

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К
АНТИМИКОТИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ
ДРОЖЖЕЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИИ ДЫХАТЕЛЬНЫХ
ПУТЕЙ**

Андреева И. С. ¹,

Морозова В. В. ²,

Кабанов А. С. ¹

¹ ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии
«Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Россия.

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г.
Новосибирск, Россия.

**IDENTIFICATION AND DETERMINATION OF RESISTANCE TO
ANTIMYCOTIC FACTORS IN YEAST CLINICAL ISOLATES DURING
RESPIRATORY DISEASES**

Andreeva I. S.^a,

Morozova V. V.^b,

Kabanov A. S.^a

^a FBUN State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector"
Rosпотребнадзор, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia.

^b Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of
Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia.

Резюме

Распространенность дрожжевых инфекций значительно возросла за последние несколько десятилетий, все более актуальна проблема резистентности выделяемых возбудителей к антимикробным препаратам. К часто встречающимся патогенным грибам относятся дрожжи рода *Candida*, доминирующим видом, как в поверхностных, так и в инвазийных инфекционных процессах является вид *Candida albicans*. В настоящем сообщении приводятся данные по идентификации и определению устойчивости к антимикотическим препаратам изолятов дрожжей, выделенных из клинического материала от пациентки с хроническим бронхитом и пациента с генерализованной дрожжевой инфекцией. В результате геномной идентификации штамм, вызвавший генерализованную инфекцию, определен как *Candida utilis*, что подтверждает литературные данные о все большем распространении этого вида, считавшегося редко встречающимся возбудителем инвазионных процессов, в качестве нового опасного патогена. Тестирование на чувствительность к антимикотикам выявило резистентность штамма *C. utilis* к широко применяемым противогрибковым препаратам, таким как кетоконазол, итраконазол и флуконазол, слабую чувствительность к клотримазолу, нистатину и амфотерицину В. Штамм из материала пациентки с хроническим бронхитом идентифицирован как *C. africana*, считающийся разновидностью *C. albicans*. За исключением итраконазола, штамм проявил чувствительность, выраженную в разной степени, к пяти антимикотическим препаратам, использованным в опыте. Оба выделенных штамма дрожжей обладали активным ростом при повышенной температуре, способностью к образованию капсулы, формированию гифальных проростков и биопленок, признаками, отличающими потенциально патогенные штаммы кандид от сапротрофных штаммов. Комбинированная противогрибковая терапия включает в себя применение пробиотических препаратов на основе микроорганизмов, проявляющих антагонизм относительно грибов. В настоящей работе показано

эффективное ингибирующее влияние на активность роста исследуемых штаммов патогенных дрожжей и типовой контрольный штамм *C. albicans* Y-583 секретлируемых водорастворимых метаболитов спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*, антисептиков «Октенисепт» и «Хлоргексидин», а также - масляных экстрактов розмарина и сандала.

Ключевые слова: дрожжеподобные грибы; кандидоз; бронхолегочная инфекция; клинические изоляты; *Candida utilis*; *Candida albicans*; резистентность к антимикотикам.

Abstract

The prevalence of yeast infections has increased significantly over the past few decades, with resistance of isolated pathogens to antimicrobial agents becoming progressively more pressing. Commonly occurring pathogenic yeasts include genus *Candida*, with *C. albicans* species being the dominant in both superficial and invasive infectious processes. This report presents data on the identification and determination of antimycotic drug resistance for yeast isolates obtained from clinical material of a patient with chronic bronchitis and a patient with generalized fungal infection. As a result of genomic identification, the strain causing the generalized infection was identified as *Candida utilis*, confirming the literature data on its increasing prevalence, considered a rare pathogen of invasive processes, as a new dangerous pathogen. Antimycotic susceptibility testing revealed resistance of *C. utilis* strain to commonly used antifungal drugs such as ketoconazole, itraconazole and fluconazole, weak sensitivity to clotrimazole, nystatin and amphotericin B. The strain from a patient with chronic bronchitis was identified as *C. africana*, considered to be a *C. albicans* species. Excepting itraconazole, the strain showed varying sensitivity to the five antimycotic drugs used in the experiment. Both isolated yeast strains actively grew at elevated temperature, were able to form a capsule, hyphal sprouts and biofilms, features which distinguish potentially pathogenic *Candida* from saprotrophic strains. Combined antifungal therapy includes the use of probiotic preparations based on microorganisms that exhibit antagonism against fungi. The present work shows an effective inhibitory effect from secreted water-soluble metabolites of spore-forming bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*, antiseptics “Octenisept” and “Chlorhexidine”, as well as rosemary and sandalwood oil extracts on growth activity of the studied pathogenic yeast strains and a typical control strain of *C. albicans* Y-583.

Keywords: yeast-like fungi; candidiasis; bronchopulmonary infection; clinical isolates; *Candida utilis*; *Candida albicans*; resistance to antimycotics.

1 Введение

2 Дрожжеподобные грибы широко распространены во внешней среде, на
3 листьях и плодах растений, в почве, воде, в организме человека и животных,
4 являются эндосимбионтами насекомых, считаются условно-патогенными, но
5 при определенных условиях способны вызывать как поверхностные, так и
6 инвазийные инфекционные процессы [1]. Кандидамикоз (кандидоз) –
7 известное заболевание кожи и слизистых оболочек полости рта,
8 урогенитального тракта, имеет локальный характер, но при ослаблении
9 иммунитета, способен переходить в генерализованную форму, вызвать
10 опасные для жизни инфекции кровотока, инвазивный кандидоз внутренних
11 органов [2]. Грибы рода *Candida*, как сапротрофы, входят в состав постоянно
12 живущих микроорганизмов в микробиоме здоровых людей [3], к патогенезу
13 имеет отношение 21 вид, среди которых доминирующим является
14 оппортунистический гриб *C. albicans*, выявляясь в 90% случаев
15 поверхностного и инвазивного кандидомикоза [4]. Реже среди возбудителей
16 инфекционных процессов встречаются виды этого рода *C. tropicalis*, *C.*
17 *glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis* [4]. Развитие инфекционных
18 процессов, вызванных *Candida utilis*, до недавнего времени были крайне
19 редки, в литературе встречались единичные публикации, где была показана
20 патогенность этого вида. *C. utilis*, преимущественно, встречалась в крови у
21 детей в возрасте 0-3 месяцев, длительно находящихся в отделении
22 интенсивной терапии, обнаружена также у людей с ослабленным
23 иммунитетом [5, 6].

24 Развитию кандидозной инфекции способствуют несколько факторов и
25 видов активности, которые усиливают патогенный потенциал грибка. Среди
26 них наличие молекул адгезии, формирование биопленки [7], способность
27 проникновения кандид в тканевые структуры благодаря морфологической
28 трансформации клеток в гифальную форму [8]. Гифы в тканях
29 распространяются быстрее, чем дрожжевая форма, что облегчает миграцию
30 кандид через поврежденные ткани и является признаком начала образования

31 биопленки с последующим накоплением внеклеточного матрикса [9]. Наличие
32 биопленки уменьшает восприимчивость кандид к антимикотическим
33 препаратам, защищает от факторов иммунитета, возможность
34 горизонтального переноса генов в биопленке обеспечивает более успешную
35 адаптацию к условиям среды, развитию полирезистентности кандид к
36 антимикотическим, препаратам, что затрудняет лекарственную терапию [10-
37 12]. Перспективным направлением для комплексного лечения при
38 хронических инфекционных заболеваниях, включая кандидоз, может стать
39 применение непатогенных бактерий-антагонистов рода *Bacillus* или других
40 микроорганизмов, используемых в качестве пробиотиков [13, 14].

