

На правах рукописи

- 2 1101 (00)

ПОЗДОРОВКИНА
Вера Витальевна

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ГРИБОВ И ДИАГНОСТИКА
ИНВАЗИВНОЙ ГРИБКОВОЙ ИНФЕКЦИИ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

03.00.07. - микробиология

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 1998

Работа выполнена в Академической группе академика РАМН Ю.Ф.Исакова (Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им.А.Н.Бакулева РАМН).

Научные руководители: доктор медицинских наук, профессор
Белобородова Наталья Владимировна;
кандидат технических наук
Демина Алла Михайловна.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Верховцева Надежда Владимировна;
кандидат биологических наук
Столярова Лидия Григорьевна.

Ведущая организация: Центральный НИИ эпидемиологии
МЗ Российской Федерации

Защита состоится 1998г. в часов на заседании
Диссертационного совета Д 084.18.01 при Московском научно-
исследовательском институте эпидемиологии и микробиологии
им. Г.Н.Габричевского (125212, г.Москва, улица адмирала
Макарова, д.10)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института.
Автореферат разослан 1998года.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук Е.М.Горская

Актуальность проблемы.

Как показывают отечественные и зарубежные исследования, в последние годы резко возросло количество микозов, вызванных условно-патогенными грибами у больных с ослабленным иммунитетом, в связи с применением антибиотиков широкого спектра, цитостатиков и глюкокортикостероидов (Романюк Ф.П., 1996; Антонов В.Б., 1995; Степанова Ж.В., 1990; Brown A.E. 1990). Снижение иммунитета способствует активизации условно-патогенной флоры, к которой относятся микроскопические грибы.

Среди возбудителей микозов ведущее место занимают грибы рода *Candida*, вызывающие различные формы кандидоза, в том числе висцеральные и системные (Самсыгина Г.А., 1996). Частота инфекций, обусловленных грибами рода *Candida*, особенно *Candida albicans*, достигает 15% в общей этиологической структуре гнойно-воспалительных заболеваний (Пронина Е.В. 1996). Присоединение кандиды-инфекции при любом соматическом заболевании приводит к значительному ухудшению общего состояния больного, развитию сепсиса с высокой степенью летальности (Tang С.М, 1992). Важно отметить, что в 40-60% случаев кандидоз остается нераспознанным или поздно диагностированным, что значительно усугубляет его прогноз (Самсыгина Г.А., 1996).

Своевременная диагностика и идентификация возбудителя, и как следствие - правильно начатое лечение, с одной стороны может существенно снизить летальность, с другой - предотвратить часто неоправданное назначение высоко токсичных препаратов, например, таких как амфотерицин В.

На современном этапе для идентификации и диагностики грибковой инфекции используются микробиологические,

Биохимические и серологические тесты. К сожалению ни один из существующих методов не является универсальным, в высокой степени чувствительным и специфичным для диагностики инвазивных микозов (Matthews R.S., 1993).

Посев крови остается основным методом лабораторной диагностики кандидоза, но во многих случаях нерезультативен. В зависимости от очага поражения и стадии заболевания частота выделения грибов из крови больных с инвазивными кандидозами не превышает 50% (Berenguer J.M., 1993; Telenti A. 1989). Идентификация возбудителя, в зависимости от вида занимает до 10 суток. Серологические методы имеют недостаточную чувствительность и специфичность, так как у больных с нейтропенией понижен уровень антител (Кубась В.Г., 1992).

Это определило необходимость разработки дополнительного хроматографического метода для идентификации и диагностики грибковой инфекции. Преимущества метода газовой хроматографии (ГХ) состоят в его высокой чувствительности, воспроизводимости, экспрессности и относительно невысокой стоимости анализа, что делает его очень полезным в клинической микологии. Возможности получения уникальных данных значительно расширяются при использовании газовой хроматографии в комбинации с масс-спектрометрией.

Цель исследования.

Целью настоящего исследования является:

1. Родовая идентификация основных клинически значимых грибов и видовая идентификация грибов рода *Candida* методом газовой хроматографии;

2. Поиск специфических метаболитов этих микроорганизмов с целью экспресс-диагностики инвазивной грибковой инфекции.

Задачи исследования.

- 1) разработать (или адаптировать) методики пробоподготовки биоматериала и оптимизировать параметры ГХ анализа;
- 2) изучить жирнокислотный и углеводный состав биомассы клеток медицински значимых грибов родов *Candida*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Cryptococcus*, *Penicillium* и *Micromonospora*, *Actinomyces*, *Nocardia*;
- 3) оценить возможность использования различий в химическом составе вышеперечисленных грибов для их таксономии и идентификации и создать алгоритм идентификации;
- 4) изучить химический состав метаболитов грибов родов *Candida*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Cryptococcus*, *Penicillium* и *Micromonospora*, *Actinomyces*, *Nocardia*;
- 5) изучить изменения химического состава биологических жидкостей при грибковых инфекциях и оценить диагностическое значение уровня метаболитов в крови и спинно-мозговой жидкости детей для экспресс-диагностики инвазивных микозов;
- 6) разработать методические рекомендации по экспресс-диагностике инвазивной грибковой инфекции.

Научная новизна работы.

Определен количественный состав моносахаров и жирных кислот биомассы грибов родов *Candida*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Micromonospora*, *Actinomyces*, *Nocardia*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Cryptococcus*, *Penicillium* и показана возможность родовой идентификации по составу жирных кислот

клеточной биомассы грибов. Осуществлена видовая идентификация грибов рода *Candida* по совместному жирнокислотному и моносахаридному составу с применением компьютерной обработки данных.

