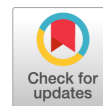


ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИМИКОТИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ ДРОЖЖЕЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИИ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ



И.С. Андреева¹, В.В. Морозова², А.С. Кабанов¹

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

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

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

Адрес для переписки:

Андреева Ирина Сергеевна
630559, Россия, Новосибирская область, п. Кольцово,
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».
Тел.: 8 (913) 946-58-22.
E-mail: andreeva_is@vector.nsc.ru

Contacts:

Irina S. Andreeva
630559, Russian Federation, Novosibirsk Region, Koltsovo,
State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector".
Phone: +7 (913) 946-58-22.
E-mail: andreeva_is@vector.nsc.ru

Для цитирования:

Андреева И.С., Морозова В.В., Кабанов А.С. Идентификация и определение резистентности к антимикотическим факторам клинических изолятов дрожжей, выделенных при заболевании дыхательных путей // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 5. С. 961–970.
doi: 10.15789/2220-7619-IAD-17630

Citation:

Andreeva I.S., Morozova V.V., Kabanov A.S. Identification and determination of resistance to antimycotic factors in yeast clinical isolates during respiratory diseases // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i mmunitet, 2024, vol. 14, no. 5, pp. 961–970. doi: 10.15789/2220-7619-IAD-17630

Генетический анализ штаммов дрожжей проведен при частичном финансировании государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300043-8, а также при поддержке федерального проекта «Санитарный щит страны — безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)» в рамках «Создание национального интерактивного каталога патогенных микроорганизмов и биотоксинов».

Genetic analysis of yeast strains was carried out under partial funding of the state assignment of IHBFM SB RAS No. 121031300043-8, and also supported by the federal project "Sanitary shield of the country — safety for health (prevention, detection, response)" within the framework of "Creation of a national interactive catalogue of pathogenic microorganisms and biotoxins".

исследуемых штаммов патогенных дрожжей и типовой контрольный штамм *C. albicans* Y-583 секретиремых 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.

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 State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

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

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.

Key words: yeast-like fungi, candidiasis, bronchopulmonary infection, clinical isolates, *Candida utilis*, *Candida albicans*, resistance to antimycotics.

Введение

Дрожжеподобные грибы широко распространены во внешней среде, на листьях и плодах растений, в почве, воде, в организме человека и животных, являются эндосимбионтами насекомых, считаются условно-патогенными, но при определенных условиях способны вызывать как поверхностные, так и инвазивные инфекционные процессы [16]. Кандидамикоз (кандидоз) — известное заболевание кожи и слизистых оболочек полости рта, урогенитального тракта, имеет локальный характер, но при ослаблении иммунитета, способен переходить в генерализованную форму, вызывать опасные для жизни инфекции кровотока, инвазивный кандидоз внутренних органов [14]. Грибы рода *Candida* являются сапротрофами, входят в состав постоянно живущих в микробиоме здоровых людей микроорганизмов [21], к патогенезу имеет отношение 21 вид, среди которых доминирующим является оппортунистический гриб *C. albicans*, определяемый в 90% случаев поверхностного и инвазивного кандидомикоза [11]. Реже среди возбудителей инфекционных про-

цессов встречаются виды этого рода *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis* [11]. Развитие инфекционных процессов, вызванных *Candida utilis*, до недавнего времени были крайне редки: в литературе встречались единичные публикации, где была показана патогенность этого вида. *C. utilis*, преимущественно, встречалась в крови у детей в возрасте 0–3 месяцев, длительно находящихся в отделении интенсивной терапии, обнаружена также у людей с ослабленным иммунитетом [4, 29].

Развитию кандидозной инфекции способствуют несколько факторов и видов активности, которые усиливают патогенный потенциал грибка. Среди них наличие молекул адгезии, формирование биопленки [13], способность проникновения кандид в тканевые структуры благодаря морфологической трансформации клеток в гифальную форму [18]. Гифы в тканях распространяются быстрее, чем дрожжевая форма, что облегчает миграцию кандид через поврежденные ткани и является признаком начала образования биопленки с последующим накоплением внеклеточного матрикса [2]. Наличие биопленки

уменьшает восприимчивость кандид к антимикотическим препаратам, защищает от факторов иммунитета. Возможность горизонтального переноса генов в биопленке обеспечивает более успешную адаптацию к условиям среды, способствует развитию полирезистентности кандид к антимикотическим препаратам, что затрудняет лекарственную терапию [15, 17, 27]. Перспективным направлением для комплексного лечения при хронических инфекционных заболеваниях, включая кандидоз, может стать применение непатогенных бактерий-антагонистов рода *Bacillus* или других микроорганизмов, используемых в качестве пробиотиков [20, 28].

