

Содержание

Болезни и возбудители

- Бочарова Ю.А., Савинова Т.А., Чаплин А.В., Лямин А.В., Кондратенко О.В., Поликарпова С.В., Жилина С.В., Федорова Н.И., Коржанова М., Маянский Н.А., Чеботарь И.В.
- 220** Геномные характеристики штаммов *Achromobacter* spp., выделенных от пациентов с муковисцидозом в России
- Попова М.О., Рогачева Ю.А.
- 226** Мукормикоз: современные возможности диагностики и лечения, существующие проблемы и новые тенденции в терапии
- Овсянников Н.В., Билевич О.А.
- 239** COVID-19-ассоциированный легочный аспергиллез
- Ортенберг Э.А.
- 248** Почти два года с COVID-19: некоторые аспекты использования антибиотиков
- Хостелиди С.Н., Зайцев В.А., Пелих Е.В., Яшина Е.Ю., Родионова О.Н., Богомолова Т.С., Авдеенко Ю.Л., Клишко Н.Н.
- 255** Мукормикоз на фоне COVID-19: описание клинического случая и обзор литературы

Антимикробные препараты

- Эйдельштейн М.В., Склеенова Е.Ю., Трушин И.В., Кузьменков А.Ю., Мартинович А.А., Шек Е.А., Шайдуллина Э.Р., Авраменко А.А., Виноградова А.Г., Иванчик Н.В., Сухорукова М.В., Романов А.В., Микотина А.В., Азизов И.С., Дехнич А.В., Козлов Р.С. от имени участников многоцентрового исследования «Оценка чувствительности клинических изолятов Enterobacterales и *P. aeruginosa* к цефтазидиму-авибактаму в России с помощью диско-диффузионного метода»
- 264** Оценка чувствительности клинических изолятов Enterobacterales и *Pseudomonas aeruginosa* к цефтазидиму-авибактаму в России (по данным локальных микробиологических лабораторий)
- Козлов Р.С., Азизов И.С., Дехнич А.В., Иванчик Н.В., Кузьменков А.Ю., Мартинович А.А., Микотина А.В., Сухорукова М.В., Трушин И.В., Эйдельштейн М.В.
- 280** *In vitro* чувствительность к биопенему и другим карбапенемам клинических изолятов *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. и представителей порядка Enterobacterales, выделенных у госпитализированных пациентов в различных регионах России

Антибиотикорезистентность

- Ромашов О.М., Ни О.Г., Быков А.О., Круглов А.Н., Проценко Д.Н., Тюрин И.Н.
- 293** Оценка резистентности микроорганизмов многопрофильного стационара и модернизация схем антимикробной терапии в условиях пандемии COVID-19-инфекции
- Хрульнова С.А., Клясова Г.А., Фёдорова А.В., Фролова И.Н., Бидерман Б.В.
- 305** Генетическое разнообразие ванкомицинорезистентных *Enterococcus faecium*, выделенных из гемокультур больных опухолями системы крови

Опыт работы

- Сыраева Г.И., Мишинова С.А., Колбин А.С., Еременко Е.О.
- 314** Оценка профиля безопасности лекарственных средств, применяемых для патогенетической терапии новой коронавирусной инфекции (COVID-19): обзор литературы
- Валиева Р.И., Лисовская С.А., Исаева Г.Ш.
- 330** Оценка биопленкообразующей активности грибов *Fusarium solani*, выделенных с кожных покровов пациентов

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России

Учредитель

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

Издатель

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии
www.iacmac.ru

Журнал зарегистрирован Комитетом РФ по печати 30.09.1999 г. (№019273) Тираж 3000 экз.

Подписка на сайте издателя
<https://service.iacmac.ru>

Адрес для корреспонденции
214019, г. Смоленск, а/я 5.
Тел./факс: [4812]45 06 02

Электронная почта:
cmac@antibiotic.ru

Электронная версия журнала:
<https://cmac-journal.ru>

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук

Присланные в редакцию статьи проходят рецензирование

Мнение редакции может не совпадать с точкой зрения авторов публикуемых материалов

Ответственность за достоверность рекламных публикаций несут рекламодатели

При перепечатке ссылка на журнал обязательна

© Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2021.

Оценка биопленкообразующей активности грибов *Fusarium solani*, выделенных с кожных покровов пациентов

Валиева Р.И.^{1,2}, Лисовская С.А.^{1,2}, Исаева Г.Ш.^{1,2}

¹ ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора, Казань, Россия

² ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Казань, Россия

Контактный адрес:
Рита Илнуровна Валиева
Эл. почта: valievarita@yandex.ru

Ключевые слова: биопленка, мицелиальные грибы, *Fusarium*, экзополисахаридный матрикс, адгезия.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Внешнее финансирование: исследование проведено без внешнего финансирования.

