

ISSN 2304-9081

Учредители:  
Уральское отделение РАН  
Оренбургский научный центр УрО РАН

**Бюллетень**  
**Оренбургского научного центра**  
**УрО РАН**



**2015 \* № 4**

**Электронный журнал**  
On-line версия журнала на сайте  
<http://www.elmag.uran.ru>

© Коллектив авторов, 2015

УДК 579.62

Т.М. Пашкова<sup>1</sup>, Л.П. Попова<sup>1</sup>, О.Л. Карташова<sup>1,2</sup>, А.С. Акжигитов<sup>2</sup>

### **ФАКТОРЫ ПЕРСИСТЕНЦИИ ГРИБОВ РОДА MALASSEZIA, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ЗДОРОВЫХ СОБАК И СОБАК С НАРУЖНЫМ ОТИТОМ**

<sup>1</sup> Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

<sup>2</sup> Оренбургский государственный аграрный университет, Оренбург, Россия

*Цель.* Изучение факторов персистенции грибов рода *Malassezia*, изолированных от собак с наружным отитом и здоровых животных.

*Материалы и методы.* В исследовании использовано 44 штамма грибов рода *Malassezia*, выделенных от здоровых собак и собак с наружным отитом. Идентификацию грибов осуществляли по J. Faergemann (2002). Способность микроорганизмов к образованию биопленок определяли по G. O`Toole et al. (2000); антилизозимную, антикарнозиновую, антигемоглобиновую и антицитокиновую активности микроорганизмов - по О.В. Бухарину и др. (1999, 2005, 2011).

*Результаты.* Установлена способность формировать биопленки, наличие антигемоглобиновой активности и антицитокиновой активности в отношении ИЛ-8 у грибов рода *Malassezia*, выделенных у собак с наружным отитом, а также более высокий уровень выраженности антикарнозиновой и антицитокиновой активности в отношении ИЛ-4 по сравнению со штаммами, выделенными у здоровых животных.

*Заключение.* Полученные данные могут быть использованы для дифференциации патогенных штаммов.

*Ключевые слова:* грибы рода *Malassezia*, наружный отит, факторы персистенции

---

---

Т.М. Pashkova<sup>1</sup>, L.P. Popova<sup>1</sup>, O.L. Kartashova<sup>1,2</sup>, A.S. Akzhigitov<sup>2</sup>

### **PERSISTENT FACTORS OF MALASSEZIA SPP., ISOLATED FROM HEALTHY DOGS AND DOGS WITH EXTERNAL OTITIS**

<sup>1</sup> Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, UrB RAS, Orenburg, Russia

<sup>2</sup> Orenburg State Agrarian University, Orenburg, Russia

*Objective.* The study of persistent factors of *Malassezia spp.*, isolated from dogs with external otitis and healthy animals.

*Materials and methods.* The study used 44 strains of *Malassezia spp.*, isolated from healthy dogs and dogs with external otitis. Identification of fungi was performed by J. Faergemann (2002). The ability of microorganisms to the biofilm formation was determined by G. O`Toole et al. (2000); antilysozyme, anticarnosine, antihaemoglobin and anticytokine activity of microorganisms – O.V. Bukharin et al. (1999, 2005, 2011).

*Results.* The ability to form biofilms, the presence of antihaemoglobin activity and anticytokine activity against IL-8 in *Malassezia spp.*, isolated from dogs with external otitis, and a higher level of expression of anticarnosine and anticytokine activity against IL-4 compared with strains isolated from healthy dogs, were established.

*Conclusion.* The data obtained can be used to differentiate pathogenic strains.

*Keywords:* *Malassezia spp.*, external otitis, persistent factors.

## **Введение**

Грибы рода *Malassezia* относятся к нормальной микрофлоре кожи человека и теплокровных животных, обеспечивающей колонизационную резистентность кожных покровов [1]. С другой стороны, при определенных условиях они могут явиться причиной развития патологических процессов в макроорганизме, в частности наружного отита [2]. Это объясняется наличием у грибов рода *Malassezia* комплекса факторов патогенности и персистенции [3]. Ранее было показано, что штаммы, вызывающие наружные отиты у собак, характеризуются наличием антилизоцимной активности и способности формировать биопленки [4, 5], антикарнозиновой и антигемоглобиновой активности [6]. Вместе с тем, комплекс персистентных свойств (биофиль) грибов, выделенных у здоровых животных и собак с наружным отитом, не охарактеризован.