41 Анализ видового состава и свойств патогенных дрожжеподобных
42 грибов, исследование действия антимикотических препаратов на биопленки,
43 сформированные грибами рода *Candida*, определение механизмов
44 возникновения резистентности к антимикотическим препаратам, поиск новых
45 эффективных антигрибковых препаратов является актуальной задачей
46 современной медицины [15].

47 **Целью настоящей работы** является идентификация и определение
48 резистентности к антимикотическим препаратам клинических изолятов
49 дрожжеподобных грибов, явившихся причиной тяжелых хронических,
50 генерализованных заболеваний бронхолегочной системы.

51 2 Материалы и методы

52 *Дрожжеподобные грибы, использованные в работе:* изолят дрожжей Y-
53 1370, выделенный из клинического материала пациента (57 лет) с
54 генерализованной инфекцией и летальным исходом; изолят дрожжей Y-1395,
55 выделенный из мокроты пациентки (78 лет) с диагнозом хронический бронхит;
56 контрольный коллекционный штамм *Candida albicans* Y-583.

57 *Штаммы бактерий антагонистов:* *Bacillus subtilis* B-652; *Bacillus*
58 *licheniformis* B-847, *Bacillus subtilis* B-1376.

59 Все перечисленные микроорганизмы хранятся в составе коллекции
60 бактерий, бактериофагов и грибов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
61 Роспотребнадзора.

62 Для культивирования дрожжей использовали кукурузный агар (г/л):
63 кукурузная мука - 40, пептон - 50, глюкоза – 20, агар - 15, водопроводная вода
64 до 1л, рН 6,5 и среду Сабуро; для бактерий применяли среду ГРМ (среды
65 производства ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия). Инкубирование высевов проводили
66 при 37 °С в течение 24-48 часов. Выросшие отдельные колонии
67 микроорганизмов использовали для дальнейшего их изучения.

68 Морфологию выделенных микроорганизмов исследовали при
69 наблюдении живых и фиксированных, окрашенных препаратов клеток с
70 применением микроскопа Axioskop 40 (Carl Zeiss, Германия).
71 Физиологические и биохимические признаки изолятов дрожжей выполняли
72 стандартными методами, способность к утилизации углеводов учитывали,
73 высевая культуры на среды Гисса [16, 17].

74 Чувствительность к антибиотическим препаратам определяли диско-
75 диффузионным методом с применением дисков производства НИЦФ (Россия)
76 применяя антимикотические препараты с концентрацией (мкг/диск):
77 кетоконазол (20); итраконазол (10); флуконазол (40); клотримазол (10),
78 нистатин (80 ЕД); амфотерицин В (40).

79 Определение чувствительности выделенных клинических изолятов к
80 секретлируемым метаболитам штаммов бацилл *B. subtilis* и *B. licheniformis*
81 выполняли методом отсроченного антагонизма [18].

82 Для определения чувствительности изолятов дрожжей Y-1370 и Y-1395
83 к антисептикам на агаризованную питательную среду Сабуро в чашку Петри
84 вносили 100 мкл суточной культуры исследуемой культуры с концентрацией
85 клеток 10⁹ КОЕ/мл. В асептических условиях в засеянной среде делали лунки
86 и вносили в каждую по 50 мкл препаратов: «Октенисепт» («Octenisept»,
87 Германия), «Хлоргексидин биглюканат» 0,05% ("Петрофарм", Россия);
88 настойка календулы (ООО «Гиппократ, Россия); настойка эвкалипта (ООО

89 «Косметик Ленд», Россия); 10% масляные экстракты розмарина, сандала,
90 лаванды (Китай). В качестве контроля в лунки вносили по 50 мкл 70%
91 этилового спирта и физиологического раствора. Инкубировали высевы в
92 течение 24-48 часов, при температуре 37 °С. Чувствительность
93 микроорганизма к препарату определяли по наличию и размеру зоны
94 угнетения роста вокруг лунки с антисептиком (использованы средние данные
95 по трем повторам опыта).

96 Таксономическую принадлежность изолятов определяли по суммарным
97 результатам фенотипического и геномного анализа. Для идентификации
98 исследуемых дрожжей молекулярно-генетическими методами использовали
99 ITS (последовательность межгенного рибосомального спейсера). ДНК
100 дрожжей выделяли из суспензий микроорганизмов с использованием набора
101 «ДНК-технология» (НК-технология, Россия) по методике производителя.
102 Реакцию амплификации ITS-фрагмента дрожжевой ДНК вели с
103 использованием олигонуклеотидов ITS1 и ITS4 для первого раунда ПЦР
104 (полученный фрагмент ~ 600 н.п.), ITS3 и ITS4 для второго раунда ПЦР (~300
105 н.п.) [19]. В качестве матрицы использовали выделенную геномную ДНК,
106 реакцию вели с использованием SP-Taq-ДНК-полимеразы (СибЭнзим,
107 Россия). Полученные ПЦР-фрагменты очищали элюцией из GTG-агарозы
108 (Lonza, Израиль). Реакцию секвенирования полученных ПЦР-фрагментов
109 проводили с использованием тех же олигонуклеотидов и реактива BigDye
110 v.3.1 (Applied Biosystems, США) в стандартных условиях.
111 Электрофоретическое разделение продуктов реакции секвенирования вели с
112 использованием прибора ABI Sequencing Analyzer 3500. Полученные
113 последовательности анализировали с использованием программного
114 обеспечения ABI Sequence Scanner и FinchTV 4.1. Сравнение
115 последовательностей с имеющимися в базе данных NCBI GenBank database
116 (ncbi.nlm.nih.gov) референсными последовательностями рибосомальных
117 спейсеров дрожжей проводили с использованием алгоритма BLASTN.

118 Филогенетический анализ для наиболее близких к исследуемым
119 последовательностей проводили в программе MEGA 7.0.21.

120 3 Результаты исследований

121 **Идентификация.** Изолят Y-1370 выделен при анализе микробной
122 генерализованной инфекции пациента с диагнозом пневмония и летальным
123 исходом. Пять образцов материалов от больного (моча, смывы из ротоглотки,
124 носоглотки) в избытке содержали эукариотические клетки капсулированных,
125 почкующихся дрожжеподобных грибов на разных стадиях жизненного цикла,
126 с диаметром до 5 мкм (рис.1А), образующих на агаре Сабуро белые,
127 пастообразной консистенции, куполообразные, непрозрачные колонии со
128 специфическим (дрожжевым) запахом (рис. 1В). Пять полученных чистых
129 культур оказались идентичными, с положительной окраской по Граму,
130 отрицательной реакцией по уреазе. Выделенные культуры проявили
131 способность к анаэробному росту, ферментации глюкозы, мальтозы и лактозы
132 до кислоты, в результате геномного анализа идентифицированы как
133 принадлежащие к виду *Cyberlindnera jadinii* (телеморфа *Candida utilis*).

