

ВИДОВОЙ СПЕКТР И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ПРОТИВОГРИБКОВЫМ ПРЕПАРАТАМ ДРОЖЖЕЙ РОДА *CANDIDA*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗНЫХ ИСТОЧНИКОВ

¹ФГБНУ «Азовский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства», 344002, Ростов-на-Дону;

²ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, 344022, Ростов-на-Дону

Введение. В настоящее время идентифицировано около 100 000 видов микроскопических грибов. Особого внимания заслуживают данные о заболеваниях, вызываемых условно-патогенными грибами. В последние годы на рыбохозяйственных предприятиях всё чаще регистрируются микозы. К этой группе инфекций относится и кандидоз.

Материал и методы. Изучен видовой состав и чувствительность к антимикотикам грибов рода *Candida*, циркулирующих в воде рыбохозяйственных предприятий Ростовской области и Краснодарского края. Чувствительность штаммов к препаратам определяли методом диффузии в агар.

Результаты. Отмечены значительные колебания в степени резистентности *Candida* spp. к четырём антимикотическим средствам. Зарегистрирован случай кандидоза у сеголетков и производителей осетровых.

Заключение. Наибольшую активность против исследованных культур кандид показал препарат из группы полиенов. Несмотря на чувствительность *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* *C. albicans*, к нистатину, применение неадсорбируемых антимикотиков (*in vivo*) при кандидозе кишечника неэффективно. Полученные данные указывают на целесообразность проведения антибиотикограммы для назначения адекватной терапии при кандидозе.

Ключевые слова: антибиотико-чувствительность; штаммы; кандидоз; препараты; изоляты; амфотерицин; нистатин; клотримазол; флуконазол.

Для цитирования: Фролова Я.Н., Морозова М.А., Диденко И.В. Видовой спектр и чувствительность к противогрибковым препаратам дрожжей рода *Candida*, выделенных из разных источников. *Гигиена и санитария*. 2018; 97(3): 204-207. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-3-204-207>

Для корреспонденции: Фролова Яна Николаевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела аквакультуры и прикладных исследований «АзНИИРХ». E-mail: yanchik-frolova@yandex.ru

Frolova Ya.N.¹, Morozova M.A.¹, Didenko I.V.²

SPECIES COMPOSITION OF *CANDIDA* SPP. ISOLATED FROM DIFFERENT SOURCES AND THEIR SENSITIVITY TO ANTIFUNGAL PREPARATIONS

¹Azov Fisheries Research Institute, Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation;

²Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, 344022, Russian Federation

About 100,000 species of microscopic fungi were currently identified. Data on diseases caused by conditionally pathogenic fungi is particularly noteworthy. Both specific composition of *Candida* spp. found at fish-rearing farms of Rostov and Krasnodar regions and their susceptibility to antibiotics preparations have been studied. Strain susceptibility to drugs was determined by the disc-diffusion method. Significant variations are observed in the *Candida* resistance to four antibiotic preparations. Some sturgeon fingerlings and breeders have been found to be infected with candida. The drugs from the group of polyenes showed the greatest activity against the studied crops *Candida*. Despite the susceptibility of *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* *C. albicans* to nystatin, the application of reabsorbing antifungals (*in vivo*) candidiasis of the intestine fails to be efficient. The data obtained show antibiogram to be expedient when assigning an adequate treatment of candidosis.

Key words: antibiotic sensitivity; strains; candidosis; preparations; isolates; amphotericin; nystatin; clotrimazole; fluconazole.

For citation: Frolova Ya.N., Morozova M.A., Didenko I.V. Species composition of *Candida* spp. isolated from different sources and their sensitivity to antifungal preparations. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal)* 2018; 97(3): 204-207. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-3-204-207>

For correspondence: Yana N. Frolova, MD, Ph.D., Senior Researcher, Department of Aquaculture and Applied Research of the Azov Fisheries Research Institute, Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: yanchik-frolova@yandex.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received: 20 January 2017

Accepted: 18 October 2017

Введение

В настоящее время идентифицировано около 100 000 видов микроскопических грибов. Широкое распространение грибов определяется их адаптивными способностями к различным температурам, влажности, инсоляции, относительно малыми питательными потребностями, высокой устойчивостью к физико-химическим и биологическим факторам [1]. Этому же благоприятствует длительное со-

стояние покоя, без размножения, свойственное грибам на голодных субстратах.