Цель. Изучить *in vitro* факторы патогенности (адгезивная активность и биопленкообразование) штаммов *F. solani*, выделенных с кожных покровов пациентов.

Материалы и методы. Отобраны грибы *F. solani* (n = 86), выделенные с кожных покровов пациентов с диагнозом L30.3 «Инфекционный дерматит», находившихся на амбулаторном лечении. Для контроля качества исследования использовали референс-штамм *F. solani* F-819. Взятие материала проводили с помощью стерильного ватного тампона с очагов поражения размером 5 × 5 см. Первичный посев проводили на среду Сабуро (HiMedia, Индия). Определение адгезивных свойств выделенных штаммов проводили на ранее разработанной модели из нитроцеллюлозной пленки. Формирование биопленок грибов проводили по методу Pierce C. и соавт. в 96-луночных плоскодонных полистироловых планшетах. Эффективность биопленкообразования штаммов *F. solani* оценивали по оптической плотности общей биомассы (окрашивание экстрактом кристаллического фиолетового) и экзополисахаридного матрикса (окрашивание экстрактом конго красного).

Результаты. Все изучаемые штаммы *F. solani* были распределены на две группы: штаммы, выделенные от пациентов с острым течением заболевания (I группа, n = 54), и штаммы, выделенные от пациентов с хроническим рецидивирующим течением в стадии ремиссии (II группа, n = 32). Уровень адгезии микроконидий штаммов, выделенных от пациентов с хроническим рецидивирующим течением, оказался значимо выше по сравнению со штаммами, выделенными от пациентов с острым течением заболевания (p = 0,013), и референс-штаммом (p = 0,007). Выраженной способностью к формированию биопленок (OD₆₂₀ > 0,6) обладали 26 (81,2%) штаммов, выделенных от пациентов с хроническим рецидивирующим течением заболевания, и 19 (35,2%) штаммов, выделенных от пациентов с острым течением. У *F. solani*, выделенных от пациентов с хроническим рецидивирующим течением заболевания, общая биомасса биопленки оказалась существенно выше, чем у штаммов, выделенных от пациентов с острым течением, и достигала зрелости уже на 4-й день инкубации. Наблюдался рост количества экзополисахаридного матрикса у *F. solani*, выделенных от пациентов с хроническим рецидивирующим течением заболевания, на 5-й день инкубации, что приводило к увеличению общей биомассы биопленок.

Выводы. Проведенное исследование показало, что штаммы *F. solani* обладают способностью к формированию биопленок. Выявлены статистически значимые различия адгезивных свойств и биопленкообразования клинических штаммов *F. solani*, выделенных от пациентов с различной длительностью заболевания.

Original Article

Assessment of biofilm-forming activity of *Fusarium solani* isolated from patients' skin

Valieva R.I.^{1,2}, Lisovskaya S.A.^{1,2}, Isaeva G.Sh.^{1,2}

¹ Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russia

² Kazan State Medical University, Kazan, Russia

Contacts:
Rita Ilnurovna Valieva
E-mail: valievarita@yandex.ru

Key words: biofilm, fungi, *Fusarium*, exopolysaccharide matrix, adhesion.

Conflicts of interest: all authors report no conflicts of interest relevant to this article.

External funding source: no external funding received.

Objective. To study pathogenic factors (adhesion and biofilm formation) in *F. solani* isolated from skin of patients

Materials and methods. A total of 86 strains of *F. solani* isolated from the skin of patients with a diagnosis of L30.3 "Infectious dermatitis" were selected. The reference strain *F. solani* F-819 was used for quality control. Samples were collected using a sterile cotton swab from an area of 5 × 5 cm. The primary incubation was at Saburo media (HiMedia, India). Determination of the adhesion of the strains was carried out in the previously developed model from a nitrocellulose plate. Biofilms were formed using the method by Pierce C. et al. in 96-well flat bottom polystyrene plates. The efficiency of *F. solani* biofilms was assessed by the optical density of the total biomass (staining with Cristal Violet extract) and exopolysaccharide matrix (staining with Congo Red extract).

Валиева Р.И. и соавт.

Results. The studied *F. solani* strains were divided into two groups: isolates from patients with acute course of the disease (group I, n = 54), and isolates from patients with chronic relapsing disease (group II, n = 32). The adhesion of microconidia of isolates from patients with a chronic form is higher compared to isolates from patients with an acute form ($p = 0.013$) and the reference strain ($p = 0.007$). 26 (81.2%) isolates from patients with chronic form of the disease and 19 (35.2%) isolates from patients with acute form had an increased ability to form biofilms. The total biofilm mass was higher in *F. solani* isolates from the patients with chronic disease than that in isolates from the patients with acute course of the disease, and already matured on the 4th day of incubation. An increase in number of exopolysaccharide matrix was observed in *F. solani* isolated from patients with chronic disease on the 5th day of incubation, which led to increase in total biofilm mass.