134 Изолят дрожжей Y-1395 выделен при высеве мокроты пациентки с
135 хроническим бронхитом на среду Сабуро в виде множества колоний белого
136 цвета, куполообразных, матовых, непрозрачных, пастообразной
137 консистенции, образованных грамположительными, капсулированными,
138 почкующимися клетками, размером 2-5 мкм, активно утилизирующими
139 глюкозу и сахарозу. От вида *Candida albicans* данный изолят дрожжей
140 отличала утилизация сахарозы, неспособность к усвоению мальтозы и к росту
141 при 42-45 °С. В результате геномной и фенотипической идентификации изолят
142 дрожжей Y-1395 определен как относящийся к виду *Candida africana* -
143 дрожжеподобным оппортунистическим грибам, также имеющим клиническое
144 значение в развитии кандидозов [20].

145 *Идентификация изолятов дрожжей с использованием*
146 *последовательностей межгенных рибосомальных спейсеров* приведена на рис.
147 2 и 3. Последовательности ITS-фрагментов приведены на рисунках 2А и 3А.

148 В зависимости от температурных условий роста кандиды способны
149 менять морфологию клеток. Диапазон температур от 37 до 40 °С содействует
150 образованию гифальных форм, характерных для инвазийных процессов.
151 Исследуемые штаммы кандид хорошо росли при температуре 37 °С, клетки
152 при росте на кукурузном агаре активно образовывали гифальные проростки и
153 формировали биопленки (Рис. 4). Фенотипическая гибкость является важным
154 фактором вирулентности кандид, обеспечивающим вторжение в эпителий,
155 распространение по организму и выживание в различных нишах
156 макроорганизма [3]. Выживанию клеток дрожжей в неблагоприятных
157 условиях способствует развитая капсула, в состоянии биопленки
158 обеспечивающая клеткам защиту от воздействия иммунитета и
159 антимикотических препаратов. Все эти свойства, активный рост при
160 повышенной температуре, способность к образованию капсулы,
161 формированию гифальных проростков и биопленок, характерные и для
162 изучаемых культур, относятся к признакам патогенности и отличают
163 потенциально патогенные штаммы кандид от сапротрофных штаммов.

164 Определение чувствительности к антимикотикам показало, что штамм
165 *C. utilis* Y-1370 резистентен к кетоконазолу, итраконазолу и флуконазолу,
166 обладает слабо выраженной чувствительностью к клотримазолу и нистатину,
167 несколько в большей степени – к амфотерицину В, что делает эти препараты
168 малоэффективными по отношению к данному патогену. Типовой штамм *C.*
169 *albicans* Y-583 по чувствительности к антимикотикам был сходен со штаммом
170 Y-1370, в то время как штамм Y-1395 проявил устойчивость к интраконазолу,
171 к остальным использованным препаратам был чувствителен в разной степени
172 (табл. 1). Кетоконазол, флуконазол и клотримазол были наиболее
173 эффективными относительно штамма Y-1395.

174 Спорообразующие бактерии *B. subtilis* B-1376, *B. licheniformis* B-847, *B.*
175 *subtilis* B-652 тестированы на наличие антигрибковой активности
176 относительно штаммов дрожжей Y-1370, Y-1395 и типового контрольного
177 штамма *C. albicans* Y-583. Показано, что клинические изоляты Y-1370, Y-1395

178 проявили высокую чувствительность к секретируемым метаболитам всех трех
179 бацилл (табл. 2), зоны угнетения роста достигали 35 мм.

180 Реакция на действие антисептиков, включая растительные экстракты, у
181 всех трех штаммов Y-1370, Y-1395 и Y-583 была схожей: показана высокая
182 чувствительность к препаратам «Октенисепт» и «Хлоргексидин», а также к
183 масляным экстрактам розмарина, сандала и контрольному раствору 70%
184 этанола (рис. 5). При использовании настойки календулы и масляного
185 экстракта лаванды получен отрицательный результат, зоны угнетения роста
186 культур вокруг лунок с этими препаратами отсутствовали, как и в
187 контрольном варианте с применением физиологического раствора.

188 4 Обсуждение результатов

189 Наблюдаемое в настоящее время все большее распространение
190 дрожжевых грибов рода *Candida* связывают с нерациональным
191 использованием антимикотиков, неблагоприятным влиянием среды на
192 иммунную систему, длительной госпитализацией, несъемными катетерами и
193 другими отягощающими факторами. У пациентов со СПИД, после
194 химиотерапии онкологического заболевания или трансплантации органов
195 также существует высокая вероятность развития генерализованного
196 кандидамикоза до септицемии [3]. При инфекционных заболеваниях
197 дыхательной системы для грибов рода *Candida* показана высокая частота
198 встречаемости, как правило, в ассоциации с другими микроорганизмами [21].
199 Чаще всего сопутствующими микроорганизмами в ассоциации с кандидами
200 были стрептококки, как мы и наблюдали при выделении из клинического
201 материала изолята Y-1395, где в первичном высеве обнаружены кроме
202 дрожжей неспороносные бактерии и гемолитические кокки.

203 Отмечается расширение видового состава штаммов кандид,
204 ответственных за инфекционные процессы. Сравнительно недавно
205 обнаруженный патоген *Candida auris* [22] все чаще становится причиной
206 клинических инфекций, с риском развития генерализованных процессов и
207 вероятностью летального исхода до 50%, отличается резистентностью ко

208 многим антифунгальным препаратам [23]. За последние два десятилетия
209 целый ряд видов рода *Candida* превратились из редких патогенов в наиболее
210 важные и частые условно-патогенные микроорганизмы, вызывающие
211 кандидемию и инвазивный кандидоз у госпитализированных пациентов. Ранее
212 не считавшиеся патогенными грибы вида *C. utilis* (*Cyberlindnera jadinii*) все
213 чаще являются возбудителями инвазивных процессов [24]. Факторами риска в
214 таких случаях являлись ослабление иммунитета, длительная госпитализация,
215 воздействие антибиотиков. Участились случаи грибковой инфекции *C. utilis*
216 кровотока, связанные с длительным полностью имплантированным венозным
217 катетером [25, 26]. В публикации 2021 года Sreelekshmi T. S. с соавторами [5]
218 вид *C. utilis* был объявлен новым грибковым патогеном в крови, выделен у
219 детей в возрасте 0-3 месяцев, заболевание тяжело поддавалось лечению из-за
220 резистентности возбудителей к антимикробным препаратам. В настоящем
221 исследовании штамм дрожжей *C. utilis* выделен из мочи, носоглотки и зева
222 пациента с генерализованной дрожжевой инфекцией с диагнозом пневмония.
223 Штамм проявил резистентность к применяемым в настоящей работе
224 антимикотикам, для его ингибирования необходим более эффективный
225 подбор противогрибковых препаратов. Следует отметить, что полученные
226 данные по резистентности исследуемых штаммов *Candida* к антимикотикам
227 отличаются от приведенных сведений [27], рекомендуемых в качестве
228 отличительных признаков для идентификации ряда видов этого рода. Вид
229 *Candida africana*, к которому можно отнести изолят Y-1395, ранее был
230 предложен в качестве нового, реже встречающегося и менее патогенного вида,
231 однако дальнейшие филогенетические анализы подтвердили его статус как
232 необычного варианта *C. albicans* [27], обнаруживаемого при вагинальных
233 инфекциях [20]. Фенотипически изолят Y-1395 отличался от *C. albicans*
234 замедленным образованием гиф, утилизацией сахарозы, отсутствием роста на
235 среде с мальтозой и при повышении температуры культивирования до 42-45
236 °C, что соответствует признакам *C. africana* [20, 27].