Анализ видового состава и свойств патогенных дрожжеподобных грибов, исследование действия антимикотических препаратов на биопленки, сформированные грибами рода *Candida*, определение механизмов возникновения резистентности к антимикотическим препаратам, поиск новых эффективных антигрибковых препаратов является актуальной задачей современной медицины [8].

Целью настоящей работы является идентификация и определение резистентности к антимикотическим препаратам клинических изолятов дрожжеподобных грибов, ставших причиной тяжелых хронических, генерализованных заболеваний бронхолегочной системы.

Материалы и методы

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

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

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

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

Морфологию выделенных микроорганизмов исследовали при наблюдении живых и фиксированных, окрашенных препаратов клеток

с применением микроскопа Axioskop 40 (Carl Zeiss, Германия). Физиологические и биохимические признаки изолятов дрожжей выполняли стандартными методами, способность к утилизации углеводов учитывали, высевая культуры на среды Гисса [10, 22].

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

Определение чувствительности выделенных клинических изолятов к секретрируемым метаболитам штаммов бацилл *B. subtilis* и *B. licheniformis* выполняли методом отсроченного антагонизма [19].

Для определения чувствительности изолятов дрожжей Y-1370 и Y-1395 к антисептикам на агаризованную питательную среду Сабуро в чашку Петри вносили 100 мкл суточной исследуемой культуры с концентрацией клеток 10⁹ КОЕ/мл. В асептических условиях в засеянной среде делали лунки и вносили в каждую по 50 мкл препаратов: «Октенисепт» (Octenisept, Германия), «Хлоргексидин биглюканат» 0,05% (Петрофарм, Россия); настойка календулы (ООО «Гиппократ», Россия); настойка эвкалипта (ООО «Косметик Ленд», Россия); 10% масляные экстракты розмарина, сандала, лаванды (Китай). В качестве контроля в лунки вносили по 50 мкл 70% этилового спирта и физиологического раствора. Инкубировали высевы в течение 24–48 ч, при температуре 37°C. Чувствительность микроорганизма к препарату определяли по наличию и размеру зоны угнетения роста вокруг лунки с антисептиком (использованы средние данные по трем повторам опыта).

Таксономическую принадлежность изолятов определяли по суммарным результатам фенотипического и геномного анализа. Для идентификации исследуемых дрожжей молекулярно-генетическими методами использовали ITS (последовательность межгенного рибосомального спейсера). ДНК дрожжей выделяли из суспензий микроорганизмов с использованием набора «ДНК-технология» (ДНК-Технология, Россия) по методике производителя. Реакцию амплификации ITS-фрагмента дрожжевой ДНК вели с использованием олигонуклеотидов ITS1 и ITS4 для первого раунда ПЦР (полученный фрагмент ~600 н.п.), ITS3 и ITS4 для второго раунда ПЦР (~300 н.п.) [3]. В качестве матрицы использовали выделенную геномную ДНК, реакцию вели с использованием SP-Taq-ДНК-полимеразы (СибЭнзим, Россия). Полученные ПЦР-фрагменты очищали элюцией из GTG-

агарозы (Lonza, Израиль). Реакцию секвенирования полученных ПЦР-фрагментов проводили с использованием тех же олигонуклеотидов и реактива BigDye v.3.1 (Applied Biosystems, США) в стандартных условиях. Электрофоретическое разделение продуктов реакции секвенирования вели с использованием прибора «ABI Sequencing Analyzer 3500». Полученные последовательности анализировали с использованием программного обеспечения ABI Sequence Scanner и FinchTV 4.1. Сравнение последовательностей с имеющимися в базе данных NCBI GenBank database (ncbi.nlm.nih.gov) референсными последовательностями рибосомальных спейсеров дрожжей проводили с использованием алгоритма BLASTN. Филогенетический анализ для наиболее близких к исследуемым последовательностей проводили в программе MEGA 7.0.21.

