

И.Д.Решетникова¹, Ю.А.Тюрин^{1,2}, Н.И.Глушко¹, С.А.Лисовская¹, И.Г.Мустафин², Р.С.Фассахов¹

Вирулентные свойства грибов рода *Candida* у пациентов с персистирующей бронхиальной астмой, длительно применяющих ингаляционные стероиды

1 – ФБУН "Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека: 420015, Республика Татарстан, Казань, ул. Большая Красная, 67;

2 – ГБОУ ВПО "Казанский государственный медицинский университет" Минздрава России: 420012, Республика Татарстан, Казань, ул. Бутлерова, 49

I.D.Reshetnikova¹, Yu.A.Tyurin^{1,2}, N.I.Glushko¹, S.A.Lisovskaya¹, I.G.Mustafin², R.S.Fassakhov¹

Virulent properties of genus *Candida* in patients with persistent bronchial asthma and long-term treatment with inhaled steroids

1 – Federal Institution Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Kazan, Russia;

3 – State Institution Kazan State Medical University, the Health Ministry of Russia; Kazan, Russia

Summary

Aim. The aim of this study was to investigate virulent properties of the genus *Candida* spp. in patients with persistent bronchial asthma and long-term treatment with inhaled steroids.

Methods. In this study, virulent properties of the genus *Candida* spp. were investigated in oropharyngeal smears of 30 patients with persistent asthma treated with moderate-to-high dose inhaled corticosteroids (ICS) for at least 1 year. A control group included 15 steroid-naive asthmatic patients. Fungi were identified by conventional methods (morphology, presence of germination tubes, chlamydozoospores, fermentation of carbohydrates). Sensitivity to antibiotics was determined by disk method on the Saburo agar medium. Adhesion was assessed in a model with nitrocellulose film and immobilized hemoglobin. Proteinase activity was measured by the ELISA method in supernatant at two pH values: acidic (pH = 4.5) or weakly alkaline (pH = 7.8). CD cell leukocyte receptor proteolysis was evaluated by the cytofluorometrics method.

Results. An incidence of fungal colonization of the pharynx in ICS-treated patients with bronchial asthma was 76.7 %. Most strains were highly virulent as they had significantly higher adhesive and enzymatic activity and multi-drug resistance to antifungals compared to control group.

Conclusion. The ability of these strains to secrete proteolytic enzymes against CD4⁺ T-lymphocyte surface receptors could provide an additional immunomodulatory mechanism in *Candida albicans* invasion.

Key words: bronchial asthma, inhaled corticosteroids, *Candida albicans*, proteolytic enzymes.

Резюме

Протеолитические свойства грибов рода *Candida*, колонизирующих слизистые и составляющих основной компонент микробиоценоза у пациентов с персистирующей бронхиальной астмой (БА), длительно применяющих ингаляционные глюкокортикостероиды (иГКС), изучены недостаточно. В настоящей работе изучались вирулентные свойства штаммов грибов рода *Candida* spp., выделенных из микробиоты зева у пациентов с БА, длительно применяющих иГКС. У пациентов с персистирующей БА ($n = 30$), принимающих средние и высокие дозы иГКС ≥ 1 года, проводилось микологическое исследование слизистых зева; группу сравнения составили пациенты с БА, не принимающие иГКС ($n = 15$). Грибы и бактерии идентифицировались общепринятыми методами (морфология, наличие трубок прорастания, хламидоспор, ферментация углеводов). Антибиотикограмма определялась методом дисков на агаризованной среде Сабуро. Уровень адгезии определялся на разработанной модели с применением нитроцеллюлозной пленки с иммобилизованным гемоглобином. Протеиназная активность в супернатанте определялась иммуноферментным способом при 2 значениях pH среды: кислой (pH = 4,5) и слабощелочной (pH = 7,8). Протеолиз CD клеточных лейкоцитарных рецепторов осуществлялся с применением цитофлуорометрического метода. Частота встречаемости грибковой колонизации зева у больных БА, постоянно применяющих иГКС, составила 76,7 %. Большинство этих штаммов характеризуются выраженными вирулентными свойствами (высокой адгезивностью и ферментативной активностью) и множественной устойчивостью к антимикотикам, что статистически достоверно выше, чем в группе сравнения. Способность данных штаммов секретировать ферменты, вызывающие протеолиз поверхностных у CD4⁺-рецепторов Т-лимфоцитов, обеспечивает дополнительный механизм развития иммуномодулирующего действия *Candida albicans* в системе местного иммунитета при развитии инвазивной инфекции.

