

Александрова Н.А.<sup>1</sup>, Заславская М.И.<sup>1</sup>, Соловьева И.В.<sup>2</sup>, Точилина А. Г.<sup>2</sup>, Белова И. В.<sup>2</sup>

## ОЦЕНКА АНТИКАНДИДОЗНОЙ АКТИВНОСТИ МЕТАБОЛИТОВ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ ЭНТЕРОКОККОВ

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава РФ, 603005, Нижний Новгород, Россия;

<sup>2</sup>ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И. Н. Блохиной» Роспотребнадзора, 603950, Нижний Новгород, Россия

*При изучении влияние продуктов метаболизма клинических изолятов энтерококков на жизнеспособность Candida albicans установлено, что метаболиты всех исследуемых штаммов Enterococcus faecium, E. faecalis обладали фунгистатическим действием. Выраженный фунгицидный эффект является штамм-специфичным признаком. Для оценки антифунгального действия продуктов метаболизма энтерококков лучше использовать метод отсроченного антагонизма на двухслойном агаре.*

**Ключевые слова:** энтерококки; кандиды; антагонизм; метаболиты; двухслойный агар.

**Для цитирования:** Александрова Н.А., Заславская М.И., Соловьева И.В., Точилина А. Г., Белова И.В. Оценка антикандиозной активности метаболитов клинических изолятов энтерококков. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (11): 690-692. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-690-692>

Alexandrova N.A.<sup>1</sup>, Zaslavskaya M.I.<sup>1</sup>, Soloveva I.V.<sup>2</sup>, Tochilina A. D.<sup>2</sup>, Belova I.V.<sup>2</sup>

### EVALUATION OF ANTI-CANDIDA ACTIVITY OF METABOLITES OF ENTEROCOCCAL CLINICAL ISOLATES

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Privolzhsky Research Medical University» of the Ministry of Health of the Russian, 603005, Nizhny Novgorod, Russia;

<sup>2</sup>Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 603950, Nizhny Novgorod, Russia

*When studying the effect of the metabolic products of clinical isolates of enterococci on the viability of Candida albicans, it was found that metabolites of all tested strains of Enterococcus faecium, E. faecalis had a fungistatic effect. At the same time a reliable fungicidal effect is a strain-specific feature. It is better to use the method of delayed antagonism on double-layer agar to assess the antifungal effect of enterococcal metabolism products.*

**Key words:** enterococci; candida; antagonism; metabolites; bilayer agar.

**For citation:** Alexandrova N.A., Zaslavskaya M.I., Soloveva I.V., Tochilina A. D., Belova I.V. Evaluation of anti-candida activity of metabolites of enterococcal clinical isolates Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (11): 690-692 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-690-692>

**For correspondence:** Alexandrova N.A., PhD, senior lecturer, Department of epidemiology, Microbiology and evidence-based medicine; e-mail: natalyuskova@rambler.ru

#### Information about authors:

Alexandrova Natalya A. <https://orcid.org/0000-0003-4845-8056>;

Zaslavskaya Maya I. <https://orcid.org/0000-0003-1895-0699>

Soloveva Irina V. <https://orcid.org/0000-0002-3136-9500>, ResearcherID: S-8129-2016;

Tochilina Anna G. <https://orcid.org/0000-0001-7753-5730>;

Belova Irina V. <https://orcid.org/0000-0003-3402-1160>.

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

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

Received 11.10.2019

Accepted 21.10.2019

**Введение.** Вторичная антибиотикорезистентность кандид носит глобальный характер и имеет тенденцию к прогрессированию [1-4]. Постоянно ведется поиск альтернативных средств, обладающих антифунгальной активностью. Предполагают, что такими свойствами могут обладать продукты метаболизма нормальной микрофлоры, включающие комплекс бактериоцинов и литических

экзоферментов [5, 6]. Пробиотические препараты, сконструированные на основе компонентов клеток, метаболитов, сигнальных молекул пробиотических штаммов микроорганизмов принято обозначать как метабиотики [7, 8]. Получение и исследование метабиотиков является одним из перспективных направлений современной медицины и биотехнологии [8]. Повышенный интерес к метабиотикам при лечении хронических форм кандидозов обусловлен их безопасностью и эффективностью [7].