Результаты

Изолят Y-1370 выделен при анализе микробной генерализованной инфекции пациента с диагнозом пневмония и летальным исходом. Пять образцов материалов от больного (моча, смывы из ротоглотки, носоглотки) в избытке содержали эукариотические клетки капсулированных, почкующихся дрожжеподобных грибов на разных стадиях жизненного цикла, с диаметром до 5 мкм (рис. 1А), образующих на агаре Сабуро белые, пастообразной консистенции, куполообразные, непрозрачные колонии со специфическим (дрожжевым) запахом (рис. 1Б). Пять полученных чистых культур оказались идентичными, с положительной

окраской по Граму, отрицательной реакцией по уреазе. Выделенные культуры проявили способность к анаэробному росту, ферментации глюкозы, мальтозы и лактозы до кислоты, в результате геномного анализа они идентифицированы как принадлежащие к виду *Cyberlindnera jadinii* (телеморфа *Candida utilis*).

Изолят дрожжей Y-1395 выделен при высеве мокроты пациентки с хроническим бронхитом на среду Сабуро в виде множества колоний белого цвета, куполообразных, матовых, непрозрачных, пастообразной консистенции, образованных грамположительными, капсулированными, почкующимися клетками, размером 2–5 мкм, активно утилизирующими глюкозу и сахарозу. От вида *Candida albicans* данный изолят дрожжей отличала утилизация сахарозы, неспособность к усвоению мальтозы и к росту при 42–45°C. В результате геномной и фенотипической идентификации изолят дрожжей Y-1395 определен как относящийся к виду *Candida africana* — дрожжеподобным оппортунистическим грибам, также имеющим клиническое значение в развитии кандидозов [25].

Идентификация изолятов дрожжей с использованием последовательностей межгенных рибосомальных спейсеров приведена на рис. 2 и 3. Последовательности ITS-фрагментов приведены на рис. 4 и 5.

В зависимости от температурных условий роста кандиды способны менять морфологию клеток. Диапазон температур от 37 до 40°C содействует образованию гифальных форм, характерных для инвазивных процессов. Исследуемые штаммы кандид хорошо

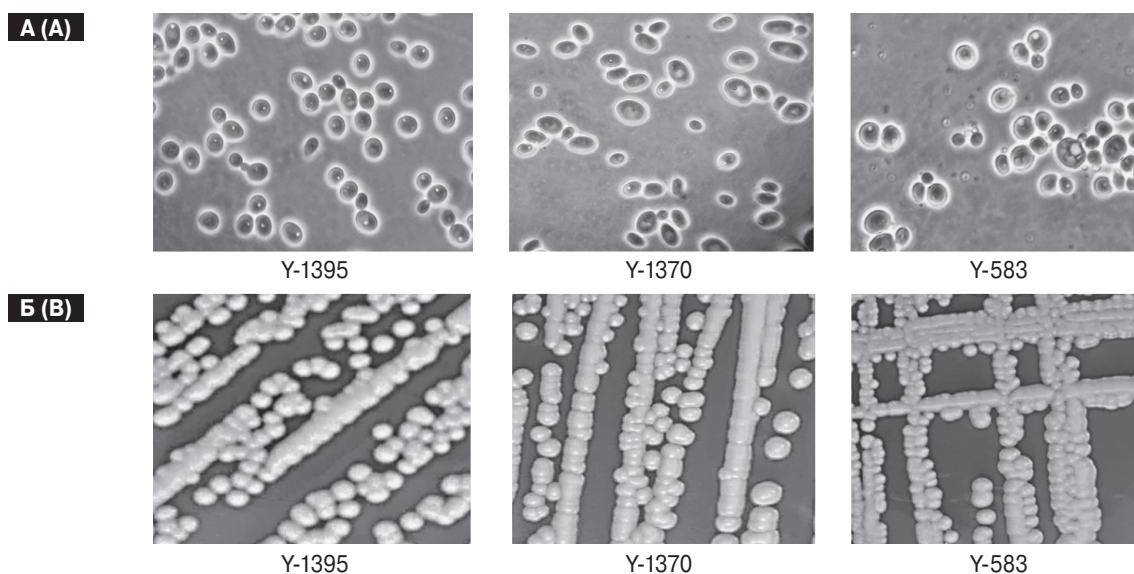


Рисунок 1. Морфология клеток (А, ×2500) и колоний (Б) штаммов дрожжей Y-1370, Y-1395, Y-583 (типовой штамм *Candida albicans*)