В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение факторов персистенции грибов рода *Malassezia*, изолированных от собак с наружным отитом и здоровых животных.

## **Материалы и методы**

Материалом для исследования послужили 44 штамма грибов рода *Malassezia*, выделенных из наружного слухового прохода здоровых собак (n=20, 1 группа) и собак с наружным отитом (n=24, 2 группа). Исследуемый материал получали методом смывов с помощью тампона из наружного слухового прохода животных [7], засекали на питательные среды: среда Лиминга-Нотманна и кровяной агар. Чашки со средой Лиминга-Нотманна инкубировали при температуре 37°C в течение 48 часов, чашки с кровяным агаром – при температуре 37°C в течение 18-24 часов. Идентификацию грибов осуществляли по морфологическим и культуральным характеристикам [8].

Способность микроорганизмов образовать биопленки (ОБ) определяли по методике G. O'Toole et al. [9]. Коэффициент биопленкообразования (КБ) рассчитывали как отношение оптической плотности раствора кристаллического фиолетового, связавшегося с клетками микроорганизмов (опыт), к оптической плотности раствора в контроле. Положительными считали значения коэффициента более 1,1. Антилизоцимную активность (АЛА) микроорганизмов определяли по методике О.В. Бухарина [10], антикарнозиновую (АКрА) – по методике О.В. Бухарина с соавт. [11], антигемоглобиновую активность (АНбА) – по методике О.В. Бухарина с соавт. [12]. Антицитокиновую актив-

ность (АЦА) в отношении ИЛ-4, ИЛ-8, ИФН- $\gamma$  определяли по методике О.В. Бухарина с соавт. [13].

Статистическую обработку данных проводили с использованием параметрических методов. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента [14].

### **Результаты и обсуждение**

На первом этапе исследования проведена идентификация грибов рода *Malassezia*, выделенных у здоровых собак и собак с наружными отитами. Установлено, что у здоровых животных доминировал вид *M. pachydermatis* (75%), *M. obtusa* изолировали в 25% случаев, при этом *Malassezia spp.* в 75% случаев выделяли в монокультуре и в 25% – в ассоциации с бактериями.

У собак с наружными отитами *M. pachydermatis* выделяли в 87,5%, *M. furfur* – в 8,3% и *M. obtusa* – в 4,2% случаев, причем грибы рода *Malassezia* в монокультуре выделяли в 29,2% случаев, а в ассоциации с бактериями – в 70,8%.

На следующем этапе исследования изучены распространенность и выраженность факторов персистенции (АЛА, АКрА, ОБ, АНбА) у грибов рода *Malassezia*, выделенных от животных 1 и 2 групп.

Распространенность АЛА среди грибов, выделенных как в норме, так и при патологии, составила 100%. Способность инактивировать карнозин обнаружена у 50% изолятов грибов, выделенных у животных 1 группы, и у 29,2% изолятов, выделенных у животных 2 группы. Грибы рода *Malassezia*, формирующие биопленки и обладающие АНбА, выявляли только у больных животных в 41,7% и 29,2% случаев, соответственно.

Выраженность персистентных характеристик у грибов рода *Malassezia* из сравниваемых групп представлена на рисунке 1.

Грибы рода *Malassezia*, выделенные у животных 1 и 2 групп, по уровню экспрессии антилизоцимного признака не отличались – их показатели составили  $2,0 \pm 0,14$  мкг/мл и  $2,0 \pm 0,03$  мкг/мл, соответственно, а выраженность у них АКрА равнялась  $1,4 \pm 0,2$  и  $1,9 \pm 0,1$  мг/мл ( $p < 0,05$ ), соответственно. КБ составил  $1,2 \pm 0,02$  у.е., а среднее значение выраженности антигемоглобиновой активности было равно  $2,7 \pm 0,8$  г/л; эти показатели регистрировались только у грибов рода *Malassezia*, выделенных только от больных животных.