Conclusions. This study showed that *F. solani* can form biofilms. Significant differences in adhesion and biofilm formation between clinical strains of *F. solani* isolated from patients with various forms of the disease were found.

Введение

Одним из основных механизмов жизненного цикла многих известных условно-патогенных микроорганизмов, формы их существования в окружающей среде и резистентности к ее агрессивным условиям является способность к образованию биопленок [1–3]. Биопленкообразование считается важным фактором вирулентности, позволяющим микромицетам длительное время выживать на поверхностях тканей макроорганизма [4, 5]. Как известно, образование биопленок представляет собой сложный процесс, первым этапом которого является адгезия. Адгезивность является одним из основных факторов, определяющих поведение микроорганизмов в биоценозах [5]. Когда микроорганизмы переходят от планктонной формы к формированию биопленки, процессы их биосинтеза меняются. Клетки начинают синтезировать полимеры, защищающие их и связывающие между собой и с подлежащей поверхностью [6]. Такая форма существования предоставляет микромицетам большое преимущество при контакте с макроорганизмом. В большинстве исследований изучение биопленкообразования у грибов проводилось на дрожжевых грибах [7, 8], в то время как активность и структура образования биопленки мицелиальных грибов, в том числе *Fusarium* spp., до сих пор остается мало изученной [9].

Большинство представителей мицелиальных грибов рода *Fusarium* известны своими фитопатогенными свойствами [10, 11]. До недавнего времени все штаммы *Fusarium* spp., выделенные в микробиологических посевах от пациентов, расценивались как транзитные контаминанты и не относились к потенциальным возбудителям инфекций. Однако во всем мире наблюдается тенденция к увеличению случаев обнаружения данных микромицетов у пациентов с различной нозологией и появление регистрируемых клинических случаев поверхностных и системных инфекций, вызванных данными грибами, что требует пересмотра отношения к ним [12–15]. Потенциальная патогенность грибов связана с наличием и проявлением факторов патогенности, основанных на физиологических особенностях клетки и характере ее взаимодействия с макроорганизмом, которые

способствуют закреплению гриба в организме и развитию заболевания [5, 16]. Наиболее распространенными представителями рода *Fusarium*, которые встречаются у человека, являются видовые комплексы (SC): *F. solani* (FSSC), *F. oxysporum* (FOOSC), *F. verticillioides* (FVSC) [17, 18]. В единичных опытах на лабораторных животных выявлено, что *F. solani* обладает большей вирулентной активностью и плохо поддается терапии, в отличие от распространенных видов *F. oxysporum* и *F. verticillioides* [19]. К тому же, по данным зарубежных ученых, из 259 опубликованных случаев фузариоза различной локализации 181 случай (70%) приходился на кожу и ее придатки [18].

Цель исследования – изучить *in vitro* факторы патогенности (адгезивная активность и биопленкообразование) штаммов *F. solani*, выделенных с кожных покровов пациентов.

Материалы и методы

Для исследования были отобраны штаммы *F. solani* (n = 86), выделенные с кожных покровов пациентов с диагнозом I30.3 «Инфекционный дерматит», находившихся на амбулаторном лечении и обратившихся в лабораторию микологии ФБУН «Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора в период с 2016 по 2020 г. Для контроля качества исследования использовали референс-штамм *F. solani* F-819, полученный из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ).

Выделение и идентификация культуры грибов

Взятие материала проводили с помощью стерильного ватного тампона с очагов поражения размером 5 × 5 см. Первичный посев проводили на среду Сабуро (HiMedia, Индия) в две чашки Петри, с добавлением в одну из чашек 50 ЕД/мл ципрофлоксацина для подавления сопутствующей бактериальной микрофлоры. Выделенные штаммы идентифицировали по основным микроскопическим и биохимическим критериям, учитывая морфологические особенности видов, а также выявление таксономической принадлежности с помощью молеку-

лярно-генетической идентификации с использованием рибосомальных генов (18S рРНК) с применением праймеров 5,8SR (5'-TCGATGAAGAACGCAGCG-3') и ITS4R (5'- CCTCCGCTTATGATATGC-3') [20]. Для контроля качества исследования использовали референс-штамм *F. solani* F-819, полученный из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ).

Определение адгезивной активности

Для приготовления инокулюма из микроконидий использовали чистые 5-суточные культуры мицелиальных грибов, выросших на плотной питательной среде Сабуро при 30°C. Готовую конидиальную суспензию собирали в стерильную пробирку с изотоническим раствором. Плотность инокулюма доводили по стандарту мутности до 0,5 по МакФарланду (измерение денситометром согласно данным изготовителя стандартов мутности bioMerieux). Инокулюм использовали в течение 15 мин. после приготовления. Чистота грибковых штаммов контролировалась перед каждым экспериментом. Определение адгезивных свойств выделенных штаммов проводили на ранее разработанной модели из нитроцеллюлозной пленки [21]. Пленку площадью 7 см² инкубировали при температуре 30°C с 3 мл суспензии спор гриба в 0,1М фосфатном буфере в течение 1 суток. Определение уровня адгезии проводили по разнице начальной и конечной оптической плотности суспензии клеток при длине волны 540 нм, а также прямым подсчетом клеток в суспензии с помощью микроскопа Микмед-6.