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

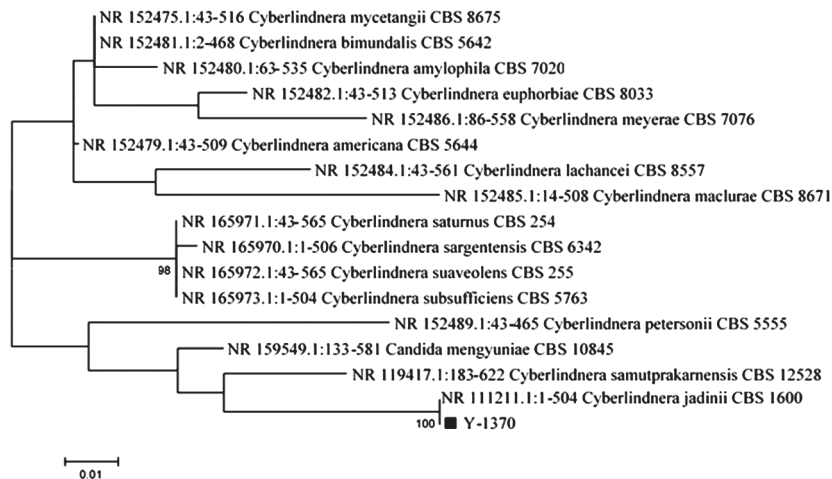


Рисунок 2. Филогенетический анализ ITS-последовательности штамма Y-1370. Выравнивание последовательностей произведено алгоритмом ClustalW, филогенетическое дерево построено методом наибольшего правдоподобия, количество реплик 1000. Анализируемая последовательность отмечена черным квадратом

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

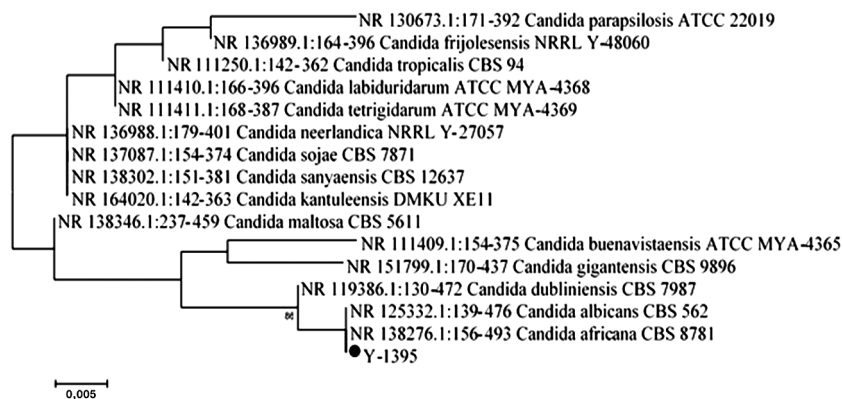


Рисунок 3. Филогенетический анализ ITS-последовательности для штамма Y-1395. Выравнивание последовательностей произведено алгоритмом ClustalW, филогенетическое дерево построено методом наибольшего правдоподобия, количество реплик 1000. Анализируемая последовательность отмечена черным кружком

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

>Y-1370

```

CTACTGATTGAGGTCAGCTTAGAAGGTTGTTTCAGCCGAGCTCTGCCTGGAAGTCTGTCTGGAAA
ATAACGAGTTGGCAGAACCTAATACATTAATTCGGCCAGAGGATTTCTAGGGGGAGCTCTGCC
TAGAGTATTTCAAGTTAACACAGAGTATCACTCAATACCAAGTCCCCTAGAGGATCTTGAGAGA
GAAATGACGCTCAAACAGGCATGCTCTGGAATGCCAGAGAGCGCAATATGCGTTCAAAGATT
CGATGATTCACGAAAACCTGCAATTCACATTACGTATCGCATTTGCGTTCGCTTCTCATCGTTG
CGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGAAGATTAATTCAAATGACTAGTTTCTAG
AGAAAATAAATTTCTGTGTTTAAACCTTTGGCAGAGCCAAAGCAAAGAAGCAAATACACTG
TGTATTGTTGGAGCCGCTAGAACGCCAGGCCAGGTTCTCTAATGATCCTTCCGCGAGTTT
ACCTACGAAAACCTTGTTACGACTTTTACTTCTCTA

```

Рисунок 4. Нуклеотидная последовательность ITS-фрагмента штамма дрожжей Y-1370

Figure 4. Nucleotide sequence of fungal strain Y-1370ITS fragment

>Y-1395

СТАСТГАТТGAGGTCAAGTTTGAAGATATACGTGGTGGACGTTACCGCCGCAAGCAATGTTTT
 GGTTAGACCTAAGCCATTGTCAAAGCGATCCCGCCTTACCACTACCGTCTTTCAAGCAAACCC
 AGTCGTATTGCTCAACACCAACCCAGCGGTTTGAGGGAGAAACGACGCTCAAACAGGCATGCC
 CTCCGGAATACCAGAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTACGAATATCTGCAATT
 САТАТТАСГТАТСГСАТТТСГСТСГТТТТСАТСГАТГСГГААССААГАГАТССГТТТГТГА
 ААГТТТТАСТАТТА

