ПРОДУКЦИЯ БИОПЛЕНОК СРЕДИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНВАЗИВНОГО КАНДИДОЗА У БОЛЬНЫХ ОПУХОЛЕВЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ СИСТЕМЫ КРОВИ И У БОЛЬНЫХ БЕЗ ОПУХОЛЕВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ СИСТЕМЫ КРОВИ

Мальчикова А. О., Клясова Г. А.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 125167, Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. Негативное влияние на результаты лечения инвазивного кандидоза может оказывать способность *Candida* spp. формировать биопленки на инвазивных медицинских устройствах у разных категорий больных.

Цель: оценить способность образовывать биопленки разных видов *Candida*, выделенных из клинически значимых образцов от больных опухолями системы крови и больных без опухолей системы крови.

Материалы и методы. Определение способности *Candida* spp. продуцировать биопленки проводили спектрофотометрическим методом с использованием соли тетразолия (XTT, Sigma-Aldrich, США). Изоляты *Candida* spp., имеющие значение оптической плотности от 0,1 и более, оценивали как образующие биопленки, менее 0,1 — как не способные к формированию биопленок.

Результаты. Было исследовано 428 *Candida* spp. (*C. albicans* $n = 192$, *C. parapsilosis* complex $n = 121$, *C. krusei* $n = 40$, *C. tropicalis* $n = 38$ и *C. glabrata* $n = 37$), из них 172 изолята были выделены от больных опухолями системы крови, 256 — от больных без опухолей системы крови, 361 — из гемокультуры, 67 — из других стерильных образцов. Способность формировать биопленки была определена у 41,8% ($n = 179$) *Candida* spp., с одинаковой частотой у больных опухолями системы крови и больных без опухолей системы крови (41,9 и 41,8% соответственно). *Candida non-albicans* чаще продуцировали биопленки в сравнении с *C. albicans* (52,5% против 28,6%, соответственно, $p < 0,001$). Значимо чаще продукция биопленок была у *C. tropicalis* (89, 5%) и у *C. krusei* (75%) в сравнении с *C. parapsilosis* (41,3%), *C. albicans* (28,6%) и *C. glabrata* (27%, $p < 0,05$). Частота образования биопленок была высокой для *C. krusei* и *C. tropicalis* в обеих группах больных, в то время как *C. albicans*, выделенные от больных без опухолей системы крови, достоверно чаще продуцировали биопленки, чем в группе сравнения (34,1% против 18% соответственно, $p = 0,03$). Продукция биопленок была сопоставимой среди *Candida* spp., выделенных из гемокультуры (42,9%) и из других стерильных образцов (35,8%, $p = 0,3$).

Заключение. Способность к формированию биопленок различалась у разных видов *Candida* и преобладала у *C. tropicalis* и *C. krusei*. Продукция биопленок была выявлена с одинаковой частотой у больных опухолями и без опухолей системы крови.

Ключевые слова: кандидемия, *Candida* spp., биопленки, опухоли системы крови, гемобластозы, отделение реанимации и интенсивной терапии

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ АААА-А18-118012490209-7).

Для цитирования: Мальчикова А.О., Клясова Г.А. Продукция биопленок среди возбудителей инвазивного кандидоза у больных опухолевыми заболеваниями системы крови и у больных без опухолевых заболеваний системы крови. Гематология и трансфузиология. 2020; 65 (3): 281–290. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2020-65-3-281-290>

BIOFILM PRODUCTION AMONG *CANDIDA* SPP. CAUSING INVASIVE CANDIDIASIS IN PATIENTS WITH HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES AND WITHOUT HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES

Malchikova A. O.*, Klyasova G. A.

National Research Center for Hematology, 125167, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction. Biofilm-forming ability among *Candida* spp. on indwelling medical devices may have a negative influence on the outcome of invasive candidiasis in various groups of patients.

Aim. The objective of this study was to evaluate the biofilm-forming ability among *Candida* spp. isolated from clinical specimens in patients with hematological malignancies and patients without hematological malignancies.

Materials and methods. Biofilm production among *Candida* spp. was studied using XTT (Sigma-Aldrich, USA) reduction assay. *Candida* spp. were classified as biofilm-forming, having optical density equal to and more than 0.1, and non-biofilm-forming with optical density less than 0.1.

