена с бактериальными патогенами

нами и значительно меньшая – с мицелиальными оппортунистическими грибами, внимание к которым в настоящее время возрастает в связи со значительным ростом заболеваемости микозами [9-12], количество которых ежегодно увеличивается на 5-10% и удваивается каждые 10 лет [13].

Наряду с температурой, на образование факторов патогенности грибов – пигментов, полисахаридов, гидролитических ферментов и др. существенное влияние оказывают различные антифунгальные средства [14, 15]. В связи с этим, возникает вопрос о характере и степени воздействия грибов антифунгальных средств на факторы патогенности в условиях, различающихся по температуре.

Этому вопросу и посвящена настоящая работа. В качестве контролируемого фактора использовали активность грибных фосфолипаз как одного из важнейших факторов патогенности, обеспечивающего способность микромицета разрушать мембраны клеток тканей человека и активно их инвазировать.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили с использованием в качестве тест-культур оппортунистических мицелиальных грибов: *Aspergillus flavus* Link 1809, *A. terreus* Thom 1025, *A. niger* Tiegh 1199, *Penicillium funiculosum* Thom 1115, *P. ochrochloron* Biourge 1702, полученных из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) РАН.

Культуры хранили и поддерживали на агаризованной среде Чапека с 2% крахмала.

Фосфолипазную активность грибов определяли «чашечным методом», предложенным М.Е. Price с соавторами (1982), с применением среды следующего состава: агар Сабуро, 1М NaCl, 5мМ CaCl₂, 8% стерильного яичного желтка.

Метод основан на гидролизе липидов, содержащихся в яичном желтке, с последующим возникновением кальциевого комплекса с образующимися при этом жирными кислотами, освобождаемыми под действием секретируемого фермента. После инкубирования посевов при различной температуре (10±1 °С; 16±1 °С; 25±1 °С; 36±1 °С) измеряли диаметр колоний (A_к) и общий диаметр колоний с зоной преципитации (A_{к+з.п.}). Фосфолипазную активность определяли как отношение диаметра колоний с зоной преципитации к диаметру колонии (A_{к+з.п.}/A_к).

В работе использовали синтетические фунгициды – катамин АБ (алкилбензилдиметиламмоний хлорид), метатин (смесь 2-метил-4-изотиазолин-3-ОН и 5-хлор-2-метил-3(2Н)-изотиазолин-3-ОН в соотношении 1: 3) и природный противогрибковый гексеновый антибиотик 30, образуемый актиномицетом из рода *Streptomyces*. Химические и биологические свойства антибиотика 30 представлены в работе [16].

Фунгициды и антибиотик 30 вносили в питательную среду в суббицидных концентрациях, которые варьировали в зависимости от чувствительности к ним грибов, и при которых достигали степени пода-

вления роста грибных колоний на 40-60%.

Обработку экспериментальных данных проводили с использованием пакета программ Statistica 5.5. Различия считали достоверными при уровне значимости p<0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Активность фосфолипаз всех исследуемых микромицетов выявляли при 16±1 °С, 25±1 °С и при повышенной температуре 36±1 °С. При биологически низкой температуре 10±1 °С определение активности фосфолипаз оказалось возможным только у *P. ochrochloron*, так как в этих условиях рост культур *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *Penicillium funiculosum* отсутствовал. Учитывая, что при различных температурах культивирования рост грибов происходит с разной скоростью, фосфолипазную активность устанавливали в динамике роста культур. Согласно данным, представленным по фосфолипазной активности (на рисунке и в таблице), выявили максимальный уровень образования ферментов.

В результате показано, что при снижении температуры культивирования с 25 °С до 16 °С у всех исследуемых грибов наблюдали активацию фосфолипазной активности (ФЛА) на 25-68% в зависимости от культуры (Рис.).

Таблица

Сочетанное влияние температуры и фунгицидов на фосфолипазную активность грибов

Варианты культивирования			Фосфолипазная активность, % к контролю				
№ п/п	T, °С	Фунгицид	<i>P.ochrochloron</i>	<i>P. funiculosum</i>	<i>A. terreus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>
1	25	-	100	100	100	100	100
2	25	катамин	128	119	110	112	112
3	25	метатин	116	110	96	112	105
4	25	антибиотик 30	127	164	130	150	135
5	37	-	93	84	122	104	121
6	37	катамин	99	104	125	136	134
7	37	метатин	93	107	121	112	113
8	37	антибиотик 30	100	98	150	150	150
9	16	-	125	168	138	127	140
10	16	катамин	165	250	134	136	150
11	16	метатин	134	201	134	127	140
12	16	антибиотик 30	152	274	167	209	153
13	10	-	125	н	н	н	н
14	10	катамин	152	н	н	н	н
15	10	метатин	135	н	н	н	н
16	10	антибиотик 30	162	н	н	н	н

н – нет роста

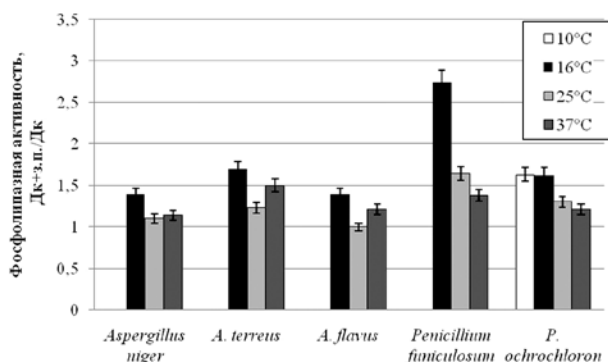


Рис. Уровень активности фосфолипаз при различной температуре роста грибов.

При последующем снижении температуры до 10 °С дальнейшего повышения уровня ФЛА не происходит (показано на примере *P. ochrochloron*). Повышение температуры культивирования с 25 °С до 37 °С сопровождается повышением активности фосфолипаз в меньшей степени – на 22% только у *Aspergillus flavus* и *A. terreus*, у остальных культур она практически не изменяется.

Так как для защиты от грибов, обитающих при различных температурных условиях, применяют природные и синтетические фунгициды, представлял интерес вопрос о влиянии температуры на активность фосфолипаз у микромицетов, одновременно подвергаемых действию антифунгальных средств. В частности, при изучении действия катамина АБ, метатина и гексаенового антибиотика 30 на активность фосфолипаз установили, что все используемые фунгициды при 25 °С активируют ФЛА микромицетов (варианты 2-4) (таблица). При этом величина эффекта зависит как от вида микромицета, так и от используемого фунгицида. Наибольшее увеличение фосфолипазной активности – на 27-64%, в зависимости от культуры, наблюдали при внесении в питательную среду гексаенового антибиотика 30. Катамин АБ и метатин способствуют значительно меньшей активации фосфолипаз. При их использовании самый высокий уровень повышения активности фосфолипаз обнаружили у *P. ochrochloron* – на 28% и 16% в присутствии катамина и метатина соответственно.

При анализе сочетанного действия температуры и антифунгальных средств на активность грибных фосфолипаз, в качестве контрольных вариантов были выбраны варианты культивирования при 25 °С на средах без фунгицидов – вариант 1.

Из представленных в таблице данных видно, что под влиянием антимикотиков при пониженной тем-

пературе (10 °С и 16 °С), происходит значительное возрастание ФЛА у всех изученных микромицетов (варианты 10-12 и 14-16), при этом в большинстве случаев наблюдали аддитивный эффект воздействия низкой температуры и фунгицида.

Аналогичный аддитивный эффект отмечали у представителей рода *Aspergillus* при воздействии фунгицидов в условиях повышенной температуры (37 °С) (варианты 6-8). Отметим, что при наличии воздействия на ФЛА только одного из двух факторов – температуры (вариант 7, *A. terreus*) или фунгицида (варианты 7, 8, *A. niger*) повышение значений фактора патогенности обусловлено именно этим фактором.

У *Penicillium* spp. выявили совершенно иную реакцию на воздействие фунгицидов в условиях повышенной температуры. Фосфолипазная активность *P. ochrochloron* и *P. funiculosum* при 37 °С остается на уровне контрольных вариантов (вариант 1), т.е. эффект увеличения ФЛА исследуемых пенициллов под воздействием фунгицидов нивелируется.

ВЫВОДЫ

1. Определен характер влияния температуры культивирования на образование *Aspergillus* spp. и *Penicillium* spp. такого фактора патогенности как фосфолипазы. Показано, что у всех изученных культур микромицетов при снижении температуры с 25 °С до 16 °С и 10 °С имеет место значительная активация ФЛА.

