

ГЛАВА 2

НОВЫЕ МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

ДИАГНОСТИКА МИКОЗОВ У БОЛЬНЫХ С ПОРАЖЕНИЕМ ЛОР-ОРГАНОВ

Абрамян Дж. Г., Нанаюлян С. Г.,
Давтян М. М., Оганисян Е. Х.

Ереванский государственный университет, кафедра ботаники
Кафедра ЛОР болезней ЕрГМУ, клиническая больница № 2
Ереван, Армения

На сегодняшний день инфекции, вызываемые оппортунистическими грибами, являются одной из важнейших проблем здравоохранения. За последние годы ухудшение бытовых условий в Армении и, вследствие этого, высокая инфицированность объектов жилых помещений и окружающей среды микроскопическими грибами, легко адаптирующими на любых материалах, привела в конечном итоге к резкому возрастанию числа пораженных микозами больных. Микотические заболевания различных локализаций с разнообразными клиническими проявлениями стали предметом углубленного исследования.

С целью изучения распространенности микозов среди больных в отделении оториноларингологии клинической больницы N2 г. Еревана на базе ЛОР отделения ЕрГМУ, нами были исследованы пациенты как детского возраста, так и взрослые со следующими патологиями: гнойно-инфекционные заболевания носа, придаточных пазух, среднего уха и глотки. Материалом для исследования служили мазки слизистой оболочки полости рта, носоглотки, уха и послеоперационного материала. Микологическая диагностика проводилась в двух направлениях: а) микроскопическое исследование патологического отделяемого; б) посевы патологического отделяемого на различные питательные среды для выделения культур грибов и идентификации вида.

При культуральном обследовании патологического материала было диагностировано несколько случаев редких грибных инфекций. Микологические анализы мазков, взятых с пораженных участков слухового прохода, выявили, что возбудителями отомикозов являются представители микроскопических грибов. В их числе: *Aspergillus flavus* — продуцент афлатоксина, относящегося к наиболее сильным гепатотропным ядам, обладающим канцерогенным свойством; *Aspergillus niger* — известный как «всепожирающий гриб», а также *Candida albicans* — весьма часто вызывающий грибной синусит, типичный представитель сапрофитной флоры различных органов человека и животных, вызывающий заболевание при ослаблении организма действием многих неблагоприятных факторов.

Микологическому обследованию было подвергнуто также патологическое содержимое из гайморовых пазух. Идентификация выделенных культур микроскопических грибов выявила весьма агрессивный вид рода *Aspergillus* — *A. ochraceus*, продуцент ократоксина. Есть предположение о роли последнего в заболевании людей нефропатией.

При посеве материала у больного с хроническим полипозным гайморитом выявлен *Penicillium implicatum*, который известен как агент биodeградации полимерных материалов, однако эколого-физиологические особенности вида недостаточно изучены. Кроме этого, у больного обнаружен и *Candida albicans*.

Очевидно, глубина и скоротечность патологического процесса коррелирует со способностью патогена-микромикета к адаптивным морфологическим видоизменениям в тканях организма. Изолированные из пораженных органов микромикеты проявляют способность к образованию мицелиальных тяжей, склеротий и хламидоспороподобных клеток, подтверждение которых нуждается в дальнейшем исследовании.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГРИБОВ РОДА КАНДИДА С ПОМОЩЬЮ КРИСТАЛЛОГРАФИЧЕСКОГО МЕТОДА

Баженов Л. Г., Артемова Е. В.

*Научный центр хирургии имени академика В. Вахидова МЗ РУз
Ташкент, Узбекистан*

Идентификация грибов рода Кандида (ГРК) до настоящего времени является недостаточно разработанной и представляет серьезные затруднения, поэтому изучена возможность идентификации ГРК с помощью разработанного нами кристаллографического метода идентификации микроорганизмов (Л. Г. Баженов, 1994), основанного на получении кристаллограмм изучаемых культур и сравнении их с кристаллограммами эталонных штаммов.

Изучению подвергнут 21 штамм ГРК, выделенных из желудочного сока больных с гастродуоденальными заболеваниями. Они в соответствии с культуральными и физиолого-биохимическими признаками были отнесены к следующим видам: *C. tropicalis* (10 штаммов), *C. krusei* и *C. stellatoidea* (по 4), *Candida albicans* (3). Полученные описанным нами ранее способом кристаллограммы изучали под стереоскопическим микроскопом (увеличение 16 и 32 раза).

Кристаллограммы ГРК имели своеобразную картину в виде нескольких кристаллов, от углов которых расходились осевые линии с боковыми ответвлениями, различающимися у разных видов. Выявлены и другие отличия, позволяющие достаточно точно установить видовую принадлежность исследуемого штамма. Сравнение данных, полученных с помощью традиционного и кристаллографического методов показало практически их полное совпадение. Кристаллограммы при точном соблюдении методики характеризуются высокой воспроизводимостью. На получение кристаллограмм требуется 18-24 часа. При традиционной идентификации ГРК необходима постановка 8-9 тестов, нередко предусматривающих использование дорогостоящих и дефицитных реактивов, тогда как кристаллографический

метод представляет собой постановку практически лишь одного теста, основанного на использовании физиологического раствора.

Таким образом, применение кристаллографического метода позволяет существенно упростить, ускорить и удешевить идентификацию ГРК по сравнению с традиционными методами распознавания этих микроорганизмов.

ПРИОРИТЕТНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО РАЗРАБОТКЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

Блинкова Л. П.

*НИИ вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова РАМН
Москва*

Достижения последних лет по конструированию и производству отечественных питательных сред, как оказалось, не затрагивают среды для микологических исследований. Немногочисленный перечень выпускаемых коммерческих сред для микромицетов и дрожжей ограничивается, в основном, средой Сабуро, хламидоспор-агаром и питательной средой для выделения грибов рода *Candida* (НПО «Питательные среды», г. Махачкала, ФГУП «Аллерген», г. Ставрополь, НПЦ Прикладной микробиологии, г. Оболенск). При этом среды Сабуро выпускаются без дополнительных компонентов (селективные добавки, красители и т. д.). Поэтому при диагностике микозов исследователи пользуются широким набором зарубежных сред фирм bioMérieux, BBL, Merck, Himedia и др. Это указывает на острую необходимость разработки питательных сред для выделения, культивирования и дифференциальной диагностики возбудителей грибковых инфекций.

Однако проблема конструирования и выпуска новых отечественных питательных сред, в которых нуждаются медицинские микробиологи и микологи, к сожалению, не включена в перечень приоритетных направлений развития науки и технологий. Потребность в питательных средах, так же как и в других средствах детекции и диагностики биоагентов, возросла в связи с частыми вспышками инфекционных заболеваний, природных и техногенных катастроф, биотерроризма.

В связи с этим к актуальным направлениям исследований по проблеме питательных сред относятся следующие:

1. Поиск новых источников недефицитного сырья для производства ингредиентов сред (белковые, углеводные, гелеобразующие, химические вещества).
2. Создание коммерческих ростовых, селективных и других добавок к питательным средам (на основе микроорганизмов, водорослей, растений, тканей животных и т. д.).
3. Усовершенствование традиционных рецептур питательных сред и качества выпускаемых препаратов. Создание новых питательных сред (среды

для выделения и выращивания возбудителей известных и вновь возникающих инфекций, прихотливых и других групп микроорганизмов).

