

ИММУНО- МИКРОБИОЛОГИ- ЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ *CANDIDA*- НОСИТЕЛЬСТВА У НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ

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

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

© Ивахнюк Т.В., Каплин Н.Н., 2010

*В статье проанализированы результаты микологического, бактериологического и иммунологического исследований новорожденных детей, естественно рожденных и путем кесарева сечения. Представлены адгезивные свойства выделенных чистых культур *Candida spp.* Выявили выраженное угнетение Т-клеточного звена иммунитета у новорожденных детей – *Candida*-носителей, рожденных путем кесарева сечения. Кроме того, у данной группы детей наблюдали сниженную в 1,2 раза продукцию INF-γ по сравнению с естественно рожденными детьми.*

Ключевые слова: адгезивные свойства, *Candida*-носительство, нейтрофилы, новорожденные дети, Т-лимфоциты

IMMUNE- MICROBIOLOGICAL PECULIARITIES OF *CANDIDA*-CARRIER BETWEEN NEWBORN CHILDREN

Ivakhnyuk T.V. (lecture assistant), Kaplin N.N. (professor of the chair)

Sумы State University Medical institute (department of infection disease), Sумы, Ukraine

© Ivakhnyuk T.V., Kaplin N.N., 2010

*Results of the mycological, bacteriological and immunological studies of newborns by cesarean section and natural way have been analysed. Presented adhesive properties of pure cultures of *Candida spp.* The marked inhibition of T-immunity in newborn children – *Candida*-carrier born by caesarean section has been revealed. In addition, this group of children found to decrease 1,2 times the concentration of INF-γ compared with children born naturally.*

Key words: adhesive properties, *Candida*-carrier, neutrophiles, newborn children, T-lymphocytes

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

В последнее время в педиатрической практике регистрируют интенсивное увеличение грибковых заболеваний, особенно – у новорожденных и детей раннего возраста. Частота кандидозов достигает 15% среди всех инфекционно-воспалительных заболеваний у новорожденных. В большинстве случаев (90-95%) идет речь о кандидозе, обусловленном *Candida albicans* [1]. Отсутствие необходимой регистрации гнойно-воспалительных инфекций в родильных домах, недостаточные знания особенностей их этиологии и эпидемиологии исключают возможность оценить распространенность перинатальных инфекций и принять целенаправленные профилактические мероприятия.

Новорожденные дети чаще, чем дети старшего возраста, болеют инфекционными заболеваниями. Это связано, с одной стороны, с функциональной незрелостью иммунной системы [2], с другой стороны известно, что функционирование иммунной системы в перинатальный период и на первом году жизни зависит в значительной степени от состояния здоровья матери и особенностей течения беременности [3]. Среди факторов риска развития кандидоза у новорожденных детей главную роль играют иммунодефицитные состояния.

Высокая восприимчивость организма новорожденного ребенка к заболеваниям обусловлена совокупностью многих факторов: несовершенством регуляторных адаптационных механизмов, морфофункциональной незрелостью иммунной системы, широким распространением штаммов условно-патогенных микроорганизмов, в том числе *Candida spp.*, имеющих высокую колонизационную способность [4].

На протяжении последних десятилетий значительное количество исследований было посвящено изучению механизмов приобретенного иммунного ответа [5]. Меньшее внимание уделяли изучению врожденного иммунитета, особенно, у новорожденных детей. Исследование механизмов врожденного иммунитета стало одним из главных приоритетов клинической иммунологии [6].

Известна роль фагоцитарной системы в резистентности организма к *Candida spp.* Считают, что нейтрофилы и макрофаги играют активную роль в обезвреживании клеток гриба за счет того, что обладают рядом фунгицидных свойств и способностью разрушать как бластоспоры, так и псевдомицелиальные элементы *Candida spp.* [7]. Кроме того, доказана роль Т-лимфоцитов: продуцируемый ими INF-γ активизирует антимикотическую активность фагоцитов [4].

Мы изучили видовой состав и биологические свойства возбудителей, а также особенности иммунологических и микробиологических сдвигов при *Candida*-носительстве у новорожденных детей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали 25 штаммов *Candida* spp., выделенных от 63 новорожденных детей, рожденных путем кесарева сечения (на 3-20 сутки). Эти штаммы мы отнесли к *Candida* spp. 1 группы.