Формирование биопленок

Формирование биопленок грибов проводили по методу Ригсе С. и соавт. [22] в 96-луночных плоскодонных полистироловых планшетах (SPL Life Sciences, Корея). Готовую конидиальную суспензию собирали в стерильные пробирки с 5-дневных культур на агаровых чашках со средой Сабуро путем заливки поверхности чашек 5 мл фосфатного буфера с добавлением 0,025% Твин-20 и последующим мягким покачиванием. Затем культуры ресуспендировали в RPMI с конечной плотностью $1,0 \times 10^6$ клеток/мл, что соответствует 0,5 по МакФарланду. Затем в каждую лунку микропланшета добавляли по 150 мкл суспензии и инкубировали при 30°C.

Определение оптической плотности биопленок

Эффективность биопленкообразования штаммов *F. solani* оценивали по оптической плотности общей биомассы, окрашенной экстрактом кристаллического фиолетового (CV). Культуры грибов инкубировали 20 мин. с добавлением 125 мкл 1% экстракта CV. Оптическую плотность элюатов CV/этанол определяли при длине волны 540 нм.

Для количественной оценки экзополисахаридного матрикса оценивали динамику изменения количества свободного красителя в лунках микропланшета при связывании матрикса с экстрактом конго красного (CR). Для этого смешивали 1000 мкл LB и 50 мкл экстракта CR до конечной концентрации 40 мкг/мл. Далее инку-

бировали 90 мин. при 37°C, после чего центрифугировали 20 мин. при 13000 об/мин. Надосадочную жидкость вносили в лунки планшета с культурами грибов.

Фотометрическое определение оптической плотности в динамике проводили на микропланшетном ридере Tecaninfinite 200 Pro (Швейцария) при длине волны 620 нм для экстракта CV и 490 нм для экстракта CR. Средние значения по результатам четырехкратных измерений вносили в базу данных эксперимента.

Статистическая обработка данных

Материалы исследования были подвергнуты статистической обработке с использованием методов параметрического и непараметрического анализа. Накопление и корректировку полученных результатов осуществляли в электронных таблицах Microsoft Office Excel 2016. Статистический анализ проводили с использованием программы STATISTICA 13.3 (StatSoft Inc., США). Количественные данные, имеющие показатели, близкие к нормальному распределению, представлены в виде среднего арифметического (M) и стандартного отклонения (SD), для оценки статистической значимости использовался t-критерий Стьюдента; при распределении, отличном от нормального, применялись непараметрические методы – критерий Манна – Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Характеристика изученных штаммов

В зависимости от длительности течения заболевания все штаммы *F. solani* были распределены на 2 группы:

- I группа – штаммы, выделенные от пациентов с острым течением заболевания (< 1 года) (n = 54)
- II группа – штаммы, выделенные от пациентов с хроническим рецидивирующим течением (> 1 года) в стадии ремиссии (n = 32)

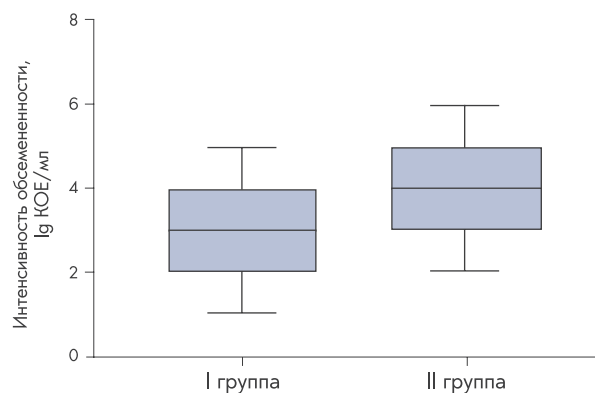


Рисунок 1. Сравнительная характеристика длительности заболевания и интенсивности обсемененности *F. solani*

- I группа – штаммы, выделенные от пациентов с острым течением заболевания (< 1 года);
- II группа – штаммы, выделенные от пациентов с хроническим рецидивирующим течением (> 1 года) в стадии ремиссии.

При сравнении длительности течения заболевания от интенсивности обсемененности *F. solani* кожных покровов пациентов были установлены статистически значимые различия ($p = 0,004$). Интенсивность обсемененности *F. solani* у пациентов с хроническим течением заболевания была существенно выше, чем у пациентов с острым течением ($M = 4,4$ и $2,8$ lg КОЕ/мл соответственно) (Рисунок 1).