Рисунок 5. Нуклеотидная последовательность ITS-фрагмента штамма дрожжей Y-1395

Figure 5. Nucleotide sequence of fungal strain Y-1395 ITS fragment

**Рисунок 6. Образование биопленки и гифальных проростков у дрожжеподобных клеток кандид при культивировании на кукурузном агаре; ×2500**Figure 6. Hyphal sprout formation in *Candida* yeast-like cells cultured on corn agar; ×2500**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	Амфотерицин В Amphotericin B
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) — 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

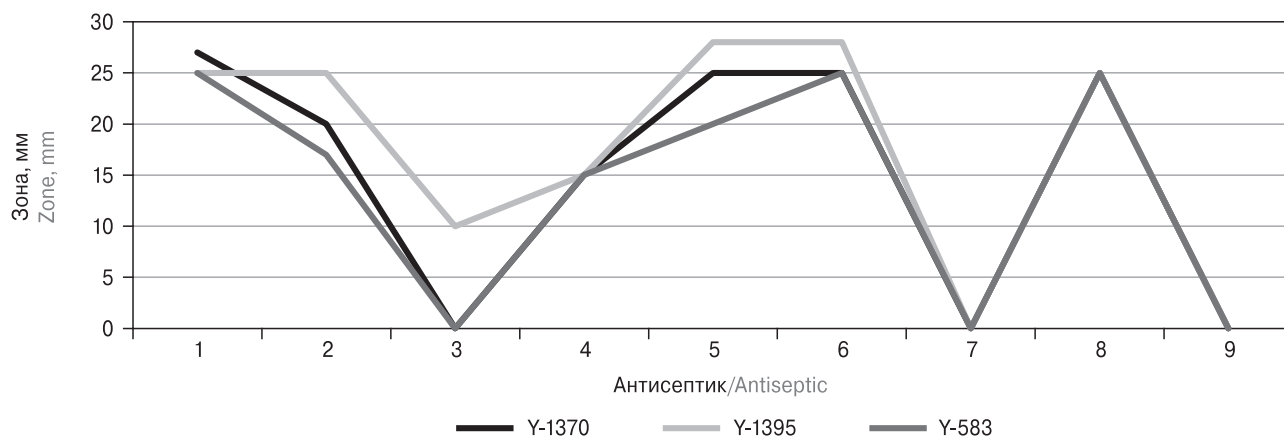


Рисунок 7. Определение чувствительности штаммов исследуемых грибов к антисептикам

Figure 7. Determination of antiseptics fungal strain sensitivity

Примечание. 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.

Note. 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.

росли при температуре 37°C, клетки при росте на кукурузном агаре активно образовывали гифальные проростки и формировали биопленки (рис. 6). Фенотипическая гибкость является важным фактором вирулентности кандид, обеспечивающим вторжение в эпителий, распространение по организму и выживание в различных нишах макроорганизма [21]. Выживанию клеток дрожжей в неблагоприятных условиях способствует развитая капсула, в состоянии биопленки обеспечивающая клеткам защиту от воздействия иммунитета и антимикотических препаратов. Все эти свойства — активный рост при повышенной температуре, способность к образованию капсулы, формированию гифальных проростков и биопленок, характерные и для изучаемых культур, — относятся к признакам патогенности и отличают потенциально патогенные штаммы кандид от сапротрофных штаммов.

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

Спорообразующие бактерии *B. subtilis* B-1376, *B. licheniformis* B-847, *B. subtilis* B-652 тестированы на наличие антигрибковой активности относительно штаммов дрожжей Y-1370, Y-1395 и типового контрольного штамма *C. albicans* Y-583. Показано, что клинические изоляты Y-1370, Y-1395 проявили высокую чувствительность к секретиремым метаболитам всех трех бацилл (табл. 2), зоны угнетения роста достигали 35 мм.