4. Совершенствование физико-химических свойств сред (гранулированные, быстрорастворимые, длительно сохраняемые и т. д.).
5. Создание и выпуск широкого набора диагностических тест-систем на основе сред, а также отдельных сред, готовых к употреблению.
6. Унификация методов лабораторного и промышленного контроля качества питательных сред с использованием стандартных международных показателей.
7. Создание доступных отечественных информационных источников по проблеме питательных сред (методические рекомендации по контролю, хранению и применению питательных сред, тематические интернет-сайты и т. д.).

Решение вопросов по этим направлениям позволит обеспечить независимость от зарубежного производителя, существенно улучшить качество выпускаемых сред, снизить стоимость проведения диагностических анализов и т. д.

ДИАГНОСТИКА МИКОЗОВ В КЛИНИКО-СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ КВКД №1 КЗ Г. МОСКВЫ

***Богущ П. Г., Редченко Е. Б.,
Чулкова Г. В., Шатрова А. Э.***

*Клинико-серологическая лаборатория кожно-венерологического
клинического диспансера №1 Комитета здравоохранения г. Москвы
Москва*

Широкая распространенность грибов в природе определяет их этиологическую роль в структуре заболеваемости кожи и слизистых человека. Своевременная диагностика микоза вселяет надежду на полное исцеление, а эпидемиологическую значимость ввремя санированного очага грибковой инфекции трудно переоценить.

Таким образом, исследование материала на наличие элементов гриба, актуально для полноценного обследования пациента, обратившегося в кожно-венерологический диспансер. Даже когда поражения кожи имеют классический характер: наличие очагов с четкими границами, валиком по периферии, отрубевидным шелушением, «специфического» поражения волос и ногтей (микроспория, трихофития), бледно-кремовых пятен (разноцветный лишай) требуется обязательное лабораторное подтверждение клинического диагноза. Но особенно необходимо исследование на наличие гриба в материале с очага поражения при атипичных формах микоза, возникающих при неправильном лечении больных (применение кортикостероидных мазей), сопутствующих заболеваниях (ВИЧ-инфицирование, обменные нарушения).

В клинико-серологическую лабораторию КВКД№1 КЗ г. Москвы для исследования на наличие грибов присылаются пациенты с папулезными высыпаниями, поражениями кожи в виде пятен с отрубевидным шелушением, поражением ногтей, волос. Они направляются как для установления диагноза, так и для контроля излеченности.

Исследование на грибы в нашей лаборатории проводится следующим образом: материал из очага поражения на гладкой коже берут одноразовым скальпелем, удаляют краевую часть ногтя (при его изменении) стерильными ножницами, волос извлекают пинцетом. Очагов поражения у одного пациента может быть несколько. Полученный материал помещают на предметное стекло и добавляют 1-3 капли 10% КОН. Через 30-60 минут (время зависит от консистенции полученного материала: для исследования с гладкой кожи — достаточно 30 минут, исследование ногтей требует более длительного времени). Исследование проводят опытные врачи — лаборанты. За 2002 год в нашей лаборатории проведено 2819 таких исследований у 1744 пациентов. Наиболее часто пациенты обращались с поражением кожи (66,7%), исследование ногтевых фаланг — 26,4%, другие локализации — 6,9%. У 512 пациентов (746 локализаций) выявлено наличие мицелия (29%). В лаборатории имеется возможность пользоваться системой визуализации. С её помощью мы вносим в компьютер изображение препарата. Постепенно создается архив, имеющий ценность для студентов, ординаторов, врачей — лаборантов. Система визуализации и возможность «сохранить» изображение элементов гриба у конкретного пациента позволяет отследить динамику изменений «in situ» в процессе терапии и после лечения. Для установления вида возбудителя материал направляется на посев в МГМЦ, с которым наша лаборатория работает в сотрудничестве.

Таким образом, диагностика грибковых заболеваний является актуальной, требует высокой профессиональной квалификации врачей — лаборантов и совершенствования методов исследования.

LABORATORY IDENTIFICATION OF DERMATOPHYTES BY PROTOPLAST HYBRIDIZATION

Chadeganipour M., Ahmadjian M.

Mycology and parasitology Dept. Isfahan Medical School

Исфаган, Иран

Clark University

Ворчестер, США

In the clinical laboratories identification of different species of dermatophytes is most often based on morphological criteria and sometimes the morphology of two species are so similar that their identification is difficult and indistinguishable. In this study, we tried to establish protoplast hybridization as a useful technique to overcome these difficulties and identify the dermatophytes more easily through their genetic relatedness. Auxotrophic mutants of different species of *Microsporum*

and *Trichophyton* were induced and identified and then protoplasts from these mutants were isolated by digestion of their mycelium with Novozyme 234 system. The isolated protoplasts from different species were fused using a solution containing 35% polyethylene glycol. Afterward, the fusion products were plated onto minimal and complete media. It was found that protoplasts from different auxotrophic mutants from the same species hybridized and complemented each other and grew on both minimal and complete media whereas, mutants from different species did not have the ability to complement each other and therefore grew only on complete media. The data generated in this study may prove useful for definite identification of suspected species of this group of medically important fungi, other than morphological criteria in clinical laboratories

ВОЗМОЖНОСТИ ЭЛЕКТРОПУНКТУРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ПО Р. ФОЛЛЮ В ДИАГНОСТИКЕ ГРИБКОВОЙ ИНФЕКЦИИ

Джумаева Н. Э., Баженов Л. Г.

Центр «Акупунктуры» Ташкент

Научный Центр Хирургии имени В. Вахидова, МЗ РУзбекистан

Ташкент, Узбекистан

Выбор лабораторных методов, которыми сегодня располагает практический врач для установления диагноза микотической инфекции довольно ограничен и заключается в методах микроскопической и бактериологической диагностики. Нами проведено исследование возможностей электропунктурной диагностики по Р. Фоллю с использованием диагностических тест-систем в диагностике орофарингеального микоза. Метод Фолля позволяет быстро оценить функциональное состояние любого органа или системы организма, провести топическую, этиологическую, нозологическую и дифференциальную диагностику заболевания. С этой целью в методе Фолля применяются специальные тест-системы: нозоды, гетеро- и аутоантигены, органоспецифичные препараты, гомеопатические препараты и т. д. Для верификации данных, полученных методом Фолля было проведено бактериологическое исследование патологического материала, заключающееся в выделении и идентификации *Candida spp.* При этом, использовали как общепринятые методы, так и кристаллографический метод идентификации грибов рода *Candida* (Баженов Л. Г. 1994).

Было обследовано 28 больных в возрасте 20-52 лет с подозрением на грибковую инфекцию полости рта. Методом Фолля наличие грибковой инфекции было установлено у всех больных. При проведении бактериологического исследования, наличие дрожжеподобных грибов рода *Candida* было обнаружено у 14 больных, при определении видовой принадлежности грибов распределение было следующим: *Candida globrata* — 3 больных, *Candida famata* — 3 больных, *Candida krusei* — 6 больных, *Candida tropicalis* — 2 больных. У

восемью больных было обнаружено наличие дрожжей. У шести больных наличие грибковой инфекции не обнаружилось, однако из этой группы, наличие дрожжеподобных грибов рода *Candida* ретроспективно определялись у двоих больных в содержимом желудочного сока, в анализах кала. Бактериологическое исследование, проводимое на наличие сопутствующего микробного пейзажа, показало наличие штаммов стрептококков у 90% больных, в ассоциации с *Staphylococcus aureus* и *Enterococcus* у 40% больных.

Представленные данные свидетельствуют о высоких диагностических возможностях метода Фолля, что совпадает с результатами исследований других авторов, использовавших данный метод в диагностике внутренних заболеваний. Преимуществом метода является его неинвазивность, а также возможность экспресс-диагностики заболевания.

ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ: ВТОРОЕ ДЫХАНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Екимов А. Н., Шипулин Г. А.

*Центральный НИИ Эпидемиологии МЗ РФ
Москва*

Широкое распространение метода полимеразной цепной реакции обусловлено его простотой, удобством и относительной дешевизной. Создано большое число как зарубежных, так и отечественных тест-систем для диагностики бактерий, вирусов, простейших, грибов. Можно спорить о целесообразности применения метода ПЦР для диагностики тех или иных инфекций, однако нельзя не согласиться с тем, что в настоящее время он получил широкое распространение и все чаще применяется для установления этиологии различных заболеваний человека.

В рамках медицинской микологии применение метода ПЦР в первую очередь оправданно в тех случаях, когда необходима максимальная чувствительность анализа, в ряде случаев недостижимая с помощью традиционных методов диагностики. Наиболее обоснованно использование ПЦР для диагностики глубокого кандидоза и диссеминированной инфекции, то есть с исследованием крови, стерильных сред организма и биоптатов глубоких тканей. [А. Ю Сергеев, Ю. В. Сергеев, 2000]

Кроме того, метод ПЦР в ряде случаев является незаменимым при проведении генотипирования микроорганизмов и определения видовой принадлежности.

Вместе с тем, метод ПЦР не лишен и недостатков, главным из которых является высокий риск контаминации реакционных смесей и анализируемых образцов продуктами амплификации, или ампликонами. Так как чувствительность ПЦР такова, что позволяет определять единичные молекулы специфической ДНК в исследуемом образце, загрязнение ПЦР лаборато-

рии подобными ампликонами может привести к появлению ложноположительных результатов. Борьба с контаминацией продуктами амплификации должна проходить постоянно, и заключаться в первую очередь в правильной организации ПЦР лаборатории, четком соблюдении сотрудниками правил работы в лаборатории, проведении специальных мероприятий по элиминации ампликонов, попавших в окружающую среду и т. д.

Наиболее радикальным для решения проблемы контаминации ампликонами является использование метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Принцип метода заключается в детекции флуоресценции, сопровождающей процесс накопления продуктов амплификации в ходе ПЦР. Причем относительный уровень флуоресценции прямо пропорционален количеству накопившихся в ходе ПЦР продуктов амплификации. Таким образом по увеличению уровня флуоресценции, не открывая пробирку, можно судить о том, образовались ли в ней специфические ампликоны.

Более того, кроме решения проблемы контаминации, real-time PCR интересна еще и тем, что позволяет проводить прямые количественные измерения содержания исходной ДНК в исследуемой пробе. Однако внедрение количественных тест-систем для детекции инфекционных агентов требует решения множества проблем, важнейшей из которых является проблема унификации пробозабора.

Существует множество подходов, позволяющих связать флуоресценцию и кинетику ПЦР. Их можно разделить на два больших класса: специфические и неспецифические.

Самым первым подходом является добавление в реакционную смесь флуоресцентных веществ, связывающихся с двухцепочечными молекулами ДНК. Лучше всего для этого подходит SYBR Green I («Molecular Probes», США). Он обладает низким значением фоновой флуоресценции, что позволяет повысить чувствительность анализа по сравнению с использованием, например, бромистого этидия.

Однако использование SYBR Green I и аналогичных веществ обладает одним существенным недостатком. Дело в том, что в ходе ПЦР могут образовываться как специфические, так и неспецифические продукты амплификации, такие как праймеры-димеры, «шмер», и т. д. Следовательно, увеличение флуоресценции в ходе ПЦР не всегда может говорить о том, что в данной пробе присутствует искомая последовательность ДНК, так как SYBR Green I будет связываться и с такими продуктами амплификации. Для верификации полученных данных проводят построение так называемых кривых плавления.

Принцип построения кривых плавления основан на том факте, что каждая последовательность ДНК имеет свою строго определенную температуру плавления, которая зависит от GC состава данной молекулы. При нагревании полученных в ходе амплификации продуктов ПЦР происходит постепенное расплетение двухцепочечной ДНК на одноцепочечные молекулы, что приводит к ее диссоциации с молекулами SYBR Green I и, в конечном счете, к уменьшению флуоресценции. При достижении температуры плавления

ния данного продукта происходит одномоментное расплетение всех молекул данного вида, что приводит к резкому снижению флуоресценции в данной пробирке. Если в пробирке находится несколько различных ампликонов с разной температурой плавления, то на кривой можно будет увидеть несколько перегибов, каждый из которых соответствует температуре плавления того или иного продукта амплификации. Таким образом, можно определить, является ли увеличение флуоресценции в пробе связанным с накоплением специфических или неспецифических продуктов амплификации.

К другим методам, специфическим, относится очень большое количество различных методик, описание которых заняло бы очень много места. Общим принципом этих методик является присоединение флуоресцентных красителей к ДНК-зондам. При связывании этих зондов с комплементарными участками нуклеотидной последовательности внутренней части специфических ампликонов тем или иным способом происходит либо активирование этой метки, либо ее дистанцирование от конъюгированного на этом же (или находящемся рядом) зонде тушителя флуоресценции. Таким образом, увеличение флуоресценции напрямую будет связано с накоплением именно специфического продукта амплификации, так как ДНК-зонд связывается только со специфическими продуктами амплификации.

Среди методик, представленных на сегодняшний день, нужно отметить следующие, получившие наибольшее распространение: TaqMan Assay, молекулярные беконь, Fluorescence Resonance Energy Transfer Assay.

Современные приборы для проведения ПЦР в режиме реального времени как правило позволяют работать с несколькими методиками, не ограничивая исследователя в выборе того или иного подхода к детекции нуклеиновых кислот бактерий, вирусов, грибов или простейших.

На сегодняшний день в Российской Федерации представлены следующие приборы для проведения real-time PCR, а именно: «ABI Prism 7000» («Applied», США), «iCycler iQ» («BioRad», США), «RotorGene 2000» («Corbett Research», Австралия). Особо хотелось бы отметить последний прибор. С одной стороны, его стоимость невелика по сравнению с другими приборами, а с другой стороны по своим возможностям он не только не уступает, но по некоторым показателям даже и превосходит аналогичные образцы других фирм-производителей.

Несмотря на то, что методика real-time PCR является довольно новой, тем не менее в нашей стране в ЦНИИ Эпидемиологии МЗ РФ уже производятся тест-системы для этой методики. В число возбудителей, которые определяются этим методом, входят хламидии, микоплазмы, уреаплазмы и другие инфекции, включая и кандиду альбиканс.

Использование метода ПЦР в режиме реального времени позволит снизить риск появления ложноположительных результатов, качественно улучшить диагностику инфекционных заболеваний, а внедрение количественных тест-систем для детекции инфекционных агентов позволит внедрить новые методики диагностики и лечения.

ИММУНОБИОСЕНСОРНЫЙ МЕТОД ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ МИКОЗОВ

*Халдеева Е. В., Глушко Н. И., Маланичева Т. Г.,
Фризин В. В., Сафина Г. Р.*

*Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии
Казанский государственный медицинский университет
Казанская государственная медицинская академия
Казанский государственный университет
Казань*

Проблема диагностики грибковых инфекций в последние годы стала весьма актуальной. Применяемые в настоящее время методы микологического исследования длительны и трудоемки, что существенно задерживает процесс лечения и отражается на его результатах. Особую сложность в клинической практике представляет выявление возбудителя заболевания при микозах внутренних органов, когда отбор материала для микроскопического и культурального исследования сильно затруднен или невозможен. Поэтому может представлять интерес разработка методов диагностики, основанных на выявлении грибковых антигенов в сыворотке крови человека.