Изучен качественный состав метаболитов грибов родов *Candida*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Cryptococcus*, *Penicillium* и *Micromonospora*, *Actinomyces*, *Nocardia* выявлен спектр их диагностически значимых метаболитов. Показана возможность диагностики инвазивной грибковой инфекции на ранних стадиях заболевания.

Практическая значимость.

Разработан и внедрен в практику адаптированный к условиям клинической лаборатории метод видовой идентификации чистых культур грибов рода *Candida*. Разработаны и внедрены в практическое здравоохранение методы экспресс-диагностики инвазивных грибковых инфекций на ранних этапах заболевания, а также газохроматографический мониторинг противогрибковой терапии, что позволило улучшить диагностику и лечение данной патологии.

Внедрение в практику.

На базе Детской городской клинической больницы №13 им.Н.Ф.Филатова создана хроматографическая лаборатория, где все разработанные в диссертации методы адаптированы на клиническом материале и с 1994г. используются в ежедневной практической работе. Клиническое внедрение осуществлено в отделениях неонатологии, хирургии, реанимации и интенсивной терапии Детской городской клинической больницы №13 им.Н.Ф.Филатова, на кафедре детской хирургии Российского

государственного медицинского университета, в клинических отделениях НИИ Детской гематологии РФ и в детских городских больницах г.Москвы. Изданы методические рекомендации, утвержденные Минздравом РФ "Диагностика грибковой инфекции методом газожидкостной хроматографии"№96/131 (1997).

Апробация работы.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на 8 международных симпозиумах и конференциях, а именно:

- 6-й Международный конгресс по инфекционным болезням, Прага, 1994.
 - 7-й Европейский конгресс по клинической микробиологии и инфекционным болезням, Вена, 1995.
 - 3-е Совещание европейского химиотерапевтического общества по инфекционным заболеваниям, Париж, 1995г.
 - Международный микологический симпозиум "Патогенез, диагностика и терапия микозов и микогенной аллергии", С.-Петербург, 1996г.;
 - Международная конференция "Человек и лекарство", Москва, 1996г.;
 - 4-е Совещание европейского химиотерапевтического общества по инфекционным заболеваниям, Афины, 1996г.;
 - 5-е Совещание европейского химиотерапевтического общества по инфекционным заболеваниям С.-Петербург, 1997г.:
 - 20 Международный конгресс по химиотерапии и инфекционным болезням, Сидней, Австралия, 1997г.;
- а также на научно-клинических конференциях РГМУ академической группы академика АМН РФ профессора Ю.Ф.Исакова и Детской городской клинической больницы №13 им.Н.Ф.Филатова.

Публикации.

По материалам диссертации опубликованы 14 работ, в том числе 5 статей в центральных журналах.

Объем и структура диссертации.

Диссертация написана на русском языке, на 159 страницах машинописи, состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, методических рекомендаций, приложений и указателя литературы. Библиография включает 185 источников, в том числе 23 работы отечественных авторов и 162 работы зарубежных авторов. Диссертация иллюстрирована 28 таблицами и 9 рисунками.

Содержание работы.

В работе проанализирован жирнокислотный и углеводный состав клинически значимых штаммов грибов и выявлена роль полученных данных для идентификации и классификации грибов. Представлены результаты исследования химического состава клеток восьми видов грибов рода *Candida*: *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.krusei*, *C.kefyr*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata*, *C.famata* и *C.guilliermondii*, и жирнокислотного состава микроорганизмов родов *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Sporotrichum*, *Cryptococcus*, *Penicillium*, *Alternaria* и *Micromonospora*, *Streptomyces*, *Nocardia*, проведен сравнительный анализ с грибами рода *Candida*.

На основании полученных жирнокислотных спектров 6 видов грибов *Candida* организован локальный банк данных, содержащий их жирнокислотные профили и проведена видовая идентификация грибов *Candida* (*C.albicans* - 40 штаммов, *C.tropicalis* - 23 штамма, *C.kefyr* - 14 штаммов,

C.parapsilosis - 16 штаммов, *C.glabrata* - 12 штаммов, *C.krusei* - 20 штаммов) по составу жирных кислот с использованием персонального компьютера.

Для обработки данных использована модифицированная в ВНИИП программа для идентификации микроорганизмов по профилю жирных кислот. Специфичность идентификации повышена путем введения в базу данных дополнительных компонентов клетки. Мы использовали для этого клеточные моносахара грибов *Candida*.

Помимо клеточных компонентов для идентификации микроорганизмов использовали продукты их жизнедеятельности. Для этого изучен состав контрольной и культуральной сред после роста микроорганизмов родов *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Sporotrichum*, *Cryptococcus*, *Penicillium*, *Oidiodendrum*, *Alternaria*, *Mucor* и *Micromonospora*, *Streptomyces*, *Nocardia*. Мы исследовали спектр таких метаболитов, как свободные сахара, спирты, летучие и нелетучие кислоты и выявили вещества, специфичные для этих родов или видов, а также выяснили значимость некоторых из них для идентификации.

Определение специфических метаболитов клинически значимых грибов чрезвычайно важно для экспресс-диагностики инвазивных микозов. Мы применили газохроматографический метод, основанный на принципе постоянства и специфичности спектра метаболитов грибов рода *Candida* и *Aspergillus* для диагностики инвазивного кандидоза и аспергиллеза.

В работе использовались музейные штаммы микроорганизмов, полученных из Всероссийской коллекции патогенных грибов г.С.-Петербурга, Всесоюзной коллекции микроорганизмов г.Пушино. Клинические штаммы, выделенные от больных, были идентифицированы с применением методов

классической микробиологии в бактериологической лаборатории ДЦЛД г.Москвы (совместно с зав.лаб. Курчавовым В.А. и бактериологом Рогатиной Е.Л.).

