

3  
НОМЕР



ISSN 2304-9081

Электронный журнал  
On-line версия журнала на сайте  
<http://www.elmag.uran.ru>

# БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН



2016

**УЧРЕДИТЕЛИ**

УРАЛЬСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РАН  
ОРЕНБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР УРО РАН

© Коллектив авторов, 2016

УДК 579.61

О.А. Пашина, О.Л. Карташова, Т.М. Паикова, Л.П. Попова

**АНТИМИКОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ГРИБОВ РОДА CANDIDA, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РЕПРОДУКТИВНОГО ТРАКТА ЖЕНЩИН С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ГЕНИТАЛИЙ**

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

*Цель.* Охарактеризовать чувствительность к антимикотикам грибов рода *Candida*, выделенных из репродуктивного тракта женщин с воспалительными заболеваниями гениталий, на уровне фено- и генотипа.

*Материалы и методы.* В исследовании использовано 47 штаммов грибов рода *Candida*, изолированных из репродуктивного тракта женщин с воспалительными заболеваниями гениталий. Выделение и идентификацию грибов осуществляли по Ребровой Р.Н. (1989). Чувствительность к антимикотическим препаратам – диско-диффузионным методом. При помощи ПЦР анализа у грибов выявляли гены, кодирующие антимикотикорезистентность.

*Результаты.* В скрининговом режиме протестирована антимикотикорезистентность грибов рода *Candida*, выделенных из репродуктивного тракта женщин с воспалительными заболеваниями гениталий. Выявлена высокая резистентность не-*albicans* видов по сравнению с *Candida albicans* к изученным препаратам. Изучена резистентность к антимикотикам *C. albicans* при остром и хроническом течении инфекционного процесса и показана необходимость дифференцированного подхода к лечению разных форм ВЗГ. С помощью ПЦР установлено наличие в изолятах *C. albicans* гена MDR1, кодирующего переносчик MF типа.

*Заключение.* Полученные данные могут быть использованы для мониторинга распространения резистентных штаммов среди грибов рода *Candida* и повышения эффективности терапии заболеваний, вызванных этими микроорганизмами.

*Ключевые слова:* *Candida spp.*, резистентность к антимикотикам, инфекционный процесс/

---

---

О.А. Pashinina, O.L. Kartashova, T.M. Pashkova, L.P. Popova

**ANTIFUNGAL-RESISTANT FUNGI ON THE GENUS CANDIDA, ISOLATED FROM REPRODUCTIVE TRACT WOMEN WITH INFLAMMATORY DISEASES OF GENITALS**

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UrB RAS, Orenburg, Russia

*Objective.* Describe the antifungal susceptibility of *Candida* isolated from the reproductive tract of women with inflammatory diseases of the genitals, at the level of phenotype and genotype.

*Materials and methods.* The study used 47 strains of *Candida* isolated from the reproductive tract of women with inflammatory diseases of the genitals. Isolation and identification of fungi was performed by Rebrova R.N. (1989). The sensitivity to antifungal preparations - disk diffusion method. Using PCR analysis of fungi identified genes encoding resistance antifungals.

*Results.* In the screening mode tested antimycotic-resistance genus *Candida* fungi isolated from the reproductive tract of women with inflammatory diseases of the genitals. The high resistance of *non-albicans* species as compared to the *Candida albicans* to the study drugs. Studied resistance to antifungal *C. albicans* in acute and chronic course of the infection process and

shows the need for a differentiated approach to the treatment of various forms of IDG. Using PCR isolates revealed the presence of *C. albicans* MDR1 gene encoding a transporter type MF.

*Conclusion.* The data obtained can be used to monitor the spread of resistant strains of fungi including *Candida* genus and efficiency of the therapy of diseases caused by these microorganisms.

*Keywords:* *Candida spp.*, resistance to antifungal, infectious process/

## **Введение**

Дрожжевые грибы рода *Candida* в качестве комменсалов входят в состав естественных микробиоценозов тела человека. В то же время эти микромицеты могут быть причиной широкого спектра воспалительных заболеваний, как правило, эндогенной природы, в том числе инфекционных процессов урогенитальной локализации у женщин [1].

Данные литературы о чувствительности к антимикотикам грибов рода *Candida* имеют значительные региональные различия и носят противоречивый и разрозненный характер [2-4]. В связи с этим для разработки эффективных схем противогрибковой терапии необходимо учитывать результаты локального мониторинга распространения резистентности у *Candida spp.*

Наряду с вышеизложенным представляет интерес изучение механизмов генетического контроля за резистентностью грибов к антимикотикам.