Клинические штаммы *Candida* spp. 2 группы (n=25) были выделены от 85 доношенных новорожденных детей, рожденных естественным путем. При микробиологическом исследовании анализировали микробиоту кишечника и ротовой полости. Идентификацию выделенных культур бактерий и грибов проводили по общепринятым методикам [8]. Для сравнения адгезивных свойств штаммов 1 и 2 групп использовали 20 штаммов *Candida* spp., выделенных из объектов внешней среды.

Изучение адгезивных свойств *Candida* spp. 1 и 2 групп, выделенных от новорожденных детей, проводили с помощью методики А.Н. Маянского [9]; стафилококков – по методике В.И. Бриллиса и соавторов (1986).

Объектом нашего исследования служили нейтрофилы, которые были получены из периферической крови 15 клинически здоровых доноров в возрасте 20-22 лет. Нейтрофилы крови выделяли по общепринятой методике и культивировали в пластиковых пробирках при 37 °С в среде ДМЕМ с помощью ранее описанной методики [9].

Фунгицидные свойства нейтрофилов относительно выделенных штаммов *Candida* spp. изучали по активности (фагоцитарный индекс – ФИ) и интенсивности (фагоцитарное число – ФЧ) [10].

Степень адгезии штаммов *Candida* spp. изучали на фиксированных и окрашенных азур-эозином препаратах.

Для постановки данного опыта *in vitro* использовали *Candida* spp., которые получали в дрожжевой фазе на агаре Сабуро (24 часа, 37 °С). Смывы посевов дважды отмывали (1000 г, 15 мин.) десятикратным объемом забуференного (рН 7,2-7,4) физиологического раствора; клеточные агрегаты удаляли центрифугированием (40 г, 2 мин.) и ресуспендировали в забуференном физиологическом растворе в концентрации 10⁵ КОЕ/мл. Концентрацию *Candida* spp. определяли спектрофотометрическим методом.

Для определения показателей клеточного иммунитета проводили определение количества Т-лимфоцитов крови путем феномена спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана (Т-общие) и определение субпопуляций теофиллин-модулирующих (теофиллин-резистентные Т-хелперы / индукторы; теофиллин-чувствительные Т-супрессоры / цитотоксические) [10].

Продукцию INF-γ оценивали методом ИФА тест-системами «Вектор-Бест».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При микотическом исследовании у новорожденных детей – *Candida*-носителей были выделены раз-

личные виды *Candida* spp. (n=50). Из 25 штаммов *Candida* spp., выделенных от детей, рожденных путем кесарева сечения, идентифицированы: *C. albicans* (n=7), *C. tropicalis* (n=5), *C. kefyr* (n=8), *C. krusei* (n=3), *C. parapsilosis* (n=2).

Клинические штаммы *Candida* spp. 2 группы (n=25) изолированные от доношенных детей, рожденных естественным способом, определены: *C. albicans* (n=6), *C. tropicalis* (n=5), *C. kefyr* (n=8), *C. krusei* (n=3), *C. parapsilosis* (n=3). Кроме того, из различного материала от новорожденных детей выявляли другую сопутствующую условно-патогенную бактериобиоту (табл. 1).

Таблица 1

Грамположительная сопутствующая бактериобиота при *Candida*-носительстве у новорожденных детей

Вид возбудителя	Частота встречаемости		Количество бактерий в единице объема
	Количество штаммов	%	
<i>Staphylococcus aureus</i>	35	87,5	10 ⁹ КОЕ/г
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10	25,0	10 ⁷ КОЕ/мл
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2	5,0	10 ⁷ КОЕ/мл

Как видно из таблицы 1, видовой состав грамположительных бактерий, которые могут стать причиной гнойно-воспалительных заболеваний у новорожденных детей, был менее разнообразным, по сравнению со спектром грамотрицательных бактерий из содержимого толстой кишки. Из 57 штаммов грамположительных кокков наибольший удельный вес приходился на *Staphylococcus aureus*. На втором месте по частоте распространения был *S. epidermidis*, изолированный от новорожденных детей – *Candida*-носителей в 25% случаев, что в 3,5 раза меньше по сравнению с аналогичным показателем для золотистого стафилококка. Минимальный удельный вес среди ассоциативных стафилококков имел коагулазонегативный *S. saprophyticus* (5,0%). При исследовании факторов патогенности у *S. aureus*, установлено, что все штаммы обладали выраженной плазмокоагулирующей (коагулировали плазму в течение 2 часов) гемолитической и лецитиназной активностями; гиалуронидазу вырабатывали 68,6% штаммов. Таким образом, в ассоциации с *Candida* spp. в 87,5% случаев выделяли *S. aureus* с выраженными патогенными свойствами. На наш взгляд, этот факт следует рассматривать как важный критерий при суждении о патогенной роли стафилококка в генезе ассоциированной бактериально-кандидозной инфекции, поскольку стафилококки обладают повышенной проницаемостью кожных покровов, слизистых оболочек и соединительной ткани.

