

ИЗУЧЕНИЕ IN VITRO ВИРУЛЕНТНЫХ СВОЙСТВ И УСТОЙЧИВОСТИ  
К АНТИМИКОТИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ ГРИБОВ РОДА CANDIDA, ИЗОЛИРОВАННЫХ  
ОТ ДЕТЕЙ С ОСТРОЙ КИШЕЧНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

П.А. ХРЕНОВ, Т.В. ЧЕСТНОВА, Н.В. СЕРЕГИНА, П.Г. ГЛАДКИХ, М.С. МАСЛОВ

ГБОУ ВПО «Тульский государственный университет, Медицинский институт»,  
ул. Болдина, 108, г. Тула, Россия, 300012, тел.: +7 (4872)332410, +7 (4872)254750  
e-mail: [hrenov.pawel@yandex.ru](mailto:hrenov.pawel@yandex.ru)

**Аннотация.** В данной статье представлены результаты исследования вирулентных свойств и антибиотикорезистентности грибов рода *Candida*, выделенных от детей с острой кишечной инфекцией. В настоящее время отмечается тенденция к возрастанию частоты грибковых инфекций, и проблема резистентности к антимикотическим препаратам становится всё более значимой. Нами проведено исследование 100 изолятов грибов рода *Candida*, изучены их вирулентные свойства, а также проведён анализ резистентности к антимикотическим препаратам. Соотношение штаммов имело следующие значения: лидирующим видом является *C. albicans* – 78,6%, далее следуют *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* (10,6, 7,1 и 3,6% соответственно). Показано, что в большинстве случаев *Candida* spp. выделяются из кишечника в составе ассоциаций с другими представителями патогенной и условно-патогенной микрофлоры. При изучении вирулентных свойств грибов получены следующие данные: способность к филаментации обнаружена у 100% исследованных штаммов *C. albicans*, *C. Krusei* – 36% штаммов, а штаммы *C. glabrata* и *C. tropicalis* не обнаружили способность к филаментации. Анализ антибиотикограмм грибов демонстрирует следующие результаты: все 100% штаммов *C. krusei* резистентны к флюконазолу (данный вид природно устойчив к препарату), к вориконазолу 14% штаммов, а к флуцитозину, амфотерицину В 11 и 34% соответственно. Промежуточная чувствительность к амфотерицину В отмечена у 11% изолятов. Выявлено наличие штаммов *C. krusei* с ассоциированной резистентностью – 40%, а штаммов с перекрёстной резистентностью – 11%. Отмечено возрастание минимальной подавляющей концентрации антимикотиков у штаммов *C. krusei* с перекрёстной и ассоциированной резистентностью. Все 100% штаммов *C. tropicalis*, а также *C. glabrata*, чувствительны ко всем четырём препаратам.

**Ключевые слова:** грибы рода *Candida*, вирулентные свойства, чувствительность к антимикотическим препаратам, острая кишечная инфекция.

THE STUDY IN VITRO THE VIRULENCE PROPERTIES AND RESISTANCE TO ANTIMYCOTIC  
DRUGS OF FUNGI CANDIDA ISOLATED FROM CHILDREN WITH ACUTE INTESTINAL  
INFECTION

P.A. KHRENOV, T.V. TCHESTNOVA, N.V. SEREGINA, P.G. GLADKIKH, M.S. MASLOV

Medical Institute, Tula State University, Str. Boldin, 108, Tula, Russia, 300012,  
tel.: +7 (4872) 332410, +7 (4872) 254750, e-mail: [hrenov.pawel@yandex.ru](mailto:hrenov.pawel@yandex.ru)

**Abstract.** This article presents the results of the study the virulence properties and antibiotic resistance of fungi of the genus *Candida* isolated from children with acute intestinal infection. Currently, there is an increase in the frequency of fungal infections, and the problem of resistance to antimycotic drugs is more important. The authors investigated 100 isolates of fungi of the genus *Candida* and they studied their virulent properties and conducted an analysis of resistance to antimycotic drugs. The correlation of the strains had the following values: leading species is *C. albicans* – 78.6%, then followed *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* (10.6, 7.1 and 3.6% respectively). In most cases the species of fungi *Candida* spp. were determined in the intestine in the composition of associations with other members of pathogenic and conditionally pathogenic microflora. The study of the virulence properties of mushrooms allowed to obtain the following data: the ability to filamentation was detected in 100% of tested strains *C. albicans*, *C. krusei* – 36% of strains, and the strains of *C. glabrata* and *C. tropicalis* has not shown the ability to filamentation. Analysis of antibioticogram of fungi demonstrates the following results: 100% of strains of *C. krusei* are resistant to fluconazole (this type of natural resistant to the drug), to voriconazole 14% of the strains, and to flucytosine, to amphotericin B 11% and 34%, respectively. Intermediate sensitivity to amphotericin B was observed in 11% of the isolates. The authors revealed the presence of strains of *C. krusei* associated with resistance (40%) and strains with cross-resistance to 11%. The increase in the minimum overwhelming concentration of antimycotics in strains of *C. krusei* and the associated cross-resistance is observed. 100% of strains of *C. tropicalis*, and *C. glabrata* are sensitive to all four drugs.