Results. A total of 428 *Candida* spp. (*C. albicans* $n = 192$, *C. parapsilosis* $n = 121$, *C. krusei* $n = 40$, *C. tropicalis* $n = 38$, *C. glabrata* $n = 37$) were evaluated (172 from hematological patients, 256 from non-hematological patients, 361 from blood culture, 67 from other sterile specimens). Biofilm-forming ability was detected among 179 (41.8%) *Candida* spp. with the same rate in hematological patients and non-hematological patients (41.9 % and 41.8 %, respectively). Biofilm production predominated among non-*C. albicans* (52.5 %) compared to *C. albicans* (28.6 %, $p = 0.001$). Biofilm production prevailed among *C. tropicalis* (89.5 %) and *C. krusei* (75 %) compared to *C. parapsilosis* (41.3 %), *C. albicans* (28.6 %), and *C. glabrata* (27 %, respectively, $p < 0.05$). Biofilm-forming ability among *C. tropicalis* and *C. krusei* dominated in both groups of patients. Biofilm production among *C. albicans* prevailed in non-hematological patients compared to hematological patients (34.1% vs 18.2%, $p = 0.03$). There were no differences in biofilm production among *Candida* spp. isolated from blood culture (42.9%) and other sterile specimens (35.8%, $p = 0.3$).

Conclusion. Biofilm-forming ability varied among the *Candida* spp. and prevailed among *C. tropicalis* and *C. krusei*. Biofilm production among *Candida* spp. was detected with the same rate in hematological and non-hematological patients.

Keywords: candidemia, *Candida* spp., biofilm production, hematological malignancies, intensive care unit

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Financial disclosure: the research was carried out within the state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (No. AAAA-A18-118012490209-7).

For citation: Malchikova A.O., Klyasova G.A. Biofilm production among *Candida* spp. causing invasive candidiasis in patients with hematological malignancies and without hematological malignancies. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya). 2020; 65(3): 281–290 (in Russian). <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2020-65-3-281-290>

Введение

Инвазивный кандидоз у больных опухолями системы крови характеризуется тяжелым течением, длительным пребыванием в стационаре, высокой летальностью, достигающей 40–50 %, и немалыми финансовыми затратами на лечение [1, 2]. В этиологической структуре сепсиса на долю *Candida* spp. приходится 2,8–7,4 % [3–5]. Негативное влияние на процесс лечения инвазивного кандидоза может оказывать способность *Candida* spp. к формированию биопленок на сосудистых катетерах и других инвазивных медицинских устройствах, причем в последние годы частота детекции их в составе биопленок увеличилась. В исследовании М. Tumbarello и соавт. [6], включавшем 294 больных кандидемией в многопрофильном стационаре, было выявлено увеличение доли *Candida* spp. в составе биопленок с 36 до 67 % в период с 2000 по 2004 гг. В последующих работах этой группы исследователей (2005–2007 гг.) было доказано, что летальность при инфекциях, вызванных *Candida* spp. в составе биопленок, была статистически значимо выше в сравнении с возбудителями, не способными формировать биопленку, и составила 51,2 % против 31,7 % ($p = 0,004$) [2]. Не все противогрибковые препараты проявляют активность в отношении биопленок *Candida* spp. В исследовании С. Tascini и соавт. [7] была отмечена крайне высокая частота летальных исходов, которая достигала 77 %, при кандидемии, вызванной продуцентами биопленок, если для лечения были использованы противогрибковые препараты группы азолов.

Количество публикаций, в которых были освещены результаты изучения способности формирования биопленок среди возбудителей инвазивного кандидоза, невелико, и в них, как правило, представлены неоднородные данные по продукции биопленок среди разных видов *Candida*. Эти исследования важны для выбора тактики ведения больных с инвазивным кандидозом. До недавнего времени полагали, что инвазивный кандидоз, а следовательно, и факт продукции биопленок среди *Candida* spp., наблюдается в основном у больных опухолями системы крови.

Целью исследования было оценить способность к образованию биопленок среди разных видов *Candida*, выделенных из клинически значимых образцов от больных опухолями системы крови и без опухолей системы крови с симптомами инвазивного кандидоза.

Материалы и методы

Источники и видовая идентификация изолятов. В проспективное многоцентровое исследование с 2005 по 2017 г. было включено 428 последовательно выделенных неповторяющихся изолятов *Candida* spp. из стерильных в норме образцов от больных опухолями системы крови ($n = 172$) и больных без опухолей системы крови ($n = 256$) с инвазивным кандидозом из 11 ме-

дицинских учреждений 10 городов России. Выделение и первичная идентификация грибов проводились в локальных микробиологических лабораториях учреждений, участвовавших в исследовании. Изоляты *Candida* spp. с заполненными индивидуальными регистрационными картами передавали в транспортных средах в лабораторию клинической бактериологии, микологии и антибиотической терапии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России. Окончательная видовая идентификация всех *Candida* spp. была проведена методом матрично-активированной лазерной десорбционной ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) с использованием системы Microflex LT и программного обеспечения MALDI Biotyper Real Time Classification, версия 3.1 (Bruker Daltonics, Германия). В качестве критерия надежной видовой идентификации микроорганизмов использовали рекомендуемые значения коэффициента соответствия (Score) от 2,0 и выше. До проведения исследования изоляты хранили в холодильнике при температуре -70°C в триптиказо-соевом бульоне с добавлением 20 % глицерина.