При изучении степени адгезии штаммов *Candida* spp., выделенных от новорожденных детей двух групп (n=50), выявили, что количество штаммов *Candida* spp. с нулевой адгезивной активностью составляет 5 (20%) штаммов в 1-й группе и 8 (32%) – во 2-й. Количество *Candida* spp. с высокой степенью

адгезии было в 1,2 раза больше среди штаммов 1-й группы (табл. 2).

Таблица 2

Адгезивная активность *Candida spp.*, выделенных от новорожденных детей, рожденных путем кесарева сечения и естественным путем

Характеристика адгезивных свойств <i>Candida spp.</i>	<i>Candida spp.</i>	Количество штаммов <i>Candida spp.</i>	
		1 группы, %	2 группы, %
Нулевая степень адгезии	<i>C. albicans</i>	-	16,7
	<i>C. tropicalis</i>	-	-
	<i>C. kefyr</i>	60,0	100
	<i>C. krusei</i>	33,3	33,3
	<i>C. parapsilosis</i>	50,0	33,3
Низкая степень адгезии	<i>C. albicans</i>	14,3	33,4
	<i>C. tropicalis</i>	60,0	60,0
	<i>C. kefyr</i>	53,3	50,0
	<i>C. krusei</i>	-	-
	<i>C. parapsilosis</i>	50,0	-
Средняя степень адгезии	<i>C. albicans</i>	57,1	33,3
	<i>C. tropicalis</i>	20,0	-
	<i>C. kefyr</i>	86,7	50,0
	<i>C. krusei</i>	66,7	66,7
	<i>C. parapsilosis</i>	-	66,7
Высокая степень адгезии	<i>C. albicans</i>	28,6	16,6
	<i>C. tropicalis</i>	20,0	40,0
	<i>C. kefyr</i>	-	-
	<i>C. krusei</i>	-	-
	<i>C. parapsilosis</i>	-	-

При анализе адгезивной активности *Candida spp.*, выделенных от разных групп новорожденных детей, и видового состава ассоциативной микробиоты, показано, что все штаммы грибов, которые проявляли высокую адгезивную способность, выделяли из указанных локусов в ассоциации с *S. aureus*, обладающими всеми факторами патогенности (лецитиназная, гиалуронидазная, гемолитическая активности и др.).

При сравнении адгезивных свойств клинических штаммов (1, 2 групп) и штаммов, выделенных из объектов внешней среды, нами установлено, что в видовом составе штаммов 1 группы и штаммов, выделенных из объектов внешней среды, доминировали *Candida spp.* с высокой и средней степенью адгезии (52% и 65% соответственно).

В различной устойчивости отдельных органов к *Candida* важное значение придают особенностям реакции полиморфноядерных лейкоцитов (нейтрофилов) [4].

При совместном культивировании нейтрофилов с живыми штаммами *Candida spp.* 1-й и 2-й групп выявили, что нейтрофилы обладали выраженной фунгицидной активностью. При сравнении активности фагоцитоза к *Candida spp.*, выделенных от новорожденных детей, было установлено, что активность нейтрофилов была выше относительно высоко- и среднеадгезивных штаммов и не зависела от времени инкубации (табл. 3). Относительно *Candida spp.* 1-й группы с нулевой и низкой степенью адгезии, фагоцитарная активность нарастала с увеличением времени инкубации.