Особого внимания заслуживают данные о заболеваниях, вызываемых условно-патогенными грибами. В последние годы на рыбохозяйственных предприятиях всё чаще регистрируются микозы. К этой группе инфекций относится и кандидоз [2, 3]. Несмотря на проводимую химиотерапию, заболеваемость кандидозом среди представителей многих видов животных [4–7], птиц [8] и рыб

Таблица 1

Зоны подавления роста культур дрожжей противогрибковыми препаратами

Противогрибковые препараты в диске	Диаметр зон подавления роста культур, мм		
	устойчивых	промежуточных (чувствительность зависит от дозы)	чувствительных
Амфотерицин В	< 14	–	≥ 14
Нистатин	< 18	–	≥ 18
Клотримазол	< 12	–	≥ 12
Флуконазол	≤ 19	20–28	≥ 19

[9] возрастает, а многие аспекты данного микоза до настоящего времени ветеринарными специалистами изучены недостаточно.

В соответствие с Единой Международной классификацией, грибы рода *Candida* отнесены к семейству *Cryptococcaceae*, классу несовершенных грибов *Fungi imperfecti*. Род *Candida* в настоящее время насчитывает более 80 видов. Однако наибольший интерес для ветеринарной микологии и рыбохозяйственной деятельности представляют только 6 видов: *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. krusei*, *C. parakrusei*. Важным аспектом является выделение наиболее значимых видов грибов, присутствующих в воде и способных вызвать заболевания у рыб. Причём в последнее время наблюдается тенденция к увеличению числа резистентных микроорганизмов к химиопрепаратам, что угрожает эффективности проводимой терапии. Это одна из сложных проблем, так как в окружающей среде вследствие их интенсивного клинического применения циркулируют устойчивые штаммы [10–12].

Поэтому целью работы послужила оценка устойчивости к противогрибковым препаратам условно-патогенных дрожжей рода *Candida*, циркулирующих в рыбохозяйственных предприятиях.

Задачей исследований было выявить распространённость *Candida spp.* в условиях садкового и бассейнового выращивания осетровых пород рыб и определить чувствительность штаммов к противогрибковым (антимикотическим) препаратам.

Материал и методы

В весенне-летний период 2007, 2015–2016 гг. проведены микологические исследования воды, кормов и осетровых рыб на шести рыболовных хозяйствах Ростовской области и Краснодарского края. Пробозабор воды производился из отстойников, бассейнов и садков. У рыб (русский осётр, русско-ленский осётр, севрюга, стерлядь, белуга) исследовали кровь, жабры, паренхиматозные органы, кишечник и мышечную ткань.

Для выделения и идентификации дрожжей рода *Candida* проводили посев исследуемого материала на микробиологические среды: Сабуро, Кандида и Хромогенный агары. Ферментативную активность дрожжей определяли на средах с 1%-ой пептонной водой и индикатором (Андрее, бром тимоловый синий) по общепринятым методикам, но с добавлением 2% углевода. Молекулярно-генетический метод исследований (ПЦР-диагностику) использовали для подтверждения принадлежности микроорганизмов к виду *Candida albicans*. Результаты ПЦР-анализа оценивали по наличию или отсутствию на

Количество штаммов дрожжей рода *Candida*, выделенных из воды и осетровых рыб на рыболовных хозяйствах за период исследований

Семейство	Род	Вид	Количество штаммов	
			Вода	Рыба
<i>Cryptococcaceae</i>	<i>Candida</i>	<i>Candida albicans</i>	4	7
		<i>C. glabrata</i>	11	8
		<i>C. guilliermondii</i>	7	9
		<i>C. krusei</i>	6	5
		<i>C. tropicalis</i>	6	8

электрофореграмме специфических полос амплифицированной ДНК. Положительными считали образцы, которые содержали специфическую светящуюся полосу (370 п. н.) на уровне фрагмента ДНК-возбудителя. Отрицательными считали образцы, которые содержали только полосу внутреннего контрольного образца (730 п. н.).

Для определения чувствительности штаммов дрожжей к противогрибковым препаратам применяли диско-диффузионный метод [13]. Использовали диски с различным содержанием препаратов (мкг/диск): с амфотерицином В (50 мкг), нистатином (50 мкг), клотримазолом (10 мкг) и флуконазолом (25 мкг). Результаты оценивали по диаметру зоны задержки (отсутствия) роста микроорганизмов вокруг дисков согласно «Инструкции по использованию дисков с противогрибковыми препаратами» Научно-исследовательского центра фармакотерапии (НИЦФ) [14] (табл. 1).