В работе исследовались биологические жидкости: кровь, ликвор, моча. Весь материал доставлялся в лабораторию не позднее 2-х часов с момента забора.

Посев крови и ликвора производился на жидкую среду Сабуро в соотношении 1:10. Патологический материал, содержащий нормальную микрофлору, разводился методом серийных разведений в жидкой среде Сабуро и высевался в количестве 0,1мл на аналогичную плотную среду. При отсутствии роста посеvy инкубировались до 10 суток, с периодическими высевами на плотные питательные среды. При наличии роста осуществлялся клинический учет колоний в патологическом материале. После выделения и количественного учета культур грибов их идентифицировали. Культивирование грибковых культур осуществляли на чашках Петри с агаровой средой Сабуро в 2-х температурных режимах: при 28° и 37°С до 2-х недель. Для идентификации грибковых культур использовали чистые первичные 48-часовые культуры или вторичные 24-часовые культуры.

Анализ метиловых эфиров высших кислот выполняли на газовом хроматографе фирмы "Hewlett-Packard" (США), используя кварцевую капиллярную колонку длиной 12м и внутренним диаметром 0,25мм с метилсиликоновой неподвижной фазой. Температуру колонки изменяли в режиме программирования от 100°С до 250°С со скоростью 5°С/мин. Идентификацию компонентов выполняли с использованием хроматографических стандартов фирмы "Sigma".

Анализ моносахаридного состава биомассы проводили на газовом хроматографе "CE-4200" ("Carlo Erba", Италия) на кварцевой капиллярной колонке длиной 25м и внутренним диаметром 0,2 мм с метилсиликоновой неподвижной фазой. Температура колонки изменялась от 100°С до 260°С со скоростью 4°С/мин.

Анализ углеводов выполняли на газовом хроматографе "CE-4200" (Италия) и газовом хроматографе GC-17A "Shimadzu" (Япония).

Температура детектора ионизации в пламени (ПИД) 260°C, испарителя - 250°C. Исследования проводили на кварцевой капиллярной колонке длиной 12 м, внутренним диаметром 0.25мм с метилсиликоновой неподвижной фазой. Температуру колонки изменяли в режиме программирования от 100° до 260°C со скоростью 5°C/мин.

Анализ спиртов и летучих кислот выполняли на газовом хроматографе 5880А фирмы Hewlett-Packard (США). Температура ПИД - 260°C, температура испарителя 250°C. Использовали стеклянную колонку, заполненную сорбентом 10% АТ-1000+1% фосфорной кислоты на Chromosorb W-AW 100-120 меш. Температуру термостата колонок изменяли от 80 до 225°C со скоростью 5°C/мин.

Анализ метиловых эфиров нелетучих кислот проводили на отечественном газовом хроматографе "Цвет-500". Температура ПИД - 260°C, температура испарителя - 250°C. Использовали стеклянную колонку длиной 1.6 м, внутренним диаметром 2 мм, заполненную сорбентом 10% АТ-1000 на Chromosorb W-AW 100-120 меш. Температуру термостата колонок изменяли в режиме программирования от 90° до 220°C со скоростью 5°C/мин.

Статистическая обработка результатов исследований проводилась на IBM-совместимом компьютере с использованием пакета статистических программ STATISTICA for Windows (Version 4.3).

Результаты исследования и их обсуждение.

В результате исследования **профилей клеточных жирных кислот** вышеперечисленных грибов в составе клеток обнаружены высшие жирные кислоты, представленные в таблице 1 с их номенклатурными и тривиальными названиями.

Таблица 1. Наименования жирных кислот, встречающихся в грибах.

Типы жирных кислот	Краткая формула	Систематическое название	Тривиальное название
Насыщенные	10:0	Декановая	Дециловая
	11:0	Ундекановая	Ундециловая
	12:0	Додекановая	Лауриновая
	13:0	Тридекановая	Тридециловая
	14:0	Тетрадекановая	Миристиновая
	15:0	Пентадекановая	Пентадециловая
	16:0	Гексадекановая	Пальмитиновая
	17:0	Гептадекановая	Маргаритиновая
	18:0	Октадекановая	Стеариновая
	19:0	Нонадекановая	Нонадециловая
	20:0	Ейкозановая	Арахидиновая
	22:0	Докозановая	Докозановая
	24:0	Тетракозановая	Лигноцериновая
Ненасыщенные	14:1 Δ 9	9,10-Тетрадеценивая	Миристоолеиновая
	16:1 Δ 9	9,10-Гексадеценивая	Пальмитоолеиновая
	16:1 Δ 11	11,12-Гексадеценивая	11,12-Гексадеценивая
	17:1	9,10-Гептадеценивая	9,10-Гептадеценивая
	18:1 Δ 9	9,10-Октадеценивая	Олеиновая
	18:1 Δ 11	11,12-Октадеценивая	Цис-вакценовая
Полиненасыщенные	18:2	9,10-Октадекановая	Линолевая
	18:3		Линоленовая
	20:4	5,8,11,14-Эйкозатетраеновая	Арахидиновая
Разветвленная цепь	i14:0	12-метилтридекановая	Изомиристиновая
	i15:0	13-метилтетрадекановая	Изопентадекановая
	a15:0	12-метилтетрадекановая	Антеизопентадекановая
	i16:0	14-метилпентадекановая	Изопальмитиновая
	i17:0		Изогептадекановая
	a17:0		Антеизогептадекановая
	10-CH ₃ -18:0	10-метилоктадекановая	Туберкулостеариновая
	Br-19:1	11-Метилоктадека-12-еновая	
Оксикислоты	2h12:0	2-Оксидодекановая	2-Оксилауриновая
	2h14:0	2-Окситетрадекановая	2-Оксимиристиновая
	2h16:0	2-Оксигексадекановая	2-Оксипальмитиновая
	2h24:0	2-Окситетракозановая	"
	2h25:0	2-Оксипентакозановая	
	2h26:0	2-Оксигексакозановая	

*Примечания: 10-26 - число углеродных атомов в цепи;

(:) - двойная связь;

h - оксикислоты;

i - изоокислот Δ - положение функциональной группы.

