

ОЦЕНКА ВИРУЛЕНТНОСТИ ГРИБОВ РОДА *CANDIDA* И ЕЕ РОЛЬ В РАЗВИТИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПЕРИОДОНТА У ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА

© Анна Владимировна Зачиняева¹, Ярослав Васильевич Зачиняев²

¹ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова. 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6

² Российский государственный педагогический университет имени А.И. Герцена. 191186, Санкт-Петербург, наб. реки Мойки, д. 48

Контактная информация: Анна Владимировна Зачиняева — профессор кафедры микробиологии, доктор биологических наук. E-mail: annaraivola@yahoo.com

Резюме. Распространение грибковых инфекций значительно возросло, что способствует развитию заболеваемости. Грибы рода *Candida* являются основными патогенными микроорганизмами человека, которые вызывают инфекции слизистой оболочки. Последние данные свидетельствуют о том, что большинство инфекций, вызываемых этим патогеном, связаны с их способностью образовывать биопленки. Существенным фактором для вирулентности рода *Candida* является способность продуцировать ферменты, и это может иметь решающее значение в возникновении грибковых инфекций. Были исследованы пятьдесят клинических штаммов *Candida* spp., выделенные у детей из полости рта: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*. Все штаммы *Candida* были протестированы *in vitro* на продуцирование биопленочной, протеиназной, каталазной, гемолитической, антилизотимной активности. Была определена чувствительность к амфотерицину В, флуконазолу, интраконазолу. Каталазная активность наблюдалась у 100% штаммов *Candida*, но протеиназная и гемолитическая активность не наблюдалась. Более 50% штаммов *Candida albicans* продемонстрировали способность к образованию биопленки. При исследовании чувствительности к антимикотикам наибольшая доля восприимчивости наблюдалась у всех видов в отношении амфотерицина В (100%, $p < 0,001$).

Ключевые слова: дети, грибковые инфекции, биоплёнка, ферментативная активность, периодонт, заболевания.

EVALUATION OF THE VIRULENCE OF FUNGI OF THE GENUS *CANDIDA* AND ITS ROLE IN THE DEVELOPMENT OF PERIODONTAL DISEASES IN YOUNG CHILDREN

© Anna V. Zachinyaeva, Yaroslav V. Zachinyaev

¹ Military Medical Academy named after S.M. Kirov. 194044, St. Petersburg, Academician Lebedev str., 6

² Russian State Pedagogical University named after A.I. Herzen. 191186, St. Petersburg, Nab. Moika River, 48

Contact Information: Anna V. Zachinyaeva — Professor, Department of Microbiology, Doctor of Biological Sciences. E-mail: annaraivola@yahoo.com

Summary. The incidence of fungal infections has increased significantly, so contributing to morbidity. *Candida* species are major human fungal pathogens that cause mucosal infections. Recent evidence suggests that the majority of infections produced by this pathogen are associated with biofilm growth. An essential factor to the virulence of the genus *Candida* is the ability to produce enzymes and this may be crucial in the establishment of fungal infections. Fifty clinical strains of *Candida* spp. isolated from the children oral cavity were evaluated, including the following species: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*. All *Candida* strains were tested *in vitro* for produc-

tion of biofilm, proteinase, katalaza, hemolytic, antilizocim activity. Sensitivity to amphotericine B, fluconazole, intraconazole was determined. Katalaza activity were observed in 100% of the *Candida* strains, but proteinase and hemolytic activity were not observed. More than 50% of the *Candida albicans* strains showed biofilmforming capacity. In the study of antimycotic sensitivity the highest percent of susceptibility was all species was observed towards amphotericine B (100%, $p < 0.001$).

Keywords: children, fungal infections, biofilm, enzymatic activity, periodontal diseases.

У новорожденных и детей раннего возраста кандидоз слизистых оболочек ротовой полости (СОПР) может проявляться в виде хейлита, гингивита и стоматита, но чаще, как правило, преобладают псевдомембранозная форма кандидоза полости рта, известная как молочница. Клинически она характеризуется типичными внешними проявлениями: гиперемией и умеренной отечностью пораженных слизистых оболочек, наличием легко снимающихся налетов белого цвета творожистого вида, иногда наблюдается зуд. Может поражать щеки, язык, редко небо и остальные отделы полости рта [1].

В последние годы наблюдается тенденция к повышению удельного веса ассоциаций плёнокообразующих микроорганизмов, вызывающих инфекционный процесс при молочнице. Совместное развитие микроорганизмов в миксопопуляции может приводить к усилению патогенного потенциала, ассоциированного с персистентными свойствами бактерий [2].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить вирулентные свойства клинически значимых штаммов микроорганизмов, выделенных у детей раннего возраста с подтвержденным диагнозом — кандидоз СОПР, находящихся на излечении в ДГБ Святой Ольги, СПб.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованы 50 клинических штаммов грибов р. *Candida*, видовую принадлежность которых определяли на основании результатов тест-системы AUXACOLOR2 (BioRad, США).