Ключевые слова: *Candida albicans*, ингаляционные глюкокортикостероиды, бронхиальная астма, ферменты.

Дрожжеподобные грибы являются комменсалами и достаточно часто могут встречаться в зеве у здоровых лиц. Расширенной колонизации слизистых зева способствуют некоторые экзогенные и эндогенные факторы — сахарный диабет, онкологические заболевания, иммуносупрессия, в т. ч. связанная с приемом глюкокортикостероидов (ГКС), прием антибактериальных препаратов [5]. В немногочисленных

исследованиях, касающихся изучения грибкового пейзажа зева у больных бронхиальной астмой (БА), применяющих ингаляционные ГКС (иГКС), данные о встречаемости орофарингеального кандидоза колеблются в широких пределах (1–77 %), вероятно, из-за метода, который использовался для обнаружения возбудителя [1–4]. Показано, что увеличению орофарингеальной колонизации *Candida* способствует

ежедневный, длительный (> 1 года) прием ИГКС в высоких дозах, а уменьшить местные побочные эффекты и снизить риск развития кандидоза возможно с помощью ИГКС со спейсерами, полоскания рта и горла водой [1, 4, 6]. У грибов рода *Candida* установлены ряд факторов вирулентности и специфическая стратегия, направленная на колонизацию тканей организма человека и преодоление иммунных механизмов защиты. Уровень экспрессии и набор факторов вирулентности, образуемых грибами рода *Candida*, в частности, для вида *Candida albicans*, реализуется в фенотипе в зависимости от типа инфекции, ее локализации и длительности течения микоза, а также состояния иммунитета [1]. Отягощенный анамнез по наличию тяжелой соматической патологии (БА, длительное нарушение как общего, так и местного иммунитета, сопровождающие прием ИГКС) способствуют расширению колонизации условно-патогенной микрофлорой, в т. ч. *Candida*, с различной степенью патогенности. Адгезия гриба к клеткам и тканям макроорганизма является одним из основных факторов патогенности, который приводит к развитию кандидоза [5].

Протеолитические свойства грибов рода *Candida*, колонизирующих слизистые и составляющие основной компонент микробиоценоза у данной категории больных, изучены недостаточно. Необходимо отметить, что за последнее десятилетие происходило интенсивное исследование факторов вирулентности дрожжеподобных грибов *Candida* в патогенезе кандидозов и висцеральных микозов [2, 3], основное внимание при этом уделяется таким детерминантам вирулентности, как внутриклеточные системы, обеспечивающие синтез секретлируемых гидролитических энзимов грибковой клеткой.

При прочтении генома грибов вида *C. albicans* показана 90%-ная гомология генов грибов этого вида с непатогенным видом *Saccharomyces cerevisiae* [4], у ≈ 6–7 % генов грибов *Candida* – отсутствие гомологичных последовательностей в геноме непатогенного вида *Saccharomyces cerevisiae*. Именно в эту группу входят гены *C. albicans*, кодирующие белки семейства адгезинов и группу белков, относящихся к аспартилзависимым протеазам [5]. Продукция секретлируемых протеиназ и их активность у грибов, так же, как и у бактерий, чаще всего связана с их вирулентным фенотипом.

Целью исследования явилось изучение вирулентных свойств штаммов грибов рода *Candida spp.*, выделенных из микобиоты зева у пациентов с БА, длительно принимающих ИГКС.

Задачами исследования явились определение видовой структуры, адгезивной и протеолитической активности дрожжеподобных грибов рода *Candida*, колонизирующих слизистую оболочку полости рта у больных БА, длительно принимающих ИГКС, по сравнению с пациентами с БА, не применяющими ИГКС; изучение *in vitro* действия секретлируемых протеолитических ферментов грибов рода *Candida spp.* на культуру выделенных лимфоцитов периферической крови.

Материалы и методы

Микологическое исследование слизистых зева (задняя стенка, корень языка) было проведено у пациентов ($n = 30$) с персистирующей БА (основная группа), постоянно принимающих средние и высокие дозы ИГКС ≥ 1 года, и у больных БА ($n = 15$), не принимающих ИГКС (группа сравнения).