Определение способности к формированию биопленок. Определение способности *Candida* spp. продуцировать биопленки проводили спектрофотометрическим методом с использованием соли тетразолия — 2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфобензил)-5-[(фениламино)карбонил]-2 Н-тетразолия (ХТТ, Sigma-Aldrich, США) согласно схеме, предложенной Pierce С. G. и модифицированной Tumbarello М. [2, 8]. Вначале для проведения исследования готовили рабочие растворы. Соль тетразолия в количестве 0,25 г растворяли в 250 мл 0,01-М фосфатного буфера (Sigma-Aldrich, США), пропускали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (Corning, США), разливали в стерильные сухие пробирки по 10 мл. Порошок менадиона (Sigma-Aldrich, США) растворяли в ацетоне (ЭКОС-1, Россия) до концентрации 1 мкМ и распределяли в стерильные сухие пробирки по 50 мкл. Приготовленные растворы в пробирках хранили при -70°C в холодильнике.

При каждой детекции продукции биопленок использовали референтные штаммы *C. parapsilosis* ATCC 22019 в качестве положительного контроля, в качестве отрицательного контроля — штамм *C. albicans* без продукции биопленок, имеющийся в лаборатории клинической бактериологии, микологии и антибиотической терапии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России.

Для исследования культуру *Candida* spp. наносили на твердую питательную среду Yeast Peptone Dextrose Agar (YPD Agar, Sigma-Aldrich, США) и инкубировали в термостате при 37°C в течение 18–24 ч. Параллельно готовили бульон YPD (Sigma-Aldrich, США). Для этого 12,5 г среды YPD растворяли

в 250 мл дистиллированной воды, автоклавируем 15 мин при 121 °С и после охлаждения до комнатной температуры разливаем по 20 мл в колбы Эрленмейера объемом 150 мл (Duran, Германия). Затем суточную культуру *Candida* spp. вносим микробиологической петлей в колбы Эрленмейера, помещаем их в шейкер-инкубатор (BioSan, Латвия) и инкубируем при 30 °С и 160 об./мин в течение 12–16 ч. После инкубации всю взвесь *Candida* spp. (20 мл) переносим в стерильные сухие пробирки, центрифугируем при 3000 g в течение 5 мин, трижды отмываем холодным стерильным 0,1-М фосфатным буфером, удаляем надосадочную жидкость, добавляем к осадку дрожжевых грибов бульон Сабуро (Oxoid, Англия), содержащий 8% глюкозы (Merck, Германия), и доводим дрожжевые клетки до количества 3×10^7 КОЕ/мл, постоянно осуществляя подсчет в камере Горяева. Далее по 100 мкл взвеси дрожжевых клеток последовательно переносим в ячейки от 1-го до 9-го рядов стерильного 96-луночного плоскодонного планшета в двух повторностях. Положительный и отрицательный контроли в объеме 100 мкл в двух повторностях добавляем в ячейки 10-го и 11-го рядов соответственно 96-луночного планшета. В ячейки 12-го ряда 96-луночного планшета суспензию не вносим и используем как контроль фона. После инкубации 96-луночного планшета при 37 °С в течение 24 ч аккуратно пипеткой удаляем надосадочную жидкость из ячеек и трижды отмываем стерильным 0,15-М фосфатным буфером. Затем к 10 мл рабочего раствора соли тетразолия добавляем 1 мкл рабочего раствора менадиона, переносим полученную смесь по 100 мкл во все ячейки 96-луночного планшета, включая контрольные, и инкубируем при 37 °С в течение 5 ч в темноте.

Учет результатов выполняли спектрофотометрически с помощью микропланшетного ридера IMark (Bio-Rad, США) при длине волны 490 нм. Изоляты *Candida* spp., имевшие оптическую плотность (ОП)

от 0,1 и более, оценивали как формирующие биопленки; менее 0,1 — не способные к формированию биопленок.

Статистический анализ. Для анализа результатов исследования была создана база данных. Статистическую обработку результатов проводили в программе IBM SPSS Statistics, версия 21. Различия между характеристиками оценивали с помощью точного критерия Фишера и считали статистически значимыми при степени вероятности безошибочного прогноза 95 % ($p < 0,05$).

Результаты

Способность к формированию биопленок была исследована у 428 *Candida* spp., включая *C. albicans* ($n = 192$), *C. parapsilosis* complex ($n = 121$), *C. krusei* ($n = 40$), *C. tropicalis* ($n = 38$) и *C. glabrata* ($n = 37$). Изоляты были выделены от больных опухолями системы крови ($n = 172$) и больных без опухолей системы крови ($n = 256$). Большинство больных без опухолей системы крови и инвазивным кандидозом (85%) находились на лечении в отделениях реанимации и интенсивной терапии. Из гемокультуры было получено 86,3 % ($n = 361$) *Candida* spp., из других клинически значимых образцов — 15,7 % ($n = 67$), среди которых преобладали асцитическая жидкость ($n = 36$; 8,4%), далее следовали биоптаты органов и тканей ($n = 14$; 3,3%), спинномозговая жидкость ($n = 9$; 2,1%), желчь ($n = 5$; 1,2%) и суставная жидкость ($n = 3$; 0,7%).

