

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА ТА БІОЛОГІЯ

DOI 10.31718/2077-1096.19.1.48

УДК:582.28-026.3:615.33

Ананьєва М.М.

ЧУТЛИВІСТЬ РІЗНИХ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ *CANDIDA* ДО АНТИМІКОТИКІВ

Українська медична стоматологічна академія, Полтава

Представники *Candida spp.* володіють різною чутливістю до азолових сполук, які широко використовують в терапії кандидозів. За рахунок своєї стійкості до даних сполук *C. glabrata* залишається і організми і, більш того, здатна розмножуватися та збільшувати свою популяцію. Це досить часто стає причиною розвитку нозокоміальних інфекцій. Метою даної роботи було дослідження чутливості до протигрибкових препаратів клінічних штамів *C. albicans* і *C. glabrata*, виділених від пацієнтів хірургічних відділень. Матеріали та методи. Об'єктами дослідження стали 5 клінічних штамів *C. albicans* та 5 *C. glabrata*, отриманих від хворих відділень торакальної та судинної хірургії Полтавської обласної клінічної лікарні ім. В.М. Скліфосовського. З метою визначення чутливості досліджуваних клінічних ізолятів до антимікотиків використовували метод подвійних серійних розведень у рідкому поживному середовищі за стандартною методикою, відповідно до наказу МОЗ України №167 від 05.04.2007 р. «Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів» [7]. Мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК) визначали за найменшою концентрацією протигрибкового препарату, що була здатна пригнічувати видимий ріст досліджуваної культури мікроорганізму, наявність якого оцінювали шляхом огляду пробірки у прохідному світлі, порівнюючи з «негативним» контролем. Для контролю якості визначення чутливості мікроорганізмів до протигрибкових препаратів використовували референтний штам *Candida albicans* ССМ 885 з музею живих культур кафедри мікробіології, вірусології та імунології УМСА. Тестування контрольованого штаму проводили відповідно до описаного вище методу паралельно з дослідженням клінічних ізолятів. Результати визначення чутливості (МІК) контрольованого штаму співставляли з відповідними показниками його паспортної характеристики. При їх відповідності умови постановки експерименту вважали стандартними, а результати визначення чутливості клінічних ізолятів, отримані в цих умовах, вважали достовірними. Для визначення чутливості представників роду *Candida spp.* використовували природні протигрибкові засоби полієнового ряду (амфотерицин В) та синтетичні препарати групи азолів (флуконазол, ітраконазол) та похідних піримідину (флуцитозин). Статистичний аналіз отриманих результатів здійснювали за допомогою стандартного пакету програми «Microsoft Excel 2010». Наявність відмінностей між досліджуваними показниками оцінювали за *t*-критерієм Стьюдента. Результати та їх обговорення. За результатами досліджень, синтетичний протигрибковий препарат флуцитозин володіє найнижчою фунгістатичною дією щодо представників *Candida spp.* Присутність флуцитозину пригнічувала розмноження еталонного штаму *C. albicans* у концентрації 2 мкг/мл. Поряд з цим, клінічні штамми цього роду дріжджоподібних грибів були однаково чутливими до флуцитозину з МІК $3,2 \pm 0,96$ мкг/мл. Це вказує на низьку ефективність даного антимікотика щодо *Candida spp.*

Ключові слова: гриби роду *Candida*, антимікотики, чутливість.

Дана робота виконана у межах НДР «Вивчення ролі умовно-патогенних та патогенних інфекційних агентів з різною чутливістю до антимікробних і противірусних препаратів у патології людини» (№ ДР 0118u004456).

Вступ

Останні десятиріччя планетою шириться хвиля опортуністичних інфекцій. Ця тенденція є наслідком низки факторів, серед яких чільне місце займає зниження популяційного імунітету серед населення, яке обумовлене широким розповсюдженням вірусних персистуючих інфекцій, епідемією туберкульозу, цукрового діабету, неконтрольованим використанням антибіотиків і, як наслідок, розвитком дисбіозів [1].

За розповсюдженістю опортуністичних інфекцій важливе значення займають мікози, в тому

числі викликані грибами роду *Candida*. За даними ВООЗ кожен десятий житель планети має клінічні ознаки кандидозу [2].