Сравнивая составы клеточных жирных кислот грибов разных родов были выявлены существенные различия в их качественном и количественном составе, показана их индивидуальность на уровне рода. Основное отличие липидного профиля грибов рода *Candida* состоит в высоком содержании кислот с 17-ю углеродными атомами, особенно гептадеценовой кислоты, не встречающейся у других изученных нами грибов. Характерным для грибов рода *Mucor* оказалось содержание длинноцепочечных жирных кислот, таких как C20:1, C22:0, C24:0. Эйкозеновая кислота (C20:1), найденная в штаммах грибов *Mucor*, характерна только для данного рода и служит его отличительным признаком. Ведущей кислотой у грибов *Streptomyces albus*, как и у *Micromonospora monospora* является изогексадекановая кислота iC16:0. Характерным компонентом обладают грибы *Nocardia asteroides*, в составе биомассы которых обнаружена туберкулостеариновая (10CH3C18:0) и 11,12-гексадеценовая (C16:1¹¹) кислоты (Таблица 2).

Таблица 2. Перечень химических маркеров грибов.

№	Вид микроорганизма	Маркер
1	Все дрожжеподобные грибы и дрожжи	Линолевая, линоленовая кислоты
2	<i>Candida albicans</i> , <i>C.tropicalis</i> , <i>C.krusei</i> , <i>C.guilliermondii</i> , <i>C.parapsilopsis</i>	Гептадеценовая кислота
3	<i>Streptomyces albus</i> , <i>Micromonospora monospora</i>	Изогексадекановая, антеизогептадекановая
4	<i>Nocardia asteroides</i>	Туберкулостеариновая, 11,12-гексадеценовая
5	<i>Mucor</i>	Эйкозеновая кислота

Анализ **липидных компонентов** грибной клетки позволяет сделать заключение о родовой принадлежности изучаемого штамма. Тем самым показана информативность и специфичность липидных профилей грибов на уровне рода. В результате нашей работы был обнаружен ряд специфических маркеров клеточной мембраны грибов, принадлежащих к разным родам, по которым они могут быть узнаны в чистой культуре.

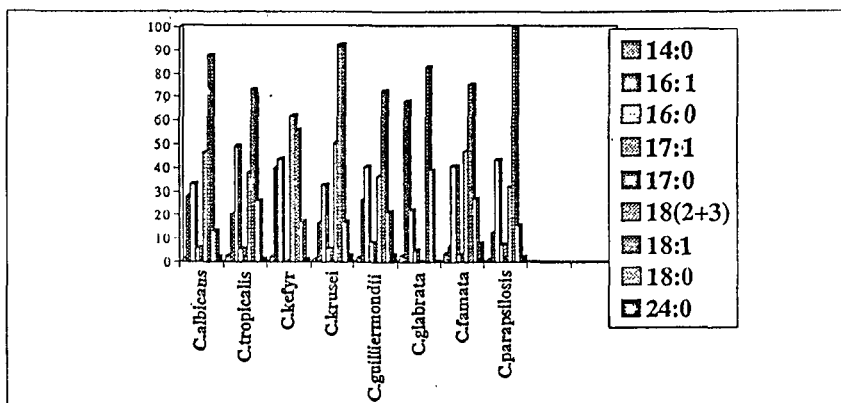
Определен качественный состав и процентное соотношение **моносахаров** клеточной биомассы 55 штаммов 6 видов грибов рода *Candida* и 44 штаммов грибов родов *Aspergillus*, *Mucor*, *Micromonospora*, *Actinomyces*, *Nocardia*, *Fusarium*, *Cryptococcus*, *Penicillium*, *Sporotrichum*, *Alternaria*. Показано, что только грибы рода *Candida* и *Sporotrichum* содержат в своем составе сахарный спирт арабинитол, который ранее по литературным данным (Bernard, 1981; Wong, 1982) был представлен только как продукт жизнедеятельности грибов *Candida albicans*. Для вышеперечисленных родов отличительным признаком является также более низкое содержание маннозы и фруктозы, в то время как у грибов *C. albicans* уровень маннозы и фруктозы достаточно высок. Маннитол в низких концентрациях может обнаруживаться у *C. albicans*, но всегда отсутствует у *Nocardia*. Высокое содержание маннитола характерно для представителей родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Micromonospora*.

Анализ **клеточных моносахаров** грибов, относящихся к различным родам показал, что их состав является специфичным для многих из изученных микроорганизмов.

На основании полученных жирнокислотных спектров 6 видов грибов рода *Candida* была создана компьютерная база данных для видовой идентификации с использованием персонального компьютера. Для обработки данных использовали

разработанную ранее программу для идентификации микроорганизмов по профилю жирных кислот (Помазанов, 1988). Жирнокислотный профиль гриба вводили в компьютер в виде двумерного массива: кодовый номер вещества и его концентрация в клетках микроорганизма (Рисунок 1.). Для этого каждому веществу присваивался кодовый номер (отложено по оси абсцисс). Концентрация вещества (отложена по оси ординат) соответствует величине отрезка прямой над каждым номером оси абсцисс. Пространственно этот код можно представить в виде ключа, у которого расположение бородок представляет набор компонентов, а длина каждой бородки соответствует содержанию компонента в микроорганизме. Нетрудно видеть, что можно изготовить огромное число «ключей», каждый из которых будет соответствовать только одному своему «замку» - микроорганизму.

