

STUDY OF THE SENSITIVITY OF CANDIDA ADAPTED TO FUNGICIDES TO MEDICAL ANTIFUNGAL DRUGS

Bogomolets National Medical University (Kyiv, Ukraine)

ahrynzovska@gmail.com

Nowadays, fungal resistance to antifungal drugs is one of the most pressing problems in modern medicine and is subject to in-depth study. It is possible that this may also be due to the fact that antimycotic drugs, in addition to the medical industry, are widely used in various sectors of the national economy, including the agricultural industry, where fungicidal drugs of the azole group, in particular triazole and imidazole derivatives, are most often used. This study aims to assess how the adaptation of microscopic fungi to azole fungicides affects their sensitivity to drugs used in the medical field to treat fungal infections.

It is known that antifungal drugs from the class of imidazoles and triazoles, both medical and non-medical, have the same mechanism of action on fungal cells. In addition, the comparative analysis showed significant structural similarities between fragments of pesticide (fungicide) molecules and antifungal drugs, which justifies the choice of similarly structured compounds from these classes for the study. Based on the above criteria, fungicides and drugs of similar structure from both the triazole and imidazole classes were selected for the study.

The results show that *C. albicans* strain 1, adapted to high concentrations of tebuconazole fungicide, showed increased susceptibility to nystatin, imidazoles (miconazole and clotrimazole) and fluconazole. All strains adapted to high doses of fungicides developed sensitivity to fluconazole, but strains adapted to triazole fungicides (difenoconazole and propiconazole) lost sensitivity to voriconazole, indicating the formation of cross-resistance.

At the same time, it was found that *C. glabrata* 91 strains resistant to the fungicide difenoconazole were able to retain sensitivity to triazole drugs when analysing the results after 24 hours, but after 48 hours the growth retardation zone was completely "overgrown", which may indicate the formation of cross-resistance in a slow-growing population.

Based on the data obtained, it can be reasonably concluded that fungal strains adapted to high concentrations of fungicides can develop cross-resistance to medical antimicrobics, especially to drugs with a similar chemical structure. However, in some cases, on the contrary, there is an increase in sensitivity to medical antifungal drugs.

Key words: antimicrobial resistance, fungicides, microscopic fungi, candidiasis, fungal infections, azole drugs, *C. albicans*, *C. krusei* and *C. glabrata*.

Connection of the publication with planned research works.

The work was performed within the framework of the research work of the Department of Microbiology and Parasitology with the basics of immunology of the Bogomolets National Medical University «Use of bacteriophages to combat antibiotic-resistant *Clepsiella pneumoniae*», state registration number 0123U100951.

Introduction.

Today, the issue of microbial resistance to major antimicrobial drugs is being actively studied. In general, this problem is not new; however, the intensive spread of multidrug-resistant strains has become a global challenge for society [1]. In medical practice, irrational antibacterial and antimycotic therapy is considered the main reason for the acquisition of antimicrobial resistance by microorganisms, which contributes to the selection of resistant strains of infectious diseases [2]. At the same time, it should be noted that antimicrobial, particularly antifungal, drugs are widely used in the agricultural sector, including for treating fruit and vegetable crops [3]. The wide range of microscopic fungi found in crops and agricultural products makes the problem particularly urgent. In this industry, azole preparations, in particular triazole derivatives (flutriafol) and imidazole derivatives (imazalil), are most often used [4]. Resistance to azoles has become a new therapeutic challenge on all continents.

Although the resistance of fungal microorganisms to azoles has been known for several decades, there are still a limited number of studies on the patterns of fungal resistance to azoles. This is especially important given that drugs of this group are also actively used in medical practice, where they have proven to be effective in treating fungal infections in humans [5].

The development of resistance in fungi is a less dynamic process than in bacteria, but it is no less important given the prevalence of fungal infections in our country and globally. The emergence of pathogen resistance to fungicides is a special case of the natural process of biological evolution of organisms capable of adapting to changing environmental conditions. In order to prevent the occurrence of toxicity to the human body, individual values of maximum permissible levels or permissible residual concentrations (in mg/kg) in products and their derivatives, in soil and other specified objects have been developed for each fungicide and each type of crop where it is used [6]. However, residual amounts of fungicides can enter the human body and be a trigger for the emergence of resistant opportunistic strains of microscopic fungi, which raises important issues of environmental sustainability, human health and food security. It is possible that the similarity in molecular structure between azole fungicides, which dominate the agricultural pesticide market, and antifungal drugs may lead to the development of cross-resistance of fungi to

medicines. It has now been shown that azole-resistant fungal strains, such as *A. fumigatus*, have been shown to be common among clinical isolates. For example, studies in the Netherlands, the UK and India have shown that azole-resistant pathogens were isolated from two-thirds of patients with invasive aspergillosis, although no azole therapy was performed in the history of such patients [7]. In the context of this problem, it is important to answer the key question: is it possible to develop cross-resistance to medical antimycotics in microorganisms adapted to fungicidal pesticides? This is the focus of this paper.

The aim of the study.

To determine the possibility of cross-resistance to antimycotics for medical purposes in fungal strains adapted to high concentrations of fungicides.

Object and research methods.

Clinical isolates of *Candida albicans* (*C. albicans*), *Candida krusei* (*C. krusei*) and *Candida glabrata* (*C. glabrata*) from the collection of microbial cultures of the Department of Microbiology and Parasitology with the Basics of Immunology of the Bogomolets National Medical University and the Bacteriological Laboratory of the Pirogov National Medical University were used in the study. Isolated fungal cultures were identified using a device for the identification and determination of the sensitivity of microorganisms to antimicrobial agents – Vitek 2 compact 30.

Sensitivity studies of clinical strains of *Candida* fungi were conducted to the most common broad-spectrum fungicides used in the agricultural industry: difenoconazole, tebuconazole, flutriafol, propiconazole (1,2,4-triazole derivatives) and imazalil, prochloraz (imidazole derivatives). All the test fungicides were presented in the form of chemically pure solids with a powdered consistency, except for propiconazole, which was a viscous, thick yellow liquid.

To determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of fungicides, the serial dilution method of drugs in a liquid nutrient medium of an antimicrobial agent (AMA) was used [8]. Working solutions of the experimental drugs were prepared under aseptic conditions by diluting an exact weight of crystalline powders (difenoconazole, tebuconazole, fluathiafloxacin, imazalil and prochlorazole) weighing 800 mg (0.8 g) or 0.8 ml of liquid propiconazole in 9.2 ml of DMSO. Subsequently, two-fold serial dilutions of fungicide solutions in AMA liquid medium were prepared. The dilutions were repeated to a final fungicide concentration of 9.7 mg/ml (for difenoconazole, tebuconazole, flutriafol, imazalil, prochlorazole) or 12.5 mg/ml (the calculation of the mass and concentration of propiconazole was calculated considering the density of the preparation). The final density of candida inoculum was 1×10^4 – 5×10^4 cells/ml.

To determine the values of the minimum fungicidal concentration (MFC), 0.1 ml samples were taken from the tube with a concentration of fungicidal preparations of $1.0 \times \text{MIC}$, all tubes with a higher concentration and the tube with a positive control. Each sample was inoculated on Petri dishes with Sabouraud medium, then placed in a thermostat at 35°C. The results were evaluated after 24 h and again after 48 h. The result was considered negative if there were 5 or fewer colonies per dish, which is equivalent to 99.9% of the test culture being killed. The lowest concentration at which negative results were recorded was taken as the MFC [8]. To determine interspecific dif-

ferences in candida susceptibility to fungicides, the average MFC values for *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. glabrata* were calculated.