Забор материала проводился только у предварительно подготовленных больных: за 1 сутки исключались из их рациона продукты, содержащие живые дрожжи (кефир, творог, сыры, квас, свежие овощи и фрукты), а также проведение местной обработки зева (полоскания, спреи), применение антимикотиков и антисептиков. Утром в день проведения исследования больные не должны были принимать пищу и чистить зубы, разрешалось пить воду. Микологическое исследование проводилось в стандартизованных условиях одинаковыми тампонами. Для посева и выращивания использовались помещения, исключаящие контаминацию сапрофитными видами грибов и бактерий. Для контроля правильности подготовки больных при выращивании фиксировался уровень нормальной бактериальной микрофлоры, выявлялось микст-инфицирование. В необходимых случаях проводились повторные исследования.

Микологическое исследование материала проводилось на следующие питательные среды:

- агаризованная обогащенная среда Сабуро;
- агаризованная среда Сабуро с добавлением антибиотиков для подавления роста бактерий (стрептомицин + левомецетин – по 70 ед. / мл).

Грибы выращивались при 28–30 °С в течение 4 суток до образования характерных колоний и выявления филаментации. Бактериальная микрофлора инкубировалась в течение 48 ч при 37 °С.

Грибы и бактерии идентифицировались общепринятыми методами (морфология, наличие трубок прорастания, хламидоспор, ферментация углеводов). Антибиотикограмма определялась методом дисков на агаризованной среде Сабуро с коммерческими и стандартизованными дисками; для контроля применялись чувствительные и устойчивые штаммы гриба *C. albicans* [5, 6].

Уровень адгезии определялся на разработанной ранее модели оценки адгезивной активности *C. albicans* на нитроцеллюлозной пленке с иммобилизованным гемоглобином [7].

Для индукции секретлируемых ферментов выделенные изоляты грибов *Candida spp.* инкубировались в течение 16 ч в жидкой синтетической среде Сабуро с добавлением альбумина до 1%-ной концентрации. После инкубации грибные клетки отделялись от жидкой среды центрифугированием при 6 000 об. / мин в течение 10 мин при 4 °С. Супернатант, содержащий секретлируемые дрожжеподобной клеткой продукты, сохранялся при замораживании до –20 °С.

Определение протеолитической активности. Протеиназная активность в супернатанте определялась иммуноферментным способом при 2 значениях pH:

кислой (0,03 М К-ацетатный буфер; pH = 4,5) и слабощелочной (0,05 М Трис-НСl буфер; pH = 7,8) [8]. В качестве субстрата использовался человеческий иммуноглобулин (Ig) G1 (*Sigma*, США).

Определение протеолиза CD-клеточных лейкоцитарных рецепторов осуществлялось с применением цитофлуорометрического метода. Лимфоциты / моноциты выделялись методом изопакфиколювой сепарации из крови здоровых доноров. Реакция инкубации супернатанта с лимфоцитами / моноцитами проводилась при pH = 7,45 (0,05 М Трис-НСl) при 36 °С в течение 60 мин в исходном и при разведении. После инкубации клетки отмывались и окрашивались с применением набора моноклональных антител 6-color TBNK BD *Multitest*. Параллельно ставился контроль, содержащий донорские лимфоциты / моноциты, инкубированные в тех же условиях со стерильной синтетической средой, содержащей 1%-ный альбумин в 0,05 М Трис-НСl (pH = 7,45) при 36 °С в течение 60 мин. Контрольные пробы также окрашивались. Показатели протеолиза CD-рецепторов на лимфоцитах крови донора выявлялись методом проточной цитофлуорометрии на цитометре *FACS Canto II* (США).

Результаты и обсуждение

Клиническая характеристика групп пациентов, включенных в исследование. В основной группе было 12 мужчин и 18 женщин в возрасте 33–72 лет ($51,8 \pm 2,6$ года), из них 24 (80 %) – больные персистирующей БА тяжелого течения и 6 (20 %) – среднетяжелого течения; неконтролируемое и частично контролируемое течение отмечено в 27 (90 %) случаях, контролируемое – в 3 (10 %). Длительность заболевания составила от 1 года до 35 лет. Отмечено ежедневное использование иГКС в высоких и средних дозах: сальметерол / флутиказона пропионат – у 10 (33,3 %) пациентов; формотерол / будесонид – у 11 (36,7 %); беклометазона пропионат – у 8 (26,7 %); флутиказона пропионат – у 1 (3,3 %); в дозировке > 500 мкг по флутиказона пропионату: в 1 случае (в сочетании полькортолоном 12 мг в сутки) ≥ 1 года, в 86 % случаев – в течение 2–17 лет. Дозированные аэрозольные ингаляторы применялись у 17 (56,7 %) больных; турбухалер – у 11 (36,7 %); мультидиск – у 2 (6,7 %). Предъявлялись следующие жалобы на проблемы в ротовой полости, связанные с приемом иГКС: осиплость голоса – в 16 (53,3 %) случаях, зуд и высыпания на слизистой полости рта – в 2 (6,7 %), кровоточивость десен – в 1 (3,3 %). У 11 (36,7 %) пациентов жалобы отсутствовали.