Определение способности к образованию биоплёнки клиническими штаммами на поверхности 96-луночных полистирольных планшетов проводили традиционным методом [3]. По уровню экстракции красителя этанолом, измеренному в единицах оптической плотности на спектрофотометре «ПЭ-5400 УФ» при длине волны 560 нм оценивали активность формирования биоплёнки. Для интерпретации полученных данных определяли способность штаммами формировать биоплёнки в соответ-

ствии со следующими критериями: при значениях оптической плотности ниже 0,090 — считали, что штаммы не обладали способностью к образованию биоплёнки; при $0,090 < OD_{560} \leq 0,5$ — штаммы обладали низкой; при $0,5 < OD_{560} \leq 1,0$ — средней; при $OD_{560} > 1,0$ — высокой способностью к образованию биоплёнок.

Для определения антилизотимной активности (АЛ) использовали препарат лизоцима («Реахим»). Готовили серию разведений препарата (1, 5, 10, 20 мкг/мл) в агаризованной среде Сабуро. На агар с лизоцимом наносили 50 мкл изучаемой культуры (10^9 КОЕ/мл). Посевы инкубировали 24 ч. при 37 °С, затем исследуемые культуры обрабатывали парами хлороформа в течение 10 минут. Затем заливали полужидкой агаровой средой (0,5%), содержащей суточную культуру (0,1 мл) *Micrococcus lysodeikticus* (ATCC № ATCC 15307) с мутностью 4 по Мак Фарланду, и инкубировали (37 °С, 24 ч). Исследуемая культура обладала антилизотимной активностью, если вокруг ее колонии отмечался рост *Micrococcus lysodeikticus*.

Гемолитическую, каталазную и протеолитическую активности определяли по М.И. Биргеру [4]. Чувствительность к флуконазолу, амфотерицину В, интраконазолу определяли методом диффузии в агар в соответствии с МУК 4.2.1890–04.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием программ «Statistica 10.0», «MS Excel».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследовано 50 клинических штаммов грибов рода *Candida*: *C.albicans*-23, *C.tropicalis*-14, *C.krusei*-8, *C.glabrata*-5.

Изучение факторов патогенности у клинических штаммов грибов показало отсутствие у них гемолитической и протеолитической активности.

Наиболее активно биоплёнку на поверхности 96-луночного полистирольного планшета формировали штаммы грибов *C.albicans* (табл. 1).

Таблица 1

Результаты плёнообразующей способности клинических изолятов *Candida spp.*

	Биомасса биоплёнки в ЕД оптической плотности (ОП)					
	кол-во штаммов	низкая (<0.5)	кол-во штаммов	средняя (0.5–1.0)	кол-во штаммов	высокая (>1.0)
<i>C.albicans</i>	7	0,13±0,02	10	0,73±0,01	6	1,98±0,13
<i>C.tropicalis</i>	9	0,08±0,01	3	0,78 ±0,01	2	4,28±0,20
<i>C.krusei</i>	6	0,06±0,01	2	0,823±0,02	-	-
<i>C.glabrata</i>	2	0,06±0,01	2	0,63±0,01	1	1,14±0,10

Таблица 2

Результаты оценки чувствительности грибов рода *Candida* к антимикотическим препаратам

Препарат	S-устойчивый R-резистентный	<i>C.albicans</i> n=23	<i>C.tropicalis</i> n=14	<i>C.krusei</i> n=8	<i>C.glabrata</i> n=5
Амфотерицин В	S	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)
	R	-	-	-	-
Флуконазол	S	30,6%	20,2%	0	12%
	R	69,4%	79,8	100%	88%
Интраконазол	S	82%	88,2%	14,6%	50%
	R	18%	11,8%	85,4%	50%

Подобная закономерность многократно отмечена в научных источниках и обусловлена, по мнению авторов, особенностью филаментации грибов р. *Candida*. Так, зрелые биоплёнки *C.albicans* и *C.tropicalis* имеют гетерогенную структуру, состоящую из бластоспор и псевдомицелия, окруженных толстым внеклеточным полисахаридным матриксом. Морфология биоплёнок *C.glabrata* представлена исключительно дрожжевой формой. *C.krusei*, как правило, проявляет высокую плёнообразующую активность в ассоциации с *C.glabrata* [5].

Изучение способности к инаktivации факторов естественной резистентности у изученных грибов рода *Candida*, показало наличие АЛА 20 мкг/мл у 32,4% штаммов *C.albicans*, 48,2% у штаммов *C.tropicalis*, 29,7% у штаммов *C.krusei*, 25,8% у штаммов *C.glabrata*.

Все изученные штаммы продуцировали каталазу, ингибируя, таким образом, процесс кислородзависимого фагоцитоза.

Полученные результаты по противогрибковой восприимчивости (Табл. 2) показали, что все изоляты рода *Candida* были восприимчивы к амфотерицину. Резистентность *C.krusei* и *C.glabrata* к флуконазолу отмечалась многими исследованиями и связана с их природной резистентностью к азолам [6, 7]. Принимая во внимание широкое применение флуконазола при лечении кандидоза СОПР у новорожденных, важно знать активность применяемого

препарата по отношению к изолированным штаммам *C.krusei* и *C.glabrata*.