2. При повышенной температуре (37 °С) микромицеты синтезируют меньшее количество фосфолипаз, являющихся важнейшими факторами патогенности, по сравнению с их образованием при более низких температурах (16 °С и 10 °С).

3. Впервые показано, что под влиянием антифунгальных препаратов в условиях пониженной температуры происходит возрастание ФЛА, при этом в большинстве случаев отмечали аддитивный эффект воздействия температуры и фунгицида. Сочетанное воздействие повышенной температуры 37 °С и фунгицидов приводит к сложению эффектов только на *Aspergillus* spp. Однако в этих температурных условиях фосфолипазная активность грибов остается существенно меньшей по сравнению с ее активностью при пониженных температурах.

4. Обработка объектов фунгицидами в условиях пониженных температур (16 °С и 10 °С) может способствовать возрастанию потенциально опасных для человека грибов в антропогенном сообществе.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Сомов Г.П., Бузолева А.С. Адаптация патогенных бактерий к абиотическим факторам окружающей среды. – Владивосток: ОАО Примполиграфкомбинат, 2004 – 167 с.
2. Бузолева А.С., Сомова А.М., Кривошеева А.М. и др. Использование запасных веществ бактериями *Yersinia pseudotuberculosis* и *Listeria monocytogenes* при разной температуре //Ж. Микробиол. – 2006. – №3. – С. 16-19.
3. Ценева Г.Я., Солодовникова Е.А., Воскресенская Е.А. Молекулярные аспекты вирулентности иерсиний //Клин. микробиол. и антимикроб. химиотерапия. – 2002. – Т. 4., №3. – С. 248-266.
4. Цветкова Н.Б., Бузолева А.С., Обухова В.С. Влияние условий хранения на изменение биологических свойств *Listeria monocytogenes*, контаминирующих пищевые продукты //Тихоокеанский медицинский журнал. – 2010. – №4. – С.

36-39.

5. Dehus O., Pfitzenmaier M., Stuebs G., et al. Growth temperature-dependent expression of structure variants of *Listeria monocytogenes* lipoteichoic acid // Immunobiology. – 2011. – Vol. 216. – P. 24-31.
6. Stuber K., Burr S.E., Braun M., et al. Type III secretion genes in *Aeromonas salmonicida* subsp *salmonicida* are located on a large thermolabile virulence plasmid //J. Clin. Microbiol. – 2003. – Vol. 41 – P. 3854-3856.
7. Daher R.K., Filion G., Tan S.G., et al. Alteration of virulence factors and rearrangement of pAsa5 plasmid caused by the growth of *Aeromonas salmonicida* in stressful conditions // Veterinary Microbiology. – 2011. – Vol. 152. – P. 353-360.
8. Garrido-Jurado I., Valverde-Garcia P., Quesada-Moraga E. Use of a multiple logistic regression model to determine the effects of soil moisture and temperature on the virulence of entomopathogenic fungi against pre-imaginal Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* // Biological Control. – 2011. – Vol. 59. – №.3 – P. 366-372.
9. Елинов Н.П., Митрофанов В.С., Чернопятова Р.М. Аспергиллезная инфекция; подходы к ее диагностике и лечению // Проблемы медицинской микологии. – 2002. – Т. 4, №1. – С.4-6.
10. Елинов Н.П. Медицинская микология – наука о болезнетворных для человека грибах; свершения и проблемы // Проблемы медицинской микологии. – 2008. – Т. 10, №2. – С. 8-10.
11. Климко Н.Н., Богомолова Т.С., Васильева Н.В. и др. Микогенная аллергия у жителей помещений, пораженных микромицетами // Проблемы медицинской микологии. – 2008. –Т. 10, №2. – С. 17-21.
12. Васильева Н.В., Елинов Н.П. Микроорганизмы-контаминанты – индукторы процессов старения больничных зданий и помещений медицинского назначения, а также возбудители некоторых заболеваний людей: (учебное пособие) /под ред. Н.П. Елинова. – СПб.: КОСТА, 2009. – 224 с.
13. Биоповреждения больничных зданий и их влияние на здоровье человека / под ред. А.П. Щербо и В.Б. Антонова. – СПб., 2008. – 230 с.
14. Сухаревич В.И., Кузикова И.А., Медведева Н.Г. Защита от биоповреждений, вызываемых грибами. – 2009. – СПб.: ЭЛБИ-СПБ. – 207 с.
15. Кузикова И.А., Медведева Н.Г., Сухаревич В.И. Влияние фунгицидов и поверхностно-активных веществ на факторы потенциальной патогенности у грибов – возбудителей микоповреждений // Микология и фитопатология. – 2010. – Т.44, Вып.5. – С. 441-447.
16. Кузикова И.А., Сухаревич В.И., Шенин Ю.Д., Медведева Н.Г. Биологические свойства и идентификация полиенового противогрибкового антибиотика, перспективного для защиты от микоповреждений // Известия РАН. Серия биологическая. – 2010. – №2. – С. 238-247.

Поступила в редакцию журнала 28.06.2013

Рецензент: Н.П. Елинов



MUCOR SPP. И ЕГО АССОЦИАНТЫ – ASPERGILLUS SPP. И CANDIDA SPP. ПРИ ДИССЕМИНИРОВАННОМ МИКОЗЕ У ПАЦИЕНТА С ЛЕЙКОЗОМ

¹Иоакимова К.Г. (с.н.с.)*, ¹Степанова А.А. (зав. лаб.), ¹Богомолова Т.С. (зав. лаб.), ²Хостелиди С.Н. (ассистент кафедры), ³Шапочник А.П. (зав. отд.), ¹Босак И.А. (врач-лабораторный миколог), ²Климко Н.Н. (зав. кафедрой)

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова: ¹НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина и ²кафедра клинической микологии, иммунологии и аллергологии, Санкт-Петербург; ³Оренбургский областной клинический онкологический диспансер, Детский онкологический центр, Оренбург, Россия

©Коллектив авторов, 2013

Приведены данные об особенностях смешанной микотической инфекции у пациента с острым лимфобластным лейкозом. Ведущим поражающим фактором был мукор, ассоциированный с Aspergillus spp. и Candida spp. Для мукороза характерным было наличие множественных микотических эмболов в кровеносных сосудах, прорастание и разрушение их стенок, множественные кровоизлияния. Аспергилл находили только в легких, а кандиды в легких и сердце.

Ключевые слова: Aspergillus spp., диссеминированный мукороз, Candida spp., острый лимфобластный лейкоз, световая микроскопия

MUCOR SPP. AND ITS ASSOCIANTS – ASPERGILLUS SPP. AND CANDIDA SPP. AT DISSEMINATED MYCOSIS IN PATIENT WITH LEUKOSIS

¹Ioakimova K.G. (senior scientific collaborator), ¹Stepanova A.A. (head of the laboratory), ¹Bogomolova T.S. (head of the laboratory), ²Khostelidi S.N. (assistant of the chair), ³Shapochnik A.P. (head of the department), ¹Bosac I.A. (physician - laboratory mycologist), ¹Klimko N.N. (head of the chair)

* Контактное лицо: Иоакимова Карина Георговна, Тел.: (812) 559-95-52

I.I. Metchnikov North-Western State Medical University: ¹ Kashkin Research Institute of Medical Mycology and ²Chair of Clinical Mycology, Immunology and Allergology, St. Petersburg; ³Orenburg Regional Clinical Oncological Dispensary, Children's Oncological Center, Orenburg, Russia

©Collective of authors, 2013

The data about the mixed mycotic infection features at the acute lymphoblastic leukemia patient was presented. Leading affected factor was Mucor spp., associated with Aspergillus spp. and Candida spp. For mycoromycosis existence multiple mycotic embols in vessels, germination and destruction of vessels walls, multiple hemorrhages was typical. Aspergillus was found only in lungs, but Candida in lungs and heart.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, Aspergillus spp., Candida spp., disseminated mucorosis, light microscopy, lymphoblastic leucosis

ВВЕДЕНИЕ

Инвазивный мукороз у больных с лейкозом за последние годы стал более частым осложнением, приводящим к высокой летальности [1-4]. Его основным патоморфологическим признаком является наличие обширного инвазивного процесса с повреждением кровеносных сосудов, тромбозом и некрозом в окружающих тканях. Различают риноцеребральную, легочную, кожную, гастроинтестинальную и диссеминированную формы мукороза [1, 3, 4]. Морфологические описания поражения тканей мукороза совместны с другими грибами в литературе редки [5, 6 и др.].

