

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНВАЗИВНОГО КАНДИДОЗА К ФЛУКОНАЗОЛУ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДИСКОВ РАЗЛИЧНЫХ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

<sup>1,2</sup>Васильева Н.В. (директор НИИ, зав. кафедрой),  
<sup>1</sup>Выборнова И.В. (н.с.), <sup>2</sup>Рауш Е.Р. (ассистент кафедр),  
<sup>1,2</sup>Богомолова Т.С. (зав. НИЛ, доцент кафедры)\*

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова: <sup>1</sup>НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, <sup>2</sup>кафедра медицинской микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2016

Определена чувствительность к флуконазолу 203 штаммов *Candida* spp., выделенных от больных инвазивным кандидозом, референтным методом серийных разведений в жидкой среде (CLSI M27-A3), а также двумя вариантами диско-диффузионного метода с использованием дисков компании BD (Becton, Dickinson and company, США) и ЗАО «Научно-исследовательский центр фармакотерапии» (НИЦФ). При сравнении полученных результатов установлено, что стандартный диско-диффузионный метод CLSI M44-A2 с применением дисков производства компании BD можно рекомендовать для рутинного применения в микробиологических лабораториях.

**Ключевые слова:** диско-диффузионный метод, инвазивный кандидоз, *Candida* spp., минимальная подавляющая концентрация, резистентность, серийные разведения, чувствительность *Candida* spp.

## SUSCEPTIBILITY TESTING OF INVASIVE CANDIDOSIS PATHOGENS TO FLUCONAZOLE USING DISKS FROM DIFFERENT COMPANIES

<sup>1,2</sup>Vasilyeva N.V. (director of the institute, head of the chair),  
<sup>1</sup>Vybornoova I.V. (scientific collaborator),  
<sup>2</sup>Raush E.R. (assistant of the chair), <sup>1</sup>Bogomolova T.S. (head of the laboratory, assistant professor)

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov: <sup>1</sup>Kashkin Research Institute of Medical Mycology;  
<sup>2</sup>Department of Medical Microbiology, St. Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2016

Susceptibility to fluconazole of 203 *Candida* spp. clinical isolates from patients with invasive candidosis was tested by three methods: reference broth microdilution method CLSI M27-A3, disk-diffusion method CLSI M44-A2 (fluconazole disks from BD, USA), and disk-diffusion method according to the instruction of the Scientific Research Center of Pharmacotherapy, St. Petersburg, Russia. Comparison of results showed that standard disk-diffusion method CLSI M44-A2 using BD fluconazole disks may be recommended for routine use in microbiological laboratories.

**Key words:** *Candida* spp., disc diffusion method, invasive candidosis, minimal inhibitory concentration, resistance, serial dilutions, susceptibility of *Candida* spp.

\* Контактное лицо: Богомолова Татьяна Сергеевна, тел.: (812) 510-62-69

## ВВЕДЕНИЕ

Согласно международным клиническим рекомендациям [1], определение *in vitro* чувствительности *Candida* spp. к антифунгальным препаратам необходимо проводить для всех возбудителей инвазивного кандидоза, а также при рецидивирующих и резистентных к стандартной терапии случаях поверхностного кандидоза. Референтными методами определения чувствительности *Candida* spp. являются методы серийных разведений в среде RPMI 1640 согласно протоколам CLSI M27-A3 [2], EUCAST EDef 7.3 [3] и Российским клиническим рекомендациям [4]. Однако эти методы сложны для применения в повседневной практике микробиологических лабораторий в связи с их трудоемкостью и значительной стоимостью расходных материалов.

Существует ряд коммерческих, в том числе автоматизированных, тест-систем для определения чувствительности дрожжей к антимикотикам (Sensititre YeastOne, Fungitest, Vitek 2 Compact и другие), однако наибольшую распространенность в практических лабораториях получил диско-диффузионный метод. Кроме стандартизованного метода (по протоколу CLSI M44-A2) [5], в России используют также другие варианты диско-диффузионного метода, в частности, по инструкции ЗАО «НИЦФ». Сведения о сопоставимости результатов, получаемых разными диско-диффузионными методами, включая ЗАО «НИЦФ», и референтными методами микроразведений ограничены. В то же время надежные данные о чувствительности возбудителей к противогрибковым препаратам имеют важное значение для проведения эффективной антифунгальной терапии больных кандидозом.