Реакция на действие антисептиков, включая растительные экстракты, у всех трех штаммов Y-1370, Y-1395 и Y-583 была схожей: показана высокая чувствительность к препаратам «Октенисепт» и «Хлоргексидин», а также к масляным экстрактам розмарина, сандала и контрольному раствору 70% этанола (рис. 7). При использовании настойки календулы и масляного экстракта лаванды получен отрицательный результат, зоны угнетения роста культур вокруг лунок с этими препаратами отсутствовали, как и в контрольном варианте с применением физиологического раствора.

Обсуждение

Наблюдаемое в настоящее время все большее распространение дрожжевых грибов рода *Candida* связывают с нерациональным использованием антимикотиков, неблагоприятным влиянием среды на иммунную систему, длительной госпитализацией, несъемными катетерами и другими отягощающими факторами. У пациентов со СПИД, после химиотерапии онкологического заболевания или трансплантации органов также существует высокая вероятность развития генерализованного кандидамикоза вплоть до септицемии [21]. При инфекционных заболеваниях ды-

хательной системы для грибов рода *Candida* показана высокая частота встречаемости, как правило, в ассоциации с другими микроорганизмами [24]. Чаще всего сопутствующими микроорганизмами в ассоциации с кандидами были стрептококки, как мы и наблюдали при выделении из клинического материала изолята Y-1395, где в первичном высеве кроме дрожжей обнаружены неспороносные бактерии и гемолитические кокки.

Отмечается расширение видового состава штаммов кандид, ответственных за инфекционные процессы. Сравнительно недавно обнаруженный патоген *Candida auris* [7] все чаще становится причиной клинических инфекций, с риском развития генерализованных процессов и вероятностью летального исхода до 50%. Он отличается резистентностью ко многим антифунгальным препаратам [1]. За последние два десятилетия целый ряд видов рода *Candida* превратились из редких патогенов в наиболее важные и частые условно-патогенные микроорганизмы, вызывающие кандидемию и инвазивный кандидоз у госпитализированных пациентов. Ранее не считавшиеся патогенными грибы вида *C. utilis* (*Cyberlindnera jadinii*) все чаще являются возбудителями инвазивных процессов [12]. Факторами риска в таких случаях являлись ослабление иммунитета, длительная госпитализация, воздействие антибиотиков. Участились случаи грибковой инфекции *C. utilis* кровотока, связанные с длительным полностью имплантированным венозным катетером [9, 23]. В публикации 2021 г. Sreelekshmi T.S. с соавт. [4] вид *C. utilis* был объявлен новым грибковым патогеном в крови, выделен у детей в возрасте 0–3 месяцев, заболевание тяжело поддавалось лечению из-за резистентности возбудителей к антимикробным препаратам. В настоящем исследовании штамм дрожжей *C. utilis* выделен из мочи, носоглотки и зева пациента с генерализованной дрожжевой инфекцией с диагнозом пневмония. Штамм проявил резистентность к применяемому в настоящей работе антимикотикам, для его ингибирования необходим более эффективный подбор противогрибковых препаратов. Следует отметить, что полученные данные по резистентности исследуемых штаммов *Candida* к антимикотикам отличаются от приведенных сведений [6], рекомендуемых в качестве отличительных признаков для идентификации ряда видов этого рода. Вид *Candida africana*, к которому можно отнести изолят Y-1395, ранее был предложен в качестве нового, реже встречающегося и менее патогенного вида, однако дальнейшие филогенетические анализы подтвердили его статус как необычного варианта *C. albicans* [6], обнаруживаемого при вагинальных инфекциях [25]. Фенотипически изолят Y-1395 отличался от *C. albicans* замедленным образованием гиф, утилизацией сахарозы, отсутствием роста на сре-

де с мальтозой и при повышении температуры культивирования до 42–45°C, что соответствует признакам *C. africana* [6, 25].

Как выяснено, исследуемые штаммы дрожжей чувствительны к препарату «Октенисепт», предназначенному для обработки слизистых, пораженных грибками, и к антисептику «Хлоргексидин биглюканат» 0,05%, применяемому для обработки наружных покровов. Использованные настойки календулы и эвкалипта в соответствии с информацией на этикетке были приготовлены с применением 70% этанола, срок их годности не истек. Однако в отличие от 70% контрольного раствора этанола обе они не оказывали антигрибкового действия на исследуемые штаммы дрожжей, что может быть связано с особенностями технологии производства и хранения этих экстрактов. Эфирные масла хвойных и травянистых растений являются источниками антимикробных веществ широкого спектра действия и способны эффективно подавлять возбудителей микозов [5, 26]. В настоящей работе проявили эффективность против штаммов кандид *C. utilis* B-1370 и *C. africana* B-1395 масляные экстракты розмарина и сандала, к экстракту лаванды оба штамма были устойчивы.