В 22 (73,3 %) случаях не отмечено сопутствующих грибковых заболеваний. На сопутствующие заболевания грибковой этиологии в анамнезе было указано у 8 (26,7 %) пациентов: онихомикоз – у 4 (13,3 %), микоз стоп – у 3 (10 %), вагинальный кандидоз – у 1 (3,3 %).

У 14 (46,7 %) больных в анамнезе отмечен прием антибиотиков в течение предшествующего года (в 1 случае – один 7-дневный курс, в 8 (26,6 %) – два

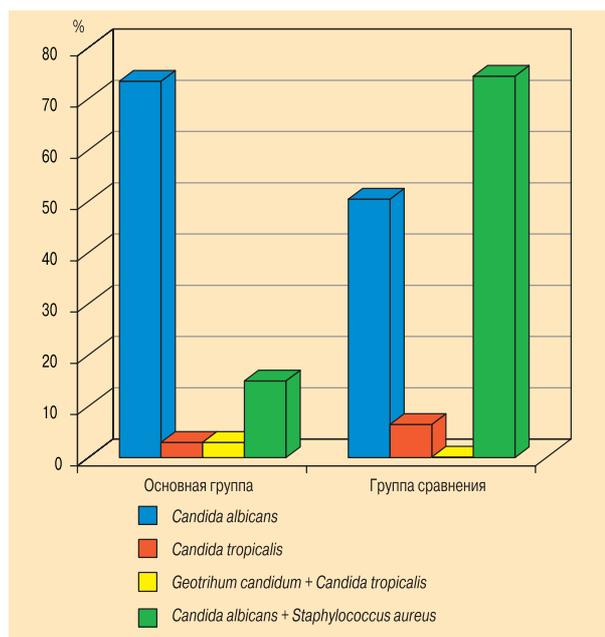


Рис. 1. Микологическая структура изолятов слизистой зева у пациентов исследуемых групп

7-дневных курса, в 2 (6,7 %) – один 3-недельный курс, в 1 (3,3 %) – три 2-недельных курса).

В группе сравнения у пациентов с персистирующей БА ($n = 15$: 8 (53,3 %) мужчин, 7 (46,7 %) женщин; возраст – 16–47 лет), не принимающих иГКС, отсутствовали жалобы на проблемы в ротовой полости и клинические признаки орофарингеального кандидоза, а также другие проявления микоза.

По результатам микологического исследования в основной группе грибы рода *Candida* были обнаружены у 23 (76,6 %) больных, из них у 22 (73,3 %) были идентифицированы как *C. albicans*, по 1 (3,3 %) случаю – *C. tropicalis*, а также сочетание *C. albicans* + *Geotrihum candidum* (рис. 1). У 75 % пациентов интенсивность обсемененности зева дрожжеподобными грибами была высокой (10^3 – 10^5 КОЕ / мл); у 12 (40 %) больных при бактериологическом обследовании зева был обнаружен золотистый стафилококк, причем у 5 из них одновременно обнаруживались микст-колонизация *C. albicans* и *Staphylococcus aureus* (10^3 – 10^4 КОЕ / мл).

В группе сравнения грибы рода *Candida* обнаружены у 9 (56,3 %) пациентов, в т. ч. у 8 *C. albicans* был выделен в монокультуре, в 1 случае отмечено сочетание с *C. tropicalis*, причем интенсивность обсеменения была ниже, чем в основной группе и составляла $\leq 10^2$ – 10^4 КОЕ / мл. У 12 (75 %) больных выявлено микст-носительство *C. albicans* + *S. aureus* в диагностически значимых количествах. У 1 пациента выявлена повышенная (10^5 КОЕ на 1 тампон) обсемененность зева стрептококком в сочетании с золотистым стафилококком (*S. pyogenes* + *S. aureus*), т. е. колонизация зева носила бактериальный характер.