Согласно данным Глобального фонда по борьбе с грибковыми инфекциями (Global Action Fund for Fungal Infections, GAFFI), ежегодно инвазивный кандидоз (ИК) поражает более 750 000 человек и является причиной смерти более 350 000 человек в мире» [6]. В России заболеваемость кандидемией составляет 8,29 случаев на 100 000 населения [7]. По данным многоцентрового исследования, проведенного в период 2011-2015 гг. в 6 федеральных округах России с использованием референтного метода CLSI M27-A3, резистентность возбудителей ИК к флуконазолу составила 12%, в том числе изолятов *Candida albicans* – 2,3%, *non-albicans* видов *Candida* – 19% [8].

Цель работы – сопоставить результаты определения чувствительности к флуконазолу изолятов *Candida* spp., выделенных от больных ИК в России, полученных референтным методом CLSI M27-A3, с результатами определения диско-диффузионным методом CLSI M44-A2 (диски BD), а также с помощью дисков производства ЗАО «НИЦФ» в соответствии с прилагаемой инструкцией.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Исследуемые штаммы *Candida* spp.

Использовали 203 изолята *Candida* spp., выделенных из биоматериалов пациентов с ИК в рамках многоцентрового исследования в России (2011-2015 гг.): крови – 170 штаммов, перитонеальной жидкости – 16, содержимого абсцессов – 5, спинномозговой жидкости – 4, желчи – 3, биопатов – 2, плевральной жидкости – 2, дренажа – 1. Видовую идентификацию полученных

культур осуществляли методом MALDI-TOF масс-спектрометрии (Bruker, Германия).

Изоляты *Candida* spp. были представлены 12 видами: *C. albicans* – 76, *C. parapsilosis* – 53, *C. glabrata* – 23, *C. tropicalis* – 17, *C. guilliermondii* – 14, *C. krusei* – 13, *C. lusitanae* – 2, *C. pararugosa* – 2, *C. lipolytica* – 1, *C. kefyr* – 1, *C. dubliniensis* – 1.

#### Определение чувствительности *Candida* spp. к флуконазолу

##### Метод CLSI M27-A3

Для определения чувствительности к флуконазолу в качестве референтного метода использовали метод серийный микроразведений в жидких питательных средах в соответствии с международным стандартным протоколом CLSI M27-A3. Выполнение метода проводили с применением субстанции флуконазола, сухой питательной среды RPMI 1640 с 0,2% глюкозы без бикарбоната (Sigma-Aldrich, США) [2].

Субстанцию флуконазола растворяли в стерильной дистиллированной воде. Последующее разведение антимикотиков проводили в RPMI 1640, в 96-луночных U-образных планшетах в концентрациях от 128 до 0,03 мкг/мл. Для приготовления взвесей *Candida* spp. использовали суточные культуры, выращенные на агаре Сабуро в чашках Петри при +37 °С (+28 °С – для *C. lipolytica*). Затем колонии снимали с поверхности агара бактериологической петлей, суспендировали в пробирке с 0,85% стерильным раствором натрия хлорида до густоты рабочих взвесей 0,5 ЕД по Мак Фарланду. Готовые взвеси сначала разводили в 0,85% стерильном растворе натрия хлорида, затем в RPMI 1640 до концентрации  $0,5 \cdot 2,5 \cdot 10^3$  клеток/мл. В каждую лунку планшет вносили 0,1 мл рабочей взвеси. Для каждой культуры ставили следующие контроли: питательной среды (среда без культуры и антимикотика), культуры (питательная среда с культурой без антимикотика) и качества исследования с использованием референтного штамма *C. parapsilosis* ATCC 22019. Засеянные планшеты инкубировали при 35 °С в течение 24 часов. Определение минимальной подавляющей концентрации (МПК) осуществляли визуально по наличию ингибирования роста в сравнении с контролем роста не менее 50%. Оценку чувствительности 5 видов *Candida* к флуконазолу проводили согласно критериям интерпретации метода CLSI M27-S4 2012 года (табл. 1), для остальных видов *Candida* – в соответствии с CLSI M27-S3 (2008 г.) [9, 10].

Таблица 1.

Критерии интерпретации результатов метода CLSI M27-A3 к флуконазолу

Виды <i>Candida</i> spp.	МПК (мкг/мл)		
	Ч	УЧ	У
<i>C. albicans</i>	<2	4	>8
<i>C. glabrata</i>	-	<32	>64
<i>C. krusei</i>	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	<2	4	>8
<i>C. tropicalis</i>	<2	4	>8

Примечание: Ч – чувствительный, УЧ – умеренно-чувствительный, У – устойчивый

Критерии интерпретации в соответствии с CLSI M27-S3 (2008 г.): МПК чувствительных к флуконазолу штаммов <8 мкг/мл, умеренно-чувствительных – 16-32 мкг/мл, устойчивых >64 мкг/мл [10].