Результаты

Проведённые микологические исследования на осетровых заводах Краснодарского края и товарных хозяйств Ростовской области показали циркуляцию дрожжей рода *Candida* в воде садков и отстойников, поступающей в них из поверхностных водоисточников. Единичные изоляты *Candida spp.* обнаруживали в воде бассейнов и у клинически здоровой молоди русского осётра, севрюги (жабры, кишечник) и русско-ленского осётра (кишечник).

Зарегистрирован случай кандидоза (кандидамикоза) у сеголетков осетровых, производителей русско-ленского осётра и белуги (в июне-июле) на одном из осетровых заводов Краснодарского края. Штаммы *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* выделяли от больных рыб (кровь, кишечник, печень) и в пробах воды. Наличие *Candida albicans* было подтверждено ПЦР-диагностикой. Источником заражения рыб являлась вода из отстойников, которая распределялась в бассейны, где и регистрировали вспышки заболеваний. Гибель сеголетков в бассейнах на момент исследования колебалась в пределах 10 – 40% особей в течение месяца. Диагноз болезни устанавливался комплексно с учётом клинических, морфологических и микологических исследований.

При анализе кормов, применяемых на рыболовных предприятиях, установлено отсутствие дрожжей и плесневых грибов.

За период исследований собрана коллекция из 71 штамма дрожжей рода *Candida* (11 – *Candida albicans*, 11 – *C. krusei*, 14 – *C. tropicalis*, 16 – *C. guilliermondii*, 19 – *C. glabrata*) (табл. 2).

C. albicans на плотной среде образует выпуклые колонии белого или кремового цвета сметанообразной

Чувствительность основных возбудителей кандидоза к противогрибковым препаратам

<i>Candida spp.</i>	Доля культур, %	Чувствительность к противогрибковым препаратам при использовании дисков			
		флуконазол	амфотерицин В	клотримазол	нистатин
<i>C. albicans</i>	65	S	S	R	S
<i>C. albicans</i>	35	S	R	S	R
<i>C. glabrata</i>	47	R	S	R	S
<i>C. glabrata</i>	40	S	S	S	S
<i>C. glabrata</i>	13	R	R	S	S
<i>C. guilliermondii</i>	100	S	S	R	S
<i>C. krusei</i>	100	R	S	R	R
<i>C. tropicalis</i>	100	S	S	S	S

Примечание. S – чувствительность; R – устойчивость.

консистенции; дрожжевые клетки овальной или удлиненно-овальной формы размером 2,9–7,2 × 2,9–14,4 мкм, филаментируют неравномерно, скопления дрожжевых клеток (гломерулы) сильно преломляют свет и имеют почти чёрную окраску. Преобладает шаровидный тип роста, причём гломерулы из-за тесного прилегания друг к другу в процессе роста деформируют свою первоначальную шарообразную форму.

C. tropicalis образует кремовые, белые или серые колонии, гладкие или складчатые. Дрожжевые клетки овоидной формы размером 4,3–7,2 × 5,8–10,8 мкм. Псевдомицелий обильный, состоящий из длинных разветвлённых нитей. Преобладающий тип роста – *Mycotoruloides*, встречается тип *Candida*, и редко – шаровидный тип. Трудности идентификации могут наблюдаться при дифференцировке девиантных штаммов *C. albicans* (отсутствие хламидоспор, «ростковых трубок») с сахарозоотрицательным вариантом *C. tropicalis*, тем более, что данный вид особенно интенсивно (до 30% клеток) формирует структуры, трудно отличимые от «ростковых трубок». Показано, что при пересевах таких штаммов восстанавливается способность к ассимиляции, но не ферментации сахарозы. В этиологии кандидоза последний вид уступает по частоте лишь *C. albicans*.

C. krusei образует колонии плоские, белого или матового цвета, вуалеобразные, с неровными краями, мягкой консистенции. На жидкой среде образуется нежная пленка и высокое пристеночное кольцо. Дрожжевые клетки овальной, удлинённой или цилиндрической формы размером 2,2–5,6 × 4,3–15,2 мкм, расположение одиночное или в виде цепочки. Обильный псевдомицелий быстро и равномерно образуется вдоль штрихового посева. Преобладает тип роста *Mycocandida*, но встречаются типы *Mycotoruloides* и *Candida*.