Ранее проведенные нами исследования микробиоценоза влагалища женщин показали, что выраженный

**Для корреспонденции:** Александрова Наталья Александровна, канд. биол. наук, ст. преподаватель каф. эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины; natalyuskova@rambler.ru

антагонизм в отношении кандид проявляют энтерококки [9]. Отбор штаммов микроорганизмов пригодных для создания метабиотиков и оценка эффективности их метаболитов является сложной задачей, требующей комплексного подхода. В настоящей работе оценён антифунгальный потенциал *Enterococcus spp.* и сравнены лабораторные методы, позволяющие выявить антикандидозную активность метаболитов, секретируемых энтерококками.

**Материал и методы:** Использованы чистые культуры клинических изолятов *Enterococcus faecalis* (штаммы 2482, 682, 651, 179-2, 671, 4276, 4304, 4306, 4314, 208), *Enterococcus faecium* (штаммы 173-5, 174-3), *Candida albicans* штамм 601. Видовую принадлежность штаммов определяли методом масс-спектрометрии MALDI-ToF (MALDI ToF Autoflex speed, Bruker Daltonik GmbH, Germany).

Оценку антикандидозной активности энтерококков проводили двумя методами: совместного одновременного и совместного отсроченного культивирования на двухслойном агаре. Для проведения метода одновременного культивирования на первый слой МПА засеивали энтерококки (0,1 мл,  $10^9$  кл/мл). Затем, наслаивали второй слой МПА, предварительно остудив до  $40^{\circ}\text{C}$ . На поверхность второго слоя засеивали кандиды (0,1 мл суспензии,  $10^3$  кл/мл), посеивали инкубировали ( $37^{\circ}\text{C}$ , 24 ч).

Для исследования зависимости антикандидозного эффекта от концентрации продуктов метаболизма использован метод совместного отсроченного культивирования.

Энтерококки засеивали на слой МПА, инкубировали ( $37^{\circ}\text{C}$ , 24 ч). Затем формировали второй слой агара, путём наслаивания агара Сабуро (0,8 см) поверх выросшей культуры *Enterococcus spp.* На поверхность второго слоя агара газоном засеивали микромицеты (0,1 мл,  $10^4$  кл/мл). Инкубировали посев при  $37^{\circ}\text{C}$ , 24 часа. Для контроля роста энтерококков использован двухслойный агар без посева грибов рода *Candida*. Для контроля роста кандид использовали двухслойный агар без посева энтерококков. Подсчитывали количество выросших на чашках Петри колоний микромицетов (КОЕ) при помощи счётчика колоний микроорганизмов СКМ-2 (Stegler, Россия).

**Результаты.** При одновременном совместном культивировании кандид с различными штаммами энтерококков всегда отмечалось уменьшение размера колоний

*C. albicans* по сравнению с результатами в контрольных посевах (без *Enterococcus spp.*), в среднем, в 1,43 раза ( $p<0,05$ ), что указывает на фунгистатическое действие продуктов метаболизма энтерококков, растворимых в среде. Во всех экспериментах, количество выросших колоний *C. albicans* на поверхности агара достоверно не отличалось от контроля - экспериментов без посева энтерококков ( $p>0,05$ ).

При совместном отсроченном культивировании энтерококков с кандидами хорошо заметен фунгистатический эффект метаболитов энтерококков, накопленных в среде. Это проявлялось в достоверном уменьшении размера колоний *C. albicans* (в среднем, в 1,55 раз;  $p<0,05$ ), выросших на среде с суточной культурой энтерококка. Наиболее выраженным фунгистатическим действием обладал штамм *E. faecium* 174-3, при культивировании с которым размер колоний кандид уменьшался в  $2,0\pm 0,13$  раза ( $p<0,05$ ) (см. таблицу).

При совместном отсроченном культивировании энтерококков с кандидами имел место выраженный штамм-зависимый фунгицидный эффект. Это проявлялось в том, что при выращивании *C. albicans* на агаре с суточной культурой некоторых штаммов *Enterococcus spp.* наблюдалось существенное снижение количества колониеобразующих единиц (КОЕ) микромицетов. Наиболее выраженным фунгицидным эффектом обладали метаболиты *E. faecalis* 4314, *E. faecium* 174-3, *E. faecium* 173-5, вызывающие гибель популяции кандид и уменьшение количества КОЕ микромицетов на агаре в  $2,87\pm 0,26$ ,  $2,63\pm 0,17$ ,  $2,28\pm 0,43$  раз соответственно ( $p<0,05$ ) (см. таблицу).