##### Диско-диффузионный метод CLSI M44-A2

Определение чувствительности к флуконазолу

методом CLSI M44-A2 проводили, используя бумажные диски диаметром 6 мм производства компании Becton-Dickinson, США (содержание препарата в диске 25 мкг). Для приготовления взвесей *Candida* spp. применяли суточные культуры, выращенные на агаре Сабуро в чашках Петри при +37 °С (+28 °С – для *C. lipolytica*). Затем колонии снимали с поверхности агара бактериологической петлей, суспендировали в пробирке с 0,85% стерильным раствором натрия хлорида до густоты рабочих взвесей 0,5 ЕД по Мак Фарланду, соответствующей  $1 \cdot 5 \cdot 10^6$  клеток/мл. Инокулюм распределяли по поверхности чашки с агаром Мюллера-Хинтона с добавлением 2% глюкозы и 0,5 мкг/мл метиленового синего одноразовым стерильным тампоном. Контроль качества исследования проводили с использованием референтного штамма *C. parapsilosis* ATCC 22019. Засеянные чашки с нанесенными дисками инкубировали при 35 °С в течение 18-24 часов [5]. Категорию чувствительности определяли с помощью микробиологического анализатора BIOMIC Vision (Giles Scientific, США) по зоне задержки роста. Критерии интерпретации приведены в таблице 2.

Таблица 2

Критерии интерпретации результатов метода CLSI M44-A2 к флуконазолу

Категория чувствительности	Диаметр, мм	МПК, мкг/мл
Чувствительный (Ч)	>19	<8
Умеренно-чувствительный (УЧ)	15-18	16-32
Устойчивый (У)	<14	>64

##### Диско-диффузионный метод ЗАО «НИЦФ»

Определение чувствительности к флуконазолу в соответствии с инструкцией ЗАО «НИЦФ» проводили на агаре Сабуро, используя бумажные диски диаметром 6 мм с содержанием препарата в диске 40 мкг. Для приготовления взвеси культуру *Candida* spp. выращивали в течение 1 суток на агаре Сабуро в чашках Петри при +37 °С (+28 °С – для *C. lipolytica*). Затем колонии снимали с поверхности агара бактериологической петлей, суспендировали в пробирке с изотоническим раствором натрия хлорида по оптическому стандарту мутности 5 ЕД. Затем готовую взвесь разводили изотоническим раствором хлорида натрия в 10 раз и равномерно распределяли по поверхности агаризованной среды Сабуро. Далее накладывали диск с флуконазолом и инкубировали в термостате при 25-27 °С в течение 40-48 часов. Категорию чувствительности определяли измерением диаметра зоны задержки роста. Критерии интерпретации результатов: Ч > 29 мм, УЧ – 20-28 мм, У <19 мм [11].

В таблицах 3 и 4 представлено сравнение характеристик диско-диффузионных методов определения чувствительности к флуконазолу.

Таблица 3

Сопоставление характеристик диско-диффузионных методов определения чувствительности к флуконазолу CLSI M44-A2 и ЗАО «НИЦФ»

Параметр	CLSI M-44A2, 2009	ЗАО «НИЦФ», СПб
Питательная среда	Агар Мюллера-Хинтон модифицированный	Агар Сабуро
Густота инокулюма	$1 \cdot 5 \cdot 10^6$ КОЕ/мл	$1,5 \cdot 10^5$ КОЕ/мл
Температура инкубации	35 °С	27 – 30 °С
Длительность инкубации	18-24 часа	24 - 48 часов
Содержание флуконазола в диске	25 мкг	40 мкг
Диаметр диска	6 мм	6 мм

Таблица 4

**Сопоставление критериев интерпретации результатов  
определения чувствительности к флуконазолу методами  
CLSI M44-A2 и ЗАО «НИЦФ»**

Категория чувствительности	Диаметр зоны задержки роста, мм	
	CLSI M44-A2	ЗАО «НИЦФ»
Чувствительный (Ч)	>19	> 29
Умеренно-чувствительный (УЧ)	15-18	20-28
Устойчивый (У)	< 14	<19

Полученные в процессе исследования результаты обрабатывали с помощью программной системы STATISTICA for Windows ver. 6.0. Критерием статистической достоверности получаемых данных считали величину  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты определения чувствительности изолятов *Candida* spp. к флуконазолу тремя методами – CLSI M27-A3, CLSI M44-A2 и по инструкции ЗАО «НИЦФ» приведены в таблице 5.

