

ВИДОВОЙ СОСТАВ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ПРОТИВОГРИБКОВЫМ ПРЕПАРАТАМ ШТАММОВ ДРОЖЖЕВЫХ ГРИБОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ БОЛЬНЫХ С КОИНФЕКЦИЕЙ ВИЧ/ТУБЕРКУЛЕЗ

А.Б. Кулько, Т.Л. Тарасенко

ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом
Департамента здравоохранения города Москвы»

ANALYSIS OF SPECIES COMPOSITION AND SUSCEPTIBILITY TO ANTIMYCOTICS OF YEAST, ISOLATED FROM PATIENTS WITH CO-INFECTION HIV/TB

A.B. Kulko, T.L. Tarasenko

Представлены собственные данные о видовом составе вероятных возбудителей бронхолегочных и диссеминированных микозов у больных с коинфекцией ВИЧ/туберкулез. Среди 48 штаммов дрожжевых грибов, выделенных из респираторного диагностического материала, ликвора, крови, мазков из зева, преобладали *C. albicans* (31,3%), *C. glabrata* (27,0%) и *C. tropicalis* (16,7%). У 40 штаммов дрожжевых грибов исследована активность эхинокандинов (анидулафунгин, каспофунгин, микафунгин), препаратов группы азолов (флуконазол, итраконазол, вориконазол, позаконазол, кетоконазол), амфотерицина В и флуцитозина (5-фторцитозина). Выявлены заметные отличия по диапазонам МПК антимикотических средств как для разных видов, так и для различных штаммов одного вида грибов. В целом наибольшей активностью в отношении клинических штаммов родов *Candida*, *Cryptococcus* и *Saccharomyces* обладали амфотерицин В и вориконазол.

Ключевые слова: условно-патогенные грибы родов *Candida*, *Cryptococcus* и *Saccharomyces*, чувствительность дрожжевых грибов к противогрибковым препаратам, ВИЧ-ассоциированные микозы

Введение

У больных с коинфекцией ВИЧ/туберкулез существенно возрастает риск развития оппортунистических микозов, представляющих серьезную проблему для данной группы пациентов фтизиатрических клиник. К обусловленным прогрессирующей ВИЧ-инфекцией и развитием СПИДа микозам относят кандидоз ротовой полости, ротоглотки и дыхательных путей, криптококкоз, диссеминированные формы гистоплазмоза и других особо опасных эндемичных микозов, пневмоцистную пневмонию (возбудитель пневмоцистоза – аскомицетовый гриб *Pneumocystis jirovesii* не растет в культуре) и некоторые другие редкие инфекционные заболевания [1, 2, 7, 8, 11]. Так, относящийся к ВИЧ-ассоциированным заболеваниям кандидоз полости рта встречается у трети боль-

The own results on specific structure of etiological agents of deep mycosis in HIV-infected tuberculosis patients are represented. In 48 yeast strains, isolated from respiratory tract sputum and BAL, spinal fluid, blood, throat swab, the most part consisted *C. albicans* (31,3%), *C. glabrata* (27,0%) and *C. tropicalis* (16,7%). 40 yeast strains were tested with echinocandin antifungal agents (anidulafungin, caspofungin, micafungin), azols (fluconazole, itraconazole, voriconazole, posaconazole, ketoconazole), amphotericin B and flucytosine (5-fluorocytosine). The difference in MIC diapasons was obtained both for yeast's species and for strains. In general, the most active drugs for species *Candida*, *Cryptococcus* and *Saccharomyces* are amphotericin B and voriconazole.

Key words: opportunistic fungi of genera *Candida*, *Cryptococcus* and *Saccharomyces*, antimycotic susceptibility of yeast fungi, HIV-associated mycosis

ных ВИЧ-инфекцией и более чем у 90% больных СПИДом [8]. В целом распространение вируса иммунодефицита человека и последующее развитие эпидемии СПИДа существенно расширило список болезнетворных для людей грибов-оппортунистов. Вследствие выраженного иммунодефицита у больных туберкулезом с ВИЧ-инфекцией и СПИДом вероятно развитие тяжелых системных и диссеминированных форм вторичной грибковой инфекции [1, 2, 8].

Цель исследования

Анализ видового состава и уровней чувствительности к противогрибковым препаратам штаммов дрожжевых грибов, выделенных при диагностике микозов различной локализации у больных с коинфекцией ВИЧ/туберкулез.