Рисунок 1. Профили жирных кислот грибов рода *Candida*.



Специфичность идентификации может быть повышена путем введения в базу данных дополнительных компонентов клетки. Мы использовали для этого клеточные моносахара грибов *Candida*. На основании полученных результатов созданы две

альтернативных частных библиотеки: одна из них формировалась только из жирнокислотного состава клеток, другая - из клеточных жирных кислот и моносахаров. Введение в компьютер данных по моносахарам проводилось аналогично описаному выше: кодовый номер вещества и его процентное содержание в клеточной биомассе. Сравнивая данные, приведенные в таблицах 2. и 3. ясно видно, что при использовании только жирнокислотного состава для дифференцирования изолятов грибов *C.albicans* правильные результаты были получены в 87% случаев, при использовании жирнокислотного состава совместно с моносахаридным составом число правильных результатов увеличилось до 95%. Для штаммов, относящихся к другим видам, при дифференцировании по составу жирных кислот правильные результаты получены в 35% - *C.tropicalis*, в 43% - *C.kefyr*, в 50% - *C.krusei*, в 67% - *C.glabrata*, в 19% - *C.parapsilosis*. Добавление моносахаров к жирным кислотам привело к возрастанию точности идентификации в два и более раз для этих видов: 74% - *C.tropicalis*, 86% - *C.kefyr*, 90% - *C.krusei*, 92% - *C.glabrata*, 50% - *C.parapsilosis*. Кроме того, использование в банке данных моносахаров вместе с жирными кислотами привело к снижению межвидового коэффициента корреляции.

Иногда штаммовые различия превышают межвидовые и штамм оказывается как бы не на своем месте. Некоторые штаммы *C.albicans* ближе по своему химическому составу к *C.kefyr* и *C.krusei*. Эти штаммы коррелируют с *C.kefyr* с $XCORR=0,949$ и с *C.krusei* с $XCORR=0,870$, в то время как со штаммами своего вида $XCORR=0,798$ и $XCORR=0,807$ соответственно. Некоторые штаммы *C.krusei* похожи на *C.albicans* с коэффициентом корреляции $XCORR=0,822$ (с *C.krusei*

XCORR=0,591) и *C.tropicalis* XCORR=0,784 (с *C.krusei* XCORR=0,555), а от *C.tropicalis* родственный мостик можно перебросить к *C.parapsilosis*: четыре штамма *C.tropicalis* были идентифицированы как *C.parapsilosis* и шесть штаммов *C.parapsilosis* - как *C.tropicalis* (Таблицы 2. и 3.) и так далее. Хотя каждый вид в целом сохраняет свои признаки и распознается как образ, четкой границы между ними не существует.

Таблица 3. Результаты идентификации грибов рода *Candida* с помощью компьютерной обработки данных по составу клеточных жирных кислот.

Название вида	Кол-во штаммов	Правильно определено	%	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida kefyр</i>	<i>Candida Parapsilosis</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida glabrata</i>	Не определено
<i>Candida albicans</i>	n=40	35	87	35	2	0	1	1	0	0
<i>Candida tropicalis</i>	n=23	8	35	1	8	6	7	0	0	0
<i>Candida kefyр</i>	n=14	6	43	2	6	6	0	0	0	0
<i>Candida parapsilosis</i>	n=16	3	19	4	7	1	3	0	0	0
<i>Candida krusei</i>	n=20	10	50	9	0	0	1	10	0	0
<i>Candida glabrata</i>	n=12	8	67	0	0	0	0	0	8	4

Таблица 4. Результаты идентификации грибов рода *Candida* с помощью компьютерной обработки данных по совместному составу клеточных жирных кислот и моносахаров.

Название вида	Кол-во штаммов	Правильно определено	%	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida kefyр</i>	<i>Candida Parapsilosis</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>Candida albicans</i>	n=40	36	90	36	0	2	0	2	0
<i>Candida tropicalis</i>	n=23	17	74	1	17	1	4	0	0
<i>Candida kefyр</i>	n=14	12	86	1	1	12	0	0	0
<i>Candida parapsilosis</i>	n=16	8	50	1	6	0	8	1	0
<i>Candida krusei</i>	n=20	18	90	1	1	0	0	18	0
<i>Candida glabrata</i>	n=12	11	92	0	0	1	0	0	11

На основании компьютерного сопоставления профилей жирных кислот и других химических компонентов клетки мы пришли к заключению о существовании непрерывности в изменении их состава при переходе от одного вида к другому, что отмечалось ранее в работах Осипова Г.А. (1996): "Разница между видами по липидному составу достаточна для дифференциации, но на уровне штамма частные изменения в липидном профиле приводят к размытию этих границ и образованию континуума - непрерывного количественного изменения химических параметров клетки, которые переходят в определенный момент в качественные - меняется вид".

Приведенные данные показывают, что грибы рода *Candida* можно дифференцировать на уровне вида, используя их углеводородный и жирнокислотный состав. Хотя ни в одном из случаев не удастся выделить компоненты, специфичные только для одного вида грибов, тем не менее по совокупности признаков состав жирных кислот и моносахаров представляет собой образ, характеризующий конкретный вид.

По сравнению с традиционными методами бактериологического исследования хемодифференциация с помощью ГХ позволяет существенно сэкономить время исследования за счет исключения стадии повторных пересевов первичных колоний и тестовых ферментаций. Положительный результат хемодифференциации видов *Candida* по жирнокислотному и углеводному составу ставит вопрос о расширении исследований грибов других родов с привлечением данных ГХ анализа стерина, оксикислот, а также продуктов метаболизма этих микроорганизмов.