Цель исследования – охарактеризовать чувствительность к антимикотикам грибов рода *Candida*, выделенных из репродуктивного тракта женщин с воспалительными заболеваниями гениталий, на уровне фено- и генотипа.

## **Материалы и методы**

В работе изучено 47 штаммов грибов рода *Candida*, изолированных из репродуктивного тракта женщин с воспалительными заболеваниями гениталий (кольпит, сальпингоофорит – острое и хроническое течение). Выделение и идентификацию грибов рода *Candida* проводили общепринятыми методами [5]. Чувствительность к антимикотическим препаратам определяли диско-диффузионным методом с помощью расширенного набора дисков: нистатин 80 мкг/диск, итраконазол 10 мкг/диск, флуконазол 40 мкг/диск, клотримазол 10 мкг/диск, кетоконазол 20 мкг/диск, амфотерицин В 40 мкг/диск (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург).

Статистическую обработку осуществляли с использованием параметрических методов [6].

При помощи ПЦР анализа у изолятов грибов рода *Candida* выявляли

гены, кодирующие антимикотикорезистентность: ген CDR1, ассоциированный с устойчивостью к ингибиторам стеролового синтеза, ген полирезистентности MDR1 – кодирующий переносчик MF типа, ген FLU1, обеспечивающий устойчивость к флуконазолу.

Для ПЦР-амплификации использовали известные праймеры [7], синтезированные компанией «Синтол» (г. Москва) (табл.).

*Таблица.* Праймеры, использованные для определения генов резистентности к антимикотикам

№	Ген	Нуклеотидная последовательность	Размер продукта реакции, п.о.
1	<i>MDR1</i>	<b>Forward</b> 5-AGAGCCATCACCGGTAACGACAG <b>Reverse</b> 5-AACCAAAAATGAAAAGACCTGAAG	420
2	<i>FLU1</i>	<b>Forward</b> 5-CACTGCCTTGGCTGGTAAC <b>Reverse</b> 5-ACATCGTGCAAAAGGAAGAAC	510
3	<i>CDR1</i>	<b>Forward</b> 5-TTTCTGGTGCCATGACTCCTGCTAC <b>Reverse</b> 5-ATATAAATGGCCAAAAGAATACG	446

ПЦР проводили в термоциклере «Терцик» («ДНК технология», Россия). Реакционная смесь состояла из грибного лизата (1 мкл), специфических праймеров (по 1 мкл), дезоксирибонуклеозид-трифосфатов, буфера, фермента Taq-полимеразы, хлорида магния. Реакционную смесь доводили до 25 мкл водой без нуклеаз.

Для обнаружения генов, кодирующих резистентность к антимикотикам, в смесь для ПЦР добавляли 1 мкл каждого праймера соответствующей группы, осуществляли амплификацию фрагмента ДНК по протоколу: 1 цикл - 92°C 5 минут; 30 циклов - 92°C в течение 1 минуты, 1 минута при 65°C, 1 минута при 72°C; 1 цикл элонгации при 72°C в течение 5 минут.

Продукты амплификации генов анализировали путем электрофоретического разделения в горизонтальном агарозном геле (2%), окрашенном бромистым этидием. В качестве маркеров использовали GeneRuler 1 kbp DNA Ladder и GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Литва). Результаты визуализировали в ультрафиолетовом свете. Положительное заключение о наличии гена делали при обнаружении в дорожке специфической светящейся полосы определенной массы, которую устанавливали по линейке молекулярных масс.

## Результаты и обсуждение

Из репродуктивного тракта женщин с воспалительными заболеваниями гениталий в 76,5% случаях выделяли *C. albicans*, в 17,1% – *C. glabrata* и 6,4% – *C. krusei*.

При анализе чувствительности этих штаммов к антимикотикам выявили вариабельность микроорганизмов по данному признаку, которая зависела от видовой принадлежности грибов (рис. 1).