Показатели фагоцитарной активности нейтрофилов по отношению к *Candida spp.*, выделенных от новорожденных детей

Показатели фагоцитарной активности нейтрофилов	Степень проявления адгезивных свойств <i>Candida spp.</i> , выделенных от новорожденных детей							
	1 группа				2 группа			
	нулевая	низкая	средняя	высокая	нулевая	низкая	средняя	высокая
Фагоцитарное число, абс.ед	2,1 ±0,2	3,4 ±0,4	6,42 ±0,34	6,64 ±0,30	2,6 ±0,32	5,71 ±0,40	6,48 ±0,34	7,11 ±0,29
Фагоцитарный индекс, %	40,2 ±2,0	44,6 ±2,4	51,6 ±2,7	54,8 ±2,3	47,5 ±2,9	48,2 ±1,4	55,8 ±2,8	59,9 ±2,7

p>0,05 – достоверность различий между первой и второй группами

Адгезию *Candida spp.* на клетках организма, в том числе на нейтрофилах, можно рассматривать как начальный этап развития инфекционного процесса. При этом в развитии кандидоза играют роль совокупность факторов: резистентность организма к прикреплению и размножению гриба, степени его патогенности и др.

В опыте с нейтрофилами доказано, что фагоцитарная активность в отношении клинических штаммов *Candida spp.*, выделенных от новорожденных детей, отличается и зависит от степени проявления адгезивных свойств грибов.

При изучении клеточного иммунитета у новорожденных детей – *Candida*-носителей 1-й и 2-й групп, которое проводили на 18-20 день, показано, что в иммунном статусе обследованных детей имелись существенные изменения. С целью получения собственных нормативных показателей мы обследовали 20 практически здоровых новорожденных детей в возрасте от 18 до 20 дней. Результаты исследования представлены в таблице 4.

Таблица 4

Показатели клеточного иммунитета у новорожденных детей – *Candida*-носителей (n=50)

Показатели	Референтная норма	Количество иммуноцитов (10 ⁹ /л)	
		1 группа	2 группа
Т-лф	5,5±0,3	3,6±0,2**	5,0±0,2**
ТФР	4,1±0,25	2,3±0,07**	3,0±0,1*
ТФЧ	1,8±0,1	2,3±0,1*	2,0±0,1*
0-клетки	1,7±0,1	2,5±0,2**	2,0±0,1*

Примечание: ТФР – теофилин-резистентные Т-хелперы/индукторы; ТФЧ – теофилин-чувствительные Т-супрессоры/цитотоксические; ** - p < 0,05, * - p < 0,01 (расчет произведен относительно контрольной группы).

Как видно из таблицы 3, у новорожденных детей – *Candida*-носителей, рожденных путем кесарева сечения (1 группа), имело место угнетение Т-клеточного звена иммунной системы. Это проявлялось в снижении общего количества Т-лимфоцитов (кратность снижения составляла 1,5 раза по сравнению с контрольной группой).

При анализе результатов исследования субпопуляционного состава Т-лимфоцитов у детей 1 группы наблюдали снижение количества ТФР-хелперов и увеличение уровня ТФЧ-клеток, обладающих цитотоксической активностью.

Кроме того, необходимо отметить, что у детей – *Candida*-носителей 1-й группы наблюдали увеличе-

ние уровня О-клеток в 1,5 раза по отношению к контрольной группе.

При сравнении показателей клеточного иммунитета (табл. 4), полученных от новорожденных детей – *Candida*-носителей, рожденных естественным способом, выявили, что эти показатели к 18-20 дню жизни имели тенденцию к нормализации параметров, хотя полного их восстановления не наблюдали.

На наш взгляд, особенности *Candida*-носительства существенно влияют на показатели иммунного статуса новорожденного ребенка. Возможно, этим можно объяснить то, что более существенные изменения клеточного звена наблюдали у новорожденных детей – *Candida*-носителей, от которых выделяли ассоциативный *S. aureus*.

При исследовании адгезивных свойств культур стафилококков, выделенных от новорожденных детей – *Candida*-носителей обеих групп, установлено, что наибольший индекс адгезии наблюдали у *S. aureus* ($5,04 \pm 2,13$), который наиболее часто (87,5% случаев) выделяли в ассоциации с *Candida* spp.

Особое значение уделяют цитокинам, влияющим на функцию полиморфно-ядерных лейкоцитов, как на одну из главных линий защиты от *Candida* spp. Исследуя количественное содержание наиболее сильного стимулятора эффекторных функций макрофагов – INF- γ , установлено, что продукция данного цитокина у детей 1-й группы в 1,2 раза ниже, чем у 2-й — показатель INF- γ в 1-й группе был $21,7 \pm 4,2$ и во 2-й группе $26,0 \pm 4,6$ при референтной норме $32,0 \pm 4,9$ ($p < 0,05$).