Оценка адгезивной активности

Наибольший уровень адгезии за 6 ч. инкубации отмечался у штамма, выделенного с кожного покрова пациента с хроническим рецидивирующим течением заболевания, и составил $155,1 \pm 5,96$. При попарном сравнении групп было установлено, что уровень адгезии микроконидий штаммов, выделенных от пациентов с хроническим рецидивирующим течением, значимо выше по сравнению со штаммами, выделенными от пациентов с острым течением заболевания ($p = 0,013$), и референс-штаммом ($p = 0,007$). Между микромицетами, выделенными от пациентов с острым течением заболевания, и референс-штаммом статистически значимые различия не выявлены ($p = 0,153$) (Таблица 1).

На основании анализа полученных данных выявлено, что микроконидии штаммов, выделенных у пациентов с хроническим рецидивирующим течением, отличались длиной главной гифы и скоростью образования перегородок. Клетки микроконидий штаммов, выделенных от пациентов с острым течением, выглядели малоактивными. Первое появление ростовых трубок у штаммов, выделенных от пациентов с хроническим рецидивирующим течением, отмечено в первые 12 ч., а полное прорастание спор завершилось на вторые сутки опыта (Рисунок 2А), тогда как у штаммов, выделенных от пациентов с острым течением, первые ростковые трубки появились только через 24 ч. (Рисунок 2В).

Оценка биопленкообразующей активности

Диапазон значений оптической плотности биопленок, окрашенных экстрактом CV, у *F. solani* варьировал от 0,272 до 1,280 ед. В ходе исследования отмечено, что выраженной способностью к формированию биопленок ($OD_{620} > 0,6$) обладали 26 (81,2%) штаммов, выделенных от пациентов с хроническим рецидивирующим течением заболевания, и 19 (35,2%) штаммов, выделенных от пациентов с острым течением, среди которых 7 штаммов имели высокий уровень обсеменения (> 4 lg КОЕ/мл). На 5-й день культивирования среднее значение оптической плотности биопленок штаммов, выделенных от пациентов с хроническим рецидивирующим течением, составило $1,193 \pm 0,098$, что статистически значимо выше, чем у штаммов, выделенных от пациентов с острым течением ($OD_{620} = 0,58 \pm 0,084$) ($p = 0,001$). Референс-штамм *F. solani* F-819 не образовал структурно сформированную биопленку.

Таблица 1. Адгезивная активность грибов *F. solani*, выделенных от пациентов с разным течением заболевания

Группа штаммов	N	Адгезивная активность, M ± SD	p
Выделенные от пациентов с острым течением заболевания (I группа)	54	101,7 ± 4,79	0,002* P ₁₋₂ = 0,013* P ₁₋₃ = 0,153 P ₂₋₃ = 0,007*
Выделенные от пациентов с хроническим рецидивирующим течением заболевания (II группа)	32	145,1 ± 5,96	
Референс-штамм	1	97,1 ± 2,31	

Валиева Р.И. и соавт.

Оценка биопленкообразующей активности *F. solani*

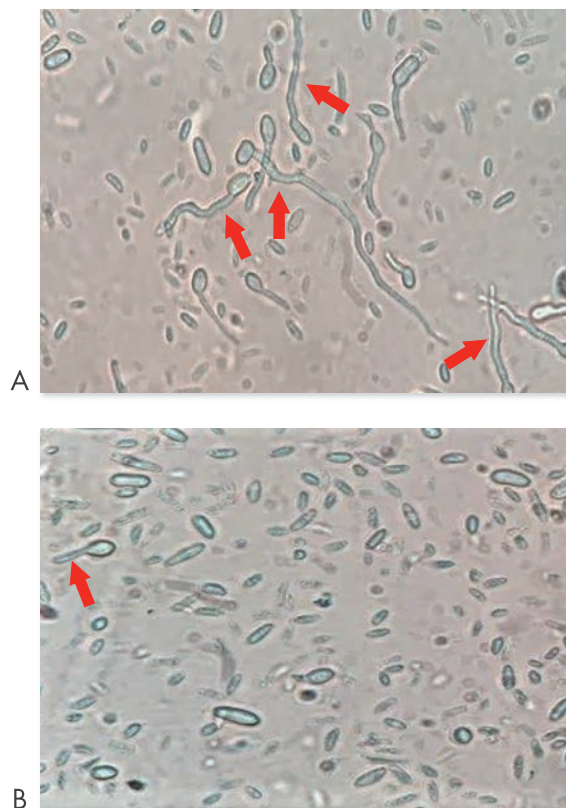


Рисунок 2. Микроконидии штаммов, выделенных от пациентов с хроническим рецидивирующим течением [А], и штаммов, выделенных от пациентов с острым течением [В], через 24 ч. культивирования на 12-луночном полистироловом планшете

Стрелками указаны ростовые трубки. Инвертированный микроскоп. Увеличение ×630.