Цель настоящего исследования – изучить у умершего больного с острым лимфобластным лейкозом: 1) характер тканевого поражения; 2) наличие патогенных грибов и их морфологические особенности.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследовали гистологические препараты аутопсийного материала от умершего больного Л. (19 лет) с острым лимфобластным лейкозом, осложнившимся микотической инфекцией. Срезы тканей различных органов окрашивали гематоксилином-эозином (ГЭ), реактивом Шиффа (PAS-реакция) и по Гомори-Грокотту (ГГ), а затем изучали в световом микроскопе Leica DMR. Измерения диаметра клеток грибов проводили на 30-35 медианных срезах при увеличении x400. Средние значения показателей и стандартные отклонения вычисляли с помощью программы Microsoft Office Excel 2007.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В описываемом случае в легких наблюдали наиболее старые очаги поражения, которые характеризовались некрозом стенок бронхов и альвеол с образованием полостей с редкими скоплениями в этих участках грибов, по морфологии отнесенным к мукомам. Профили гиф одиночные (Рис. 1 а, стрелка), широкие (от 3 до 6 мкм), прямые или слабо извилистые, с ветвлением под прямым углом, лишены регулярных септ, со слабо контрастными клеточными стенками после окраски ГЭ, что свидетельствовало о том, что они лишены «живого» содержимого.

Экссудат характеризовался большим количеством нитей фибрина и клеточными элементами: макрофагами, в том числе – гемосидерофагами, эозинофилами, лимфоцитами, плазмоцитами, эритроцитами. В сосудах разных калибров выявили обильные скопления сильно смятых профилей слабо контрастных ги́ф без септ (Рис. 2 б, стрелка).

В более «свежих» очагах поражения ткани легко (окраска ГЭ, PAS-реакция) обнаружили ги́фы двух типов: 1) широкие (Рис. 1 в, стрелки, табл. 1), рыхло и хаотично расположенные, без септ, ветвящиеся под прямым или тупыми углами, с темно-синими клеточными стенками и светло-розовым содержимым; 2) узкие, густо и радиально (Рис. 1 г, д, стрелки) ориентированные септированные ги́фы, ветвящиеся под острым углом. Судя по морфологии, широкие ги́фы принадлежали муко́ру, тогда как узкие, предположительно – *Aspergillus* spp. Узкие ги́фы, после окраски гематоксилином-эозином, имели клеточные стенки темно-фиолетового цвета, а также светлое содержимое отмерших клеток и светло-фиолетовое – интактных. Наблюдала концентрацию большого количества нейтрофилов вблизи интактных ги́ф мицелия (Рис. 1 д). В просветах мелких (23-69 мкм, Рис. 1 е, стрелка) кровеносных сосудов – скопления узких (4,02±0,38 мкм) ги́ф, тогда как крупных (от 154 до 300 мкм) – широких (в среднем, 5,60±0,39 мкм, Рис. 1 ж, стрелки).

Таблица 1

Средние значения диаметра (мкм) широких (муко́р) и узких (аспергилл) ги́ф в ткани органов и кровеносных сосудах (среднее значение ± стандартное отклонение)

Орган	Диаметр			
	широких ги́ф в органах	широких ги́ф в кровен. сосудах	узких ги́ф в органах	узких ги́ф в кровен. сосудах
Легкие	5,80±0,33	5,60±0,39	4,40±0,27	4,02±0,38
Сердце	4,85±0,59	Отсутствовали	Отсутствовали	Отсутствовали
Селезенка	9,24±0,80	Отсутствовали	Отсутствовали	Отсутствовали
Желудок	4,92±0,49	7,12±0,35	Отсутствовали	Отсутствовали
Тонкая кишка	7,60±0,48	5,64±0,46	Отсутствовали	Отсутствовали
Толстая кишка	7,75±0,68	6,53±0,49	Отсутствовали	Отсутствовали
Аппендикс	8,66±0,42	6,42±0,59	Отсутствовали	Отсутствовали
Брыжейка тонкой кишки	6,56±0,66	Отсутствовали	Отсутствовали	Отсутствовали

В сосудах разных калибров таких участков легких также выявляли ги́фы грибов: 1) редкие профили сильно смятых грибных ги́ф с слабо контрастными клеточными стенками; 2) умеренные количества хаотично и рыхло расположенных профилей светлых слабо контрастных ги́ф (от 4 до 6 мкм) и скопления фибриллярного материала; 3) обильные скопления остатков некогда живых ги́ф в виде сильно смятых, бесформенных, слабо контрастных, бесцветных клеточных стенок; 4) широкие (в среднем, 5,80±0,33 мкм), рыхло и параллельно расположенные относительно друг друга, без септ, ветвящиеся под прямым или тупым углами, с темно-синими клеточными стенками и светло-розовым содержимым (Рис. 1 ж, стрелки). Стенка кровеносных сосудов (диаметром от 427 до 980 мкм) могла быть частично или полно-

стью разрушенной. При использовании PAS-реакции ги́фы в их содержимом окрашивались плохо.

Здесь также наблюдали (окраска Г-Э, PAS-реакция) скопления (129,8x250,9 мкм, Рис. 1 з, табл. 2) клеток псевдомицелия (в среднем, 5,33±0,30 мкм), хламидоспор (в среднем, 12,6±0,42 мкм) и бластоконоидий (6,33±0,87 мкм, 4,0-5,3x6,7-7,1 мкм), по морфологии сходные с *Candida* spp. В пределах скопления общая топография разных типов клеток гриба была аналогична, описанной для тканей легких. В скоплении довольно редкие профили ги́ф мицелия и бластоконоидий располагались в центре, тогда как хламидоспоры – по периферии. Значительная часть клеток псевдомицелия и хламидоспор были сильно деформированными либо частично разрушенными.

Таблица 2

Средние значения диаметра (мкм) ги́ф псевдомицелия, хламидоспор и бластоконоидий *Candida* spp. в тканях легких, сердца и бластоконоидий в брыжейке тонкой кишки

Тип органа	Диаметр		
	ги́ф псевдомицелия	хламидоспор	бластоконоидий
Легкое	5,33±0,30	12,6±1,11	6,33±0,87
Сердце	4,73±0,29	9,9±0,42	4,08±0,52

Распространение муко́ра происходило, прежде всего, гематогенным путем, морфологически также были выявлены поражения в сердце, селезенке, печени, почках, желудке, тонкой и толстой кишках, аппендиксе, а также в брыжейке тонкой кишки.

В сердце и селезенке были обнаружены некрозы с аналогичным в легких характером ги́ф, клеточные стенки которых окрашивались в светло-голубой цвет, а содержимое – в бледно-розовый. По периферии некрозов определяли умеренно выраженный инфилтрат из макрофагов, плазмоцитов, лимфоцитов, эозинофилов, эритроцитов, стенки кровеносных сосудов в очагах, как правило, были разрушены. В селезенке очаги воспаления располагались субкапсулярно.

В ткани сердца одиночные профили ги́ф отсутствовали. Наблюдала обширные скопления грибов, предположительно, двух видов. Были выявлены линзовидной (62-150x247-327 мкм) формы скопления (Рис. 1 и, стрелка) из плотно и хаотично ориентированных широких (4,85±0,59 мкм) ги́ф несептированного мицелия, клеточные стенки которых окрашивались в светло-голубой цвет, а содержимое было бледно-оксифильным (окраска ГЭ). Характерным было ветвление латеральных ги́ф под прямым либо острым углом.

