

# СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *CANDIDA ALBICANS* К ПРЕПАРАТАМ ФЛУКОНАЗОЛА

**В. Новикова<sup>1</sup>,  
П. Зубов<sup>1</sup>,  
О. Старцева<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Пермская государственная фармацевтическая академия  
Минздрава России

<sup>2</sup>ООО «Лабораторные технологии», Пермь

**E-mail:** vvpperm@yandex.ru

*Изучена чувствительность клинических изолятов Candida albicans из отделяемого влагалища к наиболее часто применяемым антимикотическим препаратам флуконазола методом микроразведений. Полученные данные сопоставлены с данными применения диско-диффузионного метода.*

**Ключевые слова:** гинекология, кандидозный вульвовагинит, *Candida albicans*, антимикотики, флуконазол.

**К**андидозный вульвовагинит – типичная инфекционная патология женской половой сферы: у 75% женщин фиксируется по крайней мере 1 эпизод кандидозного поражения слизистой влагалища в течение жизни и почти у половины из них возникают повторные эпизоды [14, 17]. Более 90% случаев кандидозного вульвовагинита вызваны *Candida albicans* [7, 14].

К числу антимикотиков, наиболее часто используемых в терапии кандидозных вульвовагинитов, принадлежат препараты азолового ряда, в частности флуконазол. Выбор антимикотика определяется либо эмпирически, либо на основании стандартных методик оценки чувствительности клинических изолятов *Candida spp.* к противогрибковым препаратам. При этом целесообразно периодическое сопоставление данных использования рутинного диско-диффузионного метода с данными применения референтного метода микроразведений в жидкой питательной среде в конкретных лабораторных условиях. Метод серийных разведений в отличие от диско-диффузионного метода позволяет более детально описать профиль резистентности штаммов, провести сравнительный анализ эффективности противогрибковых препаратов, а также определить чувствительность грибов тогда, когда рутинные тесты могут быть неточными [6].

Целью исследования было изучить чувствительность клинических изолятов *C. albicans* из отделяемого влагалища к наиболее часто применяемым антимикотическим препаратам флуконазола методом микроразведений. Полученные данные сопоставлены с данными применения диско-диффузионного метода.

Исследованы устойчивые к флуконазолу 24 штамма *C. albicans*, выделенные от пациенток многопрофильных кли-

ник (поликлиники и стационары) Перми (биосубстрат – отделяемое влагалища). Для первичной оценки чувствительности выделенных штаммов грибов использовали диско-диффузионный метод – унифицированный, доступный и легко воспроизводимый. Описана хорошая корреляция с данными применения референтных методик (метод разведений) [10, 11]. Посевы осуществляли на агар Сабуро. Использовали диски производства компании ЗАО «НИЦФ» ДИ-ПЛС-50-01, содержащие 40 мкг флуконазола. Инокулированные чашки с дисками инкубировали при температуре  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  40–48 ч. Согласно инструкции производителя, чувствительным штамм считали при диаметре зон подавления  $>29$  мм, промежуточным-дозозависимым – при 20–28 мм и резистентным – при  $<19$  мм.

Углубленно изучали чувствительность резистентных штаммов к актуальным антимикотическим препаратам флуконазола – Микосисту (ОАО «Гедеон Рихтер», Будапешт, Венгрия), Флуконазолу (ЗАО «Вертекс», Санкт-Петербург, Россия), Флюкостату (ОАО «Фармстандарт-Лексредства», Курск, Россия), Дифлюкану (Pfizer, Франция).

Исследование проводили микрометодом двукратных серийных разведений в жидкой среде (в 96-луночных планшетах), рекомендованным [5, 9]. Чувствительность каждого

штамма определяли в 3 повторностях. Концентрация микробных клеток составила  $2-5 \cdot 10^4$  КОЕ/мл. В качестве положительного контроля использовали питательную среду без противогрибкового препарата с внесенной исследуемой культурой; качество среды контролировали, применяя референтные штаммы. В качестве отрицательного контроля использовали интактную питательную среду.

Планшеты 2 повторностей из 3 инкубировали в термостате при температуре  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Рост культур оценивали визуально на 20–24-й и 40–48-й ч инкубирования, в соответствии с [9]. За минимальную подавляющую концентрацию (МПК) препарата принимали его концентрацию в последней прозрачной лунке серии разведения.

Планшет 3-й повторности инкубировали в микропланшетном ридере DTX 880 (Beckman Coulter) при температуре  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  в течение 20–24 ч, определяя оптическую плотность каждой лунки при длине волны 595 нм каждый час. О наличии роста микроорганизма судили по изменению оптической плотности исследуемой лунки на более чем 15% по сравнению с таковой у лунок отрицательного контроля (рис. 1). За МПК принимали концентрацию исследуемого препарата в 1-й лунке ряда без признаков роста микроорганизма.