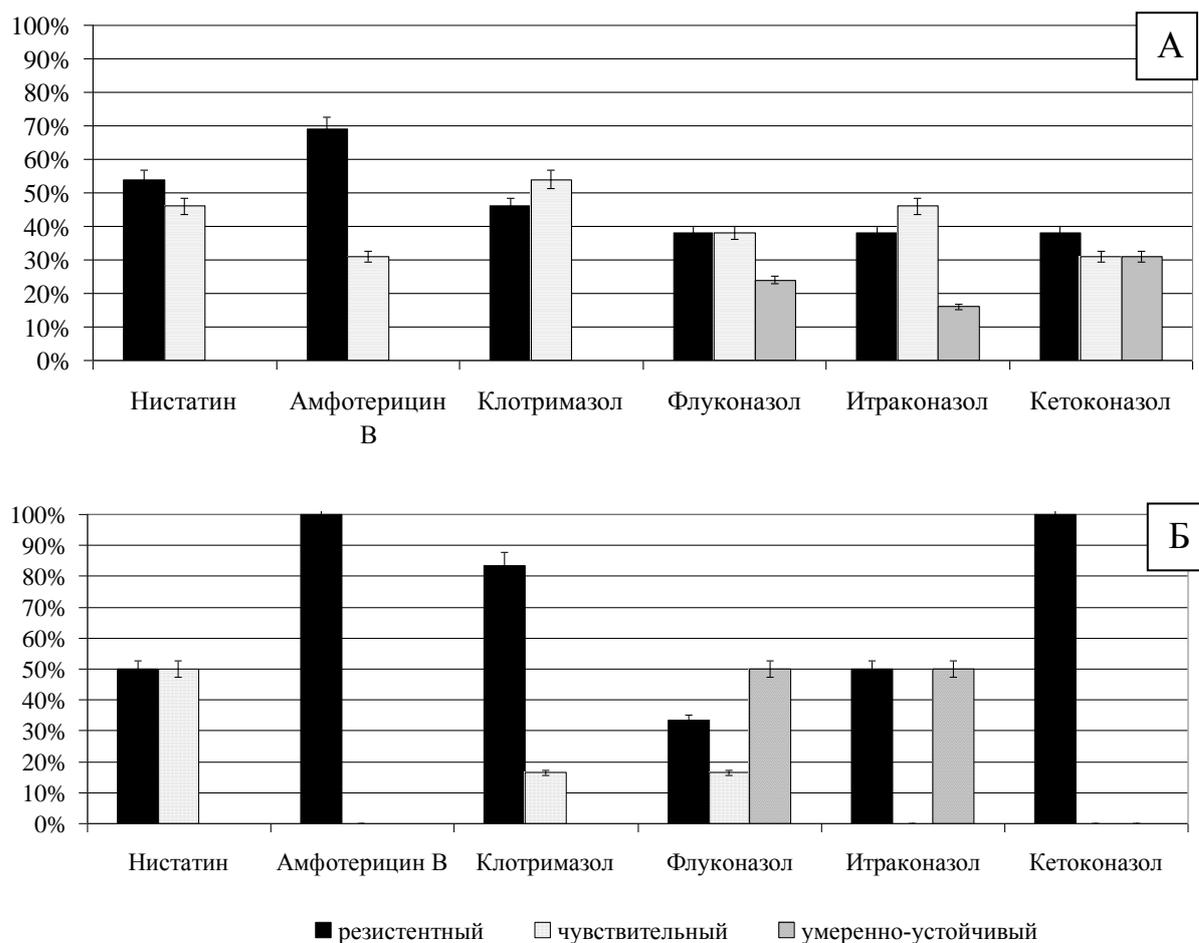


Рис. 1. Чувствительность к антимикотикам грибов *C. albicans* (А) и *C. non-albicans* (Б), выделенных из репродуктивного тракта женщин с воспалительными заболеваниями гениталий.

Обозначения: \* -  $p < 0,01$ ; \*\* -  $p < 0,001$ .

Наибольшее число вагинальных изолятов *C. albicans* оказалось чувствительным к клотримазолу (54,0%), нистатину и итраконазолу (46,0%), несколько меньше – к флуконазолу (38,0%), кетоконазолу и амфотерицину В (31,0%). Резистентность к амфотерицину В проявляли 69,0% выделенных штаммов, нистатину – 54,0%, клотримазолу – 46,0%, кетоконазолу, флуконазолу и итраконазолу по 38,0% культур. Штаммы *C. albicans* были умеренно-устойчивыми к кетоконазолу в 31,0%, к флуконазолу в 24,0%, к итраконазолу

в 16,0% случаев.