Материалы и методы исследования

Материалом для исследования послужили штаммы различных видов дрожжевых грибов, выделенные от больных с коинфекцией ВИЧ/туберкулез в Клинике № 2 МНПЦ борьбы с туберкулезом. Культуры грибов были обнаружены в посевах образцов ликвора, материалов, полученных при фибробронхоскопии (жидкость бронхоальвеолярного лаважа – БАЛЖ, бронхиальный смыв и др.), мокроты и отделяемого из зева.

Выделение микроорганизмов из крови пациентов осуществляли в модифицированной бульонной среде *Миддлбрук 7Н9*. Кровь забирали непосредственно во флаконы для культивирования *Мусо/F-Lytic* и инкубировали в приборе *Bactec 9050* (*Becton Dickinson*). После выявления роста содержимое флакона пересекали на питательные среды – кровяной агар, агар *Миддлбрук 7Н11* и агар *Сабуро*, что позволяло выявлять положительные гемокультуры, относящиеся к грибам и разным группам бактерий, включая микобактерии [5].

Для видовой идентификации штаммов дрожжевых грибов был использован комплекс общепринятых методик:

- хромогенные среды *CandiSelect 4*, *Bio-Rad* и *Brilliance Candida Agar*, *OXOID* (идентификация *C. albicans* и предварительная идентификация *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* и *C. tropicalis* по специфическому окрашиванию колоний и их морфологическим характеристикам);
- тест-системы для биохимических исследований *Auxacolor 2*, *Bio-Rad* и *ELIchrom FUNGI*, *ELITech MICROBIO* (окончательная видовая идентификация дрожжевых грибов, не относящихся к *C. Albicans*, система *ELIchrom FUNGI* содержит тест на уреазную активность, позволяющий дифференцировать базидиомицетовые и аскомицетовые дрожжи);
- макро- и микроморфологические признаки на агаризованных питательных средах (важные дополнительные характеристики);
- температурные границы роста (дополнительная характеристика) [4].

Определение чувствительности к антимикотикам ряда выделенных штаммов дрожжевых грибов проводили методом микроразведений в бульоне со средой *RPMI 1640* с определением минимальных подавляющих концентраций (МПК) в мкг/мл (система *Sensititre* – колориметрический тест *YeastOne*, *TREK Diagnostics Systems*). Список включенных в данное исследование противогрибковых препаратов и диапазон МПК для каждого из них представлен в таблице 1. Система *Sensititre* соответствует международным стандартам тестирования чувствительности дрожжевых грибов: Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI) [9] и Европейского комитета по определению чувствительности к противомикробным препаратам (EUCAST) [10]. Интерпретацию результатов тестирования чувствительности *in vitro*, т.е. отнесение штамма к категориям: чувствительный к препарату, чувствительный-

Таблица 1. Список противогрибковых препаратов и исследованные диапазоны их МПК

Препарат	Химическая группа	Диапазон МПК (мкг/мл)
Амфотерицин В	Полиены-макролиды	0,008–16
Флуцитозин	Производные пириимидина	0,03–64
Кетоконазол	Азолы (Имидазолы)	0,008–16
Флуконазол	Азолы (Триазолы I поколения)	0,12–256
Итраконазол	Азолы (Триазолы I поколения)	0,008–16
Вориконазол	Азолы (Триазолы II поколения)	0,008–16
Позаконазол	Азолы (Триазолы II поколения)	0,008–8
Анидулафунгин	Эхинокандины	0,015–8
Каспофунгин	Эхинокандины	0,008–16
Микафунгин	Эхинокандины	0,008–8

дозозависимый или устойчивый, проводили по имеющимся пороговым значениям МПК, установленным CLSI [9].

Результаты исследования и обсуждение

В общей сложности было выделено 48 штаммов дрожжевых грибов, большинство которых – 70,8% (34) – получено из респираторного диагностического материала (мокрота, БАЛЖ). Было идентифицировано восемь видов дрожжевых грибов, из которых наиболее часто выделяли *C. albicans* (15 штаммов – 31,3%), *C. glabrata* (13 штаммов – 27,0%) и, реже, *C. tropicalis* (8 штаммов – 16,7%) (табл. 2).