Проведено исследование спектра **метаболитов** некоторых грибов и определен целый ряд информативных компонентов для хемотаксономии этих грибов. Из состава

свободных сахаров культуральной среды после роста грибов *Candida* такими веществами являются глицерин, арабинитол и манноза. Для грибов родов *Aspergillus*, *Fusarium* и *Cryptococcus* информативным компонентом является маннитол (Таблица 5.).

Из летучих компонентов для идентификации грибов *Candida* информативными представляются этиловый и изамиловый спирт и изокапроновая кислота. Из нелетучих компонентов, перспективных для использования в идентификации интерес вызывают фумаровая, янтарная, шавелевоуксусная, пировиноградная кислоты. Продуцирование в среду роста этанола, изоамилового спирта, а также нелетучих кислот, схожих по спектру с *Candida*, характерно для грибов рода *Sporotrichum*.

Таблица 5. Средние значения предполагаемых информативных компонентов для различных грибов (в относительных процентах).

Название Род вещества	Глицерин	Арабинитол	Манноза	Маннитол	Миоинозитол
Контроль	0,1	0	0,1	0,1	0,1
<i>Candida albicans</i>	13,7	2,4	2,8	0,8	0,1
<i>Aspergillus</i>	0,1	0	0,5	4,8	0,1
<i>Fusarium</i>	0,5	0,1	0,1	2,6	0,1
<i>Cryptococcus</i>	0,1	0	0,5	2,0	0,1
<i>Sporotrichum</i>	43,4	2,5	0,7	0,1	0,6
<i>Penicillium</i>	1,0	0	0,6	1,5	0,1
<i>Oidiodendrum</i>	1,0	0,1	0,4	0,7	0,1
<i>Geotrichum</i>	14,4	0,1	0,5	0,8	0,2
<i>Alternaria</i>	0,1	0	0,3	1,2	0,2
<i>Mucor</i>	0,1	0	0,4	0,7	0,3
<i>Micromonospora</i>	0,1	0	0,1	0,3	0,1
<i>Streptomyces</i>	0	0	0,8	0,3	0,1
<i>Nocardia</i>	1,1	0	0,1	0,1	0,1

Определение специфических метаболитов клинически значимых грибов чрезвычайно важно для **экспресс-диагностики инвазивных микозов**. Мы применили газохроматографический метод, основанный на принципе постоянства и специфичности спектра метаболитов грибов рода *Candida* для диагностики **инвазивного кандидоза**.

Определены **фоновые концентрации** арабинитола и маннозы **метаболитов грибов** рода *Candida* в сыворотке крови и ликворе (отобранных в ходе других диагностических и лечебных мероприятий) контрольной группы детей без каких-либо признаков грибковой инфекции.

Нормальная концентрация арабинитола в сыворотке составила $0,51 \pm 0,28$ мкг/мл. Нормальная концентрация маннозы составила $17,7 \pm 10,4$ мкг/мл. Обнаружено, что нормальная концентрация арабинитола и маннозы в ликворе намного выше, чем в крови. Уровень арабинитола в ликворе в контрольной группе был $7,2 \pm 3,1$ мкг/мл. Уровень маннозы в ликворе детей контрольной группы был $35,1 \pm 17,4$ мкг/мл. У всех детей с различными формами инвазивного кандидоза на фоне онкогематологичеких заболеваний, обследованных методом ГХ, до начала противогрибковой терапии уровень арабинитола в крови был достоверно ($p < 0,001$) выше нормы и составлял $1,87 \pm 0,24$ мкг/мл, маннозы - до $106,4 \pm 21,8$ мкг/мл ($p < 0,001$) (таблица 6). В процессе противогрибковой терапии (амфотерицином В, анкотилом или флюконазолом) уровень метаболитов существенно снижался (таблица 6.), а после завершения курса терапии был сопоставим с нормальными показателями.

Таблица 6. Средние показатели арабинитола и маннозы в сыворотке крови у детей с инвазивным кандидозом (на фоне онкогематологических заболеваний) до и после противогрибковой терапии.

Группы пациентов	Материал	Арабинитол (мкг/мл) M±S	Манноза (мкг/мл) M±S	Достоверность
Контроль n=43	Сыворотка крови	0,51±0,28	17,7±10,4	
Дети с инвазивным кандидозом (n=32)	Сыворотка крови до лечения	1,87±0,24	106,4±21,8	$P_A=0,000002$ $P_M=0,000671$
	Сыворотка крови после лечения	0,43±0,23	34,0±19,5	$P_A=0,0002$ $P_M=0,0144$

Примечания. М - среднее значение компонента;
S - среднее статистическое отклонение.

При ГХ-исследовании спинномозговой жидкости детей с диагнозом грибкового менингита установлено, что арабинитол в ликворе достоверно ($p=0,012$) превышал норму и составил $35,7\pm 12,5$ мкг/мл. В среднем уровень маннозы составил $91,4\pm 21,0$ мкг/мл (Табл.7).

В результате адекватной терапии уровень метаболитов существенно снижался и практически достигал нормальных показателей, что совпадало с положительной клинической динамикой. Таким образом, метод газовой хроматографии можно использовать для мониторинга эффективности противогрибковой терапии путем анализа изменений уровней грибковых метаболитов в сыворотке крови или ликворе.

Обследование группы детей с неинвазивным кандидозом, или без клинических признаков кандидоза (кандидоносительство), показало незначительное возрастание уровней метаболитов по сравнению с их уровнями при инвазивной инфекции. Таким образом, оценка уровней арабинитола и маннозы может служить дифференциально-

диагностическим критерием в комплексе с другими клинико-диагностическими мероприятиями.

