УДК 615.012.6:616—097:616.594.171.2

М. В. Рибалкін, Н. І.Філімонова, Н. Ю. Шевельова, Д. В. Гаман

Національний фармацевтичний університет

БІОТЕХНОЛОГІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ АКТУАЛЬНОСТІ РОЗРОБКИ НОВОГО ІМУНОДІАГНОСТИЧНОГО ПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ БІОМАСИ ГРИБІВ CANDIDA ALBICANS

Внутрішньошкірні проби є важливою складовою частиною комплексу лабораторної діагностики, необхідної для виявлення кандидозної інфекції, оцінки ефективності лікування та вивчення клітинного імунітету. Обґрунтовано технологічний режим культивування для одержання біомаси гриба Candida albicans, на основі якої шляхом поєднання фізико-хімічних методів екстракції планується розробка алергену для імунодіагностики кандидамікозів.

Ключові слова: алерген; кандидамікоз; діагностика; культивування; Candida albicans; поживне середовище; біомаса

ВСТУП

Гриби роду Candida викликають специфічну сенсибілізацію організму різної інтенсивності. Найбільш сильними алергенами є живі клітини грибів. Потрапивши до організму, гриб продуктами своєї життєдіяльності змінює стан чутливості, реактивності організму [2] та виявляється різними алергічними реакціями, особливо широко розповсюдженими шкірними пробами, з яких найбільш поширена внутрішньошкірна проба [15].

Внутрішньошкірні проби є важливою складовою частиною комплексу лабораторної діагностики, необхідної для виявлення кандидозної інфекції, оцінки ефективності лікування та вивчення клітинного імунітету. Успіх використання внутрішньошкірних проб у більшому ступені залежить від хімічного складу та властивостей алергенів, а також від правильної інтерпретації результатів цих досліджень у кожному конкретному випадку. Діагностичне значення внутрішньошкірних проб при кандидозах має оцінюватися у загальному комплексі клінічних, мікологічних та серологічних досліджень [7,14].

Однак сьогодні в Україні не випускається жодних алергодіагностичних тестів для виявлення пацієнтів з прихованою формою кандидамікозу, які потребують протигрибкової терапії. Необхідно зазначити, що неінфекційні алергени (пилкові, побутові, харчові, епідермальні) достатньо відомі, виробляються в Україні та мають широкий попит. Що ж стосується мікробних та грибкових алергенів, які випускали у період існування СРСР, то їх виробництво було припинено з різних причин з моменту розпаду СРСР, а ціна імпортних алергенів дуже висока для вітчизняного ринку. Реальним способом вирішити цю задачу є організація вітчизняного виробництва грибкових алергенів, як це було зроблено в Україні по відношенню до неінфекційних алергенів. Пошук специфічно активних речовин, вивчення алергізуючої дії алергенів, обрання діючих, допоміжних речовин і технології виробництва — ось головні напрямки у розробці та розширенні номенклатури вітчизняних алергенів для імунодіагностичного дослідження кандидозної інфекції [12].

За даними наукової вітчизняної та зарубіжної літератури виділяють декілька способів одержання алергенів грибів роду *Candida*. Перші технології створення імунодіагностичних препаратів кандидамікозу передбачали використання цілих клітин гриба, причому в основному молодих, так як старі культури були менш специфічними [4,5]. При цьому використовували три типи суспензій: живі клітини (однодобові або

© *М. В. Рибалкін, Н. І.Філімонова, Н. Ю. Шевельова, Д. В. Гаман, 2010*

дводобові); клітини, вбиті нагріванням (частіше протягом 10 хв при 100 °С або 30 хв при 80 °С), та клітини, які були інактивованні 0,2% формаліном. Дещо пізніше алергенні препарати з грибів *Candida* почали одержували гідролізом біомаси гриба або за допомогою ультразвуку. В якості екстрагентів використовували трихлороцтову кислоту, сечовину, яку розбавляли лугом, формамід, трипсин, фенол, β-нафтол, гліцерин, воду, буферні розчини та інше [1]. Деякі автори використовували осадження спиртом, виділяли з цих екстрактів препарати з переважним вмістом полісахаридів, так як вважали, що детермінантою алергену гриба є полісахарид. Вивчення будови клітинної стінки *Candida* та виділення з неї полісахаридів показало, що останні в якості структурної одиниці в основному містять манозу з невеликими домішками глюкози [4,21]. У подальшому були одержані алергенні препарати, які складалися з манану, манан-протеїнових комплексів з поверхні цілої клітини, клітинної стінки та культурального середовища, суспензії живих та вбитих клітин, екстракту, який було одержано при ультразвуковому руйнуванні клітин. Базуючись на одержаних результатах, учені прийшли до висновку, що мананoвий компонент клітин гриба є найважливішим при тестуванні алергії до *Candida* [15,19].

