

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

V.B. Antonov — M.D., prof. (Russia), 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), V.L. Bykov — M.D., prof. (Russia), B. Dupont — M.D. (France), O.G. Hurzilava — M.D. (Russia), V.I. Golubev — Ph.D. (Russia), K.P. Kashkin — M.D., academician of RAMS, prof. (Russia), Z.K. Kolb — M.D., (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., corr. memb. of RAMS, prof. (Russia), Iu.A. Medvedev — M.D., prof. (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), A.P. Scherbo — M.D., corr. memb. of RAMS, prof. (Russia), N.V. Shabashova — M.D., prof. (Russia), A.V. Sobolev — M.D., prof. (Russia), F. Staib — M.D. (Germany), 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. 11, № 3, 2009

Saint Petersburg Medical Academy
of Postgraduate Education
Kashkin Research Institute
of Medical Mycology (KRI MM)

ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

Том 11, № 3, 2009

Санкт-Петербургская медицинская академия
последипломного образования (СПб МАПО)
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

В.Б. Антонов — д.м.н., профессор (Россия),
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), В.Л. Быков —
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), З.К. Колб — к.м.н., (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., чл.-корр.
РАМН, профессор (Россия), Ю.А. Медведев —
д.м.н., профессор (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), Х.И. Титц —
доктор медицины (Германия), Т.Н. Трофимова —
д.м.н., профессор (Россия), О.Г. Хурцилава — д.м.н.,
(Россия), В.А. Цинзерлинг — д.м.н., профессор (Россия),
Н.В. Шабашова — д.м.н., профессор (Россия), Ф. Штайб —
доктор медицины (Германия), А.П. Щербо — д.м.н.,
чл.корр. РАМН, профессор (Россия)

Проблематика журнала: Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской микологии — биология возбудителей, клиника, диагностика, эпидемиология, иммунитет, терапия и профилактика микозов, грибы-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 mycoses, fungi — contaminants in laboratory, clinical and other conditions.

СОДЕРЖАНИЕ

ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ И ОБЗОРЫ

Структурированные и неструктурированные формы существования микромицетов в искусственных и естественных условиях. *Елинов Н.П.* 3

КЛИНИЧЕСКАЯ МИКОЛОГИЯ

Микобиота различных локусов у детей с онкогематологическими заболеваниями в стадии интенсивного лечения. *Боронина Л.Г., Блинова С.М., Лавриненко Е.В., Аминова П.Г.* 10

Аспергиллез головного мозга: описание четырех клинических случаев. *Хостелиди С.Н., Борзова Ю.В., Десятик Е.А., Игнатъева С.М., Зубаровская Н.И., Колбин А.С., Зюзгин И.С., Бойченко Э.Г., Богомолова Т.С., Васильева Н.В., Климко Н.Н.* 16

Хронический инвазивный аспергиллез легких у больных в Санкт-Петербурге. *Борзова Ю.В., Десятик Е.А., Хостелиди С.Н., Попова М.О., Чернопятова Р.М., Богомолова Т.С., Игнатъева С.М., Шурпицкая О.А., Колбин А.С., Зюзгин И.С., Зубаровская Н.И., Климович А.В., Васильева Н.В., Климко Н.Н.* 20

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МИКОЛОГИЯ

Морфогенез конидиогенного аппарата *Aspergillus terreus* Thom по данным электронной микроскопии. *Степанова А.А., Синицкая И.А.* 26

Характеристика тканевых и культуральных форм *Candida species*, выделенных от новорожденных детей. *Ивахнюк Т.В., Каплин Н.Н.* 34

Сравнительный анализ методов выделения ДНК из клеток *Histoplasma capsulatum* Darling. *Вьючнова Н.В., Ткаченко Г.А., Гришина М.А., Савченко С.С., Антонов В.А., Липницкий А.В.* 38

Выделение и характеристика изолятов *Cryptococcus neoformans* из окружающей среды г. Санкт-Петербурга. *Босак И.А.* 43

ХРОНИКА И ИНФОРМАЦИЯ

Первый Золотой Юбилей Н.В. Васильевой 47

Конгрессы и конференции 49

Правила оформления статей в журнал «Проблемы медицинской микологии» 51

CONTENTS

PROBLEM ARTICLES AND REVIEWS

The structural and non-structural forms of existence of micromycetes in artificial and natural conditions. *Yelinov N.P.* . 3

CLINICAL MYCOLOGY

Mycobiota of different loci in children with oncohematological diseases in the stage of intensive treatment. *Boronina L.G., Blinova S.M., Lavrinenko E.V., Amineva P.G.* 10

CNS Aspergillosis: description of four clinical cases. *Khostelidi S.N., Borzova Yu.V., Desyatic Ye.A., Ignatyeva S.M., Zubarovskaya N.I., Kolbin A.S., Zyuzgin I.S., Boychenko E.G., Bogomolova T.S., Vasilyeva N.V., Klimko N.N.* ... 16

Chronic invasive pulmonary aspergillosis at patients in Saint Petersburg. *Borzova Yu.V., Desyatik E.A., Khostelidi S.N., Popova M.O., Chernopyatova R.M., Bogomolova T.S., Ignatyeva S.M., Shchurpitskaya O.A., Kolbin A.S., Zyuzgin I.S., Zubarovskaya N.I., Klimovich A.V., Vasilyeva N.V., Klimko N.N.* 20

EXPERIMENTAL MYCOLOGY

Morphogenesis of *Aspergillus terreus* Thom conidiogenous apparatus according to the electron microscopy. *Stepanova A.A., Sinitskaya I.A.* 26

The characteristic of *Candida species* tissue and cultural forms isolated from newborn children. *Ivakhnyuk T.V., Kaplin N.N.* 34

The comparative analysis of DNA extraction methods from *Histoplasma capsulatum* Darling cells. *Vyuchnova N.V., Tkachenko G.A., Grishina M.A., Savchenko S.S., Antonov V.A., Lipnitsky A.V.* 38

Isolation and characteristic of *Cryptococcus neoformans* isolates in Saint Petersburg environmental, Saint Petersburg, Russia. *Bosak I.A.* 43

CHRONICLE AND INFORMATION

N. V. Vasylyeva — to the gold jubilee 47

Congresses and conferences 49

УДК 616.992:616-057

СТРУКТУРИРОВАННЫЕ И НЕСТРУКТУРИРОВАННЫЕ ФОРМЫ СУЩЕСТВОВАНИЯ МИКРОМИЦЕТОВ В ИСКУССТВЕННЫХ И ЕСТЕСТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ

Елинов Н.П. (зам. директора по научной работе)*

НИИ медицинской микологии им. П. Н. Кашкина
ГОУ ДПО СПб МАПО, Санкт-Петербург, Россия

© Елинов Н.П., 2009

Микроорганизмы (в том числе и отдельные микромицеты), как правило, существуют в сообществах себе подобных или других видов либо на питательных субстратах in vitro, либо in vivo — в живых организмах. В первом случае они могут быть «взвешенными» в жидких средах (взвеси), или в виде планктона (от греч. plankton — блуждающее); в других случаях, например, на уплотнённых субстратах in vitro или на слизистых оболочках у людей и животных, на/в коже и её придатках (ногтях и волосах), в некоторых других тканях патогенные и условно-патогенные микромицеты образуют характерные структурированные формы, за счёт которых они обеспечивают себе определённые преимущества в конкурентной борьбе за выживание.

Ключевые слова: бактерии, взвеси, грибы нитчатые, дрожжи, колонии, микромицеты, планктон, структурированность

THE STRUCTURAL AND NON-STRUCTURAL FORMS OF EXISTENCE OF MICROMYCETES IN ARTIFICIAL AND NATURAL CONDITIONS

Yelinov N.P. (The deputy Director for Research Programs)

Kashkin Research Institute of Medical Mycology,
SEI APE SPb MAPE, SPb, Russia

© Yelinov N.P., 2009

Microorganisms (including micromycetes) as rule exist in complicity of themselves similar or other species either on nutrient substrates in vitro or in vivo — in living organisms. In the first case they can be lonely dispersed in fluid media (dispersions) or in the plankton shape, for example in solid substrates in vitro or on mucous membranes at people

and animals, on/in skin and its appendages (hairs and nails) and some other tissues pathogenic and conditionally-pathogenic micromycetes make characteristic structural forms with which they secures themselves definite advantages in a competition for the surviving.

Key words: bacteria, colonies, hyphal fungi, micromycetes, plankton shape, structurality, yeasts

У ряда специалистов — микробиологов до последнего времени формировались представления о микроорганизмах преимущественно как об одноклеточных формах живых существ; тем более, что объекты микологии до недавних пор систематики относили к царству растений. Поэтому неудивительно то, что со студенческой скамьи мы изучали одноклеточные культуры бактерий, дрожжевых организмов в суспензиях в жидких средах или в КОЕ — на плотных средах.

Многие микроорганизмы в природных условиях обитания находятся в плёно-формирующихся системах, прикрепляющихся к каким-либо поверхностям, а не «свободноплавающими клетками» — взвесями (планктонная форма).

Очевидно, мы можем говорить о том, что плёнообразование in vivo тесно связано с патогенностью микроорганизма (в том числе — микромицета), то есть его способностью вызвать инфекционный процесс. Патоген (один или в ассоциации) в биоплёнке становится устойчивее к защитным силам макроорганизма (имея в виду, прежде всего, иммунную систему), а также к различным химиотерапевтическим средствам.

В настоящей работе приведены данные о планктонных и структурированных формах некоторых избранных грибов из родов *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Candida*, *Fusarium*, *Gelosinospora*, *Penicillium* и др. Демонстрационные материалы выполнены преимущественно на видах, сохраняемых в Российской коллекции патогенных грибов (РКПГ) в НИИ медицинской микологии им. П. Н. Кашкина СПб МАПО.

В род *Aspergillus* включено, в среднем, 200 видов, из которых свыше 20 видов описаны как патогены, способные вызывать заболевание людей (аспергиллёз) [1–3]. Наиболее часто выделяют из патологического материала *A. fumigatus*, затем — *A. flavus*, *A. niger* и др. Из них первый за сутки в подходящих условиях способен образовывать порядка 65 млн. зародышевых клеток — экзоспориоидий. Созревшие конидии могут находиться в форме взвеси в воздухе закрытых помещений или во внешней среде. Подобные конидии, попав в жидкую водную среду, находятся во взвешенном состоянии до начала прорастания и формирования нитей мицелия. Если же эти клетки оказываются на уплотнённой питательной среде или субстрате, то они могут образовывать колонии определённой структуры, или архитектоники (фото 1, 2, 3).

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

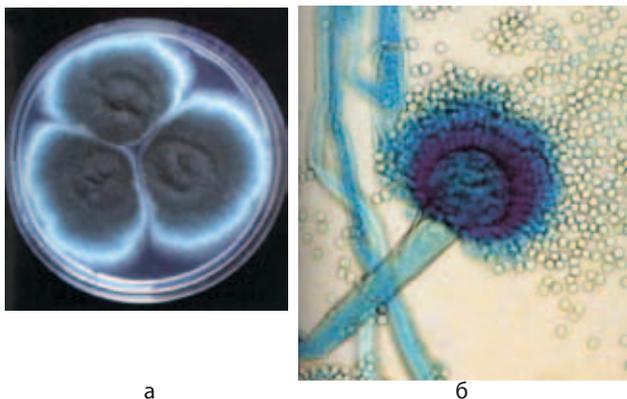


Фото 1. *A. fumigatus*: а) 1 — недельные колонии, выращенные на среде Сабуро; б) конидиеносец и отпадающие конидиоспоры (x40)

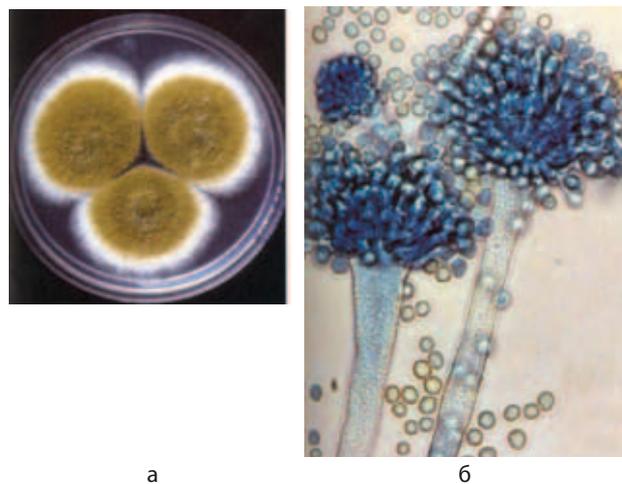


Фото 2. *A. flavus*: а) 1 — недельные колонии, выращенные на среде Сабуро; б) конидиеносец и отпадающие конидиоспоры (x40)

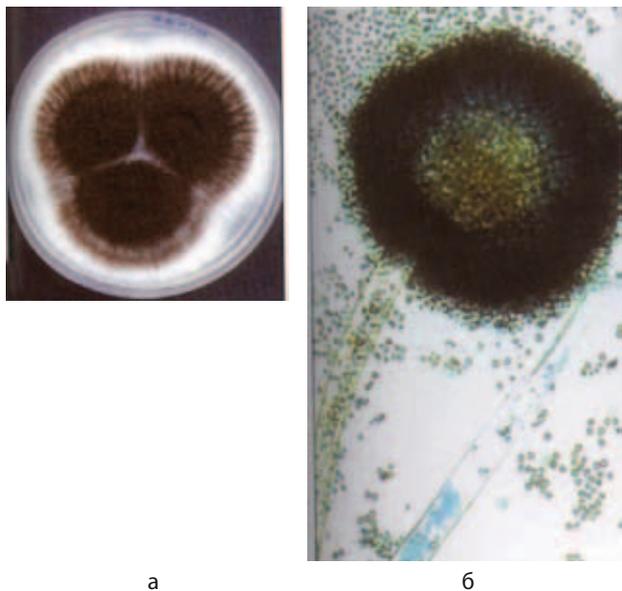


Фото 3. *A. niger*: а) 1 — недельные колонии, выращенные на среде Сабуро; б) конидиеносец и отпадающие конидиоспоры (x40)

Если экзоконидии мицелиальных грибов, как правило, гаплоидные, то аскоспоры сумчатых грибов обычно диплоидные и образуются в структуриро-

ванных сумках (аскусах), из которых они освобождаются во вне. В качестве демонстрации ниже приведен перитеций *Gelosinospora species* с яйцевидными бугристыми аскоспорами (фото 4), «выходящими» через остиолу.

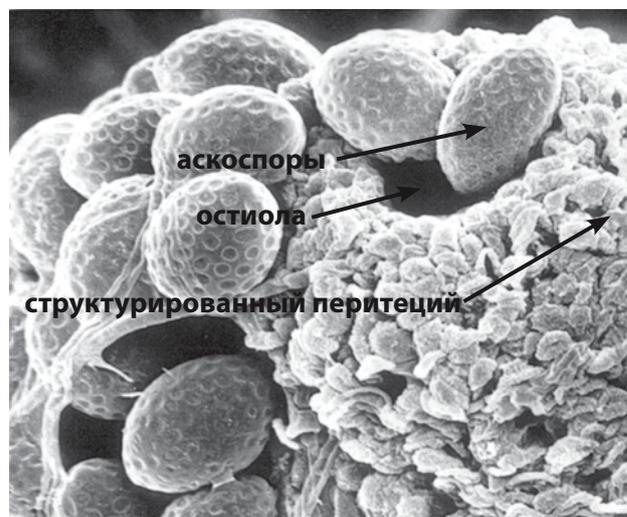


Фото 4. Высвобождение аскоспор из перитеция *Gelosinospora species* через остиолу

Конидии у *A. flavus* — шаровидные, гладкие — до шиповатых, 3–6 мкм в диаметре (чаще 3,5–4,5 мкм); у *A. fumigatus* — шаровидные, гладкие (могут быть субшаровидными, иногда — эллипсоидными) или шиповатые (редко — гладкие), 2,2–3,0 мкм в диаметре; у *A. niger* конидии также шаровидные, толстостенные, коричневые — до чёрных по цвету, нерегулярно-шероховатые, 4–5 мкм в диаметре.

Цвет колоний: у *A. flavus* жёлтый — до желтовато-зелёного или, с возрастом, зелёного; у *A. fumigatus* — белый, зелёный — до серо-зелёного, на скошенной агаризованной среде в пробирках — серые с возрастом. Обратная среда колоний вариабельна по цвету. Колонии *A. niger* вначале белого цвета, становящиеся затем чёрными; обратная сторона их случайно может приобретать бледновато-жёлтую окраску.

В качестве возбудителей аспергиллеза описаны следующие виды: *A. amstelodamii*, *A. candidus*, *A. carneus*, *A. clavatus*, *A. conicus*, *A. deflectus*, *A. fischeri*, *A. flavipes*, *A. nidulans*, *A. niveus*, *A. ochraceus*, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *A. repens*, *A. restrictus*, *A. ruber*, *A. sydowi*, *A. terreus*, *A. ustus*, *A. versicolor* [1].

В роде *Aureobasidium* описано 14 видов, достаточно широко распространённых в природе, их изолируют из почвы, воздуха, растительных остатков, как сапробы они могут находиться на поверхности кожи людей в качестве контаминантов, хотя в отдельных случаях некоторые из них (например, *A. pullulans*) могут индуцировать кератит, перитонит у лиц, длительно получающих перитонеальный диализ, лёгочную инфекцию, а вид *A. mansonii* может обусловить менингит.

Ныне описаны два варианта *A. pullulans* — var. *pullulans* и var. *melanogenum*. Колонии последнего быстрее становятся зеленовато-чёрными — до чёр-

ных примерно через 4–5 суток. *A. pullulans* с разновидностями является диморфным (фото 5).

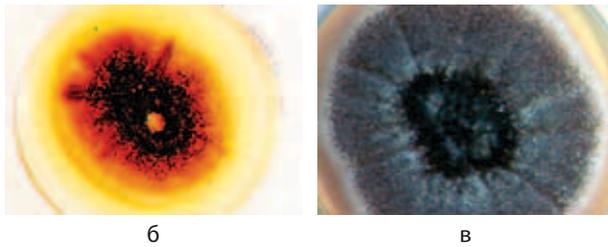
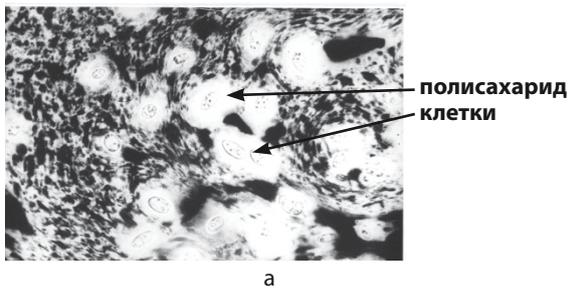


Фото 5. *Aureobasidium pullulans*: а) планктонный рост бесцветных клеток при глубинном выращивании, х 950; б, в) пленчатый структурированный рост на агаре Сабуро. <http://microbiology.mtsinai.on.ca/mig/defungi> [4]

Дрожжевые организмы рода *Candida* объединяют свыше 160 видов, из которых около 20 описаны как возможные патогенны для человека. Наиболее важным из них в этом плане является *C. albicans* — диморфный микромицет, способный быть одноклеточным, например, при +37 °С, и псевдомицелиальным при 26–28 °С (фото 6, 7, 8).

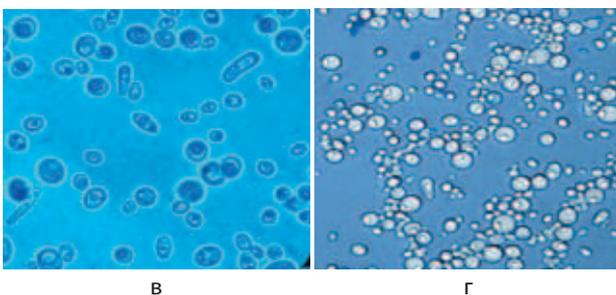
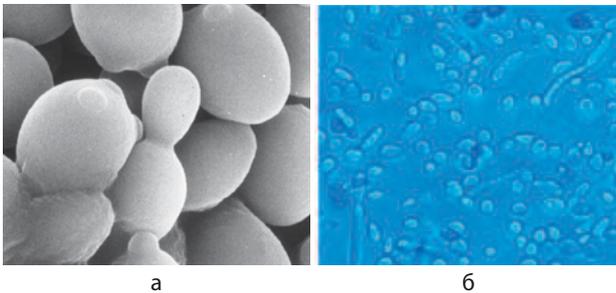


Фото 6. Суспензированный рост некоторых видов *Candida* на жидкой среде Сабуро: а — *C. albicans* (RCPF-401/ NCTC 885-653), б — *C. krusei* (РКПГУ-1057), в — *C. lipolytica* (РКПГУ-653/76), г — *C. famata* (РКПГУ 1196). Ув. х 900

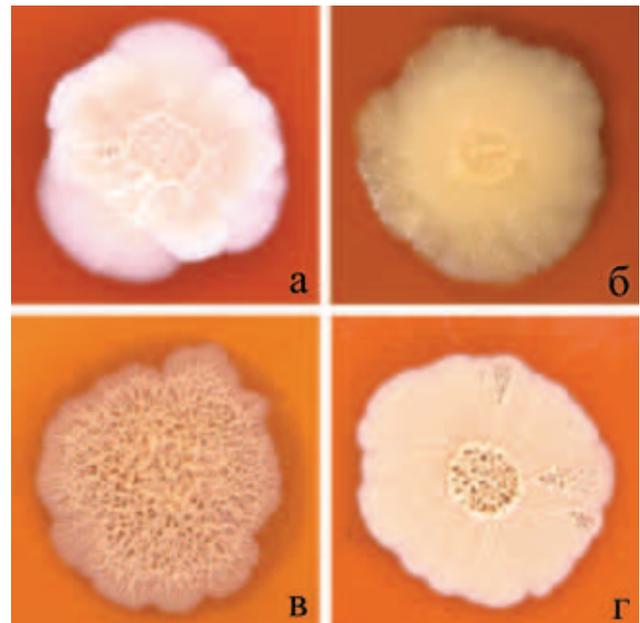


Фото 7. Колонии (натуральная величина) *C. albicans* (а, в, г — РКПГУ-401/NCTC 885-653 и б — РКПГУ-885-653), выращенные на сусле-агаре (а, в) и среде Сабуро (б, г) при 28 и 37 ° соответственно

Он часто вызывает оппортунистические инфекции у иммунодефицитных лиц, например, у пациентов с трансплантатами, у страдающих от СПИД, у онкологических больных.

C. albicans — облигатный диплоидный вид с 8 парами хромосом, ранжированных от 0,95 до 3,5 Мб ДНК, а в гаплоидном состоянии объединяет до 16 Мб ДНК [5]. У людей *C. albicans* обнаруживают на слизистой оболочке ротовой полости, в пищеварительном тракте, у женщин — в вагине; за счёт трансформации дрожжевых клеток в псевдомицелиальные и мицелиальные нити *C. albicans* проникает в живые ткани, поэтому она способна заражать большинство органов и частей тела человека. При сепсисе в крови она находится преимущественно в дрожжевой фазе, тогда как на слизистых оболочках формирует плёночные структуры (фото 8).

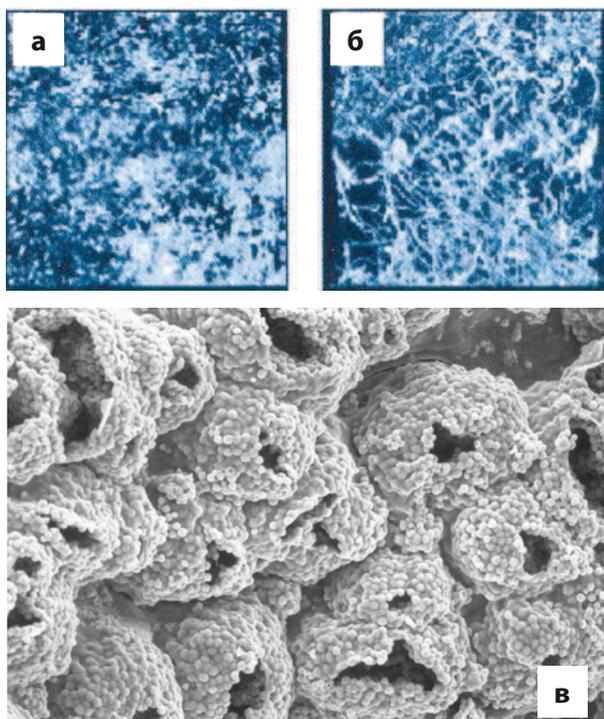


Фото 8. Биопленки *C. albicans* на разных субстратах: а) на этафилконе; б) на балафилконе; в) на Сабуро — «ласточкины гнезда»

Характеристика патогенных и условно-патогенных *Candida* spp. приведена в таблице 1. Факторами патогенности/вирулентности у *C. albicans* являются адгезины, внеклеточные протеазы и фосфолипазы, ростковые трубки и псевдогифы, способность к фенотипическому переключению округлых белых клеток в продолговатые тусклее (серые) и — наоборот (фото 9).



Фото 9. Белая и серая (тусклая) формы клеток *C. albicans*

При этом продолговатые клетки оказываются более вирулентными, чем округлые. Можно предполагать, что продолговатые особи оказываются в гаплоидном состоянии. Обе формы находятся под контролем соответствующих генов — для белых округлых клеток WH11 ген, для тусклых продолговатых — SAPI ген (от англ. White — белый, Stretory Aspartic Proteases — секреторные аспартил-протеазы) (фото 10).

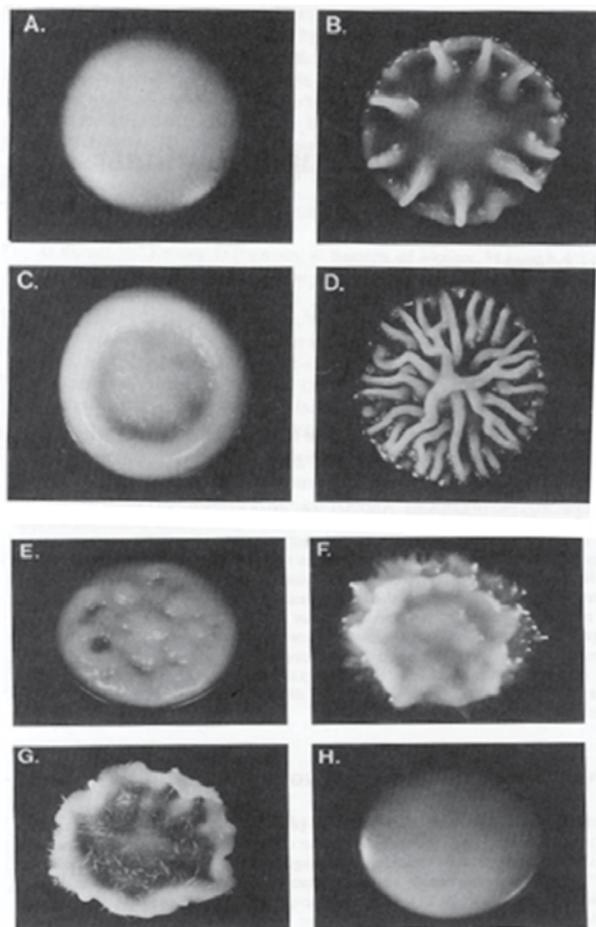


Фото 10. *C. albicans* (штамм WO-1) колонии на уплотненной питательной среде, содержащей округлые и продолговатые клетки: а — исходная гладкая; б — звездчатая; с — окольцованная; d — нерегулярно складчатая; е — пятнистая; f — шляпковидная; g — пушистая; h — ревертант-гладкая

Адгезины, выявленные у *C. albicans*, являются: углеводами, белками и, очевидно, липидами (!?). Лигандами углеводов в макроорганизме выступают лектиноподобные белки и, напротив, для белковых адгезинов лигандами оказываются лектиноподобные углеводы, или белки, нековалентно взаимодействующие между собой, а также ковалентно-связанные протеины; наконец, адгезином может быть липид, а лигандом в макроорганизме — протеин (!?) или, напротив, протеин выступает как адгезин, а лигандом — липид (!?).

Подобные адгезины и лиганды найдены у *Aspergillus fumigatus*, *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans*, *Penicillium marneffeii*, *Pneumocystis carinii*, *Sporothrix schenckii* и др.

Белок-адгезин у *A. fumigatus* размером 72 кДа взаимодействует *in vivo* с сиаловой кислотой ламинина; другой адгезин (нерасшифрованной принадлежности) взаимодействует лектиноподобно с сиаловой кислотой фибронектина и фибриногена.