В настоящей работе представлены некоторые результаты использования амперометрических иммуноферментных сенсоров для определения антигенов условно-патогенных грибов *Candida albicans* (CA) и *Trichophyton rubrum* (TR) в сыворотках крови от больных с различными формами микотических поражений.

Разработанные амперометрические ИФС для определения антигенов CA и TR состоят из специфической мембраны (биочувствительной части) и детектирующего элемента (трансдюсера). Трансдюсером ИФС служит стационарный ртутно-пленочный электрод с серебряной подложкой. В качестве биочувствительной части использовали нитроцеллюлозную мембрану с совместно иммобилизованными с помощью глутарового альдегида ферментом — холинэстеразой и соответствующими антителами к Ag CA или TR. Измерение концентрации антигенов, в отличие от других иммуноферментных методов, происходит напрямую, без участия промежуточных звеньев — детекция осуществляется по величине тока, улавливаемого электродом-трансдюсером. Данная особенность обуславливает высокую чувствительность и экспрессивность метода. Наилучшие результаты достигаются при использовании специфических Ат в разведении 1:20, что соответствует 0.31 и 0.07 мг/мл для Ат к CA и TR соответственно. Время определения не превышает 15-20 минут. Высокая селективность метода была показана в модельных опытах с антигенами других видов рода *Candida*.

Иммуноферментный сенсор для определения Ag CA использовали для уточнения диагнозов в нескольких группах больных, в том числе с микозами кожи (28 человек) и висцеральными микозами (14 человек). Кроме того, была обследована группа больных с atopическими дерматитами (10 человек) в отсутствие проявлений грибковой инфекции.

Анализ полученных данных позволяет сделать вывод о хорошей корреляции результатов микологических исследований и определения Аг СА в сыворотке крови. При этом использование ИФС позволяет проводить количественное выявление Аг СА, полностью совпадающее с данными анамнеза и результатами микологического исследования. Выявляемые при этом концентрации антигенов на уровне 10^{-4} - 10^{-5} мг/мл соответствуют тяжелым формам грибковой инфекции, а на уровне 10^{-6} и 10^{-9} мг/мл — средней и легкой степени соответственно.

Успешное проведение курса антимикотической терапии приводит к снижению концентрации антигенов СА в сыворотке крови в 100-1000 раз. При этом степень уменьшения их концентраций прямо коррелирует с клинической эффективностью лечения, что подтверждается и результатами микологического исследования.

Аналогичные результаты были получены и для микозов кожи, обусловленных дерматомицетом *Trichophyton rubrum*.

Вышеописанный метод использовался также в изучении двух клинических случаев комбинированных дерматозов, при которых было выявлено совместное присутствие СА и TR. В исследованном случае микоза стоп концентрация Аг СА составляла $(5,8 \pm 0,9) \times 10^{-6}$ мг/мл, а Аг TR — $(7,8 \pm 0,4) \times 10^{-11}$ мг/мл. При дерматите волосистой части головы концентрации Аг СА и TR составляла $(5,0 \pm 0,4) \times 10^{-7}$ и $(4,5 \pm 0,8) \times 10^{-10}$ мг/мл соответственно. Полученные данные о сравнительной интенсивности развития инфекции СА и TR в обоих случаях подтверждены результатами микологических исследований. Перекрестных реакций между антигенами СА и TR при амперометрическом тестировании не отмечено. Таким образом, разработанный нами метод представляется перспективным и для дифференциальной диагностики комбинированных грибковых инфекций.

ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКА КАНДИДОЗНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ У ДЕТЕЙ С ПОМОЩЬЮ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Курчавов В. А., Бойко Н. Б., Рогатина Е. Л.
*Московский детский центр лабораторной диагностики,
ДГКБ 13 имени Н. Ф. Филатова
Москва*

Для того, чтобы проводить экспресс-диагностику кандидозных осложнений (в течении суток), был изучен химический состав клеточных стенок грибов 136 медицински значимых штаммов методом газовой хроматографии (ГХ). Для всех исследованных видов грибов рода *Candida* качественный состав клеток был практически однороден и включал в себя арабинитол, маннозу, глюкозу и жирные кислоты. Количественный состав сахаров и жирных кислот был различен для разных видов *Candida*, что делает возможным использовать ГХ для дифференциации данных грибов.

У 30 детей без клинико-лабораторных признаков кандидоза (контрольная группа) концентрация арабинитола в сыворотке крови была ниже 0,8 мкг/мл, маннозы — 30 мкг/мл, в ликворе — арабинитола ниже 12 мкг/мл, маннозы — 50 мкг/мл.

В течении 2002 г. нами было обследовано 135 детей с подозрением на кандидозную инфекцию. Из них 80 детей с аспирационной пневмонией, в/у пневмонией, мекониальной аспирацией, ВЖК и РДС, находившихся на лечении в неонатальном центре нашей клиники и 55 детей, находившихся на лечении в нейрохирургическом отделении Морозовской ДГБ с бактериально-грибковым менингитами и различными злокачественными опухолями головного мозга. Положительный ответ был дан для 36 (45%) детей из нашей клиники. Уровень арабинитола был повышен у 27 (33,8%) детей, а уровень маннозы — у 26 (32,5%) детей, из них у 18 (22,5%) детей был завышен уровень и арабинитола и маннозы. Из обследованных 55 детей нейрохирургического отделения положительный ответ был дан для 27(49%) детей.

У всех детей с высокими уровнями арабинитола и маннозы при проведении противогрибковой терапии (целенаправленной — при высеве грибов, эмпирической — при отрицательном результате посева) наряду с клиническим улучшением отмечалось снижение арабинитола до фоновых концентраций.

Метод ГХ-определения арабинитола в сыворотке крови и ликворе является высокоинформативным и экспрессным в диагностике кандидоза у детей.

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АГАРА ШТАЙБА В МИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Липницкий А. В., Лесовой В. С., Новицкая И. В., Зимина И. В.

*Научно-исследовательский противочумный институт
Волгоград*

Нередко возбудители грибных инфекций присутствуют в пробах клинического материала в различных микоассоциациях. Однако по ростовым характеристикам, как известно, дрожжеподобные грибы часто опережают плесневые, а микромицеты рода *Cryptococcus* выделить в культуре значительно труднее по сравнению с *Candida sp.* В данном аспекте своевременная диагностика криптококкоза, особенно как этиологического фактора острой и хронической неврологической патологии, приобретает особую актуальность.

Fridrich Staib с учетом биохимических особенностей возбудителя криптококковой инфекции предложил среду, содержащую креатинин и экстракт *Guizotia abyssinica* (семейство сложноцветные), на которой колонии криптококкового гриба, по утверждению автора, приобретают устойчивый темно-коричневый цвет, в то время как скопления клеток *Candida* остаются белыми или прозрачными. Однако ареалом естественного распростране-

ния семян *Guizotia abyssinica* служит африканский континент, в связи с чем самим автором было допущено использование в составе питательных сред других представителей семейства сложноцветных.

На примере музейных штаммов *Cryptococcus neoformans* нами была апробирована среда Штайба в модификации И. Е. Колуканова, содержащая семена подсолнечника (семейство сложноцветные), наиболее широко представленного в Волгоградском регионе. В состав среды входят: экстракт семян подсолнечника (50г/л среды), глюкоза (1г/л), креатинин (1г/л), однозамещенный фосфат калия (1г/л), агар (15г/л). Стерилизацию питательной среды осуществляли автоклавированием при 110 °С в течение 20 мин.