Помимо выше описанных форм гриба, отмечали очаги микотической инфекции (Рис. 1 к), вызванные присутствием другого вида гриба, предположительно – *Candida* spp. При окраске PAS-методом в таких скоплениях обнаружили скопления ги́ф псевдомицелия (4,73±0,29 мкм), эллипсоидных бластоконоидий (в среднем, 2,9-4,3x3,3-5,1 мкм) и терминальных толстостенных хламидоспор сферической формы (9,9±0,42 мкм). В целом, зоны локализации грибных

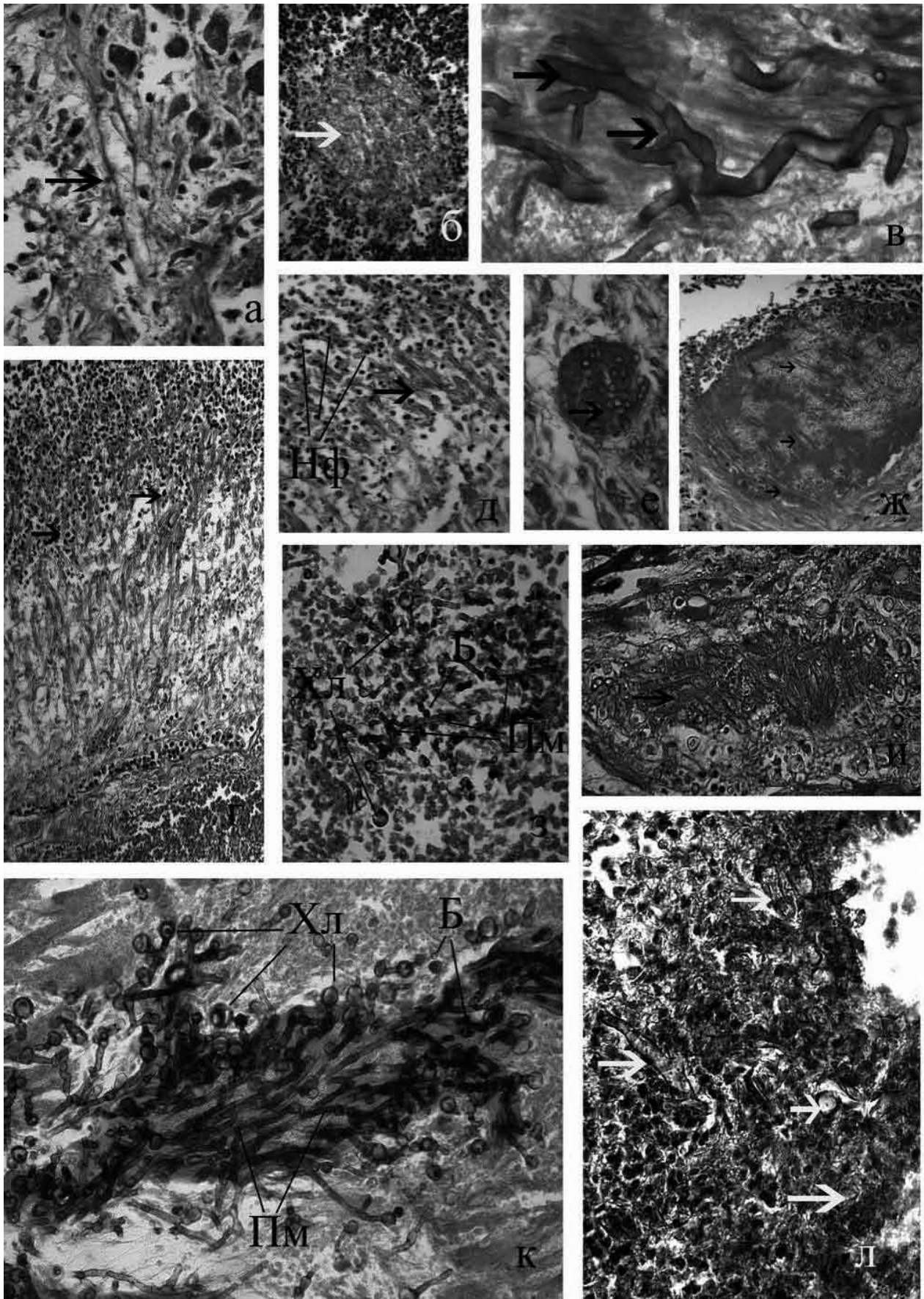


Рис. 1. Морфологические особенности строения разных типов клеток патогенных грибов в тканях легких (а-з), сердца (и, к) и селезенки (л). а-г, л – окраска гематоксилином-эозином; з,к – окраска по Гомори-Грокотт. Ув.: а, в – х1000; б, г, е, ж, з, и – х400, г – х500; д – х600; к-х800. Условные обозначения: Б – бластоконидии, Нф – нейтрофилы, Пм – псевдомицелий, Хл – хламидоспоры

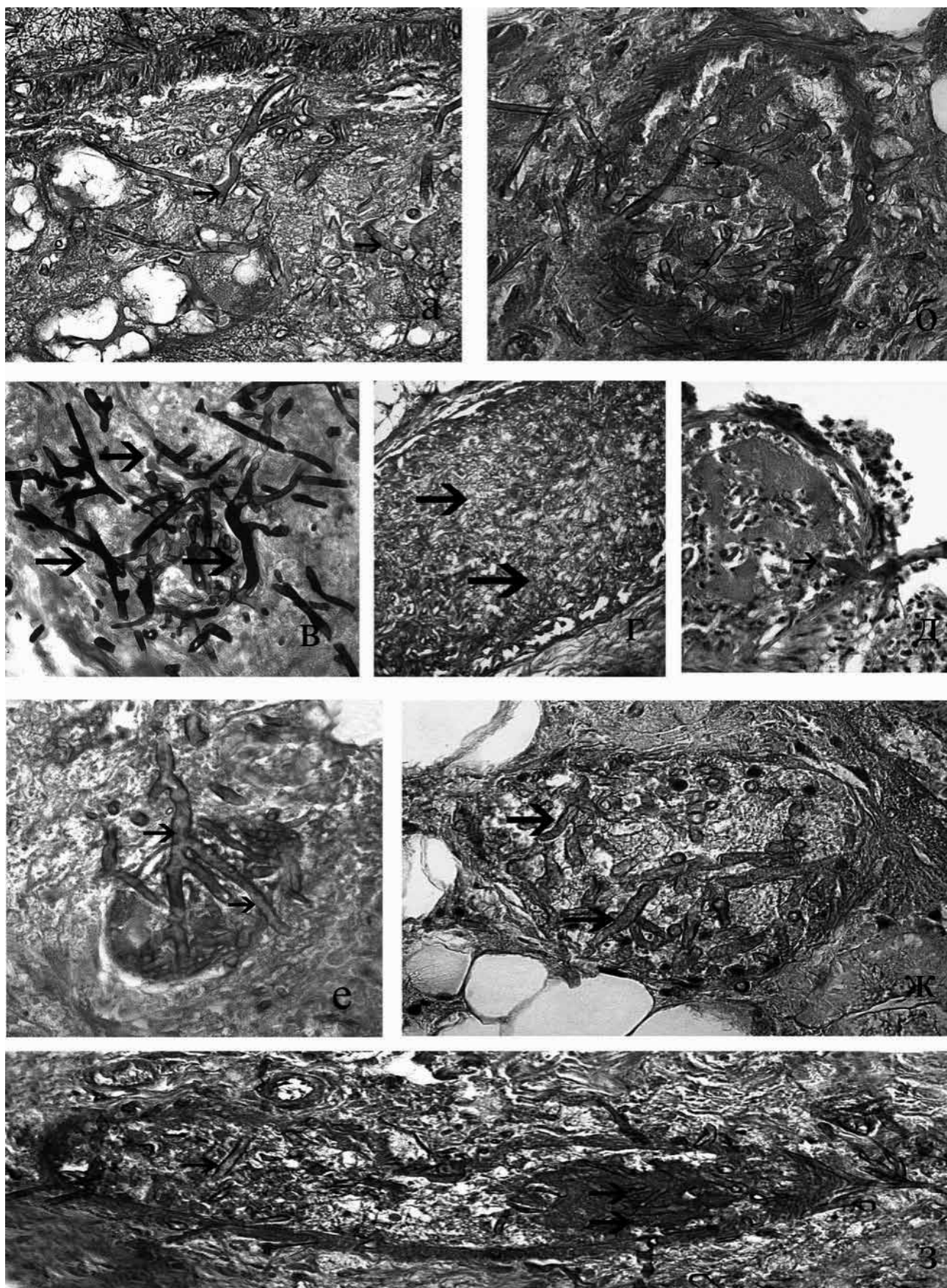


Рис. 2. Строение клеток патогенных грибов в тканях желудка (а, б), тонкой (в, г) и толстой кишки (д, е). а, б, г - ж - окраска гематоксилином-эозином, в - окраска по Гомори-Грокотт, з - окраска PAS-методом. Ув.: а, в - х600, б, д, е, ж - х800, г - х400, з - х500

элементов имели эллипсоидную форму (86-225x258-2199 мкм) и были погружены в гомогенный внеклеточный матрикс малинового цвета. Гифы мицелия формировали умеренно развитые плотные скопления, в пределах которых они располагались параллельно относительно друг друга (Рис. 1 к). Одиночные бластоконоидии в умеренном числе, находились, главным образом, вблизи гиф мицелия. Хламидоспоры обильные, одиночные, в основном расположены по периферии гиф псевдомицелия и бластоконоидий. Часто имели место картины формирования ростковых трубок бластоконоидиями и прорастания хламидоспор. В прилежащей к скоплениям клеток гриба ткани определяли некроз и инфильтрат (плазмоциты, лимфоциты, макрофаги).