Клинико-микологическая характеристика штаммов грибов рода *Candida spp.*, колонизирующих слизистую зева у пациентов 2 групп, представлена в таблице. Необходимо отметить, что штаммы грибов

Частота встречаемости и характеристика штаммов грибов рода *Candida spp.*, колонизирующих слизистую ротоглотки пациентов с различными вирулентными свойствами в 2 группах, %

Группа	<i>Candida spp.</i>	Штаммы с множественной устойчивостью к антимикотикам	Адгезивность штаммов	Протеолитически активные штаммы
иГКС, n = 30*	76,7	52,2	44,0	70,6
Контроль, n = 15	53,3	25,0	12,0	25,0

Примечание: * – частота встречаемости штаммов *Candida spp.* с множественной устойчивостью к антимикотикам, адгезивностью и протеолитической активностью в группе пациентов, использующих иГКС, достоверно выше, чем в группе сравнения по критерию Пирсона, где $\chi^2_{эмт.} (8,597) > \chi^2_{0,05} (7,815)$ при $v = 3$.

рода *Candida spp.*, выделенные от пациентов, получавших иГКС, характеризовались в большинстве случаев множественной устойчивостью к антимикотическим препаратам ($\leq 52,2$ %), а также высокой

адгезивностью (≤ 44 %) по сравнению с данными показателями в группе сравнения (25 и 12 % соответственно). Известно, что адгезия клеток гриба к тканям макроорганизма является первоначальной