В любом варианте микромицетов можно отметить их возможность быть двухфазными в соответствующих условиях среды обитания (*C. albicans* и многие другие виды этого рода, *Cryptococcus* spp., *Penicillium marneffeii* и др.) или монофазными (пени-

Таблица 2.

Возможные повреждения грибами-патогенами разных систем макроорганизма

система	повреждающее действие благодаря:
покровная	активности кератиназ при дерматомикозах кожи и её придатков; за счёт активности фосфолипаз при микотических поражениях слизистых оболочек открытых полостей
мышечная	белку «кальмодулин»*, активирующему миозин — киназу, катализирующей р-цию фосфорилирования миозина с последующим сокращением гладких мышц. при снижении уровня Ca^{2+} в плазме крови менее 2.5мм/л возможны выраженные спазмы скелетных мышц
опорная (скелетная)	эффектам «кальмодулина» — кальций (Ca^{2+})-связывающего протеина, а также гормональной дисрегуляции метаболизма кальция при участии стероидного гормона 1,25-дигидроксихоле-кальциферола, паратгормона, кальцитонина, глюкокортикоидов и гормона роста, остеомиелита
кровеносная	микотическим поражениям структурных компонентов сердца, фунгемиям, грибковым энзимопатиям, обуславливающим тромбообразование или, напротив, индуцирующим гидролиз субстратов
дыхательная	микозам различных отделов системы с первичным повреждением липидных мембран в составе слизистых оболочек ФЛ-азами
пищеварительная	микозам различных отделов системы, включая дисбиозы, изменения рН содержимого желудка, тонкой, толстой и пр.
нервная	поражениям ЦНС, например, при криптококкозе, сседоспориозе при участии ферментов полифенолоксидаз, ФЛ-аз и др.
эндокринная	микозам эндокринных органов и тканей (прежде всего, рапсгеза и обусловленный этим сахарный диабет)
выделительная	микозам системы (уретриты, циститы, пиелиты, колиты и др.)
сенсорная	микозам (кератиты, перитониты, отиты, менингиты, плевриты и др.)
иммунная	микозам и микоаллергозам
репродуктивная	микозам гениталий (в том числе — при участии эндокринной системы)

циллы, дерматомицеты). В суспензионной форме могут быть гаплоидные и диплоидные клетки, однако вирулентными оказываются, как правило, первые. И если структурированные формы на слизистых оболочках имеют в своем составе (в популяции) гаплоидные клетки, то их патогенность (вирулентность) возрастает.

C. albicans образует количественно большую и качественно более сложную биопленку на дисках силиконового эластомера по сравнению с другими видами *Candida*.

При микроскопии биопленок *C. albicans* найдено, что они «толстые» с однообразной мофрологией составляющих их базовых клеток-бластоспор, поверх которых располагается более плотный матриксный слой, состоящий из экзогликанов и гифов. Пленки *C. parapsilosis* обычно меньшего объема и состоят только из агломерированных бластоспор.

Однако частота образования биопленок из *C. albicans* заметно меньше (почти в 8 раз), чем частота формирования биопленок не-*albicans* видами *Candida*.

Candida spp. в пленках значительно устойчивее к флуконазолу, чем в «планктонной» форме. Антимикотики, сравнительно давно и недавно применяемые на практике, не действуют губительно в отношении биопленок *Candida* spp. (амфотерицин В, вориконазол = Вифенд®, итраконазол = Орунгал® и др, флуконазол = Дифлюкан®, флуцитозин = фторцитозин, равуконазол). Но липидные формы амфотерицина В (амбизом, абелсет), каспофунгин и микофунгин обладают ингибирующим действием в отношении биопленок *Candida* spp.; подмечено, что нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (аспирин и др.) обладают *in vitro* сходным ингибирующим действием.

Возможные повреждения грибами-патогенами разных систем макроорганизма приведены в таблице 2.

Ферменты и клеточные процессы, регулируемые кальмодулином*

При развитии патологических процессов у людей и животных — представителей надцарства эукариотов важную роль могут приобретать чистые культуры или их ассоциации, например, с бактериями в пленках при кандидозе верхних отделов дыхательных путей.

Пленки *Candida* spp. образуются в составе нормобиоты у людей в связи с имплантированными био- и другими материалами (протезы, шунты, эндотрахеальные трубки, различные типы катетеров, биопленки на глазных линзах и др.).

Прогнозируемые задачи исследования планктонных и биоплёночных структур микромицетов:

I. Изучить молекулярные механизмы возникновения и развития биоплёнок — какие потенции клеток индуцируют их переход от планктонной формы существования к плёночной и — наоборот, с учётом ныне задействованных генов?

II. Оценить структурно-функциональное состояние биоплёнок от начала их формирования и до «конечного созревания».

III. Исследовать диапазоны чувствительности и резистентности биоплёнок к биоцидам и лекарственным средствам.

IV. Исследование превентивных мер, предупреждающих формирование *in vivo* разнокачественных по составу и архитектонике биоплёнок.

V. Включить плёнкообразующие микромицеты (в первую очередь — из рода *Candida*) в качестве первоочередных объектов метобономики — науки

об одномоментном определении многих различных молекул в сложных системах (смесях), например, в крови при определении метаболического статуса пациента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Елинов Н.П., Митрофанов В.С., Черноятова Р.М. Аспергиллезная инфекция; подходы к ее диагностике и лечению //Ж. Проблемы медицинской микологии. — 2002. — Т.4, №1. — С. 4–16.
2. Кибалкина С.А., Подольцева Э.И., Бараневич Е.П. и др. Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток больному острым лейкозом, перенесшему инвазивный аспергиллез //Ж. Проблемы медицинской микологии. — 2002. — Т.4, №1. — С. 28–30.
3. Васильева Н.В., Елинов Н.П. Микроорганизмы — контаминанты и патогены — индукторы процессов старения больничных зданий и помещений медицинского назначения, а также возбудители некоторых заболеваний людей (учебное пособие). Под ред. Н.П. Елинова. — СПб, 2009. — 224 с.
4. <http://microbiology.mtsinai.on.ca/mig/defungi>
5. d'Enfert C. and Hube B. *Candida*: Comparative and functional genomics. — Publisher Caister Academic Press, 2007. — 428 p.

Поступила в редакцию журнала 28.09.09

Рецензент: А.А. Степанова



МИКОБИОТА РАЗЛИЧНЫХ ЛОКУСОВ У ДЕТЕЙ С ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ В СТАДИИ ИНТЕНСИВНОГО ЛЕЧЕНИЯ

^{1,2}Боронина Л.Г. (профессор кафедры)*, ^{1,2}Блинова С.М. (ассистент кафедры, врач-бактериолог), ^{1,2}Лавриненко Е.В. (старший лаборант кафедры, врач-бактериолог), ¹Аmineva П.Г. (врач-интерн)

¹Кафедра клинической лабораторной и микробиологической диагностики Уральской государственной медицинской академии, ²Областная детская клиническая больница №1 (ОДКБ №1), Екатеринбург, Россия

© Коллектив авторов, 2009

Представлены данные о микобиоте у детей, находившихся в ОДКБ №1 Екатеринбурга в течение 2007–2008 гг. Принципиальных различий в спектре выделенных грибов до и после трансплантации стволовых кроветворных клеток в большинстве случаев не выявили. Один случай инвазивного микоза отнесен к категории доказанного и три случая — к категории вероятного инвазивного микоза.

Ключевые слова: инвазивный микоз, онкогематологические заболевания, трансплантация стволовых кроветворных клеток

MYCOBIOTA OF DIFFERENT LOCI IN CHILDREN WITH ONCOHEMATOLOGICAL DISEASES IN THE STAGE OF INTENSIVE TREATMENT

^{1,2}Boronina L.G. (professor of the chair), ^{1,2}Blinova S.M. (assistant of the chair), ^{1,2}Lavrinenko E.V. (senior laboratory assistant, bacteriologist), ¹Amineva P.G. (intern)

¹Chair of clinical laboratorial and microbiological diagnostic of Ural State Medical Academy, ²Regional Children's Clinical Hospital №1, Yekaterinburg, Russia

© Collective of authors, 2009

* Контактное лицо: Боронина Любовь Григорьевна
Тел.: (343) 240-85-88

Mycobiota of different loci in children entered in Regional Children's Clinical Hospital № 1 Yekaterinburg during 2007–2008 have been presented. Basic differences in a spectrum of isolated fungi before and after transplantation stem hemopoietic cells it is not revealed. One case attributed to proved invasive mycosis and three cases attributed to probable invasive mycosis.

Key words: invasive mycosis, oncohematological diseases, transplantation stem hemopoietic cell

Грибковые инфекции за последние десятилетия стали важной проблемой здравоохранения во многих странах мира, при этом инвазивные микозы характеризуются тяжестью клинических проявлений и очень высокой летальностью. Быстро увеличивается спектр возбудителей микозов, многие из которых резистентны к применяемым препаратам [1–4]. Системные микотические инфекции в онкогематологии (главным образом, кандидоз и аспергиллез) связаны с иммунодефицитом, нейтропенией и могут возникать не только в терминальной стадии онкологического процесса, но и в период ремиссии. Системные микозы вызывают также *Fusarium* sp., *Mucor* sp., *Trichosporon* sp. и др. [4]. Особенно, клинически значимы инфекции, возникающие в период после трансплантации костного мозга. Очень важным является вопрос доказательности инвазивной грибковой инфекции, для чего в мире выработаны критерии, в соответствии с которыми определяют тот или иной тип (категорию) инфекции. Так, в Национальном институте рака (США) предложены следующие критерии доказанного инвазивного микоза:

1. обнаружение тканевых форм гриба при гистологическом исследовании или в культуре пораженной ткани;
2. двух- и более кратный высев грибов из крови, ликвора или мокроты, забранной при бронхоскопии;
3. однократный высев грибов из крови в сочетании с наличием гипоэхогенных очагов в печени или селезенке по данным УЗИ и/или КТ [5].

Международным соглашением (коллектив авторов Европейской организации по изучению и лечению опухолевых заболеваний и группы по изучению микозов в Национальном институте аллергии и инфекционных заболеваний, 2002, Мериленд, США), разработан набор научно-ориентированных определений применительно к инвазивной грибковой инфекции с тремя уровнями вероятности: «доказанное», «вероятное», «возможное». В соответствии с ним доказанной инвазивной грибковой инфекцией (в отношении дрожжей) является обнаружение дрожжевых клеток из образцов игольной аспирации или биопсии, исключая слизистые оболочки; или позитивная культура из образца, полученного асептически из стерильного в норме очага, и, в соответствии с клиническими и радиологическими исследованиями, связанными с инфекцией, исключая мочу, синусы и слизистые оболочки; или обнаружение при микроскопии позитивного антигена криптококка в спинномозговой жидкости (СМЖ). Вероятную инвазивную грибковую инфекцию определяют в случае

обнаружения, по крайней мере, одного фактора риска, индуцирующего развитие инвазивного микоза, одного микробиологического критерия; одного-двух клинических критериев из категории «значимых» или «менее значимых» и обнаружение возбудителя в стерильных в норме локусах. Возможную инвазивную грибковую инфекцию диагностируют в случае обнаружения хотя бы одного фактора риска, индуцирующего развитие инвазивного микоза, одного признака из категории микробиологических критериев или одного признака из категории «значимых»/двух — из группы «менее значимых» клинических симптомов инфекционного процесса [6].

Цель нашего исследования — изучение микобактерий различных локусов у детей с онкологическими заболеваниями в стадии интенсивного лечения, находившихся в ОДКБ №1 в течение 2007–2008 гг.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Провели культуральное исследование 3260 проб клинического материала — отделяемого слизистой оболочки полости рта (зева), слизистой оболочки носа, материала бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ), мокроты, аспирата из трахеи, мочи, фекалий, крови, ликвора, стволовых клеток, внутрисосудистых катетеров, раневого отделяемого, отделяемого уха, глаза, с наружных половых органов и влагалища, уретры, биопсии легкого и печени — от 295 детей в возрасте от 1 месяца до 19 лет онкогематологических и онкорезимационных отделений ОДКБ №1 в течение 2007–2008 гг. с диагнозами «апластическая анемия», «гемофилия», «болезнь Ходжкина», «острый лимфобластный лейкоз», «острый миелобластный лейкоз», «гепатобластома», «лимфома», «медуллобластома», «нейробластома», «нефробластома», «остеосаркома», «рабдомиосаркома», «ретинобластома», «тромбоцитопеническая пурпура». У 43 пациентов (79 проб) определяли в сыворотке крови растворимый антиген *Aspergillus* sp. (галактоманнан), у 20 пациентов (37 проб) — растворимый антиген *Candida* sp. (маннан) методом латекс-агглютинации («Pastorex Aspergillus», «Pastorex Candida», Bio-Rad, Франция). У четырех пациентов (5 проб) определяли растворимый антиген *Cryptococcus neoformans* (гликуронооксиломаннан) в ликворе и у одного — в сыворотке методом латекс-агглютинации («Pastorex Cryptococcus plus», Bio-Rad, Франция). 78 проб сывороток крови от 29 пациентов исследовали на наличие IgG методом ИФА с помощью тест-систем «Кандида-IgG-ИФА-Бест» и 94 проб сыворотки крови от 32 пациентов — в «Аспергилл-IgG-ИФА-Бест» («Вектор-Бест», Новосибирск). От 14 пациентов с летальным исходом исследовали аутопсийный материал (кровь, ткани печени, селезенки, тонкой и толстой кишок и др.). Посев крови проводили в коммерческие флаконы с 2-фазной средой («bioMerieux», Франция) для визуального учета и во флаконы фирмы Becton Dickenson (ВАСТЕС Ped plus/F, Aerobic/F, Anaerobic/F, Mycosis/F, США) для

автоматического прибора ВАСТЕС 9050; ликвора — на «шоколадный», кровяно-сывороточный и полужидкий «шоколадный» агары; посев материала на микробиоту из остальных локализаций проводили на кровяно-сывороточный агар, агар Эндо, желточно-солевой агар, агар Сабуро, «шоколадный» агар полуколичественным способом; исследование внутрисосудистых катетеров выполняли по методу Maki; при исследовании клинического материала на грибы использовали количественную методику посева на агар Сабуро и жидкую среду Сабуро [1]. Идентификацию выделенных штаммов производили рутинными методами и с помощью тест-систем для идентификации микроорганизмов на полуавтоматическом АТВ-Expression («bioMerieux», Франция) и автоматическом («MicroScan WalkAway 96, DADE BEHRING», США) баканализаторах. Для определения чувствительности дрожжей рода *Candida* к антимикотикам использовали «АТВ FUNGUS 2 и 3 INT» («bioMerieux», Франция).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Всего исследовали 683 пробы из ротовой полости от 251 пациента, получено 462 положительных высева (67,7%). При исследовании на грибы в 41,7% случаев результат был положительным. При изучении спектра выделенных микроорганизмов выявили: грамположительную микробиоту — 50,6%, грибы — 25% и грамотрицательные микроорганизмы — 24,4%. Среди *Candida* spp. доля *Candida albicans* составила 83,8%, *Candida non-albicans* — 13,8%, среди них *Candida krusei* — 6,9%, *Candida glabrata* — 3,2%, *Candida tropicalis* — 1,3%, *Candida* sp. — 2,3%, *Saccharomyces cerevisiae* — 2,4%.

Исследовали 432 пробы со слизистой оболочки носа от 228 пациентов, получен 151 положительный высев, что составило 34,9% от общего числа проб; при исследовании на грибы в 2,5% случаев обнаружен их рост. При этом обнаружение грамположительной биоты было в 81,6% случаев, грамотрицательных микроорганизмов — в 10,3% и грибов — в 8,1%. Среди *Candida* spp. доля *C. albicans* составила 68,7%, а *Candida non-albicans* — 18,7%.

Исследовали 338 проб мочи от 160 пациентов, положительные высевы составили 19,5% от общего числа проб. При количественном исследовании грибы выявлены в 30%. На первом месте среди выделенных микроорганизмов стоят энтерококки (26 штаммов), затем — представители семейства *Enterobacteriaceae* (22 штамма). Грибы выделяли в 6% проб: из них *C. albicans* — в 5% проб, *C. glabrata* — в 1%.

Исследовали 51 образец БАЛ, 61 — аспират из трахеи, 7 мокрот от 39 пациентов, получено 46 положительных высевов (38,6%). При изучении спектра выделенных микроорганизмов на первом месте оказалась грамположительная бактериобиота — 62,3%, затем следуют грамотрицательные бактерии — 25,8% и третье место занимают грибы — 11,9%. *C. albicans* составила 60%, *Candida non-albicans* —

30% (*C. tropicalis*, *C. glabrata*), *S. cerevisiae* — 10%.

При исследовании 133 внутрисосудистых катетеров от 109 пациентов в 25 пробах (18,8%) был обнаружен рост микроорганизмов: коагулазоотрицательные стафилококки (КОС) — 53,8% (чаще всего — *Staphylococcus epidermidis*). Грибы (*Candida guilliermondii*) выделили в 1 пробе (3,9%).

Исследовали 63 пробы раневого содержимого, включая пунктаты, экссудаты, от 40 больных. При этом в 23 пробах (36,5%) обнаружили рост и выделили 41 культуру микроорганизмов. Наиболее часто выявляли энтеробактерии, энтерококки и грибы — по 17%, соответственно. Грибы обнаружили в 7 пробах (17%): *C. albicans* — в 10% случаев и *C. glabrata* — в 7%.

Исследовали 14 проб отделяемого из ушей от 6 больных. При этом в 6 пробах (42,8%) обнаружили рост микроорганизмов (9 штаммов). Чаще всего выделяли *Escherichia coli* (33,4%), далее следуют КОС и *Candida* spp. (по 22,2%, соответственно), *Staphylococcus aureus* — 11,1%, *Enterococcus faecalis* — 11,1%. Выявили по 1 штамму *Candida* sp. (11,1%) и *Candida parapsilosis* (11,1%).

Из 14 проб со слизистой оболочки влагалища и уретры в 8 (57%) выделили 11 микроорганизмов: *Enterococcus* sp. — 27,2%, *C. glabrata* — 18,1%, прочие — представители нормобиоты данной локализации — 54,7%.

Было произведено исследование 3-х биоптатов легкого и одного печени, роста микроорганизмов не обнаружили.

Всего от 149 пациентов исследовали 618 проб фекалий, из них 194 (31,3%) количественно исследованы на грибы, остальные — на условно-патогенную микробиоту. Во всех пробах обнаружили рост грибов, что связано с назначением антибиотиков широкого спектра данной группе пациентов, а также за счет подавления иммунной системы во время терапии основного заболевания и тяжестью самого заболевания. В 41 (6,6%) пробе наблюдали ассоциации грибов. *Candida* spp. составили, в среднем, 86,6% от всех штаммов, *C. albicans* — 62,1%, а *Candida non-albicans* — 37,9%. На протяжении периода исследования чаще всего выделяли *C. albicans*, *C. glabrata* и *C. krusei*. Это можно объяснить снижением естественных защитных механизмов макроорганизма, сопровождающихся возрастанием скорости размножения и роста *C. albicans* [7]; индукцией усиленного роста *Candida* у пациентов за счет применения различных широкого спектра антибиотиков из числа современных антибиотических средств, например, цефалоспорины в большей степени приводят к обильному росту *Candida* spp., чем аминогликозидные антибиотики или имипенем [7]; и еще — *C. glabrata*, *C. krusei* характеризуются дозозависимой чувствительностью к наиболее часто используемым антимикотикам [1,3], а *C. krusei*, кроме того, отличается природной резистентностью к флуконазолу. Во всех клиниках, включая нашу, с профилактической целью достаточно ши-

роко назначают флуконазол, относящийся к группе системных антимикотиков, которые можно применять местно, перорально и внутривенно. При назначении внутрь эти препараты практически полностью адсорбируются из верхних отделов ЖКТ и не достигают уровня подвздошной кишки, где сосредоточена основная популяция грибов [8]. Таким образом, закономерным выглядит преобладание в популяции грибов, выделенных из кишечника у наших пациентов, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* (Рис. 1).

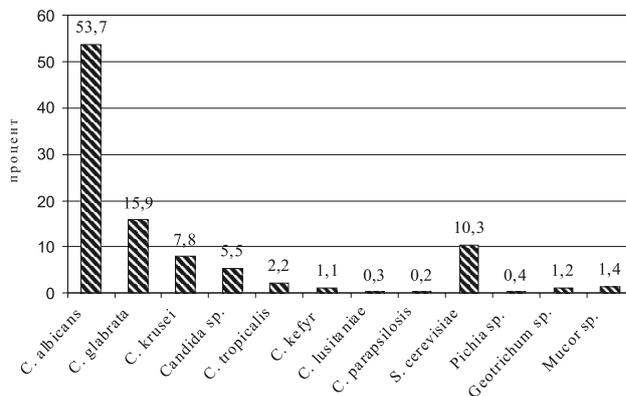


Рис. 1. Частота выделения грибов у онкологических больных из фекалий (n=633)

Всего исследовали 760 проб крови от 184 пациентов. При этом 14,4% (110) проб были собраны через катетер. Так как таких пациентов госпитализируют на длительный срок, то забор крови у них осуществляют многократно. В 45 пробах крови были обнаружены микроорганизмы (5,9%). Среди обнаруженных микроорганизмов чаще всего (37,5%) изолировали грамположительные кокки (в основном — КОС), на 2 месте — грибы (35,4%), на 3-м — грамотрицательные бактерии, главным образом, семейства *Enterobacteriaceae*. Грибы за исследуемый период были выделены в пробах крови от 4 больных: *Blastoschizomyces capitatus* (син. *Geotrichum capitatum*, *Trichosporon capitatum*) — 1 штамм от одного пациента, *C. pelliculosa* — 12 штаммов от одного пациента, *C. guilliermondii* — 4 штамма, 3 из которых от одного и 1 еще от одного пациента. Этим пациентам не проводили ретрансфузию периферических стволовых клеток или их трансплантацию, так как они не были показаны по протоколу.

Необходимо отметить, что пациент, у которого из крови был выделен *B. capitatus*, умер на следующий день после взятия данной пробы крови; из аутопсийного материала (кишечник) также была выделена культура *B. capitatus*, при микроскопическом исследовании мазков-отпечатков обнаружили мицелий. Морфологически при патологоанатомическом исследовании кишок наблюдали из многочисленных перфораций, что характерно для инвазивного поражения грибами. При жизни у этого больного также неоднократно выделяли дрожжевые грибы — из ротовой полости и содержимого кишечника — *C. albicans*, *Candida* sp., *B. capitatus*. По данным научной литературы, резервуаром *B. capitatus* являет-

ся желудочно-кишечный тракт, а летальность среди больных, которым проводили лечение, составляет 75% [4].

У всех пациентов с положительной гемокультурой на микромицеты другие грибы рода *Candida* и сахаромицеты также выделяли из иных локализаций, главным образом, из фекалий и, следовательно, говорить о доказательном поражении грибами (об инвазивном микозе) можно только в одном случае — при выделении *B. capitatus*. В остальных случаях выделения *Candida* из крови (от трех других пациентов) можно говорить лишь о вероятном инвазивном микозе (кандидозе).

У двух (из 4) больных с положительной гемокультурой на грибы выполняли серологические исследования с сыворотками крови на обнаружение антигенов и антител *Aspergillus* и *Candida*; результаты отрицательные. У двух (из 4) больных проводили тестирование выделенных гемокультур на чувствительность к антимикотикам: *C. pelliculosa* умеренно-резистентна к флюцитозину, чувствительна к амфотерицину В, вориконазолу, флуконазолу, итраконазолу; *C. guilliermondii* — чувствительна к флюцитозину, амфотерицину В, вориконазолу, флуконазолу, итраконазолу.

Был исследован 51 аутопсийный материал от 14 пациентов, при этом лишь в 2 образцах не было роста микроорганизмов. Основным условием для получения достоверных результатов и их правильной интерпретации является раннее, не позднее 12 часов после смерти больного, взятие материала [9]. В нашем исследовании это условие соблюдено лишь в одном случае. Всего выделено 127 микроорганизмов, из них на долю представителей семейства *Enterobacteriaceae* пришлось 17,4%, неферментирующих грамотрицательных бактерий — 25,2%; КОС (преимущественно *S. epidermidis*) — 14,2%; *Enterococcus* sp. — 20,5%; грибов — 19,7%: *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. melibiosa*, *C. pelliculosa*, *C. tropicalis*, *Candida* sp., *Rhodotorula* sp., *Trichosporon* sp., *B. capitatus*; *Corynebacterium* sp. — 1,5% и *Haemophilus influenzae* — 1,5%. Рост грибов из аутопсийного материала был обнаружен у 8 из 14 умерших пациентов. При этом из крови при жизни у этих пациентов грибы не выявляли. У 4 из этих 8 пациентов выделенные из аутопсийного материала грибы обнаруживали и в прижизненных анализах, а от других 4 больных наблюдали расхождения в спектре выделенных грибов в аутопсийном материале и в прижизненных исследованиях.

У больного М. из ротовой полости (зева), фекалий при жизни выделяли *C. albicans*, а в аутопсийном материале, который был доставлен для исследования позже 12 часов от момента смерти, обнаружили *C. glabrata*, *Trichosporon* sp., *Rhodotorula* sp. из печени, селезенки, легкого, кишечника. При этом от последнего прижизненного анализа до исследования аутопсийного материала прошло 19 суток, в течение которых, возможно, и произошла смена оппортунистических штаммов, с одной стороны, а, с другой, с

учетом применяемой антифунгальной терапии (флуконазол), произошел избыточный рост грибов, резистентных к терапии.

У больной Ф. при жизни с кожи, из зева и из фекалий выделяли *C. albicans*, из аутопсийного материала (кровь) — *C. glabrata*, что, возможно, также связано с отсроченным периодом прижизненных анализов и исследования аутопсийного материала (прошло 9 дней) и размножением резистентных к флуконазолу грибов.

У больного Х. при жизни однократно была выделена из фекалий *C. albicans*, а при исследовании аутопсийного материала (вена, кровь), которое проводили спустя 2 месяца, была выделена *C. glabrata*.

Наибольший интерес представляет еще одно клинико-микробиологическое наблюдение. При жизни больному Г. в качестве осложнения основного заболевания был клинически выставлен диагноз «менингоэнцефалит грибковый (криптококк)». В биоматериалах для микробиологического исследования (трахея, зев, фекалии) при жизни грибы не выявили. В аутопсийном материале были обнаружены *C. pelliculosa* (легкое, головной мозг) и *C. tropicalis* (кровь). При патологоанатомическом исследовании также были найдены поражения головного мозга, характерные для дрожжевых грибов, и был выставлен диагноз «очаговый продуктивный грибковый менингоэнцефалит».

Исследование патологоанатомического материала, в особенности — при подозрении на грибковое поражение, требует особого подхода. Здесь необходимо строгое соблюдение всех требований, предъявляемых к сбору, хранению и транспортировке аутопсийного материала, в противном случае интерпретация полученных результатов может быть не только затруднена, но и просто дискредитирует проведенные исследования.

В практической работе вид возбудителя и чувствительность к антимикотикам следует определять у больных при всех вариантах инвазивного кандидоза, а также при рецидивирующем течении и/или резистентности возбудителей поверхностного кандидоза к стандартной антимикотической терапии [3]. Стандарты для определения чувствительности к антимикотикам разработаны только для штаммов *Candida* sp. и носят рекомендательный характер для *Cryptococcus neoformans* согласно Clinical and Laboratory Standards Institute. В нашем исследовании чувствительность к антимикотикам была определена у 11 штаммов: *C. krusei* (3), *C. glabrata* (2), *C. guilliermondii* (2), *C. albicans* (2), *C. parapsilosis* (1), *C. pelliculosa* (1), выделенных из крови, БАЛ, аспирата трахеи, катетера, мочи, со слизистой оболочки зева и отделяемого уха. *C. krusei* во всех 3 случаях был резистентен к флуконазолу, так как обладает к нему природной устойчивостью; в одном случае проявила снижение чувствительности к амфотерицину В; все исследуемые штаммы резистентны к итраконазолу; в 2 случаях умеренно-резистентны к флюцитозину и в одном — чувствительна; к вориконазолу чувствительна (одно тестирование). *C. glabrata* — чувствительна к флюцитозину, амфотерицину В, ворикона-

золу; умеренно-резистентна к флуконазолу в одном случае, а в другом чувствительна; к итраконазолу один штамм резистентен и один умеренно-резистентен. *C. guilliermondii*, *C. albicans*, *C. parapsilosis* — чувствительны к флюцитозину, амфотерицину В, вориконазолу, флуконазолу, итраконазолу. *C. pelliculosa* — умеренно-резистентна к флюцитозину, чувствительна к амфотерицину В, вориконазолу, флуконазолу, итраконазолу. Данные по чувствительности к антимикотикам подтверждают последние тенденции: 28% изолятов *C. glabrata* устойчивы к флуконазолу, 46% изолятов — к итраконазолу, 31% изолятов *C. krusei* устойчивы к итраконазолу, в последние годы отмечено снижение чувствительности *C. krusei* и *C. glabrata* к амфотерицину В [3, 4].