Пример изменения оптической плотности в лунках к 24-му часу инкубирования при определении чувствительности клинических изолятов к Дифлюкану представлен на рис.2.

Первичные результаты обрабатывали с использованием стандартных статистических методов, усредняя результаты 3 повторностей.

Грибы рода *Candida* являются основной этиологической причиной как тяжелых инвазивных микозов, так и большого числа поверхностных форм грибковой инфекции [8, 10, 12]. Наиболее типичная локализация патологического процесса, вызванного *Candida* spp., – слизистая оболочка половых трактов [4, 7, 8]. О высокой частоте выделения из половых путей представителей *Candida* spp. свидетельствуют данные многих исследований. Доминирующим видом традиционно является *C. albicans*: 76,1–88,4% случаев; виды *Candida* spp. не-*albicans* выделяют в 14–15,1% случаев [2–4, 7, 14, 15].

Широкое использование антимикотиков, нарушающих синтез ферментов гриба (основной механизм действия азоловых препаратов), существенно увеличивает риск развития резистентности клинических штаммов *Candida* spp. [10, 16]. В связи с этим данные о чувствительности к используемому антимикотику весьма важны для эффективного лечения пациента.

Данные о резистентности представителей *Candida* spp. и конкретно *C. albicans* к антимикотикам вообще и к флуконазолу, в частности, противоречивы. С одной стороны, исследователи подтверждают высокую эффективность флуконазола. Так, результаты 5-летнего проспективного исследования ARTEMIS DISK [3] свидетельствуют о высокой чувствительности клинических изолятов доминирующего вида *C. albicans* к флуконазолу (95,9% штаммов, вошедших в исследование, и 96,8% штаммов, выделенных из половых путей). В работе [15] также подтверждена высокая чувствительность *C. albicans* к данному препарату – 90% штаммов имеют  $\text{МПК} \leq 8$  мкг/мл, что по критериям CLSI свидетельствует об их чувствительности к флуконазолу [1]. Результаты масштабного изучения резистентности *C. albicans*, выделенных от пациенток с рецидивирующим вульвовагинальным кандидозом, к флуконазолу за период 2003–2013 гг. [2] также указывают на высокую эффективность препарата (чувствительны 98,8% штаммов).

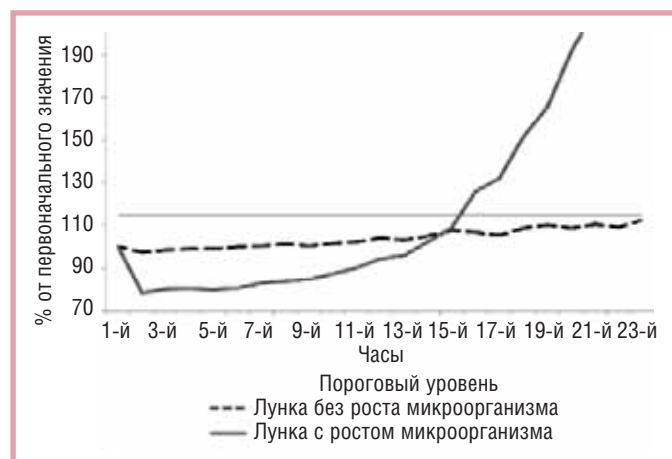


Рис. 1. Динамика роста микроорганизмов

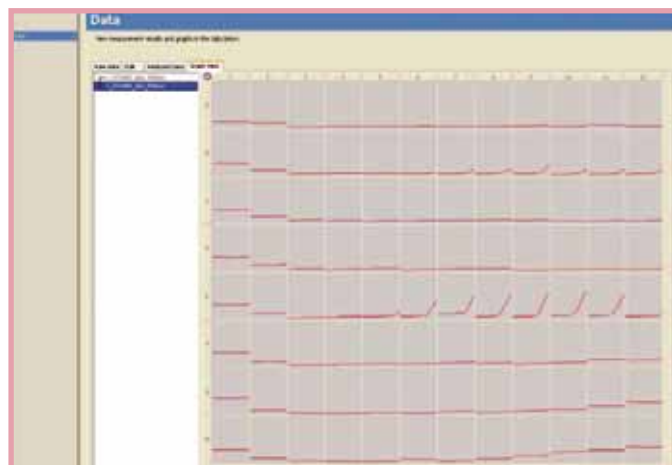


Рис. 2. Результат анализа чувствительности штаммов *C. albicans* к Дифлюкану в течение 24 ч инкубирования в 96-луночном планшете в приборе DTX-880

С другой стороны, все чаще появляются сообщения о снижении чувствительности *Candida spp.* к флуконазолу. Так, по данным [13], чувствительность к этому антимикотику снизилась на 17%. В работе [4] также подтверждено прогрессивное снижение чувствительности *C. albicans* к флуконазолу: количество чувствительных штаммов за 7-летний период наблюдения уменьшилось со 100 до 70,4%.