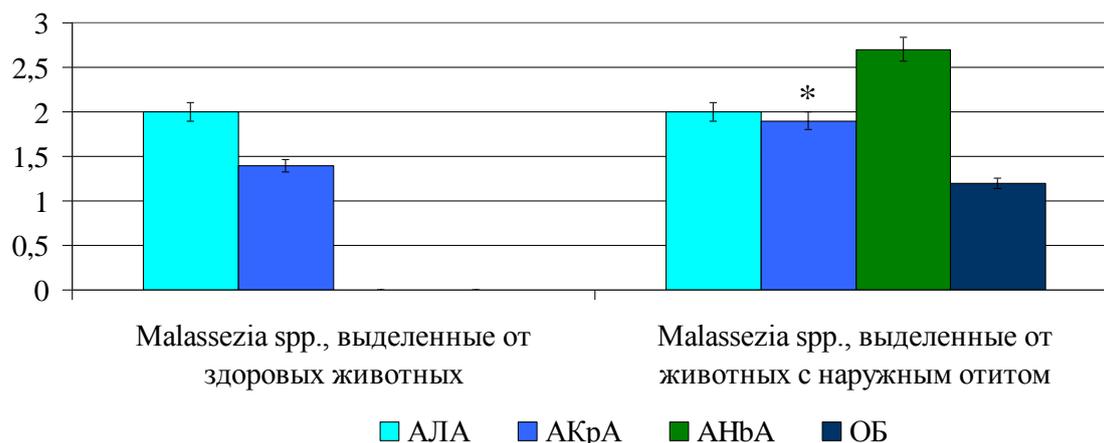


Рис. 1. Выраженность факторов персистенции *Malassezia spp.*, выделенных от здоровых собак и собак с наружным отитом.

Обозначения: \* -  $p < 0,05$ ; достоверность различий в выраженности АКрА у *Malassezia spp.*, выделенных от здоровых собак и собак с наружным отитом.

Далее была изучена антицитокиновая активность АЦА) грибов рода *Malassezia* в отношении провоспалительных (ИЛ-8 и ИФН- $\gamma$ ) и противовоспалительных (ИЛ-4) цитокинов. Способность к инактивации ИФН- $\gamma$  и ИЛ-4 регистрировалась у 100% изолятов, выделенных у животных 1 группы, и у 95,8% изолятов 2 группы, а АЦА в отношении ИЛ-8 была выявлена только у 21% штаммов грибов рода *Malassezia*, выделенных из наружного слухового прохода только больных животных 2 группы. Параметры выраженности АЦА у грибов рода *Malassezia* сравниваемых групп представлены на рисунке 2.

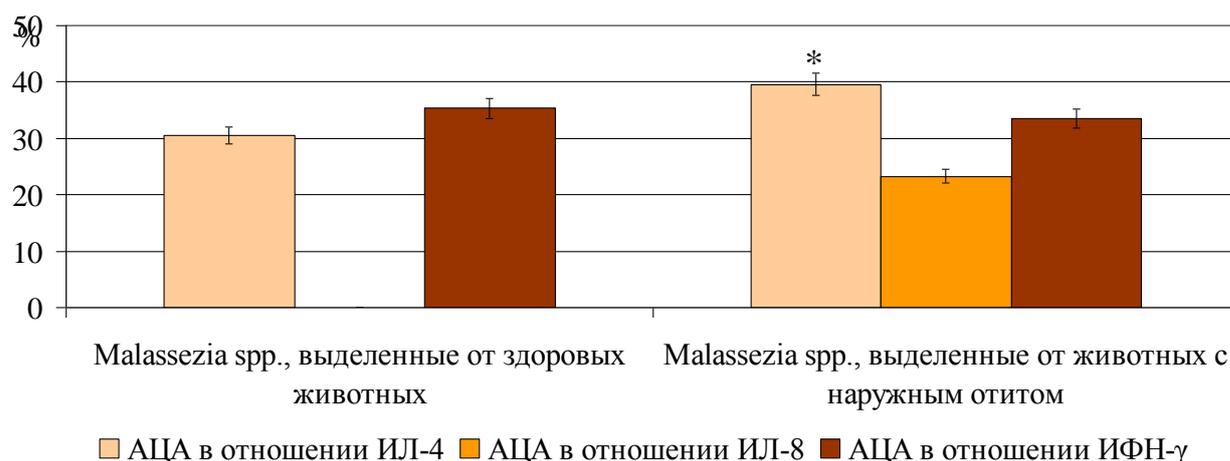


Рис. 2. Выраженность антицитокиновой активности *Malassezia spp.*, выделенных от здоровых собак и собак с наружным отитом.