Определение растворимого антигена *Aspergillus* sp. (галактоманна) в сыворотке крови используют для ранней диагностики инвазивного аспергиллеза методом латекс-агглютинации или ИФА [1, 10]. В нашем исследовании в 79 пробах сывороток от 43 пациентов, протестированных в реакции латекс-агглютинации, галактоманнан не обнаружили. Отсутствие антигена *Aspergillus* sp. при многократном исследовании свидетельствует в пользу отсутствия инвазивного аспергиллеза. Чувствительность реакции латекс-агглютинации ниже, чем определение галактоманна методом ИФА, но даже и этим методом, при достаточно высокой его специфичности, чувствительность составляет 71–95% [11]. В 94 пробах сывороток крови от 32 пациентов, исследованных на наличие IgG к грибам рода *Aspergillus*, антитела не выявили. В 37 пробах сыворотки крови от 20 пациентов, в которых определяли растворимый антиген *Candida* sp. (маннан) методом латекс-агглютинации, положительных результатов не было. В итоге нашими исследованиями подтверждено, что серодиагностика кандидоза у онкогематологических больных мало информативна. Выявление антигена маннана затруднено в связи с коротким временем выведения его из кровотока и связыванием антиманновыми антителами [1]. Из 78 проб сывороток крови от 29 пациентов, исследованных на наличие IgG к *Candida* spp., у 5 пациентов обнаружили IgG в титре 1:200; у 6 пациентов — в титре 1:400. У всех пациентов, у которых обнаружены IgG, в посевах отделяемого из зева, носа, фекалий были также выделены *Candida* spp., а в крови и ликворе не обнаружены, что, возможно, свидетельствует о наличии антител, вызванных поверхностной колонизацией ЖКТ *Candida* spp. [1, 7, 10, 11]. У онкологических больных с выраженными нарушениями клеточного иммунитета может развиваться криптококкоз. В нашем исследовании при подозрении на криптококкоз ЦНС исследовали ликвор у четырех пациентов и у одного — сыворотку крови, где определяли растворимый антиген *C. neoformans* (гликуроноксилманнан) методом латекс-агглютинации. Все пробы дали отрицательный результат [1, 10, 11].

В 2007–2008 гг. 10 пациентам была проведена

ретрансфузия размороженных аутологичных периферических стволовых (CD34+) клеток и четырех — аллогенная трансплантация периферических стволовых клеток (в 3-х от HLA родственного совместимого донора и 1 от неродственного совместимого донора). От этих больных для микробиологического исследования поступали различные биоматериалы, чаще всего фекалии и содержимое ротовой полости (зева). Количество проанализированных проб до трансплантации стволовых клеток составило 104, после — 130. Таким образом, сопоставление данных для выявления достоверности различий не представляется целесообразным. Среди выделенных грибов на первом месте — *C. albicans*, затем *C. glabrata*, *C. krusei* (Рис. 2). Как следует из приведенных данных, каких-либо принципиальных различий в спектре выделенных грибов до и после трансплантации не прослеживается (незначительные различия статистически недостоверны). Необходимо отметить, что из крови этих больных грибы не выделяли.



Рис. 2. Обнаружение грибов из различных локусов до и после трансплантации стволовых кровяных клеток (n = 213)

Из этих 14 больных трое погибли в результате прогрессирования основного заболевания, аутопсийный материал для анализа не поступал. У одного из этих пациентов до и после проведения трансплантации из фекалий неоднократно выделяли *C. glabrata*; получаемая антифунгальная терапия — каспофунгин, флуконазол. У другого больного до и после проведения трансплантации из фекалий неоднократно выявляли *C. albicans*, его же выделяли до проведения трансплантации из зева; получаемая антифунгальная терапия — каспофунгин, флуконазол. У третьего погибшего ребенка из фекалий однократно до проведения трансплантации выделяли *C. glabrata*, после — однократно *C. glabrata* и дважды — *C. tropicalis*; получаемая антифунгальная терапия — флуконазол.

Интересным представляется неоднократное выделение из фекалий от пациента Н. культуры *Mucor* sp., при этом рост гриба периодически обнаруживали с декабря 2007 г. по апрель 2008 г. В качестве антифунгальной терапии пациент получал системные антимикотики — каспофунгин, флуконазол, вориконазол, к которым зигмицеты не проявляют чувствительности. Закономерными выглядят и 2 других клинико-микробиологических наблюдения.

Так, до трансплантации у пациентки М. из фекалий однократно выделяли *C. krusei*, при этом получаемая антифунгальная терапия — каспофунгин, (флуконазол) — обусловила эрадикацию *C. krusei*. У больной Л. после проведения трансплантации из фекалий однократно выделяли *C. glabrata*, чего не наблюдали до трансплантации. Получаемая антифунгальная терапия (флуконазол, вориконазол), по-видимому, не обеспечивала санации кишечника в силу возможной резистентности *C. glabrata* к данным препаратам.

Таким образом, принципиальных различий в спектре выделенных грибов до и после трансплантации стволовых клеток выявить не удалось; здесь, по-видимому, главным является назначение адекватной антифунгальной терапии.

ВЫВОДЫ

1. Назрела необходимость решения вопроса о доказанности инвазивного микоза. Доказанным, по нашим данным, был один случай (при выделении *V. capitatus* из крови и аутопсийного материала) и три случая можно отнести к категории вероятно инвазивного микоза (при выделении из крови

C. pelliculosa, *C. guilliermondii*), наблюдавшиеся до проведения трансплантации стволовых клеток.

2. Для оценки категории микоза («доказанный», «вероятный», «возможный») необходим анализ большего числа параметров. Среди них основными являются результаты исследования наиболее информативных, кроме крови, биоматериалов для выявления инвазивных поражений — биоптатов, БАЛ, придаточных пазух носа и др.

3. Принципиальных различий в спектре выделенных грибов до и после трансплантации стволовых клеток выявить не удалось. Наиболее часто наблюдали колонизацию грибами гастроинтестинального тракта, обусловленную прежде всего *C. albicans*, затем — *C. glabrata* и *C. krusei*.

4. Ныне целесообразна смена системного, применяемого профилактически, антимикотика — флуконазола — на более адекватный, не подвергающийся адсорбции из кишечника, из группы полиенов — нистатин, натамицин, с помощью которых возможно упредить рост числа резистентных штаммов к азоловым антимикотикам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аравийский Р.А., Климко Н.Н., Васильева Н.В. Диагностика микозов. — СПб.: Изд. дом СПбМАПО, 2004. — 185 с.
2. Йоргенсен Дж.Х., Пфаллер М.А. Микробиологический справочник для клиницистов. — М.: Бином, 2006. — 243 с.
3. Климко Н.Н. Микозы: диагностика и лечение. — М.: Премьер МТ, 2007. — 331 с.
4. Клясова Г.А. Инвазивные микозы в онкогематологии: современное состояние проблемы // Современная онкология. — 2001. — Т.3, № 2. — С. 10-17.
5. Материалы совместных исследований: Белобородова Н.В., Бирюкова А.В., Курчавова В.А., Архипова Ж.И., Кагермазова М.К., Поздоровкина В.В., Рогатина Е.А., Вострикова Т.Ю., Крутских Е.Н. Анализ этиологической структуры инвазивных грибковых осложнений у пациентов с онкогематологическими заболеваниями // Этиология, распространенность и критерии риска грибковых инфекций на современном этапе. — С. 12-18. <http://www.rusmedserv.com/antibioroom/fungycont.htm>
6. Ascioğlu S., Rex J., de Pauw B. et al. Defining opportunistic invasive fungal infection in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplantants: an international consensus // Clin. Infect. Dis. — 2002. — Vol. 34. — P.7-14.
7. Елинов Н.П. *Candida* species и кандидемия. Состояние проблемы // Проблемы медицинской микологии. — 2000. — Т.3, №1. — С. 4-14.
8. Шульпекова Ю.О. Кандидоз кишечника // Русский медицинский журнал. — 2002. — №1. — С. 25-30.
9. МУ 4.2.2039-05. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Техника сбора и транспортировки биоматериалов в микробиологические лаборатории.
10. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Грибковые инфекции: руководство для врачей. — М.: Бином, 2008. — 480 с.
11. Мари П.Р., Шей И.Р. Клиническая микробиология: краткое руководство. — М.: Мир, 2006. — 425 с.

Поступила в редакцию журнала 03.08.2009

Рецензент: М.А.Шевяков



АСПЕРГИЛЛЕЗ ГОЛОВНОГО МОЗГА: ОПИСАНИЕ ЧЕТЫРЕХ КЛИНИЧЕСКИХ СЛУЧАЕВ

¹Хостелиди С.Н. (аспирант)*, ²Борзова Ю.В. (аспирант), ²Десятник Е.А. (аспирант), ²Игнатъева С.М. (зав.лаб.), ³Зубаровская Н.И. (зав.отд.), ⁴Колбин А.С. (нач.лаб.), ⁵Зюзгин И.С. (зав.отд.), ⁴Бойченко Э.Г. (зав.отд.), ²Богомолова Т.С. (зав.лаб.), ²Васильева Н.В. (директор), ¹Климко Н.Н. (зав.каф.)

¹Кафедра клинической микологии, иммунологии и аллергологии ГОУ ДПО СПб МАПО Росздрава;

²Научно-исследовательский институт медицинской микологии им. П.Н.Кашкина; ³Городская больница №31; ⁴Детская городская больница №1; ⁵Ленинградская областная клиническая больница, Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2009

Описаны четыре клинических случая инвазивного аспергиллеза головного мозга, наблюдаемых с 2005 по 2008 гг. Диагноз был установлен на основании критериев EORTC/MSG. Галактоманнан в сыворотке крови и ликворе определяли с помощью тест-системы «Platelia Aspergillus». Для обнаружения поражения ЦНС использовали магнитно-резонансную томографию. Лечение проводили вориконазолом в адекватной дозе.

Ключевые слова: вориконазол, инвазивный аспергиллез, нейтропения, ЦНС

CNS ASPERGILLOSIS: DESCRIPTION OF FOUR CLINICAL CASES

¹Khostelidi S.N. (postgraduate student),
²Borzova Yu.V. (postgraduate student),
²Desyatic Ye.A. (postgraduate student),
²Ignatyeva S.M. (head of the laboratory),
³Zubarovskaya N.I. (head of the department),
⁴Kolbin A.S. (head of the laboratory),
⁵Zyuzgin I.S. (head of the department),
⁴Boychenko E.G. (head of the department),
²Bogomolova T.S. (head of the laboratory),
²Vasilyeva N.V. (director), ¹Klimko N.N. (head of the chair)

¹Department of Clinical Mycology, Allergology and Immunology SEI APE SPb MAPE; ²Kashkin Research

* Контактное лицо: Хостелиди Софья Николаевна
Тел.: (812)303-51-46

Institute of Medical Mycology; ³City Hospital №31;
⁴Children's City Hospital №1; ⁵Leningrad Regional
Clinical Hospital, Saint-Petersburg, Russia

Four cases of aspergillosis CNS observed since 2005 for 2008 have been described in the article. We used criteria EORTC/MSG for diagnosis. Galactomanan in blood and liquids found out using test systems «Platelia Aspergillus». Magnitno-resonant tomography used for detection of the brain lesion. Treatment — voriconazole in an adequate dose.

Key words: CNS, invasive aspergillosis, neutropenia, voriconazole

ВВЕДЕНИЕ

Поражение головного мозга *Aspergillus* spp., по данным разных исследователей, составляет от 1–3% до трети всех случаев инвазивного аспергиллеза. Аспергиллез ЦНС обычно развивается в результате гематогенной диссеминации из первичного очага поражения (легких, околоносовых пазух). Общая летальность при аспергиллезе ЦНС составляет около 100%.

Публикации об аспергиллезе центральной нервной системы (ЦНС) в нашей стране единичны, поэтому мы провели анализ 4 случаев инвазивного аспергиллеза головного мозга в период с 2005 по 2008 гг.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе представлены описания нескольких клинических случаев инвазивного аспергиллеза ЦНС. Диагноз был установлен на основании критериев EORTC/MSG [1]. Галактоманнан в сыворотке крови и ликворе определяли с помощью тест-системы «Platelia Aspergillus». Для обнаружения поражения ЦНС использовали магнитно-резонансную томографию (МРТ) головного мозга в обычном режиме и с контрастированием.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Описание клинического случая №1.

У больного Р., 35 лет, в июле 2003 г. диагностировали острый миелобластный лейкоз (ОМЛ), 45 X–Y; проведено 2 курса полихимиотерапии (ПХТ), достигнута 1 клинико-гематологическая ремиссия. В августе 2003 г. на фоне нейтропенической лихорадки появились КТ-признаки очагового поражения легких, положительные тесты «Platelia Aspergillus», диагностировали инвазивный аспергиллез легких, по поводу чего назначали терапию итраконазолом в дозе 600 мг /сут с положительной динамикой. В феврале 2004 г. получал итраконазол 800 мг/сут в период агранулоцитоза. В январе 2005 г., во время очередного курса ПХТ по схеме «НАМ», развилась панцитопения, появилась лихорадка до 38,9 °С, не купирующаяся антибиотиками широкого спектра действия. Через сутки стала нарастать очаговая неврологическая симптоматика (дизартрикуляция, сглаженность носогубной складки справа). По данным МРТ: в конвекситальных отделах правой лобной доли — патологическое объемное образование, активно накапли-

вающее контрастное вещество.

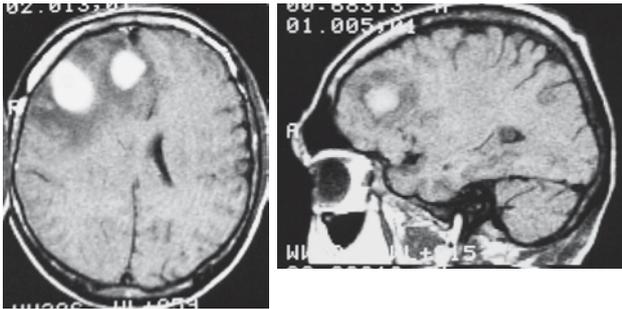


Рис.1. Больной Р. Данные МРТ до лечения

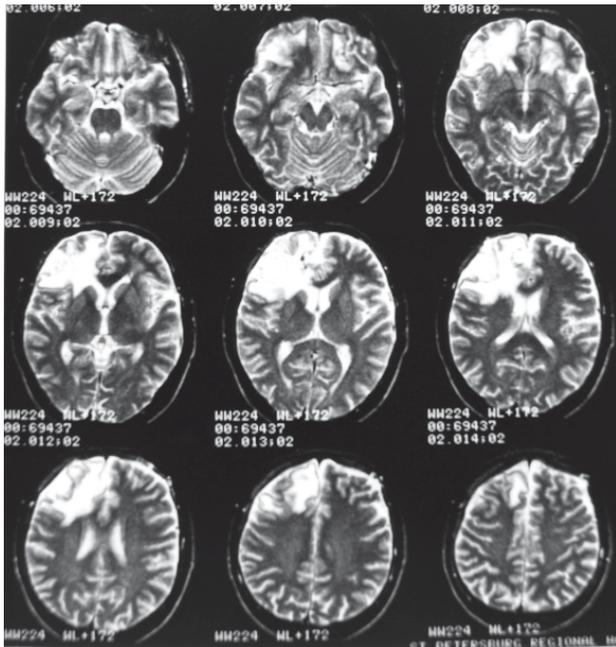


Рис. 2. Больной Р. Данные МРТ до лечения

На основании полученных данных выставлен диагноз: вероятный аспергиллез ЦНС. Назначена терапия вориконазолом 400 мг/сут, на фоне приема которого отмечали положительную динамику: нормализовалась температура тела, стали менее выражены неврологические симптомы, на МРТ визуализировались очаги поражения, но меньшего размера и интенсивности. В дальнейшем пациент получал итраконазол в дозе 400 мг/сут. Общая продолжительность лечения — 6 месяцев. В мае 2005 г. была достигнута ремиссия инвазивного аспергиллеза. В 2006 году пациент погиб в результате рецидива основного заболевания.

Описание клинического случая №2.

Больная С., 19 лет. С января 2005 г. находилась под наблюдением гематологов по поводу ОМЛ, М1, вариант, стандартный риск. С 13.01.05 г. начата специфическая терапия по протоколу AMF-BFM-98. Полная клиничко-гематологическая ремиссия достигнута 02.02.2006 г. Химиотерапия по протоколу завершена в мае 2006 г. Проведение химиотерапии осложнилось постцитостатической панцитопенией, появилась ли-

хорадка, боль в грудной клетке, кашель, одышка.

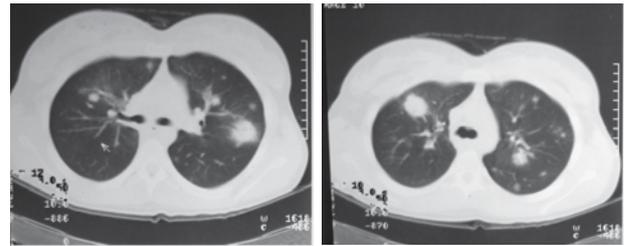


Рис. 3. Больная С. КТ легких до лечения

При обследовании на КТ — признаки очагового поражения легких, положительные тесты «Platelia Aspergillus».

С 2 июня 2005 г. была начата антимикотическая терапия итраконазолом (орунгал в капсулах). В связи с развитием «нежелательных явлений» (выраженная тошнота, рвота) 9 июня была проведена смена препарата на вориконазол в дозе 400 мг в сутки. Достигнута положительная динамика инвазивного аспергиллеза легких и основного заболевания. В мае 2006 года появились слабость, сонливость, фебрильная лихорадка, очаговая неврологическая симптоматика. На МРТ головного мозга были выявлены очаговые образования в правом полушарии — 1,7×1,4 см, в левом полушарии в затылочной доле — 1,0×0,9 см.

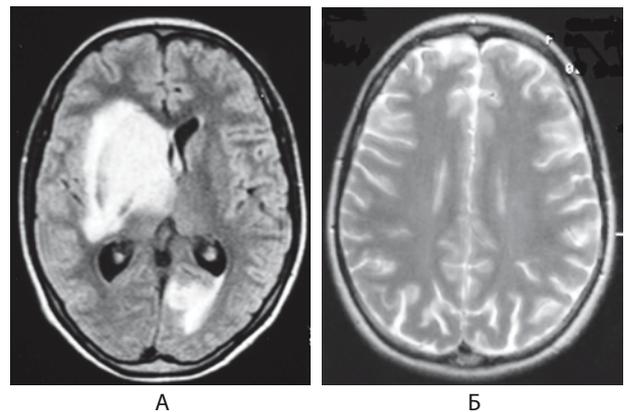


Рис. 4. Больная С. Данные МРТ до лечения (А) и после лечения (Б)

Учитывая анамнез и выявленные изменения на МРТ, поражение головного мозга было расценено как грибковое. Назначена антифунгальная терапия вориконазолом 400 мг/сут, затем итраконазолом 400 мг/сут. По данным МРТ головного мозга в динамике, лечение было эффективным (уменьшение размеров очагов до 0,48 и 0,8 см в диаметре). Больная была консультирована нейрохирургом, от оперативного лечения решено воздержаться. За 2006 год впервые отрицательную динамику инфильтративно-очаговых изменений в лёгких отметили в августе 2006 года.

На контрольной КТ от 08.08.06 г. выявили появление нового очага в сегменте S3 верхней доли левого лёгкого. Рекомендовано наблюдение. На КТ через 1 месяц 07.09.06 г. в лёгких сохранялись прежние изменения. Принято решение начать комбини-

рованную антимикотическую терапию итраконазолом 400 мг/сут и каспофунгином 50 мг/сут, далее итраконазол был заменен на вориконазол 400 мг/сут. При последующих рентгенологических исследованиях органов грудной клетки наблюдали стойкую положительную динамику. Комбинированная терапия данными препаратами была продолжена до 28 дней. Достигнута полная ремиссия ОМЛ и инвазивного аспергиллеза. Общая продолжительность антифунгальной терапии — 20 месяцев.

Описание клинического случая №3.

Больной П., 16 лет. В сентябре 2006 г. диагностировали острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), L1, Common – иммунологический вариант. Провели ИХТ – СОАЛЛ 92 для высокого риска. С июня 2007 г. получал поддерживающую терапию. В ноябре 2007 г. поступил в экстренном порядке в ДГБ №1 с жалобами на «онемение» лица, затрудненную речь, снижение чувствительности в правой руке и левой ноге. Клиническая картина развивалась остро. На МРТ головного мозга очагов ишемии и гематом не выявили. Состояние было расценено как острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК) неясного генеза. Через три дня появилась лихорадка. Была назначена массивная антибактериальная терапия – без эффекта. При повторной МРТ ЦНС выявили четыре острых воспалительных очага. В сыворотке крови дважды был обнаружен галактоманнан методом «Platelia Aspergillus». Состояние расценили как вероятный аспергиллез головного мозга и назначили антифунгальную терапию вориконазолом (600 мг/сут).

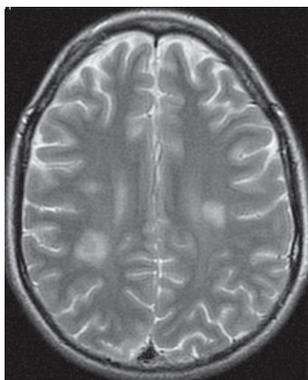


Рис. 5. Больной П. Данные МРТ до лечения

Общая продолжительность антимикотического лечения составила 159 дней. Неврологическая симптоматика полностью нивелировалась. На МРТ головного мозга в динамике отмечали уменьшение размеров патологических очагов. Во время антифунгальной терапии продолжали эффективное лечение ОЛЛ. В настоящее время пациент продолжает получать поддерживающую терапию по поводу основного заболевания.

Описание клинического случая №4.

Больной П., 4 года. В декабре 2007 г. диагностировали ОЛЛ (J2) пре-В иммунный вариант. Получал

ПХТ по протоколу ALL-MB-2002. В январе 2008 г. появилась рефрактерная к антибиотикам фебрильная лихорадка, нейтропения. На КТ органов грудной клетки выявили признаки очаговой пневмонии, в связи с чем назначена эмпирическая противогрибковая терапия амфотерицином В. В феврале 2008 г. достигнута клиничко-гематологическая ремиссия ОЛЛ. Планировали трансплантацию кроветворных стволовых клеток (ТКСК), однако у пациента вновь развилась рефрактерная к антибиотикам лихорадка, общая и очаговая неврологическая симптоматика (сонливость, вялость, мышечная гипотония, тонико-клонические судороги, правосторонний гемипарез). На МРТ головного мозга с контрастированием в затылочной и теменной долях обнаружили объемные образования 0,42×0,36 и 0,38×0,29 см.

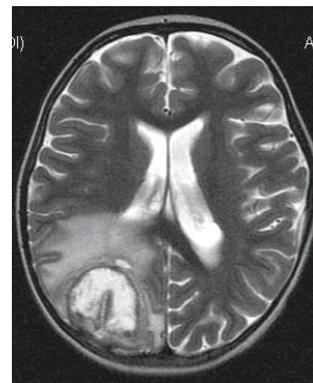


Рис. 6. Больной Ш. Данные МРТ до лечения

Эмпирически начато лечение вориконазолом — 200 мг/сут с положительной клинической и МРТ динамикой. В мае 2008 г. в сыворотке крови и СМЖ выявили галактоманнан методом «Platelia Aspergillus». Диагностировали аспергиллез ЦНС и рекомендовали продолжить лечение вориконазолом — 400 мг/сут. Антимикотическую терапию пациент получал в течение 12 месяцев. На фоне вторичной антифунгальной профилактики провели ТКСК. Достигнута стойкая ремиссия как основного заболевания, так и грибкового поражения головного мозга.

ОБСУЖДЕНИЕ

Увеличение частоты инвазивного аспергиллеза в последние годы является результатом роста численности иммунокомпрометированных больных. В экономически развитых странах частота инвазивного аспергиллеза составляет 12-34 случаев на 1 миллион населения в год. Отмечено, что стали чаще встречаться такие, ранее редкие формы инвазивного аспергиллеза, как поражение ЦНС [2].

Аспергиллез ЦНС характеризуется очень высокой летальностью (80–99%), его нередко выявляют лишь посмертно. Обычно поражение ЦНС возникает в результате гематогенной диссеминации, а также распространения инфекции из придаточной пазухи или орбиты. Частота поражения ЦНС зависит от степени иммуносупрессии у разных категорий больных и варьирует от 3 до 30% [2, 3]. Основными вариан-

тами церебрального аспергиллеза являются абсцесс и кровоизлияние в вещество головного мозга, менингит развивается редко. Клинические проявления (головная боль, головокружение, тошнота и рвота, очаговые неврологические симптомы и нарушение сознания) не специфичны [4].

Появления необъясненной неврологической симптоматики у больных с инвазивным аспергиллезом другой локализации может свидетельствовать о поражении грибами ЦНС. Церебральный аспергиллез обычно является проявлением диссеминированного заболевания, характеризуется неспецифическими симптомами и поздней диагностикой. Дифференциальную диагностику проводят с бактериальными абсцессами, туберкулезом, токсоплазмозом, лимфомой, а также с другими микотическими поражениями ЦНС [5].

Лечение аспергиллеза ЦНС остается малоэффективным, и большинство больных умирает. Следует учитывать также, что поступление антимикотиков в очаг поражения часто затруднено в связи с низкой пенетрацией некоторых препаратов через гематоэнцефалический барьер и окклюзией сосудов ангиоинвазивными *Aspergillus* spp.

При лечении инвазивного аспергиллеза используют следующие антимикотики: амфотерицин В (АмВ), итраконазол, каспофунгин, вориконазол. АмВ плохо проникает в спинномозговую жидкость (СМЖ) и ткань головного мозга. Итраконазол также создает небольшие концентрации в СМЖ, но при этом хорошо накапливается в тканях головного мозга. Высокомолекулярный каспофунгин плохо проникает в СМЖ и не создает высокие концентрации в тканях головного мозга. Только вориконазол отличается

высокой концентрацией как в СМЖ, так и в тканях головного мозга, что и делает его препаратом выбора для лечения аспергиллеза головного мозга [6].

Эффективность вориконазола при аспергиллезе ЦНС зависит от основного заболевания и варьирует от 16% у реципиентов алло-ТКСК до 54% — у больных гемобластомами. Описаны случаи, когда монотерапия вориконазолом не достаточно эффективна. У таких пациентов рекомендуют использовать комбинацию вориконазола и липидного комплекса амфотерицина В или вориконазола и каспофунгина. Лечение продолжают до стойкой стабилизации неврологического статуса и размеров очагов поражения на КТ или МРТ головного мозга (отсутствия редукции размеров очагов в течение 3 месяцев терапии). Обычная продолжительность антифунгальной терапии — не менее 6–12 месяцев [7, 8].

У всех наблюдаемых нами пациентов микотическая патология развивалась на фоне основного гематологического заболевания (ОЛЛ и ОМЛ). У трех из четырех пациентов первично инфекционный процесс локализовался в легких. Антимикотическую терапию проводили итраконазолом, амфотерицином В или вориконазолом в малой дозе. В результате диссеминации процесса новые очаги инфекции были обнаружены при помощи МРТ в ЦНС. Дальнейшая коррекция терапии позволила достичь ремиссии инвазивного аспергиллеза головного мозга. Продолжительность лечения антифунгальными препаратами составляла от 6 до 20 месяцев. Таким образом, наш опыт подтверждает, что вориконазол является препаратом выбора в лечении инвазивного аспергиллеза головного мозга.