To study the possibility of developing cross-resistance to antifungal drugs in *Candida*, which have been adapted to high concentrations of agricultural fungicides, the sensitivity of the original and passaged strains of *Candida* to the most commonly used antifungal drugs in medical practice – imidazole, triazole and polyene antibiotics – was determined. The susceptibility was determined according to the standard method specified in CLSI M44-A2 (2018) [9] using Müller-Hinton medium (with 2% glucose and 0.5 µg/ml methylene blue) and standard discs with miconazole (50 mg per disc), clotrimazole (10 mg per disc), fluconazole (25 mg per disc), voriconazole (1 mg per disc), and nystatin (100 U per disc).

Research results and their discussion.

Antifungal drugs derived from imidazole and triazole, both medical and non-medical, have the same mechanism of detrimental effects on fungal cells, so it was advisable to study whether strains adapted to high concentrations of fungicides develop cross-resistance to medical antimycotics. A comparative analysis of the compounds under study showed structural similarities between fragments of pesticide (fungicide) molecules and antifungal drugs [10]. Based on chemical similarities, we selected for the study similarly structured fungicides and drugs from both the triazole and imidazole classes: two medicinal products from the imidazole group, namely miconazole (with the highest chemical similarity to fungicidal imidazoles) and clotrimazole (with the lowest chemical similarity) and the triazole group (fluconazole and voriconazole), both of which had high chemical similarity (fig. 1). It should be noted that comparative studies of the chemical similarity of fungicides and medicinal products have demonstrated the absence of a group with low chemical similarity (figs. 1, 2). In addition, the drug imazalil, which belongs to the group of polyene antimycotics, was also used in the studies.

The results of determining the susceptibility of microorganisms to antifungal drugs both before the formation of resistance and after their passage in a nutrient medium with fungicides are presented for each strain separately.

According to the results of the disco-diffusion method, strain *C. Albicans 1* was identified as highly sensitive to fluconazole, voriconazole, sensitive to miconazole, clotrimazole and nystatin. The data presented in fig. 3 demonstrate certain changes in antimicrobial susceptibility in clinical *C. albicans 1* strains that were passaged in culture medium with different fungicides. According to the results, the strain adapted to the fungicide difenoconazole lost sensitivity to triazole drugs (fluconazole and voriconazole) and decreased sensitivity

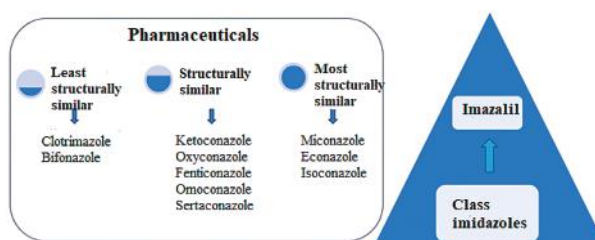


Figure 1 – Structural similarities between imidazole pesticides and antifungal drugs.

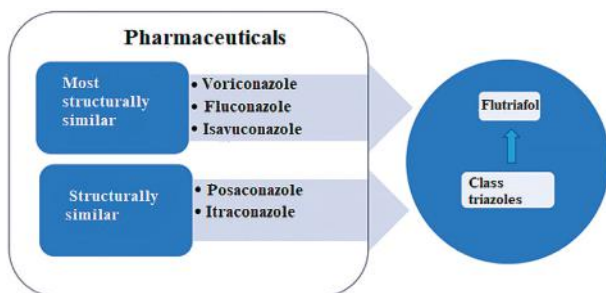


Figure 2 – Structural similarities between triazole pesticides and antifungal drugs.

to clotrimazole. In strains adapted to high concentrations of the fungicides imazalil and prochloraz (imidazole derivatives), cross-resistance to medical antimicrobials, triazole and imidazole derivatives was not found; on the contrary, we recorded an increase in growth retardation zones compared to the corresponding baseline data, indicating an increase in sensitivity to these drugs.

An increase in sensitivity to nystatin, all imidazoles and fluconazole used in the study was observed in the strain adapted to high concentrations of tebuconazole and the strain *C. albicans* 1, which is not sensitive to the flutriafol fungicide, showed pronounced sensitivity to both triazole antimycotics (fluconazole and voriconazole) and the imidazole antimycotic miconazole. For the

propiconazole-resistant strain, the susceptibility values remained almost unchanged.

Based on the size of the growth inhibition zones around the discs with the respective antifungal drugs, strain *C. albicans* 77 was identified as resistant to nystatin and fluconazole, sensitive to voriconazole and clotrimazole, slightly sensitive to miconazole, and moderately resistant to nystatin.

All strains of this group, adapted to high doses of fungicides, developed sensitivity to fluconazole, but populations that were passaged in medium with triazole fungicides (difenoconazole and propiconazole) lost their sensitivity to voriconazole, i.e. in this case, the formation of cross-resistance was observed. Fungi with low sensitivity to the fungicide tebuconazole acquired resistance to imidazoles: miconazole and clotrimazole. The sensitivity to clotrimazole also decreased in the strain adapted to the imidazole fungicide propiconazole, but the sensitivity to miconazole increased in strains resistant to fungicides from the imidazole group, which is confirmed by the data presented in fig. 4.

It should also be noted that the flutriafol-resistant *C. albicans* 77 strain increased its sensitivity to the polyene antibiotic nystatin, but decreased its sensitivity to miconazole. Thus, based on the analysis of the susceptibility of these two strains, it can only be stated that difenoconazole-resistant strains may develop cross-resistance to triazoles, but the vast majority of adapted cultures are increasingly susceptible to fluconazole and/or voriconazole. Adapted or resistant strains to imidazoles had a higher susceptibility to medical imidazoles.

According to the disc diffusion method of susceptibility testing, *C. krusei* B strain was determined to be resistant to fluconazole, highly sensitive to voriconazole, sensitive to clotrimazole, and slightly sensitive to miconazole and nystatin. It was found that fungicide-resistant strains of *C. krusei* B retained resistance to fluconazole, and strains adapted to high doses of difenoconazole, flutriafol, and imazalil significantly reduced sensitivity to voriconazole or developed resistance to it, as in strains resistant to imazalil, as evidenced by the data shown in fig. 5.

The results of experimental studies showed that *C. krusei* B strain, which had acquired resistance to flutriafol, lost sensitivity to imidazoles (miconazole and clotrimazole); loss of sensitivity to nystatin was observed in candida resistant to the fungicide imazalil. In contrast to clinical strains of *C. albicans*, no increase in susceptibility to different chemical groups of antifungal drugs was detected in this type of fungicide-resistant candida, except for a slight increase in susceptibility to clotrimazole in the *C. krusei* B strain, which was resistant to the tebuconazole fungicide.