Значения ОП варьировали среди изолятов (рис. 1). Наиболее высокие значения медианы ОП были обнаружены у *C. krusei* (0,771), далее следовали *C. tropicalis* (0,206), *C. parapsilosis* complex (0,075), *C. albicans* (0,065) и *C. glabrata* (0,057). Значения ОП от 0,5 и более чаще определялись у *C. krusei* (40%) в сравнении с *C. glabrata* (5,4%), *C. tropicalis* (5%), *C. parapsilosis* complex (1,7%) и полностью отсутствовали у *C. albicans* ($p < 0,05$). Основная доля изолятов имела значения ОП в диапа-

Рисунок 1. Распределение значений оптической плотности среди изолятов *Candida* spp. Черными линиями показаны медианы значений оптической плотности
Figure 1. Distribution of optical density values among *Candida* spp. The black lines show the means values of optical density

зоне от 0,1 до 0,499, и этот показатель чаще выявляли у *C. tropicalis* (84,2%) в сравнении с *C. parapsilosis* complex (39,7%), *C. krusei* (35%), *C. albicans* (23,4%) и *C. glabrata* (18,9%, $p < 0,05$).

Продукция биопленок была выявлена у 179 (41,8%) из 428 *Candida* spp. с одинаковой частотой среди изолятов, выделенных от больных опухолями системы крови (41,9%, 72 из 172) и больных без опухолей системы крови (41,8%, 107 из 256). Способность к формированию биопленок была несколько выше среди *Candida* spp., выделенных из гемокультуры (42,9%, 155 из 361), в сравнении с изолятами из других клинически значимых образцов (35,8%, 24 из 67), но отличия были недостоверными ($p > 0,05$).

На рисунке 2 представлена частота образования биопленок среди *C. albicans* и *Candida* non-*albicans*, выделенных от больных исследуемых групп и из разных клинически значимых образцов. При анализе *Candida* spp., полученных от всех больных, чаще биопленки продуцировали *Candida* non-*albicans* в сравнении с *C. albicans* (52,5% против 28,6% соответственно, $p < 0,001$) в основном за счет *Candida* non-*albicans*, выделенных из гемокультуры (52,8% против 28,3% соответственно, $p < 0,001$), рисунок 2 А. Более выраженные отличия в способности образования биопленок среди *Candida* non-*albicans* и *C. albicans* были выявлены при выделении их от больных опухолями системы крови и составили 56,6% против 18,2%, а при исследовании изолятов из гемокультуры — 55,3% против 17,2%, $p < 0,001$ соответственно (рисунок 2 Б). Среди изолятов, выделенных из других клинически значимых образцов, отличий не было получено, вероятно, по причине небольшого числа исследуемых *Candida* spp. В группе больных без опухолей системы крови различия в частоте образования биопленок между *Candida* non-*albicans* и *C. albicans* были определены лишь среди изолятов, полученных из гемокультуры, и эти отличия были не столь выражены как в группе сравнения (50,4% против 35,6% соответственно, $p = 0,04$), рисунок 2 В.

Во все анализируемые временные периоды образование биопленок преобладало у *Candida* non-*albicans* в сравнении с *C. albicans* (рис. 3). Значимое увеличение продукции биопленок с 45 до 60% среди *Candida* non-*albicans* было отмечено в период с 2005 по 2017 г. ($p = 0,001$). Доля *C. albicans* в составе биопленок за этот период также возросла, но в меньшей степени: с 19% (2005–2007 гг.) до 29% (2016–2017 гг., $p > 0,05$). В 2010–2011 гг. частота образования биопленок среди *Candida* non-*albicans* и *C. albicans* также была высокой, как в последний период исследования (2016–2017 гг.), и составила 60 и 37% соответственно. При анализе видового распределения *Candida* spp. и частоты детекции продукции биопленок в исследуемые временные промежутки не было выявлено отличий. Возможно, регистрируемый всплеск

продукции биопленок в 2010–2011 гг. был обусловлен использованием у больных в эти годы инвазивных устройств, к которым *Candida* spp. проявляют большую тропность, или более тяжелой когортой больных с инвазивным кандидозом.

Исследуемые виды *Candida* имели разную способность к формированию биопленок (рис. 4). Образование биопленок определялось значимо чаще среди *C. tropicalis* (89,5%, 34 из 38) и *C. krusei* (75%, 30 из 40) в сравнении с *C. parapsilosis* complex (41,3%, 50 из 121), *C. albicans* (28,6%, 55 из 192) и *C. glabrata* (27%, 10 из 37), $p < 0,05$. Продукция биопленок была минимальной у *C. albicans* (28,6%) и *C. glabrata* (27%).