**Key words:** fungi of the genus *Candida*, virulent properties, sensitivity to antifungal drugs, acute intestinal infection.

**Введение.** В последние годы отмечается тенденция к возрастанию частоты грибковых нозокомиальных инфекций, и проблема резистентности грибов к антимикотическим препаратам становится все более актуальной [8-12]. Ведущую роль в этом играет необоснованное использование противогрибковых препаратов, что приводит к селекции резистентных штаммов микроорганизмов. Инфекции, вызванные резистентными штаммами, отличаются длительным течением, увеличивают продолжительность пребывания в стационаре, ухудшают прогноз для пациентов.

Увеличение частоты встречаемости среди людей грибов рода *Candida*, по разным данным, объясняется снижением как специфического иммунного ответа, так и неспецифической резистентности организма и связано это, в первую очередь, с влиянием неблагоприятных факторов окружающей среды. Кроме того, важную роль в развитии иммунносупрессии играют длительное применение антибактериальных препаратов, цитостатиков у больных с новообразованиями, иммунодепрессантов после трансплантации органов [2-4]. У детей иммунная система является в значительной мере уязвимой, по причине того, что в этот период происходит активное становление функций иммунитета, и, вследствие этого они являются более уязвимым контингентом в плане развития оппортунистических инфекций. Кроме того, кандидозная инфекция может возникать в результате подавления нормальной микрофлоры кишечника и развития вторичного иммунодефицита, вследствие длительного и бессистемного применения антибиотиков [1-7]. С учётом вышесказанного, представляется целесообразным проведение мониторинга за циркуляцией грибов рода *Candida* у детей с острыми кишечными инфекциями. Также немаловажным является изучение изменений вирулентных свойств и уровня резистентности к антимикотическим препаратам, применяемым для лечения больных с кандидозами.

В изученных нами доступных литературных и интернет-источниках встречается информация о мониторинге за антибиотикочувствительностью, но на практике он проводится в единичных случаях.

**Цель исследования** – изучение вирулентных свойств и чувствительности к антимикотическим препаратам *in vitro* грибов рода *Candida*, изолированных от детей с диагнозом острая кишечная инфекция, для оптимизации антимикотической терапии в условиях стационара.

**Объекты и методы исследования.** Был проведен анализ вирулентных свойств и резистентности к антимикотическим препаратам 100 штаммов грибов. Идентификацию микроорганизмов проводили с использованием питательной среды Сабуро и КАНДСЕЛЕКТ-агар французской фирмы BioMerieux. Определение антибиотикочувствительности и биохимического профиля проводили с применением автоматического бактериологического анализатора VITEK 2 compact французской фирмы BioMerieux. Микробную взвесь грибов стандартизировали до 2,0 ед. (McFarland) с помощью денситометра. Исследование антибиотикочувствительности грибов проводили к четырём препаратам: флуцитозин, флюконазол, вориконазол, амфотерицин В. Для обнаружения у изолятов RV-фактора (способность к филаментации) использовалась среда BIG-GY (производство Испания), а также использование среды с высоким содержанием белка (сыворотка крови) для определения способности к формированию ростовой трубки после инкубирования в термостате при 37°C. Представителей патогенной микрофлоры выделяли согласно действующим нормативным актам.

**Результаты и их обсуждение.** Все изоляты грибов выделялись в диагностически значимом титре ( $10^5$ - $10^7$ ). Наибольший удельный вес в структуре изучаемых изолятов приходился на *S. albicans* – 78,6%, затем в порядке убывания следуют *S. krusei* – 10,6%, *S. glabrata* – 7,1% и *S. tropicalis* – 3,6%. Штаммы грибов выделялись из кишечника детей, как в монокультуре, так и с другими представителями условно-патогенной и патогенной микрофлоры (табл. 1).