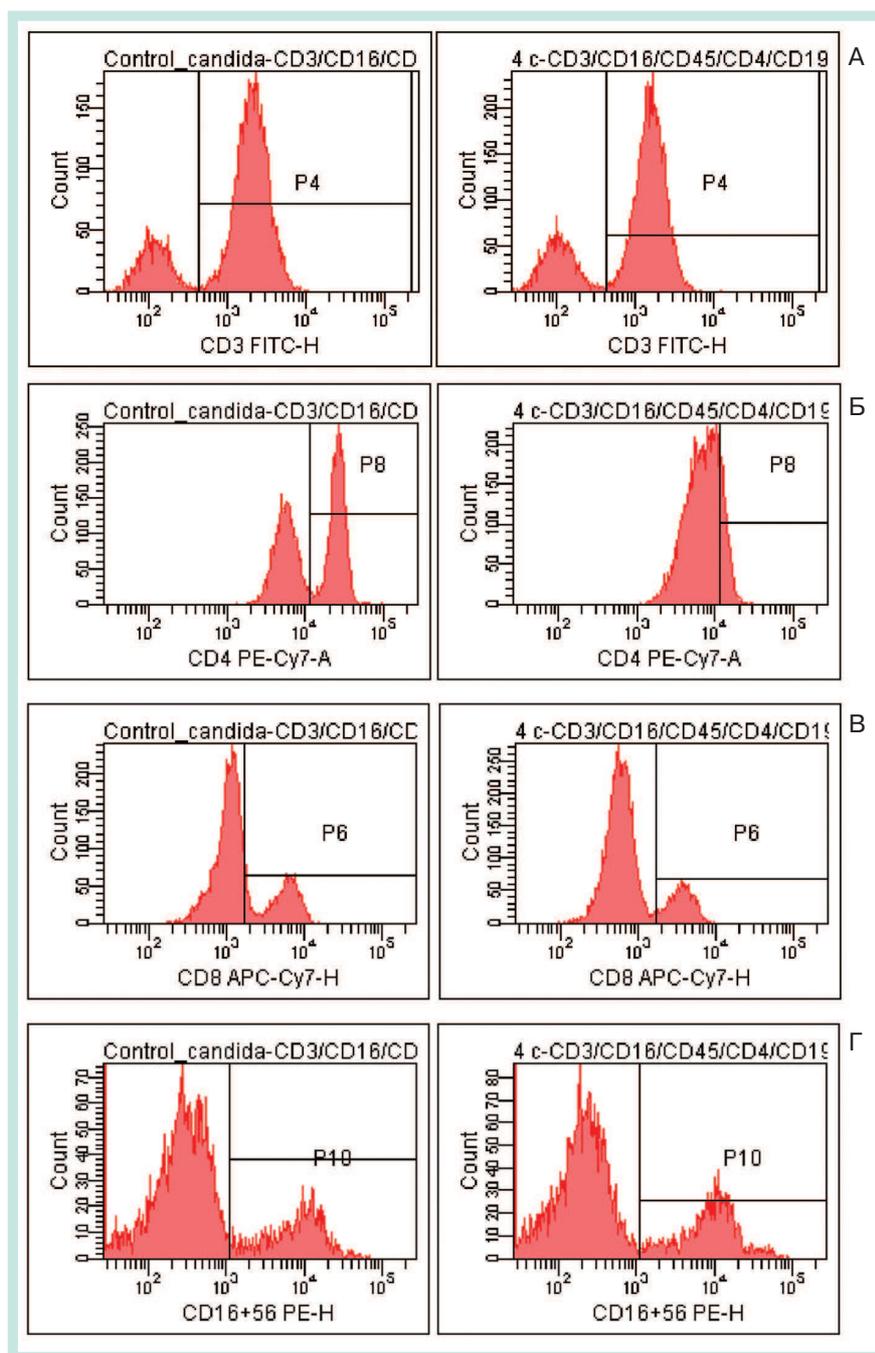


Рис. 2. В серии цитофлюорограмм продемонстрирована экспрессия рецепторов CD3, CD4, CD8, CD16⁺56⁺-рецепторов в контроле и опыте при инкубации лимфоцитов с протеолитически активным супернатантом клинического изолята *C. albicans* № 4: А) экспрессия рецептора CD3⁺ не изменена, четко видно 2 пика цитофлуоресценции; Б) показано отсутствие экспрессии CD4⁺-рецепторов в опыте, 1 пик флуоресценции CD3⁺, отсутствует специфическая флуоресценция CD4⁺; В) экспрессия CD8⁺-рецептора не изменена в опыте и в контроле; Г) экспрессия CD16⁺56⁺-рецептора не изменена в опыте и в контроле

степенью инвазии и у больных микозами характеризуется уровнем 20–60 %, при кандиданосительстве – 10–15 %. Частота встречаемости штаммов *Candida spp.* с множественной устойчивостью к антимикотикам, адгезивностью и протеолитической активностью в группе пациентов, используемых ИГКС, достоверно выше, чем в группе сравнения (по критерию Пирсона).

В связи с выраженной ферментативной активностью протеолитических ферментов у 70,6 % выделенных штаммов проведено дополнительное исследование действия секретируемых протеолитических ферментов грибов рода *C. albicans* на поверхностные рецепторы различных субпопуляций Т-лимфоцитов, которые участвуют в регуляции противогрибковых иммунных реакций в организме человека. Определена удельная активность супернатантов для *C. albicans* при pH = 4,5, которая составила от $0,10 \pm 0,01$ до $0,80 \pm 0,05$ у. е. активности, а при слабощелочном значении pH = 7,8 – от $0,030 \pm 0,005$ до $0,08 \pm 0,01$ у. е. активности. Инкубация лимфоцитов человека с протеолитически активными супернатантами (рис. 2) *C. albicans* при pH = 7,45 вызвала уменьшение экспрессии CD4⁺-рецепторов на лимфоцитах в сравнении с контролем (в опытных образцах лимфоцитов CD4⁺ 7,3 ± 0,5 %, в контрольных – CD4⁺ 52,5 ± 0,5 %; различия достоверны; $p < 0,05$), содержание других CD-рецепторов на лимфоцитах не претерпело изменений (опытные образцы – CD3⁺ 80,2 ± 0,5 %; CD8⁺ 21,5 ± 0,5 %; CD19⁺ 8,5 ± 0,5 %; CD16⁺ 11,3 ± 0,5 %; контрольные образцы – CD3⁺ 81,2 ± 0,5 %; CD8⁺ 20,5 ± 0,5 %; CD19⁺ 8,0 ± 0,5 %; CD16⁺ 10,8 ± 0,5 %).

Отмечено, что длительное нарушение как общего, так и местного иммунитета, сопровождающее прием ИГКС, способствуют расширенной колонизации условно-патогенной микрофлорой, среди которой доминируют штаммы *C. albicans*, характеризующиеся в большинстве случаев высокой адгезивностью и ферментативной активностью в сочетании с множественной устойчивостью к антимикотикам.

Выраженная адгезивность и ферментативная активность являются свойствами, которые определяют потенциальную патогенность и способствуют закреплению гриба в организме и развитию заболевания.