237 Как выяснено, исследуемые штаммы дрожжей чувствительны к
238 препарату «Октенисепт», предназначенному для обработки слизистых,
239 пораженных грибками, и к антисептику «Хлоргексидин биглюканат» 0,05%,
240 применяемому для обработки наружных покровов. Использованные настойки
241 календулы и эвкалипта, в соответствии с этикеткой были приготовлены с
242 использованием 70% этанола, срок годности не просрочен. Однако в отличие
243 от 70% контрольного раствора этанола обе они не оказывали антигрибкового
244 действия на исследуемые штаммы дрожжей, что может быть связано с
245 особенностями технологии производства и хранения этих экстрактов.
246 Эфирные масла хвойных и травянистых растений являются источниками
247 антимикробных веществ широкого спектра действия и способны эффективно
248 подавлять возбудителей микозов [28, 29]. В настоящей работе проявили
249 эффективность против штаммов кандид *C. utilis* В-1370 и *C. africana* В-1395
250 масляные экстракты розмарина и сандала, к экстракту лаванды оба штамма
251 были устойчивы.

252 5 Заключение

253 По результатам фенотипического и генетического анализа установлена
254 таксономическая принадлежность дрожжеподобных грибов, выделенных из
255 клинического материала пациентов с бронхолегочными заболеваниями, как
256 относящихся к видам *C. utilis*, штамм Y-1370, и *C. africana*, штамм Y-1395.
257 При определении резистентности штаммов к 6-ти широко применяемым на
258 практике антимикотикам установлена чувствительность к пяти из них штамма
259 *C. africana* Y-1395 и резистентность штамма *C. utilis* Y-1370. Подтверждены
260 ранее имеющиеся сравнительно немногочисленные сведения о необходимости
261 контролировать грибы вида *C. utilis* как патогены, способные вызвать тяжелые
262 инфекционные заболевания до возможности летального исхода.

263 На примере клинических штаммов дрожжей Y-1370, Y-1395 и типового
264 штамма *C. albicans* Y-583 показано, что исследованные антисептики,
265 растительные и бактериальные препараты могут быть эффективно

266 использованы в качестве дополнительных средств для терапии и
267 профилактики кандидозов разного происхождения.

268 **Благодарности**

269 Буряк Г.А. и Емельяновой Е.К. за редакционные правки и техническую
270 помощь в подготовке материалов статьи.

271 **Финансирование:** генетический анализ штаммов дрожжей проведен
272 при частичном финансировании государственного задания ИХБФМ СО РАН
273 № 121031300043-8, а также при поддержке федерального проекта
274 «Санитарный щит страны - безопасность для здоровья (предупреждение,
275 выявление, реагирование)» в рамках «Создание национального
276 интерактивного каталога патогенных микроорганизмов и биотоксинов».

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Определение чувствительности штаммов исследуемых грибов к антимикотическим препаратам диско-диффузионным методом.

Table 1. Determination of sensitivity of strains of the studied fungi to antimycotic drugs by disk-diffusion method.

Штамм/ Strain	Препараты антимикотиков / зона подавления роста дрожжей (мм)/ Antimycotic agents / growth suppression zone of fungal strains (mm)						
	Кетоконазол / Ketocanazol	Итраконазол / Itraconazole	Флуконазол/ Fluconazole	Клотримазол / Clotrimazole	Нистатин / Nystatin	Амфотери- цин B / Amphotericin	
Y-1370	R	R	R	I	I	S	
Y-1395	S	R	S	S	I	I	
Y-583	R	R	R	R	I	I	

Примечание: S (Susceptible) – чувствительный; R (Resistant) – резистентный; I (Intermediate) – умеренно резистентный.

Note: S (Susceptible) - sensitive; R (Resistant) - resistant; I Intermediate (Intermediate) - moderately resistant.

Таблица 2. Ингибирующее влияние на клетки штаммов дрожжей Y-1370, Y-1395, Y-583 секретируемых метаболитов штаммов спорообразующих бактерий.

Table 2. Inhibitory effect of secreted metabolites from spore-forming bacterial strains on yeast Y-1370, Y-1395, and Y-583 strains.

Штамм / Strain	Штаммы антагонисты / зона подавления роста (мм)/ Antagonist strains / growth suppression zone (mm)		
	<i>B. subtilis</i> B-1376	<i>B. licheniformis</i> B-847	<i>Bacillus subtilis</i> B-652
Y-1370	35±1,0	35±1,0	35±1,0
Y-1395	20±1,0	35±1,0	35±1,0
Y-583	30±1,0	15±0,7	20±1,0

РИСУНКИ

Рисунок 1. Морфология клеток (А, $\times 2500$) и колоний (В) штаммов дрожжей Y-1370, Y-1395, Y-583 (типовой штамм *Candida albicans*).

Figure 1. Cell (A, $\times 2500$) and colony (B) morphology of yeast strains Y-1370, Y-1395, and Y-583 (type strain *Candida albicans*).

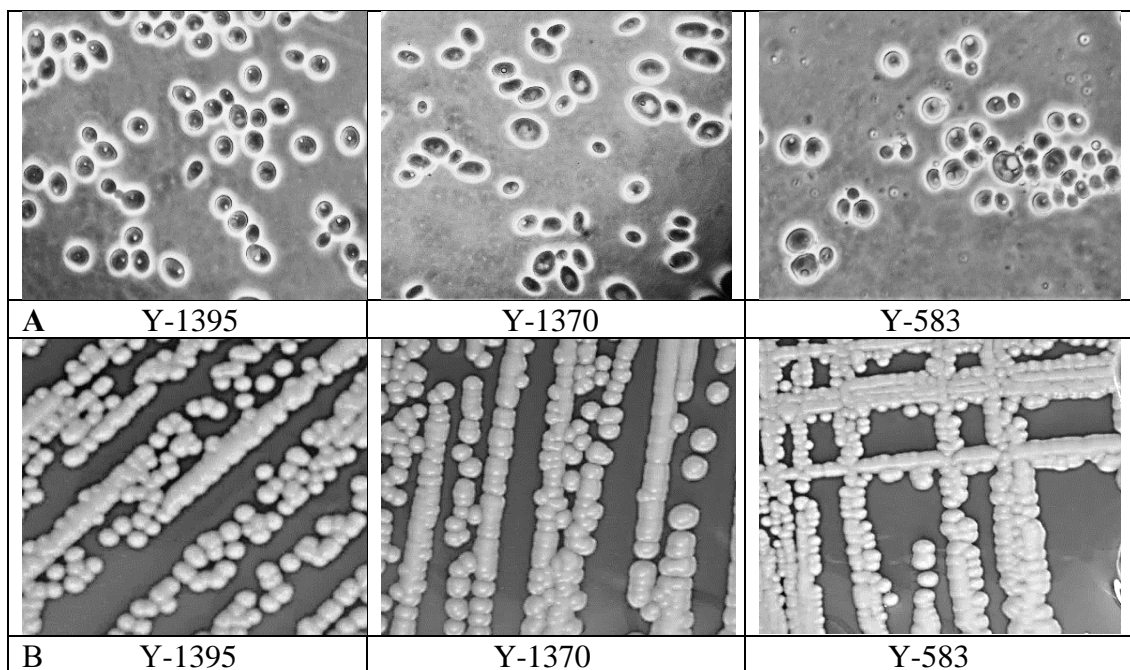


Рисунок 2. Филогенетический анализ ITS-последовательности штамма Y-1370. Выравнивание последовательностей произведено алгоритмом ClustalW, филогенетическое дерево построено методом наибольшего правдоподобия, количество реплик 1000. Анализируемая последовательность отмечена черным квадратом.