Based on the results obtained, certain features of the spectrum of antimicrobial

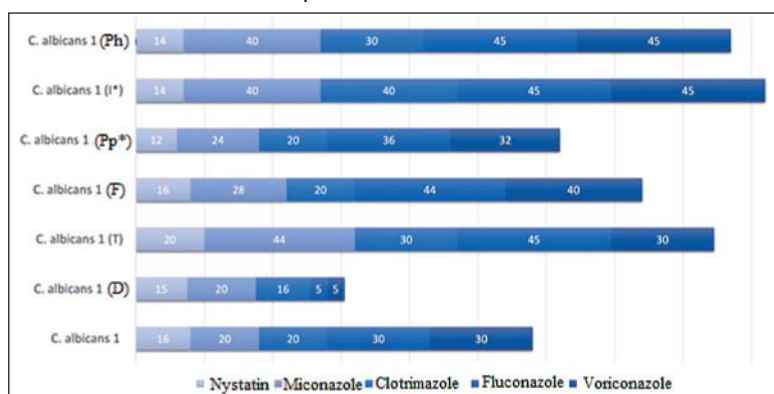


Figure 3 – Sensitivity of fungicide-adapted *C. albicans* 1 strains to antimycotics for medical use.

Notes: (D), (T), (F), (Ph) adapted to difenoconazole, tebuconazole, flutriafol, prochlorazole, respectively; (Pp*), (I*) strain with developed resistance to propiconazole, imazalil, respectively.

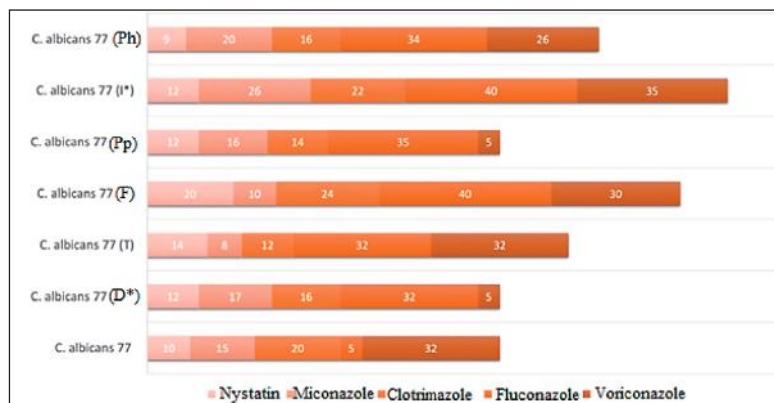


Figure 4 – Sensitivity of fungicide-adapted *C. albicans* 77 strains to antimycotics for medical use.

Notes: (T), (F), (Pp), (Ph) adapted to tebuconazole, flutriafol, propiconazole, prochlorazole, respectively; (D*), (I*) strain with developed resistance to difenoconazole, imazalil, respectively.

activity of medical antimycotics on the *C. glabrata* 91 strain and fungicide-resistant populations of this strain were established. According to our data, the clinical isolate of *C. glabrata* 91 was moderately sensitive to miconazole, nystatin, and sensitive to clotrimazole, fluconazole, and voriconazole.

The results of the studies presented in **fig. 6** and **fig. 7**, demonstrate some features of the biological effect of antimycotics on *C. glabrata* 91 strains adapted to fungicides. When determining the antimicrobial effect of miconazole on strains adapted to difenoconazole and imazalil, a «double zone» was formed: a central, smaller diameter zone with a complete absence of growth and a wider zone with rather scarce growth. In addition, the difenoconazole-resistant candida retained sensitivity to triazoles when analysing the results after 24 hours, but after 48 hours the zone of growth retardation was completely «overgrown», which may indicate the formation of cross-resistance in a slow-growing population. A similar feature was also found in the imazalil-resistant strain, but only concerning voriconazole. In addition, an increase in susceptibility to antifungal drugs was recorded in *C. glabrata* resistant to the flutriafol fungicide, and an increase in susceptibility to fluconazole was shown in strains that had acquired resistance to the propiconazole and imazalil fungicides.

Conclusions.

Thus, based on the results of experimental studies, it can be concluded that clinical isolates of *Candida spp.*, after acquiring resistance to fungicides, react differently to the effects of drugs used in medical practice to treat fungal infections. In some cases, as in the case of *C. albicans* 1, after adaptation to the fungicide difenoconazole, it acquired resistance to triazoles (fluconazole and voriconazole) and reduced sensitivity to clotrimazole. At the same time, strains of this isolate adapted to high concentrations of the fungicides imazalil and prochloraz (imidazole derivatives) did not develop cross-resistance to medical antimycotics, triazole and imidazole derivatives but rather increased it. Similar patterns were observed in other clinical isolates of fungal infections.

In general, the process of adaptation of this group of microorganisms to fungicidal drugs was accompanied by the formation of cross-resistance to drug antimycotics and an increase in their sensitivity.

Prospects for further research.

Further study of this issue on a more representative number of strains of candida that develop resistance

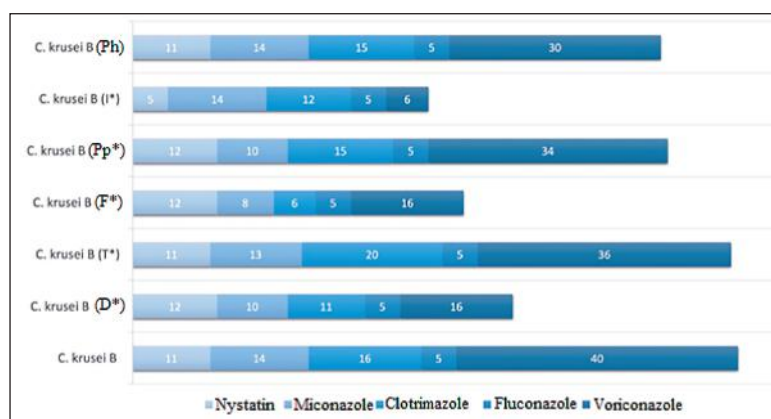


Figure 5 – Sensitivity of fungicide-adapted *C. krusei* B strains to antimycotics for medical use.

Notes: (D*) (T*), (F*), (Pp*), (I*) strains with established resistance to difenoconazole, tebuconazole, flutriafol, propiconazole, imazalil, respectively; (Ph) adapted strain to prochlorazole.

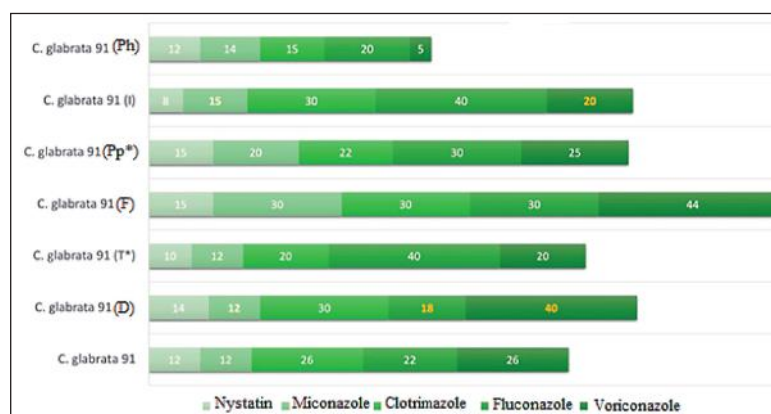


Figure 6 – Sensitivity of fungicide-adapted *C. glabrata* 91 strains to medical antimycotics after 24 hours.