В ткани селезенки редко выявляли немногочисленные и рыхло расположенные скопления из одиночных (Рис. 1 л, стрелки) или собранных по 2-3 профиля широких ($9,24 \pm 0,80$ мкм) гиф без септ, ветвящихся под прямым углом. Они имели темно-синие клеточные стенки и базофильное содержимое после окраски ГЭ.

В **печени** и **почках** (окраска ГЭ) очаги инфекции представляли собой неспецифические гранулемы, состоящие из плазмоцитов, лимфоцитов, макрофагов, с некрозом в центре; элементы грибов не обнаружили.

В ткани **желудка** (окраска ГЭ) наблюдали округлой формы (от 190 до 225 мкм) скопления широких гиф без септ, которые по диаметру (в среднем, $4,92 \pm 0,49$ мкм) и особенностям строения были сходны с аналогичными, описанными выше для тканей других органов. В основном, гифы располагались разреженно (Рис. 2 а, стрелки), хаотично, часто ветвились под углом 90° ; плотность их расположения была намного выше, чем в ткани селезенки. Стенка мелких (56-80 мкм) кровеносных сосудов была разрушена; в их светлом просвете видны редкие профили одиночных прямых либо изогнутых широких ($7,12 \pm 0,35$ мкм) гиф без септ, имеющих темно-синие латеральные клеточные стенки и бледно-розовое содержимое, а также скопления микрофибрилл. В содержимом более крупных кровеносных сосудов (240 мкм) скопления гиф имели сходную морфологию с таковыми в ткани, однако здесь они были более обильны (Рис. 2 б, стрелки) и снабжены темно-синими клеточными стенками и бледно-розовым содержимым. Отмечены профили гиф вблизи и в стенках собственно кровеносных сосудов.

В ткани **тонкой** (окраска ГЭ, Г-Г, Рис. 2 в, стрелки) и **толстой кишок** также выявили широкие гифы гриба (соответственно, $7,60 \pm 0,48$ и $7,75 \pm 0,68$ мкм). По толщине они превосходили аналогичные в ткани желудка и сходным образом были лишены септ, ветвились под прямым или острым углом. Плотность расположения гиф в ткани сопоставима с аналогичной плотностью в ткани желудка.

В тканях тонкой кишки (окраска ГЭ) редко наблюдали мелкие (50-80 мкм) кровеносные сосуды (1

группа) с небольшим количеством микрофибрилл, без гиф мицелия, с сильно видоизмененными стенками. Крайне редко имели место мелкие сосуды без грибных гиф (2 группа) и с сильно утолщенными гомогенными базофильными стенками. Содержимое более крупных (от 130 до 200 мкм) сосудов (3 группа) светлое, с небольшим числом микрофибрилл; концентрация гиф мицелия умеренная. Последние располагались плотно и были сильно искривлены. Клеточные стенки отличались слабым контрастом, содержимое гиф светлое или бледно-розовое. Внутри части крупных сосудов (от 150 до 300 мкм, 4 группа) содержимое светлое, концентрация грибных гиф и микрофибрилл умеренная. Для преобладающего числа гиф было характерно светлое отмершее содержимое и наличие слабо контрастных клеточных стенок. Содержимое другой части крупных сосудов (5 группа) полностью заполнено хаотично и плотно расположенными гифами ($5,64 \pm 0,46$ мкм) мицелия (Рис. 2 г, стрелки).

В толстой кишке (окраска ГЭ) обнаружили просветы мелких (30-60 мкм) и среднего диаметра (120-200 мкм) кровеносных сосудов, которые по особенностям строения и строения грибных элементов были сходны, соответственно, с таковыми 1 и 3 групп тонкой кишки. Средние значения гиф в сосудах толстой кишки составляли 6,53 мкм. Наблюдали картины проникновения одиночного (Рис. 2 д, стрелка) и вставания большого числа апексов сильно ветвящейся по типу «куриной лапки» гифы мукора в крупные сосуды (Рис. 2 е, стрелки).

В **аппендиксе** (окраска ГЭ) установили присутствие одного микотического агента в виде широких гиф мицелия, описанных выше для тканей других органов. Средние значения ширины гиф в ткани составляли $8,66 \pm 0,42$ мкм. Плотность расположения гиф в тканях аппендикса при *adorulus* была сопоставима с таковой в других органах желудочно-кишечного тракта. В просветах мелких кровеносных сосудов диаметром от 25 до 40 мкм – редкие профили отмерших гиф. В крупных сосудах (от 70 до 206 мкм, рис. 2 ж, стрелки) гифы на 50% заполняли их просвет: они были распределены довольно равномерно, имели темно-синие клеточные стенки и содержимое, окрашенное в розовый цвет. На редко встречающихся продольных срезах крупных сосудов (диаметр – от 500 до 600 мкм) наглядно видно, что на разных его уровнях состояние гиф гриба различно: зоны отмерших гиф со светлым содержимым и часто смятыми, слабо контрастными клеточными стенками (Рис. 2 з, стрелка слева) перемежаются с зонами локализации интактных гиф с базофильным содержимым, цилиндрической формы, с темно-синими клеточными стенками (Рис. 2 з, две стрелки справа), погруженных в гомогенный внеклеточный матрикс темно-розового цвета.

В **брыжейке тонкой кишки** (окраска Г-Э, ГГ) гифы ($6,56 \pm 0,66$ мкм) выявляли, прежде всего, в кровеносных сосудах разных калибров, по морфологии

они соответствовали таковым мукора с живым содержанием. Наблюдали картины проникновения одноклеточного и вставания большого числа апексов сильно ветвящейся (по типу «куриной лапки») гифы в крупные сосуды. Отсюда распространение происходило в стенку тонкой кишки вплоть до подслизистого слоя, в слизистом слое гифы не обнаруживали. Аналогичная картина имела место в желудке, толстой кишке и аппендиксе, что свидетельствовало, прежде всего, о гематогенном характере распространения микотической инфекции. Ткани брыжейки, стенок кишечника и желудка до подслизистого слоя были некротизированы, часто имбибированы эритроцитами с примесью отдельных плазмочитов и лимфоцитов; слизистый слой был сохранен. На границе с непораженной частью органа отметили обилие нейтрофилов, плазмочитов, лимфоцитов и макрофагов. Гифы выявляли в большом количестве, и плотность их расположения была намного выше, чем в селезенке и миокарде. Воспалительный инфильтрат был очень слабо выражен и состоял из отдельных лимфоцитов, плазмочитов и макрофагов.

В результате проведенного исследования показано, что при изучении микст-микозов желательны морфометрические исследования, которые облегчают анализ биологического разнообразия тканевых форм грибов. Данные таблицы 1, где представлены средние значения диаметра гиф мукора в разных органах пациента, показано (если допустить, что речь идет об одном, а не нескольких видах мукора), что в тканях селезенки и аппендикса они достигают максимальных значений, тогда как в тканях сердца, желудка и легких – минимальных. В тканях тонкой и толстой кишок эти значения были практически идентичными и промежуточными в сравнении с двумя описанными выше примерами. В легких значения диаметра интактных гиф мукора в содержимом сосудов практически не различались с таковыми в ткани. В кровеносных сосудах тонкой и толстой кишок, а также аппендикса значения диаметра гиф были несколько ниже, чем в ткани. Из всех изученных органов пациента только в сосудах желудка значения диаметра гиф заметно превышали аналогичные показатели в ткани. Иными словами, судя по морфометрическим данным, в тканях селезенки и аппендикса условия для «обитания» мукора «наиболее благоприятны», о чем свидетельствуют более широкие гифы гриба.

Заметим, что показатели диаметра узких гиф аспергиллов в кровеносных сосудах и в ткани практически не различались, что было отмечено нами и для мукора.