Figure 2. Phylogenetic analysis of strain Y-1395 ITS-sequence. The alignment was performed by the ClustalW algorithm, the phylogenetic tree was constructed using the Maximum Likelihood method, with 1000 replicates. The analyzed sequence is depicted as a black box.

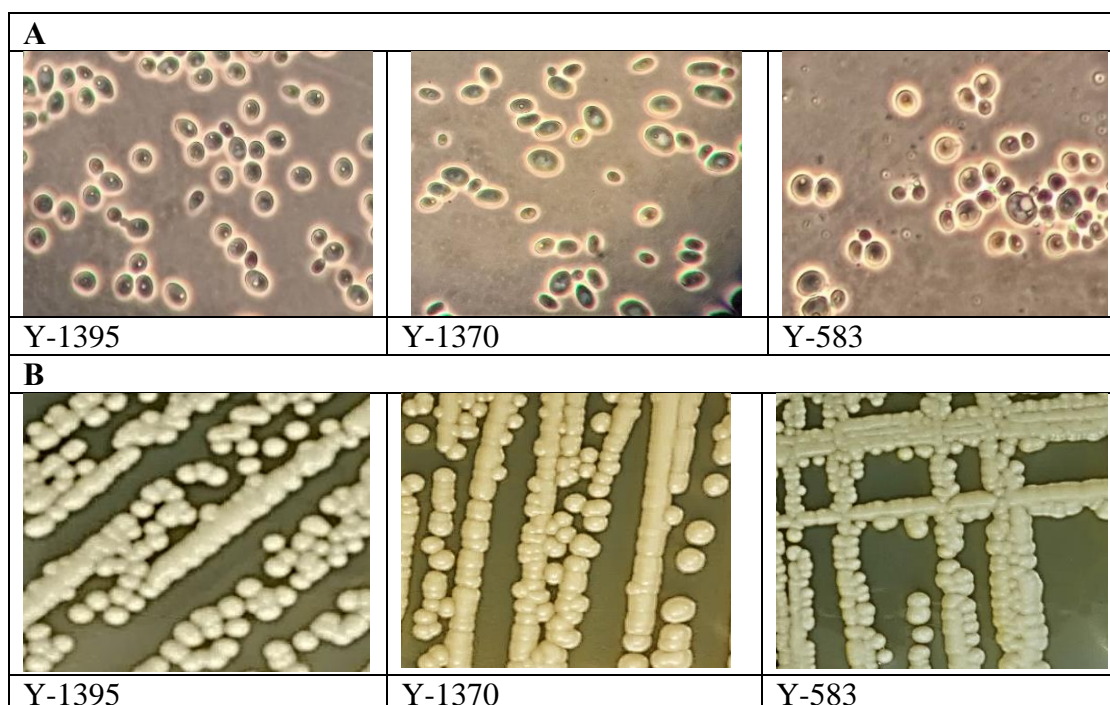


Рисунок 2А. Нуклеотидная последовательность ITS-фрагмента штамма дрожжей Y-1370.

Figure 2A. Nucleotide sequence of fungal strain Y-1370ITS fragment

>Y-1370

СТАСТГАТТГАГГТСАГСТТАГААГГТТГТТСАГССГАГСТСТГССТГГААГТСТГТ
СТГГААААТААСГАТТГГСАГААССААТАСАТТАТТТССГСССАГАГГАТТТСТА
ГГГГГАГСТСТГССТАГАГТАТТТСААГТТААСАСАГАГТАТСАТСААТАССААГТ
ССССТАГАГГАТСТТГАГАГАГАААТГАСГСТСАААСАГГСАТГСТСТСТГГААТГ
ССАГАГАГССААТАТГСГТТСАААГАТТСГАТГАТТСАСГААААССТГСААТТСА
САТТАСГАТСГСАТТТСГСТГСГТТСТТСАТСГТТГСГАГААССААГАГАТССГТТ
ГТТГАААГТТТТГААГАТТААААТТСАААТТГАСТАГТТТСТАГАГААААТАААТТТ
СТГТГТТТААААССТТТГГСАГАГССАААГСААААГААГСААААТАСАТСТГТГАТ
ТГГТТГГАГССГСГСТАГААГССАГГСССАГГТТСТТААТГАТССТТССГСАГГТ
ТСАССТАСГГАААССТТГТТАСГАСТТТТАСТТССТСТА

Рисунок 3. Филогенетический анализ ITS-последовательности для штамма Y-1395. Выравнивание последовательностей произведено алгоритмом ClustalW, филогенетическое дерево построено методом наибольшего правдоподобия, количество реплик 1000. Анализируемая последовательность отмечена черным кружком.

Figure 3. Phylogenetic analysis of strain Y-1370 ITS-sequence. Alignment was performed by the ClustalW algorithm, phylogenetic tree was constructed using the Maximum Likelihood method, with 1000 replicates. The analyzed sequence is denoted by a black circle.

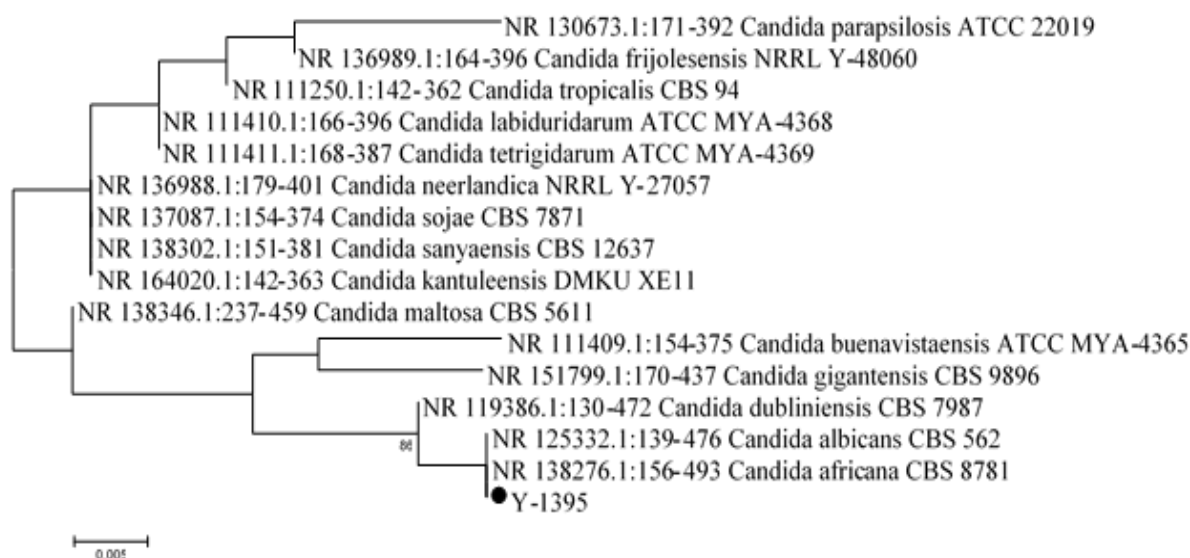


Рисунок 3А. Нуклеотидная последовательность ITS-фрагмента штамма дрожжей Y-1395.