Обозначения: \* -  $p < 0,05$ ; достоверность различий в выраженности АЦА в отношении ИЛ-4 у *Malassezia spp.*, выделенных от здоровых собак и собак с наружным отитом.

Среднее значение АЦА в отношении ИФН- $\gamma$  у изолятов грибов рода

*Malassezia* в 1 группе составляло  $35,3 \pm 1,9\%$ , во 2 группе –  $33,6 \pm 2,2\%$  (рис. 2). Выраженность АЦА в отношении ИЛ-4 у грибов рода *Malassezia*, выделенных из слухового прохода здоровых животных, была ниже, чем у грибов, выделенных у собак с наружными отитами:  $30,5 \pm 1,6\%$  против  $39,6 \pm 1,3\%$ , соответственно ( $p < 0,05$ ). Уровень АЦА в отношении ИЛ-8 у грибов рода *Malassezia*, выделенных из наружного слухового прохода животных 2 группы, составил  $23,3 \pm 5,8\%$ .

Таким образом, в результате проведенных исследований определены биологические свойства, по которым изученные группы штаммов рода *Malassezia* различались между собой. Так, грибы, выделенные при наружном отите у собак, обладали способностью инактивировать лизоцим, карнозин, формировать биопленки, а также антигемоглобиновая активность и антицитокиновая активность в отношении ИЛ-4, ИЛ-8, ИФН- $\gamma$ , тогда как штаммы грибов рода *Malassezia*, выделенные от здоровых собак, характеризовались наличием АЛА, АКрА, АЦА в отношении ИЛ-4 и ИФН- $\gamma$ .

Сравнение уровней экспрессии этих признаков показало, что у грибов рода *Malassezia*, выделенных из патологического материала, выраженность АКрА и АЦА в отношении ИЛ-4 в 1,3 раза выше, чем у грибов, изолированных у здоровых животных.

### **Заключение**

Известно, что эндогенные инфекции, к которым относится отит, могут вызывать лишь представители аутофлоры, обладающие определенным набором патогенных свойств (биофильем), который позволяет им состояться в качестве возбудителя. В биофильях возбудителей эндогенных инфекций приоритетное место по своей патогенетической значимости занимают персистентные свойства, обеспечивающие «иммунорезистентность» микроорганизмов и их выживание при контакте с гуморальными и клеточными эффекторами антимикробной защиты хозяина [15].

Проведенные исследования показали, что все штаммы грибов рода *Malassezia*, выделенные при патологии, обладали комплексом изученных факторов персистенции, тогда как штаммы, выделенные от здоровых животных, характеризовались лишь способностью к инактивации лизоцима и карнозина, антицитокиновой активностью в отношении ИЛ-4 и ИФН- $\gamma$ , что свидетельствует о более выраженном патогенном потенциале грибов, выделенных у собак с наружными отитами.

Полученные в настоящей работе данные о способности грибов рода *Malassezia* изменять содержание цитокинов в условиях *in vitro*, в частности, наличие АЦА в отношении ИЛ-8 и высокие значения АЦА в отношении противовоспалительного цитокина ИЛ-4 у штаммов, выделенных от больных животных, свидетельствуют о возможном влиянии экзометаболитов липолитических грибов *Malassezia* на локальный цитокиновый баланс, что может поддерживать воспалительный процесс.

Установлено, что изоляты грибов, выделенные при патологии, характеризуются более высокими значениями АКрА и АЦА в отношении ИЛ-4. Эти данные согласуются с результатами [16-19], в которых показано, что штаммы микроорганизмов, выделенные при патологии, характеризуются более высоким уровнем выраженности факторов персистенции по сравнению с изолятами, выделенными от здоровых животных.