При анализе средних значений диаметра клеток псевдомицелия, хламидоспор и бластоконидий (табл. 2), а также диаметра гиф мукора, выявленных в ткани легких и сердца, можно думать о том, что в тканях первого они достигают больших размеров, и это, вероятно, можно объяснить лучшими условиями питания и аэрации в них. Однако в тканях легкого значительная часть клеток псевдомицелия и хламидоспор были сильно деформированными либо частично разрушенными. Иными словами, судя по частоте встречаемости, морфологии и степени развития клеточных элементов, выявленный микотический агент, предположительно *Candida* spp., в ткани сердца находился в намного более активном состоянии, чем в легких.

В работе Scheld W.M. с соавторами (1979) на примере пациента, страдающего лейкемией, показано присутствие в тканях легких двух микотических агентов – *Rhizopus* spp. и *Aspergillus fumigatus*. Описан также случай мукороза в сочетании с *Aspergillus fumigatus* у пациента, страдающего сахарным диабетом [6].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В описываемом нами случае ведущим поражающим фактором был мукор, ассоциированный с *Aspergillus* spp. и *Candida* spp. Распространение *Mucor* spp. и *Candida* spp. происходило гематогенным путем. Для мукороза характерным было наличие множественных микотических эмболов в сосудах, прорастание и разрушение стенок кровеносных сосудов, множественные кровоизлияния. Аспергилл находили только в легких, несмотря на скопления аналогичных по морфологии гиф в мелких сосудах. В других внутренних органах их не обнаружили. Скорее всего, инфицирование органов *Candida* spp. и *Aspergillus* spp. вторично и имело место на фоне имевшегося мукороза. Особенностью последнего являлось массивное поражение желудочно-кишечного тракта с обилием возбудителя, некрозом и выраженной отграничительной реакцией на границе с непораженной частью органа.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Елинов Н.П. Низшие микромицеты и вызываемые ими микозы – беспокойная проблема будущего // Материалы 3-го Всеросс. конгресса по мед. микологии. – М., 2005. – Т. VI. – С. 44-46.
2. Колбин А.С., Бойченко Э.Г., Попов С.Д. и др. Генерализованный зигомикоз у ребенка с лейкозом // Материалы 3-го Всеросс. Конгресса по мед. микологии. – М., 2005. – С. 91-93.
3. Клишко Н.Н. Диагностика и лечение оппортунистических микозов. – СПб., 2008. – 197 с.
4. Хостелиди С.Н. Главное о зигомикозе (обзор) // Проблемы медицинской микологии. – 2006. – Vol. 8, №4. – С. 8-18.
5. Stelzmueller L, Lass-Floerl C., Geltner Ch., et al. Zygomycosis and other rare filamentous fungal infections in solid organ transplant recipients // Transplant. Inter-national. – 2008. – Vol. 21. – P. 534-546.
6. Walsh T.J., Gamaletou M.N., McGinnis M.R., et al. Early clinical and laboratory diagnosis of invasive pulmonary, extrapulmonary, and disseminated mucormycosis (zygomycosis) // Clin. Infect. Dis. – 2012. – Vol. 54, Suppl. 1. – P. 55-60.

Поступила в редакцию журнала:

Рецензент: Ю.А. Криволапов

К 85-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ НИКОЛАЯ ПЕТРОВИЧА ЕЛИНОВА

TO 85 YEARS SINCE BIRTHDAY OF NIKOLAI PYETROVICH YELINOV



В журнале «Проблемы медицинской микологии» (2008. – Т.10, №3.– С. 36-37) коллектив сотрудников НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина отметил 80-летие Николая Петровича и всё позитивное, содеянное им в СПб МАПО. К тому времени ему было присвоено звание «Почётного доктора Санкт-Петербургской медицинской академии последипломного образования Росздрава»; за значительный вклад в деятельность Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов и в знак признания его заслуг в области профилактической медицины проф. Н.П. Елинов награждён в 2008 г. дипломом и медалью почётного члена, а за выдающиеся заслуги и большой вклад в развитие отечественной науки и образования государства Российского награждён дипломом лауреата премии им. М.В. Ломоносова с вручением ему золотой медали.

Будучи педагогом с 66-летним стажем, он и сегодня выполняет свою роль учителя для студентов и слушателей в СЗГМУ им. И.И. Мечникова; под его руководством подготовили и защитили кандидатские диссертации свыше 50 человек аспирантов и соискателей, а также при его консультативной помощи 14 человек стали докторами наук, и теперь он продолжает подготовку научных кадров для России.

Проф. Н.П. Елинов – автор многих публикаций (статей, учебных пособий, монографий). Можно назвать такие его работы, изданные в течение последних 5 лет (то есть после его 80-летия в 2008 г.):

1) «Микроорганизмы – контаминанты и патогены – индукторы процессов старения больничных зданий и помещений медицинского назначения, а также возбудители некоторых заболеваний людей» (учебное пособие). Соавтор – Н.В. Васильева. Под ред. проф. Н.П. Елинова. – СПб., 2009. – 224 с.;

2) «Краткий микологический словарь» (для врачей и биологов). Издание второе, исправленное и дополненное. – СПб., 2009. – 190 с.;

3) «Дерматомицеты» (Лекция). Автор – з.д.н. РФ, проф. Н.П. Елинов. – СПб., 2010. – 48 с.;

4) «*Candida*. Кандидозы. Лабораторная диагностика». Авторы: Елинов Н.П., Васильева Н.В., Степанова А.А., Чилина Г.А. Под ред. з.д.н. РФ, проф. Н.П. Елинова. – СПб., 2010. – 224 с.;

5) «Патогенные и условно-патогенные макро- и микромицеты как объекты царства грибов (*Fungi*), их характеристика с учётом требований международного кодекса ботанической номенклатуры». Авторы: Елинов Н.П., Васильева Н.В., Маметьева А.А., Николенко М.В., Озерская С.М. Под ред. з.д.н. РФ, проф. Елинова Н.П. Выпуск I. Учебное пособие. – СПб., 2011. – 64 с.;

6) «Энтомофторамицеты» (лекция – учебное пособие). Автор – з.д.н. РФ, проф. Н.П. Елинов. – СПб., 2012. – 20 с.;

7) «Краткий атлас медицински значимых микромицетов рода *Candida*». Под ред. з.д.н. РФ, проф. Н.П. Елинова. Учебное пособие. Авторы: Н.П. Елинов, Н.В. Васильева, А.А. Степанова, И.А. Босак, Г.А. Чилина. – СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2013. – 76 с.

Ныне подготовлено к изданию учебно-методическое пособие «Роль патогенных и условно-патогенных грибов в жизни человека». Выпуск II. Авторы: Юцковский А.Д., Васильева Н.В., Кулагина Л.М., Богомолова Т.С., Киселёва В.С. Под ред. з.д.н. РФ, проф. Елинова Н.П. – СПб., 2013. – 190 с.

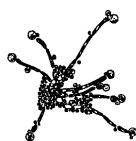
Находится в стадии подготовки к изданию учебное пособие «Рациональная научно-практическая терминология патогенных и условно-патогенных грибов и вызываемых ими заболеваний». Выпуск III. Авторы: Елинов Н.П., Васильева Н.В., Озерская С.М., Рауш Е.А., Доршакова Е.В. Под ред. з.д.н. РФ, проф. Елинова Н.П., 2013.

Следует подчеркнуть, что проф. Н.П. Елинов инициирует выпуски учебной и учебно-методической литературы (изданной и подготавливаемой к изданию) и как председатель Российской комиссии по номенклатуре патогенных и условно-патогенных грибов (РКНПУПГ) при научно-методическом микологическом центре МЗ РФ при НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина.

В феврале месяце 2012 г. проф. Н.П. Елинов подал заявление ректору СЗГМУ им. И.И. Мечникова

проф. О.Г. Хурцилава с просьбой освободить его по состоянию здоровья от обязанности зам. директора по научной работе в НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина. Заявление было удовлетворено, и теперь Николай Петрович – профессор кафедры медицинской микробиологии на $\frac{1}{2}$ ставки профессора, и занят преимущественно лекционными курсами со слушателями и студентами, и как главный редактор журнала «Проблемы медицинской микологии» – постоянной редакционной работой.

Коллектив нашего института поздравляет Юбилера со знаменательной датой и желает ему хорошего здоровья на многие лета (остальное приложится само собой)!!!