Деякі дослідники використовували для діагностики кандидамікозів загальний екстракт зруйнованих дріжджових клітин *C. albicans*. [1,5]. Багатокомпонентність такого складу забезпечувала їх ефективність, однак у той же час збільшувала вірогідність похибки, пов'язаної з баластними речовинами.

Цитоплазматичні препарати, одержані з вмісту цитоплазми *C. albicans* після відділення клітинних стінок, використовувалися багатьма дослідниками для імунодіагностики кандидозу, причому цитоплазматичні препарати були одержані як з дріжджової, так і з міцеліальної фази гриба. В деяких працях проведено порівняння діагностичної цінності цитоплазматичних препаратів з мананoвими, виділеними з клітинних стінок цих же грибів на користь останніх [1,4,15].

Іншим напрямком досліджень по розробці діагностичних препаратів є виділення ферментів гриба *Candida*. Існує гіпотеза, відповідно до якої факторами агресії та інвазії умовно-патогенних грибів роду *C. albicans* є ферменти. Багато дослідників виділяли і детально вивчали субстратну специфічність неклітинних та внутрішньоклітинних протеїназ різних штамів *C. albicans*. Було виявлено, що різниця кислих протеїназ, які декретуються більшістю штамів Candida, відображає ступінь вірулентності видів для людини. Протеїнази грибів роду *Candida* по їх впливу на субстрати та відношення до інгібіторів є штамоспецифічними, хоча структурні відмінності між ензимами невеликі. Антитіла до протеїназ володіли здатністю реагувати з протеїназами різних штамів, але одного і того ж виду [4,7,15,23].

Ще один напрямок досліджень — використання інших видів грибів роду *Candida* в якості джерела одержання імунологічних препаратів. Загальновизнано, що частіше за все збудником кандидамікозу є *C. albicans*. Однак кандидозні інфекції можуть бути визнані і деякими іншими видами грибів роду *Candida*, а саме *C. krusei, C. parapsiosis, C. tropicalis ma C. guilliermondii*. Перехресна реактивність антигенів різних видів Candida створює додаткові труднощі при виборі джерела отримання алергенів. Одні автори пропонують одержувати алергени з суміші грибів, інші — тільки з *C. albicans,* треті — з аутоштамів [1,4,7,20,22].

Таким чином, узагальнюючи наукові дані вітчизняної та зарубіжної літератури, увесь різновид імунологічних препаратів для алергодіагностики можна об'єднати у чотири категорії: препарати, які містять повні корпускулярні антигени, препарати з окремих фракцій грибів, препарати, у яких основною діючою основою є продукти метаболізму грибів, та препарати, які включають до свого складу як матеріали клітини гриба, так і продукти метаболізму.

Отже, аналіз даних літератури показав, що дослідження по розробці імунологічних препаратів для алергодіагностики кандидамікозу проводяться давно та інтенсивно. Але, недивлячись на це, наукові дослідження по створенню та вдосконаленню алергенів грибів *Candida* у вітчизняній практиці майже не проводяться, при тому що алергени є важливою складовою частиною комплексної діагностики кандидозної інфекції. Тому розробка складу та технології алергена грибів Candida є актуальним. На кафедрі мікробіології, імунології та вірусології Національного фармацевтичного університету проводиться науково-дослідна робота по розробці алергену для імунодіагностики кандидамікозів шляхом поєднання фізико-хімічних методів екстракції.

При виборі оптимального температурного режиму культивування грибів роду *Candida* необхідно зазначити, що сприятлива температура для їх росту знаходиться в діапазоні 27—37 °С. Дріжджові гриби є аеробами, без кисню їх розвиток різко зупиняється та припиняється. Вирощувати гриби роду *Candida* можна як на рідких поживних середовищах, так і на твердих, однак при культивуванні на рідких пожив-

них середовищах одержана біомаса містить багато супутніх речовин (компоненти середовища, додаткові поживні інгредієнти, продукти метаболізму), що в подальшому впливає на ступінь чистоти імунологічного препарату, який одержують з цієї біомаси.

При виготовленні грибкових алергенів велике значення має вибір поживного середовища, яке б забезпечувало максимальне накопичення біомаси гриба, на основі якої планується розробити алерген для імунодіагностики кандидамікозів.