Заключение

Частота встречаемости грибковой колонизации зева у больных БА, постоянно применяющих ИГКС, составляет 76,7 %. Большинство этих штаммов характеризуются выраженными вирулентными свойствами (высокой адгезивностью и ферментативной активностью) и множественной устойчивостью к антимикотикам, что статистически достоверно выше, чем в группе сравнения.

Способность данных штаммов секретировать ферменты, вызывающие протеолиз поверхностных рецепторов у CD4⁺ Т-лимфоцитов, обеспечивает дополнительный механизм развития иммуномодулирующего действия *C. albicans* в системе местного иммунитета при развитии инвазивной инфекции.

Литература / References

1. Buhl R. Local oropharyngeal side effects of inhaled corticosteroids in patients with asthma. *Allergy*. 2006; 61: 518–526.
2. Roland J.N., Bhalla R.K., Earis J. The local side effects of inhaled corticosteroids: current understanding and review of the literature. *Chest*. 2004; 126: 213–219.
3. Salzman G.A., Pyszczynski D.R. Oropharyngeal candidiasis in patients treated with beclomethasonedipropionate delivered by metered dose inhaler alone and with aerochamber. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1988; 81: 424–428.
4. Adams N.P., Bestall J.C., Jones P.W. et al. Inhaled fluticasone at different doses for chronic asthma in adults and children. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2005; 20; (3): CD003534.
5. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Грибковые инфекции. Руководство для врачей. 2 изд. М.: Издательство "БИНОМ"; 2008. / Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. *Fungal Infections: Practical Guidelines*. [Gribkovye infektsii. Rukovodstvo dlya vrachey]. 2nd ed. Moscow: BINOM; 2008 (in Russian).
6. Kurta E., Yildirim H., Kirazb N. et al. Erginela Oropharyngeal candidiasis with dry-powdered fluticasonepropionate: 500 mg / day versus 200 mg / day. *Allergol. Immunol. Pathol.* 2008; 36 (1): 17–20.
7. Лисовская С.А., Глушко Н.И., Халдеева Е.В. Адгезивные свойства штаммов *Candida albicans* при кандидозах различной локализации. *Проблемы медицинской микологии*. 2007; 9 (1): 26–29. / Lisovskaya S.A., Glushko N.I., Khaldeeva E.V. Adhesive properties of *Candida albicans* strains in candidosis of different sites. *Problemy meditsinskoj mikologii*. 2007; 9 (1): 26–29 (in Russian).
8. Куликов С.Н., Тюрин Ю.А., Фассахов Р.С. и др. Способ определения IgG-протеиназной активности. Патент РФ № 2373538, 2009. / Kulikov S.N., Tyurin Yu.A., Fassakhov R.S. et al. A method to measure proteinase activity. Patent RF № 2373538. 2009 (in Russian).

Информация об авторах

Решетникова Ирина Дмитриевна – к. м. н., доцент, зам. директора по научной и лечебной работе ФБУН КНИИЭМ Роспотребнадзора; тел.: (843) 236-67-21; e-mail: reshira@mail.ru

Тюрин Юрий Александрович – к. м. н., зав. лабораторией иммунологии и разработки аллергенов ФБУН "КНИИЭМ" Роспотребнадзора; ассистент кафедры биологической химии ГБОУ ВПО "КГМУ" МЗ России; тел.: (843) 238-99-79; e-mail: immunolab@yandex.ru

Глушко Надежда Ивановна – ст. научный сотрудник лаборатории микологии ФБУН "КНИИЭМ" Роспотребнадзора; тел.: (843) 236-56-59; e-mail: mycology-kazan@yandex.ru

Лисовская Светлана Анатольевна – к. б. н., ст. научный сотрудник лаборатории микологии ФБУН "КНИИЭМ" Роспотребнадзора; тел.: (843) 236-56-59; e-mail: mycology-kazan@yandex.ru

Мустафин Ильшат Ганиевич – д. м. н., профессор, зав. кафедры биологической химии ГБОУ ВПО "КГМУ" Мнздрова России; тел.: (843) 238-99-79; e-mail: immunolab@yandex.ru

Фассахов Рустэм Салахович – д. м. н., профессор, директор ФБУН "КНИИЭМ" Роспотребнадзора; тел.: (843) 236-67-21; e-mail: farrus@mail.ru

Поступила 17.10.13

© Коллектив авторов; 2014

УДК 616.248-085.234.032.23.06