C. guilliermondii образует колонии жёлто-кремового цвета, с гладкой и блестящей поверхностью, мягкой консистенции. Встречаются варианты с матовой поверхностью и исчерченностью. Дрожжевые клетки сравнительно мелкие (2–4,5 × 2,5–7 мкм), чаще овоидной, реже цилиндрической формы.

C. glabrata образует глянецовые гладкие колонии кремового цвета и мягкой консистенции. Клетки овоидные размером 2,5–4,5 × 4–6 мкм. Псевдомицелия не образует.

Некоторые штаммы образуют немногочисленные разветвлённые нити, состоящие из овоидных клеток [15].

Обсуждение

Оценка эффективности применения антимикотиков (флуконазол, амфотерицин В, клотримазол, нистатин) против выделенных кандид показала, что большинство штаммов проявляли в той или иной степени чувствительность. У *C. albicans* она регистрировалась в 100% случаев к флуконазолу, в 65% – к амфотерицину В и нистатину. У *C. tropicalis* и *C. guilliermondii* чувствительность регистрировалась несколько чаще: флуконазол, амфотерин В, нистатин – 100%, за исключением устойчивости последнего к клотримазолу. Для штаммов *C. glabrata* данный показатель отмечался в 40% случаев для флуконазола, в 87% – для амфотерицина и в 100% – для нистатина. Культуры *C. krusei* имели чувствительность лишь к амфотерицину В (табл. 3).

Таким образом, проведённые микологические исследования на осетровых заводах Краснодарского края и товарных хозяйств Ростовской области установили циркуляцию дрожжей рода *Candida* как в воде садков и отстойников, поступающей в них из поверхностных водоисточников, так и в организме сеголетков и производителей осетровых. Кандиды, выделенные из воды и организма рыб, были представлены видами *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. tropicalis*.

Заключение

Наибольшую активность против исследованных культур кандид показали препараты из группы полиенов. Несмотря на чувствительность *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* *C. albicans* (65%) к нистатину, применение неадсорбируемых антимикотиков (*in vivo*) при кандидозе кишечника неэффективно. К флуконазолу были чувствительны *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*. Культуры *C. krusei* имели чувствительность лишь к амфотерицину В. Поэтому целесообразно проведение антибиотикограммы для назначения адекватной терапии при кандидозе.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Kwon-Chung K.J. Phylogenetic spectrum of fungi that are pathogenic to humans. *Clin. Infect. Dis.* 1994; 19(Suppl. 1): S1-7.
2. Сергеев А.Ю., Иванов О.Л., Сергеев Ю.В., Караулов А.В. Защита макроорганизма при кандидозе и возможности иммунокоррекции. В кн.: Караулов А.В., ред. *Успехи клинической иммунологии и аллергологии. т. 1. М.*; 2001: 308-28.
3. Себряков Е.В. Кандидамикоз животных. *Ветеринария сельскохозяйственных животных.* 2006; 5: 25-9.
4. Домницкий И.Ю. Патоморфологические изменения при кандидозе телят. *Ветеринарная практика.* 2007; 3: 66-7.
5. Кисленко В.Н. *Ветеринарная микробиология и иммунология.* М.; 2006.
6. Литвинов А.М. Поверхностный кандидоз плотоядных животных. *Ветеринария.* 2010; 7: 3-5.
7. Лысухо Т.Н. Система ветеринарно-санитарных, профилактических и лечебных мероприятий при кандидамикозе поросят. В кн.: Лысухо Т.Н., Лысухо А.С. *Актуальные проблемы производства свинины в РФ.* 2001: 117-8.
8. Гарольд Л. Кандидоз: микоз пищеварительного тракта. *Птицефабрика.* 2006; 8: 48-51.
9. Ожередова Н.А. Кандидамикоз карповых рыб. *Ветеринарный врач.* 2008; 4: 49-52.
10. Анганова Е.В., Курносоев А.Д., Самойлова И.Ю., Савилов Е.Д. Анти-