Таблица 7. Средние концентрации арабинитола и маннозы в ликворе у детей с грибковым менингитом и носителей грибов *Candida*.

Группы пациентов	Материал	Арабинитол (мкг/мл) M±S	Манноза (мкг/мл) M±S	Достоверность
Контроль n=40	Спино мозговая жидкость	7,2±3,1	35,1±17,4	
Дети с грибковым менингитом n=14	Спино мозговая жидкость	35,7±12,5	91,4±21,0	$P_A=0,0058$ $P_K=0,029$
Дети без инв. кандидоза с обсемененными слизистыми n=11	Спино мозговая жидкость	10,8±1,2	39,0±20,5	

Примечания. M - среднее значение компонента;
S - среднее статистическое отклонение.

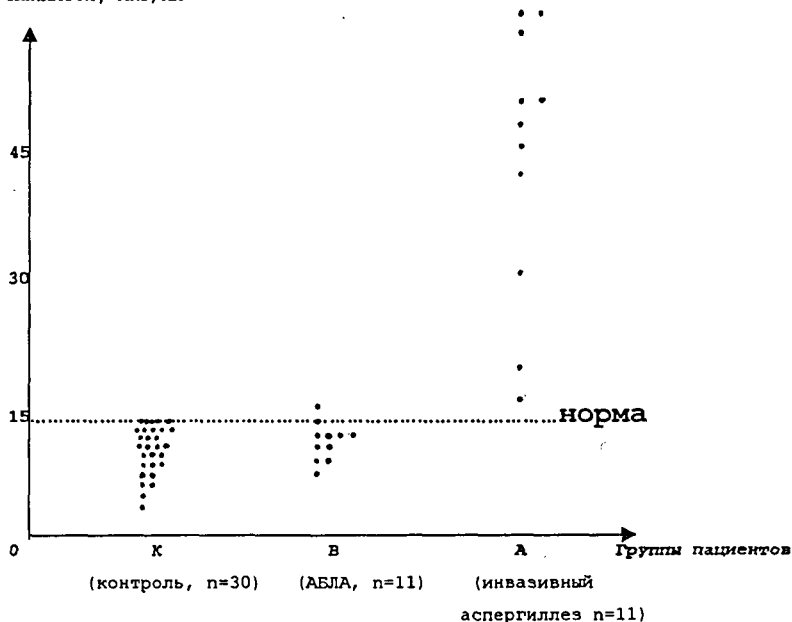
В опытах *in vitro* мы обнаружили, что грибы рода *Aspergillus* продуцируют значительное количество маннитола, шестиатомного сахарного спирта. В связи с этим выдвинуто предположение о возможности использования этого показателя с целью **диагностики инвазивного аспергиллеза**. При ретроспективном анализе уровней маннитола в крови больных детей из онкогематологического отделения с достоверно подтвержденным диагнозом инвазивного аспергиллеза, (гистологические данные и/или аутопсия), выявлено, что у 9 из 11 таких больных были обнаружены высокие концентрации маннитола (группа А). Уровень маннитола в сыворотке крови детей контрольной группы составил 10-15 мкг/мл (Группа К). Показано, что нормальные фоновые концентрации маннитола в

ликворе выше, чем в крови, и составляет 20-30 мкг/мл (Рисунок 2.).

Обследованы 11 пациентов (группа В), с неинвазивным аспергиллезом (аллергический бронхо-легочный аспергиллез (АБЛА) и бронхиальная астма). Концентрации маннитола в сыворотке крови у пациентов этой группы составили от 6 до 20 мкг/мл, то есть нормальные и лишь у двоих пациентов слабо повышенные.

Рисунок 2. Уровень маннитола в сыворотке крови здоровых и больных людей.

Маннитол, мкг/мл



Сравнивая уровень содержания маннитола в сыворотке крови здоровых людей и у пациентов с инвазивным аспергиллезом, мы пришли к выводу, что у больных грибы *Aspergillus* продуцируют в ткани достаточное количество маннитола, чтобы поднять его уровень в крови до высоких

значений (от 30 до 80 мкг/мл). Таким образом, полученные предварительные данные указывают на перспективность определения маннитола - метаболита грибов рода *Aspergillus* с целью экспресс-диагностики инвазивного аспергиллеза.

На основании полученных данных изданы методические рекомендации "**Диагностика грибковой инфекции у детей методом газожидкостной хроматографии**" (1997), утвержденные Минздравом РФ и рекомендуемые к внедрению в крупных диагностических центрах по всей территории России для лабораторной диагностики кандидоза и мониторинга эффективности противогрибковой терапии.

Выводы

1. Установлены различия в химическом составе биомассы клеток клинически значимых грибов родов *Candida*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Micromonospora*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Cryptococcus*, *Penicillium*, *Torulopsis* с использованием метода газовой хроматографии. Определены вещества - маркеры, специфичные для отдельных родов грибов:
 - для грибов *Candida* - гептадеценвая кислота,
 - для грибов рода *Mucor* - эйкозеновая кислота,
 - для *Nocardia asteroides* - туберкулостеариновая кислота,
 - для *Streptomyces albus* - изогексадекановая и антоизогептадекановая кислоты.
2. Родовая идентификация грибов возможна по жирнокислотному составу биомассы. Видовая идентификация 125 штаммов грибов рода *Candida*: *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.krusei*, *C.kefyr*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata* осуществляется при

совместном анализе их жирнокислотных и углеводных составов с использованием компьютерной обработки данных.

3. Определены специфические продукты метаболизма грибов родов *Candida*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Micromonospora*, *Actinomyces*, *Nocardia*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Cryptococcus*, *Penicillium*, *Torulopsis* и показана возможность использования этих метаболитов для идентификации, например:

- для *Candida* информативными компонентами являются глицерин, арабинитол, манноза, этиловый, изиамиловый спирты, изокапроновая кислота;
- для *Aspergillus*, *Fusarium* и *Cryptococcus* - маннитол.