**Обсуждение.** В ходе исследования особенностей антифунгальной активности энтерококков в отношении *C. albicans* установлено, что все штаммы *Enterococcus spp.* проявляли фунгистатический эффект, и только часть исследованных штаммов обладали фунгицидным действием.

Метод совместного одновременного культивирования не давал полного представления об антифунгальном потенциале энтерококков. Отсутствие заметного фунгицидного эффекта у всех исследуемых штаммов *Enterococcus spp.* при их одновременном совместном культивировании с микромицетами могло быть связано с недостаточным количеством антифунгальных метаболитов энтерококков, накопленных в среде. При данном варианте совместного культивирования, кандиды мог-

Выраженность фунгистатического и фунгицидного эффекта метаболитов энтерококков

Штаммы энтерококков, культивируемых совместно с <i>C. albicans</i> 601	Фунгистатический эффект: кратность уменьшения размера колоний (количество раз)	Фунгицидный эффект: кратность снижения количества КОЕ (количество раз)
<i>E. faecium</i> 173-5	1,73±0,17*	2,28±0,43*
<i>E. faecium</i> 174-3	2,00±0,13*	2,63±0,17*
<i>E. faecalis</i> 2482	1,40±0,08*	1,25±0,10*
<i>E. faecalis</i> 682	1,40±0,09*	1,20±0,11*
<i>E. faecalis</i> 651	1,40±0,15*	1,16±0,13
<i>E. faecalis</i> 179-2	1,66±0,10*	0,99±0,12
<i>E. faecalis</i> 4304	1,65±0,12*	1,17±0,22
<i>E. faecalis</i> 4276	1,30±0,13*	1,18±0,19
<i>E. faecalis</i> 4306	1,78±0,18*	1,01±0,13
<i>E. faecalis</i> 4314	1,53±0,07*	2,87±0,26*
<i>E. faecalis</i> 208	1,22±0,10*	1,13±0,21

Примечание. \* - статистически значимые отличия относительно культивирования *C. albicans* без энтерококков ( $p<0,05$ ).

ли подавлять рост энтерококков, что вело к снижению концентрации продуктов метаболизма бактерий в среде. В связи с вышеуказанными возможными недостатками метода одновременного совместного культивирования микроорганизмов, в дальнейшем использована другая схема исследования антагонистических взаимоотношений между энтерококками и кандидами – отсроченное культивирование. Метод отсроченного совместного культивирования позволил обнаружить не только фунгистатический, но и фунгицидный эффект энтерококков. Не все штаммы *Enterococcus spp.* обладали выраженной фунгицидной активностью, из чего следует, что выраженность антифунгального действия зависит не только от концентрации продуктов метаболизма бактерий в среде, но и от биологических свойств самого штамма энтерококка.

Установлено, что *Enterococcus spp.* обладают выраженной антагонистической активностью в отношении кандид. Для оценки фунгицидного действия продуктов метаболизма энтерококков, секретируемых во внешнюю среду, лучше использовать метод отсроченного совместного культивирования. Данный способ даёт возможность накопления в среде большого количества продуктов метаболизма бактерий и минимизирует действие микромицетов на клетки бактерий. Метод отсроченного совместного культивирования позволяет с большей вероятностью установить и отобрать штаммы бактерий – продуцентов метаболитов с максимальной антикандидозной активностью, что важно при получении метабиотиков.

#### **Выводы:**

Энтерококки обладают выраженной антагонистической активностью в отношении *C. albicans*. При этом, все выделенные клинические изоляты энтерококков проявляют фунгистатический эффект в отношении кандид.

Фунгицидный эффект метаболитов энтерококков в отношении кандид носит штамм-специфичный характер.

Для оценки антифунгального действия экзогенных метаболитов бактерий предпочтительнее использовать метод отсроченного совместного культивирования.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Донгак Д.А., Карноухова О.Г., Коган Г.Ю., Распопина Л.А., Ботвинкин А.Д. Частота выделения и лекарственная резистентность грибов рода *Candida* от больных ВИЧ-инфекцией в Иркутске. *Сибирский медицинский журнал*. 2013; 5: 57-9.
2. Иванова Л. В., Баранцевич Е.П., Шляхто Е.В. Резистентность грибов-патогенов к антимикотикам (обзор). *Проблемы медицинской микологии*. 2011;13(1):14-7.
3. Arendrup M. C. Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida*. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014; 6: 42-8.