Совокупность изученных биологических свойств (биофиль) – ОБ, АНбА, АЦА в отношении ИЛ-8, вкуче с данными о более выраженной экспрессии АКрА и АЦА в отношении ИЛ-4 у штаммов грибов *Malassezia*, выделенных от больных животных, могут быть использованы для дифференциации патогенных вариантов грибов данного семейства.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Литвинов А.М., Ивченко О.В., Касьянов А.И. Малассезиозы животных. Ветеринария. 2010. 6: 13-15.
2. Овчинников Р.С., Маноян М.Г., Ершов П.П. и др. Грибы рода *Malassezia* в заболеваниях животных. Vetpharma. 2013. 1(12): 30-38.
3. Акжигитов А.С., Капустина О.А., Пашигин Н.С. Биологические свойства *Malassezia pachydermatis*, выделенных от собак. Вестник ветеринарии. 2013. 1(64): 53-55.
4. Уткина Т.М., А.С. Акжигитов, Р.М. Нурғалиева Видовой состав и факторы персистенции микроорганизмов, выделенных от собак с отитами. Вестник ветеринарии. 2014. 2: 47-49.
5. Акжигитов А.С., Пашкова Т.М., Карташова О.Л. Антилизосимная активность микроорганизмов – возбудителей отитов у собак. Проблемы медицинской микологии. 2015. 17. (2): 35.
6. Пашкова Т.М., Акжигитов А.С., Карташова О.Л. и др. Антикарнозиновая и антигемоглобиновая активности микроорганизмов, выделенных от собак с наружными отитами. Материалы международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы ветеринарной науки». Ульяновск, 2015: 60–62.
7. Ершов П.П. Изучение клиничко-эпизоотологических особенностей *Malassezia*-инфекций собак и кошек в Московском регионе. Ветеринарная медицина. 2008. 1: 23-24.
8. Faergemann J. Atopic Dermatitis and Fungi. Clinical Microbiology Reviews. 2002. 15. (4): 545-563.
9. O'Toole G., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. Annu Rev Microbiol. 2000. 54: 49-79.
10. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. М.: Медицина, 1999. 366 с.

11. Бухарин О.В., Чернова О.Л., Матюшина С.Б. Способность стафилококков к инактивации карнозина. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1999. 5: 545-546.
12. Бухарин О.В., Усвяцов Б.Я., Ханина Е.А. Определение антигемоглобиновой активности. Патент РФ 2262705. Бюл., 2005. №29.
13. Бухарин О.В., Перунова Н.Б., Чайникова И.Н. и др. Антицитокиновая активность микроорганизмов. Журнал микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2011. 4: 56-61.
14. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз, 1962. 182 с.
15. Гриценко В.А., Иванов Ю.Б. Роль персистентных свойств микроорганизмов в патогенезе эндогенных инфекций. Журнал микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2009. 4: 66-71.
16. Сычева М.В., Карташова О.Л. Биологические свойства энтерококков различного происхождения. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2015. 4: 17-21.
17. Пошвина Д.В., Щепитова Н.Е., Сычева М.В. и др. Видовая характеристика и факторы персистенции энтерококков, выделенных в норме и при патологии. Ветеринария. 2015. 6: 26-29.
18. Сычева М.В., Пашкова Т.М., Карташова О.Л. и др. Характеристика антицитокиновой активности энтерококков. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2015. 3: 1-6 [Электронный ресурс]. (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-3/Articles/SMV-2015-3.pdf>).
19. Пашина О.А., Карташова О.Л., Пашкова Т.М. и др. Характеристика биофильей *Candida albicans*, выделенных у здоровых лиц и при патологии. Проблемы медицинской микологии. 2015. 17. (3): 46-49.