ЛИТЕРАТУРА

1. Елинов Н.П. Некоторые дефиниции, или определения в медицинской микологии // Ж. Проблемы медицинской микологии. - 2007. - Т.9, №4. - С. 12-18.
2. Клишко Н.Н. Микозы: диагностика и лечение. Руководство для врачей. 2-е изд. переработанное и дополненное. — М.: Ви Джи Групп, 2008. — 336 с.
3. Dotis J., Iosifidis E., Roilides E. Central nervous system aspergillosis in children: a systematic review of reported cases // Int. J. Infect. Dis. — 2007. - Vol.11, №5. - P.381-393.
4. Azarpira N., Esfandiari M., Bagheri M.H., et al. Cerebral aspergillosis presenting as a mass lesion // Braz. J. Infect. Dis. — 2008. - Vol.12, №4.
5. Sood S., Sharma R., Gupta S., et al. Neuroaspergillosis in an immunocompetent patient // Indian J. Med. Microbiol. — 2007. - Vol.25, №1. - P.67-69.
6. Clemons K.V., Espiritu M., Parmar R., Stevens D.A. Comparative efficacies of conventional amphotericin b, liposomal amphotericin B (AmBisome), caspofungin, micafungin, and voriconazole alone and in combination against experimental murine central nervous system aspergillosis // Antimicrob. Agents Chemother. — 2005. - Vol.49, №12. - P.4867-4875.
7. Espinel-Ingroff A., Johnson E., Hockey H., Troke P. Activities of voriconazole, itraconazole and amphotericin B in vitro against 590 moulds from 323 patients in the voriconazole Phase III clinical studies // J. of Antimicrob. Chemother. — 2008. - Vol.61, №3. - P.616-620.
8. Redmond A., Dancer C., Woods M.L. Fungal infections of the central nervous system: A review of fungal pathogens and treatment // Neurol. India. — 2007. - Vol.55, №3. - P.251-259.

Поступила в редакцию журнала 07.09.2009

Рецензент: Черноятова Р.М.



ХРОНИЧЕСКИЙ ИНВАЗИВНЫЙ АСПЕРГИЛЛЕЗ ЛЕГКИХ У БОЛЬНЫХ В САНКТ- ПЕТЕРБУРГЕ

¹Борзова Ю.В. (аспирант)*, ¹Десятник Е.А. (аспирант), ¹Хостелиди С.Н. (аспирант), ²Попова М.О., ¹Чернопятова Р.М. (зав.отд.), ¹Богомолова Т.С. (зав.лаб.), ¹Игнатъева С.М. (зав.лаб.), ¹Шурпицкая О.А. (зав.лаб.), ³Колбин А.С. (нач.лаб.), ⁴Зюзгин И.С. (зав.отд.), ²Зубаровская Н.И. (зав.отд.), ⁵Климович А.В. (зав.отд.), ¹Васильева Н.В. (директор), ¹Климко Н.Н. (зав.каф.)

¹НИИ медицинской микологии им. П. Н. Кашкина и кафедра клинической микологии, иммунологии и аллергологии ГОУ ДПО СПб МАПО; ²Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова — институт детской гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой, Россия ³Детская городская больница №1; ⁴Ленинградская областная клиническая больница; ⁵Городская больница №31, Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2009

*Хронический инвазивный аспергиллез легких (ХИАЛ) – малоизученная проблема. Мы представили данные о 62 больных ХИАЛ, полученные из регистра инвазивного аспергиллеза (ИА) в Санкт-Петербурге. Контрольную группу составили 151 больной острым инвазивным аспергиллезом легких (ОИАЛ). В Санкт-Петербурге ХИАЛ составил 29% от общего количества инвазивного аспергиллеза легких (ИАЛ). Установлено, что ХИАЛ чаще болеют взрослые – 91%, медиана возраста – 40,5. Соотношение мужчин и женщин составило 1,5:1. Показано, что ХИАЛ достоверно чаще развивается на фоне хронических заболеваний легких, таких как хроническая обструктивная болезнь легких, туберкулез легких, бронхиальная астма. Кроме того, фактором риска развития ХИАЛ является лимфоцитопения. Основные возбудители ХИАЛ – *Aspergillus fumigatus* (51%), *A. niger* (30%), *A. flavus* (9%). В клинической картине ХИАЛ достоверно чаще выявляют кровохарканье и бронхообструктивный синдром. По данным компьютерной томографии (КТ), при ХИАЛ были достоверно чаще зарегистрированы двусторонние, диффузные поражения и симптом «полумесяца». Больные ХИАЛ чаще получали 2 и более антифунгальных препарата. ХИАЛ протекает более благоприятно, чем ОИАЛ. Выживаемость в течение 12 недель составила 96%, в течение 12 месяцев – 43%.*

Ключевые слова: *Aspergillus*, острый инвазивный аспергиллез легких хронический инвазивный аспергиллез легких

CHRONIC INVASIVE PULMONARY ASPERGILLOSIS AT PATIENTS IN SAINT PETERSBURG

¹Borzova Y.V. (postgraduate student), ¹Desyatnik E.A. (postgraduate student), ¹Khostelidi S.N. (postgraduate student), ²Popova M.O., ¹Chernopyatova R.M. (head of the department), ¹Bogomolova T.S. (head of the laboratory), ¹Ignatyeva S.M. (head of the laboratory), ¹Shchurpitskaya O.A. (head of the laboratory), ³Kolbin A.S. (head of the laboratory), ⁴Zyuzgin I.S. (head of the department), ²Zubarovskaya N.I. (head of the department), ⁵Klimovich A.V. (head of the department), ¹Vasilyeva N.V. (director), ¹Klimko N.N. (head of the chair)

¹Kashkin Research Institute of Medical Mycology, Chair of Clinical Mycology, Immunology and Allergology, of SEI APE SPb MAPE; ²Saint Petersburg State Medical University named I.P. Pavlov — Institute of Children's hematology and transplantology named R.M. Gorbachova, Saint Petersburg, Russia. ³Children's hospital №1; ⁴Leningrad Regional Clinical Hospital; ⁵City Hospital, Saint Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2009

*The chronic invasive pulmonary aspergillosis (CIPA) is a little studied problem. We have presented data about 62 patients with CIPA received from the Register of invasive aspergillosis (IA) in Saint Petersburg. Control group consisted of 151 patients with acute invasive pulmonary aspergillosis (AIPA). CIPA in Saint Petersburg composed 29% from common quantity of invasive pulmonary aspergillosis (IPA). It was established CIPA there is at adults – 91%, a median of age – 40,5. Correlation of men and women composed 1,5:1. It was shown that CIPA development reliably more often in a background of chronic pulmonary diseases, such as chronic obstructive pulmonary disease, pulmonary tuberculosis, bronchial asthma. Besides, lymphocytopenia is a risk factor of CIPA development. Main pathogens of CIPA are *Aspergillus fumigatus* (51%), *A. niger* (30%), *A. flavus* (9%). In the clinical picture of CIPA reliably more often there are haemoptysis and bronchoobstructive syndrome. Bilateralis diffused defeats and "air crescent sing" reliably more often registered in the computer tomography (CT) when CIPA. Patients with CIPA have received 2 and more antifungal drugs: CIPA flows more favorably, than AIPA. The surviving for 12 weeks composed 96%, for 12 months – 43%.*

Key words: acute invasive pulmonary aspergillosis, *Aspergillus*, chronic invasive pulmonary aspergillosis

* Контактное лицо: Борзова Юлия Владимировна
Тел.: (812) 303-51-40

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время хронический инвазивный аспергиллез легких — недостаточно изученная проблема, сообщения по этой теме в литературе единичны и основаны на малом количестве наблюдений.

Цель нашего исследования — изучить распространенность, факторы риска, этиологию, основные клинические признаки и результаты лечения хронического инвазивного аспергиллеза легких в Санкт-Петербурге.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведено многоцентровое ретроспективное исследование в 14 многопрофильных стационарах Санкт-Петербурга в период с 1998 по 2009 гг.

Инвазивный аспергиллез легких классифицировали как доказанный, вероятный и возможный, используя критерии Европейской организации по изучению и лечению рака и Национального института здоровья США 2008 г. (EORTC/MSG) [1].

Для установления диагноза ХИАЛ мы использовали критерии диагностики Denning D.W. (2003) и соавторов [2]: инвазивный аспергиллез с длительностью заболевания более 3-х месяцев или рецидив заболевания в течение 6 месяцев от его начала.

Материал для культурального исследования (бронхоальвеолярный лаваж — БАЛ, мокроту, аспират плевральной полости и пр.) засеивали на среду Сабуро, посеивали инкубировали при 37 °С в течение 10 дней. Полученные культуры *Aspergillus* идентифицировали по морфологическим признакам. При микроскопии использовали нативный препарат или окраску калькофлюором белым. Гистологический материал исследовали с окраской PAS-методом или по методу Гомори-Грокотт.

Содержание галактоманнана в сыворотке крови, БАЛ и спинномозговой жидкости больных определяли методом ELISA «Platelia Aspergillus; Bio-Rad». Положительным считали коэффициент оптической плотности более 0,5 [1].

Для диагностики инвазивного аспергиллеза легких мы также использовали инструментальные методы исследования — компьютерную томографию или рентгенографию легких [1].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью прикладных программ для ПК: «Statistica 6.0» и «Microsoft Office Excel 2003». Мультивариантный анализ выживаемости был проведен при помощи метода Каплана-Мейера [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Создан регистр больных инвазивным аспергиллезом из 14 многопрофильных стационаров Санкт-Петербурга в период с 1998 по 2009 гг. В него вошли данные о 300 пациентах. Проследить течение заболевания и разделить ИАЛ на острый и хронический мы смогли у 213 пациентов.

Хронический инвазивный аспергиллез легких

(ХИАЛ) выявили у 62 (29%) обследованных больных, острый инвазивный аспергиллез легких (ОИАЛ) — у 151 (71%).

Соотношение мужчин (n=37) и женщин (n=25) среди пациентов с ХИАЛ составило 1,5:1, среди пациентов ОИАЛ — 1,4:1. ХИАЛ у взрослых составляет 91%, медиана возраста — 40,5; ОИАЛ — 79%, медиана возраста — 43, при этом хронический инвазивный аспергиллез возникает достоверно реже у детей — 8%, в сравнении с ОИАЛ — 21% (p=0,009).

При сравнительном анализе «фоновых» заболеваний и факторов риска мы выявили, что ХИАЛ достоверно чаще развивается на фоне негематологических заболеваний (хронические заболевания легких при ХИАЛ составили 14%), тогда как при ОИАЛ гематологические заболевания составили 93% (140), а негематологические — всего 7% (p=0,03) (табл.1).

Таблица 1.

«Фоновые» заболевания у больных хроническим и острым инвазивным аспергиллезом легких

ХИАЛ (n=62)		ОИАЛ (n=151)	
гематологические заболевания	50 (80%)*	гематологические заболевания	140 (93%)
хронические заболевания легких	9 (14%)*	хронические заболевания легких	2 (1,4%)
ХОБЛ, бронхиальная астма, хронический необструктивный бронхит	5 (8%)	ХОБЛ, бронхиальная астма, хронический необструктивный бронхит	0
туберкулез	3 (5%)	туберкулез	1 (0,7%)
гистиицитоз Х	1 (1,6%)	силикоз легких	1 (0,7%)
заболевания соединительной ткани	1 (1,6%)	онкологические заболевания	3 (1,9%)
лекарственный агранулоцитоз после приема НПВС на фоне ОРВИ	1 (1,6%)	заболевания соединительной ткани	2 (1,3%)
трансплантация почки	1 (1,6%)	вирусный менингит	1 (0,7%)
		хронический гепатит	1 (0,7%)
		СПИД	1 (0,7%)
		хирургическое вмешательство на сердце	1 (0,7%)

*P < 0,05

Кроме того, ХИАЛ развивался у больных с заболеваниями соединительной ткани, лекарственным агранулоцитозом, трансплантацией почки.

Основными факторами риска у больных ХИАЛ и ОИАЛ были: нейтропения < 0,5·10⁹, лимфопения < 1,0·10⁹, использование препаратов, оказывающих значительный иммуносупрессивный эффект, использование системных глюкокортикостероидов, трансплантация кровяных стволовых клеток, хирургические вмешательства.

Сравнительный анализ факторов риска у больных с ХИАЛ и ОИАЛ представлен в таблице 2. При ХИАЛ лимфопению выявляли достоверно чаще (p=0,03), а назначение цитостатической терапии — достоверно реже (p=0,02) чем при ОИАЛ.

Таблица 2.

Основные факторы риска развития хронического и острого инвазивного аспергиллеза легких

Факторы риска	ХИАЛ	ОИАЛ
Лимфопения	76%*	55%
Цитостатическая полихимиотерапия (ПХТ)	76%*	90%
Нейтропения	71%	80%
Системные глюкокортикостероиды (СГКС)	57%	57%
Трансплантация кроветворных стволовых клеток (ТКСК)	34%	29%
Хирургические вмешательства	9%	5%

*P < 0,05

До развития микоза легких в группе ХИАЛ оперативному вмешательству подверглись 6 (9%) пациентов: у 5 удалены 1 или несколько долей легкого в анамнезе, у 1 проведена трансплантация почки с последующим ее удалением в связи с неприживлением. В группе больных ОИАЛ прооперировано 6 (5%) пациентов: протезирование митрального клапана при ревматизме, коррекция пролапса митрального клапана, удаление аденокарциномы слепой кишки, ревизия брюшной полости при перфорации слепой кишки и длительное ИВЛ, аппендэктомия.

По сравнению с острым, ХИАЛ достоверно реже развивался на фоне бактериальной инфекции (47% vs 19% (p=0,001)).

Результатами исследований подтвержден широкий спектр возбудителей ХИАЛ — *Aspergillus fumigatus* выделен у 51% больных (при ОИАЛ — у 23%), кроме того, возбудителями ХИАЛ были *A. niger* и *A. flavus* (табл.3).

Таблица 3.

Возбудители хронического и острого инвазивного аспергиллеза легких

Возбудитель	ХИАЛ	ОИАЛ
<i>A. fumigatus</i>	51%	23%
<i>A. niger</i>	30%	34%
<i>A. flavus</i>	9%	7,6%
<i>Aspergillus spp.</i>	6%	27%
<i>A. nidulans</i>	3%	4%
<i>A. ochraceus</i>	0%	4%

Основными клиническими проявлениями ИАЛ были: повышение температуры тела, одышка, кашель, кровохарканье, бронхообструктивный синдром (табл. 4).

Таблица 4.

Клинические проявления хронического и острого инвазивного аспергиллеза легких

Признаки	ХИАЛ	ОИАЛ
повышение температуры тела	88%	89%
одышка	70%	63%
кашель	70%	63%
кровохарканье	22%*	12%*
боли в грудной клетке	16%	25%
бронхообструктивный синдром	14%*	8%*

*P<0,05

Установлено, что кровохарканье и бронхообструктивный синдром при ХИАЛ развивались достоверно чаще, чем при остром, в то же время боли в грудной клетке при ХИАЛ возникали реже. Следует отметить, что повышение температуры тела — наиболее частый клинический признак в обоих случаях.

В нашем исследовании при ХИАЛ достоверно реже были выявлены очаги аспергиллеза другой локализации: в центральной нервной системе, в придаточных пазухах носа, глазах, миокарде, печени, селезенке и лимфоузлах (6,5% vs 12,5% при ОИАЛ (p=0,04)).

При изучении КТ удалось установить, что для ХИАЛ характерно более распространенное поражение легких — двустороннее, диффузное поражение и симптом «полумесяца» при ХИАЛ были зарегистрированы достоверно чаще, чем при ОИАЛ (табл.5).

Таблица 5.

Сравнительная характеристика КТ признаков при хроническом и остром инвазивном аспергиллезе легких

Признаки	ХИАЛ	ОИАЛ
КТ-признаки микоза легких	98%	78%
двустороннее поражение	83%*	66%
диффузное поражение легких	65%*	39%
инфильтративные изменения	70%	55%
симптом «матового стекла»	36%	36%
симптом «полумесяца»	28%*	13%

*P < 0,05

Галактоманнан в сыворотке крови определяли у 90% больных при ХИАЛ и у 77% больных — при ОИАЛ, из них при ХИАЛ результат был положительным в 70% случаев, при ОИАЛ — в 55% случаев.

В нашем исследовании 79% больным с ХИАЛ и 42% больным с ОИАЛ было проведено прямое микроскопическое исследование биосубстратов (мокроты и/или БАЛ), при этом положительный результат был получен в 45% случаев для ХИАЛ и в 28% случаев — для ОИАЛ. Культуральное исследование было проведено в 74% и в 42% случаев соответственно. Возбудитель был выделен при ХИАЛ в 52%, при ОИАЛ — в 34% случаев.

У больных ХИАЛ достоверно чаще диагноз устанавливали с использованием гистологических, культуральных и серологических методов исследования, поэтому ХИАЛ по классификации Европейской организации по изучению и лечению рака 2008 г. (EORTC/MSG) [1] был верифицирован в 2 раза чаще как доказанный или вероятный, тогда как ОИАЛ — в 2 раза чаще был возможным (табл.6).

Таблица 6.

Диагностика хронического и острого инвазивного аспергиллеза согласно критериям EORTC/MSG 2008

Оценка	ХИАЛ	ОИАЛ
Доказанный	13,5%	7%
Вероятный	70%*	54%
Возможный	16,5%*	39%

*P<0,05

Большинство больных получало 2 и более антимикотических препарата. Наиболее часто при ХИАЛ применяли итраконазол и вориконазол. В таблице 7 представлено лечение ИАЛ.

Таблица 7.

Препараты, используемые при лечении хронического и острого инвазивного аспергиллеза легких

Препараты	ХИАЛ	ОИАЛ
Итраконазол	66%*	41%
Вориконазол	56%*	21%
Амфотерицин В	54%	58%
Каспофунгин	16%	23%
Липосомальный амфотерицин В	4%	-
Липидный комплекс амфотерицина В	7%	3,5%
Позаконазол	4%*	1%
Два и более препарата получали	70%	53%

* $p < 0,05$

Выживаемость в течение 12 недель, по данным наших исследований, составила 96% для ХИАЛ и 45% — для ОИАЛ ($p < 0,05$); в течение года выжило 43% больных ХИАЛ и 17% больных ОИАЛ ($p = 0,003$). При этом выживаемость пациентов с поражением внутренних органов и центральной нервной системы при ХИАЛ составила 50%, при ОИАЛ — только 10% (Рис. 1.).

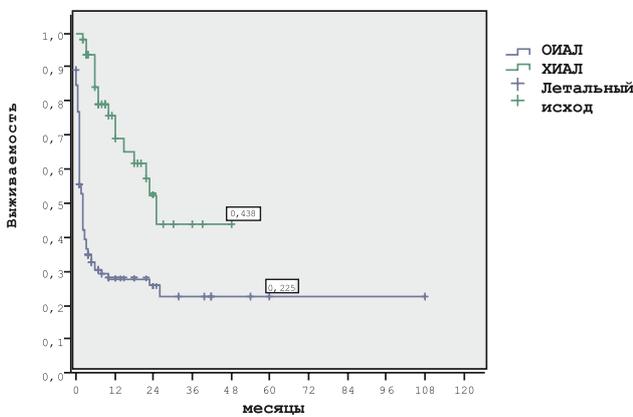


Рис.1. Выживаемость больных хроническим инвазивным аспергиллезом легких и острым инвазивным аспергиллезом легких по Каплану-Мейеру [3]

ОБСУЖДЕНИЕ

Инвазивный аспергиллез до настоящего времени является наиболее распространенным микозом легких как у больных с выраженным иммунодефицитом, так и у пациентов с умеренным нарушением иммунного ответа [4]. *Aspergillus* spp. могут вызывать различные заболевания: инвазивный аспергиллез, хронический некротизирующий аспергиллез, аспергиллезный трахеобронхит, аспергиллез плевры, аспергиллому и аллергический бронхолегочный аспергиллез [5,6]. Характер клинических проявлений аспергиллеза зависит от состояния иммунного статуса пациента и/или наличия у него предшествующего заболевания легких [7]. Наиболее типичной локализацией патологического процесса являются легкие.

Описанный впервые в 1981 г. как полуинвазивный аспергиллез, ХИАЛ характеризуется вялым деструктивным течением, обусловленным грибами рода *Aspergillus*. [8,9]. В 2003 году David W. Denning впервые предложил определение хронического инвазивного аспергиллеза, при котором изменения в легких,

обусловленные инвазией грибов рода *Aspergillus*, сохраняются в течение более 3-х месяцев [2, 5].

Мы впервые создали регистр больных инвазивным аспергиллезом в Санкт-Петербурге. В него вошли 300 случаев ИА, зарегистрированных за последние 10 лет в 14 многопрофильных стационарах города. Ретроспективно мы изучили случаи заболевания более чем по 40 различным показателям (пол, возраст, основное заболевание, факторы риска, профилактика, эмпирическая терапия, локализация микотической инфекции, клинические проявления, показатели клинического и биохимического анализов крови, изменения на КТ и Rg, микроскопическое и культуральное исследования биосубстратов, уровень галактоманна в крови, уровень антител к антигену *Aspergillus*, антимикотическая терапия, выживаемость). Проследить течение заболевания и разделить ИАЛ на острый и хронический мы смогли у 213 пациентов.

Из регистра мы получили данные о значительном количестве больных с выраженной иммуносупрессией с хроническим течением инвазивного аспергиллеза.

Частота развития ХИАЛ до настоящего времени остается неизвестной. За последнее десятилетие было проведено большое количество исследований отдельных категорий больных ИА (пациенты с острым лейкозом, реципиенты ТКСК, реципиенты органов, пациенты отделений реанимации и интенсивной терапии). Частота развития ИА известна для отдельных групп пациентов и зависит от основного заболевания. Так, у пациентов с острым лейкозом с нейтропенией она составляет 1–4%, у реципиентов аллогенной ТКСК – 2,3–15%, ауто ТКСК — 0,5–4%, у пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии — 0,3–5,8% [10–12]. Однако в связи с улучшением выживаемости при ИАЛ, появилось большое количество пациентов, у которых на фоне цитостатической терапии или после перенесенной цитостатической полихимиотерапии (ПХТ) или трансплантации кроветворных стволовых клеток (ТКСК), на фоне неполного восстановления иммунного ответа сохраняются проявления ИАЛ (преимущественно рентгенологические) более 3-х месяцев. Эти пациенты требуют назначения длительной (до нескольких лет) антимикотической терапии.

В нашем исследовании мы объединили пациентов всех групп риска по одному признаку, а именно – длительности заболевания более 3-х месяцев, поэтому в нашем случае частота ХИАЛ составила почти 1/3 всего ИАЛ.

Полученные нами демографические данные сопоставимы с результатами сообщений, опубликованных ранее [2, 5, 13, 14]. Преобладание ХИАЛ у мужчин среднего возраста соответствует данным предшествующих исследований [5] и, возможно, в какой-то мере объясняется преобладанием хронических заболеваний легких у мужчин [13].

Основные факторы риска ХИАЛ, выявленные в

нашей работе, аналогичны данным предыдущих исследований [10–13, 15].

Следует отметить, что в нашем исследовании лимфоцитопения при ХИАЛ выявлена в 76% случаев. Частота выявления лимфоцитопении у больных с ИА, по данным Y. Nivoix, составила 42%, что более соответствует при ОИАЛ (55%) [15]. Вероятно, недостаточность лимфоцитов является одной из причин хронического течения ИАЛ. Данный факт требует более глубокого исследования.

Назначение ПХТ значительно подавляет иммунитет, при этом ИАЛ имеет преимущественно острое течение. Наличие вирусной или бактериальной инфекции, по всей видимости, также влияет на степень иммунного ответа, так как, по данным нашего исследования, ИАЛ на фоне тяжелой бактериальной или вирусной инфекции протекал остро.

В найденных нами единичных исследованиях хронических форм инвазивного аспергиллеза прослеживается тот же спектр «фоновых» заболеваний, что и в нашей работе [12–15]. По данным H. Sambatakou, хронические заболевания легких составили до 30% [14]. В нашем исследовании хронические заболевания легких отмечали у 14% больных.

В результате микологического обследования мы выявили широкий спектр возбудителей ХИАЛ. В 51% случаев мы выделили *A. fumigatus*, вторым по частоте изолятом был *A. niger*. Подобные находки существенно отличаются от всех ранее опубликованных работ, в которых *A. fumigatus* составлял приблизительно 90% изолятов, а вторым по частоте был *A. terreus* (до 23%) [12, 13, 16].

В этом исследовании мы отметили, что при ХИАЛ кровохарканье и бронхообструктивный синдром встречались достоверно чаще, а частота клинических проявлений в виде лихорадки и кашля была такой же частой, как и при остром ИАЛ.

Чувствительность теста на галактоманнан в сы-

воротке крови в нашем исследовании сопоставима с сообщениями различных исследователей [15, 17].

В нашей работе диагноз ХИАЛ, установленный на основании классификации EORTC/MSG 2008 г. [1] как доказанный и вероятный, составил 83,5%, в сравнении с данными Conillet A. — 73%, Y. Nivoix — 67% и V. Meersseman — 75% [13–15].

Согласно ранее опубликованным сообщениям, выживаемость больных ИАЛ составляет 52,3%, что сопоставимо с нашими данными для ОИАЛ. Следует отметить, что с появлением вориконозола и липосомального амфотерицина В в терапии ИАЛ выживаемость больных выросла до 70–72% [18–20]. По нашим данным, выживаемость больных с ХИАЛ в течение 12 недель составила 96%, в течение года — 43%, что значительно выше результатов предыдущих исследований.

ВЫВОДЫ

У больных в Санкт-Петербурге (1998–2008 гг.) хронический инвазивный аспергиллез легких составляет 29% инвазивного аспергиллеза легких. ХИАЛ достоверно чаще развивается на фоне хронических заболеваний легких. Важным фактором риска развития ХИАЛ является лимфоцитопения. *A. fumigatus* и *A. niger* зарегистрированы как наиболее частые возбудители ХИАЛ. В клинической картине ХИАЛ достоверно чаще отмечали кровохарканье и бронхообструктивный синдром. По данным КТ, двустороннее, диффузное поражение и симптом «полумесяца» при ХИАЛ были зарегистрированы достоверно чаще, чем при ОИАЛ. Наиболее часто при ХИАЛ применяли итраконазол и вориконозол. Большинство больных получало 2 и более антимикотических препарата. ХИАЛ протекает более благоприятно в сравнении с ОИАЛ, выживаемость больных ХИАЛ в течение 12 недель составила 96% в течение года — 43%.

ЛИТЕРАТУРА

1. De Pauw B., Walsh T.J., Donnelly P., et al. Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group // Clin. Infect. Dis. – 2008.- Vol. 46.- P.1813-21.
2. Denning D.W. Aspergillosis. Faculty Reviewer: Education and Research Centre Wythenshawe Hospital Manchester, United Kingdom, 2006.
3. Kaplan E.L., Meier P. Non-parametric estimation from incomplete observations // J. Am. Stat. Assoc. - 1958. - Vol. 53. - P. 457-81.
4. Denning D.W. Invasive aspergillosis // Clin. Infect. Dis. – 1998. - Vol. 26. - P. 781-805.
5. Denning D.W., Riniotis K., Dobrashian R., Sambatakou H. Chronic Cavitary and Fibrosing Pulmonary and Pleural Aspergillosis: Case Series, Proposed Nomenclature Change, and Review // Clin. Infect. Dis. - 2003. - Vol. 37, Suppl. 3. - P. 265-280.
6. Hope W.W., Walsh T.J., Denning D.W. The invasive and saprophytic syndrome due to *Aspergillus* spp. // Med. Mycol. – 2005. - Vol. 43, Suppl. 1. - P. 207-238.
7. Zmeili A.O. Soubani. Pulmonary aspergillosis: a clinical update // Q. J. Med. – 2007. - № 100. - P. 317-334.
8. Binder R.E., Faling L.J., Pugatch R.D., et al. Chronic necrotizing pulmonary aspergillosis: a discrete clinical entity // Medicine (Baltimore). - 1982. - Vol. 61. - P. 109-124.
9. Gefter W.B., Weingrad T.R., Epstein D.M., et al. «Semiinvasive» pulmonary aspergillosis: a new look at the spectrum of *Aspergillus* infections of the lung // Radiology. - 1981. - Vol. 140. - P. 313-321.
10. Marr K.A., et al. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors // Blood. - 2002. - Vol. 100. - P. 4358-4366.