Рисунок 2. Микроконидии штаммов, выделенных от пациентов с хроническим рецидивирующим течением [А], и штаммов, выделенных от пациентов с острым течением [В], через 24 ч. культивирования на 12-луночном полистироловом планшете

В начальные сроки исследования микромицеты штаммов, выделенных от пациентов с хроническим рецидивирующим течением заболевания, интенсивно образовывали биомассу и достигли зрелости на 4-й день инкубации. Максимальные значения были обнаружены на 5-е сутки культивирования ($OD_{620} = 1,193 \pm 0,098$) (Рисунок 3А), после чего на 7-е сутки значения оптической плотности экстракта CV снизились ($OD_{620} = 1,114 \pm 0,106$) и стабилизировались к 9-м суткам. У штаммов, выделенных от пациентов с острой формой заболевания, процесс образования биомассы биопленки протекал равномерно, максимальные значения оптической плотности

экстракта CV были обнаружены на 7-й день инкубации ($OD_{620} = 0,691 \pm 0,102$), после чего биопленки стабилизировались.

Значения поглощения экстракта CR на 5-й день культивирования у штаммов, выделенных от пациентов с хроническим рецидивирующим течением заболевания, оказались статистически значимо выше, чем у штаммов, выделенных от пациентов с острым течением ($p = 0,002$) (Рисунок 3В). В динамике максимальные значения поглощения (расщепления) красителя по сравнению с контролем были обнаружены у штаммов, выделенных от пациентов с хроническим рецидивирующим течением заболевания, на 5-й день культивирования

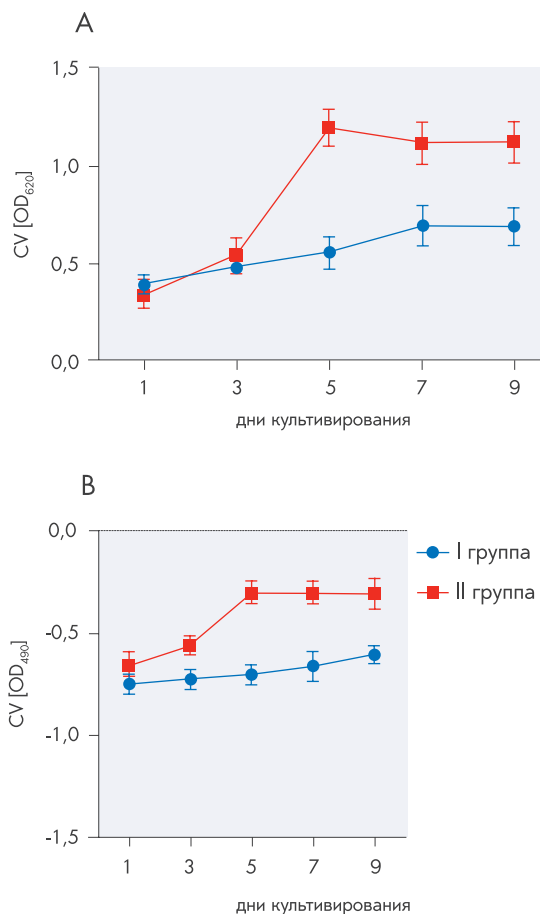


Рисунок 3. Динамика образования биопленок штаммов *F. solani*, выделенных от пациентов с острым (I группа) и хроническим рецидивирующим (II группа) течением заболевания

А – для оценки биомассы биопленок культуры грибов инкубировали с добавлением водного раствора 1% кристаллического фиолетового (CV). Оптическую плотность элюатов CV/этанол определяли при длине волны 540 нм.

В – для оценки количества экзополисахаридного матрикса культуры грибов инкубировали с раствором конго красного (CR). Оптическую плотность определяли при длине волны 490 нм. $OD_{\text{контроль}} = 0,8 \pm 0,032$. Эксперимент проводился в трех повторениях.

($OD_{490} = -0,301 \pm 0,056$), после чего произошла стабилизация биопленки и наблюдались незначительные изменения оптической плотности экстракта. Для штаммов, выделенных от пациентов с острым течением заболевания, было характерно равномерное производство биомассы в течение всего периода исследования (от 1 до 9 дней).

Обсуждение

Важным этапом закрепления микроорганизмов на определенных субстратах и в организме человека является адгезия [23]. Адгезию микроорганизмов можно рассматривать как начальный этап колонизации различных биотопов организма, который предшествует формированию биопленок [23, 24]. Для изучения адгезивной активности штаммов *Fusarium* следует использовать микроконидии, несмотря на то что по морфологии они менее дифференцированы, чем макроконидии, но играют ведущую роль в распространении культуры и заселении субстрата [16]. Выявлено, что у штаммов, выделенных от пациентов с хроническим рецидивирующим течением заболевания, адгезивная активность была существенно выше, микроконидии отличались размерами и скоростью образования ростовых трубок. Высокая адгезивная активность штаммов, выделенных от пациентов с хроническим рецидивирующим течением заболевания, свидетельствует о способности данных грибов к быстрой колонизации ткани макроорганизма, что может быть одной из причин высокой степени обсемененности у пациентов данной группы.