ПАМЯТИ ПРОФЕССОРА ВАСИЛИЯ МИХАЙЛОВИЧА ЛЕЩЕНКО

TO THE MEMORY OF PROFESSOR VASYLIY MIKHAILOVICH LESCHENKO



14 мая 2013 г. на 90 году жизни скончался доктор медицинских наук, профессор Василий Михайлович Лещенко.

Василий Михайлович – участник Великой Отечественной войны, защитник блокадного Ленинграда, полковник медицинской службы, кавалер 30 различных наград. Окончив в 1946 году Ленинградскую военно-медицинскую академию, до 1964 года он продолжал службу в Вооруженных силах на лечебной и административной должностях. После окончания адъюнктуры на кафедре кожных и венерических болезней Академии в 1958 году и защиты кандидатской диссертации, он работал заведующим отделом и ученым секретарем Ленинградского НИИ антибиотиков, в котором под руководством з.д.н. профессора Кашкина П.Н. освоил основы этиологии, эпидемиологии и противоэпидемических мероприятий при глубоких микозах. По рекомендации П.Н. Кашкина в 1967 году В.М. Лещенко был приглашен на работу в Центральный научно-исследовательский кожно-

венерологический институт, в котором в течение 25 лет он последовательно занимал должности заведующего отделом глубоких микозов, затем – отдела микологии, заместителя директора Института по науке. В 1970 году Василий Михайлович Лещенко защитил докторскую диссертацию по теме «Аспергиллез». В 1972 году ему было присвоено звание профессора.

Василий Михайлович широко известен в нашей стране и за рубежом как эрудированный клиницист и экспериментатор. Он – автор 500 научных трудов, в том числе 5 монографий – разделов и глав в руководствах, справочниках, атласах, статей в медицинских энциклопедиях, а также двадцати авторских свидетельств и патентов на изобретения, инструкций и методических рекомендаций в области медицинской микологии. Основными направлениями его исследований были эпидемиология, иммунология, диагностика и терапия дерматомикозов, кандидоза и глубоких микозов. Большое внимание он уделял подготовке научных кадров микологов для Российской Федерации, стран СНГ и дальнего зарубежья. При его консультации и научном руководстве выполнено и защищено 50 докторских и кандидатских диссертаций. Василий Михайлович Лещенко неоднократно представлял отечественную микологию на зарубежных Конгрессах.

Василий Михайлович – академик Международной Академии Информации (МАИ), лауреат премии мэрии г. Москвы и Густава Рилья, состоял вице-президентом общественной организации «Национальная Академия микологии» (с момента ее возникновения в 2002 г.). В.М. Лещенко был в составе редакционных советов журналов «Дерматология, косметология, сексопатология» (г. Днепропетровск, Украина), «Проблемы медицинской микологии» (Санкт-Петербург, РФ), «Российский журнал кожных и венерических болезней» (г. Москва, РФ).

Учитывая заслуги в области отечественной медицинской микологии, руководство Холдинга «Отечественные лекарства», Санкт-Петербургской медицинской академии последипломного образования и НИИ медицинской микологии им. П.Н.Кашкина в 2006 году присудили Василию Михайловичу ежегодную премию «За выдающиеся заслуги в области отечественной медицинской микологии».

В связи с кончиной замечательного ученого, члены редколлегии и научно-редакционного совета нашего журнала, друзья и коллеги выражают искренние соболезнования родным и близким Василия Михайловича Лещенко.



ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ В ЖУРНАЛ «ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ»

Журнал «Проблемы медицинской микологии» нацелен на публикацию оригинальных, ранее не опубликованных в других изданиях в России или за рубежом, статей, научных обзоров, дискуссий, рецензий на книги, методических разработок, хроники и информации. Предварительные сообщения не принимаются. Статьи необходимо сопровождать направлением от учреждения (-й), в котором (-ых) выполнена работа.

Каждый автор может представить не более 2-х статей в один номер журнала.

Статьи представляются на русском языке с обязательным расширенным резюме на английском языке объемом не более 20 строк. Можно представлять статьи на английском языке с рефератом на русском языке в объеме до 20 строк.

Статьи представляются в редакцию по почте с приложением диска (с распечаткой текста на бумаге в 2-х экземплярах) или по электронной почте (mycobiota@szgmu.ru), подготовленными в текстовом редакторе Win Word. Статьи должны быть напечатаны шрифтом № 12 через 1,5 интервала. Все страницы должны быть пронумерованы.

Размер рукописей не должен превышать 12 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы, фотографии и подписи к ним, список цитированной литературы, представляемые на отдельных листах. Количество иллюстраций не должно превышать двух страниц при их плотном размещении друг к другу.

Рукопись статьи подписывается автором (соавторами), на отдельной странице написать ф.и.о. (полностью) одного из авторов, его должность, адрес электронной почты (для связи) и номер телефона.

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ:

Сначала пишется **название статьи** заглавными буквами (шрифт 12 – жирный). Затем через 2 интервала указываются **фамилии авторов, инициалы и должности** (шрифт 12 – жирный). Далее через 2 интервала пишется **название учреждения**, в котором выполнена работа. Затем через 2 интервала печатать **резюме на русском языке** (без написания слова «резюме»). Через 2 интервала указать до 7 **ключевых слов**. Затем через 2 интервала (шрифт – 12) пишется **заголовок на английском языке, фамилии, инициалы и должности автора (-ов), резюме** (без написания слов «abstract, summary») **и ключевые слова** (не более 7).

Затем через 3 интервала и с красной строки печатать **текст статьи** в следующем порядке: краткое

введение, материалы и методы, результаты и их обсуждение, выводы, цитированная литература.

Латинские названия грибов необходимо писать курсивом; если в заголовке названы род и вид гриба, то после него следует указывать автора, впервые писавшего вид (например, *Aspergillus fumigatus* Fres.); в тексте такая форма уже не повторяется и при повторном упоминании гриба название рода сокращают до первой буквы (например, при первом написании в тексте *Aspergillus fumigatus*, при повторениях - *A. fumigatus*).

Автор (-ы) вида должен (-ны) быть указан (-ы) не только в заголовке к статье, но и при первом упоминании в тексте (если нет этого в заголовке) и в возможном списке видов. В подписях к рисункам и в надписях к таблицам полные названия рода и вида приводятся один раз.

Названия учреждений при первом упоминании в тексте даются полностью, и сразу же в скобках приводят их принятые сокращения, которыми пользуются в последующем тексте статьи, например, Санкт-Петербургская медицинская академия последипломного образования (ГОУ ДПО СПб МАПО), Московская государственная медицинская академия им. И.М. Сеченова (ММА им. Сеченова) и т.д.

Четко писать и различать О, о, и 0 (ноль), 1 и I (единицу и заглавную латинскую И), I и J, q и g, заглавные буквы О по-русски и Q по-английски. Подстрочные примечания должны иметь сквозную нумерацию по всей статье. Содержание таблиц не должно дублировать текст. Таблицы должны иметь порядковые номера, если их больше одной. Текст таблиц печатать через 2 интервала.

Все термины, употребляемые в статье, должны строго соответствовать действующим номенклатурам (анатомической, гистологической и т.д.), названия лекарственных средств - Государственной Фармакопее, единицы физических величин - международной системе единиц (СИ).

В тексте при ссылке на работу иностранных авторов их фамилии приводятся в русском написании и рядом в скобках - в оригинальном написании с указанием года опубликования работы, например: «Штайб (Staib, 1992) наблюдал...». Ссылки на работы располагать в хронологическом порядке годов опубликования работ.

Литература, упоминаемая в тексте (не должна быть старше 10 лет), приводится списком в конце статьи **в том порядке, в котором она цитирована в тексте работы**; соответствующие номера статей проставляются в тексте в квадратных скобках.

Рисунки (фото) должны иметь порядковые номера, на которые следует ссылаться в тексте статьи. Рисунки (фото) прилагаются в отдельном конверте (фотоснимки - в двух экземплярах) или в электронном виде. На микрофотографиях изображается масштаб, в подписях к ним необходимо указывать собственные увеличения объектива и окуляра, и, возможно, коэффициент усиления увеличения за счет допол-

нительных оптических приспособлений (например, для некоторых бинокулярных микроскопов х 1,5). На обороте рисунка указываются мягким карандашом без нажима фамилия автора, номер и желательное уменьшение рисунка (фото), верх рисунка.