Статистическая корреляция между образованием биоплёнки и восприимчивостью к противогрибковым препаратам отсутствовала.

Таким образом, исследованные клинические штаммы грибов рода *Candida* обладают плёнообразующей и антилизоцимной активностью, а также устойчивостью к противогрибковым препаратам. Факторы вирулентности исследуемых изолятов не вызывают сомнения в необходимости индивидуального подхода при обследовании и лечении детей с кандидозом СОПР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зачиняева А.В., Москалев А.В., Андреев В.А., Сбойчаков В.Б. Медицинская микология. Руководство для врачей. 2-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2018: 288.
2. Козлова Н.С., Баранцевич Н.Е., Баранцевич Е.П., Гоик В.Г. Устойчивость к антибиотикам клебсиелл различного происхождения. Инфекция и иммунитет. 2016; 6(3): 261–261.
3. Зачиняева А.В., Зачиняев Я.В. Оценка риска персистенции плёнообразующих изолятов грибов рода *Candida* среди больных с тяжёлой сочетанной травмой. Успехи медицинской микологии. 2015; 15: 307.
4. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. М.: Медицина; 1982.

5. Riera M., Ch. d'Enfert. New regulations of biofilm development in *C.glabrata*. Research in Microbiology. 2013; 163(4): 297–307.
6. Козлова Н.С., Баранцевич Н.Е., Баранцевич Е.П. Антибиотикорезистентность возбудителей гнойно-септических инфекций в многопрофильном стационаре. Проблемы медицинской микологии. 2018; 20(1): 40–48.
7. Spelberg B.J., Filler S.G., Edwards J.E. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. Clin. Infect. Dis. 2006; 42: 244–251.
3. Zachinyaeva A.V., Zachinyaev Ya.V. Otsenka riska persistentsii plenkoobrazuyushchikh izolyatov gribov roda *Candida* sredi bol'nykh s tyazheloy sochetannoy travmoy. [Assessment of the risk of persistence of film-forming isolates of fungi of the genus *Candida* among patients with severe combined trauma]. Uspekhi meditsinskoy mikologii. 2015; 15:30. (in Russian).
4. Birger M.O. Spravochnik po mikrobiologicheskim i virusologicheskim metodam issledovaniya. [Handbook of Microbiological and Virological Research Methods]. M.: Medicine; 1982. (in Russian).
5. Riera M., Ch. d'Enfert New regulations of biofilm development in *C.glabrata*. Research in Microbiology. 2013; 163(4): 297–307.
6. Kozlova N.S., Barantsevich N.E., Barantsevich E.P. Antibiotikorezistentnost' vozbuditeley gnoyno-septicheskikh infektsiy v mnogoprofil'nom statsionare. [Antibiotic resistance of pathogens of purulent-septic infections in a multidisciplinary hospital]. Problemy meditsinskoy mikologii. 2018; 20(1): 40–48. (in Russian).
7. Spelberg B.J., Filler S.G., Edwards J.E. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. Clin. Infect. Dis. 2006; 42: 244–251.

REFERENCES

1. Zachinyayeva A.V., Moskalev A.V., Andreyev V.A., Sboychakov V.B. Meditsinskaya mikologiya. [Medical mycology: a guide for doctors]. Rukovodstvo dlya vrachey. 2-ye izd., pererab. i dop. M.: GEOTAR-Media; 2018: 288. (in Russian).
2. Kozlova N.S., Barantsevich N.E., Barantsevich E.P., Goik V.G. Ustoychivost' k antibiotikam klebsiell razlichnogo proiskhozhdeniya. [Resistance to antibiotics *Klebsiella* of various origins]. Infektsiya i immunitet. 2016; 6 (3): 261–261. (in Russian).
3. Zachinyaeva A.V., Zachinyaev Ya.V. Otsenka riska persistentsii plenkoobrazuyushchikh izolyatov gribov roda *Candida* sredi bol'nykh s tyazheloy sochetannoy travmoy. [Assessment of the risk of persistence of film-forming isolates of fungi of the genus *Candida* among patients with severe combined trauma]. Uspekhi meditsinskoy mikologii. 2015; 15:30. (in Russian).
4. Birger M.O. Spravochnik po mikrobiologicheskim i virusologicheskim metodam issledovaniya. [Handbook of Microbiological and Virological Research Methods]. M.: Medicine; 1982. (in Russian).
5. Riera M., Ch. d'Enfert New regulations of biofilm development in *C.glabrata*. Research in Microbiology. 2013; 163(4): 297–307.
6. Kozlova N.S., Barantsevich N.E., Barantsevich E.P. Antibiotikorezistentnost' vozbuditeley gnoyno-septicheskikh infektsiy v mnogoprofil'nom statsionare. [Antibiotic resistance of pathogens of purulent-septic infections in a multidisciplinary hospital]. Problemy meditsinskoy mikologii. 2018; 20(1): 40–48. (in Russian).
7. Spelberg B.J., Filler S.G., Edwards J.E. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. Clin. Infect. Dis. 2006; 42: 244–251.