Известно, что рост отдельных планктонных клеток микромицет *in vitro* на богатой питательными веществами среде существенно отличается от способа существования в организме человека [2]. Планктонные формы микроорганизмов встречаются, как правило, транзиторно и в небольшом количестве, тогда как в совокупности микробы способны преимущественно образовывать биопленки [3, 5]. В проведенном нами исследовании в качестве суммарного показателя объема биопленки оценивали биомассу биопленки, определенную колориметрическим способом. Так, у *F. solani*, выделенных от пациентов с хроническим рецидивирующим течением заболевания, общая биомасса биопленки оказалась существенно выше, чем у штаммов, выделенных от пациентов с острым течением, и достигала зрелости уже на 4-й день инкубации. В ходе длительной инкубации формирование биопленки сопровождалось образованием экзополисахаридного матрикса. Считается, что экзополисахариды составляют значительную часть матрикса, способную увеличивать слои биопленки за счет прикрепления к себе клеток, ранее находившихся в планктонном состоянии [6, 8]. Так, в ходе исследования наблюдался рост количества экзополисахаридного матрикса у штаммов *F. solani*, выделенных от пациентов с хроническим рецидивирующим течением заболевания, на 5-й день инкубации, что приводило к увеличению общей биомассы биопленок. Значительное увеличение биомассы, плотности и скорости формирования биопле-

нок имеет большое значение, поскольку быстрое созревание биопленок в сочетании с высокой плотностью клеток, погруженных в матрицу, может способствовать выживанию микромицет и длительному сохранению инфекции [7, 24]. Стоит отметить, что 81,2% штаммов, демонстрирующих активную способность к формированию биопленок, были выделены от пациентов с длительным течением инфекции. Таким образом, можно предположить, что биопленки являются одним из патогенетических факторов формирования хронических инфекционных процессов.

Заключение

Проведенное исследование показало, что штаммы *F. solani* обладают способностью к формированию биопленок. Выявлены статистически значимые различия адгезивных свойств и биопленкообразования клинических штаммов *F. solani*, выделенных от пациентов с различной длительностью заболевания. Полученные данные подтверждают, что вирулентная активность штаммов грибов может отягощать течение инфекционного процесса за счет их способности к колонизации макроорганизма.

Внешнее финансирование: исследование поддержано Российским научным фондом (грант № 20-64-47014).