Для статей, написанных на английском языке, литература, цитируемая в тексте и приводимая в списке, должна быть представлена в английском переводе, например: *Брондз Б.Д.* Т-Лимфоциты и их рецепторы в иммунологическом распознавании. – М.: Наука, 1987. – 472 с. *Brondz B.D.* T-Lymphocytes and their receptors in the immunological recognition. – Moscow: Science, 1987. – 472 p. (in Rus).

Оформление списка литературы.

Для книг указываются фамилии и инициалы авторов, название книги, место издания (город), издательство, год, общее количество страниц, например: *Беккер З.Э.* Физиология и биохимия грибов. – М.: Изд-во МГУ, 1988. – 216 с. Для статей, опубликованных в журналах, указываются фамилии и инициалы авторов, название статьи, название журнала, год, том, номер, первая и последняя страницы статьи, например: *Антонюк В. А.* Характеристика лектина из плодовых тел *Boletus luridus* Schff.ex, Fr. // Микология и фитопатология. – 1997. – Т. 31, Вып. 1. – С. 35-41.

Для статей, опубликованных в сборниках, указываются фамилии и инициалы авторов, название статьи, название сборника, место издания (город), издательство, год, первая и последняя страницы статьи, например: *Пармасто Э.* Жизненные формы высших

базиальных грибов // Проблемы изучения грибов и лишайников. – Таллинн: Изд-во АН ЭССР, 1965. – С. 64-68.

Для авторефератов диссертаций, например: *Аванесов С. Г.* Биологические основы отбора вирулентных штаммов энтомопатогенного гриба *Verticillium lecanii* Zimm: Автореф. дисс...канд. биол. наук. – Л., 1987. – 19 с.

Редакция оставляет за собой право сокращать статьи и вносить редакционные исправления.

В случае возвращения автору рукописи статьи на переработку дата ее поступления сохраняется в течение 4 месяцев. При отклонении работы статья не подлежит возвращению автору.

В конце статьи, принятой к публикации, приводится фамилия рецензента.

Частота выпуска журнала: 1 номер в квартал, 1 том в год.

Все статьи публикуются БЕСПЛАТНО.

По вопросам размещения рекламы обращаться по адресу редакции (см. ниже).

Вся корреспонденция направляется по адресу: 194291, Санкт-Петербург, ул. Сантьяго-де-Куба, 1/28, НИИ ММ им.П.Н.Кашкина СЗГМУ им. И.И. Мечникова.

Тел: (812) 303-51-45;

тел./факс: (812) 510-62-77

E-mail: mycobiota@szgmu.ru;

egukova@mail.ru

Заведующая редакцией: Гукова Елена Станиславовна

ВНИМАНИЮ АВТОРОВ СТАТЕЙ!

Направляя статью для размещения в журнале ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И.Мечникова» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (далее – Университет) «Проблемы медицинской микологии» автор статьи предоставляет Академии право использовать статью в любой форме и любым способом, предусмотренными п. 2 ст. 1270 Гражданского Кодекса Российской Федерации, в том числе: воспроизведение статьи; распространение статьи путем продажи или иного отчуждения его оригинала или экземпляров; сообщение в эфир; сообщение по кабелю; перевод или другая переработка статьи; доведение статьи до всеобщего сведения; передача права использования статьи третьим лицам (сублицензионный договор); извлечение и обработка метаданных статьи.

«Направляя статью для размещения в журнале ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И.Мечникова» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (далее – Университет) «Проблемы медицинской микологии» я _____ (указать ФИО) предоставляю Университету право использовать мою статью _____ (название статьи) в любой форме и любым способом, указанным в «Правилах предоставления рукописей авторами» журнала «Проблемы медицинской микологии».

Сопроводительное письмо к статье должно быть написано и подписано собственноручно автором статьи.

Автор статьи гарантирует, что он является обладателем передаваемых Университету прав (правообладателем).

Территория, на которой допускается использование прав на статью, не ограничена.

Передача прав на статью осуществляется без выплаты автору статьи вознаграждения.

Университет вправе использовать статью в течение срока действия исключительного права правообладателя на статью.

Автор предоставляет Университету право обработки своих персональных данных.

В связи с вышеизложенным, редакционная коллегия журнала «Проблемы медицинской микологии» просит авторов, **вместе с сопроводительным письмом от организации, присылать бумагу с текстом следующего содержания:**

ЧАСТИЧНО ОБНОВЛЁННЫЙ СОСТАВ РОССИЙСКОЙ КОМИССИИ ПО НОМЕНКЛАТУРЕ ПАТОГЕННЫХ И УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ (РКНПУГ), УТВЕРЖДЁННЫЙ 21 ИЮНЯ 2013 ГОДА НА 16 КАШКИНСКИХ ЧТЕНИЯХ

1. **Богомолова Евгения Владимировна** – д.б.н., БИН РАН, Санкт-Петербург.

2. **Богомолова Татьяна Сергеевна** – к.б.н., зав. лаб. мониторинга и биологии грибов НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург.

3. **Васильев Олег Дмитриевич** – к.м.н., доцент кафедры медицинской микробиологии СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург.

4. **Васильева Наталья Всеволодовна** – д.б.н., профессор, заведующая кафедрой медицинской микробиологии, директор НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург.

5. **Голубев Владислав Иванович** – в.н.с., д.б.н.; ИБФМ, ВКМ, г.Пушино, Московская обл.

6. **Елинов Николай Петрович** – з.д.н. РФ, д.б.н., профессор кафедры медицинской микробиологии СЗГМУ им. И.И. Мечникова, главный редактор жур-

нала «Проблемы медицинской микологии», председатель РКНПУГ, Санкт-Петербург.

7. **Иванушкина Наталья Евгеньевна** – к.б.н., с.н.с. лаборатории мицелиальных грибов ИБФМ, ВКМ, г.Пушино, Московская обл.

8. **Климко Николай Николаевич** – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической микологии, аллергологии и иммунологии СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург.

9. **Коваленко Александр Евсеевич** – д.б.н., заместитель директора по научной работе БИН РАН, Санкт-Петербург.

10. **Лебедева Елена Валентиновна** – к.б.н., с.н.с. БИН РАН, Санкт-Петербург.

11. **Липницкий Анатолий Васильевич** – д.м.н., заместитель директора по научной работе ВНИПЧИ, г. Волгоград.

12. **Марфенина Ольга Евгеньевна** – д.б.н., профессор МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва.

13. **Мельник Вадим Александрович** – д.б.н., главный научный сотрудник БИН РАН, Санкт-Петербург.

14. **Николенко Марина Викторовна** – к.м.н., доцент кафедры ТГМУ, заместитель председателя РКНПУГ, г. Тюмень.

15. **Озерская Светлана Михайловна** – д.б.н., зав. лабораторией мицелиальных грибов ИБФМ, ВКМ, учёный секретарь РКНПУГ, г. Пушино, Московская обл.

16. **Чилина Галина Анастасьевна** – заведующая ВКПГ (Всероссийская коллекция патогенных грибов) в НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург.

17. **Юцковский Александр Дмитриевич** – д.м.н., проф., заведующий кафедрой дерматовенерологии с курсом косметологии ВГМУ, зам. председателя РКНПУГ, г. Владивосток.



Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (СЗГМУ)
Научно-исследовательский институт медицинской микологии им. П.Н.Кашкина (НИИ ММ) СЗГМУ им. И.И. Мечникова
Адрес редакции: 194291, Санкт-Петербург, ул. Сантьяго-де-Куба, 1/28. Тел.: (812) 303-51-45, факс (812) 510-62-77
E-mail: mycobiota@spbmapo.ru. Заведующая редакцией: Е.С.Гукова.

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov
Kashkin Research Institute of Medical Mycology
Address of Editorial Office: Santiago-de-Cuba str., 1/28, Saint Petersburg, 194291, RUSSIA. Tel.: (812) 303-51-45, Fax (812) 510-62-77
E-mail: mycobiota@spbmapo.ru. Manager of Editorial Office: E.S.Gukova

«ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ»
Reg. № 77-1396 от 20.12.1999 г. ISSN 1999-6780
Журнал включен в реферативный журнал и базы ВИНТИ.
Сведения о журнале ежегодно публикуются в международной системе по периодическим и продолжающимся изданиям «Ulrich's Periodicals Directory».

Оригинал-макет — НИИ «Медицинской микологии им. П. Н. Кашкина СЗГМУ».
Подписано в печать 01.11.2013. Формат 60×90 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Times. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 18.25. Тираж 999 экз.