Метою даної роботи було обґрунтування технологічного режиму та поживного середовища для одержання біомаси гриба *Candida albicans*.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Об'єктом досліджень були культури умовно-патогенного гриба роду *Candida albicans* штаму ССМ 885—653 та поживні середовища: агар Сабуро, Кандида-агар, сусло-агар та агар Чапека.

Агар Сабуро з глюкозою. Склад середовища: мікологічний пептон — 10,00 г/л, глюкоза — 40,00 г/л, агар-агар — 15,00 г/л, pH при температурі 25°С становить 5,6±0,2. Мікологічний пептон слугує джерелом необхідних поживних речовин для росту. Глюкоза є джерелом енергії. Низьке значення pH сприяє росту грибів та пригнічує ріст бактерій, які контамінують культуру гриба. Агар Сабуро рекомендується для селективного культивування дріжджових і пліснявих грибів, а також для культивування кислотолюбивих бактерій. Культивування референт-штамів грибів роду *Candida* триває 24—48 годин при температурі 28—30°С. Спосіб приготування: розмішати 65,0 г порошку в 1000 мл дистильованої води; підігріти до кипіння для повного розчинення частинок; стерилізувати автоклавуванням при 1,1 атм (121°С) протягом 15 хв; зберігати при температурі від 10°С до 30°С. Утворюється середовище, яке відповідає за густиною 1,5% агаровому гелю. Виробник даного агару ТОВ «Євролабс». Агар Сабуро з глюкозою є модифікацією пропису, яку запропонував Sabouraud для культивування грибів. Агар Сабуро з глюкозою рекомендується американською фармакопеєю для тесту на присутність мікроорганізмів. Для виділення грибів з матеріалу, контамінованого грибами або бактеріями, у це середовище часто додають антибіотики, наприклад, хлорамфенікол.

Агар з вісмутом для грибів Candida. Склад середовища: мікологічний пептон — 2,50 г/л, глюкоза — 5,00 г/л, калію гідрофосфат — 5,00 г/л, натрію сульфат — 5,00 г/л, вісмуту сульфат — 3,00 г/л, агар-агар — 15,00 г/л.; pH при температурі 25°С складає 7,6±0,2. Мікологічний пептон дає необхідні азотисті речовини для живлення грибів, глюкоза слугує джерелом атомів вуглецю, фосфат придає буферні властивості середовищу. Присутній у середовищі сульфіт натрію відновлюється грибами Кандида до сульфіду. У поєднанні з вісмутом сульфід забарвлює колонії деяких видів грибів у чорний колір, а навколо них формуються зони темного преципітату. Сульфіт вісмуту діє і як інгібітор росту супутніх бактерій флори. Селективність середовища збільшується з введенням пеніциліну та стрептоміцину, які пригнічують ріст багатьох бактерій. Культивування референт-штамів грибів роду *Candida* триває 24—48 год при температурі 28—30°С. Спосіб приготування: розчинити 35,5 г порошку у 1000 мл дистильованої води. Прокип'ятити для повного розчинення частинок. Стерилізувати автоклавуванням при 1,1 атм (121°С) протягом 15 хв. Утворюється середовище, яке відповідає за густиною 1,5% агаровому гелю. Виробник даного агару — ТОВ «Євролабс». Агар *Candida* використовують для селективного культивування та диференціації видів грибів Candida. Першим цей агар запропонував Nickerson. Її використовують для висівання нативного матеріалу, у тому числі уражень тканин, шкірних елементів, нігтів та волосся. Диференціацію грибів роду Кандида ведуть за характером росту та пігментації ізольованих колоній.

Сусло-агар. Склад середовища: пивне сусло — 1 л, агар-агар — 20 г. Солодове сусло одержують на пивоваренних заводах. Воно містить 10—15% цукру та має густину 16—18° за Білінгом. Пивне сусло слугує джерелом необхідних поживних речовин для росту дріжджових і пліснявих грибів. Культивування референт-штамів грибів Candida триває протягом 24—48 год при температурі 28—30°С. Для приготування сусло-агару беруть 1 л пивного сусла, яке фільтрують, розбавляють у 2 рази водою та стерилізують при 121°С (1,1 атм) протягом 30 хв. Потім на суслі готують агар. Утворюється середовище, яке відповідає за густиною 1,5% агарового гелю. Виробник даного агару — ЗАТ «НІЦФ».