Референтная норма данного показателя была получена при обследовании 20 практически здоровых новорожденных детей в возрасте от 18 до 20 дней.

В ходе повторного микологического обследования (через 7 дней) новорожденных детей обеих групп, нами установлено, что количество *Candida* spp. в исследуемом материале от детей 1-й группы увеличивалось с 10^2 КОЕ/мл до 10^3 КОЕ/мл материала.

В соответствии с выявленными фактами, необходим всесторонний подход к изучению *Candida*-носительства с учетом возможной роли бактериально-ассоциантов в патологическом процессе.

ВЫВОДЫ

1. В видовом составе микробиоты толстой кишки и ротовой полости новорожденных детей, рожденных путем кесарева сечения, доминируют штаммы *Candida* spp. с высокой и средней степенью адгезии (52%); среди *Candida* spp., выделенных от детей, рожденных естественным способом, доминируют штаммы (60%) с нулевой и низкой степенью адгезии.

2. В видовом составе сопутствующей микробиоты у новорожденных детей – *Candida*-носителей 1 и 2 групп доминирует *S. aureus* с выраженными патогенными свойствами.

3. Фагоцитарная активность нейтрофилов здоровых доноров в отношении клинических штаммов *Candida* spp., выделенных от новорожденных детей, отличается и зависит от степени проявления адгезивных свойств грибов: активность нейтрофилов выше относительно высоко- и среднеадгезивных штаммов.

4. У новорожденных детей – *Candida*-носителей, рожденных путем кесарева сечения, установлено выраженное угнетение Т-клеточного звена иммунной системы: снижение общего числа Т-лимфоцитов и усиление их дифференцировки в сторону Т-цитотоксической субпопуляции.

5. У детей – *Candida*-носителей, рожденных естественным способом, к 18–20 дню жизни наблюдали тенденцию к нормализации параметров клеточного иммунитета, но не полностью.

6. Снижение продукции INF- γ у новорожденных детей, рожденных путем кесарева сечения, обусловлено функциональной недостаточностью Т-клеточного звена иммунного ответа и может быть причиной кандидоза у данной группы детей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Безкоровайний Б.О., Сіротченко Т.А. Етіотропна терапія та профілактика поверхневого кандидозу ротової порожнини у новонароджених та дітей раннього віку // Клиническая педиатрия. – 2007. – Т.1, №4. – С. 87-89.
2. Klein J, Remington J. Current concepts of infections of the fetus and new-born infant. Infectious diseases of the fetus and newborn infants. 6th ed. Elsevier Saunders, Philadelphia, 2000. – P. 1-23.
3. Толстопятова М.А., Буслаева Г.А., Козлов И.Г. Роль рецепторов врожденного иммунитета в развитии инфекционной патологии у новорожденных детей // Педиатрия. – 2009. – Т. 86. – С. 115-120.
4. Лебедева Т.Н. Иммунитет при кандидозе (обзор) // Ж.Проблемы мед. микологии. – 2004. – Т.6, №4. – С.8-16.
5. Zinkernagel R.M. Maternal antibodies, childhood infections, and autoimmune diseases // N. Engl. J. Med. – 2001. – P. 345:1331-1335.
6. Lewis D.B., Wilson C.B. Developmental immunology and role of host defenses in fetal and neonatal susceptibility to infection / In: Infectious diseases of the fetus and newborn infants. Saunders. Philadelphia, 2001. – P. 25-138.
7. Кантин О.М., Сюч Н.И., Корсунская И.М. Влияние кандидоносительства беременных на заболеваемость у детей первого года жизни // Гинекология. – 2008. – №10/1. – С. 60-61.
8. Аравийский Р.А., Климко Н.Н., Васильева Н.В. Диагностика микозов. – СПб: СПбМАПО, 2004. – 187 с.
9. Маянский А.Н., Салина Е.В., Заславская М.И. Способ оценки прочности адгезии *Candida albicans* на эпителиоцитах // Клиническая лабораторная диагностика. – 2003. – №2. – С. 53-54.
10. Лебедев К.А., Понякина И.Д. Иммунная недостаточность (выявление и лечение). – М.: Медицинская книга, Н.-Новгород: Изд-во НГМА, 2003. – 443 с.

Поступила в редакцию журнала 16.06.2010

Рецензент: А.Е.Учеваткина