За даними іноземних досліджень, серед чотирьох значимих видів *Candida spp.* найчастіше патологічні процеси викликає *C. albicans*. Як опортуністичний патоген, даний збудник давно відіграє провідну роль. Завдяки наявності факторів патогенності (інвазія, біоплівкоутворення) *C. albicans* поводить себе доволі агресивно [3]. Це в певній мірі сприяє її ефективній ідентифікації та своєчасній терапії.

Другий за значимістю представник роду

Candida – *C. glabrata* не володіє яскраво вираженими патогенними властивостями, однак, на думку ряду авторів, виживає за рахунок ефективної роботи генів, що кодують фактори адгезії (специфічні білки на поверхні клітинної стінки збудника), здатність розмножуватися всередині фагоцитів і епітеліальних клітин, резистентність до хіміотерапевтичних препаратів. Вищеописані відмінності різних представників одного роду мікроорганізмів можна пояснити відсутністю філогенетичної спорідненості між *C. albicans* і *C. glabrata* (філогенетично ближча до *S. cerevisiae*). Крім цього, дані два представники *Candida spp.* володіють різною чутливістю до азолових сполук, які широко використовують в терапії кандидозів. За рахунок своєї стійкості до даних сполук *C. glabrata* залишається і організмі і, більш того, здатна розмножуватися та збільшувати свою популяцію. Це досить часто стає причиною розвитку нозокоміальних інфекцій [4,5].

Мета роботи

Дослідження чутливості до протигрибкових препаратів клінічних штамів *C. albicans* і *C. glabrata*, виділених від пацієнтів хірургічних відділень.

Матеріали та методи

Об'єктами дослідження стали 5 клінічних штамів *C. albicans* та 5 *C. glabrata*, отриманих від хворих відділень торакальної та судинної хірургії Полтавської обласної клінічної лікарні ім. В.М. Скліфасовського.

З метою визначення чутливості досліджуваних клінічних ізолятів до антимікотиків використовували метод подвійних серійних розведень у рідкому поживному середовищі за стандартною методикою, відповідно до наказу МОЗ України №167 від 05.04.2007 р. «Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів» [6]. Мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК) визначали за найменшою концентрацією проти-

грибкового препарату, що була здатна пригнічувати видимий ріст досліджуваної культури мікроорганізму, наявність якого оцінювали шляхом огляду пробірки у прохідному світлі, порівнюючи з «негативним» контролем.

Для контролю якості визначення чутливості мікроорганізмів до протигрибкових препаратів використовували референтний штам *Candida albicans* ССМ 885 з музею живих культур кафедри мікробіології, вірусології та імунології УМСА. Тестування контрольного штаму проводили відповідно до описаного вище методу паралельно з дослідженням клінічних ізолятів. Результати визначення чутливості (МІК) контрольного штаму співставляли з відповідними показниками його паспортної характеристики. При їх відповідності умови постановки експерименту вважали стандартними, а результати визначення чутливості клінічних ізолятів, отримані в цих умовах, вважали достовірними.

Для визначення чутливості представників роду *Candida spp.* використовували природні протигрибкові засоби полієнового ряду (амфотерицин В) та синтетичні препарати групи азолів (флуконазол, ітраконазол) та похідних піримідину (флуцитозин).

Статистичний аналіз отриманих результатів здійснювали за допомогою стандартного пакету програми "Microsoft Excel 2010". Наявність відмінностей між досліджуваними показниками оцінювали за t-критерієм Стьюдента.