Продукция биопленок была сопоставимо высокой в анализируемых группах для *C. tropicalis* и *C. krusei*, ниже для *C. parapsilosis* complex и *C. glabrata* (рис. 5). Отличия в группах больных с инвазивным кандидозом по способности формирования биопленок были выявлены для *C. albicans*. Образование биопленок достоверно чаще было определено для *C. albicans*, выделенных от больных без опухолей системы крови и составило 34% против 18,2% в группе сравнения ($p = 0,03$).

Обсуждение

Для возбудителей инвазивного кандидоза характерным является наличие факторов патогенности. Наиболее значимыми из них являются адгезины, благодаря которым происходит прикрепление *Candida* spp. к инвазивным устройствам и клеткам макроорганизма, наличие ферментов агрессии, таких как протеазы, липазы, присутствие морфологической гетерогенности, которая выражается в формировании дрожжевых клеток и псевдомицелия, а также способность к образованию биопленок на поверхностях инородных устройств и слизистых оболочек.

В настоящей работе частота детекции биопленок среди изолятов *Candida* spp., выделенных из клинически значимых образцов, составила 41,8%. По результатам разных исследований этот показатель был переменным. В исследовании ученых из Швеции продукция биопленок среди *Candida* spp., выделенных из гемокультуры, была определена у 58,8% (231 из 393) изолятов; в исследовании из Турции — только у 20,2% (20 из 99) [9, 10].

Одинаковая частота выделения *Candida* spp. в составе биопленок была получена от больных опухолями системы крови и больных без опухолей системы крови и составила 41,9 и 41,8% соответственно. Основная доля больных без опухолей системы крови (85%) находилась в отделениях реанимации и интенсивной терапии. Сопоставимо высокая частота образования биопленок среди *Candida* spp. может быть связана с частым использованием инвазивных медицинских устройств в обеих группах больных. Полученные в настоящем исследовании данные подтверждены результатами

A

Б

В

Рисунок 2. Частота образования биопленок среди *C. albicans* и *Candida non-albicans*: А — *Candida* spp., выделенные от всех больных; Б — *Candida* spp., выделенные от больных опухолями системы крови; В — *Candida* spp., выделенные от больных без опухолей системы крови
Figure 2. Incidence of biofilm formation among *C. albicans* and *Candida non-albicans*: А — *Candida* spp. isolated from all patients; Б — *Candida* spp. isolated from patients with hematological malignancies; В — *Candida* spp. isolated from patients without hematological malignancies

Рисунок 3. Способность к формированию биопленок среди *C. albicans* и *Candida non-albicans* в разные временные периоды
Figure 3. Biofilm-forming ability among *C. albicans* and *Candida non-albicans* at various periods

Рисунок 4. Частота образования биопленок среди разных видов *Candida*
Figure 4. Biofilm production among different species of *Candida*

других исследователей, в которых доля *Candida* spp. в составе биопленок, выделенных от больных опухолями системы крови, составила 46 % ($n = 43$), этот показатель был несколько выше от больных из отделений реанимации и достигал 58 % [11, 12].

Продукция биопленок среди *Candida* spp., выделенных из гемокультуры, была выше и составила 42,9 % против 35,8 % среди изолятов, полученных из других клинически значимых образцов, но отличия были недостоверными ($p > 0,05$). Опубликованные

результаты исследований по изучению способности к формированию биопленок среди *Candida* spp., как вызывающих инвазивный кандидоз, так и колонизирующих слизистые оболочки макроорганизма, оказались неоднородными. Продукция биопленок была изучена среди *Candida* spp., выделенных из гемокультуры ($n = 101$), мочи ($n = 97$), респираторного тракта ($n = 89$), ран ($n = 41$), асцитической жидкости ($n = 12$) и других образцов ($n = 20$) [13]. Было показано, что *Candida* spp., выделенные из гемокультуры, чаще образовывали

Рисунок 5. Способность к формированию биопленок среди разных видов *Candida* spp., выделенных от больных опухолями системы крови и от больных без опухолей системы крови

Figure 5. Biofilm-forming ability among different species of *Candida*, isolated from patients with hematological malignancies and patients without hematological malignancies

био пленки в сравнении с изолятами из других образцов (57 % против 32 % соответственно, $p < 0,0001$). Другими исследователями была отмечена высокая частота формирования биопленок среди *Candida* spp., выделенных из гемокультуры (83,3 %) и со слизистой оболочки ротоглотки (81,8 %) [14].

Изоляты *Candida* non-*albicans* статистически значимо чаще образовывали биопленки в сравнении с *C. albicans* (52,5 % против 28,6 %, $p < 0,001$). Согласно данным других авторов, частота формирования биопленок среди *Candida* non-*albicans*, выделенных из гемокультуры, была также выше и варьировала от 54 до 77 %, в то время как этот показатель среди *C. albicans* составлял от 26,7 до 30,6 % ($p < 0,05$) [6, 11, 15].