При сравнении результатов определения чувствительности к флуконазолу изолятов *Candida* spp. ( $n=203$ ), полученных двумя стандартными методами – CLSI M27-A3 и CLSI M44-A2 (диски BD), достоверных различий в распределениях штаммов по категориям чувствительности не выявили ( $p > 0,05$ ). В то же время распределение штаммов по категориям чувствительности, полученное при использовании метода ЗАО «НИЦФ», отличалось от полученного референтным методом CLSI M27-A3 по значительно меньшему числу чувствительных штаммов *C. albicans* ( $p=0,00001$ ).

При анализе результатов для каждого индивидуального штамма установлено, что для видов *C. albicans*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. pararugosa*, *C. lipolytica*, *C. kefyr*, *C. dubliniensis* не отмечали различий по категориям чувствительности при определении методами CLSI M27-A3 и CLSI M44-A2 (диски BD). Таким образом, совпадение полученных результатов составило 100%.

Выявлено несовпадение на 1 категорию чувствительности для 16 изолятов: *C. guilliermondii* – 8 штаммов, *C. tropicalis* – 3, *C. glabrata* – 3, *C. parapsilosis* – 2.

Таким образом, для всех изученных 203 штаммов *Candida* spp. совпадение результатов, полученных референтным методом CLSI M27-A3 и диско-диффузионным методом CLSI M44-A2 с использованием дисков BD, составило 92 % ( $p < 0,05$ ).

При сравнении результатов определения чувствительности, полученных по стандарту CLSI M27-A3 и по инструкции ЗАО «НИЦФ», было установлено, что

3 штамма редких видов (*C. kefyr* – 1, *C. pararugosa* – 2) не различались по категориям чувствительности. В то же время обнаружили различие результатов на 1 категорию чувствительности для 26 штаммов *C. albicans* и 37 штаммов не-*albicans* видов *Candida* (*C. glabrata* – 14, *C. parapsilosis* – 8, *C. guilliermondii* – 6, *C. tropicalis* – 6, *C. krusei* – 1, *C. lusitaniae* – 1, *C. dubliniensis* – 1). Также несовпадение результатов на 2 категории чувствительности было выявлено для 8 штаммов (*C. albicans* – 3, *C. parapsilosis* – 3, *C. lipolytica* – 1, *C. guilliermondii* – 1).

Таким образом, для всех изученных 203 штаммов *Candida* spp. совпадение результатов, полученных референтным методом CLSI M27-A3 и диско-диффузионным методом по методике ЗАО «НИЦФ», составило 65% ( $p < 0,05$ ).

В результате исследования было показано, что для штаммов *C. albicans* ( $n=76$ ) совпадение результатов, полученных методом CLSI M44-A2 (диски BD) и референтным методом CLSI M27-A3, составило 100 %, а методом ЗАО «НИЦФ» и референтным методом – 62% CLSI M27-A3 ( $p=0,00001$ ). Установлено, что метод CLSI M44-A2 (диски BD), по сравнению с методом ЗАО «НИЦФ», дает значительно меньше ошибок в определении чувствительности к флуконазолу для штаммов не-*albicans* видов *Candida* (12% и 34%, соответственно,  $p=0,0002$ ).

В последнее время зарубежные исследователи придают важное значение проблеме стандартизации дисков с антибиотиками, коммерчески выпускаемых различными фирмами для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST) провел сравнительное исследование активности 16 дисков с антибиотиками, выпускаемых 9 производителями. Установлено, что диски некоторых производителей не соответствуют критериям качества при определении чувствительности с использованием референтных штаммов микроорганизмов [12].

Отметим, что при использовании дисков с флуконазолом производства ЗАО «НИЦФ» мы получили различные категории чувствительности – Ч и УЧ для одного и того же референтного штамма *C. parapsilosis* ATCC 22019 (Рис. 1).

Таблица 5

**Распределение изолятов *Candida* spp. по категориям чувствительности к флуконазолу согласно протоколам  
CLSI M27-A3, CLSI M44-A2 и инструкции ЗАО «НИЦФ»**