Наряду с высевом на агар Штайба рост криптококкового гриба был изучен также на стандартных плотных питательных средах Сабуро и Чапека (с соответствующими хромогенными добавками экстракта семян подсолнечника и креатинина в тех же концентрациях). Результаты оценивали на 6-7 сут роста колоний при 37°С, когда появляющиеся бесцветными колонии криптококков темнели до коричневой окраски. В качестве контроля были изучены штаммы *Candida albicans* 624, *C. pseudotropicalis*, *C. krusei*.

Оказалось, что из 11 музейных штаммов возбудителя криптококкоза (*Cryptococcus neoformans* 861/151А, 855/438-2n, 4n, 881/9-753, 870/156А, 9/22, 824/125-3n, 860-07-Н, 867/151-С, 856/439-4n, 873-у 85) на агаре Штайба-Колуканова изменение цвета колоний до темно-коричневого отмечено у *C. neoformans* 861/151А, 855/438-2n, 881/9-753, 870/156

А, 9/22, 856/439-4n (54,5% наблюдений).

В ряде случаев (27,25%) цвет колоний менялся неотчетливо — от желтого до бежевого (на примере штаммов *C. neoformans* 4n, 824/125-3n, 867/151 С). В 3 наших наблюдениях из 11 (27,25%) изменения окраски колоний криптококка на среде Штайба не происходило.

При сравнительном изучении питательных сред Чапека и Сабуро, содержащих креатинин и экстракт семян подсолнечника в тех же пропорциях, только в 1 случае из 11 (9,1%) отмечено существенное расхождение результатов: рост штамма *C. neoformans* 870/156 А на агаре Штайба-Колуканова отмечен в виде темно-коричневых колоний, в то время как на средах Чапека и Сабуро, имеющих хромогенные компоненты, изменения окраски колоний криптококка не происходило. В 7 наблюдениях (54,5%) во всех аранжировках опытов получены идентичные результаты (на примере штаммов *C. neoformans* 861/151 А, 855/438-2n, 4n, 881/9-753, 9/22, 860-07-Н, 873-У 85). В 3 случаях (при изучении штаммов *C. neoformans* 824/125-3n, 867/151-С, 856/439-4n) различия в появляющейся окраске на изучаемых средах оказались несущественными.

В контрольных опытах с дрожжеподобными микромицетами рода *Candida* потемнения окраски колоний не отмечено независимо от сроков наблюдения и используемых хромогенных питательных сред.

Таким образом, преимущества среды Штайба-Колуканова перед стандартными средами Чапека и Сабуро с теми же хромогенными добавками для выявления возбудителя криптококкоза проявляются неабсолютно. В большинстве наблюдений (90,1%) на средах Штайба, а также Чапека и Са-

буро с добавлением экстракта семян сложноцветных растений и креатинина отмечено полное или неполное совпадение результатов. В отдельных случаях (на примере штамма *C. neoformans* 824/125-3n) более отчетливо изменение окраски прослеживались на средах с основами Сабуро или Чапека. Часть колоний возбудителя криптококковой инфекции (*C. neoformans* 860-07 H, *C. neoformans* 873-у 85) в наших наблюдениях оставались неокрашенными во всех случаях.

В целом использование агара, содержащего хромогенные компоненты (с основой по Сабуро, Чапеку или Штайбу), оправдано и целесообразно в аспекте диагностики криптококковой инфекции, что, несомненно, служит повышению качества проводимого культурального микологического исследования.

В 1996 г. Штайбом были опубликованы предварительные данные о том, что клинические изоляты *Histoplasma capsulatum* в мицелиальной фазе спустя 4 нед инкубации при 26 °С на агаре Штайба формируют характерные колонии, имеющие белый центр, окаймленный красно-коричневой зоной, переходящей в край, представленный субстратным мицелием коричневого цвета.

В коллекции музейного центра ВолгНИПЧИ имеется 22 штамма возбудителя гистоплазмоза (американский и африканский варианты). Большинство из них относится к А-типу (*albus*) с преобладанием гладкостенных макро- и микроконидий и меньшая часть — к В-варианту (*brown*), в котором преобладают бугристые (шиповидные) конидии, являющиеся главным морфологическим признаком для идентификации этого гриба.

В наших исследованиях 18 из 22 штаммов возбудителя гистоплазмоза при культивировании на модифицированной среде Штайба росли в замедленном темпе и формировали плоские матовые коремияльные колонии, не имеющие спор и воздушного мицелия, и лишь 4 штамма сохраняли свою прежнюю культурально-морфологическую характеристику. Полученные нами результаты показали недостаточную эффективность изучаемой питательной среды при исследовании биологии возбудителя гистоплазмоза.

Таким образом, требуется взвешенный и дифференцированный подход к использованию модифицированной среды Штайба в практических и научных исследованиях.

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ (ПЦР) В ДИАГНОСТИКЕ МИКОЗОВ

Липницкий А. В., Новицкая И. В., Лесовой В. С.

*Научно-исследовательский противочумный институт
Волгоград*

ПЦР — амплификация специфических ДНК в настоящее время является стандартной процедурой для клинических микробиологических лабо-

раторий. С этой целью используются видоспецифические ДНК-зонды и олигонуклеотидные праймеры. Для идентификации различных видов микроорганизмов применяют также метод, основанный на случайно выбранных для амплификации праймерах (RAPD), или фингерпринт ДНК, в которой простой повтор используется как единственный праймер для амплификации.

В 1988 г. Cutler et al. показали, что ДНК-зонд может быть успешно использован для прямого выявления *Candida albicans* в клиническом материале Buchman et al. (1996) с помощью амплификации фрагмента ДНК, находящегося внутри видоспецифического гена, в ПЦР обнаруживали грибок в течение 6 ч со времени получения клинического образца.

Чувствительность ПЦР при исследовании образцов крови составила 1-10 клеток грибов в 1 мл (Einsele et al., 1997). Некоторые варианты метода позволяли выявить до 40 видов грибов, включая все клинически важные грибные патогены. Метод был успешно использован для идентификации серотипов и индивидуальных штаммов *C. neoformans* (Mitchell, Perfect, 1995). Недавно Skladny et al. (1999) предложили новый высокочувствительный вариант ПЦР для быстрого выявления различных видов *Aspergillus* в крови и бронхиальном секрете. Они использовали двухступенчатую процедуру ПЦР с тщательно отобранными двумя парами «гнездовых» праймеров. Специфичность метода была подтверждена негативными результатами с широким набором различных грибов, включая несколько видов *Penicillium*, бактериальными патогенами и человеческими клеточными линиями.

Специфичный ДНК-фрагмент из 3-х различных штаммов *Paracoccidioides brasiliensis* был амплифицирован в ПЦР с праймерами, комплементарными последовательности в 110 пар нуклеотидов. Было показано, что этот фрагмент может быть полезным диагностическим маркером при идентификации и дифференциации штаммов возбудителя паракокцидиоидомикоза.

Имеются работы о применении в медицинской микологии варианта ПЦР с различным проявлением обратной транскрипции (DDRT-PCR), позволяющего идентифицировать различно экспрессируемые гены в условиях взаимодействия грибных клеток с макроорганизмом.

На модели *Histoplasma capsulatum* и клеток мышинных макрофагов были проанализированы комбинации 45 праймеров. Выявлены 70 различно экспрессируемых фрагментов, 35 из которых проявляли экспрессию только *in vivo* (Colonna-Romano et al., 1998).