Основными продуцентами биопленок были изоляты *C. tropicalis* (89,5 %) и *C. krusei* (75 %), реже — *C. albicans* (28,6 %) и *C. glabrata* (27 %). Сопоставимые результаты были получены в других работах, согласно которым частота детекции биопленок среди *C. tropicalis* и *C. krusei* также была высокой, и в некоторых исследованиях этот показатель достигал 100 % [9, 16]. Вариабельные данные о способности к формированию биопленок были выявлены среди *C. glabrata* и *C. albicans* и варьировали у каждого из этих видов от 8 до 95 % [9, 13].

Учитывая неоднородные данные о продукции биопленок среди разных видов *Candida*, можно полагать, что на этот процесс оказывают влияние не только наличие инвазивного устройства в макроорганизме, но и другие факторы, например материал, из которого они изготовлены, и длительность их использования [17]. В экспериментальных исследованиях было доказано,

что образование биопленок среди *C. albicans* чаще было на латексе и реже — на полиуретане и силиконе [18, 19]. В другой работе было показано, что *C. parapsilosis*, *C. albicans* и *C. krusei* обладали большей способностью к формированию биопленок на тефлоне, в то время как *C. glabrata* — на поливинилхлориде, а *C. tropicalis* — на полиуретане [20]. Авторы полагают, что на частоту образования биопленок среди *Candida* spp. может влиять и структура поверхности инвазивного устройства [18].

Различия в способности к формированию биопленок среди разных видов *Candida* могут быть обусловлены неоднородностью используемых методик ввиду присутствия отличий в используемой питательной среде для инкубации, а также в качестве применяемых планшет [17, 20–22].

Таким образом, формирование биопленок было выявлено у 41,8 % возбудителей инвазивного кандидоза с одинаковой частотой у больных опухолями и без опухолей системы крови. Образование биопленок значимо чаще преобладало среди *C. tropicalis* (89,5 %) и *C. krusei* (75 %) в сравнении с *C. parapsilosis* complex (41,3 %), *C. albicans* (28,6 %) и *C. glabrata* (27 %, $p < 0,05$). Отличия в группах больных с инвазивным кандидозом по способности формирования биопленок были выявлены для *C. albicans*. Образование биопленок достоверно чаще было определено для *C. albicans*, выделенных от больных без опухолей системы крови, и составило 34 % против 18,2 % в группе сравнения ($p = 0,03$). Полученные результаты подтверждают необходимость удаления центрального венозного катетера у больных инвазивным кандидозом, особенно при повторном выделении *Candida* spp. из гемокультуры.

Литература

1. Клясова Г.А., Мальчикова А.О., Тандилова К.С. и др. Лечение кандидемий, вызванных *Candida albicans* и *Candida non-albicans*, у больных с опухолями системы крови. Терапевтический архив. 2019; 91(8): 84–92. DOI: 10.26442/00403660.2019.08.000385.
2. Tumbarello M., Fiori B., Trecarichi E.M. et al. Risk factors and outcomes of candidemia caused by biofilm-forming isolates in a tertiary care hospital. PloS One. 2012; 7(3): e33705. DOI: 10.1371/journal.pone.0033705.
3. Клясова Г.А. Антимикробная терапия. В кн.: Программное лечение заболеваний системы крови: сборник алгоритмов диагностики и протоколов лечения заболеваний системы крови. Под ред. В.Г. Савченко. М.: Практика, 2012. С. 827–54.
4. Клясова Г.А., Сперанская Л.Л., Миронова А.В. и др. Возбудители сепсиса у иммунокомпрометированных больных: структура и проблемы антибиотикорезистентности (результаты многоцентрового исследования). Гематология и трансфузиология. 2007; 52(1): 11–8.
5. Puerta-Alcalde P., Cardozo C., Marco F. et al. Changing epidemiology of bloodstream infection in a 25-years hematopoietic stem cell transplant program: current challenges and pitfalls on empiric antibiotic treatment impacting outcomes. Bone Marrow Transplant. 2020; 55: 603–12. DOI:10.1038/s41409-019-0701-3.
6. Tumbarello M., Posteraro B., Trecarichi E.M. et al. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. JCM. 2007; 45(6): 1843–50. DOI: 10.1128/JCM.00131-07.
7. Tascini C., Sozio E., Corte L. et al. The role of biofilm forming on mortality in patients with candidemia: a study derived from real world data. Infect Dis. 2018; 50(3): 214–19. DOI: 10.1080/23744235.2017.1384956.
8. Pierce C. G., Uppuluri P., Tristan A.R. 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): 1494–500. DOI: 10.1038/nprot.2008.141.
9. Pannanusorn S., Fernandez V., Römling U. Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species causing bloodstream infection. Mycoses. 2013; 56(3): 264–72. DOI: 10.1111/myc.12014.
10. Gokce G., Cerikcioglu N., Yagci A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. Mycopathologia. 2007; 164(6): 265–9. DOI:10.1007/s11046-007-9053-4.
11. Pongrácz J., Benedek K., Juhász E. et al. In vitro biofilm production of *Candida* bloodstream isolates: any association with clinical characteristics? J Med Microbiol. 2016; 65(4): 272–7. DOI: 10.1099/jmm.0.000207.
12. Gangneux J.P., Cornet M., Bailly S. et al. Clinical impact of antifungal susceptibility, biofilm formation and mannoside expression of *Candida* yeasts on the outcome of invasive candidiasis in ICU: an ancillary study on the prospective AmarCAND2 cohort. Front Microbiol. 2018; 9: 2907. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02907.
13. Shin J.H., Kee S.J., Shin M.G. et al. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. J Clin Microbiol. 2002; 40(4): 1244–8. DOI: 10.1128/jcm.40.4.1244-1248.2002.
14. Girish Kumar C. P., Menon T. Biofilm production by clinical isolates of *Candida* species. Med Mycol. 2006; 44(1): 99–101. DOI: 10.1080/13693780500338084.
15. Arora S., Dhuria N., Jindal N. et al. Speciation, biofilm formation and antifungal susceptibility of *Candida* isolates. Int J Res Dev Pharm L Sci. 2017; 6: 2517–21. DOI: 10.21276/IJRDP. 2278-0238.2017.6(2).2517-2521.