Figure 3A. Nucleotide sequence of fungal strain Y-1395 ITS fragment.

>Y-1395

СТАСТGATTGAGGTCAAGTTTGAAGATATACGTGGTGGACGTTACCGCCGCAAGCA
ATGTTTTTGGTTAGACСТАAGCCATTGTCAAAGCGATCCCGCCTTACCACTACCGTCT
TTCAAGCAAACCCAAGTCGTATTGCTCAACACCAAACCCAGCGGTTTGAGGGAGAA
ACGACGCTCAAACAGGCATGCCCTCCGGAATACCAGAGGGGCGCAATGTGCGTTCAA
AGATTTCGATGATTCACGAATATCTGCAATTCATATTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTT
CTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGACTATTA

Рисунок 4. Образование биопленки и гифальных проростков у дрожжеподобных клеток кандид при культивировании на кукурузном агаре; ×2500.

Figure 4. Hyphal sprout formation in *Candida* yeast-like cells cultured on corn agar; ×2500.

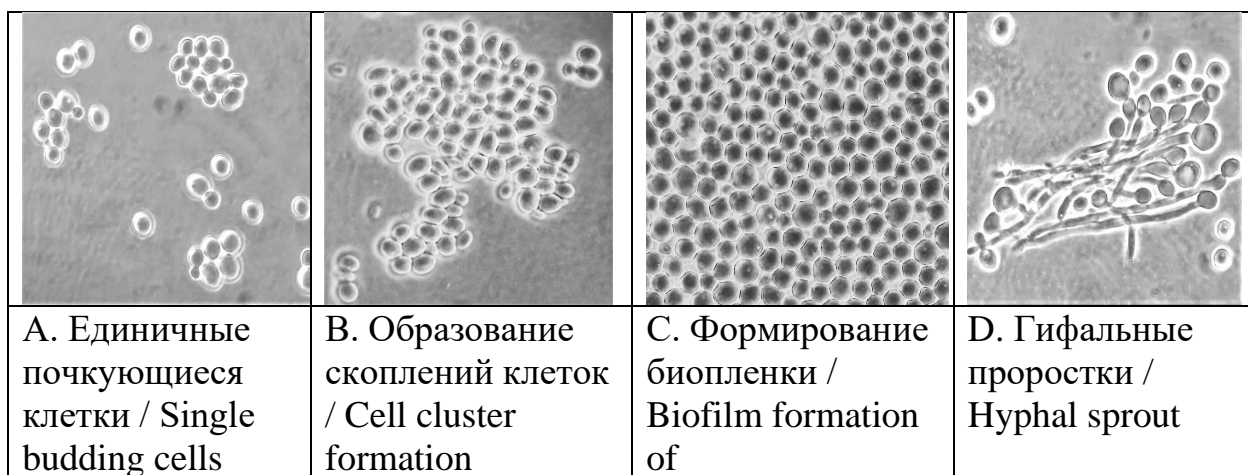
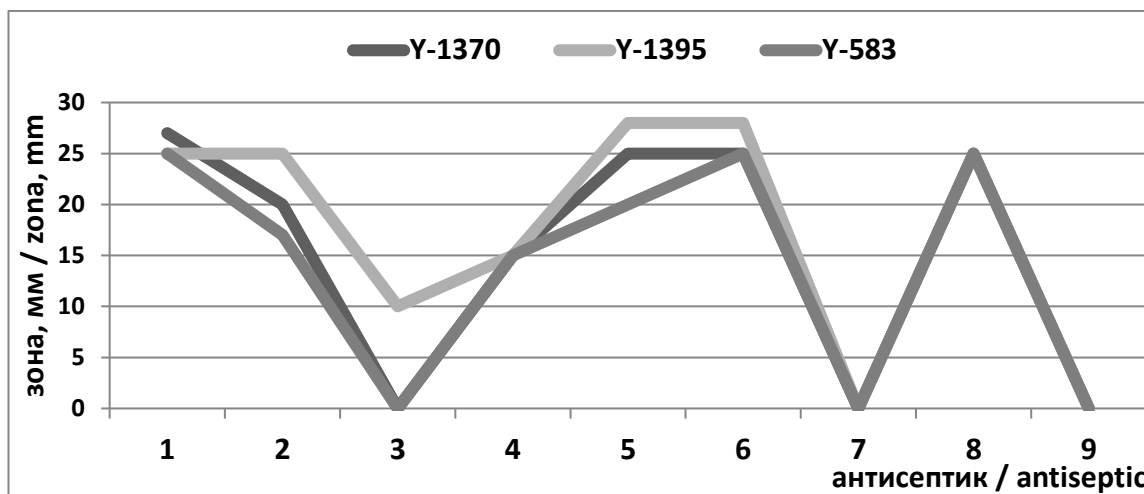


Рисунок 5. Определение чувствительности штаммов исследуемых грибов к антисептикам.

Figure 5. Determination of antiseptics fungal strain sensitivity.



Обозначения: 1 – «Октенисепт»; 2 – «Хлоргексидин биглюканат» 0,05%; 3 – настойка календулы; 4 – настойка эвкалипта; 5 – масляный экстракт розмарина, 6 – масляный экстракт сандала, 7 - масляный экстракт лаванды; 8 – 70% этанол; 9 – физиологический раствор.

Comments: 1 - "Octenisept"; 2 - "Chlorhexidine biglucanate" 0,05%; 3 - calendula tincture; 4 - eucalyptus tincture; 5 - rosemary oil extract, 6 - sandalwood oil extract, 7 - lavender oil extract; 8 - 70% ethanol; 9 - physiological solution

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Андреева Ирина Сергеевна, канд. биол. наук, доцент, ведущий научный сотрудник;

адрес: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область;

телефон: 8(913)946-58-22;

e-mail: andreeva_is@vector.nsc.ru

Irina S. Andreeva, PhD (Biol.), Associate Professor, Leading Researcher of the Department of Biophysics and Ecological Research;

Federal Budgetary Research Institution State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector” Rospotrebnadzor;

address: 630559, r.p. Koltsovo, Novosibirsk region;

telephone: 8(913)946-58-22;

e-mail: andreeva_is@vector.nsc.ru

Блок 2. Информация об авторах

Морозова Вера Витальевна канд. биол. наук, старший научный сотрудник;

адрес: 630090 пр. Академика Лаврентьева, 8, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия;

телефон: 8(913)920-62-56;

e-mail: morozova@niboch.nsc.ru

Vera V. Morozova, PhD (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Microbiology;

address: 630090, Academician Laurentiev Avenue, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia;

telephone: 8(913)920-62-56;

e-mail: morozova@niboch.nsc.ru

Кабанов Алексей Сергеевич - канд. биол. наук, старший научный сотрудник

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный Научный
Центр Вирусологии и Биотехнологии «Вектор» (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора)ж

адрес: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская областьж

телефон: 8(913)716-20-92;

e-mail: kabanov@vector.nsc.ru

Alexey S. Kabanov, PhD (Biol.), Senior Researcher of the Department "Collection
of Microorganisms"; Federal Budgetary Research Institution State Research Center
of Virology and Biotechnology “Vector” Rospotrebnadzor;

telpehone: 8(913)716-20-92;

e-mail: kabanov@vector.nsc.ru

Блок 3. Метаданные статьи

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К
АНТИМИКОТИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ
ДРОЖЖЕЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИИ ДЫХАТЕЛЬНЫХ
ПУТЕЙ

IDENTIFICATION AND DETERMINATION OF RESISTANCE TO
ANTIMYCOTIC FACTORS OF YEAST ISOLATES IN RESPIRATORY
DISEASE

**IDENTIFICATION AND DETERMINATION OF RESISTANCE TO
ANTIMYCOTIC FACTORS IN YEAST CLINICAL ISOLATES DURING
RESPIRATORY DISEASES**

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

ИДЕНТИФИКАЦИЯ, РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ДРОЖЖЕЙ
IDENTIFICATION, YEAST FUNGAL RESISTANCE

Ключевые слова: дрожжеподобные грибы; кандидоз; бронхолегочная инфекция; клинические изоляты; *Candida utilis*; *Candida albicans*; резистентность к антимикотикам.