Результати та їх обговорення

За результатами досліджень синтетичний протигрибковий препарат флуцитозин володіє найнижчою фунгістатичною дією щодо представників *Candida spp.* Присутність флуцитозину пригнічувала розмноження еталонного штаму *C. albicans* у концентрації 2 мкг/мл (Рис. 1). Поряд з цим, клінічні штами цього роду дріжджоподібних грибів були однаково чутливими до флуцитозину з МІК $3,2 \pm 0,96$ мкг/мл. Це вказує на низьку ефективність даного антимікотика щодо *Candida spp.*

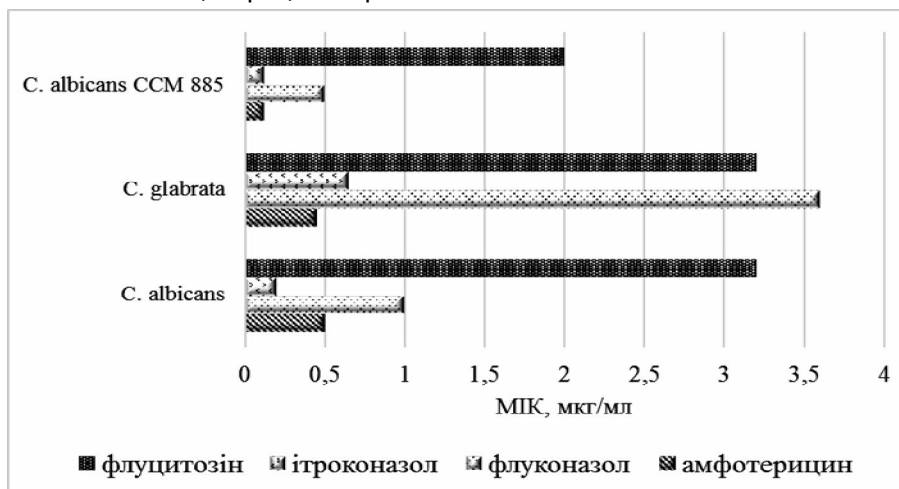


Рис. 1. Чутливість *Candida spp.* до протигрибкових препаратів

Досить закономірним було виявлення розвитку стійкості досліджуваних мікроорганізмів до дії флуконазолу, як протигрибкового засобу, що застосовується найчастіше. Так, його МІК щодо клінічних ізолятів *C. albicans* ($1,0 \pm 0,4$ мкг/мл) вдвічі перевищувала МІК щодо музейного штаму цього виду. Цікавою особливістю є суттєва відмінність у чутливості мікроорганізмів до флуконазолу у середині роду. Адже, клінічні штами *C. glabrata* виявилися менш чутливими до його дії, ріст і розмноження збудника спостерігали у присутності $3,6 \pm 0,64$ мкг/мл. Даний факт варто враховувати при лікуванні кандидомікозів у пацієнтів хірургічних стаціонарів з використанням флуконазолу, переважна дія якого направлена на пригнічення штамів *C. albicans*.

Подібна тенденція прослідковувалася при визначенні чутливості представників роду *Candida* до ітраконазолу. Тобто, клінічні ізоляти *C. glabrata* проявляли значно більшу стійкість до антимікотиків з групи азолів, порівняно з чутливістю штамів *C. albicans*. Проте, варто відмітити, що МІК ітраконазолу щодо *C. glabrata* та *C. albicans* виявилися нижчими за МІК флуконазолу щодо них і становили $0,65 \pm 0,28$ мкг/мл та $0,2 \pm 0,12$ мкг/мл відповідно.

Найпотужнішою протигрибковою дією щодо досліджуваних клінічних штамів мікроорганізмів володів амфотерицин. Пригнічення росту клінічних ізолятів *C. albicans* спостерігали у присутності $0,5 \pm 0,2$ мкг/мл амфотерицину, при чому чутливість до нього штамів *C. glabrata* майже не відрізнялась. МІК амфотерицину щодо даного виду кандид знаходилась в межах $0,45 \pm 0,24$ мкг/мл.

Висновки та перспективи

Закономірно, що клінічні штами дріжджоподібних грибів роду *Candida* проявляють нижчу чутливість до дії антимікотиків, порівняно з чутливістю музейного штаму [7,8].

Реферат

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ РАЗНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *CANDIDA* К АНТИМИКОТИКАМ

Ананьева М.Н.

Ключевые слова: грибы рода *Candida*, антимикотики, чувствительность.

Представители *Candida spp.* обладают различной чувствительностью к азоловым соединениям, которые широко используют в терапии кандидозов. За счет своей устойчивости к данным соединениям *C. glabrata* остается и организме и, более того, способна размножаться и увеличивать свою популяцию. Это довольно часто становится причиной развития нозокомиальных инфекций.