Агар Чапека. Склад середовища: глюкоза — 20 г/л, $NaNO_3$—3 г/л, KH_2PO_4—1 г/л, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,5 г/л, KCl — 0,5 г/л, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,015 г/л, агар-агар — 15 грам/л. Сахароза слугує джерелом енергії та необхідних поживних речовин для росту дріжджових і пліснявих грибів, фосфат придає буферні властивості середовищу. Культивування референт-штамів грибів *Candida* триває протягом 24—48 год при температурі 28—30°С. Для приготування агару

Чапека беруть 1 л розчину солей, додають 15 г агар-агару та кип'ятять до повного його розчинення, фільтрують та стерилізують при 121 °С (1,1 атм) протягом 30 хв. Після стерилізації ємність з агаром перемішують до застигання. Утворюється середовище, яке відповідає за густиною 1,5% агрового гелю. Виробник даного агару — ЗАТ «НІЦФ».

Оскільки деякі патогенні гриби можуть утворювати спори, які легко переносяться повітряними потоками, для профілактики лабораторних заражень дослідження проводили у ламінарному боксі.

Щоб визначити, яке середовище є найперспективнішим для одержання біомаси грибів, визначали мікробне навантаження у змивах при порівнянні зі стандартним показником каламутності. Дослідні агари розплавляли на водяній бані та заливали по 2,5 мл кожного агару в окремі стерильні пробірки, які вкладали під кутом для збільшення площі висіву культури грибів. Пробірки з агарами витримували у термостаті при температурі 35—37 °С протягом 48 год для перевірки агарів на чистоту. Далі культури гриба *Candida albicans* висівали у пробірки з дослідними агарами, використовуючи одну петлю, яку перед кожним висівом прожарювали в полум'ї горілки, та робили приблизно однаковий висів культури грибів у кожну пробірку з агарами. Пробірки з висівами культивували у термостаті при температурі 28—30 °С протягом 48 год та перевіряли культури на чистоту методом мікроскопування. Одержані культури грибів змивали 5 мл ізотонічного 0,9% розчину натрію хлориду, інтенсивно збовтуючи пробірки до повного переходу клітин гриба з поверхні агарів до розчину. В одержаних змивах визначали мікробне навантаження при порівнянні зі стандартним показником каламутності на 10 ОД, який вважається найдостовірнішим.

Для розведення 5 мл змиву з кожного агару відбирали від загального об'єму змиву 0,1 мл та додавали 0,9 мл ізотонічного 0,9 % розчину натрію хлориду. Одержаний розчин порівнювали зі стандартним показником каламутності на 10 ОД. Якщо розчин за каламутністю переважав стандартний показник каламутності на 10 ОД, то послідовно додавали по 1 мл ізотонічного 0,9 % розчину натрію хлориду та порівнювали одержані розчини зі стандартним показником каламутності на 10 ОД. У разі необхідності від розведеного розчину клітин гриба відбирали 0,1 мл, послідовно розводили ізотонічним 0,9 % розчином натрію хлориду та порівнювали одержані розчини зі стандартним показником каламутності на 10 ОД, доки розчин клітин гриба не буде відповідати за каламутністю стандартному показнику каламутності на 10 ОД. Необхідно зауважити, що розмір клітин гриба *Candida albicans*, переважає розмір бактеріальних клітин приблизно в 10 разів, тому це необхідно урахувати при підрахунку кількості клітин гриба в 1 мл змиву з кожного агару за стандартним показником каламутності на 10 ОД (1 мільярд бактеріальних клітин в 1 мл).

Для визначення кількості клітин у одержаних змивах їх розводили та підраховували клітини у камері Горяєва. Підраховували кількість клітин гриба у 5 великих (80 маленьких) квадратах та підставляли одержане число у формулу:

$$x = a \cdot 4000 \cdot б/в,$$

де: x — кількість клітин гриба Candida albicans у 1 мм^3;

а — кількість клітин гриба у певному об'ємі камери;

б — кількість підрахованих квадратів;

в — розведення змиву.

Для визначення кількості клітин гриба в одержаних змивах їх розводили та висівали у об'ємі 0,1 мл на чашки Петрі з досліджуваними агарами з подальшим підрахунком кількості колоній. Для цього до розплавлених агарів по 19,9 мл при температурі 40—50 °С додавали по 0,1 мл розведеного змиву з відповідного агару. Ретельно перемішували та виливали в чашку Петрі, яку витримували у термостаті протягом 48 год при температурі 28—30 °С. Одержані культури перевіряли на чистоту мікроскопуванням та підраховували кількість колоній, яка відповідала кількості клітин гриба у 0,1 мл розведеного змиву. Одержану кількість клітин перемножили на розведеня та вираховували кількість клітин гриба у змиві з відповідного агару.