Notes: (T*), (Pp*) strain with developed resistance to tebuconazole, propiconazole, respectively; (D), (F), (I), (Ph) adapted strain to difenoconazole, flutriafol, imazalil, prochloraz, respectively; numbers in orange indicate that the area was completely overgrown after 48 hours of incubation.

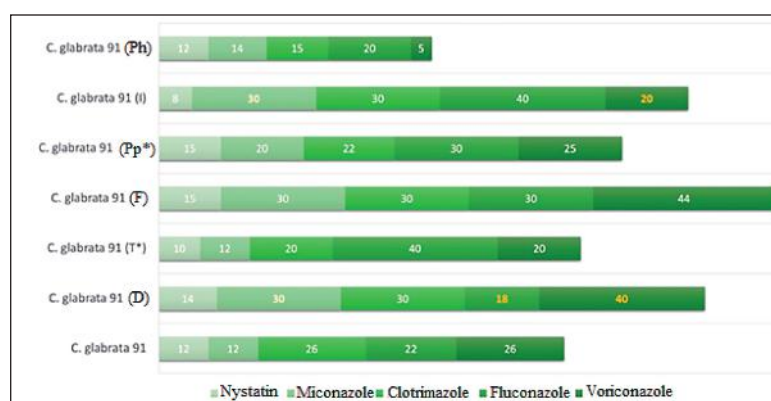


Figure 7 – Sensitivity of fungicide-adapted *C. glabrata* 91 strains to antimycotics for medical use after 48 hours.

Notes: (T*), (Pp*) strain with established resistance to tebuconazole, propiconazole, respectively; (D), (F), (I), (Ph) adapted strain to difenoconazole, flutriafol, imazalil, prochloraz, respectively; numbers in orange indicate that the area was completely overgrown after 48 hours of incubation.

to non-medical fungicides will allow the establishment of certain patterns or correlations regarding the antimicrobial activity of antimycotics on strains of candida that develop resistance to non-medical fungicides.

ДОСЛІДЖЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ АДАПТОВАНИХ ДО ФУНГІЦИДІВ КАНДИД ДО ЛІКАРСЬКИХ ПРОТИГРИБКОВИХ ПРЕПАРАТІВ

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця (м. Київ, Україна)

ahrynsovskaa@gmail.com

В наш час резистентність грибів до протигрибкових препаратів являється однією із найактуальніших проблем сучасної медицини і підлягає глибокому вивченню. Не виключено, що це може бути пов'язано також з тим, що антимікотичні засоби, крім медичної галузі, знайшли широке використання в різних галузях народного господарства, в тому числі і в аграрній сфері, де найчастіше застосовують фунгіцидні препарати групи азолів, зокрема похідні триазолів та імідазолів. Мета даного дослідження – оцінити як впливає процес адаптації мікроскопічних грибів до азольних фунгіцидів на їх чутливість до препаратів, які використовуються в медичній сфері для лікування грибкових інфекцій.

Відомо, що протигрибкові препарати з класу імідазолів та триазолів, як медичного, так і немедичного призначення мають однаковий механізм дії на грибкові клітини. Крім того, проведений порівняльний аналіз показав значну структурну подібність між фрагментами молекул пестицидів (фунгіцидів) і лікарських протигрибкових препаратів, що обґрунтовує вибір для дослідження схожих за будовою сполук з цих класів. Орієнтуючись на вказані критерії, для дослідження обрано схожі за будовою фунгіциди і лікарські препарати як з класу триазолів, так і з класу імідазолів.

Отримані результати свідчать про те, що у штаму *C. albicans* 1, адаптованого до високих концентрацій фунгіциду тебуконазолу, спостерігалось підвищення чутливості до лікарських препаратів ністатину, імідазолів (міконазолу та клотримазолу) а також флуконазолу. У всіх штамів, адаптованих до високих доз фунгіцидів, формувалась чутливість до флуконазолу, проте штами, адаптовані до триазольних фунгіцидів (дифенконазолу та пропіконазолу), втрачали чутливість до воріконазолу, що свідчить про формування перехресної резистентності.

Разом з тим, встановлено, що резистентні до фунгіциду дифенконазолу штами *C. glabrata* 91 здатні зберігати чутливість до медичних препаратів триазолів при аналізі результатів через 24 години, однак через 48 годин зона затримки росту повністю «заростала», що, очевидно, може свідчити про формування перехресної резистентності у популяції з повільним ростом.

На підставі отриманих даних можна зробити аргументований висновок, що штами грибів, адаптовані до високих концентрацій фунгіцидів, можуть формувати перехресну резистентність до медичних антимікотиків, особливо до препаратів з аналогічною хімічною структурою. Однак, у деяких випадках навпаки – спостерігається підвищення чутливості до медичних протигрибкових препаратів.

Ключові слова: антимікробна резистентність, фунгіциди, мікроскопічні гриби, кандидози, грибкові інфекції, азольні препарати, *C. albicans*, *C. krusei* та *C. glabrata*.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Робота виконана в рамках НДР кафедри мікробіології та паразитології з основами імунології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця «Використання бактеріофагів для боротьби з антибіотикорезистентними *Clebsiella pneumoniae*», № державної реєстрації 0123U100951.

Вступ.

А наш час активно вивчається питання резистентності мікроорганізмів до основних антимікробних препаратів. В цілому ця проблема є не новою, разом з тим, інтенсивне поширення мультирезистентних штамів стало глобальним викликом для суспільства [1]. В медичній практиці основною причиною набуття мікроорганізмами резистентності до протимікробних засобів вважають нераціональну антибактеріальну та антимікотичну терапію, що сприяє селекції резистентних штамів збудників інфекційних захворювань [2]. Водночас слід відмітити, що протимікробні, зокрема протигрибкові препарати знайшли широке використання і в аграрній сфері в тому числі й для обробки плодоовочевих культур [3]. Широкий спектр мікроскопічних грибів, що виявляється в культурах та продуктах сільського господарства особливо актуалі-

зує проблему. В даній галузі найчастіше використовують препарати азолів, зокрема похідні триазолів (флутриафол) та імідазолів (імазаліл) [4]. Стійкість до азолів стала новою терапевтичною проблемою на всіх континентах. Хоча про резистентність мікроорганізмів грибкової природи до азолів відомо кілька десятиліть і сьогодні існує обмежена кількість досліджень, присвячених вивченню закономірностей формування резистентності грибів до них. Це особливо важливо з огляду на те, що препарати даної групи активно використовуються і у медичній практиці, де зарекомендували себе як ефективні засоби для лікування грибкових інфекцій у людини [5].