Целью данной работы было исследование чувствительности к противогрибковым препаратам клинических штаммов *C. albicans* и *C. glabrata*, выделенных от пациентов хирургических отделений.

Материалы и методы. Объектами исследования стали 5 клинических штаммов *C. albicans* и 5 *C. glabrata*, полученных от больных отделений торакальной и сосудистой хирургии Полтавской областной клинической больницы им. В.М. Склифосовского.

С целью определения чувствительности исследуемых клинических изолятов к антимикотикам использовали метод двойных серийных разведений в жидкой питательной среде по стандартной методике, согласно приказу МОЗ Украины №167 от 05.04.2007 г. «Об утверждении методических указаний «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам». МПК (МИК) определяли по наименьшей концентрации противогрибкового препарата, которая была способна подавлять видимый рост исследуемой культуры микроорганизмов. Наличие роста оценивали путем осмотра пробирки в проходящем свете, по сравнению с «негативным» контролем.

Для контроля качества определения чувствительности микроорганизмов к противогрибковым пре-

Природный протигрибковый засіб полієнового ряду (амфотерицин) володіє найвищою активністю як щодо *C. albicans*, так і *C. glabrata*. В свою чергу, до препаратів з групи азолів є більш чутливими представники виду *C. albicans*, в той час як чутливість *C. glabrata* до них є дещо нижчою.

Отримані результати звертають увагу на відмінності у чутливості до відомих протигрибкових препаратів у середині роду *Candida*. Адже при широкому застосуванні препаратів групи азолів є ризик розвитку кандидозу, викликаного штамми *C. glabrata*, які проявляють значно нижчу чутливість до даних антимікотиків. Крім цього, часте використання даних засобів сприяє формуванню резистентності серед клінічних ізолятів, що потребує постійного моніторингу з метою корекції відомих до сьогодні схем лікування кандидомікозів у пацієнтів хірургічних стаціонарів.

Литература

1. Cimbalista OL. Problema rezistentnosti mikroorganizmiv do antibiotikiv (lekciya) [The problem of microbial resistance to antibiotics (lecture)]. *Sovremennaya pediatriya*. 2017; 2: 52-57. (Ukrainian)
2. Rudenko AV, Zalitok SA, Kostyuk BA. Prediktori rozvutku rezistentnosti klinichnih izolyativ gribiv rodu *Candida* (*C. Albicans*) [Predictors of the development of resistance of clinical isolates of fungi of the genus *Candida*]. *Mizhnarodnij zhurnal antibiotiki ta probiotiki*. 2017; 1 (1): 83-92. (Ukrainian)
3. Enkler L, Richer D, Marchand AL, Ferrandon D, Jossinet F. Genome engineering in the yeast pathogen *Candida glabrata* using the CRISPR-Cas9 system. *Scientific Reports*. 2016; 6: 35766. doi: 10.1038/srep35766.
4. Odds FC. Pathogenesis of fungal disease. *Oxford Textbook of Medical Mycology: A Handbook of Scientists and Clinicians*. 2017; 56p.
5. Vale-Silva, LA, Sanglard D. *Tipping the balance both ways: drug resistance and virulence in *Candida glabrata**. 2015; 15: 1-8.
6. Genome engineering in the yeast pathogen *Candida glabrata* using the CRISPR-Cas9 system Ludovic Enkler, Delphine Richer, Anthony L. Marchand, Dominique Ferrandon & Fabrice Jossinet <https://www.nature.com/articles/srep35766>
7. Ananieva MM, Faustova MO, Loban GA, Avetnikov DS. Microbiological aspects of chlorophyll extract used for prevention of candida postoperative complications *Euromediterranean biomedical journal* 2018;13 (39): 178-80
8. Ananieva MM, Faustova MO, Basarab YO. Antimicrobial effect of proteflazid extract on microflora of peri-implant areas in infectious and inflammatory complications after dental implantation. *Zaporožskij Medicinskij Zhurnal*, 2017; 6: 809-812.