4. Разработана газохроматографическая экспресс-диагностика инвазивного кандидоза по уровням арабинитола и маннозы - специфическим метаболитам-маркерам грибов *Candida* в биологических жидкостях человека (крови и ликворе). Установлены фоновые концентрации (норма) вышеназванных маркеров в крови и ликворе детей без клинико-лабораторных признаков грибковой инфекции.

Норма в сыворотке крови:

- арабинитол - $0,51 \pm 0,28$ мкг/мл,
- манноза - $17,7 \pm 10,4$ мкг/мл.

Норма в ликворе:

- арабинитол - $7,2 \pm 3,1$ мкг/мл,
- манноза - $35,1 \pm 17,4$ мкг/мл.

5. Показано, что уровни метаболитов в сыворотке крови и ликворе пациентов с инвазивным кандидозом достоверно

превышают норму. Совокупность изменений в содержании этих метаболитов является достоверным объективным диагностическим критерием, и рекомендуется для контроля эффективности проводимой антифунгальной терапии.

6. Доказана возможность использования маннитола - метаболита грибов *Aspergillus* - для диагностики инвазивного аспергиллеза. Определены фоновые концентрации маннитола в сыворотке крови и ликворе контрольной группы детей без признаков грибковой инфекции:

- Норма маннитола в сыворотке - от 10 до 15 мкг/мл;
- Норма маннитола в ликворе не превышает 30 мкг/мл.

7. Уровень маннитола в сыворотке крови пациентов с инвазивным аспергиллезом значительно превышает норму, достигая 30-80 мкг/мл.

Практические рекомендации по созданию лаборатории газовой хроматографии.

1. Лаборатория должна иметь необходимый набор помещений:

- для приема клинического материала и пробоподготовки;
- для газохроматографического анализа и обработки результатов.

2. Необходимый набор оборудования:

- Хроматограф газовый, серия GC-14 А фирмы "Shimadzu" или газовый хроматограф с аналогичными техническими характеристиками. Хроматограф снабжен пламенно-ионизационным детектором, блоком программирования температуры термостата от 60°C до 450°C, испарителем с

температурой нагрева 60...450 °С, кварцевой капиллярной колонкой с метилсиликоновой неподвижной фазой 25м x 0,25мм.

- Весы лабораторные;
- Центрифуга лабораторная медицинская;
- Испаритель ротационный;
- Насос водоструйный лабораторный стеклянный;
- Термоблок /до 100 °С/ для пробирок "Drybath" модель 17615 /США/ или баня водяная лабораторная одноместная;
- Термометр ртутный стеклянный;
- Эксикатор вакуумный;
- Пипетки, микрошприц "Газохром-101", стеклянные пробирки объемом до 5 мл с завинчивающимися крышками, снабженными тефлонированными резиновыми прокладками/"Altech", США/, пикнометр.

3. При ГХ анализе с целью таксономии целесообразно размещение лаборатории в непосредственной близости с лабораторией бактериологии для соблюдения санитарно-эпидемиологических требований по хранению культур. Клинические ГХ исследования биологических жидкостей с целью определения метаболитов (арабинитол, манноза, маннитол) не требуют условий бактериологической лаборатории.

4. При внедрении методики рекомендуется руководствоваться Методическими рекомендациями "Диагностика грибковой инфекции у детей методом газожидкостной хроматографии" (1997), утвержденные Минздравом РФ.

Автор готов оказать содействие и практическую помощь на этапе внедрения

Список опубликованных работ по теме диссертации.

1. Идентификация грибов по клеточным моносахарам методом газожидкостной хроматографии, Поздоровкина В.В., Демина А.М., Рогатина Е.Л., Радюшина Т.В., Минаев В.А., Белобородова Н.В., Курчавов В.А., Антибиотики и химиотерапия, 1994, т.39, с.17-21.
2. Анализ высших жирных кислот грибов рода *Candida* методом газовой хроматографии, Поздоровкина В.В., Демина А.М., Белобородова Н.В., Курчавов В.А., Рогатина Е.Л., Минаев В.А., Антибиотики и химиотерапия, 1994, т.39, с.13-17.
3. Determination of volatile fatty acids - metabolites anaerobes in the urine with the purpose of diagnostic of appendicitis in paediatrics, Pozdorovkina V.V., Beloborodova N.V., Kucherov U.I., In: 6-th International Congress for Infectious Diseases, Prague, 1994, p.117.
4. Госпитальная инфекция и стратегия антибиотикотерапии в детской хирургической клинике, Поздоровкина В.В., Белобородова Н.В., В сб. тез. 8-го Всероссийского Съезда хирургов, 1995, Краснодар, с.437-438.
5. Determination of anaerobic bacteria involved in perinatal pneumonia in neonates with prolonged artificial ventilation by GC-method, Pozdorovkina V.V., Beloborodova N.V., Koroleva O.V., In: 7 European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Abstracts, Vienna, 1995, p.238.
6. Возможность использования газовой хроматографии для экспресс-диагностики осложнений у детей с нейтропенией, Поздоровкина В.В., Белобородова Н.В., Курчавов В.А., Рогатина Е.Л., В сб. тез. 3 Международного микологического симпозиума, 1996, С.-Петербург, с.2.
7. Газо-хроматографическое определение этиологической роли анаэробов в развитии пневмонии у новорожденных высокого риска, находящихся на искусственной вентиляции легких, Поздоровкина В.В., Белобородова Н.В., Королева О.В., Российский вестник перинатологии и педиатрии, 1995, т.40, с.24-28.