Определенные сложности при использовании ПЦР в клинике связаны с возможными ложно-положительными реакциями, обусловленными транзитным присутствием плесневых грибов (чаще, аспергиллов) в респираторном тракте. Фактически до 25% образцов, полученных из бронхо-альвеолярного лаважа здоровых людей, дают положительные результаты ПЦР (Bart-Delabesse et al., 1996). Значительно более надежные результаты при аспергиллезной инфекции получены в ПЦР с сывороткой или плазмой крови (Yamakami et al., 1996). Дальнейшее усовершенствование ПЦР позволит улучшить диагностику микозов.

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ ВЫДЕЛЕНИЯ ГРИБКОВОЙ МИКРОФЛОРЫ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ

Мартынова А. В., Туркутюков В. Б.

Кафедра эпидемиологии, военной эпидемиологии,
Владивостокский государственный медицинский университет
Владивосток

В подавляющем большинстве случаев основными возбудителями такого серьезного заболевания как внебольничная пневмония являются прежде всего бактерии, и такие их виды как *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*, *Moraxella catarrhalis* и другие. Определенный вклад в этиологию вносят атипичные и вирусные возбудители. Тем не менее, нельзя упускать из виду и возможность возникновения инвазивного микоза с клиникой тяжелой внебольничной пневмонии. Особенно это актуально в период нарастания числа больных как с иммуносуппресией, так и с более легкими формами иммунодефицитных состояний. Кроме того, учитывая и объективное улучшение микологической диагностики специалисты практического здравоохранения чаще обращают внимание на инвазивные микозы респираторного тракта, вызванные грибами родов *Candida*, *Aspergillus*, и т. д.

Цель: целью нашей работы было оценить диагностическую значимость выделения при микробиологическом исследовании мокроты наиболее часто диагностируемых грибов. Материалы и методы: мы проводили микробиологическое исследование индуцированной мокроты 280 больных внебольничными пневмониями, диагноз выделенных возбудителей грибковой этиологии подтверждался бактериоскопически; культурально (на среде Сабуро), согласно общепринятой методике, в том числе и при культивации с антимикотиками при 25° и 37° с демонстрацией теплового полиморфизма.

Результаты: По нашим наблюдениям, в рутинной работе клинического микробиолога при исследовании мокроты в процессе постановки этиологического диагноза внебольничной пневмонии чаще всего выделяются грибы рода *Candida*, *Penicillium*, и др. Так при проведении нами 280 исследований мокроты больных внебольничными пневмониями достоверное выделение грибов рода *Candida* было в 2% случаев в диагностически значимом разведении, и практически в 30%(84/280) всех исследований при первичном посеве (естественно правильно собранного материала!). Грибы рода *Penicillium*, обильно присутствующие во внешней среде, являлись одним из наиболее частых лабораторных контаминантов (примерно в 40% (112/280) всех исследований мокроты). В 10% случаев (28/280), наблюдалось сочетанное выделение грибов рода *Candida* и *Penicillium* в первом разведении. Видовая диагностика была проведена с выделенным возбудителем рода *Penicillium*, и по полученным данным он был определен как *Penicillium marneffe*, являющийся эндемичным для Дальнего Востока микроорганизмом, вызывающим в

отдельных случаях инвазивный микоз. В диагностически значимом разведении был выделен *Streptococcus pneumoniae*, клинического инфицирования данным грибом определено не было.

Выводы: несмотря на отсутствие в большинстве случаев клинической значимости выделения при исследовании мокроты возбудителей грибковой этиологии, необходим эпидемиологический контроль за этими микроорганизмами и, как следствие, клиническая настороженность в плане появления инвазивных микозов у пациентов, относящихся к группам риска.

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ В ИММУНОДИАГНОСТИКЕ КАНДИДОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Новицкая И. В., Васильев В. П.

*Научно-исследовательский противочумный институт
Волгоград*

Инвазия возбудителя кандидоза влечет за собой ответную иммунную реакцию макроорганизма, интенсивность которой может быть зарегистрирована с помощью ряда иммунологических методов. Наиболее широкое использование в клинической практике получил твердофазный иммуноферментный анализ. При поиске антигенов, особенно в случае массовых обследований, с успехом может быть применен метод флуоресцирующих антител.

В последние годы возрос интерес к явлению биолюминесценции и основанному на нем хемилюминесцентному иммуноанализу.

Хемилюминесцентный метод основан на использовании окислительно-восстановительных реакций, протекающих с излучением света. В процессе реакции образуется большое количество нестабильных короткоживущих продуктов, в том числе в фазе возбуждения. При переходе из возбужденного в основное состояние происходит излучение видимого света. Интенсивность излучения измеряется либо значением пика световой интенсивности, либо интегральной характеристикой свечения (*Kricka L., J., Carter T. J., 1982; Wood W. G., 1984*).

Данная работа посвящена изучению диагностической ценности ХЛИА, основанного на реакции перекисного окисления аминоксигидраза, катализируемого компонентами сыворотки человека. Гомогенный иммуноанализ на основе переноса энергии описан для определения ряда антигенов с молекулярной массой от 312 до 150000. При этом образование комплекса антиген-антитело сопровождается уменьшением интенсивности хемилюминесценции на 50-70% (*Patel A. e. a., 1983, Campbell J. e. a., 1985*).

В данном исследовании взаимодействие кандидозных антител с антигенами *Candida albicans* 624 изучено с помощью хемилюминесцентного анализа. Для оценки уровня хемилюминесценции использовали люминометр LKB 1250-001 (Швеция).

В пробирку, содержащую 0,1 мл исследуемой сыворотки, вносили 0,1 мл взвеси *Candida sp.* (в концентрации 10^7 кл/мл фосфатно-солевого буфера, pH 7,2). По истечении инкубации при комнатной температуре добавляли 0,05 мл люминола (в разведении 1:100) и непосредственно перед считыванием результатов — 0,05 мл 0,33% раствора перекиси водорода.

Метод хемилюминесценции был апробирован в ходе исследования иммунных кроличьих сывороток (с титрами по результатам реакции иммунодиффузии в геле 1:16-1:32). При этом вариировали как разведения сывороток (от 1:20 до 1:1280), так и концентрацию используемой взвеси клеток возбудителя кандидоза (от 10^5 до 10^9 кл/мл). Уровень хемилюминесценции оценивали спустя 10, 20 и 30 мин от начала реакции. Контролем служили чумные, бруцеллезные и коревые иммунные сыворотки, а также нормальная сыворотка человека.

Оказалось, что в случае специфических реакций на модели иммунных кроличьих сывороток зарегистрировано снижение интенсивности излучения от 2 раз при концентрации кандидозных микромицетов 10^5 кл/мл до 15 раз при концентрации возбудителя 10^9 кл/мл. Разведение кроличьей сыворотки составляло 1:50-1:400. Контроли оказались интактными.

При изучении уровня хемилюминесценции на модели сывороток людей (12 наблюдений), страдающих различными проявлениями кандидоза, в том числе висцеральной локализации, верифицированного в культуральном исследовании, оказалось, что снижение интенсивности излучения зарегистрировано в 91,7% случаев (11 наблюдений). Учет реакции осуществляли спустя 15 мин инкубации при комнатной температуре. При этом интенсивность свечения была снижена до 50% у 2 пациентов, от 50% до 100% — в 6 случаях, в 3 наблюдениях этот показатель составил соответственно -218%, -230% и -300%. В контролях (с сывороткой против вируса коревой краснухи, взвесью клеток гриба *Candida sp.*, раствора используемого буфера) снижения естественного фона не происходило.