Формування резистентності у грибів є менш динамічним процесом, ніж у бактерій, однак він є не менш важливим, з огляду на поширеність грибкових інфекцій і в нашій і країні і в цілому у світі. Виникнення резистентності збудників до фунгіцидів є окремим випадком природного процесу біологічної еволюції організмів, здатних адаптуватися до мінливих умов зовнішнього середовища. З метою попередження виникнення токсичності для організму людини для кожного фунгіциду та кожного виду культури, де він застосовується, розроблено індивідуальні значення максимально допустимих рівнів або допустимої

залишкові концентрації (у мг/кг) в продукції та її похідних, у ґрунті та інших встановлених об'єктах [6]. Однак залишкова кількість фунгіцидів може потрапляти в організм людини та бути тригерним фактором для виникнення резистентних умовно-патогенних штамів мікроскопічних грибів, що актуалізує важливі питання екологічної стійкості, здоров'я людей та продовольчої безпеки. Не виключено, що схожість у структурі молекул між азольними фунгіцидами, які домінують на ринку сільськогосподарських пестицидів, і протигрибковими препаратами може призводити до формування перехресної стійкості грибів до медичних препаратів. Сьогодні показано, що стійкі до азолів штами грибів, зокрема *A. fumigatus*, часто зустрічаються серед клінічних ізолятів. Так, наприклад, дослідження в Нідерландах, Великобританії та Індії показали, що від двох третин пацієнтів, хворих на інвазивний аспергільоз, виділялись резистентні до азолів збудники, хоча в анамнезі терапія таких хворих азолами не проводилась [7]. В розрізі даної проблеми важливо дати відповідь на ключове запитання – чи можливе формування перехресної резистентності до антимікотиків медичного призначення у мікроорганізмів, адаптованих до фунгіцидних пестицидів? Саме цьому у присвячена дана робота.

Мета дослідження.

З'ясувати можливість формування перехресної резистентності до антимікотиків медичного призначення у штамів грибів, адаптованих до високих концентрацій фунгіцидів.

Об'єкт і методи дослідження.

В роботі використовували клінічні ізоляти *Candida albicans* (*C. albicans*), *Candida krusei* (*C. krusei*) та *Candida glabrata* (*C. glabrata*) з колекції культур мікроорганізмів кафедри мікробіології та паразитології з основами імунології НМУ імені О.О. Богомольця та бактеріологічної лабораторії ВНМУ імені М.І. Пирогова. Ідентифікацію ізольованих культур грибів здійснювали з використання приладу для ідентифікації та визначення чутливості мікроорганізмів до протимікробних засобів – Vitek 2 compact 30.

Дослідження чутливості клінічних штамів грибів роду *Candida* проводили до найбільш поширених фунгіцидів широкого спектру дії, які використовують в аграрній промисловості: дифеноконазолу, тебуконазолу, флутриафолу, пропіконазолу (похідні 1,2,4-триазолу) та імазалілу, прохлоразу (похідні імідазолу). Усі дослідні фунгіциди були представлені у вигляді хімічно чистих твердих речовин порошковидної консистенції, за винятком пропіконазолу, який був в'язкою густою рідиною жовтого кольору.

Для визначення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) фунгіцидів використовували метод серійних розведень препаратів у рідкому поживному середовищі антимікробного засобу (АМЗ) [8]. Робочі розчини дослідних препаратів готували в асептичних умовах шляхом розведення точної наважки кристалічних порошків (дифеноконазолу, тебуконазолу, флутриафолу, імазалілу та прохлоразу) вагою 800 мг (0,8 г) або 0,8 мл рідкого пропіконазолу в 9,2 мл ДМСО. Надалі готували двократні послідовні розведення розчинів фунгіцидів в рідкому середовищі АМЗ. Розведення повторювали до кінцевої концентрації фунгіциду 9,7 мг/мл (для дифеноконазолу, тебуконазолу, флутриафолу, імазалілу, прохлоразу) або

12,5 мг/мл (розрахунок маси та концентрації пропіконазолу вираховували з урахуванням густини препарату). Кінцева щільність інюляту кандид становить 1×10^4 – 5×10^4 клітин/мл.

Для визначення значень мінімальної фунгіцидної концентрації (МФЦК) відбирали проби по 0,1 мл з пробірки з концентрацією фунгіцидних препаратів $1,0 \times \text{МІК}$, усіх пробірок з вищою концентрацією та пробірки з позитивним контролем. Висівали кожен пробу на чашки Петрі з середовищем Сабуро, потім поміщали чашки у термостат при температурі 35°C. Результати оцінювали через 24 год та повторно через 48 год. Результат вважали негативним при наявності 5 або менше колоній на чашку, що еквівалентно 99,9% загибелі дослідної культури. Найнижчу концентрацію, при якій реєструвалися негативні результату приймали як МФЦК [8]. Для встановлення міжвидових відмінностей у чутливості кандид до фунгіцидів вираховували середні значення МФЦК для видів *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*.

Для вивчення можливості формування перехресної стійкості до протигрибкових препаратів медичного призначення у кандид, які були адаптовані до високих концентрацій сільськогосподарських фунгіцидів, проведено визначення чутливості вихідних та пасажованих штамів грибів роду *Candida* до найбільш поширених в медичній практиці антифунгальних препаратів – похідних імідазолу, триазолу та полієнових антибіотиків. Чутливість визначали згідно стандартної методики, що зазначена в CLSI M44-A2 (2018) [9] з використанням середовища Мюлера-Хінтона (з додаванням 2% глюкози та 0,5 µг/мл метиленової синьки) та стандартних дисків з міконазолом (50 мг на диск), клотримазолом (10 мг на диск), флуконазолом (25 мг на диск), воріконазолом (1 мг на диск), ністатином (100 Од на диск) виробництва.

Результати досліджень та їх обговорення.

Протигрибкові препарати, похідні імідазолу та триазолу, як медичного, так і немедичного призначення, мають однаковий механізм згубної дії на грибові клітини, тому було доцільно вивчити чи не формується у штамів, адаптованих до високих концентрацій фунгіцидів, перехресної резистентності до антимікотиків медичного призначення. Порівняльний аналіз досліджуваних сполук показав структурну подібність фрагментів молекул пестицидів (фунгіцидів) та лікарських протигрибкових препаратів [10]. Орієнтуючись на хімічну подібність нами було відібрано для дослідження схожі за будовою фунгіциди і лікарські препарати як з класу триазолів, так і з класу імідазолів: по два лікарські препарати з групи імідазолів, а саме – міконазол (мав найбільшу хімічну подібність до фунгіцидних імідазолів) та клотримазол (найменш хімічно подібний) та групи триазолів (флуконазол і воріконазол), обидва мали високу хімічну подібність (рис. 1). Слід відмітити, що порівняльні дослідження хімічної подібності фунгіцидів та лікарських препаратів продемонстрували відсутність групи з низкою хімічною схожістю (рис. 1, 2). Крім того, в дослідженнях використовували і препарат імазалілу, який належить до групи полієнових антимікотиків.

Результати визначення чутливості мікроорганізмів до протигрибкових препаратів як до формування резистентності, так і по закінченню їх пасажування в



Рисунок 1 – Структурна подібність пестицидів групи імідазолів та лікарських протигрибкових препаратів.



Рисунок 2 – Структурна подібність пестицидів групи триазолів та лікарських протигрибкових препаратів.

поживних середовищах з фунгіцидами представлені для кожного штаму окремо.

За результатами диско-дифузійного методу штаму *C. albicans 1* визначений як високочутливий до лікарських препаратів флуконазолу, воріконазолу,

чутливий до міконазолу, клотримазолу та ністатину. Наведені на **рис. 3** дані демонструють певні зміни чутливості до антимікотиків у клінічних штамів *C. albicans 1*, які пасажували в поживних середовищах з різними фунгіцидами. Згідно отриманих результатів у штаму, який був адаптований до фунгіциду дифеноконазолу, втрачалась чутливість до лікарських препаратів з групи триазолів (флуконазолу та воріконазолу) та зменшувалась чутливість до клотримазолу. У штамів, адаптованих до високих концентрацій фунгіцидів імазалілу та прохлоразу (похідних імідазолу) перехресної резистентності до медичних антимікотиків, похідних триазолу та імідазолу, не встановлено, навпаки, нами зафіксовано збільшення зон затримки росту в порівнянні з відповідними вихідними даними, що свідчить про зростання чутливості до цих лікарських препаратів.