Для визначення біомаси гриба *Candida albicans*, яку можна одержати при культивуванні цих грибів на досліджуваних агарах, їх розплавляли на водяній бані та по 150 мл заливали у матраци. Матраци з агарами витримували у термостаті при температурі 35—37 °С протягом 48 год та перевіряли агари на чистоту. Далі одержували змиви культури дріжджового гриба *Candida albicans* з кожного досліджуваного агару, як це було описано вище, використовуючи по 5 мл ізотонічного 0,9 % розчину натрію хлориду. Далі проводили культивування у термостаті при температурі 28—30 °С протягом 12 діб. Кожні 6 діб культури в усіх матрацах перевіряли на чистоту шляхом мікроскопування. Одержані культури змивали у кожному випадку 50 мл ізотонічного розчину натрію хлориду, інтенсивно збовтуючи матраци до повного переходу клітин гриба з поверхні агарів до розчину. Одержаний

розчин стерилізували в автоклаві при температурі 121 °С (2 атм) протягом години. Клітини гриба відділяли від ізотонічного розчину натрію хлориду центрифугуванням протягом 30 хв при 5000 об/хв. Осад висушували у термостаті при температурі 40—50 °С та зважували.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Одержані змиви гриба Candida albicans з усіх досліджуваних агарів значно переважали за каламутністю стандартний показник каламутності на 10 одиниць. Тому було проведене послідовне розведення одержаних змивів до каламутності, яка відповідала стандартному показнику каламутності на 10 одиниць.

Урахувавши усі розведення для кожного змиву, визначали мікробне навантаження в одержаних змивах з кожного агару, які наведені в табл. 1.

Згідно з одержаними результатами найбільша кількість клітин була у змивах з агару Сабуро та Кандида-агару.

Результати підрахунку кількості клітин гриба *Candida albicans* у камері Горяєва у 0,1 мм^3, враховуючи розведення для кожного змиву з досліджуваних агарів, наведені у табл. 2.

Одержані результати свідчать про найбільшу кількість клітин гриба *Candida albicans* у змивах з агарів Сабуро та Кандида-агару.

Результати підрахунку кількості колоній гриба, враховуючи розведення для кожного змиву, при висіві на чашки з досліджуваними агарами дозволили вирахувати кількість клітин гриба Candida albicans у 1 мл для кожного змиву, які наведені у табл. 3.

Одержані результати свідчать про найбільшу кількість клітин у змиві з агару Сабуро та Кандида-агару.

Результати визначення біомаси грибів *Candida albicans*, які можна одержати при їх культивуванні на агарі Сабуро, Кандида-агарі, сусло-агарі та агарі Чапека, наведені у табл. 4.

Найбільша біомаса гриба *Candida albicans* була одержана при використанні Кандида-агару та агару Сабуро.

З одержаних даних видно, що Кандида-агар та агар Сабуро забезпечують найбільше одержання біомаси гриба, тому для остаточного вибору

Таблиця 1

КІЛЬКІСТЬ КЛІТИН ГРИБА *CANDIDA ALBICANS* У 1 мл ЗМИВІВ З ДОСЛІДНИХ АГАРІВ

Поживне середовище	Кількість клітин гриба у 1 мл змиву, шт.
Агар Сабуро	$6 \cdot 10^{10}$-$6 \cdot 10^{11}$
Кандида-агар	$7 \cdot 10^{10}$-$7 \cdot 10^{11}$
Сусло-агар	$5 \cdot 10^{10}$-$5 \cdot 10^{11}$
Агар Чапека	$4 \cdot 10^{10}$-$4 \cdot 10^{11}$

Таблиця 2

КІЛЬКІСТЬ КЛІТИН ГРИБА *CANDIDA ALBICANS* У 0,1 мл ЗМИВІВ З ДОСЛІДНИХ АГАРІВ

Поживне середовище	Кількість клітин у 0,1 мм3 змиву, шт.
Агар Сабуро	$(300\text{-}400) \cdot 10^5$
Кандида-агар	$(350\text{-}450)\ 10^5$
Сусло-агар	$(250\text{-}350)\ 10^5$
Агар Чапека	$(250\text{-}350)\ 10^5$