Штаммы грибов не-*albicans* видов, выделенные при воспалительных заболеваниях гениталий (ВЗГ), реже проявляли чувствительность к изученным антимикотикам в сравнении с *C. albicans*. Так, все выделенные культуры *C. glabrata* и *C. krusei* были резистентны к кетоконазолу, амфотерицину В и итраконазолу; к клотримазолу и флуконазолу проявляли чувствительность по 16,5% культур не-*albicans* видов *Candida*. По отношению к флуконазолу и итраконазолу штаммы проявляли умеренную устойчивость в 50,0% случаев.

Не отмечали достоверной разницы между количеством штаммов грибов разных видов чувствительных и резистентных к нистатину.

При сравнении чувствительности *C. albicans*, выделенных при разных формах течения инфекционного процесса, установлены определенные различия (рис. 2).

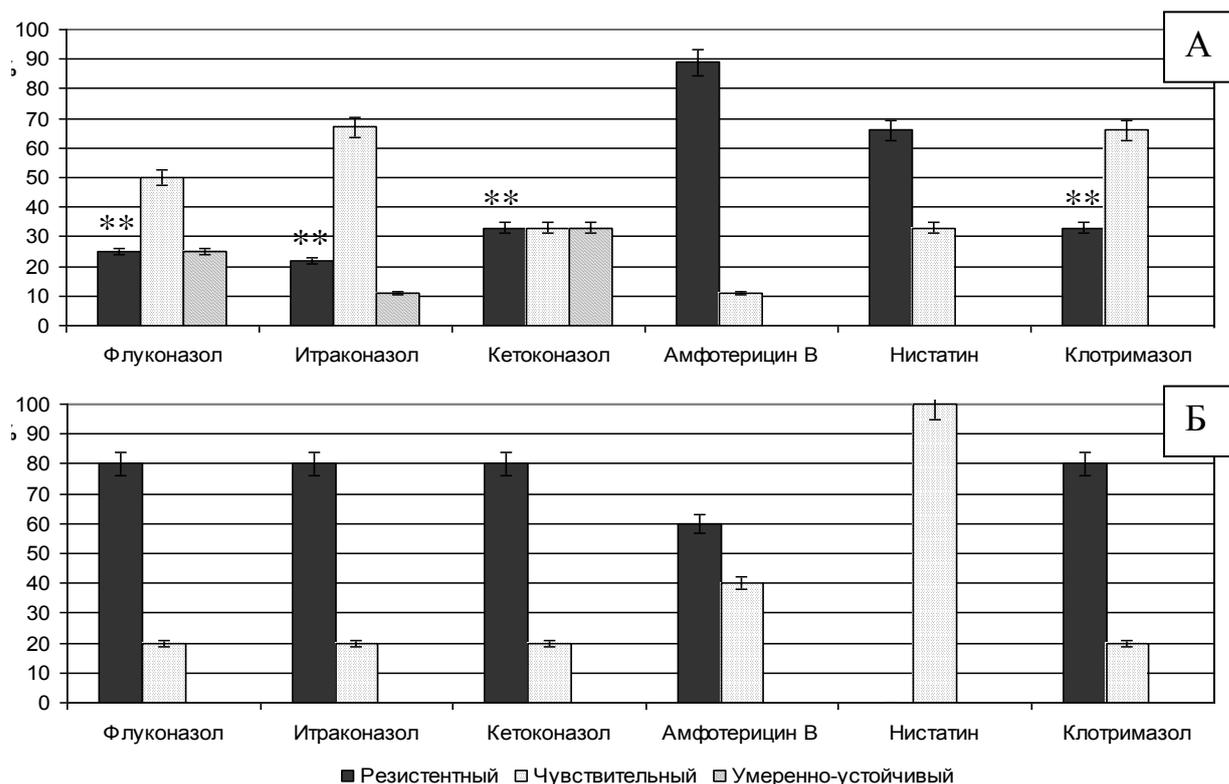


Рис. 2. Чувствительность к антимикотикам штаммов *C. albicans*, выделенных при остром течении (А) и хроническом (Б) течении инфекционно-воспалительного процесса (%).

Обозначения: \*\* -  $p < 0,001$ .

Так, при хроническом течении ВЗГ, штаммов, резистентных к флуконазолу, итраконазолу, кетоконазолу, клотримазолу (по 80,0%) было в 2,4-3,6 раза больше, чем при остром течении заболевания (25,0%, 22,0% и по 33,0%,

соответственно;  $p < 0,001$ ).

