

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, антигены, 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.*

ВВЕДЕНИЕ

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, удлинением 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 микрофлоры, 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 ИНФy 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 кандидатоксин, 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 кандидатоксина 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.А. 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