11. Upton A., Kirby K.A., Carpenter P, et al. Invasive aspergillosis following hematopoietic cell transplantation: outcomes and prognostic factors associated with mortality // Clin. Infect. Dis. – 2007.- Vol.44.- P.531-40.
12. Meersseman W, Vandecasteele S.J, Wilmer A, et al. Invasive Aspergillosis in Critically Ill Patients without Malignancy // Am. J. of Resp. and Crit. Care Med. – 2004.- Vol.170.
13. Conillet A., et al. Comparison of epidemiological, clinical and radiological features of invasive aspergillosis in neutropenic and nonneutropenic patients: 6-year survey // Clin. Infect. Dis. – 2006.- Vol. 43.- P.577-584.
14. Sambatakou H, Dupont B., Lode H., Denning D. Voriconazole treatment for subacute invasive and chronic pulmonary aspergillosis // The Am. J. of Med. – 2006.- Vol.119, № 527.- P.17-24.
15. Nivoix Y, Velten M., Letscherp B.V., et al. Factors associated with overall and attributable mortality in invasive aspergillosis // Clin. Infect. Dis.- 2008.- Vol. 47.- P.1176-1184.
16. Hachem R.Y., Kontoyiannis D.P, Boktour M.R., et al. *Aspergillus terreus*: an emerging amphotericin B – resistant opportunistic mold in patients with hematologic malignancies // Cancer.- 2004.- Vol. 101.- P.1594-1600.
17. Pfeiffer C.D., Fine J.P., Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan: a metaanalysis // Clin. Infect. Dis. – 2006.- Vol. 42.- P.1417-1427
18. Herbrecht R., Denning D., Patterson T.F., et al. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis // N. Engl. J. Med. – 2002.- Vol. 347.- P. 408-415.
19. Cornely O.A., Maertens J, Bresnik M., et al. Liposomal amphotericin B as initial therapy for invasive mold infection: a randomized trial comparing a high-loading dose regimen with standard dose (AmBiLoad trial) // Clin. Infect. Dis. – 2007.- Vol. 44.- P.1289-1297.
20. Codonnier C., Ribaud P, Herbrecht R., et al. Prognostic factor for death due to invasive aspergillosis after hematopoietic stem cell transplantation: a 1-year retrospective study of consecutive patient at French transplantation centers // Clin. Infect. Dis. – 2006.- Vol. 42.- P.955-63.

Поступила в редакцию журнала 28.09.09 г.

Рецензент: Я.И.Козлова



МОРФОГЕНЕЗ КОНИДИОГЕННОГО АППАРАТА ASPERGILLUS TERREUS ТНОМ ПО ДАННЫМ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Степанова А.А. (вед. н. сотр.),
Синицкая И.А. (ст.н. сотр.)

НИИ медицинской микологии им. П.Н.Кашкина ГОУ
ДПО СПб МАПО Росздрава, Санкт-Петербург, Россия

© Степанова А.А., Синицкая И.А., 2009

*Изучены ультраструктурные особенности формирования разных типов клеток конидиогенного аппарата у штамма *A. terreus*, выделенного от больного отомикозом и выращенного на среде Чапека. Предложена схема, иллюстрирующая морфогенез конидиогенного аппарата.*

Ключевые слова: *Aspergillus terreus*, компоненты клеток, конидиогенез, конидиогенный аппарат, модель морфогенеза, ультраструктура

MORPHOGENESIS OF ASPERGILLUS TERREUS ТНОМ CONIDIOGENOUS APPARATUS ACCORDING TO THE ELECTRON MICROSCOPY

Stepanova A.A. (leading researcher),
Sinitskaya I.A. (senior researcher)

Kashkin Research Institute of Medical Mycology of SEI
APE SPb MAPE, Saint Petersburg, Russia

© Stepanova A.A., Sinitskaya I.A., 2009

*The ultrastructural peculiarities of the conidiogenous apparatus morphogenesis of the *A. niger* strain isolated from patient with otomycosis have been investigated. The morphogenesis scheme of the conidiogenous is represented.*

Key words: *Aspergillus terreus*, cell components, conidiogenesis, conidiophore, model of morphogenesis, ultrastructure

ВВЕДЕНИЕ

Ранее изученные нами закономерности морфогенеза разных типов клеток *A. niger* [1, 2] и *A. fumigatus* [3,4] in vitro с помощью современных методов электронной микроскопии стали основой предложенной модели биологии их развития. В настоящем исследовании эксперименты были продолжены на другом виде из рода *Aspergillus* [5] – *A. terreus*; рассмотрены субмикроскопические аспекты биологии развития конидиогенного аппарата, тогда как морфогенез клеток вегетативного мицелия и некоторые аспекты конидиогенеза были освещены ранее [6, 7].

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Штамм *A. terreus* (РКПГФ-1275/1397) взят из коллекции НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина; он был выделен 02.02.02 г. от пациента Н.А. с отомикозом. Гриб выращивали на среде Чапека в термостате при 27 °С, фиксировали через 2, 3, 5, 10, 20 дней после посева и микроскопировали методами просвечивающей и трансмиссионной микроскопии, описанной нами ранее [1, 2].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В составе сформированного конидиогенного аппарата *A. terreus* различимы конидионосцы и колонковидная головка (Рис. 1 з; 2 а,б), несущая на своей поверхности два ряда стеригм. Стеригмы второго ряда формировали цепочки из разновозрастных конидий (Рис. 2 в, г).

Конидионосец. Конидионосец формировался как латеральный вырост (Рис. 1а) клетки субстратного мицелия, растущий апикально (Рис. 1б). В содержимом растущего конидионосца присутствовали редкие одиночные интерфазные ядра округлой (2,0 мкм) или эллипсоидной формы (1,5×2,0 мкм), как правило, приуроченные к латеральной клеточной стенке. Нуклеоплазма умеренной электронной плотности, хроматин диффузного типа. Ядрышко одно, довольно крупное (0,5 мкм), эксцентричное. В его составе гранулярный и фибриллярный компоненты были представлены в равной мере. Оболочка ядра имела ровный либо слегка волнистый контур.

Митохондрии в умеренном числе, разнообразной формы и небольших размеров (0,5–0,7 мкм). Матрикс этих органелл намного более плотный, чем цитозоль; содержал небольшое число длинных, параллельно расположенных относительно друг друга крист. Митохондриальный ретикулум, характерный для растущих конидионосцев *A. niger* [2], в нашем материале не был отмечен. Не было его и в растущих конидионосцах *A. fumigatus* [4]. Эндоплазматический ретикулум развит слабо, в форме коротких прямых либо слабо извилистых агранулярных цистерн, в основном, приуроченных к клеточной стенке. Редко наблюдали одиночные пероксисомы округлой

* Контактное лицо: Степанова Амалия Аркадьевна
Тел.: (812) 303-51-40

(0,2 мкм) либо эллипсоидной (0,2×0,4 мкм) формы, ограниченные высоко контрастной мембраной и содержащие плотный фибриллярный матрикс. Другие органеллы не обнаружены.

Запасные вещества в виде редких одиночных мелких (0,2–0,3 мкм) липидных включений умеренной электронной плотности. Рост конидиеносца сопровождался новообразованием цитозоля, большого числа свободных рибосом, незначительным увеличением числа ядер, митохондрий и цистерн эндоплазматического ретикулаума. Существенно возрастало и число вакуолей. Они мелкие, светлые, равномерно распределены по площади среза конидиеносца, как правило, содержали одну темную гомогенную глобулу, приуроченную к тонопласту.

Закончившие рост конидиеносцы имели высоту в пределах от 100 до 230 мкм и толщину — от 5 до 6 мкм. В их содержимом выявляли плотный цитозоль (Рис. 2 ж-и), насыщенный свободными рибосомами. Ядра, митохондрии и элементы эндоплазматического ретикулаума, представленные в небольшом числе, располагались вблизи клеточной стенки. Вакуоли мелкие, светлые; в их содержимом наблюдали обрывки мембран разной протяженности и морфологии, а также темные глобулы у тонопласта.

Клеточная стенка значительной толщины (от 0,7 до 0,8 мкм) состояла из трех слоев (Рис. 2и): внутреннего толстого светлого (0,6 мкм, слой 1 на рисунке 2о), среднего умеренной электронной плотности и толщины (0,15 мкм, слой 2 на рисунке 2о) и, наконец, наружного самого тонкого (0,02–0,03 мкм, слой 3 на рисунке 2о), темного гомогенного и электронно-плотного слоя – так называемой «кутикулы», непрерывно покрывающей головку и цепочки формирующихся конидий, что было отмечено и для других видов аспергиллов [2, 4, 7–9].

Головка. По завершении роста конидиеносца, его апекс претерпевал изодиаметрический рост, формируя зачаток головки (Рис. 1в). Последний имел плотный цитозоль, одиночные редкие ядра, небольшое число митохондрий, а также цистерн агранулярного ретикулаума и многочисленные свободные рибосомы. По завершении роста апекс головки приобретал эллипсоидальную форму (Рис. 2ж); диаметр ее варьировал в пределах от 1 до 15 мкм. Клеточная стенка толстая (0,3–0,5 мкм), многослойная, фибриллярная, умеренной электронной плотности.

В центральной части головки, формирующей стеригмы, выявляли небольшое (5–6 мкм на срез головки) число ядер, одиночных или собранных в группы (Рис. 1 г, д; 3а). Митохондрии в умеренном числе (8–10 на срез головки) ориентировались беспорядочно и равномерно по площади среза. В период формирования стеригм в содержимом конидиеносца и головки продолжался синтез мелких (0,2–0,3 мкм) одиночных липидных включений умеренной электронной плотности, в основном, локализующихся вблизи клеточной стенки. По мере завершения формирования стеригм, в конидиеносце и головке, ядра и ми-

тохондрии из их центральной части мигрировали к клеточной стенке, уровень вакуолизации несколько возрастал (Рис. 3 е). На этой стадии наблюдали довольно много вакуолей. Они мелкие, светлые, неправильной, часто причудливой формы, содержали скопления фибриллярного материала и одиночные мелкие темные гранулы.

Во время конидиогенеза уровень вакуолизации конидиеносца и головки несколько снижался (Рис. 3 ж), заметно увеличивались размеры темных округлых глобул в их содержимом (от 0,4 до 0,5 мкм). Также возрастало число ядер и митохондрий. Теперь доминирующим компонентом головки становились запасные вещества. В центральной части ее имело место крупное скопление из плотно расположенных розеток гликогена умеренной электронной плотности (Рис. 3 ж). В содержимом конидиеносца преобладали липидные включения, локализовавшиеся в тонком слое цитозоля между клеточной стенкой и тонопластом (Рис. 2 п).

В цитоплазме конидиеносца и головки конидиогенных аппаратов колоний гриба изучаемого штамма *A. terreus* через 3 и 5 дней после посева запасные вещества отсутствовали. Через 10 и 20 дней после посева в их содержимом, начиная с ранних стадий развития, аккумулировались многочисленные розетки гликогена (0,1–0,2 мкм), занимающие основной объем пристенной гиалоплазмы, свободный от органелл. По времени это совпадало с исчезновением гликогена и других типов запасных веществ из содержимого многих клеток субстратного мицелия изучаемого штамма *A. terreus* [6]. Сходная картина перераспределения запасных веществ в системе «вегетативный мицелий конидиогенный аппарат» была описана и для патогенных видов двух других – *A. niger* [1, 2] и *A. fumigatus* [3,4], выращенных *in vitro*.

Согласно обзору данных научной литературы, растущие и закончившие рост конидиеносцы и головки конидиогенных аппаратов у *A. niger* [2, 4] и *A. nidulans* [10, 11], имеющих два ряда стеригм, в целом, имели сходную ультраструктуру. В отличие от *A. fumigatus* [3, 4] с одним рядом стеригм, они были слабо вакуолизированными, содержали намного больше ядер, митохондрий и цистерн эндоплазматического ретикулаума. У анализируемого нами штамма *A. terreus*, дифференциация конидиеносца и головки проходила сходно и заключалась в незначительном увеличении числа ядер, митохондрий (без формирования митохондриального ретикулаума) и цистерн ретикулаума, новообразовании цитозоля и большого числа свободных рибосом, а также в усилении уровня вакуолизации. Эти ультраструктурные признаки были показателями невысокого уровня их метаболизма, сохраняющегося вплоть до завершающих этапов конидиогенеза.

Стеригмы. Закладка стеригм первого ряда происходила синхронно на верхней 2/3 поверхности головки и заключалась в появлении многочисленных небольших вздутий (зачатков стеригм, Рис. 1 г). Син-

хронность в закладке стеригм была характерна для *A. niger* [2], *A. fumigatus* [4], *A. nidulans* [11] и *A. giganteus* [12].

Отметим, что в образовании зачатков стеригм исследуемого штамма *A. terreus* вовлечен внутренний тонкий (0,02 мкм) светлый слой клеточной стенки закончившей рост головки, что отмечали также для *A. niger*, *A. clavatus* [13] и *A. fumigatus*. Затем происходил дальнейший синхронный апикальный рост стеригм (Рис. 1 д). В растущих стеригмах запасные вещества отсутствовали, гиалоплазма плотная, с редкими мелкими митохондриями, короткими агранулярными цистернами ретикулума и многочисленными свободными рибосомами. В апексе формирующихся стеригм можно было видеть небольшое число мелких светлых пузырьков. Отметим, что растущие стеригмы у других исследованных к настоящему времени видов аспергиллов [4, 5, 11, 12] имели ультраструктуру, сходную с таковой стеригм объекта настоящего исследования.

Закончившие рост стеригмы первого ряда у *A. terreus* имели цилиндрическую форму [5–7×2–2,5 мкм, Рис. 2 в; к-м; 3 а,в] и располагались плотно относительно друг друга. Они содержали одно ядро округлой (0,8 мкм) либо слегка эллипсоидной (0,8×1,0 мкм) формы, ориентированное в средней или базальной части клетки. Ядрышко одно (0,7 мкм), сдвинуто к оболочке ядра, с преобладанием гранулярного компонента. Ультраструктуру стеригм определяли многочисленные (6–8 на срез клетки) полиморфные митохондрии, равномерно распределенные по площади среза клетки. Размеры их варьировали в пределах от 0,2 до 0,9 мкм. Матрикс митохондрий отличался умеренной электронной плотностью, насыщен длинными густыми светлыми, хаотично ориентирующимися, кристами.

Цистерны эндоплазматического ретикулума встречали редко, они занимали пристенное положение (редкие, короткие, прямые либо слегка извилистые агранулярные). Цитозоль насыщен свободными рибосомами. Вакуоли (от 1 до 2 на срез клетки), мелкие и средних размеров, светлые, располагались в апикальной (Рис. 2 м; 3 в) или базальной частях клетки, содержали скопления фибриллярного материала. Запасные вещества не выявлены. Клеточная стенка закончивших рост стеригм первого ряда тонкая (0,04 мкм), однослойная, светлая и фибриллярная.

В основании закончивших рост стеригм первого ряда у *A. terreus* закладывалась светлая клиновидная отделительная септа (Рис. 2р) с толщиной вблизи латеральной клеточной стенки – 0,6 мкм, тогда как в средней части – 0,4. Общий диаметр септы был равен 0,6 мкм, а диаметр сквозной поры в ее центре соответственно – 0,07. Тельца Воронина вблизи таких септальных пор появлялись с началом конидиогенеза: обычно по одному (Рис. 3 и), реже – по два, с каждой стороны септы. По размерам, числу, форме и топографии относительно септальной поры они были идентичны таковым клеток вегетативного мицелия

A. terreus [6]. По завершении конидиогенеза, тельца Воронина вблизи описываемого типа септ не отмечали, септальная пора полностью закрывалась мелкой плоской темной гомогенной пробкой (Рис. 2 р) дискоидной или округлой формы.

По завершении роста каждая стеригма первого ряда формировала по 2–3 стеригмы следующего второго. Стеригмы второго ряда (5,5–7,5×1,5–2 мкм) по форме и плотности расположения были сходны с аналогичными первого. Отметим, что в основании стеригм конидиогенных аппаратов у *A. nidulans* [10,11], *A. giganteus* [12] и *A. clavatus* [13] описана септа аналогичного строения, вблизи которой (в цитоплазме стеригм) наблюдали два темных тельца Воронина, ограниченные мембраной. В стеригмах *A. terreus* на заключительных этапах конидиогенеза имел место синтез большого числа крупных липидных включений разного диаметра (0,5–0,8 мкм, Рис. 4а), занимающих значительную часть площади их среза. Синтез липидных включений также имел место в стеригмах конидиогенных аппаратов *A. fumigatus* [4], в то время как у *A. niger* [2] сходным образом аккумулировались и многочисленные розетки гликогена.

Таким образом, у *A. terreus* формирование стеригм сопровождалось увеличением числа митохондрий (с формированием митохондриального ретикулума), элементов эндоплазматического ретикулума, вакуолей, новообразованием цитозоля и многочисленных свободных рибосом. Согласно данным научной литературы, одноядерные стеригмы характерны и для других видов аспергиллов: *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. giganteus*, *A. clavatus* [2, 4, 10–13]. Сформированные стеригмы конидиогенных аппаратов у *A. terreus*, как у *A. fumigatus* и *A. niger*, были лишены запасных веществ и вакуолей, однако, содержали небольшое число митохондрий и вакуолей. В тоже время в вакуолях головок и сформированных стеригм конидиогенных аппаратов *A. clavatus* [13] были обнаружены темные кристаллические включения.

Конидиогенез. Формирование конидий в пределах одной головки проходило асинхронно и по пяти основным стадиям – закладка, рост, созревание, обезвоживание и отделение от цепочки. В апексе закончившей рост стеригмы закладывалось небольшое вздутие (зачаток конидии, Рис. 2 к, м), в содержимом которого выявляли цитозоль и многочисленные свободные рибосомы. Первичной стенкой инициали конидии являлся эндоспорий – светлый, однослойный, фибриллярной структуры (1 на Рис. 3 о-е). Толщина его в апикальной части инициали конидии намного больше (0,15 мкм), чем в ее основании (0,04 мкм). По мере роста инициали конидии толщина эндоспория незначительно (0,2 мкм) возрастала; он становился равномерным на всем своем протяжении.

В месте заложения конидий клеточная стенка стеригмы разрушалась, формируя так называемый «воротничок», который был очевиден при формировании первой и всех последующих конидий. У

изученного нами штамма *A. terreus* конидиогенез протекал исключительно по эндо-(энтеро)бластическому типу, что было показано нами и для *A. niger* и *A. fumigatus*.

В растущей конидии отмечали цитозоль, свободные рибосомы, небольшое число мелких (0,20–0,30 мкм) митохондрий, коротких одиночных агранулярных элементов эндоплазматического ретикулума и мелких вакуолей. После миграции из содержимого стеригмы в конидию одного ядра (0,6 мкм), в основании конидии формировалась светлая клиновидная отделительная септа (Рис. 2 а), диаметр которой вблизи латеральной клеточной стенки составлял 0,24 мкм и в средней части – 0,14. Септа такого строения формировалась в основании конидий у *A. niger*, *A. nidulans*, *A. giganteus* и *A. clavatus*. Вблизи такой септы тельца Воронина отсутствовали, что отмечали также для *A. niger*, *A. fumigatus* и *A. clavatus*. Вскоре клиновидная форма описываемой септы у *A. terreus* изменялась на прямую (Рис. 3 а, б), при этом толщина ее возрастала до 0,4 мкм, и она приобретала тонкофибрилярное строение (Рис. 3 в). В центральной части такой септы наблюдали тонкую равномерную по толщине (0,04 мкм) сквозную пору с электронноплотным содержимым (Рис. 3 в). Отметим, что септа аналогичного строения была описана между созревающими конидиями *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus* и *A. clavatus*.

После формирования отделительной септы в основании конидии, последняя проходила стадию изодиаметрического роста, в ходе которого происходила закладка всех слоев ее стенки. Рост конидии и формирование ее слоев завершались еще в период, когда она была связана со стеригмой. Далее в центробежном направлении происходила закладка новых слоев в клеточной стенке конидии. В стенке конидий *A. terreus* эписпорий откладывался снаружи эндоспория лишь после формирования слоя орнаментации и периспория, что отличало его от *A. niger* [5], у которого эписпорий формировался сразу после закладки эндоспория. При исследовании зрелых конидий в сканирующем электронном микроскопе (Рис. 2к, е) элементы слоя орнаментации имели форму продольно ориентирующихся ребер небольшой высоты (от 0,20 мкм) и ширины (от 0,14 мкм). Элементы слоя орнаментации по наличию фибрилл и электронной плотности были сходны с эндоспорием. Они были погружены в светлый, слегка гранулярный матрикс – периспорий (слой 4 на Рис. 3 п, р) варьирующей толщины (0,03–0,5 мкм). Снаружи клеточная стенка конидий была покрыта тонкой (0,02 мкм) темной кутикулой, повторяющей контур слоя орнаментации. Толщина клеточной стенки зрелых конидий, в среднем, составляла 0,45 мкм. У *A. niger* и *A. fumigatus*, как и у объекта настоящего исследования, максимальное число слоев в клеточной стенке закончившей рост конидии также было равно пяти. Далее в цепочках в базипетальном направлении проходил процесс созревания конидий, сопровождаю-

щийся уменьшением размеров, изменением формы, усыханием и упрощением строения их стенки, синтезом запасных веществ, а также обезвоживанием их содержимого.

В ходе созревания конидий *A. terreus* эндоспорий и периспорий становились более светлыми и бесструктурными, тогда как эндоспорий – неравномерным и более тонким. Эписпорий уплотнялся, утоньшался и приобретал слабо волнистый контур. Затем происходило усыхание элементов слоя орнаментации и периспория вплоть до полного его исчезновения.

В зрелых конидиях ядра нами не выявлялись ввиду высокой электронной плотности цитозоля и нуклеоплазмы. Размеры зрелых конидий варьировали в пределах от 1,8 до 2,4 мкм; они имели сферическую или слегка эллипсоидальную форму. Лизис кутикулы в верхней части цепочки, содержащей зрелые конидии, приводил к их освобождению.

Отметим тот факт, что формирующиеся конидии *A. terreus* различались между собой по наличию или отсутствию и типу аккумулируемых запасных веществ. По этому признаку можно выделить 6 типов конидий: 1) без видимых отложений запасных веществ (Рис. 3а); 2) с небольшим (1-3 на срез конидии) числом липидных включений (Рис. 3б, к); 3) с небольшим числом липидных включений и розеток гликогена (Рис. 3л); 4) с многочисленными розетками гликогена (Рис. 3н); 5) с крупными темными белковыми включениями в вакуолях; 6) с крупными темными белковыми включениями в вакуолях и розетками гликогена (Рис. 3м). Интересно отметить, что разнокачественность конидий по запасным веществам имела место не только в пределах одного конидиогенного аппарата, но и одной цепочки. Редкие липидные включения, характерные для некоторых конидий анализируемого нами штамма *A. terreus*, попадали в их содержимое из цитоплазмы стеригм. Однако синтез гликогена в конидиях этого вида гриба происходил именно в этот период, когда они практически теряли связь с содержимым формируемых ими стеригм.

При изучении интерфазных ядер всех типов культур патогенного штамма *A. terreus* показано, что конденсированный хроматин отсутствует в их содержимом, а варьирование его размеров и числа находится в прямой зависимости от типа клетки и их размеров. Так, самые крупные и многочисленные интерфазные ядра были отмечены для конидиеносца и головки, а самые мелкие одиночные ядра — для конидий. Перечисленные кариологические особенности были характерны для ранее изученных нами штаммов *A. niger* [1,2] и *A. fumigatus* [3,4].

Для всех типов клеток конидиогенного аппарата *A. terreus* были характерны светлые однослойные клиновидные септы; исключение составляли лишь таковые зрелых конидий и таллоконидий [6], имеющие прямую форму. В клетках вегетативного мицелия и конидиогенного аппарата у *A. terreus* в качестве

компонентов порового аппарата септ были выявлены только тельца Воронина (0,13–0,18 мкм) и пробки. Число телец Воронина зависело от типа клетки и стадии ее развития, тогда как форма (плоскогексагональная) была стабильной.

Таким образом, стерильные клетки конидиогенного аппарата у изученного штамма *A. terreus*, в отличие от таковых в его вегетативном мицелии [6], имели более стабильную ультраструктуру, закономерно меняющуюся в зависимости от стадии их морфогенеза. Такая особенность была ранее отмечена нами также для *A. niger* [1, 2] и *A. fumigatus* [3, 4]. Общим для этих двух видов аспергиллов было то, что клетки их вегетативного мицелия, выращенного в культуре *in vitro* на среде одного состава, имели ультраструктуру, свидетельствующую о высоком уровне метаболизма, подтверждением чего являлось присутствие в них хорошо развитого митохондриального ретикулула. Сравнением особенностей морфогенеза клеток конидиогенных аппаратов у этих двух видов аспергиллов доказаны их существенные различия. Так, если конидиеносцы и головки у *A. niger* в период их формирования и конидиогенеза имели ультраструктурные признаки высокоактивных клеток (слабая вакуолизация, богатство гиалоплазмой, ядрами и митохондриями, формирующими митохондриальный ретикулум), то у *A. fumigatus*, напротив, малоактивный (сильная вакуолизация, бедность гиалоплазмой, ядрами и митохондриями, отсутствие митохондриального ретикулула), несмотря на то, что у обоих видов они выполняют сходные функции (формирование, питание и механическое поддержание стеригм, несущих цепочки разновозрастных конидий). В то же время зрелые стеригмы (в период конидиогенеза) у *A. fumigatus*, наоборот, в отличие от аналогичных *A. niger*, имели ультраструктурный облик высокоактивных клеток, о чем свидетельствовало присутствие в них митохондриального ретикулула. По другим признакам (одно ядро, слабая вакуолизация, плотный цитозоль, обогащенный свободными рибо-

сомами) зрелые (в период конидиогенеза) стеригмы сравнимых видов имели сходную ультраструктуру, характерную для меристематических клеток грибов [14], что соответствовало выполняемой ими образовательной функции (конидиогенез).

Несмотря на то, что процесс конидиогенеза у исследованных ранее *A. niger* и *A. fumigatus* протекал по одному – эндо-(энтеро)бластическому типу, между ними имелись принципиальные различия, касающиеся времени формирования отдельной септы в основании конидий. Так, если у *A. terreus* и *A. niger* последняя закладывалась после завершения роста конидии и формирования максимального числа слоев ее клеточной стенки, то у *A. fumigatus*, напротив, в основании ее зачатка — до начала изодиаметрического роста и формирования всех слоев стенки.

ВЫВОДЫ

1. Морфогенез конидиеносца и головки у *A. terreus* сопровождался усилением уровня вакуолизации, увеличением числа ядер, митохондрий (без формирования митохондриального ретикулула) и цистерн эндоплазматического ретикулула, новообразованием цитозоля и свободных рибосом.

2. Закладка и последующее формирование стеригм в пределах одной головки *A. terreus* происходили синхронно. Для стеригм, формирующих конидии, характерно наличие одного ядра, митохондриального ретикулула, плотного цитозоля, небольшого числа цистерн эндоплазматического ретикулула, многочисленных свободных рибосом, присутствие запасных веществ в виде розеток гликогена, а также редких липидных включений.

3. В пределах головки одного конидиогенного аппарата *A. terreus* закладка конидий и их последующее формирование проходили асинхронно. Миграция цитозоля, свободных рибосом, органелл и ядра завершались перед формированием отдельной септы в основании конидии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Степанова А.А., Синицкая И.А. Ультраструктура клеток *Aspergillus niger* van Tieghem. Вегетативный мицелий // Ж. Проблемы мед. микологии. – 2003. – Т. 5, №4. – С. 32-39.
2. Степанова А.А., Синицкая И.А. Морфогенез конидиогенного аппарата *Aspergillus niger* van Tieghem по данным электронной микроскопии // Ж. Проблемы мед. микологии. – 2004. – Т. 6, № 2. – Р. 37-48.
3. Степанова А.А., Синицкая И.А. Субмикроскопическое изучение клеток вегетативного мицелия *Aspergillus fumigatus* Fres. // Ж. Проблемы мед. микологии. – 2004. – Т. 6, №3. – С. 34-40.
4. Степанова А.А., Синицкая И.А. Цитологическое изучение морфогенеза конидиогенного аппарата *Aspergillus fumigatus* Fres. // Ж. Проблемы мед. Микологии. – 2005. – Т. 7, №1. – С. 41- 49.
5. Билай В.И., Коваль З.З. Аспергиллы. Определитель. — Киев: Наукова думка, 1988.- 204 с.
6. Степанова А.А., Синицкая И.А. Субмикроскопическое изучение клеток вегетативного мицелия *Aspergillus terreus* Thom // Ж. Проблемы мед. микологии. – 2007. – Т. 9, № 3. – С. 26-33.
7. Fletcher J. Electron microscopy of genesis, maturation, and wall structure of conidia of *Aspergillus terreus* // Trans. Brit. Mycol. Soc. – 1976. – Vol. 66, №1. – Р. 27-34.
8. Griose W.C., Edwards M.R. Ultrastructure of *Aspergillus fumigatus* conidia development and maturation // Protoplasma. – 1973. – Vol. 76. – Р. 49-59.
9. Tiedt L.K. Electron microscopic study of conidiogenesis and wall formation of conidia of *Aspergillus niger* // Mycol. Res. – 1993. – Vol. 97, №12. – Р. 1459- 462.
10. Oliver P.T.P. Conidiophore and spore development in *Aspergillus nidulans* // J.of Gen. Microbiol. – 1972. – Vol. 73. – Р. 45-54.