Підвищення чутливості до ністатину, всіх використаних у досліді лікарських препаратів імідазолів та флуконазолу спостерігали у штаму, адаптованого до високих концентрацій тебуконазолу, а малочутливий до фунгіциду флутріафолу штаму *C. albicans 1* проявляв виражену чутливість як до антимікотиків групи триазолів (флуконазолу та воріконазолу), так і до імідазольного антимікотика міконазолу. Для резистентного до пропіконазолу штаму показники чутливості майже не змінювались.

На підставі розмірів зон затримки росту навколо дисків з відповідними протигрибковими препаратами штаму *C. albicans 77* був визначений як резистентний до ністатину та флуконазолу, чутливий до воріконазолу та клотримазолу, мало чутливий міконазолу та помірно-стійкий до ністатину.

У всіх штамів цієї групи, адаптованих до високих доз фунгіцидів, формувалась чутливість до флуконазолу, однак популяції, які пасажувались у середовищах з триазольними фунгіцидами (дифеноконазолом та пропіконазолом) втрачали свою чутливість до воріконазолу, тобто в даному випадку спостерігали формування перехресної резистентності. Малочутливі до фунгіциду тебуконазолу гриби набували стійкості до імідазолів: міконазолу та клотримазолу. Чутливість до клотримазолу також знижувалась у штаму, адаптованому до імідазольного фунгіциду пропіконазолу, однак чутливість до міконазолу підвищувалась у штамів, резистентних до фунгіцидів з групи імідазолів, що підтверджують дані, представлені на **рис. 4**.

Слід також відмітити, що у резистентного до фунгіциду флутріафолу штаму *C. albicans 77* зростала чутливість до полієнового антибіотика ністатину, однак знижувалась чутливість до міконазолу. Отже, на підставі аналізу чутливості цих двох штамів можна лише стверджувати, що у резистентних до дифеноконазолу штамів може з'являтися перехресна стійкість до триазолів,

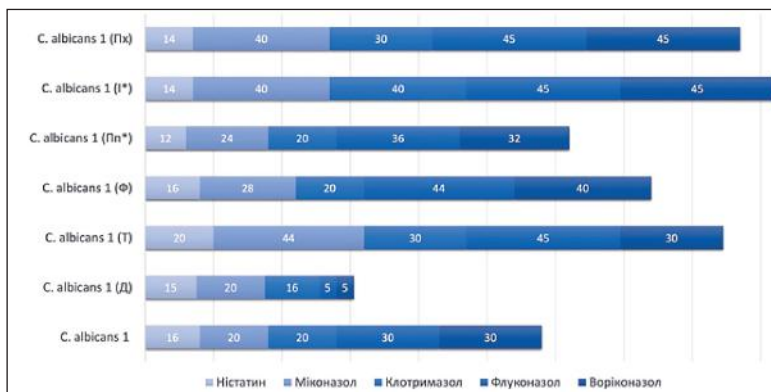


Рисунок 3 – Чутливість адаптованих до фунгіцидів штамів *C. albicans 1* до антимікотиків медичного призначення.

Примітки: (Д), (Т), (Ф), (Пх) адаптований до дифеноконазолу, тебуконазолу, флутріафолу, прохлоразу, відповідно; (Пп*), (І*) штаму із сформованою резистентністю до пропіконазолу, імазалілу, відповідно.

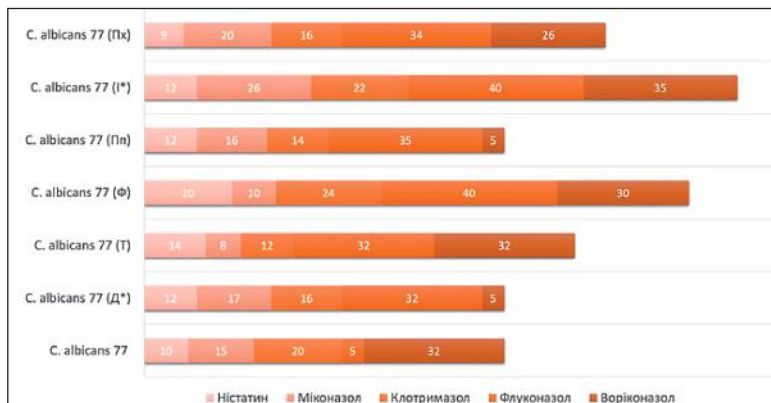


Рисунок 4 – Чутливість адаптованих до фунгіцидів штамів *C. albicans 77* до антимікотиків медичного призначення.

Примітки: (Т), (Ф), (Пп), (Пх) адаптований до тебуконазолу, флутріафолу, пропіконазолу, прохлоразу, відповідно; (Д*), (І*) штаму із сформованою резистентністю до дифеноконазолу, імазалілу, відповідно.

однак у переважній кількості адаптованих культур зростає чутливість до флуконазолу та/або воріконазолу. Адаптовані або резистентні штами до імідазолів мали більш високу чутливість до імідазолів медичного призначення.

За даними диско-дифузійного методу дослідження чутливості штам *C. krusei* B був визначений як резистентний до флуконазолу, високо чутливий до воріконазолу, чутливий до клотримазолу, мало чутливий до міконазолу та ністатину. Встановлено, що у резистентних до фунгіцидів штамів *C. krusei* B зберігалась стійкість до дії флуконазолу, а у штамів адаптованих до високих доз дифеноконазолу, флутріафолу, імазалілу істотно зменшувалась чутливість до воріконазолу або розвивалась до нього стійкість, як у штамів, резистентних до імазалілу, що підтверджують показники, наведені на **рис. 5**.

За результатами експериментальних досліджень було встановлено, що штам *C. krusei* B, який набув резистентності до флутріафолу, втрачав чутливість до імідазолів (міконазолу та клотримазолу); втрата чутливості до ністатину спостерігалась у резистентних до фунгіциду імазалілу кандид цього виду. На відміну від клінічних штамів *C. albicans*, у даного виду резистентних до фунгіцидів кандидат не виявлено зростання чутливості до різних за хімічною будовою груп протигрибкових препаратів, за винятком незначного підвищення чутливості до клотримазолу у штаму *C. krusei* B, який був стійким до фунгіциду тебуконазолу.

На підставі отриманих результатів встановлені певні особливості спектру антимікробної активності медичних антимікотиків на штам *C. glabrata* 91 та на резистентні до фунгіцидів популяції цього штаму. За нашими даними клінічний ізолят *C. glabrata* 91 був помірно чутливим до міконазолу, ністатину, чутливим до клотримазолу, флуконазолу та воріконазолу.