Таблиця 3

КІЛЬКІСТЬ КЛІТИН ГРИБА *CANDIDA ALBICANS* У 1 мл У ЗМИВАХ З ДОСЛІДНИХ АГАРІВ

Поживне середовище	Кількість клітин у 1 мл змиву, шт
Агар Сабуро	$(24\text{-}44) \cdot 10^{10}$
Кандида-агар	$(27\text{-}51) \cdot 10^{10}$
Сусло-агар	$(19\text{-}37) \cdot 10^{10}$
Агар Чапека	$(19\text{-}35) \cdot 10^{10}$

Таблиця 4

БІОМАСИ ГРИБІВ *CANDIDA ALBICANS*, ОДЕРЖАНІ ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ НА ДОСЛІДНИХ АГАРАХ

Поживне середовище	Біомаса, г
Агар Сабуро	1,5345±0,1452
Кандида-агар	1,6814±0,1531
Сусло-агар	1,4863±0,1432
Агар Чапека	1,3358±0,1413

поживного середовища була врахована вартість агарів. Агар Сабуро коштує 397 грн за 0,5 кг, а Кандида-агар — 985 грн за 0,5 кг, хоча вихід біомаси гриба Candida albicans при їх культивуванні на Кандида-агарі лише частково переважає вихід біомаси гриба *Candida albicans* при їх культивуванні на агарі Сабуро. Тому було обрано для культивування біомаси грибів агар Сабуро.

ВИСНОВКИ

Таким чином, порівняльна характеристика режимів культивування біомаси гриба *Candida albicans* при використанні наступних методів свідчить, що:

1) при порівнянні змивів з досліджуваних агарів за оптичним стандартом каламутності встановлено, що найбільша кількість клітин спостерігалась у змивах з агару Сабуро та Кандида-агару;
2) при підрахунку кількості клітин у змивах з досліджуваних агарів у камері Горяєва встановлено, що найбільша кількість клітин у змивах з агару Сабуро та Кандида-агару;
3) при підрахунку кількості клітин у змивах з досліджуваних агарів при їх висіві на поживне середовище та за підрахунком колоній встановлено, що найбільша кількість клітин була у змивах з агару Сабуро та Кандида-агару;
4) порівняльний економічний аналіз вартості агару Сабуро та Кандида-агару показав перевагу використання агару Сабуро;
5) при урахуванні всіх фізико-хімічних, біологічних та економічних аспектів встановлено, що агар Сабуро є оптимальним середовищем для накопичення біомаси гриба *Candida albicans*, в основі якої планується розробити імунологічний препарат для алергодіагностики кандидозної інфекції, актуальний на сьогодні в Україні, СНГ та інших державах.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Беклемишев Н. Д. Аллергия к микробам в клинике и эксперименте / Н. Д. Беклемишев, Г. С. Суходоева — М.: Медицина, 1979. — 262 с.
2. Елинов Н. П. Особенности иммунитета при грибковых инфекциях. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Под ред. Л. Б. Борисова, А. М. Смирновой. — М.: Медицина, 1994. — С. 219–220, 441–446.
3. Зуева Е. В. Антигенно-активные компоненты *Candida albicans* для выявления повышенной чувствительности немедленного типа: автореф. дис... канд. биол. наук. — Л., 1990. — 18 с.
4. Караев З. О. Антигенные препараты для иммунодиагностики кандидоза / З. О. Караев, Г. А. Бабенко, С. М. Игнатьев, Г. И. Соловьева. — 1990. — С. 104-110.
5. Кашкин П. Н. Антигены для серологических реакций и аллергических проб при грибковых заболеваниях: [метод. письмо] / [П. Н. Кашкин, Н. П. Елинов, А. И. Дроздов]. — Л., 1959. — 28 с.
6. Молчанов Г. И. Фармацевтические технологии — современные электрофизические биотехнологии в фармации: [учеб. пособие] / Г. И. Молчанов, А. А. Молчанов, Ю. А. Морозов. — М.: Альфа-М — ИНФРА-М, 2009. — 336 с.
7. Новые диагностические и лечебные аллергены / [В. М. Бержец, Е. А. Коренева, О. В. Радикова, С. В. Хлгатян и др.] // Аллергол. и иммунол. — 2007. — Т. 8, № 1. — С. 56-56.
8. Оценка погрешности расчета материального баланса аэробного процесса культивирования дрожжей Candida lambica / [Р. Т. Елчуев, С. Г. Мухачев, Р. И. Валеев, Р. Т. Валеева] // Вестник Казанского технол. ун-та. — 2006. — № 4. — С. 189-202.