Таблица 1

Характер изоляции грибов *Candida spp.*

Характер изоляции штаммов <i>Candida spp.</i>	% изоляции
Изоляция в монокультуре	22
Ассоциация с ротавирусом	29,4
Ассоциация с одним бактериальным видом	24
Ассоциация с ротавирусом и одним бактериальным видом	10,2
Ассоциация с ротавирусом и двумя бактериальными видами	13,2
Ассоциация с двумя бактериальными видами	1,2

Следует отметить, что в подавляющем большинстве случаев грибы изолированы в составе ассоциаций.

Исследование вирулентных свойств грибов *Candida* обнаружило способность к филаментации у 100% исследованных штаммов *S. albicans*, *S. Krusei* – 36% штаммов, тогда как штаммы *S. glabrata* и *S. tropicalis* не обнаружили способности к филаментации.

На следующем этапе проводилось изучение чувствительности штаммов различных видов грибов рода *Candida* к антимикотическим препаратам (табл. 2).

Чувствительность различных видов грибов рода *Candida* к основным коммерческим антимикотикам

Название штамма	Флюконазол (%)	Вориконазол (%)	Флуцитозин (%)	Амфотерицин В (%)
<i>C. albicans</i>	100 (Ч)	100 (Ч)	100 (Ч)	100 (Ч)
<i>C. krusei</i>	100 (Р)	14 (Р)	11 (Р)	34 (Р) 11 (ПЧ)
<i>C. tropicalis</i>	100 (Ч)	100 (Ч)	100 (Ч)	100 (Ч)
<i>C. glabrata</i>	100 (Ч)	100 (Ч)	100 (Ч)	100 (Ч)

Примечание: Р – резистентные штаммы, Ч – чувствительные штаммы, ПЧ – промежуточная чувствительность

*C. krusei* в 100 и 14% проявили резистентность к препаратам группы азолов (флюконазолу (данный вид природно устойчив к препарату) и вориконазолу), а к флуцитозину, амфотерицину В 11 и 34% соответственно. Промежуточная чувствительность к амфотерицину В отмечена у 11% изолятов. Среди штаммов *C. Krusei* выявлено наличие представителей с ассоциированной и перекрёстной резистентностью (40 и 11% соответственно). Отмечено увеличение минимальной подавляющей концентрации (МПК) антимикотиков у штаммов *C. krusei* с перекрёстной и ассоциированной резистентностью. У штаммов резистентных к одному препарату (флюконазол) МПК составляла: флуцитозин  $\leq 1$ , флюконазол  $\leq 1$ , вориконазол  $\leq 0,12$ , амфотерицин В = 0,5, тогда как штаммы с перекрёстной и ассоциированной резистентностью имели следующие результаты: флуцитозин  $\geq 64$ , флюконазол  $\geq 64$ , вориконазол = 4, амфотерицин В = 8. Все 100% изолятов *C. albicans* чувствительны к флуцитозину, вориконазолу и амфотерицину В. Все 100% штаммов *C. tropicalis*, а также *C. glabrata*, чувствительны к препаратам полиенового (амфотерицин В) и пиримидинового (флуцитозин) рядов, а также к представителям группы азолов (флюконазол и вориконазол).

**Заключение.** Лидирующим, а также наиболее вирулентным штаммом является *C. albicans* (вирулентные свойства выявлены у 100% исследованных штаммов), далее следуют изоляты *C. krusei* (36% штаммов имеют способность к филаментации), а штаммы *C. glabrata* и *C. tropicalis* не проявляют таковой. Кроме того, необходимо отметить тот факт, что грибы рода *Candida* изолируются из кишечника детей в совокупности с другими клинически значимыми патогенами. Наибольшую резистентность к антимикробным препаратам проявляют штаммы *Candida krusei*, среди них встречаются штаммы с перекрёстной и ассоциированной резистентностью. Также важно отметить увеличение минимальной подавляющей концентрации антимикотических препаратов для штаммов *C. krusei*. Увеличение значений МПК, возможно, объясняется бесконтрольным применением антимикотических препаратов и, как следствие, селекцией резистентных штаммов.

Полученные нами данные по чувствительности грибов рода *Candida* spp. могут быть использованы при лечении детей с кандидозной инфекцией.