11. Mims C.W., Richardson E.A., Timberlake W.E. Ultrastructural analysis of conidiophore development in the fungus *Aspergillus nidulans* using freeze-substitution // *Protoplasma*. – 1988. – Vol. 144. – P. 132-141.
12. Trinci A.P.J., Peat A., Banbury G.H. Fine structure of phialide and conidiophore development in *Aspergillus giganteus* // *Ann. Bot.* – 1968. – Vol. 32, №2. – P.241-249.
13. Hanlin R.T. Phialide and conidium development in *Aspergillus clavatus* // *Amer. J. Bot.* – 1976. – Vol. 63. – P. 144-155.
14. Койда М.А., Степанова А.А. Ультраструктура зачатков и вторичных меристематидов плодовых тел *Flammulina velutipes* // *Микол. и фитопатол.* – 1997. – Т. 31, Вып. 5. – С 33-39.

Поступила в редакцию журнала 30.08.09

Рецензент: А.Е.Васильев

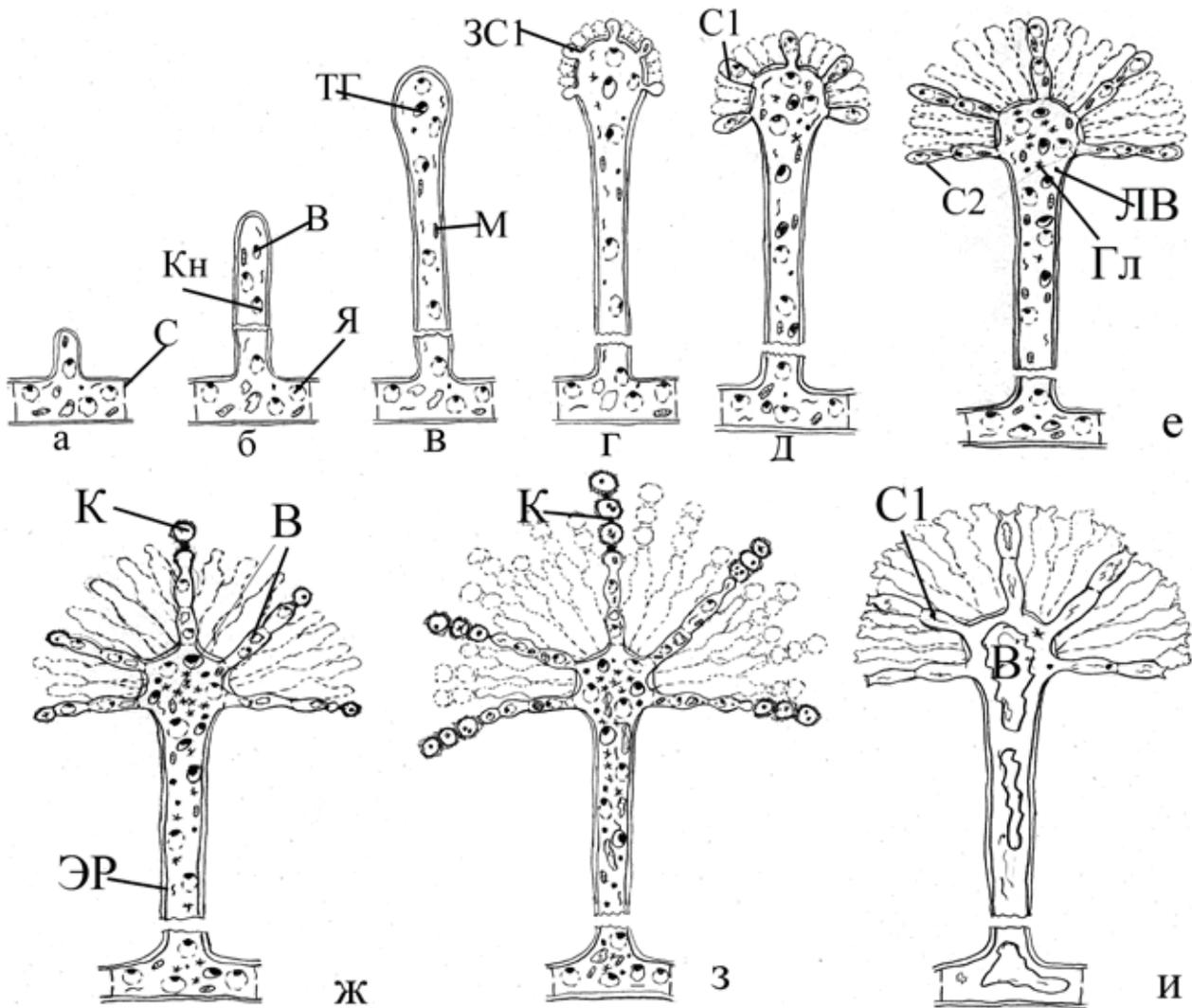


Рис. 1. Схема морфогенеза конидиогенного аппарата *A. terreus*: формирование конидиеносца (а-б), головки (в), стеригм (г-е), конидий (ж, з) и старение конидиогенного аппарата (и)

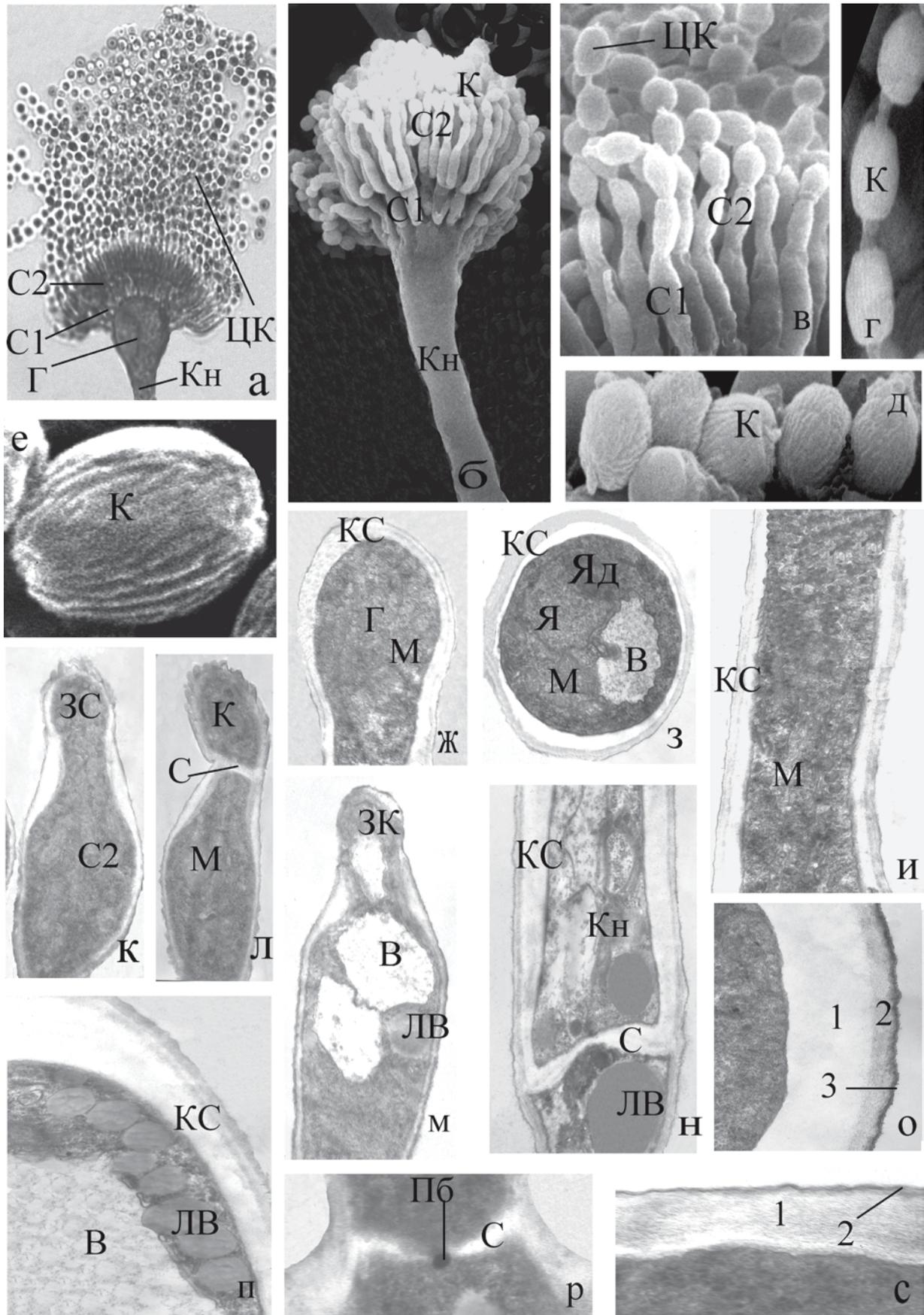


Рис. 2. Световая (а), сканирующая (б-е) и просвечивающая (ж-с) электронная микроскопия *A. terreus*. Ув. а – х100; б – х500; в – х1000; г – х2500; д – х4000; е – х14000; ж-л, н – х20000; м – х25000; п, р – х40000; о, с – х50000. Цифрами (о, с) обозначены слои клеточной стенки

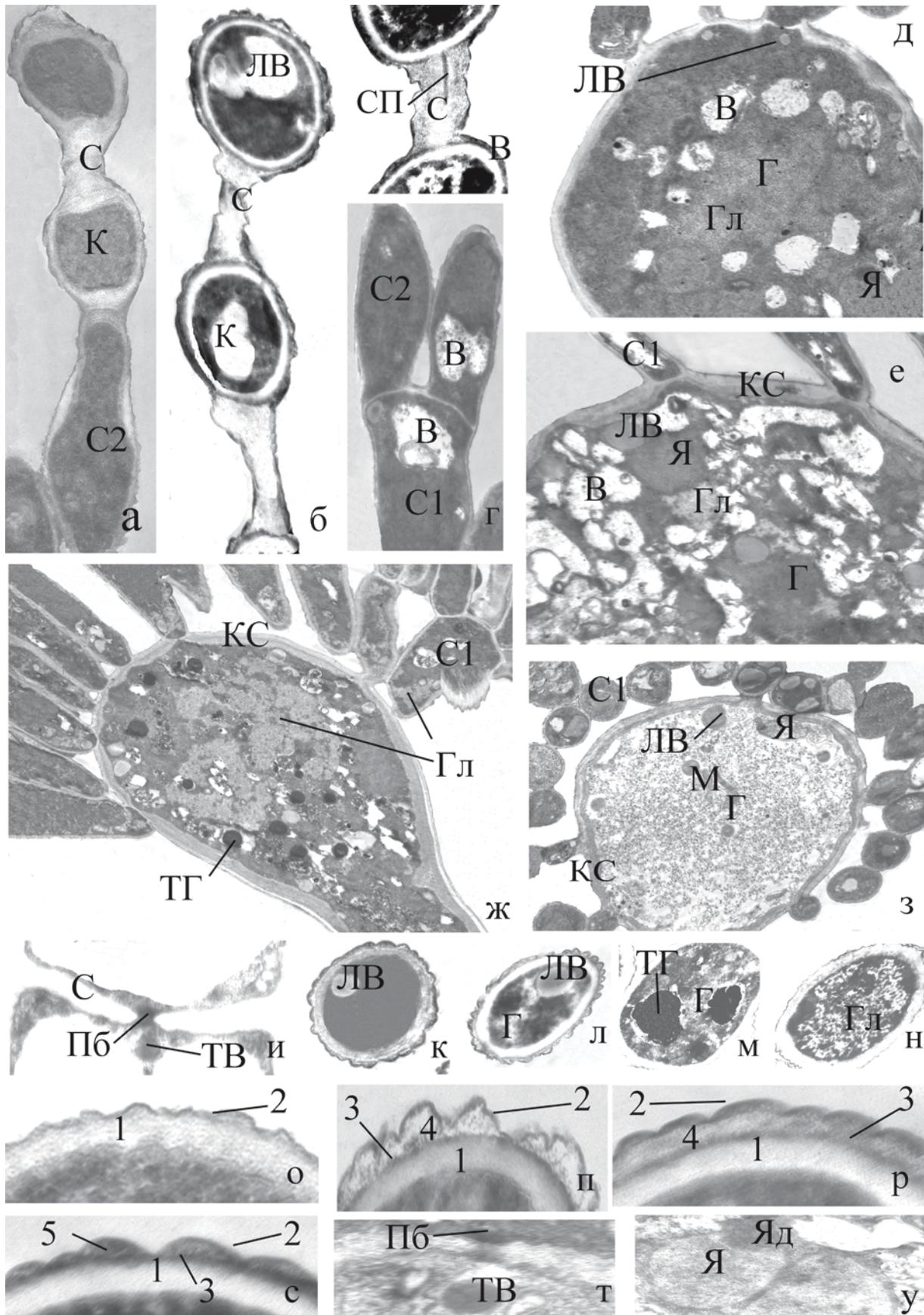


Рис. 3. Особенности ультраструктуры конидиогенного аппарата *A. terreus*. Ув.: а – г – х 25000; д, ж, з – х 20000; е – х 25000; и, т, у – х 400000; к – н – х 25000; о – с – х 45000. Цифрами (о-с) обозначены слои оболочки конидий

ХАРАКТЕРИСТИКА ТКАНЕВЫХ И КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ФОРМ *CANDIDA SPECIES*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ

**Ивахнюк Т.В. (аспирант)*, Каплин Н.Н.
(профессор кафедры)**

Сумской государственной университет Медицинский институт (кафедра инфекционных болезней), Сумы, Украина

© Ивахнюк Т.В., Каплин Н.Н., 2009

*В статье представлены результаты микробиологического обследования новорожденных детей, изучения биологических, в том числе и патогенных, свойств тканевой и культуральной форм *Candida spp.* Рассмотрены итоги базисного иммунологического эксперимента на лабораторных животных (крысах), инфицированных вышеуказанными формами *Candida spp.**

Ключевые слова: адгезивные и патогенные свойства, антигена, новорожденные дети, тканевые и культуральные формы *Candida spp.*, цитокины

THE CHARACTERISTIC OF *CANDIDA SPECIES* TISSUE AND CULTURAL FORMS ISOLATED FROM NEWBORN CHILDREN

**Ivakhnyuk T.V. (postgraduate student),
Kaplina N.N. (professor of the chair)**

Sumy State University Medical Institute (chair of infectious diseases), Sumy, Ukraine

© Golubnichaya V.N., Kaplina N.N., 2009

*The results of microbiological researches of newborn children, study of biological, including pathogenic, properties of *Candida spp.* in tissue and cultural forms are presented in the article. Also we have examined the results of principal immunological experiment in laboratory rats, infected these forms of *Candida spp.**

Key words: adhesion, antibodies, cytokines, newborn children, pathogenic properties, tissue and cultural forms of *Candida spp.*

За последние годы частота кандидозов выросла на 20%, особенно — у больных с дефектами иммунной системы. При этом высокий риск развития кандидоза отмечают за счет возрастания роли автохтонных штаммов *Candida spp.* [1]. Отметим, что значительный рост микопатологии связан с совершенствованием технологий выживания больных в стационаре, удлинению сроков их пребывания там, применения современных лечебных средств, изменения чувствительности микроорганизмов к противогрибковым препаратам [2].

В специальной литературе имеются данные о биологических свойствах мицелиальной и дрожжевой формы *Candida spp.*, но до сих пор недостаточно изучены роль микотоксинов, видовой состав изолятов, патогенные свойства *Candida spp.*, выделенных от новорожденных детей до посева и после культивирования на питательных средах.

Целью нашего исследования было изучение патогенных свойств *Candida spp.*, выделенных от новорожденных детей до посева материала на питательные среды (тканевая культура) и после культивирования на питательной среде *in vitro* (культуральная форма), а также изучение влияния этих патогенов на гуморальное звено иммунитета лабораторных животных при экспериментальной кандидозной инфекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для комплексного бактериологического и микологического исследования нами были обследованы новорожденные дети (n=70) с целью выявления *Candida spp.* и сопутствующей микробиоты, а также последующего изучения патогенных свойств этих грибов.

Исследовали мазки с кожи промежности, пупка, из зева, кал от детей. Для транспортировки материала использовали жидкую питательную среду Сабуро. Мерный посев материала производили на плотную питательную среду Сабуро и сусло-агар по общепринятой методике [3], посеvy инкубировали при 37 °С в течение 2–3 суток. Видовую идентификацию *Candida spp.* проводили с использованием тест-системы *Ari-Candida* (BioMerieux) и стандартных методов микологической диагностики (ферментация и ассимиляция углеводов, филаментация и тест на ростовые трубки).

Сопутствующую бактериобиоту (стафилококки, стрептококки, бактерии группы кишечной палочки) изолировали после засева патологического материала на специальные питательные среды. Идентификацию выделенных чистых культур бактерий-ассоциантов проводили по общепринятым методикам.

Для изучения патогенных свойств *Candida spp.* использовали тканевую форму гриба, представляющую собой центрифугат патологического материала, обработанный противобактериальными антибио-

* Контактное лицо: Ивахнюк Татьяна Васильевна
Тел.: (0542)-66-17-62

тиками (до посева на питательные среды), и культуральную форму – чистые культуры грибов со среды Сабуро, выделенные от тех же детей, которые до полной идентификации сохраняли в холодильнике при 6 °С в течение 3–4 суток.

Экспериментальное изучение патогенности тест-микроорганизмов на крысах проводили на базе микробиологической лаборатории медицинского института Сумского государственного университета (Украина), при этом строго соблюдали требования Европейской конвенции (Страсбург, 1986) по содержанию, кормлению и уходу за подопытными животными, а также выводу их из эксперимента и последующей утилизации. Хирургические манипуляции осуществляли под эфирным наркозом.

Концентрацию различных антител, цитокинов в сыворотке крови крыс, инфицированных различными формами *Candida* spp., определяли методом ИФА. Клеточное звено иммунитета у лабораторных крыс определяли унифицированным методом подсчета лейкоцитов в счетной камере [4], морфологическим исследованием форменных элементов крови с дифференциальным подсчетом лейкоцитарной формулы.

Наличие *Candida* spp. в биологических жидкостях, внутренних органах и содержимом кишок экспериментальных животных выявляли после засева их на среду Сабуро с последующей идентификацией возбудителя общепринятыми методами [3].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием методов вариационного и корреляционного анализов, математические расчеты — с помощью программы Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Среди исследуемых детей *Candida* spp. выделили у 33 детей, что составило 47,1%, причем количество данных грибов составляло $\leq 10^3$ КОЕ/мл(г) материала.

В составе изолятов от новорожденных детей нами обнаружены 5 видов из рода *Candida*: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, причем доминировал вид – *C. albicans*. Частота выделения *Candida* spp. из различного патологического материала от новорожденных детей представлена в таблице 1.

Таблица 1

Частота выделения различных видов *Candida* spp. у новорожденных детей

<i>Candida</i> spp.	Частота выделения <i>Candida</i> spp. (%)
<i>C. albicans</i>	24,3
<i>C. tropicalis</i>	10
<i>C. krusei</i>	7
<i>C. parapsilosis</i>	2,9
<i>C. kefyr</i>	2,9

Из полученных результатов исследования следует, что в ассоциации с *Candida* spp., выделенных от новорожденных детей, могут быть различные виды стафилококков: *S. aureus*, *S. epidermidis* и *S. saprophyticus*. Частота их обнаружения у детей раз-

личных групп варьирует. Обращает на себя внимание тот факт, что коагулазоположительные штаммы *S. aureus* ассоциировали с более патогенным видом — *C. albicans*.

При изучении факторов патогенности у выделенных штаммов стафилококков нами определены гемолизин, плазмокоагулаза, лецитовителаза, ферментация маннитола, что позволило судить о том, что стафилококки, выделенные как ассоцианты с *C. albicans*, обладали более выраженными патогенными свойствами в 83% случаев.

Известно, что *Candida* spp. также присущи факторы патогенности [5–7]. Такие факторы обуславливают возрастание этиологической роли *Candida* spp. в распространении данной грибковой инфекции именно у новорожденных детей, у которых иммунная система в норме находится в состоянии естественного иммунодефицита. Патогенность *Candida* spp. в значительной степени связана с их адгезивными свойствами. Мы изучали адгезивные свойства у тканевой (n=33) и культуральной (n=33) форм *Candida* spp., выделенных от новорожденных детей. Кроме того, изучение патогенности *Candida* spp. проводили на беспородных крысах-самцах массой 180–220 г ($195,4 \pm 27,3$).

В нашем исследовании тканевая форма *Candida* spp. – это центрифугат материала от ребенка, обработанный антибиотиками с количеством грибных клеток 10^2 КОЕ/мл, культуральная форма – суспензия в физиологическом растворе чистой культуры *Candida* spp., накопленной на среде Сабуро, с количеством грибных клеток 10^2 КОЕ/мл. Причем идентификация тканевой формы *Candida* spp. была нами установлена после идентификации чистой культуры этого гриба.

Адгезивные свойства *Candida* spp. изучали по методу В.И.Брилис и соавт.[4] с учетом среднего показателя адгезии.

При анализе результатов изучения адгезивных свойств показано, что среди тканевых форм *Candida* spp. от новорожденных детей преобладали высокоадгезивные *Candida* spp. (табл. 2).

Кроме того, нами установлено, что среди культуральных форм высокоадгезивные свойства имели штаммы *C. albicans*, выделенные в ассоциации с коагулазоположительными стафилококками с высокоадгезивными свойствами.

Если сравнить полученные результаты по адгезивной активности, то чистая культура *Candida* spp., выделенная от новорожденных детей, изменяет свои адгезивные свойства. Возможно, это происходит вследствие культивирования грибов на питательной среде, где в результате адаптации изменяются патогенные свойства возбудителя.

Известно, что *Candida* spp. относят к полноценным Т-зависимым антигенам [8, 9]. С целью изучения патогенных свойств мы также использовали 2 группы беспородных крыс-самцов массой 180–220 г ($195,4 \pm 27,3$). В качестве инфекта для крыс первой

группы использовали суточную взвесь чистой культуры (культуральная форма) *Candida* spp. в физиологическом растворе, для крыс 2 группы – тканевую форму *Candida* spp. с содержанием клеток гриба в количестве 10^2 в 1 мл. Дозу подбирали эмпирически с учетом массы животного.

При выборе пути введения инфекта мы основывались на том, что заражение грудных детей может происходить, в том числе, через соски матери [10]. Поэтому культуральную (1 группа животных) и тканевую (2 группа животных) формы *Candida* spp., выделенные от новорожденных детей, вводили энтерально. При этом мы преследовали две основные цели: оценить вирулентность патогена при данном пути введения трехкратно с интервалом 60 минут и воссоздать «синдром» избыточной колонизации кишечника у лабораторных крыс. Для сравнения иммунологических показателей до эксперимента и после, до инфицирования, у животных брали кровь, в которой определяли все интересующие нас показатели.

В содержимом кишечника, после инфицирования крыс, обнаруживали *Candida* spp. того же вида, что и вводили вместе с инфектом. Результаты микотического исследования содержимого кишечника крыс после энтерального инфицирования были следующими: в содержимом кишечника крыс 2 группы инфицированных высоко- и среднеадгезивными *Candida* spp. количество грибов, на 4–5 сутки, было в 1,8–2 раза больше, нежели у крыс 1 группы.

При иммунологических исследованиях энтерально инфицированных крыс высокоадгезивными грибами, на фоне обсемененности кишок *Candida* spp., на 7 день эксперимента нами зарегистрировано статистически значимое уменьшение количества IgA, IgM и IgG в сравнении с данными через 3 суток. Из этого следует, что развитие инфекции, вызванной высокоадгезивными *Candida* spp. (чаще тканевой формой *C. albicans*), может быть связано со снижением опсонизирующих свойств антител. У крыс, инфицированных среднеадгезивными штаммами *Candida* spp., уровень специфических IgG к антигенам *Candida* spp. статистически повышался на 7 сутки у крыс 2 группы, и на 5 сутки – у крыс 1 группы.

Известно, что ИНФ γ является наиболее сильным стимулятором эффекторных функций макрофагов [11], и он ограничивает размножение грибов на ранней стадии *Candida*-инфекции [8]. Изучением данного цитокина в крови исследуемых крыс доказано, что на 7–8 сутки эксперимента синтез этого цитокина был снижен у крыс 1 и 2 групп, инфицированных высокопатогенными *Candida* spp. (в 1,2 и 1,5 раза соответственно).

Кроме того, культуральная форма *Candida* spp., обладающая наименьшей адгезивной активностью, активирует нейтрофилы, в сравнении с тканевой формой *Candida* spp., на что указывает повышенное количество нейтрофилов в крови крыс 1 группы. Также было установлено, что в крови крыс 1 группы, по сравнению со 2 группой, в 1,2–1,3 раза выше концен-

трация провоспалительного ИЛ-6 в сыворотке крови.

Для изучения патогенных свойств культуральную и тканевую формы *Candida* spp. вводили внутривенно, и крыс подразделяли на группы:

1а — группа крыс, которым вводили культуральную форму высокоадгезивных *Candida* spp.;

1б — группа крыс, которым вводили культуральную форму среднеадгезивных *Candida* spp.;

2а и 2б — группа крыс, которым вводили тканевую форму высокоадгезивных и среднеадгезивных *Candida* spp. (соответственно).

Такое введение подопытным крысам сопровождалось развитием клиники тяжелой генерализованной инфекции: животные отказывались от приема пищи и воды, катастрофически быстро теряли массу. При вскрытии животных 1а и 2а групп макроскопически определяли более выраженные множественные поражения внутренних органов в виде некротических изменений. Причем такие некротические проявления чаще наблюдали у животных 2а группы, что, вероятно, связано с тем, что данные грибы в тканевой форме выделяли кандидотоксин, оказывающий некробактериальное действие. Гибель животных разных групп наступала в разное время: у животных 1а группы – через 29–42 часа; 2а – через 21–29 часов; 1б и 2б – через 96–102 часа.

При исследовании мазков крови и полутонких срезов легких, для изучения которых использовали способ двухцветного окрашивания в модификации В.М. Котвича, нами выявлена мицелиальная форма грибов у 75% животных 2а группы и 63% — 1а группы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнением двух форм *Candida* spp., выделенных от новорожденных детей, показано, что *Candida* spp. с высокоадгезивными свойствами, энтерально вводимые в организм лабораторных крыс до культивирования на питательной среде (тканевая форма *Candida* spp.), ингибировали показатели иммунной защиты уже на 7-е сутки эксперимента. Культуральная форма этих же грибов, выделенных от тех же новорожденных детей, проявляла такие свойства на 15–16 сутки эксперимента. Культуральная форма *Candida* spp., обладающая наименьшей адгезивной активностью, активирует нейтрофилы, в сравнении с тканевой формой этих же грибов, и не проявляет ингибирующего влияния на гуморальное звено иммунитета.

Тканевая и культуральная формы *Candida* spp., выделенные от одного и того же новорожденного, в тестах на адгезивную активность могут изменять это свойство в зависимости от культивирования и срока нахождения их вне организма.

Внутривенное введение тканевой формы *Candida* spp. приводит к более выраженным некротическим проявлениям в органах экспериментальных животных, что связано с наличием у данной формы гриба кандидотоксина с выраженными некробактериальными свойствами.