Таким образом, в соответствии с общепринятыми критериями результат реакции ХЛИА можно считать четко положительным в 9 случаях из 12. Эти результаты коррелируют с данными, полученными при исследовании сывороток в иммуноферментном методе, однако, с нашей точки зрения, хемилюминесцентный анализ не только не уступает ТИФМ, но в некоторых случаях даже оказывается более предпочтительным, так как является одноэтапным исследованием, не требующим предварительной подготовки пластин, использования термостата и длительной инкубации в ходе выполнения реакции. Более того, необходимость использования хемилюминометра и люминофора компенсируется, с нашей точки зрения, относительной простотой методики, не нуждающейся в получении антииммуноглобулиновых конъюгатов с пероксидазой хрена определенной степени очистки.

В целом хемилюминесцентный анализ, с нашей точки зрения, является одним из современных и перспективных методов иммунологической диагностики кандидомикоза, что может быть особенно необходимым в случае наличия висцеральных и трудно доступных для диагностики септических очагов кандидозной инфекции.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ В ЧИСТЫХ КУЛЬТУРАХ И КЛИНИЧЕСКИХ ПРОБАХ ПО ЖИРНЫМ КИСЛОТАМ И СТЕРИНАМ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ — МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

*Осипов Г. А., Арзуманян В. Г., Гребенюк В. Н.,
Поздоровкина В. В., Парфенов А. И.,
Ручкина И. Н., Бажин Ю. А., Парфенов Г. И.,
Мазитова Л. П., Текучева Л. В.*

*Научный центр сердечно-сосудистой хирургии имени Бакулева,
Академическая группа Ю. Ф. Исакова
НИИ вакцин и сывороток имени Мечникова
Центральный научно-исследовательский
кожно-венерологический институт МЗ РФ
Центральный НИИ гастроэнтерологии*

*Частный медицинский салон терапевтической косметологии «Благовест»
Москва
Центр здоровья семьи
Калининград*

Исследованы химические компоненты клеток некоторых клинически значимых микроскопических грибов с целью их идентификации как в чистой культуре так и в клиническом материале пациентов с разной патологией без предварительного выделения чистых культур. При сопоставлении профилей клеточных жирных кислот грибов разных таксонов были выявлены существенные различия в их химическом составе и показана его информативность и специфичность на уровне рода. Для дрожжеподобных грибов *Candida albicans* маркерами являются гептадеценовая и лигноцереновая кислоты, для рода *Mucor* — ейкозановая кислота, для актиномицетов — разветвленные изо-гексадекановая (*Streptomyces*, *Nocardiosis*), 10-метил-гексадекановая (*Rhodococcus*) кислоты и туберкулостеариновая — для *Nocardia*. Специфичность идентификации грибов повышена введением в анализ новых соединений, таких как оксикислоты, спирты и стерины. Длинноцепочечные 2-оксикислоты C24 -C26, не характерные для других микроорганизмов, были обнаружены у представителей родов *Mucor*, *Aspergillus*, *Candida*, *Malassezia*. У большинства исследованных штаммов обнаружены разнообразные стерины: эргостерол, ситостерол, брасикастерол, эргостатриен, лано-стадиенол, и другие вместе с их предшественником — скваленом. Использование указанных выше веществ в качестве маркеров позволило отследить присутствие соответствующих микроскопических грибов и аэробных актиномицетов в клинических объектах: коже, биоптатах кишечника, фекалиях, крови, мокроте, моче, ликворе, вагинальном содержимом, эякуляте, ликворе, раневом отделяемом. Исследовано микробное сообщество очага поражения кожи больных с atopическим дерматитом, псориазом, угревой болезнью и алопецией. ГХ-МС анализ методом прямого сканирования и масс-фрагмен-

тографии показал наличие в основном грибковых компонентов по сравнению с бактериальными. Обнаружены маркеры *C. albicans*, *Aspergillus*, *Propionibacterium*, *Malassezia* и других грибов, бактерий родов *Clostridium*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Klebsiella*, *Flavobacterium*, *Bacteroides* а также стафилококков и микобактерий. Анализ кожного сала — себума — показал наличие оксикислот C24-C26 и стерина как у здоровых людей, так и у больных алопецией и акне. Из биоптатов тонкого кишечника людей с синдромом раздраженного кишечника (СРК) выделены в чистой культуре дрожжеподобные грибы *Candida*, микроскопические грибы *Penicillium freg*, аэробные актиномицеты *Nocardia asteroides*. Показано, что при СРК, наряду с изменением бактериальной составляющей микробиоты происходит существенное увеличение численности грибов кандиды и уменьшается концентрация нокардий, родококков и актиномадура. При антибиотико-ассоциированной диарее (ААД) и алопеции в тонком кишечнике, а при простатите в эякуляте увеличивается содержание микроскопических грибов, продуцирующих ситостерол и кампестерол (нитчатые грибы с дрожжевым запахом, выделены в чистой культуре). Из аэробных актиномицетов в 100% случаев ААД по маркерам отмечено превышение численности псевдонокардий. Подавляющее большинство недиагностируемых форм инфекционного простатита связано с увеличением на порядок и более концентрации 10-метил-гексадекановой (10Me16) кислоты — маркера *Rhodococcus equi*. При atopическом дерматите, напротив, численность родококков по данным контроля концентрации 10Me16 в крови уменьшается при увеличении содержания маркеров других аэробных актиномицетов: нокардий, стрептомицетов, а также микроскопических грибов, продуцирующих кампестерол. Приведенные примеры показывают новые возможности детектирования и мониторинга клинически значимых микроскопических грибов и аэробных актиномицетов при заболеваниях инфекционной этиологии и дисбактериозах слизистых оболочек кишечника и других органов. Тому способствует экспрессность метода ГХ-МС микробных молекулярных маркеров, универсальность, селективность и высокая чувствительность в детектировании и количественном определении возбудителей различной природы: бактерий, вирусов, грибов и актиномицетов.

ГЕНОДИАГНОСТИКА В КЛИНИЧЕСКОЙ МИКОЛОГИИ

Щербо Д. С., Полтараус А. Б., Щербо С. Н.

НПФ «ГЕНТЕХ»

Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгарда РАН
Москва

С момента возникновения проблемы грибковых инфекций в 60-70 г. усилия медиков всего мира были направлены на разработку методов диагностики этих опасных осложнений, так как ранняя диагностика остается основным критическим моментом, определяющим успех в ведении больного

с инвазивной инфекцией. Традиционные методы микробиологического культивирования грибов требуют длительного времени и часто не достаточно результативны. В настоящее время разрабатывается генодиагностика грибных патогенов, что особенно важно при системных поражениях, и для выбора эффективной антигрибковой терапии, где необходима точная идентификация патогена. Грибы относительно быстро формируют механизмы устойчивости к тем или иным препаратам, поэтому при проведении курса ПЦР-диагностика может быть использована для контроля эффективности проводимой терапии. Цель данной работы заключалась в разработке и апробации чувствительных и специфичных систем ПЦР диагностики, позволяющих выявлять грибные патогены в крови и в других биологических материалах.

При массовом проведении ПЦР анализов в диагностических лабораториях особое значение имеют специфичность и надежность тест-систем, условия проведения реакций, возможность стандартизации и удобства регистрации результата. Специфичность такой тест-системы обеспечивается на этапе полимеразной реакции с помощью олигонуклеотидных праймеров и дополнительно контролируется при определении длины полученного фрагмента ДНК. Для выбора олигонуклеотидных праймеров нами было использовано множественное выравнивание последовательностей консервативных и вариабельных участков генов рРНК разных видов грибов. Это позволило создать тест-системы различного спектра действия. Многокопийность рибосомальных генов (у грибов tandemные повторы генов рДНК насчитывают 100–200 повторяющихся единиц) дает существенный выигрыш в чувствительности системы.