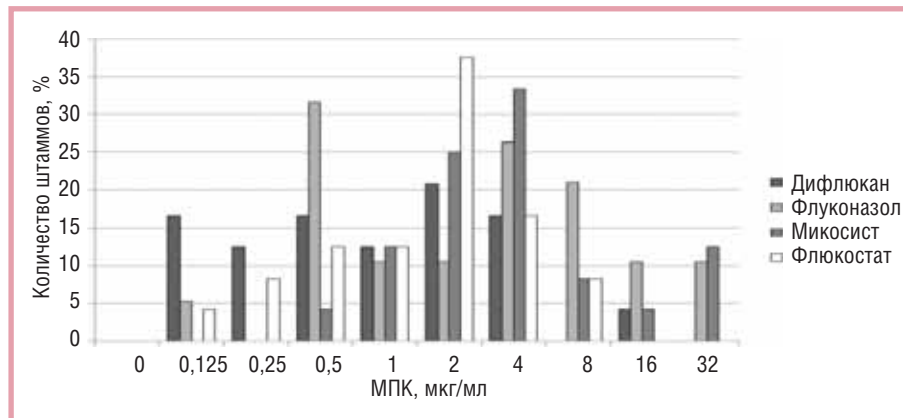


Рис. 3. Распределение штаммов *C. albicans* в зависимости от МПК препаратов флуконазола



Рис. 4. Чувствительность штаммов *C. albicans* к препаратам флуконазола

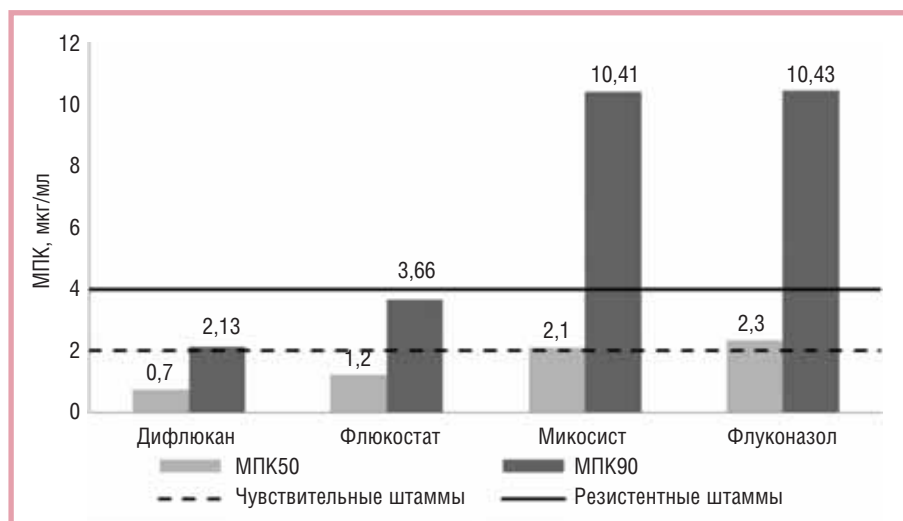


Рис. 5. МПК50 и МПК90 препаратов флуконазола в отношении изученных штаммов *C. albicans*

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о сохранении высокой чувствительности большинства изученных клинических изолятов *C. albicans* к препаратам флуконазола. Распределение штаммов в зависимости от МПК препаратов флуконазола представлено на рис. 3.

В соответствии с руководством EUCAST, для признания штамма *C. albicans* чувствительным к флуконазолу МПК этого препарата не должна превышать 2 мкг/мл; если МПК флуконазола >4 мкг/мл, штамм *C. albicans* считается резистентным [1]. Таким образом, чувствительными к Микосисту оказались 41,7% исследованных штаммов, к Флюкостату – 75,0%, к Дифлюкану – 79,8% (рис. 4).

Однако популяция чувствительных штаммов не является однородной. При этом важно их распределение по показателям МПК50 и МПК90 (рис. 5).

Наиболее активным препаратом флуконазола в отношении исследованных штаммов *C. albicans* оказался Дифлюкан.