Таблица 2

Результаты изучения адгезивных свойств тканевых и культуральных форм *Candida* spp., выделенных от новорожденных детей

Форма <i>Candida</i> spp.	Количество <i>Candida</i> spp. (%)														
	<i>C. albicans</i>			<i>C. tropicalis</i>			<i>C. krusei</i>			<i>C. parapsilosis</i>			<i>C. kefyr</i>		
	характеристика адгезивных свойств														
	в/а	с/а	м/а	в/а	с/а	м/а	в/а	с/а	м/а	в/а	с/а	м/а	в/а	с/а	м/а
Тканевая форма	58,8	35,2	6	57,2	28,5	14,3	-	100	-	-	100	-	-	100	-
Культуральная форма	52,9	41,1	6	-	71,4	28,6	-	60	40	-	50	1	-	-	100

Условные обозначения: в/а – высокоадгезивные; с/а – среднеадгезивные; м/а – обладающие наименьшей адгезивной активностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бажукова Т.А. Этиологическая значимость грибов рода *Candida* при гнойно-септических заболеваниях//Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1997.- № 3. – С. 100-02.
2. Голубничая В.Н. Диагностика кандидоза у новорожденных//Ж. Проблемы медицинской микологии. – 2003. – Т.5, №2. – С.26-27.
3. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Грибковые инфекции. Руководство для врачей. – М.: Бином-пресс. – 2003. – 400 с.
4. Клиническое руководство по лабораторным тестам /Под ред. Н. Тица; Перев. с англ.- М.: ЮнимедПРЕСС, 2004. – 960 с.
5. Елинов Н.П. Патогенные дрожжеподобные организмы.- М.: Медгиз, 1964.- 384 с.
6. Елинов Н.П. Химическая микробиология. — М.: Высшая школа, 1989.- 448 с.
7. Елинов Н.П. *Candida* species и кандидемия. Состояние проблемы (обзор) //Ж. Проблемы медицинской микологии. – 2001. – Т.3, №1. – С.4-15.
8. Лебедева Т.Н. Иммуитет при кандидозе//Ж. Проблемы медицинской микологии. – 2004. – Т.4, №4. – С.8-17.
9. Rotani L. Immunity to *Candida albicans*:Th1, Th2 cells and beyond//Cur. Opin. Microbial. — 1999. – Vol.2, №4. – P. 363-367.
10. Знаменська Т.К., Туманова Л.Є., Філіненко Л.Л. Профілактика розвитку кандидозу у новонароджених//Акушерство, гінекологія, педіатрія. – 1997, №2. – С. 41-43.
11. Демьянов А.В., Котов А.Ю., Симбирце А.С. Диагностическая ценность исследования уровней цитокинов в клинической практике//Цитокины и воспаление. – 2003. – Т. 3, №3. – С. 48-51.

Поступила в редакцию журнала 23.06.09

Рецензент: Р.А.Аравийский



СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ КЛЕТОК *HISTOPLASMA CAPSULATUM* DARLING

Вьючнова Н.В. (научный сотрудник)*, Ткаченко Г.А. (старший научный сотрудник), Гришина М.А. (зав. лабораторией), Савченко С.С. (научный сотрудник), Антонов В.А. (зав.отд.), Липницкий А.В. (зам.директора)

ФГУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Россия

© Коллектив авторов, 2009

В статье рассмотрены различные методы выделения ДНК применительно к *H. capsulatum*. Проведен сравнительный анализ использования различных лизирующих ферментов для расщепления компонентов клеточной стенки возбудителей гистоплазмоза. Показано, что оптимальным методом выделения ДНК является гуанидинтиоцианат-фенольная экстракция с переосаждением ДНК изопропанолом. Чувствительность реакции амплификации составила $1 \cdot 10^4$ – $1 \cdot 10^5$ клеток/мл. Добавление на стадии пробоподготовки в образец литических агентов позволяет повысить чувствительность реакции амплификации до $1 \cdot 10^3$ – $1 \cdot 10^4$ клеток/мл.

Ключевые слова: лизирующие ферменты, методы выделения ДНК, *H. capsulatum*, ПЦР

THE COMPARATIVE ANALYSIS OF DNA EXTRACTION METHODS FROM *HISTOPLASMA CAPSULATUM* DARLING CELLS

Vyuchnova N.V. (scientific researcher), Tkachenko G.A. (senior scientific researcher), Grishina M.A. (head of the laboratory), Savchenko S.S. (scientific researcher), Antonov V.A. (head of the department), Lipnitsky A.V. (deputy director)

Research Institute for Plague Control, Volgograd, Russia

© Collective of authors, 2009

* Контактное лицо: Вьючнова Надежда Васильевна, Тел.: (8442)37-37-74

There are different methods of DNA extraction of *H. capsulatum* reviewed in this article. The comparative analysis of using of various lysing enzymes for destruction of cellular wall components of causative agents of histoplasmosis is carried out. It is shown that an optimum method of DNA extraction is guanidintioisyanat-phenolic extraction with DNA resedimentation by isopropanol. Sensitivity of reaction of amplification was $1 \cdot 10^4$ – $1 \cdot 10^5$ cells/ml. Addition at a stage DNA preparing in the sample lysis agents allows to raise the sensitivity of reaction of amplification to $1 \cdot 10^3$ – $1 \cdot 10^4$ cells/ml.

Key words: DNA extraction methods, *H. capsulatum*, lysing enzymes, PCR

ВВЕДЕНИЕ

К глубоким (эндемичным) микозам традиционно относят группу инфекций, обусловленных диморфными грибами, обитающими в почве определенных географических областей, и отличающихся респираторным механизмом заражения. Одним из таких этиологических агентов эндемических микозов является *H. capsulatum*, вызывающая гистоплазмоз [1, 2].

В настоящее время выделяют: *H. capsulatum* var. *capsulatum* — возбудитель классического (американского) гистоплазмоза, высоко эндемичные очаги которого расположены вдоль реки Миссисипи (США), и *H. capsulatum* var. *duboisii* — возбудитель африканского гистоплазмоза. Еще один вариант *H. capsulatum* var. *farcinosum* — возбудитель эпизоотического лимфангоита у лошадей, ослов, мулов. Возбудитель широко распространен в Европе, Северной Африке, Индии и Южной Азии, в патологии людей какого-либо существенного значения не имеет [1, 2].

Природным источником возбудителя считается почва, особенно — верхние ее слои. В естественных условиях микроицет существует в мицелиальной (сапробной) форме. Механизм заражения — аэрогенный. Основной инфицирующий элемент — конидии и мелкие фрагменты мицелия. При вдыхании возбудителя в организме человека происходит конверсия гриба из мицелиальной фазы в дрожжеподобную форму. Продолжительность инкубационного периода — от 3 до 17 дней. В большинстве случаев заболевание протекает бессимптомно. Наиболее распространенным клиническим вариантом гистоплазмоза является пневмония. Возбудитель способен вызывать диссеминированные заболевания, преимущественно у лиц с ослабленной иммунной системой, а также в престарелом возрасте [1–3].

Организм человека не обладает естественным иммунитетом к данным грибам, поэтому восприимчивость населения к ним считается всеобщей. На сегодняшний день надежной вакцины от гистоплазмоза не найдено.

Разнообразие клинических проявлений, наряду с отсутствием характерных черт заболевания, являются причинами трудностей постановки диагноза «гистоплазмоз». В настоящее время лабораторная диагностика основана на использовании микологического, биологического и иммунологического методов. Возбудителей гистоплазмоза относят к агентам

II группы патогенности [4]. Для выделения чистой культуры из клинического материала необходимо строгое соблюдение условий работы с *H. capsulatum*, согласно действующим СП 1.3.1285-03. Достоверность культурального метода должна быть подтверждена получением конверсии одной фазы гриба в другую. Как правило, эти процедуры занимают минимум 2–3 недели. К биологическому методу лабораторной диагностики гистоплазмоза прибегают для идентификации культуры гриба при исследовании патологического материала, сильно загрязненного посторонней биотой. При этом время, необходимое для верификации диагноза, увеличивается до 8 недель. Постановка иммунологических реакций занимает значительно меньшее время, но они не обладают высокой чувствительностью и специфичностью из-за возможных перекрестных реакций с гетерологичными видами микромицетов [1, 2].

В последнее время получила развитие и широкое применение в диагностике и генотипировании патогенных микроорганизмов полимеразная цепная реакция (ПЦР). При постановке ПЦР необходимо выделить достаточное количество ДНК с минимальным содержанием белков и других ингибирующих примесей. Основная проблема при выделении ДНК из грибов – как наиболее эффективно разрушить их клеточные стенки для того, чтобы с максимальным выходом экстрагировать ДНК. Как известно, дрожжевые и мицелиальные грибы обладают прочной клеточной стенкой, которая устойчива к действию большинства лизирующих агентов [5]. Общая масса клеточной стенки может достигать 30% от массы всей клетки, которая состоит на 40% из маннопротеинов и на 2% – из хитина; остальное приходится на полимер глюкозы – глюкан. Глюкан является важным структурным компонентом клеточной стенки, ответственным за поддержание ее прочности, состоящим из нескольких типов молекул полисахарида, образованных, в основном, β -1,3 и β -1,6-связанными остатками глюкозы. Хитин – минорный, но чрезвычайно важный компонент клеточной стенки грибов, состоящий из β -1,4-связанных остатков N-ацетилглюкозамина. В настоящее время для получения протопластов у микромицетов используют различные ферменты: β (1→3) и β (1→6) глюканазу (коммерческое название литиказа или зимолаза), протеазу, маннаазу, хитиназу и сок виноградной улитки [6], которые действуют разрушающе на различные межмолекулярные связи.

В доступной научной литературе имеется ограниченное количество работ, посвященных разработке ПЦР тест-систем для анализа ДНК *H. capsulatum*. Как правило, зарубежные авторы использовали коммерческие наборы для выделения ДНК из клеток. R. Bialek с соавторами применяли QIAamp tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) для образцов чистых культур, органов белых мышей линии Balb/c и клинического материала от больных. Чувствительность ПЦР составила 1–5 клеток/образец [7–9].

H. L. de Matos Guedes с соавторами для выделения ДНК использовали коммерческий препарат Puregene DNA isolation kit (Gentra Systems, Inc. Minneapolis, Minn.). Исследовали чистые культуры, пробы почвы и клинические образцы [10].

A. Врасса с соавторами разработали полугнездовую ПЦР. Исследования проводили с пробами крови, биоптата и кожных покровов, взятых у пациентов с подтвержденным диагнозом «гистоплазмоз»; для выделения ДНК использовали зимолазу. Все пробы исследовали микроскопически, культурально и в ПЦР. Проанализировали 30 проб (24 образца крови, 4 соскоба с кожи и 2 биоптата). При исследовании биоптатов и соскобов с кожи результаты всех трех методов совпадали. 4 образца крови были положительными в ПЦР, хотя в двух из них возбудитель не определялся другими используемыми в работе методами. В реакции амплификации показана возможность определять геномный материал, соответствующий 10 клеткам [11].

Анализ данных из научной литературы не позволяет сделать заключение о преимуществах использования тех или иных литических ферментов для экстракции ДНК из клеток возбудителей гистоплазмоза, а в случаях использования для выделения ДНК коммерческих наборов достаточно сложно оценить эффективность отдельных компонентов.

Цель данной работы заключалась в проведении сравнительной оценки методов выделения ДНК из клеток *H. capsulatum* и изучении эффективности использования различных литических ферментов на стадии пробоподготовки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили 18 штаммов *H. capsulatum* var. *capsulatum*, 4 штамма *H. capsulatum* var. *duboisii*, 1 штамм *H. capsulatum* var. *farciminosum*. Исследуемые штаммы микроорганизмов были предоставлены Коллекционным центром Волгоградского научно-исследовательского противочумного института (ФГУЗ ВолгоградНИПЧИ Роспотребнадзора).

Все работы проводили согласно требованиям режима работы с особо опасными микроорганизмами и общепринятыми требованиями к проведению ПЦР [12].

Штаммы возбудителей особо опасных микозов в мицелиальной фазе роста культивировали на агаре Сабуро с 3% дрожжевым экстрактом (Difco, США) при 28 °С в течение 30 суток. Дрожжевую форму *H. capsulatum* получали на агаре Френсиса с добавками при 37 °С в течение 10–14 суток, в зависимости от штамма. Выросшую культуру суспендировали в 0,15 М растворе NaCl, фильтровали через марлевый фильтр и обеззараживали добавлением раствора натрия мертиолатата до конечной концентрации 0,1 мг/мл с последующим прогреванием на водяной бане 40 мин при 56±1 °С и инкубацией при комнатной температуре в течение 24 ч. После обеззараживания

взвеси делали контрольные высева на стерильность. Количество клеток дрожжевой фазы подчитывали в камере Горяева.

Использовали три способа выделения ДНК: кипячение грибных суспензий при 100 °С в течение 30 мин, метод нуклеосорбции в присутствии гуанидинтиоцианата [13] и гуанидин-фенольной экстракции с переосаждением ДНК изопропанолом [14].

В качестве источника литических ферментов использовали пищеварительный сок улитки (ПСУ) (ФГУЗ ВолгоградНИПЧИ Роспотребнадзора) и коммерческий препарат «Lysing Enzymes from *Trichoderma harzianum*» (Sigma, США).

Реакционная смесь в объеме 25 мкл содержала исследуемую ДНК, специфические олигонуклеотидные праймеры, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, фермент Таq-полимеразу и буферный раствор, различный для каждой пары праймеров.

Аmplификацию проводили на мультициклере «Терцик» (НПФ «ДНК-технология», Москва) с использованием «горячего старта». Анализ продуктов ПЦР осуществляли методом гель-электрофореза в 1,5% агарозном геле с окраской фрагментов ДНК этидиумом бромидом и визуализацией в УФ-свете. Специфичность полосы амплифицированной ДНК подтверждалась ее положением (размером) по отношению к маркерным фрагментам.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе использовали сконструированные нами 2 пары праймеров. Одна пара комплементарна фрагменту гена белка *MS8* — *mold-specific MS8 protein* (GenBank NCBI, [AY049031](#)), экспрессия которого происходит в мицелиальной фазе развития гриба [3,15,16]. Вторая пара специфична фрагменту гена кальций-связывающего белка — *calcium-binding protein CBP1* (GenBank NCBI, [AF006209](#)), экспрессия которого происходит в дрожжевой фазе и способствует выживанию клеток в макрофагах человека [3,16,17]. Выбранные праймеры обозначили как *HcMS8s-HcMS8as* и *HcCBP1s-HcCBP2as*, соответственно.

В ходе работы оценивали несколько методов выделения ДНК из микромицетов. При сравнении способов выделения ДНК учитывали следующие критерии – простота, доступность, быстрота выполнения, воспроизводимость, степень экстракции ДНК. Эффективность методов выделения ДНК определяли по наличию специфической амплификации в пробах.

Первоначально, для экстракции нуклеиновых кислот из клеток микромицетов, использовали кипячение грибной взвеси. Как следует из рисунка, фрагменты необходимого размера в реакции амплификации синтезировались с ДНК возбудителей гистоплазмоза в пробах с концентрацией $1 \cdot 10^6$ клеток/мл. Отмечено наличие «шлейфов» на электрофореграмме. Нами установлено, что высокотемпературный лизис, будучи самым простым и доступным методом выделения нуклеиновых кислот, оказался мало эф-

фективным для выделения ДНК *H. capsulatum*, вероятно, в связи с недостаточным разрушением клеточной стенки грибов.

Использование в работе методики нуклеосорбции в присутствии натрия гуанидинтиоцианата позволило повысить чувствительность ПЦР до $1 \cdot 10^5$ клеток/мл (Рис. 1). Однако при использовании метода нуклеосорбции возможны потери ДНК вследствие необратимой адсорбции на носителе, а также в процессе многочисленных отмывок. Особенно большое значение это имеет при работе с небольшими количествами ДНК в образце.

В ходе исследований для сравнения использовали ещё один метод выделения ДНК из микромицетов, разработанный G.S. Sandhu с соавторами [14]. Чувствительность реакции амплификации с используемыми праймерами составила $1 \cdot 10^4$ — $1 \cdot 10^5$ клеток/мл (Рис. 1).

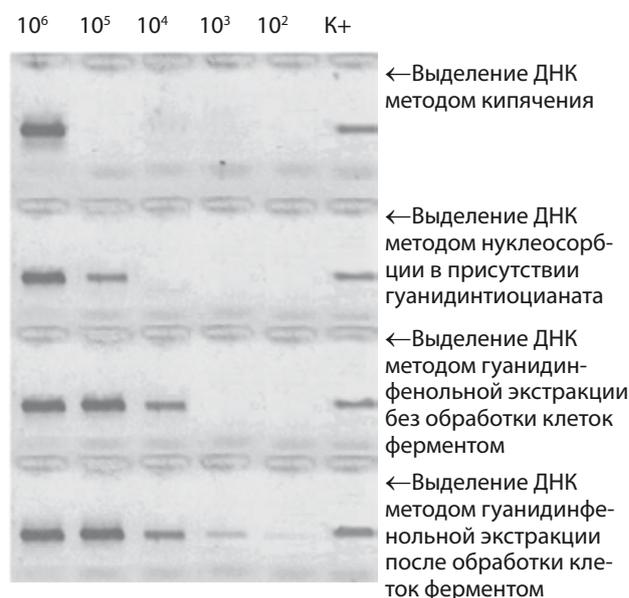


Рис.1. Электрофореграмма результатов ПЦР при сравнении эффективности различных способов экстракции ДНК возбудителей гистоплазмоза. 10^6 – 10^2 – концентрация грибных суспензий клеток/мл K+ – положительный контроль

Из всех апробированных методов наиболее эффективным для выделения ДНК из клеток *H. capsulatum* оказался метод гуанидинтиоцианат-фенольной экстракции с переосаждением ДНК изопропанолом.

Для изучения эффективности использования различных ферментов на стадии пробоподготовки при выделении ДНК из клеток *H. capsulatum* в ПЦР применяли различные литические препараты, разрушающие компоненты клеточной стенки грибов [5, 6, 18]. Первоначально использовали пищеварительный сок улитки (ПСУ) как источник хитинолитических ферментов. Для определения оптимальных условий выделения ДНК к суспензии клеток *H. capsulatum* добавляли 5, 10, 20, 30 мкл ПСУ и инкубировали смесь при 37 °С в течение 1, 6, 18 часов, после чего выделяли ДНК методом гуанидин-фенольной экстракции с

пересаживанием ДНК изопропанолом. Использование ПСУ позволило повысить эффективность выделения ДНК из клеток *H. capsulatum* и обеспечило амплификацию специфических фрагментов в ПЦР у большинства используемых в работе штаммов. ПСУ — фермент опытного образца, используемый для лизиса клеточной стенки грибов, не стандартизирован, и активность его может изменяться от серии к серии [18]. Вследствие этого, в дальнейшей работе для расщепления клеточной стенки микромицетов мы использовали коммерческий препарат «Lysing Enzymes из *Trichoderma harzianum*», обладающий целлюлазной, протеазной и хитиназной активностями. Фермент добавляли в концентрациях 1, 2, 3, 4 и 5 мг/мл и инкубировали смесь 1, 6, 18 часов при температуре 37 °С. На основании проведенных экспериментов установлено, что применение лизирующих ферментов из *T. harzianum* в оптимальной концентрации 2 мг/мл и выдерживанием смеси в течение 1 часа при 37 °С позволило повысить эффективность экстракции ДНК из клеток *H. capsulatum*. В этом случае чувствительность ПЦР составила 1·10³–1·10⁴ клеток/мл (Рис. 1).

Для сравнения полученных результатов использовали гнездовую ПЦР с олигонуклеотидными затравками *Hc100 PCR* на основе гена, кодирующего уникальный 100 кДа белок *H. capsulatum* [7,9]. Чувствительность реакции амплификации с применением литических ферментов как для прайме-

ров *HcMS8s-HcMS8as* и *HcCBP1s-HcCBP2as*, так и праймеров *Hc100 PCR*, была одинаковой и составила 1·10⁴ кл/мл. Однако в работах Bialek R. с соавторами чувствительность реакции амплификации составляла 1-5 клеток в образце, но для определения концентрации использовали чистую ДНК плазмиды pCR2.1-ТОРО, на которой был клонирован участок амплифицируемого гена *H. capsulatum* в бактериях. Клеточная стенка бактерий по своему составу сильно отличается от оболочки гриба. При экстракции ДНК из клетки бактерии полного лизиса можно достичь простым кипячением, в то время как клеточная стенка микромицетов, как правило, при этом не разрушается. Этим можно объяснить несоответствие заявленной авторами чувствительности ПЦР (1-5 грибных клеток) с нашими результатами, которые получены в экспериментах при работе с целыми клетками грибов.

На основании проведенных исследований можно сделать вывод о преимуществе метода гуанидинтиоцианат-фенольной экстракции с пересаживанием ДНК изопропанолом для выделения ДНК из клеток *H. capsulatum*. В ходе работы мы оценили эффективность использования литических ферментов на стадии пробоподготовки. Предварительное воздействие лизирующих агентов на клетки *H. capsulatum*, в конечном итоге, позволило повысить чувствительность реакции ПЦР до 1·10³–1·10⁴ клеток/мл.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kauffman C.A. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update // Clin. Microbiol. Rev.-2007.-Vol.20, №1.-P.115–132.
2. Guimarães A.J., Nosanchuk J.D., Zancopé-Oliveira R.M. Diagnosis of histoplasmosis // Brazilian J. of Microbiology.-2006.-Vol.37.-P.1-13.
3. Maresca B., Kobayashi G.S. Dimorphism in *Histoplasma capsulatum*: a model for the study of cell differentiation in pathogenic fungi // Microbiol. Rev.-1989.-Vol.53, №2.-P.186-206.
4. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.23.22-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» // утверждены главным государственным санитарным врачом РФ Г.Г.Онищенко 28.01.2008 г. под №4, зарегистрированы в Министерстве юстиции РФ 21.02.2008 г. под №11197, введены в действие с 1.05.2008 г.
5. Данилевич В.Н., Гришин Е.В. Новый подход для выделения геномной ДНК из дрожжей и грибов: получение ДНК-содержащих клеточных оболочек и их прямое использование в ПЦР // Биоорганическая химия.-2002.-Т.28, №2.-С.156-167.
6. Кабелина Т.С., Кулаев И.С. Роль белков в формировании молекулярной структуры клеточной стенки дрожжей // Успехи биологической химии.-2001.-Т.41.-С.105-130.
7. Bialek R., Fischer J.R., Feucht A., et al. Diagnosis and monitoring of murine histoplasmosis by a nested PCR assay // J.Clin. Microbiol.-2001.-Vol.39, №4.-P.1506-1509.
8. Bialek R., Ernst F., Dietz K., et al. Comparison of staining methods and a nested PCR assay to detect *Histoplasma capsulatum* in tissue sections // Microbiol. and Infect. Dis.- 2002.-Vol.117.-P.597-603.
9. Bialek R., Feucht A., Aepinus C., et al. Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue // J.Clin.Microbiol.-2002.-Vol.40, №5.-P.1644-1647.
10. H.L. de Matos Guedes, Guimarães A.J., Peralta J.M., et al. PCR assay for identification of *Histoplasma capsulatum* based on the nucleotide sequence of the M antigen // J.Clin.Microbiol.-2003.-Vol.41, №2.-P.535-539.
11. Bracca A., Tosello M.E., Girardini J.E., et al. Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in human clinical samples // J.Clin.Microbiol.-2003.-Vol.41, №4.-P.1753-1755.
12. МУ 1.3.1794–03. Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I-II групп патогенности. – М., 2003.
13. Boom R., Sol C.J.A., Salimans M.M., et al. Rapid and simple method purification of nucleic acids // J.Clin.Microbiol.-1990.-Vol.28, №3.-P.495-503.
14. Sandhu G.S., Bruce C.K., Stockman L. Molecular probes for diagnosis of fungal infections // J.Clin.Microbiol.-1995.-Vol.41, №4.-P.2913-2919.

15. Xianbin T., Glenmore S. The mold-specific *MS8* gene is required for normal hypha formation in the dimorphic pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* // Eukaryotic cell.-2002.-Vol.1, №2.- P.249-256.
16. 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 // Molecular Biology of the Cell.-2003.-Vol.14.-P.2314-2326.
17. Ratel J.B., Batanghari J.W., Goldman W.E. Probing the yeast phase-specific expression of the *CBP1* gene in *Histoplasma capsulatum* // Journal of Bacteriology.-1998.-Vol.180, №7.-P.1786-1792.
18. Salazar O., Juan Ж., Asenjo A. Enzymatic lysis of microbial cells // Biotechnol. Lett.-2007.-Vol.29.-P.985-994.

Поступила в редакцию журнала 03.08.09

Рецензент: С.М. Игнатъева



ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ *CRYPTOCOCCUS* *NEOFORMANS* ИЗ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ Г. САНКТ-ПЕТЕРБУРГА

Босак И.А. (врач-лабораторный миколог)*

НИИ медицинской микологии им. П.Н.Кашкина ГОУ
ДПО СПб МАПО, Санкт-Петербург, Россия

©Босак И.А., 2009

Биосубстраты из окружающей среды (253 пробы) в г. Санкт-Петербурге были исследованы на содержание Cryptococcus neoformans. C. neoformans был обнаружен только в четырех из 124 проб помета голубей, что составило 3,2% для этого вида субстрата. При исследовании морфологии и биологических свойств in vitro установлено, что природные изоляты C. neoformans обладают: способностью расти при 40 °С, узкой капсулой, уреазной, фенолоксидазной, фосфолипазной активностями. Природные изоляты C. neoformans были слабопатогенные (LD 50 при внутривенном заражении белых мышей составила 1·10⁶–1·10⁷ клеток/мышь).

Ключевые слова: вирулентность, капсула, помет голубей, природные резервуары, *Cryptococcus neoformans*, экология

ISOLATION AND CHARACTERISTIC OF *CRYPTOCOCCUS* *NEOFORMANS* ISOLATES IN SAINT PETERSBURG ENVIRONMENTAL, SAINT PETERSBURG, RUSSIA

Bosak I.A. (laboratory researcher)

Kashkin Research Institute of Medical Mycology, SEI APE
SPbMAPE, Saint Petersburg, Russia

© Bosak I.A., 2009

In our work 253 samples from environmental sources in Saint Petersburg, including 124 samples of pigeon droppings from garrets of dwellings have been investigated. C. neoformans has been found in four samples of pigeon droppings (3,2 % for this source). Research of morphology and biological properties has shown, that environmental isolates of C. neoformans can grow at 40°C, they have thin capsule in vitro and produce urease, phenoloxidase and phospholipase. Environmental strains of C. neoformans were low virulent for white mice. LD50 ranged from 1·10⁶ to 1·10⁷ cells/mouse after intravenous inoculation.

Key words: capsule, *Cryptococcus neoformans*, ecology, environmental sources, pigeon droppings, virulence for mice.

* Контактное лицо: Босак Илья Алексеевич
Тел.: (812)303-51-45

ВВЕДЕНИЕ

Базидиомицетовые капсулированные дрожжи *C. neoformans* распространены повсеместно в мире и способны вызывать поражение центральной нервной системы у иммунокомпрометированных и, реже, у иммунокомпетентных лиц [1]. Экология *C. neoformans* достаточно хорошо изучена применительно к странам и территориям с умеренным, суб-, и тропическим климатом, тогда как в регионах с прохладным и холодным климатом сведения о таких исследованиях весьма ограничены.

В настоящее время для *C. neoformans* характерны 8 молекулярных типов: VNI, VNII, VNIII, VNIV (*C. neoformans* var. *neoformans*), VGI, VGII, VGIII, VGIV (*C. neoformans* var. *gattii*). Из них VNI, VNII выделяют по всему миру, а VNIII и VNIV больше распространены в Европе [2, 3]. *C. neoformans* var. *gattii* распространен только в тропических и субтропических климатических зонах [4-6]. Известна симбиотическая связь *C. neoformans* var. *gattii* серотипа В с двумя видами эвкалиптов [4]. Первые сведения о молекулярных типах *C. neoformans*, выделенных от больных в России, получены Н.В. Васильевой [7-10].

Наиболее часто *C. neoformans* выявляют из субстратов, обильно загрязненных пометом птиц, в основном голубей, но природными биосубстратами, из которых может быть выделен *C. neoformans*, в различных условиях могут выступать: почва, гниющая древесина, фрукты [11-15]. Реже, с различной частотой в зависимости от географического региона, этот микромицет выделяют из таких источников как: деревья, домашняя пыль, слизистая оболочка ротовой полости и полости носа домашних животных (кошек, собак, коров и др.) [11,16].

Учитывая рост численности пациентов, входящих в группу риска возникновения криптококкоза: СПИД, аутоиммунные заболевания, лица после кортикостероидной терапии, пациенты гематологических стационаров, всё более актуальной оказывается проблема природных резервуаров *C. neoformans* в городской среде. В настоящее время сведения об особенностях природных изолятов *C. neoformans* в России отсутствуют.

Цель настоящей работы — выделение и характеристика изолятов *C. neoformans* из окружающей среды в г. Санкт-Петербурге.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве возможных природных субстратов — источников *C. neoformans*, нами были исследованы: содержимое кишечника птиц, погибших от неизвестных причин (вороны, сороки, воробьи, синицы, снегири); помет голубей, отобранный с чердаков жилых зданий двух районов г. Санкт Петербурга; почва и листовая опад; пробы со слизистых оболочек зева и носа домашних животных (кошек, собак).