9. Пат. 791379 СССР, МКИ[3] А 61 К 39/35 Способ получения бактериальных аллергенов / [А. Н. Маянский, И. Е. Алатырцева, Б. А. Молотилов, И. В. Молчанова и др.] — № 2660855/28—13. Заявл.: 15.08.78. Опубл.: 31.12.80. — Бюл. № 48.
10. Пат. 2245721 Российская Федерация, МПК[7] А 61 В 39/00, С 12 Р 21/00, 19/04, С 08 В 37/00, С 07 К 2/00, С 12 N 1/16 (С 12 N 1/16, С 12 R 1:725), (С 12 Р 21/00, С 12 R 1:645), (С 12 Р 19/04, С 12 R 1:645). Антигенные препараты/Дитер Фарнов, Йоахим Карле, И. Д. Поляков, Л. Г. Иванова; заявитель и патентообладатель: БЕРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ ВЕТМЕДИКА ГмбХ. — № 98104502/15. Заявл.: 09.08.1996. Опубл.: 10.02.2005. — Бюл. № 4.
11. Перечень основных методов и критериев диагностики микозов / [Н. Н. Климко, Н. В. Васильева, Н. П. Елинов и др.]. — С.Пб.: СПб. МАПО, 2001. — 24 с.
12. Пухлик Б. М. Аллергены Украины. Состояние дел, нерешенные проблемы и перспективы / Б. М. Пухлик, В. Б. Русанова // Імунол. та алергол. — 1999. — № 3. — С. 3-9.
13. Разработка протективного антигена гриба *Candida albicans*, контроль его качества и возможность практического применения в свиноводстве [К вакцинопрофилактике кандидамикоза] // Ветеринария. Реферативный журн. — 2004. — № 2. — С. 436.
14. Сергеев Ю. В. Кандидоз. Природа инфекции, механизмы агрессии и защиты, лабораторная диагностика, клиника и лечение / Ю. В. Сергеев, А. Ю. Сергеев — М.: Медицина, 2001. — 472 с.
15. Фрадкин В. А. Диагностические и лечебные аллергены / В. А. Фрадкин. — М:. Медицина, 1990. — 256 с.
16. Царев С. В. Аллергены грибов / С. В. Царев, М. Р. Хаитов // Доктор Ру. — 2009. — № 2. — С. 57-68.
17. Antibody response to Candida albicans cell wall antigens / J. L. López-Ribot, M. Casanova, A. Murgui, J. P. Martinez // FEMS Immunol. Med. Microbiol. — 2004. — № 41. — P. 187-196.
18. Brunet J. L. Diagnosis of normal and abnormal delayed hypersensitivity to Candida albicans. Importance of evaluating lymphocyte activation by flow cytometr / J. L. Brunet, D. Peyramond, G. J. Cozon // Allergol. Immunol. (Paris). — 2001. — Vol. 33, № 3. — P. 115-119.
19. Candida albicans mannan- and protein-induced humoral, cellular and cytokine responses in atopic dermatitis patients / J. Savolainen, J. Kosonen, P. Lintu et al.//Clin. Exp. Allergy. — 1999. — Vol. 29, № 6. — P. 824-831.
20. Comparison of pathogenesis and host immune responses to Candida glabrata and Candida albicans in systemically infected immunocompetent mice / J. Brieland, D. Essing, C. Jackson et al. // Infect. Immunol. — 2001. — Vol. 69, № 8. — P. 5046-5055.
21. Cutler J. E. Defining criteria for anti-mannan antibodies to protect against candidiasis / J. E. Cutler // Curr. Mol. Med. — 2005. — № 5. — P. 383-392.
22. Decoding seroligical response to Candida cell wall immunome into novel diagnostic, prognostic, and therapeutic candidates for systemic candidiasis by proteomic and bioinformatic analyses / A. Pitarch, A. Jiménez, C. Nombela, C. Gil // Molecular & Cellular Proteomics. — 2006. — Vol. 5, № 1. — P. 79-96.
23. Diagnosis of invasive candidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay using the N-terminal fragment of Candida albicans hyphal wall protein 1 / A. Laín, N. Elguezabal, S. Brena // BMC Microbiol. — 2007. — Vol. 7. — P. 35.
24. Dreborg S. Allergen standardization and skin tests. EAACI position paper / S.Dreborg, A. Frew // Allergy. — 1993. — № 48. — P. 49-75.
25. IgE, IgA and IgG antibodies and delayed skin response towards Candida albicans antigens in atopics with and without saprophytic growth / [J. Savolainen, A. Koivikko, K. Kalimo, E. Nieminen et al.] // Clin. Exp. Allergy. — 1990. — № 20. — P. 549-54.
26. IgE-sensitization to cellular and culture filtrates of fungal extracts in patients with atopic dermatitis / D. Nissen, L. J. Petersen, R. Esch // Ann. Allergy Asthma Immunol. — 1998. — Vol.81, № 3. — P. 247-55.
27. Identification of Candida albicans antigens reactive with immunoglobulin E antibody of human sera / A. Ishiguro, M. Homma, S. Torii, K. Tanaka // Infect. Immunol. — 1992. — Vol. 60, № 4. — P. 1550-1557.
28. Immunodiagnosis of Candida-infections. I. Sensitivity of the antigens / A. Tomíková1, J. V. Zavázal, L. Masler, D. Novákova // Mycopathologia. — 2004. — Vol. 71, № 2. — P. 103-111.
29. Lehrbuch der pharmazeutischen Technologie: mit einer Einführung in die Biopharmazie/Kurth. Bauer. — 7. Aufl. — Stuttgart: Wiss. Verl. — Ges., 2002. — 496 S.
30. Tomŝíková A. Antigenic activity of the cell components of Candida albicans/A. Tomŝíková,