Таким образом, выявлена тенденция к снижению чувствительности клинических изолятов *C. albicans*, выделенных при кандидозном вульвовагините, к препаратам флуконазола. Среди изученных препаратов по антимикотической активности лидирует Дифлюкан.

Подтверждена необходимость сопоставления данных применения диско-диффузионного метода с данными применения референтных методик для получения достоверных результатов, необходимых в клинической практике.

## Литература

1. Веселов А.В., Козлов Р.С. Инвазивный кандидоз: современные аспекты эпидемиологии, диагностики, терапии и профилактики у различных категорий пациентов // Клин. микробиол. и антимикроб. химиотер. – 2016; 18 (2, Прил. 2): 1–104.
2. Долго-Сабурова Ю.В., Мирзабалаева А.К., Клишко Н.Н. О проблеме резистентности возбудителей рецидивирующего вульвовагинального кандидоза // Гинекология. – 2014; 16 (1): 3–6.
3. Веселов А.В., Клишко Н.Н., Кречикова О.И. и др. *In vitro* активность флуконазола и вориконазола в отношении более 10000 штаммов дрожжей: результаты 5-летнего проспективного исследования ARTEMIS disk в России // Клин. микробиол. и антимикроб. химиотер. – 2008; 10 (4): 345–54.
4. Анкирская А.С., Муравьева В.В., Фурсова С.А. и др. Мониторинг видового состава и чувствительности к антимикотикам дрожжеподобных грибов, выделенных из влагалища женщин репродуктивного возраста // Клин. микробиол. и антимикроб. химиотер. – 2006; 8 (1): 87–95.
5. Определение чувствительности к микроорганизмам к антибактериальным препаратам: методические указания / МУК 4.2.1890-04. Утв. 04.03.2004.
6. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам: клинические рекомендации, 2015. URL: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/clinical-recommendations>.

7. Прилепская В.Н., Байрамова Г.Р. Вульвовагинальный кандидоз. Клиника, диагностика, принципы терапии / М., 2010; 72 с.

8. Климко Н.Н., Козлова Я.И., Васильева Н.В. и др. Распространенность тяжелых и хронических микотических заболеваний в Российской Федерации по модели LIFE program // Пробл. мед. микол. – 2014; 16 (1): 3–8.

9. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1 / М.: Гриф и К, 2012; 944 с.

10. Веселов А.В., Мултых И.Г., Клясова Г.А. и др. Эпидемиология возбудителей кандидозов и их чувствительность к азолам: результаты исследования ARTEMIS Disk в России // Клин. микробиол. и антимикроб. химиотер. – 2005; 7 (1): 68–76.

11. Bary A., Brown D. Fluconazole disk diffusion procedure for determining susceptibility of *Candida* species // J. Clin. Microbiol. – 1996; 34: 2154–7.

12. Cardo D., Horan T., Andrus M. et al. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. A report from the NNIS System // J. Infect. Control. – 2004; 32: 470–85.

13. Leroy O., Gangneux J.-P. et al. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: A multicenter, prospective, observational study in France (2005–2006) // Crit. Care Med. – 2009; 37: 1612–8.

14. Marchaim D., Lemanek L., Bheemreddy S. et al. Fluconazole-Resistant *Candida albicans* Vulvovaginitis // Obstet. Gynecol. – 2012; 120 (6): 1407–14.

15. Mohanty S., Xess I., Hasan F. et al. Prevalence & susceptibility to fluconazole of *Candida* species causing vulvovaginitis // Indian J. Med. Res. – 2007; 126: 216–9.

16. Peman J., Canton E., Espinel-Ingroff A. Antifungal drug resistance mechanisms // Exp. Rev. Anti-Infect. Ther. – 2009; 7 (4): 453–60.

17. Sobel J. Vulvovaginal candidosis // Lancet. – 2007; 369 (9577): 1961–71.

---

## COMPARATIVE ANALYSIS OF THE FLUCONAZOLE SUSCEPTIBILITY OF CLINICAL ISOLATES OF *CANDIDA ALBICANS*

V. Novikova<sup>1</sup>, P. Zubov<sup>1</sup>; O. Startseva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Perm State Pharmaceutical Academy, Ministry of Health of Russia

<sup>2</sup>ООО «Laboratory Technologies», Perm

*A microdilution method was used to investigate the susceptibility of the clinical isolates of *Candida albicans* from vaginal discharge to the commonly used antifungal medication fluconazole. The findings were compared with the data obtained when using the disk diffusion method.*

**Key words:** gynecology, vulvovaginal candidiasis, *Candida albicans*, antifungals, fluconazole.