Наоборот, при остром течении заболевания по сравнению с хроническим, в 1,5 раза чаще встречались штаммы, резистентные к амфотерицину В. Кроме того 66,0% штаммов было резистентно к нистатину, тогда как среди *C. albicans*, выделенных при хроническом течении заболевания, такие штаммы отсутствовали. Также при остром течении заболевания наблюдали наличие культур, умеренно устойчивых к флуконазолу (25,0%), итраконазолу (11,0%) и кетоконазолу (33,0%).

Резистентность культур грибов к изученным антимикотикам, в частности, препаратам из группы азолов, может быть обусловлена усилением оттока препарата из клетки [8]. Анализ генов, кодирующих переносчики - клеточные насосы (efflux pumps), выводящие препарат за пределы грибковой клетки, показал наличие у 100% изученных вагинальных изолятов *C. albicans*, выделенных при ВЗГ, гена полирезистентности MDR1, кодирующего переносчики MF типа.

Согласно полученным результатам, среди *Candida spp.*, выделенных из репродуктивного тракта при ВЗГ, преобладали *C. albicans*, что согласуется с другими исследованиями [9], в меньшем проценте случаев выделяются *C. glabrata* и *C. krusei*.

### **Заключение**

Проведенными исследованиями показано, что *Candida spp.*, изолированные из репродуктивного тракта женщин, обладают вариабельной антимикотикорезистентностью, частота встречаемости которой зависит от видовой принадлежности грибов: штаммы не-*albicans* характеризуются более высокой устойчивостью к изученным антимикотикам, по сравнению с *C. albicans*, что было отмечено и другими авторами [10, 11].

В последние годы среди разных видов грибов рода *Candida*, особенно *C. albicans*, все чаще выявляет резистентность к азолам [12,13]. В данном исследовании была оценена их эффективность в отношении штаммов, выделенных при разных формах течения заболевания, и показано, что высоким уровнем резистентности к препаратам этой группы характеризуются штаммы, выделенные при хроническом течении ВЗГ, в отличие от грибов, выделенных при острой форме инфекционного процесса, которые в большем проценте случаев были резистентны к полиеновым антибиотикам. Полученные данные свидетельствуют о необходимости дифференцированного подхода к

лечению разных форм ВЗГ, на правомерность подобного подхода при терапии острых и хронических форм вульвовагинального кандидоза указывают [14].

Тем не менее, проведенные исследования показали, что у всех изученных штаммов обнаружен ген полирезистентности MDR1, кодирующий переносчики MF типа, выводящие из клетки флуконазол. При изучении генетических механизмов резистентности к азоловым препаратам у клинических изолятов *C. albicans* ряд авторов [15, 16] отмечали широкую перекрестную резистентность к флуконазолу, клотримазолу, итраконазолу и кетоконазолу. Установленная нами высокая резистентность грибов, выделенных при хроническом течении инфекционного процесса, к азолам, обусловлена, по-видимому, активным эффлюксом препаратов [17], а антимикотики в данном случае выступают в качестве индукторов (или регуляторов) экспрессии гена, кодирующего эффлюкс-систему, и способствуют селективному отбору штаммов, обладающих этими механизмами [18].

Таким образом, в результате проделанной работы в скрининговом режиме протестирована антимикотикорезистентность грибов рода *Candida*, выделенных из репродуктивного тракта женщин с ВЗГ. Полученные данные могут быть использованы для мониторинга распространения резистентных штаммов среди грибов и повышения эффективности терапии заболеваний, вызванных этими микроорганизмами.

### **Выводы**

1. Штаммы не-*albicans* видов *Candida* чаще характеризовались резистентностью к изученным антимикотикам по сравнению с *C. albicans*.
2. При остром течении воспалительных заболеваний гениталий эффективными являются антимикотики класса азолов, при хроническом – полиеновые антимикотики.
3. Механизм устойчивости к азолам у *C. albicans* определяется наличием гена MDR1, кодирующего MF-переносчик, выводящий препараты за пределы клетки гриба.

### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Сергеев А. Ю., Сергеев Ю.В. Кандидоз. Природа инфекции, механизмы агрессии и защиты, лабораторная диагностика, клиника и лечение. М.: Триада-Х, 2001. 345с.
2. Захарова Е.А., Шамбилова Н.А., Азизов И.С. Сравнительная оценка чувствительности к противогрибковым препаратам клинических штаммов грибов рода *Candida*, выделенных из фекалий и влагалища. Успехи медицинской микологии. 2006. 7: 167-168.
3. Анкирская А.С., Муравьева В.В., Фурсова С.А. Мониторинг видового состава и чув-

- ствительности к антимикотикам дрожжеподобных грибов, выделенных из влагалища женщин репродуктивного возраста. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2009. 8(1): 87-95.
4. Желтикова Т.М., Глушакова А.М. Фунгицидное действие различных системных антимикотиков на грибы рода *Candida in vitro*. Акушерство и гинекология. 2010. 4: 79-81.
  5. Реброва Р.Н. Грибы рода *Candida* при заболеваниях негрибковой этиологии. М.: Медицина, 1989. 128с.
  6. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологии. Л.: Гос. изд. мед. лит, 1962. 177с.
  7. Niewerth M., Kunze D., Seibold M. et al. Ciclopirox olamine treatment affects the expression pattern of *Candida albicans* genes encoding virulence factors, iron metabolism proteins, and drug resistance factors. Antimicrob. Agents Chemother. 2003. 47(6): 1805-1819.
  8. Vanessa M. S., Caroline J. B., Bernhard H. et al. Exposure of *Candida albicans* to antifungal agents affects expression of SAP2 and SAP9 secreted proteinase genes. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2005. 55: 645-654.
  9. Дробкова В.А., Карпунина Т.И. Видовой спектр и биологические особенности грибов рода *Candida*, изолируемых из влагалища женщин репродуктивного возраста. Современные проблемы инфекционной патологии человека. 2009. 2: 244-248.
  10. Батырбаева Д.Ж., Рамазанова Б.А., Таурбаева Н.Т. Сравнительный анализ изучения устойчивости *Candida spp.* к противогрибковым препаратам различными методами. Проблемы медицинской микологии 2015. 17(2): 43-44.
  11. Вершинина М.Г., Калугина Е.Ю., Володин О.Б. Анализ встречаемости *Candida spp.* в отделяемом нижних дыхательных путей больных реанимационного отделения многопрофильного стационара. Проблемы медицинской микологии. 2014. 16(2): 51.
  12. Малова И.О., Кузнецова Ю.А. Чувствительность к антимикотикам *Candida spp.*, выделенных от пациенток с хроническим рецидивирующим кандидозом урогенитального тракта. Проблемы медицинской микологии. 2013. 15(2): 103.
  13. Саперкин Н.В., Широкова И.Ю., Сергеева А.В. и др. Изучение чувствительности *Candida spp.* к антимикотикам. Проблемы медицинской микологии. 2014. 16(2): 124.
  14. Пестрикова Т.Ю., Юрасова Е.А., Воронова Ю.В. и др. Дифференцированный подход к лечению разных форм вульвовагинального кандидоза. Гинекология. 2014. 3: 38-40.
  15. White TC, Holleman S, Dy F. et al. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother. 2002. 46(6): 1704-1713.
  16. Sanguinetti M., Posteraro B., Fiori B. et al. Mechanisms of Azole Resistance in Clinical Isolates of *Candida glabrata* Collected during a Hospital Survey of Antifungal Resistance. Antimicrobial agent and chemotherapy. 2005. 2: 668-679.
  17. Иванова Л.В., Баранцевич Е.П., Шляхто Е.В. Резистентность грибов-патогенов к антимикотикам (обзор). Проблемы медицинской микологии. 2001. 13(1): 14-17.
  18. Исаева Г.Ш. Резистентность *H. pylori* к антибактериальным препаратам и методы ее определения. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2010. 12(1): 57-66.

Поступила 29.09.2016

(Контактная информация: Капустина Ольга Александровна – к.б.н., с.н.с. Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН; адрес: 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11; тел/факс 8(3532)774463; e-mail: olga25mikro@mail.ru)

---

---

## LITERATURE

1. Sergeev A. Ju., Sergeev Ju.V. Kandidoz. Priroda infekcii, mehanizmy agressii i zashhity, laboratornaja diagnostika, klinika i lechenie. M.: Triada-H, 2001. 345s.