Пробы помета голубей и листовой опад подготавливали к исследованию следующим образом: про-

бы растирали в стерильной фарфоровой ступке до однородного состояния и готовили навески по 1 г. Навески проб разводили в 9 мл стерильного 0,9% водного раствора натрия хлорида и тщательно перемешивали [14]. Полученную взвесь в объеме 0,1 мл стеклянным шпателем втирали в поверхность агара Сабуро, содержащего хлорамфеникол и гентамицин, с последующей инкубацией в термостате при 37 °С, в течение 5–10 суток. Чашки ежедневно просматривали, а подозрительные на криптококки колонии микроскопировали в тушевом препарате; при наличии капсулы видовую идентификацию проводили при помощи тест-системы «Auchacolor®2».

Для изучения биохимических особенностей выделенных культур дрожжей (ассимилятивной и ферментативной активностей) использовали следующие питательные среды: с яичным желтком, Христенсена, с L-ДОФА и тест-систему «Auchacolor®2» (Bio-Rad, Франция).

Микроморфологию клеток криптококков изучали при микроскопии трехсуточной культуры (37 °С, агар Сабуро) в «раздавленной капле» и в туши. Морфометрическое исследование клеток (диаметр клеток, толщина капсулы) каждого штамма криптококка проводили с помощью светового микроскопа Leica DM LB, используя программное обеспечение Leica IM 1000, Adobe Photoshop 7, Excel и персональный компьютер на базе процессора Intel. Учитывали следующие параметры: диаметр клеток, толщину капсулы; всего измеряли по 50 клеток каждого изолята.

Способность клеток *C. neoformans* расти при повышенных температурах

Культуры грибов засеивали штрихами на чашки Петри с агаром Сабуро и инкубировали в термостате при 35 °, 37 °, 39 °, 40 °, 42 °, 45 °С. Учет результатов производили на 3-и и 7-е сутки выращивания. Результаты оценивали качественно: «+» – рост есть, «±» – очень слабый рост, «-» – роста нет.

Изучение патогенности криптококков в опытах на лабораторных животных.

Определение патогенности криптококков на модели экспериментального криптококкоза при внутривенном введении клеток патогенна белым мышам.

В этой серии опытов модель экспериментального криптококкоза воспроизводили на беспородных мышках-самцах с массой тела 18–20 г.

Культуры криптококков выращивали на плотной среде Сабуро при +37 °С в течение 72 часов, затем готовили взвеси в стерильном водном 0,9% растворе NaCl и вводили внутривенно по 0,5 мл мышам в хвостовую вену. Животным контрольной группы вводили по 0,5 мл 0,9% стерильного раствора натрия хлорида. Дозы патогена составляли 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 клеток *C. neoformans* на мышку для каждого штамма, каждую дозу испытывали на 10 мышках. В качестве количественной характеристики вирулентности различных штаммов криптококков была принята величина LD₅₀, которую определяли для каждого штамма

на 28 сутки эксперимента методом «пробитов».

Ферментативная активность криптококков - фосфолипазная, уреазная, фенолоксидазная
Определение внеклеточной фосфолипазной активности.

Фосфолипазную активность штаммов криптококков определяли чашечным методом на агаре с яичным желтком.

Из трехсуточных культур *C. neoformans*, выращенных на агаре Сабуро при +37 °С, готовили суспензии клеток в дистиллированной воде. Устанавливали густоту взвесей грибных клеток 10^7 на мл подсчетом в камере Горяева.

В центр чашки Петри с желточным агаром наносили каплю взвеси объемом 0,02 мл. Для каждого штамма, выделенного из окружающей среды, использовали две чашки с желточным агаром. После высыхания капель засеянные чашки ставили в термостат на 37 °С и инкубировали в течение 7 суток. Результаты учитывали через 3 и 7 суток.

При учете результатов проводили измерение диаметра выросших колоний и диаметра зоны помутнения среды вокруг колонии. Рассчитывали показатель фосфолипазной активности (Pz), равный отношению диаметра колонии гриба к диаметру зоны помутнения среды. Минимальные значения Pz соответствовали наибольшей фосфолипазной активности штаммов.

Определение уреазной активности.

Культуры засеивали на косяки с агаром Христенсена (короткий штрих в центре косяка) и инкубировали при +28 и +37 °С в течение 4 суток. Регистрацию результатов проводили ежедневно и оценивали по изменению цвета среды - из желтого на малиновый. Интенсивный малиновый цвет всего косяка – 3 балла (+++), неполное малиновое окрашивание среды – 2 балла (++) , малиновая окраска только в зоне штриха – 1 балл (+), желтую окраску среды отмечали как «0» (-). Контроль – не засеянные пробирки.

Определение фенолоксидазной активности.

Выявление фенолоксидазной активности производили на среде с L-ДОФА. В результате ферментативного окисления этого субстрата образуется темный пигмент - меланин.

Культуры засеивали на чашки с L-ДОФА-агаром радиальными штрихами. Инкубировали при + 28 ° и +37 °С в течение 3 суток. Результаты контролировали ежедневно. Накопление пигмента оценивали полуколичественно, в баллах: «+++» -пигментация штриха интенсивная от темно-коричневой до черной, «++» - менее интенсивная окраска штриха – коричневая, «+» - штрих светло-коричневый, «-» - штрих белый, светлый, окраски нет.

Чувствительность криптококков к флуконазолу и вориконазолу.

Чувствительность криптококков к антимикотикам определяли диско-диффузионным методом по протоколу CLSI M44A.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование природных субстратов на наличие криптококков.

Рост *C. neoformans* получен в четырех пробах помета голубей при посеве на среду Сабуро-агар с левомицетином и гентамицином, что составило 3,2% от проб данного биосубстрата. Все исследованные образцы других природных материалов: почва, лиственной опад, помет голубей, содержимое кишечника птиц, погибших от неизвестных причин, пробы со слизистых оболочек зева и носа кошек и собак были негативными по росту *C. neoformans* (табл. 1.)

Таблица 1.

Результаты микологического исследования образцов природных биоматериалов на содержание *C. neoformans*

Объекты исследования	Общее количество проб	Количество проб, положительных на <i>C. neoformans</i> (%)
Содержимое кишечника птиц	63	0
Мазки из зева и носа домашних животных (кошек, собак)	47	0
Помет голубей	124	4 (3,2%)
Почва, лиственной опад	18	0

Описание культур и микроморфология клеток криптококков

Колонии изолятов *C. neoformans* (ГП 1, ГП 2, ГП 3, ГП 4) на агаре Сабуро через 3 суток инкубации при +37 °С блестящие, слизистые, светло-кремового или кремового цвета.

При микроскопии нативных препаратов клетки исследуемых штаммов были округлыми, одиночными или почкующимися. Средний диаметр клеток исследуемых штаммов *C. neoformans* варьировал в небольших пределах (от 5,26 до 5,71 мкм). Ширина капсулы в тушевом препарате составляла от 0,6 мкм до 0,8 мкм (табл. 2).

Таблица 2

Микроморфология природных изолятов *C. neoformans*

Изолят <i>C. neoformans</i>	диаметр клетки (мкм) $M \pm m$	ширина капсулы (мкм) $M \pm m$
ГП 1	5,30±0,12	0,64±0,02
ГП 2	5,71±0,26	0,80±0,03
ГП 3	5,26±0,09	0,62±0,02
ГП 4	5,34±0,08	0,74±0,03

Патогенность криптококков на модели экспериментального криптококкоза при внутривенном введении.

Результаты исследования патогенности природных изолятов *C. neoformans* приведены в таблице 3.

Таблица 3

Средние летальные дозы природных изолятов *C. neoformans*

Изолят <i>C. neoformans</i>	LD ₅₀
ГП 1	1·10 ⁶
ГП 2	1·10 ⁷
ГП 3	1·10 ⁶
ГП 4	1·10 ⁶

Таким образом, изученные изоляты *C. neoformans* проявили слабую вирулентность на модели внутривенного заражения беспородных мышей.

Способность клеток *C. neoformans* расти при повышенных температурах.

Все изоляты формировали типичные для *C. neoformans* колонии на плотной среде Сабуро к третьим суткам инкубации при +40 °С; при +42 °С рост всех изолятов гриба отсутствовал.

Определение уреазной активности.

Результаты определения уреазной активности исследуемых штаммов криптококков при выращивании на агаре Христенсена при +28 °С и +37 °С приведены в таблице 4.

Таблица 4

Уреазная активность природных изолятов *C. neoformans*

изолят <i>C. neoformans</i>	Сутки при:					
	28 °С			37 °С		
	1-е	2-е	3-и	1-е	2-е	3-и
ГП 1	+	++	+++	+	+++	+++
ГП 2	+	++	+++	++	+++	+++
ГП 3	+	++	+++	+++	+++	+++
ГП 4	+	++	+++	+++	+++	+++

Все штаммы проявили высокую уреазную активность (+++) к третьим суткам наблюдения. Отмечено, что изоляты ГП 3 и ГП 4 при +37 °С продуцировали уреазу быстрее, чем изоляты ГП 1 и ГП 2.

Меланинообразование природных изолятов *C. neoformans*

Все изученные изоляты проявили высокую фенолоксидазную активность на синтетической среде с L-ДОФА – пигментацию штриха культуры оценивали как интенсивную: от темно-коричневой до черной с диффузией в среду.

Определение фосфолипазной активности криптококков

Результаты определения фосфолипазной активности штаммов криптококков на среде с желтковым агаром приведены в таблице 5.

Таблица 5

Фосфолипазная активность природных изолятов *C. neoformans*

Изолят <i>C. neoformans</i>	Показатель Pz
ГП 1	0,54±0,03
ГП 2	0,57±0,03
ГП 3	0,60±0,03
ГП 4	0,51±0,03

Все изоляты криптококков образовывали зоны преципитации на среде с желтковым агаром через трое суток выращивания при 37 °С. Ширина зоны преципитации и, соответственно, Pz варьировали от 0,54 (максимальная продукция фосфолипазы) до 0,60 (меньшая продукция фосфолипазы).

Исследование чувствительности криптококков к флуконазолу и вориконазолу диско-диффузионным методом CLSI M44A.

Диаметры зоны задержки роста для изученных штаммов находились в пределах 32–37 мм для флуконазола и 35–44 мм — для вориконазола. Таким

образом, все исследованные изоляты отнесены к категории чувствительных с МПК ≤ 8 мкг /мл для флуконазола и ≤ 1 мкг /мл — для вориконазола.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ВЫВОДЫ

Для *C. neoformans* существует ряд природных резервуаров, в том числе среди основных отмечают помет и гнезда птиц (голубей, канареек, попугаев) [11, 16, 25]. В результате исследования из 124 проб помета голубей было выделено четыре изолята *C. neoformans*, частота выделения составила 3,2%, что существенно ниже указанных в литературе данных для других регионов [15]. Возможно, выявленная нами низкая встречаемость *C. neoformans* обусловлена особенностями климата в Санкт-Петербурге. Из других исследованных нами субстратов *C. neoformans* не выделен. Таким образом, сухие отложения помета голубей являются основным ре-

зервуаром *C. neoformans* в природно-климатических условиях г. Санкт-Петербурга.

При исследовании морфологии и биологических свойств выделенных культур установлено, что все изоляты обладают основными факторами вирулентности: способностью образовывать капсулу, внеклеточной уреазной, фосфолипазной, фенолоксидазной активностями, способностью к росту при +37 °С и выше. Тем не менее, изученные изоляты являются слабопатогенными. Эти наблюдения согласуются с данными ряда зарубежных исследователей [17, 18].

Несомненно, применение новых методов молекулярно-генетических исследований для изучения возбудителей криптококкоза позволит выявить причины слабой вирулентности природных изолятов. В настоящее время, в качестве международного стандарта предложен метод мультилокусного секвенирования для типирования *C. neoformans* и *C. gattii* [2].

ЛИТЕРАТУРА

1. Jianghan Chen. Population structure of *C. neoformans* and high frequency of cryptococcosis in immunocompetent patients in China // 7th International Conference on Cryptococcus & Cryptococcosis, 2008.
2. Meyer W., Gilgado F., Kaoharoen S. Global molecular epidemiology divides the *Cryptococcus* species complex into 8 major molecular types and reveals the possible origin of the Vancouver Island outbreak // 7th International Conference on Cryptococcus & Cryptococcosis, 2008
3. Meyer W. Molecular characterization of *Cryptococcus neoformans* species complex // 6th International conference on Cryptococcus and Cryptococcosis. S6.1. - Boston Usa, 2005.
4. Ellis D. and Pfeiffer T.J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* // J. Clin. Microbiol. - 1990. - Vol. 28. - P. 1642-1644.
5. Meyer W., Aanensen D.M., Boekhout T., et al. Molecular Mycology Research Laboratory, Centre for Infecti Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* // Med. Mycology. - 2009. - Vol. 47. - P.561-570.
6. Sorell T.C., Pfeiffer T.J., Ellis D. H. Natural Environmental Sources of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* // J. of Clin. Microbiol. - 1996. - P.1261-1263.
7. Васильева Н.В. Факторы патогенности *Cryptococcus neoformans* и их роль в патогенезе криптококкоза: Дисс... докт. биол. наук. - СПб., 2005.
8. Vasilyeva N.V., Yelinov N.P., Thileva E.A., et al. The mating of strains *Cryptococcus neoformans* isolated from patients in Russia // "Cryptococcus and Cryptococcosis", 2002
9. Мейер В., Васильева Н.В., Елинов Н.П. и др. Анализ ДНК в геноме *Cryptococcus neoformans* изолятов от больных методами ПЦР - отпечатков и РАПДФ // Ж. Проблемы медицинской микологии. - 2003. - Т.5, №3. - С. 3-11.
10. Vasilyeva N.V., Viviani M.A. Survey of cryptococcosis in Europe, the ECMM working group report // Iberoamericana Micologia. - 2000. - Vol.17, №3. - P.115.
11. Emmons C. W. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil // J. Bacteriol. - 1951. - №62. - P.685-689.
12. Emmons C. W. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*) // Amer. J. Hyg. - 1955. - №62. - P.227-232.
13. Littman M.L. and Schneier S.S. *Cryptococcus neoformans* in pigeon excreta in New York City // Am. J. Hyg. - 1959. - №69. - P.49-59.
14. Camile Lugarini, Cristine Souza Goebel. *Cryptococcus neoformans* Isolated from Passerine and Psittacine Bird Excreta in the State of Parana // Brazil. Mycopathologia. - 2008. - №166. - P.61-69.
15. Kobayashi C., Souza L., Fernandes O. Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás state // Brazil Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo. - 2005. - Vol.47, №4. - P.203-207.
16. Ellis D.H., Pfeiffer T.J. Natural Habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* // J. of Clin. Microbiol. - 1990. - P. 1642-1644.
17. Litvintseva A.P., Kestenbaum L., Vilgalys R., Mitchell T.G. Comparative Analysis of Environmental and Clinical Populations of *Cryptococcus neoformans* // J. of Clin. Microbiol. - 2005. - P. 556-564.
18. Litvintseva A.P., Mitchell T.G. Most Environmental Isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (Serotype A) Are Not Lethal for Mice // Infect. and Immun. - 2009. - Vol. 77, № 8. - P.3188-3195.

Поступила в редакцию журнала 10.09.09

Рецензент: Богомолова Т.С.





ПЕРВЫЙ ЗОЛОТОЙ ЮБИЛЕЙ Н. В. ВАСИЛЬЕВОЙ

N. V. VASYLIEVA — TO THE GOLD JUBILEE

27 июля 2009 г. доктор биологических наук, профессор Наталья Всеволодовна Васильева — директор НИИ медицинской микологии им. П. Н. Кашкина ГОУ ДПО СПб МАПО встретила свой первый золотой юбилей. Ею по-праву гордятся земляки в деревне Вилково Одесской области как первой и единственной на селе, достигшей таких высоких степени и звания!

В 1982 году она закончила с отличием Ленинградский химико-фармацевтический институт (ЛХФИ), а в 1987 г. — очную аспирантуру по специальности «микробиология» и защитила в 1989 г. кандидатскую диссертацию на тему: «Влияние криптококкового полиуронида на макрофаги».

Трудовая деятельность Натальи Всеволодовны началась со старшего лаборанта кафедры микробиологии ЛХФИ, затем с 1990 по 1996 гг., последова-

тельно, в должности младшего научного сотрудника работала во Всесоюзном научно-исследовательском технологическом институте антибиотиков и ферментов медицинского назначения (ВНИТИАФ) в лаборатории экспериментальной микологии, в должности научного сотрудника в лаборатории иммунологии и старшего научного сотрудника в лаборатории химиотерапии и патоморфологии НИО глубоких микозов СПб МАПО. Очевидно, «сама судьба подсказала» руководству МАПО целесообразность выдвижения кандидатуры руководителя лаборатории морфологии и биологии грибов Васильевой Н. В. на пост директора НИИ медицинской микологии им. П. Н. Кашкина, и это произошло в 1997 г.

За истекшие 12 лет под руководством Натальи Всеволодовны НИИ медицинской микологии организационно вырос и окреп, а также приобрел известность внутри России, в странах ближнего и дальнего зарубежья. Назовем лишь главные свершения за истекшие годы:

1. трансформация центра глубоких микозов и микогенной аллергии в НИИ медицинской микологии им. П. Н. Кашкина (приказ ректора №57 от 03.04.1998 г.);

2. организация и утверждение в ректорате СПб МАПО состава ученого совета (и положения о нем) НИИ медицинской микологии им. П. Н. Кашкина (приказ №744 от 22.05.09 г; положение от 18.01.99 г.);

3. подготовка всей необходимой документации по открытию лабораторной и клинической микологии с последующим ее утверждением в Минздраве России;

4. включение лабораторной и клинической микологии в качестве базовых дисциплин в учебный план постдипломной подготовки врачей (приказы Минздрава РФ №337 от 27.08.99 г. и №№ 115, 116 от 21.03.2003 г.);

5. предание коллекции патогенных и условно-патогенных грибов ранга Всероссийской (приказ МЗ РФ № 19 от 28.01.2004 г.);

6. создание научно-методического микологического центра Минздрава России на базе НИИ медицинской микологии им. П. Н. Кашкина ГОУ ДПО СПб МАПО (приказ МЗ РФ №20 от 28.01.2004 г.) с приданием ему функций референтного учреждения по медицинской микологии в России;

7. организация кафедры лабораторной микологии на базе НИИ медицинской микологии им. П. Н. Кашкина (приказ по СПб МАПО от 03.05.2007 г.) с избранием Натальи Всеволодовны заведующей кафедрой.

8. активное участие Натальи Всеволодовны как заместителя главного редактора:

- а) в создании оригинального научно-практического журнала «Проблемы медицинской микологии»;

- б) в организации ежегодных научно-практических конференций по медицинской микологии («Кашкинских чтений»), признанных исключительно полезными для разных специалистов — микологов и, в целом, микробиологов, в нашей стране;

- в) в создании базы для обеспечения квалифици-

рованной микологической помощи больным при функциональном объединении специалистов клиники и кафедр, а также для подготовки кадров через аспирантуру, соискательство и на циклах последипломного образования;

9. НИИ медицинской микологии им. П.Н.Кашкина утвержден в качестве испытательного лабораторного центра; ему придана Российская комиссия по терминологии патогенных и условно-патогенных грибов.

В 2004 г. Васильева Н.В. защитила докторскую диссертацию на тему: «Факторы патогенности *Cryptococcus neoformans* и их роль в патогенезе криптококкоза», внося заметный вклад в изучение биологии криптококков — возбудителей СПИД-маркерного заболевания — криптококкоза в нашей стране. Европейская конфедерация по медицинской микологии (ЕСММ) утвердила ее координатором по этой проблеме в России.

Наталья Всеволодовна — член ученого совета СПб МАПО и председатель ученого совета НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, а также заместитель председателя проблемной комиссии «Микозы, микоаллергозы и вирусно-бактериальные инфекции».

Н.В. Васильева ныне известна как специалист и организатор разносторонних работ на «поприще микологии». Она — член ISHAM, ЕКММ, Всероссийского общества дерматовенерологов и Всероссийского научно-практического общества эпиде-

миологов, микробиологов и паразитологов г. Санкт-Петербурга и Ленинградской области; неоднократно выступала с лекциями и докладами по специальности на различных конференциях и конгрессах в России и зарубежом.

Наталья Всеволодовна является автором более 100 публикаций, а также учебных пособий («Диагностика микозов» в соавторстве с Р.А. Аравийским и Н.Н. Климко; «Микроорганизмы — контаминанты и патогены — индукторы процессов старения больничных зданий и помещений медицинского назначения, а также возбудители некоторых заболеваний людей» в соавторстве с Н.П. Елиновым), глав в монографиях, соавтором трех патентов на изобретения.

Наталья Всеволодовна — чуткий руководитель, создающий в институте комфортный микроклимат и доброжелательную атмосферу в коллективе, находящий время для каждого сотрудника института.

Быть руководителем — искусство и ежедневная сложная работа, которая Наталье Всеволодовне удается вполне успешно!

Коллектив НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина и редакционный совет журнала «Проблемы медицинской микологии» от всей души поздравляют Наталью Всеволодовну Васильеву с Юбилеем и желают ей всегда веселого настроения, крепкого здоровья, молодости и красоты, мира и благополучия, добрых поступательных перемен в жизни, процветания, успехов во всех начинаниях, семейного счастья, уверенности в завтрашнем дне.



КОНГРЕССЫ И КОНФЕРЕНЦИИ

4TH TRENDS IN MEDICAL MYCOLOGY
18-21 OCTOBER 2009
WWW.TIMM2009.ORG

Congress secretariat

Congress Care, P.O. Box 440, 5201 AK's-Hertogenbosch, The Netherlands
Tel +31-73-690-1415, Fax +31-73- 690-1417
info@congresscare.com, www.congresscare.com
The deadline for abstract submission is 1 June 2009

* * *

20TH ECCMID
EUROPEAN CONGRESS OF CLINICAL MICROBIOLOGY AND
INFECTIOUS DISEASES
VIENNA, AUSTRIA, 10-13 APRIL, 2010

Call for Papers

Deadline for submission of abstracts: 19 November 2009

Preliminary Programme

The Preliminary Programme will be available in September 2009 and will include information on abstract submission, registration and hotel reservation. Please return the attached card to receive the Preliminary Programme.

Administrative Secretariat

20th ECCMID 2010, c/o AKM Congress Service,
Association House, Freiestrasse 90
4002 Basel, Switzerland
Phone +41 61 686 77 11
Fax +41 61 686 77 88
E-mail: info@akm.ch
www.escmid.org/eccmid2010

Scientific Secretariat

20th ECCMID 2010, c/o ESCMID Executive Office,
Association House, Freiestrasse 90
4002 Basel, Switzerland
Phone +41 61 686 77 99
Fax +41 61 686 77 98
E-mail: eccmid@escmid.org

9TH INTERNATIONAL MYCOLOGICAL CONGRESS (IMC9)
1-6 AUGUST 2010, EDINBURGH, SCOTLAND

The UK, including Scotland, has a long tradition of being at the forefront of international mycology. The BMS is the largest mycological society in the world and promotes mycology in all of its aspects. It also has an international membership representing virtually every country in which mycology is studied. The BMS will provide the local Organizing Committee for the Congress and bring to bear its immense experience in organizing and hosting international mycological meetings. As a primary sponsor of the Congress, it has already agreed to provide £100,000 to support the meeting. The BMS will also put considerable effort into obtaining further financial sponsorship to support speakers, provide travel bursaries, and keep registration costs low.

Besides the BMS, other Societies and Organizations have also agreed to contribute and support IMC9. These include the British Lichen Society, British Society for Medical Mycology, British Society for Plant Pathology, European Mycological Association, Society for Applied Microbiology, Society for General Microbiology, the Royal Botanic Gardens at Edinburgh, and the Royal Botanic Gardens at Kew.

Mycology has never been as important as it is today and this is undoubtedly the most exciting time to be studying the subject. The International Mycological Congress represents the most important forum to provide an up-to-date perspective of mycology in all its guises. The BMS will make sure that IMC9 contains a Scientific Programme which

is tremendously stimulating, inspiring and balanced across the enormously diverse subject spectrum of mycology.

The Nobel Prize laureate and Honorary Member of the BMS, Sir Paul Nurse FRS, has provisionally agreed to give the opening lecture.

Edinburgh has everything to ensure a successful conference. The Edinburgh International Conference Centre will provide an outstanding venue for IMC9 with excellent facilities for up to 2,700 delegates. A wide range of accommodation from student halls of residence to all classes of hotels will be available to suit every budget, and this will be centrally bookable online. The opening reception would be held in the historic castle with its dramatic setting in the centre of the city

Edinburgh is easily accessible with direct flights from many European cities and from the USA and Canada.

Edinburgh is widely regarded as one of the most outstanding tourist meccas in the world. The date for the conference will be the week before the Edinburgh Festival, which is the biggest arts festival on the planet. It will also coincide with the Jazz and Blues Festival. Numerous social and scientific activities before, during and after the meeting will also be available for delegates and their families, including tours around Edinburgh and Scotland, golf, fishing, field trips to major sites of international scientific interest, visits to research institutes, specialist workshops, field meetings and whisky tasting.

Professor **Nick D. Read**, Chair of the IMC9 Organizing Committee University of Edinburgh
nick@imc9.info

* * *

**21ST EUROPEAN CONGRESS OF CLINICAL MICROBIOLOGY
AND INFECTIOUS DISEASES (ECCMID)/
27TH INTERNATIONAL CONGRESS OF CHEMOTHERAPY (ICC)
MILAN, ITALY, 7-10 MAY 2011**

Call for Papers

Deadline for submission of abstracts: 21 December 2010

Preliminary Programme

The Preliminary Programme will be available in September 2010 and will include information on abstract submission, registration and hotel reservation. Please return the attached card to receive the Preliminary Programme.

Administrative Secretariat

21th ECCMID / 27th ICC 2011
c/o Congress Switzerland
Association House
Freie strasse 90
4002 Basel, Switzerland
Phone +41 61 686 77 11
Fax +41 61 686 77 88
E-mail: basel@congress.com
www.escmid-icc2011.org

Scientific Secretariat

21th ECCMID / 27th ICC 2011,
c/o ESCMID Executive Office
Association House
Freie strasse 90
4002 Basel, Switzerland
Phone +41 61 686 77 99
Fax +41 61 686 77 98
E-mail: eccmid@escmid.org



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 на дискетах, подготовленными в текстовом редакторе Win Word, с распечаткой текста на бумаге в 2-х экземплярах. Статьи должны быть напечатаны шрифтом № 12 через 1,5 интервала с полями по 2,5 см слева и справа, по 3 см сверху и снизу. 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. одного из авторов-адресата, его должность, адрес и номер телефона.

Правила оформления статей:

Сначала пишется название статьи заглавными буквами (шрифт 12 — жирный). Затем через 2 интервала указываются фамилии авторов и инициалы (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 и инициалы 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 (нуль), 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 представляются 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). На микрофотографиях изображается масштаб, в подписях к ним необходимо указывать собственные увеличения объектива и окуляра, и, возможно, коэффициент усиления увеличения за счет дополнительных оптических приспособлений (например, для некоторых биноклярных микроскопов × 1,5). На обороте рисунка ука-

зываются 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 базидиальных 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 (в том числе на изготовление ксерокопий) направляется по адресу: 194291, Санкт-Петербург, ул. Сантьяго-де-Куба, 1/28, НИИ ММ им.П.Н.Кашкина СПб МАПО.

Тел: (812) 510-62-40;

Тел./факс: (812) 510-62-77

E-mail: mycobiota@peterlink.ru

Заведующая редакцией: Гукова Елена Станиславовна



**Санкт-Петербургская медицинская академия последипломного образования (СПб МАПО)
Научно-исследовательский институт медицинской микологии им. П.Н.Кашкина (НИИ ММ) СПб МАПО**

Адрес редакции: 194291, Санкт-Петербург, ул. Сантьяго-де-Куба, 1/28. Тел./факс: (812) 510-62-40

E-mail: mycobiota@peterlink.ru. Заведующая редакцией: Е.С.Гукова.

**Saint Petersburg Medical Academy of Postgraduate Education
Kashkin Research Institute of Medical Mycology**

Address of Editorial Office: Santiago-de-Cuba str., 1/28, Saint Petersburg, 194291, RUSSIA. Tel./fax: +7 (812) 510-62-40

E-mail: mycobiota@peterlink.ru. Manager of Editorial Office: E.S.Gukova

«ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ»

Рег. № 77-1396 от 20.12.1999 г.

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 СПб МАПО»

Подписано в печать 01.10.2009. Формат 60×90 1/4. Бумага офсетная. Гарнитура Times. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 33. Тираж 999 экз.