Keywords: yeast-like fungi; candidiasis; bronchopulmonary infection; clinical isolates; *Candida utilis*; *Candida albicans*; resistance to antimycotics.

Оригинальная статья.

Количество страниц текста – 12, количество таблиц – 2, количество рисунков – 5.

05.04.2024.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	Ф.И.О., название публикации и источника на английском языке	Полный интернет-адрес (ГКД) цитируемой статьи и/или ее DOI
1	Бабьева И.П., Чернов И.Ю. Биология дрожжей. Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2004. 221 с.	Babieva I.P., Chernov I.Yu. Biology of yeast. Moscow: Partnership of scientific editions of KMK, 2004, 221 с.	https://studfile.net/preview/15929972/
2	Габриэлян Н.И., Горская Е.М., Крупенио Т.В., Зенкова В.А., Ефименко Т.А., Маланичева И.А., Сумарукова И.Г., Ефременкова О.В., Евлашкина В.Ф., Давыдов Д.С. Оценка антимикробной активности бациллярного пробиотика <i>Bacillus subtilis</i> (штамм 534) // Эпидемиология и инфекционные	Gabrielyan N.I., Gorskaya E.M., Krupenio T.V., Zenkova V.A., Efimenko T.A., Malanicheva I.A., Sumarukova I.G., Efremenkova O.V., Evlashkina V.F., Davydov D.S. Evaluation of the antimicrobial activity of the bacterial probiotic <i>Bacillus subtilis</i> -534. Epidemiology and Infectious Diseases. Actual issues, 2016, no. 1, pp. 41-47.	https://www.elibrary.ru/download/elibrary_25478926_16484353.pdf

	болезни. Актуальные вопросы» 2016. № 1. С. 41–47.		
3	Годовалов А.П., Быкова Л.П., Ожгибесов Г.П. Значение грибов рода <i>Candida</i> при воспалительных заболеваниях дыхательных путей // Сибирский медицинский журнал. 2008. № 7. С. 10–12.	Godovalov A.P., Bykova L.P., Ozhgibesov G.P. Significance of <i>Candida</i> in inflammatory diseases of respiratory tract. Siberian Medical Journal, 2008, no. 7, pp.10-12.	https://cyberleninka.ru/article/n/znachenie-gribov-roda-candida-pri-vospalitelnyh-zabolevaniyah-dyhatelnyh-putey/viewer
4	Капустина О.А., Карташова О.Л., Потехина Л.П., Уткина Т.М. Биопленкообразование <i>Candida</i> spp., выделенных из разных биотопов тела человека // Проблемы медицинской микологии. 2011. Т.13, № 2. С. 81–82.	Kapustina O.A., Kartashova O.L., Potekhina L.P., Utkina T.M. Biofilm formation of <i>Candida</i> isolated from different human's biotopes. Problems in medical mycology, 2011, vol. 13, no. 2, pp. 81–82.	https://mycology.szgmu.ru/files/MAPO_2_2011_A4_lowres_01-06-2011.pdf

5	Кольцов И.П., Стрельникова Н.В., Витько Е.В., Витько Л.Г., Савлюк О.Е. Микробиологические свойства условно-патогенных сахаромицетов рода <i>Candida</i> при хронических, рецидивирующих инфекционно-воспалительных процессах (обзор литературы) // Тихоокеанский медицинский журнал. 2023. № 1. С. 19–26.	Koltsov I.P., Strelnikova N.V., Vitko E.V., Vitko L.G., Savlyuk O.E. Microbiological properties of opportunistic saccharomycetes of the genus <i>Candida</i> in chronic, recurrent infectious inflammatory processes (literature review). Pacific Medical Journal, 2023, no.1, pp. 19–26.	DOI: 10.34215/1609-1175-2023-1-19-26
6	Лыков И.Н., Викторова А.С., Муравьева А.С., Петелина К.О. Скрининг эфирных масел на предмет их антимикробной активности // Международный научно-исследовательский	Lykov I.N., Viktorova A.S., Muravyeva A.S., Petelina K.O. Screening of essential oils for their antimicrobial activity. International Research Journal, 2023, no. 8 (110), part 2, pp. 19-23.	https://cyberleninka.ru/article/n/skrining-efirnyh-masel-na-predmet-ih-antimikrobnoy-aktivnosti/viewer DOI: 10.23670/IRJ.2021.110.8.039

	журнал. 2023. № 8 (110), Часть 2, С. 19–23.		
7	Маланичева И.А., Козлов Д.Г., Ефименко Т.А., Зенкова В.А., Катруха Г.С., Резникова М.И., Королев А.М., Борщевская Л.Н., Тарасова О.Д., Синеокий С.П., Ефременкова О.В. Новые антибиотики, образуемые штаммами <i>Bacillus subtilis</i> // Микробиология. 2014. Т. 83, № 4. С. 445–450.	Malanicheva I.A., Kozlov D.G., Efimenko T.A., Zenkova V.A., Katrukha G.S., Reznikova M.I., Korolev A.M., Borshchevskaya L.N., Tarasova O.D., Sineokii S.P., Efremenkova O.V. New antibiotics produced by <i>Bacillus subtilis</i> strains. Microbiologia, 2014, vol. 83, no. 4, pp. 445-450.	DOI: 10.7868/S0026365614040119
8	МУК 4.2.1890-04 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. Москва: Федеральный центр	MUK 4.2.1890-04 Determination of sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs: Methodological guidelines. - Moscow: Federal Center of Gossanepidnadzor of the Ministry of Health of Russia, 2004. 91 p.	https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293754/4293754463.pdf?ysclid=ltg2iq3lzw569628646

	госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. 91 с.		
9	Николаева Е.Н. Частота встречаемости в полости рта дрожжеподобных грибов рода <i>Candida</i> при остром респираторном заболевании // Международный научно-исследовательский журнал. 2013. № 5. С. 69–70.	Nikolaeva E.N. The frequency of occurrence in the mouth yeast-like fungi of the genus <i>Candida</i> with acute respiratory diseases. International Research Journal, 2013, vol. 12, no. 5, pp.69-70.	https://elibrary.ru/item.asp?id=19077906
10	Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М. Определитель патогенных и условно патогенных грибов. Москва: Мир, 2001. 468 с.	Sutton D., Fothergill A., Rinaldi M. The determination of pathogenic and conditionally pathogenic fungi. Moscow: The World, 2001. 468 p.	https://www.libex.ru/qna/ref/isbn/
11	Сачивкина Н.П., Ленченко Е.М. Эффективные способы идентификации	Sachivkina N.P., Lenchenko E.M. Effective ways to identify yeast-like fungi of the genus <i>Candida</i> . The	DOI: 10.30896/0042-4846.2019.22.2.25-28