2. Zaharova E.A., Shambilova N.A., Azizov I.S. Sravnitel'naja ocenka chuvstvitel'nosti k protivogribovym preparatam klinicheskikh shtammov gribov roda *Candida*, vydelennyh iz fekalij i vlagalishha. *Uspehi medicinskoj mikologii*. 2006. 7: 167-168.
3. Ankirskaja A.S., Murav'jova V.V., Fursova S.A. Monitoring vidovogo sostava i chuvstvitel'nosti k antimikotikam drozhzhopodobnyh gribov, vydelennyh iz vlagalishha zhenshhin reproduktivnogo vozrasta. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija*. 2009. 8(1): 87-95.
4. Zheltikova T.M., Glushakova A.M. Fungicidnoe dejstvie razlichnyh sistemnyh antimikotikov na griby roda *Candida* in vitro. *Akusherstvo i ginekologija*. 2010. 4: 79-81.
5. Rebrova R.N. Griby roda *Candida* pri zabolevanijah negribovoj jetiologii. M.: Medicina, 1989. 128s.
6. Ashmarin I.P., Vorob'jov A.A. *Statisticheskie metody v mikrobiologii*. L.: Gos. izd. med. lit, 1962. 177s.
7. Niewerth M., Kunze D., Seibold M. et al. Ciclopirox olamine treatment affects the expression pattern of *Candida albicans* genes encoding virulence factors, iron metabolism proteins, and drug resistance factors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003. 47(6): 1805-1819.
8. Vanessa M. S., Caroline J. B., Bernhard H. et al. Exposure of *Candida albicans* to antifungal agents affects expression of SAP2 and SAP9 secreted proteinase genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005. 55: 645-654.
9. Drobkova V.A., Karpunina T.I. Vidovoj spektr i biologicheskie osobennosti gribov roda *Candida*, izoliruemyh iz vlagalishha zhenshhin reproduktivnogo vozrasta. *Sovremennye problemy infekcionnoj patologii cheloveka*. 2009. 2: 244-248.
10. Batyrbaeva D.Zh., Ramazanova B.A., Taurbaeva N.T. Sravnitel'nyj analiz izuchenija ustojchivosti *Candida* spp. k protivogribovym preparatam razlichnymi metodami. *Problemy medicinskoj mikologii* 2015. 17(2): 43-44.
11. Vershinina M.G., Kalugina E.Ju., Volodin O.B. Analiz vstrechaemosti *Candida* spp. v otdeljaemom nizhnih dyhatel'nyh putej bol'nyh reanimacionnogo otdelenija mnogo-profil'nogo stacionara. *Problemy medicinskoj mikologii*. 2014. 16(2): 51.
12. Malova I.O., Kuznecova Ju.A. Chuvstvitel'nost' k antimikotikam *Candida* spp., vydelennyh ot pacientok s hronicheskim recidivirujushhim kandidozom urogenital'nogo trakta. *Problemy medicinskoj mikologii*. 2013. 15(2): 103.
13. Saperkin N.V., Shirokova I.Ju., Sergeeva A.V. i dr. Izuchenie chuvstvitel'nosti *Candida* spp. k antimikotikam. *Problemy medicinskoj mikologii*. 2014. 16(2): 124.
14. Pestrikova T.Ju., Jurasova E.A., Voronova Ju.V. i dr. Differencirovannyj podhod k lecheniju raznyh form vul'vovaginal'nogo kandidoza. *Ginekologija*. 2014. 3: 38-40.
15. White TC, Holleman S, Dy F. et al. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002. 46(6): 1704-1713.
16. Sanguinetti M., Posteraro B., Fiori B. et al. Mechanisms of Azole Resistance in Clinical Isolates of *Candida glabrata* Collected during a Hospital Survey of Antifungal Resistance. *Antimicrobial agent and chemotherapy*. 2005. 2: 668-679.
17. Ivanova L.V., Barancevich E.P., Shljahto E.V. Rezistentnost' gribov-patogenov k antimikotikam (obzor). *Problemy medicinskoj mikologii*. 2001. 13(1): 14-17.
18. Isaeva G.Sh. Rezistentnost' *H. pylori* k antibakterial'nym preparatam i metody ee opredelenija. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija*. 2010. 12(1): 57-66.

**Образец ссылки на статью:**

Пашина О.А., Карташова О.Л., Пашкова Т.М., Попова Л.П. Антимикотикорезистентность грибов рода *Candida*, выделенных из репродуктивного тракта женщин с воспалительными заболеваниями гениталий. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2016. 3: 9с. [Электронный ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/POA-2016-3.pdf>).