### Литература

1. Воробьев А.А. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. Москва: МИА, 2004. 345 с.
2. Страчунский Л.С., Белоусов Л.С., Козлов С.Н. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии. НИИ АХ СГМА, 2000-2007. 690 с.
3. Честнова Т.В., Серегина Н.В. Медицинская микология. Учебно-методическое пособие. Тула: «Тульский полиграфист», 2010. 120 с.
4. Честнова Т.В., Смольянинова О.Л. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. Тула: ТулГУ, 2008. 188 с.
5. Авдиенко И.Д., Рябченко Н.Ф. Поиск биологических средств против грибов рода *Candida* // ЖМЭИ. 2000. №6. С. 79.
6. Ганковская О.А., Зверев В.В. Изменение уровня экспрессии сигнальных рецепторов врождённого иммунитета при инфекции, вызванной *C. Albicans* in vitro и in vivo // ЖМЭИ. 2009. №3. С. 61.
7. Шевяков М.А. Кандидоз пищевода: диагностика и современный выбор лечения // Лечащий врач. 2008. №9. С. 16.
8. Честнова Т.В., Серегина Н.В. Изучение мицелиально-дрожжевого диморфизма у грибов рода *Candida*. Общественное здоровье и здравоохранение: профилактическая и клиническая медицина // XXXV научно-практическая конференция профессорско-преподавательского состава ТулГУ. Тула: ТулГУ, 2009. С. 143
9. Честнова Т.В., Серегина Н.В. Пейзаж клинических изолятов грибов рода *Candida* и резистентность к противогрибковым препаратам. Тезисы XIII Международного конгресса МАКМАХ / ESCMID по антимикробной терапии. Москва, 2011. 95 с.

10. WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. World Health Organization 2001. Available from: [http://www.who.int/emc/amrpdfs/WHO\\_Global\\_Strategy\\_English.pdf.9](http://www.who.int/emc/amrpdfs/WHO_Global_Strategy_English.pdf.9)
11. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. A report from the NNIS System / Cardo D., Horan T., Andrus M. [et al]// J. Infect. Control. 2004. Vol.32. P. 470–485.
12. Решедько Г.К., Козлов Г.К. Состояние резистентности к антиинфекционным препаратам в России. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Под ред. Стречунского Л.С., Белоусова Ю.Б., Козлова С.Н. М.: РЦ «Фармединфо», 2007.

#### References

1. Vorob'ev AA. Meditsinskaya mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya. Moscow: MIA; 2004. Russian.
2. Strachunskiy LS, Belousov LS, Kozlov SN. Prakticheskoe rukovodstvo po antiinfektsionnoy khimioterapii. NIIAKh SGMA; 2000-2007. Russian.
3. Chestnova TV, Seregina NV. Meditsinskaya mikologiya. Uchebno-metodicheskoe posobie. Tula: «Tul'skiy poligrafist»; 2010. Russian.
4. Chestnova TV, Smol'yaninova OL. Meditsinskaya mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya. Tula: TulGU; 2008. Russian.
5. Avdienko ID, Ryabchenko NF. Poisk biologicheskikh sredstv protiv gribov roda Candida. ZhMEI. 2000;6:79. Russian.
6. Gankovskaya OA, Zverev VV. Izmenenie urovnya ekspressii signal'nykh retseptorov vrozhdennogo immuniteta pri infektsii, vyzvannoy C. Albicans in vitro i in vivo. ZhMEI. 2009;3:61. Russian.
7. Shevyakov MA. Kandidoz pishchevoda: diagnostika i sovremennyy vybor lecheniya. Lechashchiy vrach. 2008;9:16. Russian.
8. Chestnova TV, Seregina NV. Izuchenie mitselial'no-drozhzhevogo dimorfizma u gribov roda Candida. Obshchestvennoe zdorov'e i zdavookhranenie: profilakticheskaya i klinicheskaya meditsina. XXXXV nauchno-prakticheskaya konferentsiya professorsko-prepodavatel'skogo sostava TulGu. Tula: TulGU; 2009. Russian.
9. Chestnova TV, Seregina NV. Peyzazh klinicheskikh izolyatov gribov roda Candida i rezistentnost' k protivogribovym preparatam. Tezisy XIII Mezhdunarodnogo kongressa MAKMAKh / ESCMID po antimikrobnoy terapii. Moscow; 2011. Russian.
10. WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. World Health Organization 2001. Available from: [http://www.who.int/emc/amrpdfs/WHO\\_Global\\_Strategy\\_English.pdf.9](http://www.who.int/emc/amrpdfs/WHO_Global_Strategy_English.pdf.9)
11. Cardo D, Horan T, Andrus M, et al. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. A report from the NNIS System. J. Infect. Control. 2004;32:470-85.
12. Reshed'ko GK, Kozlov GK. Sostoyanie rezistentnosti k antiinfektsionnym preparatam v Rossii. Prakticheskoe rukovodstvo po antiinfektsionnoy khimioterapii / Pod red. Strachunskogo L.S., Belousova Yu.B., Kozlova S.N. Moscow: RTs «Farmedinfo»; 2007. Russian.