Для выявления системных микозов нами были апробированы три универсальные тест-системы позволяющие выявлять широкий спектр грибных патогенов. Результаты сравнения позволили выбрать наиболее специфичную универсальную систему, которая позволяет выявлять ДНК более 78 штаммов 25-ти видов патогенных грибов, включая *Candida spp.*, *Hansenula spp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon beigeli*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*

С учетом требований диагностических лабораторий нами разработана видоспецифичная тест-система (КанАм) для выявления ДНК *Candida albicans*, которая занимает лидирующее место в списке возбудителей кандидоза. Высокая чувствительность систем позволяет выявлять возбудителей микозов в количестве, не менее 10–100 клеток возбудителя на 100 мкл и исследуемого биологического материала.

Обе тест-системы были апробированы в ходе исследований динамики частоты возникновения грибковых инфекций у группы повышенного риска — недоошенных новорожденных детей, находящихся на выхаживании в детском боксированном корпусе 7-ой клинической больницы. Перед началом исследований вся система оборудования боксированного корпуса подверглась тотальной дезинфекции. Забор материала (крови, мочи, ликвора и аспирата из легких) осуществляли стерильными инструментами, избегая соприкосновения с кожными покровами и слизистыми, где вероятно нали-

чие клинически незначимой грибковой колонизации. Параллельно проводили микробиологическое исследование отбираемых проб. Забор материала проводили сначала в двух точках: на 1-4 сутки жизни (с. ж.) и 7-10 с. ж., затем в трех точках (14,21 и 28 с. ж.). Кроме того, пробы брали также у детей, длительно находящихся в отделении. В подавляющем большинстве случаев результаты ПЦР диагностики совпадали с результатами культурального метода, хотя в единичных случаях нами было зарегистрировано присутствие ДНК грибов при отрицательных результатах культивирования, что допустимо, учитывая большую чувствительность метода. В настоящее время исследовано более 250 клинических образцов от 151 младенца. Зарегистрировано 19 случаев присутствия грибов в моче, 4- в крови. После первичного скрининга образцов при помощи универсальной системы, положительные пробы проверяли на наличие *C. albicans* при помощи дополнительной тест-системы диагностики.

Разработанная тест-система ПЦР-диагностики *C. albicans* (НПФ «ГЕНТЕХ»), показала свою эффективность при гинекологических исследованиях. Нами проведено комплексное диагностическое обследование и получены статистические результаты обнаружения микозов и других сопутствующих им ИППП у взрослого населения г. Москвы с использованием наборов НПФ «ГЕНТЕХ». За исследованный период (24000 анализов, с августа 2001 по июль 2002 года) средняя выявляемость урогенитальных инфекций составила следующие значения: *Candida albicans* — 19. 9%, *C. trahomatics* — 7. 3%, *M. hominis* — 14. 4%, *M. genitalium* — 4. 0%, *U. urealiticum*+ *U. parvum* — 43.1%, *Herplex Simplex Virus type I,II* — 14. 9%, *Human cytomegalovirus* — 9. 3%, *N. gonorrhoeae* — 2. 6%, *G. vaginalis* — 42. 7%, *T. vaginalis* — 1. 9%, *S. agalactiae* — 28. 5%, *Human papillomavirus* (высокий онкогенный риск) — 29,6%, *Human papillomavirus* (низкий онкогенный риск) — 15,5%.

СПОСОБНОСТЬ К КАПСУЛООБРАЗОВАНИЮ И СИНТЕЗУ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ НЕКОТОРЫМИ ВИДАМИ РОДА *EXORNIALA* МОЖЕТ БЫТЬ ИСПОЛЬЗОВАНА ДЛЯ ИХ ДИАГНОСТИКИ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ

Юрлова Н. А.

Государственный университет
Государственная химико-фармацевтическая академия
Санкт-Петербург

Таксономически сборная группа черных дрожжевых грибов (ЧДГ) вызывает большое внимание медицинских микологов как к возбудителям системных микозов, заканчивающихся в 65-100% случаев фатальным исходом. ЧДГ хорошо адаптируются к различным условиям окружающей среды. К характеристикам ЧДГ, имеющим медицинское значение, относят, например,

наличие меланинов, продукцию капсул и экстрацеллюлярных полисахаридов. Адаптация к экстремальным условиям дает возможность ЧДГ преодолеть иммунную систему человека при попадании в подкожные травмы или при вдыхании, и тогда они способны стать причиной хронических или случайных диссеминированных микозов.

Из-за нечеткой выраженности морфологических признаков ЧДГ диагностика заболеваний, этиологическим фактором которых являются эти микромицеты, затруднена. В основу определения ЧДГ аскомицетного аффинитета положен тип конидиогенеза: симподиальный (*Rhinocladiella*, *Fonsecaea*), фиалидный (*Phialophora*), перкуррентный с образованием ярковыраженных (*Exophiala*, *Hortaea*) и слабовыраженных (*Hormonema*) аннелидных зон; синхронный с последующим развитием перкуррентного (*Aureobasidium*). Однако из-за присутствия плеоморфизма у ЧДГ их часто путают при определении даже по типу конидиогенеза. В последние годы для дифференциации и диагностики ЧДГ разработаны молекулярные пробы (Hoog de et al, 2001; Yurlova, Hoog de, 1999). Однако молекулярные методы дороги и иногда недоступны для пользователей. Поэтому возникает необходимость разработки простых и доступных маркеров дифференциации таксонов ЧДГ на родовом и видовом уровнях. Известно, что ЧДГ образуют в природных условиях, а также на некоторых питательных средах капсулы и/или экстрацеллюлярные полисахариды. Эти признаки с успехом были использованы в диагностике некоторых видов *Exophiala*, в том числе *E. spinifera* и *E. dermatitidis* — агентов оппортунистических микозов (Yurlova & Hoog de, 2002).

Были исследованы типовые штаммы *Nadsoniella nigra* var. *hesuelica* Lyakh & Ruban ВКМ F-2137(T); *Pullularia prototropha* Bulanov & Malama (T) = *Exophiala prototropha* (Bulanov & Malama) Naase, Yurlova & de Hoog 1999 по этим признакам.

Была изучена способность штаммов *Exophiala nigra* и *Exophiala prototropha* продуцировать экзополисахариды (ЭПС) и капсулы на разных по составу питательных средах. Обнаружено, что культуры обоих штаммов способны синтезировать ЭПС в жидких средах с органическим источником азота и не синтезируют их в средах с неорганическим источником азота (NaNO_3). Экзопполисахариды штаммов представляют собой гетерополисахариды, состоящие из глюкозы, маннозы и галактозы. Клетки культур *E. nigra* не образуют капсулу ни на одной из изученных питательных сред, тогда как *E. prototropha* продуцирует капсулу как в естественных (сусло), искусственных (с органическим источником азота), так и в синтетических средах (с окисленной формой источника азота).

Результаты исследования штаммов *E. spinifera* и *E. dermatitidis* — агентов оппортунистических микозов (Yurlova & Hoog de, 2002) и штаммов *E. nigra* и *E. prototropha*, являющихся экстремофилами и потенциально полезными в биотехнологии как продуценты противоопухолевого меланина (Лях, 1981; Лях и др., 1996; Малама, 1966) свидетельствуют о том, что способность к капсулообразованию и к синтезу ЭПС — может быть использована в качестве дополнительного признака для дифференциации видов рода *Exophiala*.