- биотикорезистентность бактерий микробиоценозов водных объектов как показатель антропогенной нагрузки на водоем (на примере реки Лены). *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*. 2008; 76(1): 75-7.
- Страчунский Л.С., Богданович Т.М., Козлова С.Н. Состояние антибиотикорезистентности в России. В кн.: Страчунский Л.С., Белоусов Ю.Б., Козлов С.Н., ред. *Антибактериальная терапия: Практическое руководство*. М.: Фарммединфо; 2000.
 - Хвещук П.Ф., Рудакова А.В. Рациональное использование лекарственных средств как основа совершенствования лечебного процесса. В кн.: *Современные технологии диагностики и терапии инфекционных болезней. Тезисы докладов научной конференции 27-28 октября 1999г.* СПб.; 1999: 323-4.
 - Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания*. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России; 2004.
 - Инструкция по использованию дисков с противогрибковыми препаратами «Научно-исследовательский центр фармакотерапии (НИЦФ)»*. Доступно по: http://www.nicf.spb.ru/diski_i_docs/10.doc
 - Кубась В.Г. *Этиология и патогенез кандидоза. Микробиология в гигиене и клинической медицине*. СПб.: Издательский дом СПб МАПО; 2000: 4-19.
 - Kislenko V.N. *Veterinarnaya mikrobiologiya i immunologiya*. Moscow; 2006. (in Russian)
 - Litvinov A.M. Poverkhnostnyy kandidoz plotoyadnykh zhivotnykh. *Veterinariya*. 2010; (7): 3-5. (in Russian)
 - Lysukho T.N. Sistema veterinarno-sanitarnykh, profilakticheskikh i lechebnykh meropriyatiy pri kandidamikoze porosyat. In: Lysukho T.N., Lysukho A.S. *Aktual'nye problemy proizvodstva sviny v RF*. 2001: 117-8. (in Russian)
 - Garol'd L. Kandidoz: mikoz pishchevaritel'nogo trakta. *Ptitsefabrika*. 2006; (8): 48-51. (in Russian)
 - Ozheredova H.A. Kandidamikoz karpovykh ryb. *Veterinarnyy vrach*. 2008; (4): 49-52. (in Russian)
 - Anganova E.V., Kurnosov A.D., Samoylova I.Yu., Savilov E.D. Antibiotikorezistentnost' bakteriy mikrobiotsenozov vodnykh ob'ektov kak pokazatel' antropogennoy nagruzki na vodoem (na primere reki Leny). *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk)*. 2008; 76(1): 75-7. (in Russian)
 - Strachunskiy L.S., Bogdanovich T.M., Kozlova S.N. Sostoyanie antibiotikorezistentnosti v Rossii. In: Strachunskiy L.S., Belousov Yu.B., Kozlov S.N., eds. *Antibakterial'naya terapiya: Prakticheskoe rukovodstvo*. Moscow: Farmmedinfo; 2000. (in Russian)
 - Khveshchuk P.F., Rudakova A.V. Ratsional'noe ispol'zovanie lekarstvennykh sredstv kak osnova sovershenstvovaniya lechbnogo protsesssa. In: *Sovremennye tekhnologii diagnostiki i terapii infektsionnykh bolezney. Tезisy dokladov nauchnoy konferentsii 27-28 October 1999*. St. Petersburg; 1999: 323-4. (in Russian)
 - Opreделение chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam: Metodicheskie ukazaniya*. Moscow: Federal'nyy tsentr gos-sanepidnadzora Minzdrava Rossii; 2004. (in Russian)
 - Instruktsiya po ispol'zovaniyu diskov s protivogribkovymi preparatami "Nauchno-issledovatel'skiy tsentr farmakoterapii (NITSF)"*. Available at: http://www.nicf.spb.ru/diski_i_docs/10.doc (in Russian)
 - Kubas' V.G. *Etiologiya i patogenez kandidoza. Mikrobiologiya v gigiyene i klinicheskoy meditsine*. St. Petersburg: Izdatel'skiy dom Sankt Peterburga MAPO; 2000: 4-19. (in Russian)

References

- Kwon-Chung K.J. Phylogenetic spectrum of fungi that are pathogenic to humans. *Clin. Infect. Dis.* 1994; 19(Suppl. 1): S1-7.
- Sergeev A.Yu., Ivanov O.L., Sergeev Yu.V., Karaulov A.V. Zashchita makroorganizma pri kandidoze i vozmozhnosti immunokorreksii. In: Karaulov A.V., ed. *Uspekhi klinicheskoy immunologii i allergologii. vol. 1*. Moscow; 2001: 308-28. (in Russian)
- Sebryakov E.V. Kandidamikoz zhivotnykh. *Veterinariya sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh*. 2006; (5): 25-9. (in Russian)
- Domnitskiy I.Yu. Patomorfologicheskie izmeneniya pri kandidoze telenka. *Veterinarnaya praktika*. 2007; (3): 66-7. (in Russian)

Поступила 20.01.2017

Принята к печати 18.10.2017