Заключение

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

На примере клинических штаммов дрожжей Y-1370, Y-1395 и типового штамма *C. albicans* Y-583 показано, что исследованные антисептики, растительные и бактериальные препараты могут быть эффективно использованы в качестве дополнительных средств для терапии и профилактики кандидозов разного происхождения.

Благодарности

Авторы выражают благодарность Буряк Г.А. и Емельяновой Е.К. за редакционные правки и техническую помощь в подготовке материалов статьи.

Список литературы/References

1. Бабьева И.П., Чернов И.Ю. Биология дрожжей // М.: 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 p. (In Russ.)]
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 бактериального пробиотика *Bacillus subtilis* (штамм 534) // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2016. № 1. С. 41–47. [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 *Bacillus subtilis*-534. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy = Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items*, 2016, no. 1, pp. 41–47. (In Russ.)]
3. Годовалов А.П., Быкова Л.П., Ожгибесов Г.П. Значение грибов рода *Candida* при воспалительных заболеваниях дыхательных путей // Сибирский медицинский журнал. 2008. № 7. С. 10–12. [Godovalov A.P., Bykova L.P., Ozhgibesov G.P. Significance of *Candida* in inflammatory diseases of respiratory tract. *Sibirskij medicinskij zhurnal = Siberian Medical Journal*, 2008, no. 7, pp. 10–12. (In Russ.)]
4. Капустина О.А., Карташова О.Л., Потехина Л.П., Уткина Т.М. Биопленкообразование *Candida* 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 *Candida* isolated from different human's biotopes. *Problemy meditsinskoi mikologii = Problems of Medical Mycology*, 2011, vol. 13, no. 2, pp. 81–82. (In Russ.)]
5. Кольцов И.П., Стрельникова Н.В., Витько Е.В., Витько Л.Г., Савлюк О.Е. Микробиологические свойства условно-патогенных сахаромикетов рода *Candida* 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 *Candida* in chronic, recurrent infectious inflammatory processes (literature review). *Tihookeanskij medicinskij zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2023, no. 1, pp. 19–26. (In Russ.)] 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 журнал. 2023. № 8 (110), Часть 2. С. 19–23. [Lykov I.N., Viktorova A.S., Muravyeva A.S., Petelina K.O. Screening of essential oils for their antimicrobial activity. *Mezhdunarodnyi nauchno-issledovatel'skii zhurnal = International Research Journal*, 2023, no. 8 (110), part 2, pp. 19–23. (In Russ.)] doi: 10.23670/IRJ.2021.110.8.039
7. Маланичева И.А., Козлов Д.Г., Ефименко Т.А., Зенкова В.А., Катруха Г.С., Резникова М.И., Королев А.М., Боршевская Л.Н., Тарасова О.Д., Синеокий С.П., Ефременкова О.В. Новые антибиотики, образуемые штаммами *Bacillus subtilis* // Микробиология. 2014. Т. 83, № 5. 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 *Bacillus subtilis* strains. *Mikrobiologiya = Mikrobiologiya*, 2014, vol. 83, no. 5, pp. 445–450. (In Russ.)] doi: 10.7868/S0026365614040119
8. МУК 4.2.1890-04 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. 91 с. [MUK 4.2.1890-04 Determination of sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs: Methodical instructions. Moscow: Federal Center of Gossanepidnadzor of the Ministry of Health of Russia, 2004. 91 p. (In Russ.)]
9. Николаева Е.Н. Частота встречаемости в полости рта дрожжеподобных грибов рода *Candida* 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 *Candida* with acute respiratory diseases. *Mezhdunarodnyi nauchno-issledovatel'skii zhurnal = International Research Journal*, 2013, vol. 12, no. 5, pp. 69–70. (In Russ.)] <https://elibrary.ru/item.asp?id=19077906>
10. Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М. Определитель патогенных и условно патогенных грибов. М.: Мир, 2001. 468 с. [Sutton D., Fothergill A., Rinaldi M. The determination of pathogenic and conditionally pathogenic fungi. Moscow: Mir, 2001. 468 p. (In Russ.)]
11. Сачивкина Н.П., Ленченко Е.М. Эффективные способы идентификации дрожжеподобных грибов рода *Candida* // Ветеринария. 2019. № 2. С. 25–28. [Sachivkina N.P., Lenchenko E.M. Effective ways to identify yeast-like fungi of the genus *Candida*. *Veterinariya = Veterinary Medicine*, 2019, no. 2, pp. 25–28. (In Russ.)] doi: 10.30896/0042-4846.2019.22.2.25-28
12. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.Б. Кандидоз. Природа инфекции, механизмы агрессии и защиты, лабораторная диагностика, клиника и лечение. М.: 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. (In Russ.)]
13. Шаповал О.Г., Шереметьева А.С., Дурнова Н.А., Мухамадиев Н.К., Раббимова Г.Т., Назирбеков М.Х. Антимикробная активность эфирных масел *Thymus serpyllum* L. и *Thymus marschallianus* Willd. в отношении *Candida albicans* // Химико-фармацевтический журнал. 2023. Т. 57, № 9. С. 26–31. [Shapoval O.G., Sheremetyeva A.S., Durnova N.A., Mukhamadiev N.Q., Rabbimova G.T., Nazirbekov M.K. Antimicrobial activity of essential oils of *Thymus serpyllum* L. and *Thymus marschallianus* Willd. against *Candida albicans*. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal = Chemical and Pharmaceutical Journal*, 2023, vol. 57, no. 9, pp. 26–31. (In Russ.)] doi: 10.30906/0023-1134-2023-57-9-26-31
14. Borman A.M., Szekely A., Linton C.J., Palmer M.D., Brown Ph., Johnson E.M. Epidemiology, antifungal susceptibility, and pathogenicity of *Candida africana* 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: 10.1177/00220345950740050301