Вид <i>Candida</i> spp. (n)	Категория чувствительности	CLSI M27-A3			CLSI M44-A2 (диски BD)			Диски ЗАО «НИЦФ»		
		Ч (n)	УЧ (n)	У (n)	Ч (n)	УЧ (n)	У (n)	Ч (n)	УЧ (n)	У (n)
<i>C. albicans</i> (76)		75	-	1	75	-	1	47	26	3
<i>C. parapsilosis</i> (53)		42	1	10	42	1	10	39	9	5
<i>C. glabrata</i> (23)		0	23	0	2	20	1	0	9	14
<i>C. tropicalis</i> (17)		15	1	1	14	2	1	11	5	1
<i>C. guilliermondii</i> (14)		10	2	2	2	9	3	4	6	4
<i>C. krusei</i> (13)		0	0	13	0	0	13	0	1	12
<i>C. lusitaniae</i> (2)		2	0	0	2	0	0	1	1	0
<i>C. pararugosa</i> (2)		2	0	0	2	0	0	2	0	0
<i>C. lipolytica</i> (1)		1	0	0	1	0	0	1	0	0
<i>C. kefyr</i> (1)		1	0	0	1	0	0	1	0	0
<i>C. dubliniensis</i> (1)		1	0	0	1	0	0	0	1	0
ИТОГО: 203		149	27	27	142	32	29	106	58	39

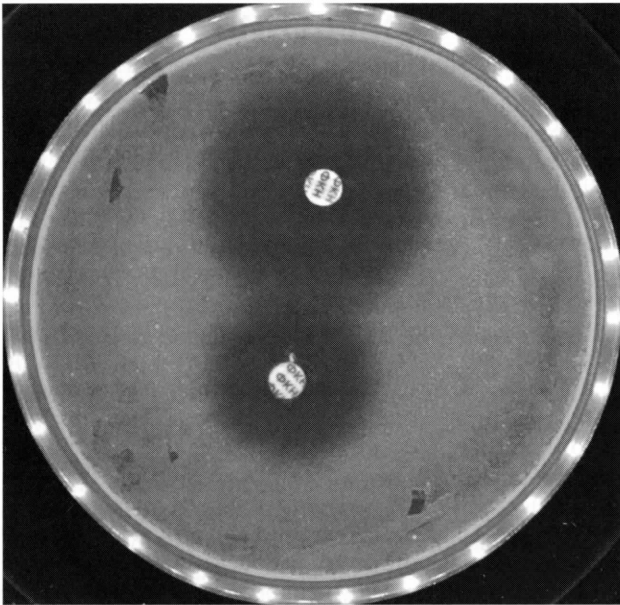


Рис. 1. Зоны подавления роста культуры *C. parapsilosis* ATCC 22019 на агаре Сабуро вокруг дисков с флуконазолом ЗАО «НИЦФ». Диаметр зоны сверху 32 мм (Ч), внизу – 23 мм (УЧ)

## ВЫВОДЫ

1. Определение чувствительности штаммов *Candida* spp. к флуконазолу согласно методике ЗАО «НИЦФ» приводит к большому количеству ошибочных результатов и не может быть рекомендовано для использования в практических микробиологических лабораториях.

2. Для рутинного определения чувствительности *Candida* spp. к флуконазолу предпочтительно использовать метод CLSI M44-A2 и стандартные диски, содержащие 25 мкг флуконазола (например, производства Becton-Dickinson).

## ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012// Clin. Microbiol. Infect. – 2012. – Vol. 18, Suppl. 7.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: third edition// CLSI document M27-A3. – CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.
3. Document E.DEF 7.3: Method for the determination of broth dilution of antifungal agents for fermentative yeasts; revised December, 2015
4. Клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам», февраль 2015 г. <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/clinical-recommendations/>
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved guideline // CLSI document M44-A2. – CLSI, Wayne, PA, USA, 2009. <http://www.gaffi.org/why/fungal-disease-frequency/>
6. Климко Н.Н., Козлова Я.И., Васильева Н.В. и др. Распространенность тяжелых и хронических микотических заболеваний в Российской Федерации по модели LIFE program// Проблемы медицинской микологии. – 2014. – Т. 16, №1. – С. 3-8.
7. Рауш Е.Р. Особенности возбудителей внутрибольничного инвазивного кандидоза: Автореф...дис. канд. мед. наук. – СПб.: СЗГМУ им.И.И.Мечникова, 2015. – 24 с.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: 4th edition// CLSI document 3rd Informational Supplement M27-S4. – CLSI, Wayne, PA, USA, 2012.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: third edition // CLSI document 3rd Informational Supplement M27-S3. – CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.
10. Инструкция по использованию дисков с противогрибными препаратами ЗАО «НИЦФ», 2015 г.
11. Kahlmeter G. Wide variation in activity of antibiotic discs from nine manufacturers// Clin. Microbiol. Infect. – 2016. – Vol. 22. – P. 211-212.

Поступила в редакцию журнала 22.04.2016

Рецензент: Н.Н. Климко