паратам использовали референтный штамм *Candida albicans* ССМ 885 из музея живых культур кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии УМСА. Тестирование контрольного штамма проводили в соответствии с описанным выше методом параллельно с исследованием клинических изолятов. Результаты определения чувствительности (МИК) контрольного штамма сопоставляли с соответствующими показателями его паспортной характеристики. При их соответствии условия постановки эксперимента считали стандартными, а результаты определения чувствительности клинических изолятов, полученные в этих условиях, считали достоверными.

Для определения чувствительности представителей рода *Candida spp.* использовали природные противогрибковые средства полиенового ряда (амфотерицин В) и синтетические препараты группы азолов (флуконазол, итраконазол) и производные пиримидина (флукцитозина).

Статистический анализ полученных результатов осуществляли с помощью стандартного пакета программы "Microsoft Excel 2010". Наличие различий между исследуемыми показателями оценивали по t-критерию Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. По результатам исследований синтетический противогрибковый препарат флукцитозина обладает низким фунгистатическим действием в отношении представителей *Candida spp.* Присутствие флукцитозина подавляло размножение эталонного штамма *C. albicans* в концентрации 2 мкг / мл. Наряду с этим, клинические штаммы этого рода дрожжеподобных грибов были одинаково чувствительны к флукцитозину с МИК $3,2 \pm 0,96$ мк / мл. Это указывает на низкую эффективность данного антимикотика для *Candida spp.*

Summary

SUSCEPTIBILITY OF DIFFERENT REPRESENTATIVES OF THE GENUS CANDIDA TO ANTIMYCOTICS

Ananyeva M.M.

Key words: fungi of the genus *Candida*, antifungals, susceptibility.

Representatives of *Candida spp.* demonstrate different susceptibility to azole compounds, which are widely used in the treatment of candidiasis. Due to the resistance to these compounds, *C. glabrata* remains in the body and, moreover, is able to multiply and increase its population. It quite often causes the development of nosocomial infections.

The purpose of this study was to investigate the susceptibility of clinical strains of *C. albicans* and *C. glabrata* isolated from surgical patients to antifungal drugs.

Materials and methods. We studied 5 clinical strains of *C. albicans* and 5 clinical strains of *C. glabrata*, taken from the patients of Thoracic and Vascular Surgery Units, V.M. Sklifosovskiy Poltava Regional Clinical Hospital.

In order to assess the susceptibility of the studied clinical isolates to antimycotics, the method of two-fold serial dilutions (macrodilution) in liquid nutrient medium was used as the standard procedure according to the order of the Ministry of Public Health of Ukraine No. 167 dated April 05, 2007, on Approval of Guidelines "Assessment of Microbial Susceptibility to Antibacterial Drugs". MIC was determined by the lowest concentration of the antifungal drug, which was able to suppress the visible growth of the studied microorganism culture. The presence of growth was assessed by inspecting the tubes in transmitted light compared to the "negative" control.

To control the quality of evaluating susceptibility of microorganisms to antifungals, we used the reference strain *Candida albicans* ССМ 885 taken from the Museum of Living Cultures of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, UMSA. Testing of the control strain was carried out in accordance with the method described above in parallel with the study of clinical isolates. The findings obtained by evaluating the susceptibility (MIC) of the control strain were compared with the relevant parameters of its passport characteristics. If they match, the conditions of the experiment were considered as standard, and the results of evaluating sensitivity of clinical isolates obtained under these conditions were considered as reliable.

To identify susceptibility of the genus *Candida spp.*, natural anti-fungal agents of the polyene series (amphotericin B) and synthetic drugs of the azoles group (fluconazole, itraconazole) and pyrimidine derivatives (flucytosine) were used.

Statistical analysis of the findings obtained was carried out using the standard software package "Microsoft Excel 2010". The presence of differences between the studied parameters was assessed by Student's t-test.

Results and discussion. The study has demonstrated that the synthetic antifungal, flucytosine, has a low fungistatic effect on *Candida spp.* The presence of flucytosine inhibits the reproduction of the reference *C. albicans* strain at a concentration of 2 μg / ml. Along with it, clinical strains of yeast-like fungi of this genus were equally sensitive to flucytosine with a MIC of 3.2 ± 0.96 μ / ml. This indicates a low efficacy of this antimycotic for *Candida spp.*