Результати досліджень, представлені на **рис. 6** та **рис. 7**, демонструють деякі особливості біологічної дії антимікотиків на штами *C. glabrata* 91, адаптовані до фунгіцидів. При визначенні протимікробної дії міконазолу на штами, адаптовані до дифеноконазолу та імазалілу, відмічали утворення "подвійної зони" центральної, меншого діаметру, де відмічали повну відсутність росту, та більш широкої зони, де реєстрували досить скудний ріст. Крім того, резистентні до дифеноконазолу кандиди зберігали чутливість до триазолів при аналізі результатів через 24 години, однак через 48 годин зона затримки росту повністю «заростала», що, очевидно, може свідчити про формування



Рисунок 5 – Чутливість адаптованих до фунгіцидів штамів *C. krusei* B до антимікотиків медичного призначення.

Примітки: (Д*) (Т*), (Ф*), (Пп*), (І*) штам із сформованою резистентністю до дифеноконазолу, тебуконазолу, флутріафолу, пропіконазолу, імазалілу, відповідно; (Пх) адаптований штам до прохлоразу.

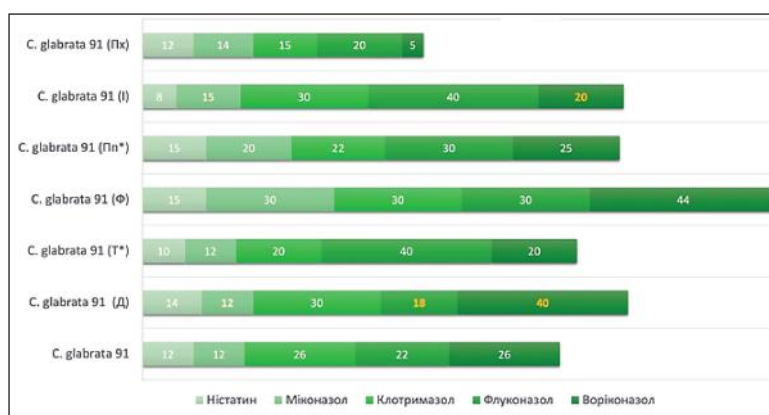


Рисунок 6 – Чутливість адаптованих до фунгіцидів штамів *C. glabrata* 91 до антимікотиків медичного призначення через 24 год.

Примітки: (Т*), (Пп*) штам із сформованою резистентністю до тебуконазолу, пропіконазолу, відповідно; (Д), (Ф), (І), (Пх) адаптований штам до дифеноконазолу, флутріафолу, імазалілу, прохлоразу, відповідно; цифри, виділені помаранчевим кольором – зона повністю заростала після 48 годин інкубації.



Рисунок 7 – Чутливість адаптованих до фунгіцидів штамів *C. glabrata* 91 до антимікотиків медичного призначення через 48 год.

Примітки: (Т*), (Пп*) штам із сформованою резистентністю до тебуконазолу, пропіконазолу, відповідно; (Д), (Ф), (І), (Пх) адаптований штам до дифеноконазолу, флутріафолу, імазалілу, прохлоразу, відповідно; цифри, виділені помаранчевим кольором – зона повністю заростала після 48 годин інкубації.

перехресної резистентності у популяції з повільним ростом. Схожа особливість була також встановлена у стійкого до імазалілу штаму, однак тільки стосовно воріконазолу. Крім того, зафіксовано зростання чутливості до протигрибкових препаратів у резистентної до фунгіциду флутріафолу *C. glabrata*, а також показа-

но підвищення чутливості до флуконазолу у штамів, які набули резистентності до фунгіцидів пропіконазолу та імазалілу.

Висновки.

Отже за результатами експериментальних досліджень можна зробити висновок, що клінічні ізоляти *Candida spp.* після набуття резистентності до фунгіцидів по різному реагують на дію препаратів, які використовуються у медичній практиці для лікування грибкових інфекцій. В одних випадках, як до прикладу з *C. albicans* 1, після адаптації до фунгіциду дифеноконазолу набувала резистентність до триазолів (флуконазолу та воріконазолу та зменшувала чутливість до клотримазолу. Водночас у штамів даного ізоляту, адаптованих до високих концентрацій фунгіцидів імазалілу та прохлоразу (похідних імідазолу)

перехресної резистентності до медичних антимікотиків, похідних триазолу та імідазолу, не встановлено, навпаки, відмічалось її зростання. Подібні закономірності були відмічені і в інших клінічних ізолятів – збудників грибкових інфекцій.

В цілому процес адаптації даної групи мікроорганізмів до фунгіцидних препаратів супроводжувався як формування перехресної резистентності до лікарських антимікотиків, так і підвищенням їх чутливості.

Перспективи подальших досліджень.

Встановити певні закономірності або кореляції щодо протимікробної активності антимікотиків на штами кандид, у яких формується резистентність до фунгіцидів немедичного призначення, дозволить подальше вивчення цього питання на більш репрезентативній кількості штамів.

References / Література

1. Prakash H, Chakrabarti A. Global Epidemiology of Mucormycosis. J Fungi (Basel). 2019;5(1):26. DOI: [10.3390/jof5010026](https://doi.org/10.3390/jof5010026).
2. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. P T. 2015;40(4):277-83.
3. Fisher MC, Henk DA, Briggs CJ, Brownstein JS, Madoff LC, McCraw SL, Gurr SJ. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. Nature. 2012;484(7393):186-94. DOI: [10.1038/nature10947](https://doi.org/10.1038/nature10947).
4. Kunova A, Pizzatti C, Saracchi M, Pasquali M, Cortesi P. Grapevine Powdery Mildew: Fungicides for Its Management and Advances in Molecular Detection of Markers Associated with Resistance. Microorganisms. 2021;9(7):1541. DOI: [10.3390/microorganisms9071541](https://doi.org/10.3390/microorganisms9071541).
5. Fisher MC, Hawkins NJ, Sanglard D, Gurr SJ. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. Science. 2018;360(6390):739-742. DOI: [10.1126/science.aap7999](https://doi.org/10.1126/science.aap7999).
6. Lucas JA, Hawkins NJ, Fraaije BA. The evolution of fungicide resistance. Adv Appl Microbiol. 2015;90:29-92. DOI: [10.1016/b.s.aambs.2014.09.001](https://doi.org/10.1016/b.s.aambs.2014.09.001).
7. Chowdhary A, Sharma C, Meis JF. Azole-Resistant Aspergillosis: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. J Infect Dis. 2017;216(3):S436-S444. DOI: [10.1093/infdis/jix210](https://doi.org/10.1093/infdis/jix210).
8. MOZ Ukrainy. Metodichni rekomendatsiyi «Vychennya spetsyifichnoyi aktivnosti antyfunhal'nykh likars'kykh zasobiv». Kyiv: Ministerstvo okhorony zdorov'ya Ukrainy, DP «Derzhavnyy ekspertnyy tsentr MOZ Ukrainy»; 2016. 60 s. [in Ukrainian].
9. CLSI. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts. 3rd ed. CLSI guideline M44. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
10. Hrynzovska AA, Bobyr VV. The formation of mechanisms of cross-resistance of *A. fumigatus* due to the chemical similarity of azole antifungals and fungicides. Nation's Health. 2023;3:27-33. DOI: [10.32782/2077-6594/2023.3/04](https://doi.org/10.32782/2077-6594/2023.3/04).

ДОСЛІДЖЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ АДАПТОВАНИХ ДО ФУНГІЦИДІВ КАНДИД ДО ЛІКАРСЬКИХ ПРОТИГРИБКОВИХ ПРЕПАРАТІВ

Гринзовська А. А., Бобир В. В.