References

1. Klyasova G.A., Malchikova A.O., Tandilova K.S. et al. Treatment of candidemia caused by *Candida albicans* and *Candida non-albicans* in patients with hematological malignancies. Terapevticheskiy Arkhiv. 2019; 91 (8): 84–92. DOI: 10.26442/00403660.2019.08.000385 (In Russian).
2. Tumbarello M., Fiori B., Trecarichi E.M. et al. Risk factors and outcomes of candidemia caused by biofilm-forming isolates in a tertiary care hospital. PloS One. 2012; 7(3): e33705. DOI: 10.1371/journal.pone.0033705.
3. Klyasova G.A. Antimicrobial therapy. In: Program treatment of blood system diseases. Ed. V.G. Savchenko. Moscow: Praktika; 2012. P. 829–53. (In Russian).
4. Klyasova G., Speranskaya L., Mironova A. et al. The pathogens causing sepsis in immunocompromised patients: structure and problems of antibiotic resistance. Results of multi-center cooperative study. Gematologiya i Transfusiologiya. 2007; 52(1): 11–8. (In Russian).
5. Puerta-Alcalde P., Cardozo C., Marco F. et al. Changing epidemiology of bloodstream infection in a 25-years hematopoietic stem cell transplant program: current challenges and pitfalls on empiric antibiotic treatment impacting outcomes. Bone Marrow Transplant. 2020; 55: 603–612. DOI:10.1038/s41409-019-0701-3.
6. Tumbarello M., Posteraro B., Trecarichi E.M. et al. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. JCM. 2007; 45(6): 1843–50. DOI: 10.1128/JCM.00131-07.
7. Tascini C., Sozio E., Corte L. et al. The role of biofilm forming on mortality in patients with candidemia: a study derived from real world data. Infect Dis. 2018; 50(3): 214–9. DOI: 10.1080/23744235.2017.1384956.
8. Pierce C.G., Uppuluri P., Tristan A.R. 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): 1494–500. DOI: 10.1038/nprot.2008.141.
9. Pannanusorn S., Fernandez V., Römling U. Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species causing bloodstream infection. Mycoses. 2013; 56(3): 264–72. DOI: 10.1111/myc.12014.
10. Gokce G., Cerikcioglu N., Yagci A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. Mycopathologia. 2007; 164(6): 265–9. DOI:10.1007/s11046-007-9053-4.
11. Pongrácz J., Benedek K., Juhász E. et al. In vitro biofilm production of *Candida* bloodstream isolates: any association with clinical characteristics? J Med Microbiol. 2016; 65(4): 272–7. DOI: 10.1099/jmm.0.000207.
12. Gangneux J. P., Cornet M., Bailly S. et al. Clinical impact of antifungal susceptibility, biofilm formation and mannoside expression of *Candida* yeasts on the outcome of invasive candidiasis in ICU: an ancillary study on the prospective AmarCAND2 cohort. Front Microbiol. 2018; 9: 2907. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02907.
13. Shin J.H., Kee S.J., Shin M.G. et al. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. J Clin Microbiol. 2002; 40(4): 1244–8. DOI: 10.1128/jcm.40.4.1244-1248.2002.
14. Kumar C.P., Menon T. Biofilm production by clinical isolates of *Candida* species. Med Mycol. 2006; 44(1): 99–101. DOI: 10.1080/13693780500338084.
15. Arora S., Dhuria N., Jindal N. et al. Speciation, biofilm formation and antifungal susceptibility of *Candida* isolates. Int J Res Dev Pharm L Sci. 2017; 6: 2517–21. DOI: 10.21276/IJRDP. 2278-0238.2017.6(2).2517-2521.