Литература

- Rakhmatullina M.R., Nechayeva I.A. Biofilms of microorganisms and their role for the formation of resistance to anti-bacterial drugs. Vestnik dermatologii i venerologii. 2015;2:58-62. DOI: 10.25208/0042-4609-2015-91-2-58-62 Russian. (Рахматулина М.Р., Нечаева И.А. Биопленки микроорганизмов и их роль в формировании резистентности к антибактериальным препаратам. Вестник дерматологии и венерологии. 2015;(2):58-62.)
- Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev. 2002;15(2):167-193. DOI: 10.1128/cmr.15.2.167-193.2002
- Pace J.L., Rupp M.E., Finch R.G. Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy. CRC Press. 2005. DOI: 10.1201/9781420028232
- Carolis De E., Posteraro B., Lass-Flörl C., Tortorano A.M., Sanguinetti G., Fadda M. Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Microbiol Infect. 2012;18(5):475-484. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03599.x
- Valieva R.I., Lisovskaya S.A., Isaeva G.Sh., Daudova A.D. Peculiarities of *Fusarium* virulent activity. Astrakhan medical journal. 2020;15(2):24-29. Russian. (Валиева Р.И., Лисовская С.А., Исаева Г.Ш., Даутова А.Д. Особенности вирулентной активности грибов рода *Fusarium*. Астраханский медицинский журнал. 2020;15(2):24-29.) DOI: 10.17021/2020.15.2.24.29
- Voznesenskij N.A. Biofilms are a therapeutic target for chronic infections. Prakticheskaja pul'monologija. 2008;3:43-44. Russian. (Вознесенский Н.А. Биопленки терапевтическая мишень при хронических инфекциях. Практическая пульмонология. 2008;3:43-44.)
- Douglas L.J. *Candida* biofilms and their role in infection. Trends in Microbiology. 2013;11(1):30-36. DOI: 10.1016/S0966-842X(02)00002-1
- Finkel J., Mitchell A. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. Nat Rev Microbiol. 2011;9:109-118. DOI: 10.1038/nrmicro2475
- Homa M., Galgóczy L., Manikandan P., Narendran V., Sinka R., Cserecics A., Vágvölgy C., et al. South Indian isolates of the *Fusarium solani* species complex from clinical and environmental samples: identification, antifungal susceptibilities, and virulence. Front Microbiol. 2018;9:1052. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01052
- Perincherry L., Lalak-Kańczugowska J., Stępień Ł. *Fusarium*-produced mycotoxins in plant-pathogen interactions. Toxins. 2019;11(11):664. DOI: 10.3390/toxins11110664
- Chilaka C.A., De Boevre M., Atanda O.O., De Saeger S. The status of *Fusarium* mycotoxins in Sub-Saharan Africa: a review of emerging trends and post-harvest mitigation strategies towards food control. Toxins. 2017;9(1):19. DOI: 10.3390/toxins9010019
- Ansari Z., Miller D., Galor A. Current thoughts in fungal keratitis: diagnosis and treatment. Curr Fungal Infect Rep. 2013;7(3):209-218. DOI: 10.1007/s12281-013-0150
- Dignani M.C., Anaissie E. Human Fusariosis. Clin Microbiol Infect. 2004;10(1):67-75. DOI: 10.1111/j.1470-9465.2004.00845.x
- Dóczy I., Gyetvai T., Kredics L., Nagy E. Involvement of *Fusarium* spp. in fungal keratitis. Clin Microbiol Infect. 2004;10(9):773-776. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2004.00909.x
- Walther G., Stasch S., Kaerger K., Hamprecht A., Roth M., Oliver A., et al. *Fusarium* keratitis in Germany. J Clin Microbiol. 2017;55(10):2983-2995. DOI: 10.1128/JCM.00649-17
- Lisovskaya S.A., Khaldeeva E.V. Micromycetes of *Fusarium* species as potentially pathogenic microorganisms. Prakticheskaja medicina. 2016;3(95):64-67. Russian. (Лисовская С.А. Халдеева Е.В. Грибы рода *Fusarium*

- как потенциально патогенные виды микроорганизмов. Практическая медицина. 2016;3(95):64-67.)
17. Dallé da Rosa P, Nunes A., Borges R., Batista B., Meneghello Fuentefria A., Goldani L.Z. *In vitro* susceptibility and multilocus sequence typing of *Fusarium* isolates causing keratitis. J Mycol Med. 2018;28(3):482-485. DOI: 10.1016/j.mycmed.2018.05.001
 18. Nucci M., Anaissie E. Cutaneous infection by *Fusarium* species in healthy and immunocompromised hosts: implications for diagnosis and management. Clin Infect Dis. 2002;35(8):909-920. DOI: 10.1086/342328
 19. Ortoneda M., Capilla J., Pastor F.J., Pujol I., Guarro J. Efficacy of liposomal amphotericin B in treatment of systemic murine fusariosis. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46(7):2273-2275. DOI: 10.1128/aac.46.7.2273-2275.2002
 20. Herkert P.F., Al-Hatmi A., de Oliveira S., Muro M.D., Pinheiro R.L., Nucci M., et al. Molecular characterization and antifungal susceptibility of clinical *Fusarium* species From Brazil. Front Microbiol. 2019;10(10):737. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00737
 21. Lisovskaya, S.A., Glushko, N.I., Khaldeeva, E.V. Laboratory model for determining the adhesive properties of yeast-like fungi. Problemy medicinskoj mikologii. 2006;8(3):36-39. Russian. (Лисовская С.А., Глушко Н.И., Халдеева Е.В. Лабораторная модель для определения адгезивных свойств дрожжеподобных грибов. Проблемы медицинской микологии. 2006;8(3):36-39.)
 22. Pierce C.G., Uppuluri P., Tristan A.R., Wormley F.L. Jr, Mowat E., Ramage G., et al. A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. Nat Protoc. 2008;3(9):1494-1500. DOI: 10.1038/nprot.2008.141
 23. Sidorenko S. V. Infectious process as a "dialogue" between the host and the parasite. Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija. 2001;3(4):301-315. Russian. (Сидоренко С.В. Инфекционный процесс как «диалог» между хозяином и паразитом. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2001; 3(4):301-315.)
 24. Ivanova E.I., Popkova S.M., Shabanova N.M., Petrova I.V., Gorbunova E.L., Savel'kaeva M.V., et al. Adhesive properties of microorganisms colonizing various biotopes of the human body. Irkutsk State University Bulletin. 2011;4(4):25-29. Russian. (Иванова Е.И., Попкова С.М., Шабанова Н.М., Петрова И.В., Горбунова Е.Л., Савелькаева М.В. и соавт. Адгезивные свойства микроорганизмов, колонизирующих различные биотопы организма человека. Известия Иркутского государственного университета. 2011;4(4):25-29.)