4. Kok E. T., Jong M. C., Gravendeel B., Van Leeuwen W. B., Baars E. W. Resistance to Antibiotics and Antifungal Medicinal Products: Can Complementary and Alternative Medicine Help Solve the Problem in Common Infection Diseases? The Introduction of a Dutch Research Consortium. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015; 2015:521584.
5. Ng S. M., Yap Y. Y., Cheong J. W., Ng F. M., Lau Q. Y., Barkham T., Teo J. W., Hill J., Chia C. S. Antifungal peptides: a potential new class of antifungals for treating vulvovaginal candidiasis caused by fluconazole-resistant *Candida albicans*. *J. Pept. Sci.* 2017; 23(3): 215-21.
6. Hanson L., Vusse L.V., Jerme M., Abad C.L., Safdar N. Probiotics for Treatment and
7. Prevention of Urogenital Infections in Women: A Systematic Review. *J. Midwifery. Womens. Health.* 2016; 61(3): 339-55.
8. Шендеров Б.А., Синица А.В., Захарченко М.М. Метабиотики: вчера, сегодня, завтра: СПб.: ИнформМед; 2017.
9. Ардатская М. Д., Столярова Л.Г., Архипова Е.В., Филимонова О.Ю. Метабиотики как естественное развитие пробиотической концепции. *Трудный пациент*. 2017; 15(6-7): 35-9.
10. Александрова Н.А., Заславская М.И. Взаимоотношения *Candida* с энтерококками на уровне вагинального биотопа. *Проблемы медицинской микологии*. 2016; 18(4):53-5.

#### REFERENCES

1. Dongak D.A., Karnouhova O.G., Kogan G.Ju., Raspopina L.A., Botvinkin A.D. Chastota vydeleniya i lekarstvennaya rezistentnost' gribov roda *Candida* ot bol'nyh VICH-inficiej v Irkutске. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*. 2013; 5: 57-9. (in Russian)
2. Ivanova L. V., Barancevich E.P., Shljahto E.V. Rezistentnost' gribov-patogenov k antimikotikam (obzor). *Problemy meditsinskoj mikologii*. 2011; 13(1):14-7. (in Russian)
3. Arendrup M. C. Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida*. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014; 6: 42-8.
4. Kok E. T., Jong M. C., Gravendeel B., Van Leeuwen W. B., Baars E. W. Resistance to Antibiotics and Antifungal Medicinal Products: Can Complementary and Alternative Medicine Help Solve the Problem in Common Infection Diseases? The Introduction of a Dutch Research Consortium. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015; 2015:521584. d
5. Ng S. M., Yap Y. Y., Cheong J. W., Ng F. M., Lau Q. Y., Barkham T., Teo J. W., Hill J., Chia C. S. Antifungal peptides: a potential new class of antifungals for treating vulvovaginal candidiasis caused by fluconazole-resistant *Candida albicans*. *J. Pept. Sci.* 2017; 23(3): 215-21.
6. Hanson L., Vusse L. V., Jerme M., C. L. Abad, Safdar N. Probiotics for Treatment and Prevention of Urogenital Infections in Women: A Systematic Review. *J. Midwifery. Womens. Health.* 2016; 61(3): 339-55.
7. Shenderov B.A., Sinitsa A. V., Zakharchenko M. M.[Metabiotiki: vchera, segodnya, zavtra]. St. Petersburg: InformMed; 2017. (in Russian)
8. Ardatskaya M. D., Stolyarova L.G., Arkhipova E.V., Filimonova O.Yu. Metabiotiki kak estestvennoe razvitie probioticheskoj koncepcii. *Trudnyi patsient*. 2017; 15(6-7): 35-9. (in Russian)
9. Alexandrova N.A., Zaslavskaya M.I. Vzaimootnosheniya *Candida* s enterokokkami na urovne vaginal'nogo biotopa. *Problemy meditsinskoj mikologii*. 2016; 18(4): 53-5. (in Russian)

Поступила 11.10.19

Принята к печати 21.10.19