	дрожжеподобных грибов рода <i>Candida</i> // журнал Ветеринария. 2019. № 2. С. 25-28.	Veterinary Journal, 2019, no. 2, pp. 25-28.	
12	Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.Б. Кандидоз. Природа инфекции, механизмы агрессии и защиты, лабораторная диагностика, клиника и лечение. Москва: Триада, 2001. 472 с.	Sergeev A.Yu., Sergeev Yu.B. Candidiasis. Nature of infection, mechanisms of aggression and protection, laboratory diagnosis, clinic and treatment. Moscow: Triada, 2001, 472 p.	https://www.researchgate.net/publication/315652692_Candidosis_In-Russian-Kandidoz-priroda_infekcii_mehanizmy_agressii_i_zasity_laboratornaa_diagnostika_klinika_i_lecenie_472_pp
13	Шаповал О.Г., Шереметьева А.С., Дурнова Н.А., Мухамадиев Н.К., Раббимова Г.Т., Назирбеков М.Х. Антимикробная активность эфирных масел <i>Thymus serpyllum</i> L. и <i>Thymus marschallianus</i> Willd. в отношении <i>Candida albicans</i> // Химиико-фармацевтический	Shapoval O.G., Sheremetyeva A.S., Durnova N.A., Mukhamadiev N.Q., Rabbimova G.T., Nazirbekov M.K. Antimicrobial activity of essential oils of <i>Thymus serpyllum</i> L. and <i>Thymus marschallianus</i> Willd. against <i>Candida albicans</i> . Chemical and Pharmaceutical Journal, 2023, vol. 57, no. 9, pp. 26-31.	DOI: 10.30906/0023-1134-2023-57-9-26-31

	журнал. 2023. Т. 57, № 9. С. 26–31.		
14	Borman A.M., Szekely A., Linton C.J., Palmer M.D., Brown Ph., Johnson E.M. Epidemiology, antifungal susceptibility, and pathogenicity of <i>Candida africana</i> isolates from the United Kingdom. J. Clin. Microbiol., 2013, vol. 51, no. 3, pp. 967-972.	-	DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e03619
15	Cannon R.D., Holmes A.R., Mason A.B., Monk B.C. Oral candida: clearance, colonization, or candidiasis? J. Dent. Res., 1995, vol. 74, no. 5, pp. 1152-1161.	-	DOI: 10.1177/0022034595074005030 1
16	Cavalheiro M, Teixeira M.C. <i>Candida</i> biofilms: threats, challenges, and promising	-	DOI:10.3389/fmed.2018. 00028

	strategies. Front. Med. (Lausanne), 2018, vol. 5, 28.		
17	Cortegiani A., Misseri G., Fasciana T., Giammanco A., Giarratano A., Chowdhary A. Epidemiology, clinical characteristics, resistance, and treatment of infections by <i>Candida auris</i> . J. Intensive Care., 2018, vol. 6, 69.	-	DOI: 10.1186/s40560-018-0342-4
18	Gardes M., Bruns T.D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. Molecular Ecology. 2008, vol. 2, no. 2, pp. 113–118.	-	DOI: 10.1111/j.1365-294x.1993.tb00005.x
19	Gow N.A.R., Yadav B. Microbe Profile: <i>Candida albicans</i> : a shape-changing, opportunistic pathogenic	-	DOI: 10.1099/mic.0.000499

	fungus of humans. Microbiology, 2017, vol. 163, no. 8, pp.1145–1147.		
20	Jindal N., Arora S., Dhuria N., Arora D. <i>Cyberlindnera (Pichia) fabianii</i> infection in a neutropenic child: importance of molecular identification. J. Med. Microbiol. Case Reports, 2015, vol. 2, no. 4, pp. 1–3.	-	DOI: 10.1099/jmmcr.0.000033
21	Lukić-Grlić A., Mlinarić-Missoni E., Škarić I., Važić-Babić V., Svetec I.-K. <i>Candida utilis</i> candidaemia in neonatal patients. J. Med. Microbiol., 2011, vol. 60, no. 6, pp. 838–841.	-	DOI: 10.1099/jmm.0.023408-0
22	Mayer F.L., Wilson D., Hube B. <i>Candida albicans</i> pathogenicity	-	DOI: 10.4161/viru.22913

	mechanisms. <i>Virulence</i> , 2013, vol. 4, no. 2, pp. 119–128.		
23	Ostrosky-Zeichner L., Al-Obaidi M. Invasive fungal infections in the intensive care. <i>Unit. Infect. Dis. Clin. North Am.</i> , 2017, vol. 31, no. 3, pp. 475–487.	-	DOI: 10.1016/j.idc. 2017.05.005
24	Sahal G., Bilkay I.S. Distribution of clinical isolates of <i>Candida</i> spp. and antifungal susceptibility of high biofilm-forming <i>Candida</i> isolates. <i>Rev. Soc. Bras. Med. Trop.</i> , 2018, vol. 51, no. 5, pp. 644–650.	-	DOI: 10.1590/0037-8682-0136-2018
25	Welsh R.M., Bentz M.L., Shams A., Houston H., Lyons A., Rose L.J., Livintseva A.P. Survival, persistence, and isolation of the emerging multidrug-resistant	-	DOI: 10.1128/JCM.00921-17

	pathogenic yeast <i>Candida auris</i> on a plastic health care surface. J. Clin. Microbiol., 2017, vol. 55, no. 10, pp. 2996–3005.		
26	Sherwood J., Gow N.A., Gooday G.W., Gregory D.W., Marshall D. Contact sensing in <i>Candida albicans</i> : a possible aid to epithelial penetration. J. Med. Vet. Mycol., 1992, vol. 30, no. 6, pp. 461–469.	-	DOI: 10.1080/02681219280000621
27	Shih M.H., Sheu M.M., Chen H.Y., Lin S.R. Fungal keratitis caused by <i>Candida utilis</i> – case report. Kaohsiung J. Med. Sci., 1999, vol.15, no. 3, pp. 171–174.	-	https://researchoutput.ncku.edu.tw/en/publications/fungal-keratitis-caused-by-candida-utilis-case-report
28	Sreelekshmi T.S., Ninan M.M., Premanand A., Chacko A., Sahni R.D., Michael J.S. <i>Candida utilis</i> : a	-	DOI: 10.1099/acmi.0.000281

	rare cause of septicemia in children. Access Microbiology, 2021, vol. 3, no 10, 000281.		
29	Treguier P., David M., Gargala G., Camus V., Stamatoullas A., Menard A.-L., Lenain P., Contentin N., Lemasle E., Lanic H., Tilly H., Jardin F., Lepretre S. <i>Cyberlindnera jadinii</i> (teleomorph <i>Candida utilis</i>) candidaemia in a patient with aplastic anaemia: a case report. JMM Case Rep., 2018, vol. 5, no. 8, e005160.	-	DOI: 10.1099/jmmcr.0.005160