16. Cavalheiro M., Teixeira M.C. Candida biofilms: threats, challenges, and promising strategies. *Front. Med. (Lausanne)*, 2018, vol. 5: 28. doi: 10.3389/fmed.2018.00028
17. Cortegiani A., Misseri G., Fasciana T., Giammanco A., Giarratano A., Chowdhary A. Epidemiology, clinical characteristics, resistance, and treatment of infections by *Candida auris*. *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: *Candida albicans*: a shape-changing, opportunistic pathogenic fungus of humans. *Microbiology*, 2017, vol. 163, no. 8, pp. 1145–1147. doi: 10.1099/mic.0.000499
20. Jindal N., Arora S., Dhuria N., Arora D. Cyberlindnera (*Pichia*) *fabianii* 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-Gričić A., Mlinarić-Missoni E., Škarić I., Važić-Babić V., Svetec I.-K. *Candida utilis* 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. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 2013, vol. 4, no. 2, pp. 119–128. doi: 10.4161/viru.22913
23. Ostrosky-Zeichner L., Al-Obaidi M. Invasive fungal infections in the intensive care unit. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 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 *Candida* spp. and antifungal susceptibility of high biofilm-forming *Candida* isolates. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 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 pathogenic yeast *Candida auris* on a plastic health care surface. *J. Clin. Microbiol.*, 2017, vol. 55, no. 10, pp. 2996–3005. doi: 10.1128/JCM.00921-17
26. Sherwood J., Gow N.A., Gooday G.W., Gregory D.W., Marshall D. Contact sensing in *Candida albicans*: 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 *Candida utilis* – case report. *Kaohsiung J. Med. Sci.*, 1999, vol. 15, no. 3, pp. 171–174.
28. Sreelekshmi T.S., Ninan M.M., Premanand A., Chacko A., Sahni R.D., Michael J.S. *Candida utilis*: a rare cause of septicemia in children. *Access Microbiology*, 2021, vol. 3, no. 10: 000281. doi: 10.1099/acmi.0.000281
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. *Cyberlindnera jadinii* (teleomorph *Candida utilis*) candidaemia in a patient with aplastic anaemia: a case report. *JMM Case Rep.*, 2018, vol. 5, no. 8: e005160. doi: 10.1099/jmmcr.0.00516

Авторы:

Андреева И.С., к.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник отдела биофизики и экологических исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;
Морозова В.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия;
Кабанов А.С., к.б.н., старший научный сотрудник отдела «Коллекция микроорганизмов» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», п. Кольцово, Россия.

Authors:

Andreeva I.S., PhD (Biology), Associate Professor, Leading Researcher, Department of Biophysics and Ecological Research, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;
Morozova V.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Microbiology, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation;
Kabanov A.S., PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Microorganisms Collection, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation.

Поступила в редакцию 05.04.2024
 Принята к печати 13.08.2024

Received 05.04.2024
 Accepted 13.08.2024