Поступила 16.11.2015

(Контактная информация: **Карташова Ольга Львовна** – д.б.н., зав. лабораторией по изучению механизмов и регуляции персистенции бактерий Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН; адрес: 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11, тел/факс (3532)774463, e-mail: [labpersist@mail.ru](mailto:labpersist@mail.ru))

---

---

## LITERATURA

1. Litvinov A.M., Ivchenko O.V., Kas'janov A.I. Malasseziozy zhivotnyh. Veterinarija. 2010. 6: 13-15.
2. Ovchinnikov R.S., Manojan M.G., Ershov P.P. i dr. Griby roda Malassezia v zabolevanijah zhivotnyh. Vetpharma. 2013. 1(12): 30-38.
3. Akzhigitov A.S., Kapustina O.A., Pashinin N.S. Biologicheskie svojstva Malassezia pachydermatis, vydelennyh ot sobak. Vestnik veterinarii. 2013. 1(64): 53-55.
4. Utkina T.M., A.S. Akzhigitov, R.M. Nurgalieva Vidovoj sostav i faktory persistencii mikroorganizmov, vydelennyh ot sobak s otitami. Vestnik veterinarii. 2014. 2: 47-49.
5. Akzhigitov A.S., Pashkova T.M., Kartashova O.L. Antilizocimnaja aktivnost' mikroorganizmov – vozбудитеlej otitov u sobak. Problemy medicinskoj mikologii. 2015. 17. (2): 35.
6. Pashkova T.M., Akzhigitov A.S., Kartashova O.L. i dr. Antikarnozinovaja i antigemoglobinovaja aktivnosti mikroorganizmov, vydelennyh ot sobak s naruzhnyimi otitami. Materialy mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii «Aktual'nye voprosy veterinarnoj nauki». Ul'janovsk, 2015: 60–62.
7. Ershov P.P. Izuchenie kliniko-jepizootologicheskikh osobennostej Malassezia-infekcij sobak i koshek v Moskovskom regione. Veterinarnaja medicina. 2008. 1: 23-24.
8. Faergemann J. Atopic Dermatitis and Fungi. Clinical Microbiology Reviews. 2002. 15. (4): 545-563.
9. O'Toole G., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. Annu Rev

- Microbiol. 2000. 54: 49-79.
10. Buharin O.V. Persistencija patogennyh bakterij. M.: Medicina, 1999. 366 s.
  11. Buharin O.V., Chernova O.L., Matjushina S.B. Sposobnost' stafilokokkov k inaktivacii karnozina. Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny. 1999. 5: 545-546.
  12. Buharin O.V., Usvjacov B.Ja., Hanina E.A. Opredelenie antigemoglobinovoj aktivnosti. Patent RF 2262705. Bjul., 2005. №29.
  13. Buharin O.V., Perunova N.B., Chajnikova I.N. i dr. Anticitokinovaja aktivnost' mikroorganizmov. Zhurnal mikrobiol., jepidemiol. i immunobiol. 2011. 4: 56-61.
  14. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovanijah. L.: Medgiz, 1962. 182 s.
  15. Gritsenko V.A., Ivanov Ju.B. Rol' persistentnyh svojstv mikroorganizmov v patogeneze jendogennyh infekcij. Zhurnal mikrobiol., jepidemiol. i immunobiol. 2009. 4: 66-71.
  16. Sycheva M.V., Kartashova O.L. Biologicheskie svojstva jenterokokkov razlichnogo proishozhdenija. Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunobiologii. 2015. 4: 17-21.
  17. Poshvina D.V., Shhepitova N.E., Sycheva M.V. i dr. Vidovaja harakteristika i faktory persistencii jenterokokkov, vydelennyh v norme i pri patologii. Veterinarija. 2015. 6: 26-29.
  18. Sycheva M.V., Pashkova T.M., Kartashova O.L. i dr. Harakteristika anticitokinovoj aktivnosti jenterokokkov. Bjulleten' Orenburgskogo nauchnogo centra UrO RAN. 2015. 3: 1-6 [Elektronnyj resurs]. (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-3/Articles/SMV-2015-3.pdf>).
  19. Pashinina O.A., Kartashova O.L., Pashkova T.M. i dr. Harakteristika bioprofilej Candida albicans, vydelennyh u zdorovyh lic i pri patologii. Problemy medicinskoj mikologii. 2015. 17. (3): 46-49.

**Образец ссылки на статью:**

Пашкова Т.М., Попова Л.П., Карташова О.Л., Акжигитов А.С. Факторы персистенции грибов рода *Malassezia*, выделенных от здоровых собак и собак с наружным отитом. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2015. 4: 1-8 [Электронный ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-4/Articles/PTM-2015-4.pdf>).