16. Sida H., Shah P., Pethani J. et al. Study of biofilm formation as a virulence marker in *Candida* species isolated from various clinical specimens. Int J Med Sci Public Health. 2016; 5(5): 842–6. DOI:10.5455/ijmsph.2016.24082015139.
17. Jain N., Kohli R., Cook E. et al. Biofilm formation by and antifungal susceptibility of *Candida* isolates from urine. Appl Environ Microbiol. 2007; 73(6): 1697–703. DOI: 10.1128/AEM.02439-06.
18. Hawser S.P., Douglas L.J. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. Infect Immun. 1994; 62(3): 915–21. DOI: 10.1128/IAI.62.3.915-921.1994.
19. Radford D.R., Sweet S.P., Challacombe S.J., Walter J.D. Adherence of *Candida albicans* to denture-base materials with different surface finishes. J Dent. 1998; 26(7): 577–83. DOI: 10.1016/s0300-5712(97)00034-1.
20. Estivill D., Arias A., Torres-Lana A. et al. Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. J Microbiol Methods. 2011; 86(2): 238–42. DOI: 10.1016/j.mimet.2011.05.019.
21. Krom B.P., Cohen J.B., Feser G.E.M., Cihlar R.L. Optimized candidal biofilm microtiter assay. J Microbiol Methods. 2007; 68(2): 421–3. DOI: 10.1016/j.mimet.2006.08.003.
22. Frade J.P., Arthington-Skaggs B.A. Effect of serum and surface characteristics on *Candida albicans* biofilm formation. Mycoses. 2011; 54(4): 154–62. DOI: 10.1111/j.1439-0507.2010.01862.x.

Информация об авторах

Мальчикова Анна Олеговна*, кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории клинической бактериологии, микологии и антибиотической терапии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: anmalchikova@gmail.com;
125167, г. Москва, Новый Зыковский проезд, 4
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8725-5131>

Клясова Галина Александровна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией клинической бактериологии, микологии и антибиотической терапии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: klyasova.g@blood.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5973-5763>

* Автор, ответственный за переписку

Поступила: 31.01.2020

Принята к печати: 27.07.2020

16. Sida H., Shah P., Pethani J. et al. Study of biofilm formation as a virulence marker in *Candida* species isolated from various clinical specimens. Int J Med Sci Public Health. 2016; 5(5): 842–6. DOI:10.5455/ijmsph.2016.24082015139.
17. Jain N., Kohli R., Cook E. et al. Biofilm formation by and antifungal susceptibility of *Candida* isolates from urine. Appl Environ Microbiol. 2007; 73(6): 1697–703. DOI: 10.1128/AEM.02439-06.
18. Hawser S.P., Douglas L.J. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. Infect Immun. 1994; 62(3): 915–21. DOI: 10.1128/IAI.62.3.915-921.1994.
19. Radford D.R., Sweet S.P., Challacombe S.J., Walter J.D. Adherence of *Candida albicans* to denture-base materials with different surface finishes. J Dent. 1998; 26(7): 577–83. DOI: 10.1016/s0300-5712(97)00034-1.
20. Estivill D., Arias A., Torres-Lana A. et al. Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. J Microbiol Methods. 2011; 86(2): 238–42. DOI: 10.1016/j.mimet.2011.05.019.
21. Krom B.P., Cohen J.B., Feser G.E.M., Cihlar R.L. Optimized candidal biofilm microtiter assay. J Microbiol Methods. 2007; 68(2): 421–3. DOI: 10.1016/j.mimet.2006.08.003.
22. Frade J.P., Arthington-Skaggs B.A. Effect of serum and surface characteristics on *Candida albicans* biofilm formation. Mycoses. 2011; 54(4): 154–62. DOI: 10.1111/j.1439-0507.2010.01862.x.

Information about the authors

Anna O. Malchikova*, Cand. Sci. (Med.), Researcher, Laboratory of Clinical Microbiology, Mycology and Antibiotic Therapy National Research Center for Hematology,
e-mail: anmalchikova@gmail.com;
125167, Moscow, Novy Zykovsky proezd, 4
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8725-5131>

Galina A. Klyasova, Dr. Sci. (Med.), Prof., Head of the Laboratory of Clinical Microbiology, Mycology and Antibiotic Therapy National Research Center for Hematology,
e-mail: klyasova.g@blood.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5973-5763>

* Corresponding author

Received 31 Jan 2020

Accepted 27 Jul 2020