Резюме. Мета: з'ясувати можливість формування перехресної резистентності до антимікотиків медичного призначення у штамів грибів, адаптованих до високих концентрацій фунгіцидів.

Об'єкт і методи. В роботі використовували клінічні ізоляти *C. albicans*, *C. krusei* та *C. glabrata* з колекції культур мікроорганізмів кафедри мікробіології та паразитології з основами імунології НМУ імені О.О. Богомольця та бактеріологічної лабораторії ВНМУ імені М.І. Пирогова. Дослідження чутливості клінічних штамів грибів роду *Candida* проводили до: дифеноконазолу, тебуконазолу, флутриафолу, пропіконазолу (похідні 1,2,4-триазолу) та імазалілу, прохлоразу (похідні імідазолу).

Для визначення МІК фунгіцидів використовували метод серійних розведень препаратів у рідкому поживному середовищі АМЗ. Робочі розчини дослідних препаратів готували в асептичних умовах шляхом розведення точної наважки кристалічних порошків, надалі готували двократні послідовні розведення розчинів фунгіцидів в рідкому середовищі АМЗ. Розведення повторювали до кінцевої концентрації фунгіциду.

Для визначення значень МФЦК відбирали проби по 0,1 мл з пробірки з концентрацією фунгіцидних препаратів 1,0×МІК, усіх пробірок з вищою концентрацією та пробірки з позитивним контролем. Висівали кожную пробу на чашки Петрі з середовищем Сабуро, потім поміщали чашки у термостат при температурі 35°C. Результати оцінювали через 24 год та повторно через 48 год.

Для вивчення можливості формування перехресної стійкості до протигрибкових препаратів медичного призначення у кандид, які були адаптовані до високих концентрацій сільськогосподарських фунгіцидів, проведено визначення чутливості вихідних та пасажованих штамів грибів роду *Candida* до найбільш поширених в медичній практиці антифунгальних препаратів – похідних імідазолу, триазолу та полієнових антибіотиків.

Результати. Зроблено аргументоване припущення, що клінічні ізоляти грибів роду *Candida*, які в процесі адаптації до фунгіцидів набули резистентності до даних препаратів, можуть формувати перехресну резистентність до медичних антимікотиків з групи триазолів та імідазолів. Водночас отримані дані також свідчать про те, що пасажування грибів у середовищах з фунгіцидами може призводити до зростання чутливості досліджених мікроорганізмів до протигрибкових препаратів. Це зумовлює необхідність формування нових підходів до моніторингу та контролю за використанням фунгіцидів у сільському господарстві і інших сферах, щоб уникнути розвитку резистентності у грибів, яка може ускладнити лікування грибкових захворювань у медичній практиці. Отримані результати важливі для розробки нових стратегій лікування грибкових захворювань та контролю за використанням антимікотиків в медичній практиці і сільськогосподарському секторі.

Висновки. В цілому процес адаптації даної групи мікроорганізмів до фунгіцидних препаратів супроводжувався як формування перехресної резистентності до лікарських антимікотиків, так і підвищенням їх чутливості.

Ключові слова: антимікробна резистентність, фунгіциди, мікроскопічні гриби, кандидози, грибкові інфекції, азольні препарати, *C. albicans*, *C. krusei* та *C. Glabrata*.

STUDY OF THE SENSITIVITY OF CANDIDA ADAPTED TO FUNGICIDES TO MEDICAL ANTIFUNGAL DRUGS

Hrynzovska A. A., Bobyr V. V.

Abstract. *Objective:* to investigate the potential for developing cross-resistance to medical antifungals in fungal strains adapted to high concentrations of fungicides.

Object and Methods. The study utilized clinical isolates of *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. glabrata* from the microorganism culture collection of the Department of Microbiology and Parasitology with Fundamentals of Immunology at Bogomolets National Medical University and the bacteriological laboratory of Vinnytsia National Medical University named after M.I. Pirogov. The sensitivity of clinical *Candida* strains was tested against difeniconazole, tebuconazole, flutriafol, propiconazole (1,2,4-triazole derivatives), and imazalil, prochloraz (imidazole derivatives).

The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of fungicides was determined using the serial dilution method in liquid AMZ nutrient medium. Working solutions of the test substances were prepared under aseptic conditions by diluting precise amounts of crystalline powders, followed by preparing twofold serial dilutions of the fungicide solutions in AMZ liquid medium, continuing the dilutions to the final fungicide concentration.

To determine the Minimum Fungicidal Concentration (MFC) values, samples of 0.1 ml were taken from the tube with the fungicide concentration of 1.0×MIC, all tubes with higher concentrations, and the positive control tube. Each sample was plated onto Petri dishes with Sabouraud agar and incubated at 35°C. Results were evaluated after 24 hours and again after 48 hours.

To study the possibility of developing cross-resistance to medical antifungal drugs in *Candida* strains adapted to high concentrations of agricultural fungicides, the sensitivity of the original and passaged *Candida* strains to the most commonly used antifungal drugs in medical practice—imidazole, triazole derivatives, and polyene antibiotics—was assessed.

Results. It is reasonably hypothesized that clinical isolates of *Candida* species, which developed resistance to these preparations during the adaptation process, can form cross-resistance to medical antifungals from the triazole and imidazole groups. At the same time, the obtained data also indicate that the passage of fungi in environments with fungicides can lead to an increase in the sensitivity of the studied microorganisms to antifungal drugs. This necessitates the development of new approaches to monitoring and controlling the use of fungicides in agriculture and other sectors to avoid the development of fungal resistance, which can complicate the treatment of fungal diseases in medical practice. The obtained results are important for developing new strategies for the treatment of fungal diseases and for controlling the use of antifungals in medical practice and the agricultural sector.

Conclusions. Overall, the adaptation process of this group of microorganisms to fungicidal preparations was accompanied by the development of both cross-resistance to medical antifungals and an increase in their sensitivity.

Key words: antimicrobial resistance, fungicides, microscopic fungi, candidiasis, fungal infections, azole preparations, *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. Glabrata*

ORCID and contributionship / ORCID кожного автора та їх внесок до статті:

Hrynzovska A. A.: <https://orcid.org/0000-0002-2273-3331>^{ABCD}

Bobyr V. V.: <https://orcid.org/0000-0002-8310-8011>^{DEF}

Conflict of interest / Конфлікт інтересів:

The authors declare no conflict of interest. / Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Hrynzovska Anastasiia Anatoliivna / Гринзовська Анастасія Анатоліївна

Bogomolets National Medical University / Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

Ukraine, 01601, Kyiv, 13 T. Shevchenko Blvd. / Адреса: Україна, 01601, м. Київ, б-р Т. Шевченка 13

Tel.: +380953620491 / Тел.: +380953620491

E-mail: ahrynzovska@gmail.com

A – Work concept and design, **B** – Data collection and analysis, **C** – Responsibility for statistical analysis, **D** – Writing the article, **E** – Critical review, **F** – Final approval of the article / **A** – концепція роботи та дизайн, **B** – збір та аналіз даних, **C** – відповідальність за статистичний аналіз, **D** – написання статті, **E** – критичний огляд, **F** – остаточне затвердження статті.

Received 16.12.2023 / Стаття надійшла 16.12.2023 року
Accepted 24.04.2024 / Стаття прийнята до друку 24.04.2024 року