D. Ŝikl Dana Nováĉková//Mycoses. — 2009. — Vol. 19, Issue 6. — P. 175-182.

31. Usefulness of the recombinant protein Hyr1 of Candida albicans for serodiagnosis of invasive candidiasis/A. Laín, M. Santos, J. R. Iruretagoyena. In: Proceedings of the Spanish Society for Infectious Diseases and Clinical Microbiology y (SEIMC '05). — Zaragoza, Spain, 2005.
32. Use of Recombinant Antigens for the Diagnosis of Invasive Candidiasis/[Ana Laín, Natalia Elguezabal, Elena Amutio, Iñigo Fernández de Larrinoa et al.]//Clinical and Developmental Immunol. — 2008. — Vol. 2008. — Article ID 721950. — P. 7.
33. Value of candida antigen and antibody assays for the diagnosis of invasive candidiasis in surgical intensive care patients/[Philipp M. Lepper, Heidemarie Wiedeck, Gotz Geldner, Andreas Essig et al.]//Intensive Care Medicine. — 2001. — Vol. 27, № 5. — P. 916-920.

УДК 615.012.6:616—097:616.594.171.2

Н. В. Рыбалкин, Н. И. Филимонова, Н. Е. Шевелева, Д. В. Гаман

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ АКТУАЛЬНОСТИ РАЗРАБОТКИ НОВОГО ИММУНОДИАГНОСТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ БИОМАССЫ ГРИБОВ CANDIDA ALBICANS

Внутрикожные пробы являются важной составляющей частью комплекса лабораторной диагностики, необходимой для выявления кандидозной инфекции, оценки эффективности лечения и изучения клеточного иммунитета. Обоснован технологический режим для получения биомассы гриба Candida albicans, на основе которой путем сочетания физико-химических методов экстракции планируется разработка аллергена для иммунодиагностики кандидомикозов.

Ключевые слова: аллерген; кандидамикоз; диагностика; культивирование; питательная среда; Candida albicans; биомасса

UDC 615.012.6:616—097:616.594.171.2

M. V. Rybalkin, N. I. Filimonova, N.Yu. Shevelyova, D. V. Gaman

BIOTECHNOLOGICAL GROUND OF ACTUALITY OF DEVELOPMENT NEW IMMUNODIAGNOSTIC OF PREPARATION ON THE BASIS OF BIOMASS OF FUNGUS CANDIDA ALBICANS

Intracutaneous tests are the important component of complex of laboratory diagnostics, necessary for the exposure of candida infection, estimation of efficiency of treatment and study of cellular immunity. In the article the technological mode is grounded for the recept of biomass of mushroom of Candida albicans, on the basis of which, by combination of physical and chemical methods of extraction, development an allergen is planned for the immunodiagnosis of candidamicoses.

Key words: allergen; candidamicoses; diagnosis; cultivation; nutrient medium; Candida albicans; biomass

Адреса для листування:
61002, м. Харків, вул. Мельникова, 12.
Кафедра мікробіології, вірусології
та імунології НФаУ
Тел. (099) 794-13-43
e-mail: ribalkin.nikolay@mail.ru

Надійшла до редакції:
17.12.2010