Дрожжевые грибы были высеяны из крови у двух пациентов, причем в обоих случаях фунгемия была обусловлена *Candida glabrata*. Небольшое число выделенных нами штаммов не позволяет сделать выводы об этиологии кандидемии при сочетании ВИЧ-инфекции и туберкулеза, однако многие отечественные и зарубежные авторы отмечают рост числа случаев диссеминированного кандидоза, вызванного *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* и другими *Candida spp.*, не относящимися к *C. albicans* [1, 2, 8].

Все четыре штамма дрожжевых грибов, выделенные из ликвора, были идентифицированы нами как *Cryptococcus neoformans*. Инкапсулированный грибок *Cryptococcus neoformans* способен вызывать тяжелые и диссеминированные формы криптококкоза у больных с клеточным иммунодефицитом, причем при СПИДе наиболее распространенной формой криптококкоза является криптококкоз центральной нервной системы [1, 2, 8].

Наибольшим разнообразием выделялись дрожжевые грибы, полученные из жидкости БАЛЖ (шесть видов) и мокроты (четыре вида). Доля штаммов главного возбудителя кандидоза *C. albicans* в пробах **БАЛЖ, мокроты и отделяемого из зева** составляла всего 32,4% (11 из 34 выделенных штаммов дрожжевых грибов). Отметим, что доля штаммов *C. albicans*,

Таблица 2. Видовой состав и число штаммов выделенных дрожжевых грибов

Вид дрожжевых грибов	Выделено штаммов (абс. число):					
	всего	в том числе из				
		крови	ликвора	жидкости БАЛ	мокроты	мазка из зева
<i>Candida albicans</i>	15	–	–	11	3	1
<i>Candida glabrata</i>	13	2	–	9	2	–
<i>Candida kefyr</i>	1	–	–	1	–	–
<i>Candida krusei</i>	5	–	–	5	–	–
<i>Candida rugosa</i>	1	–	–	–	1	–
<i>Candida tropicalis</i>	8	–	–	7	1	–
<i>Cryptococcus neoformans</i>	4	–	4	–	–	–
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	–	–	1	–	–
Всего	48	2	4	34	7	1

выделяемых из респираторного материала (БАЛ, мокрота), у ВИЧ-отрицательных больных туберкулезом легких, по нашим данным, превышает 60% [6].

Необходимо также указать на очень высокую долю выделенных от больных ВИЧ-инфекцией штаммов *C. glabrata* (27,0%), *C. tropicalis* (16,7%) и *C. krusei* (10,4%) (табл. 2), трех возбудителей кандидоза с высокими уровнями устойчивости к препаратам группы азолов [3, 4, 7, 11, 12].

Чувствительность к антимикотикам была исследована у 40 клинических штаммов дрожжевых грибов родов *Candida*, *Cryptococcus* и *Saccharomyces*, выделенных от больных с коинфекцией ВИЧ/туберкулез (табл. 3).

Установлено, что активность флуконазола в отношении различных видов возбудителей кандидоза имела заметные отличия по диапазонам МПК. В целом флуконазол проявлял высокую активность в отношении штаммов *C. albicans* и вариативную активность в отношении штаммов *C. glabrata* и *C. tropicalis*. Следует особо отметить, что грибок *C. krusei* обладает природной устойчивостью к флуконазолу, что подтвержда-

ют результаты наших собственных исследований (диапазон МИК – 32–64 мкг/мл).

Протестированные нами клинические штаммы *C. glabrata* отличала вариативная и в целом низкая чувствительность не только к флуконазолу, но и к другому широко распространенному азоловому препарату итраконазолу. Причем для двух выделенных из крови штаммов *C. glabrata* были характерны крайне высокие значения МПК сразу четырех системных препаратов группы азолов: флуконазол – 128 мкг/мл, итраконазол – более 16 мкг/мл, вориконазол – 2 и 4 мкг/мл, позаконазол – более 8 мкг/мл. Вместе с тем высокую активность в отношении всех протестированных штаммов *C. glabrata* проявляли препараты группы эхинокандинов (анидулафунгин, каспофунгин и микафунгин) и амфотерицин В.

В целом наибольшей активностью в отношении клинических штаммов родов *Candida*, *Cryptococcus* и *Saccharomyces* обладали амфотерицин В и вориконазол.

Все четыре протестированных штамма *Cryptococcus neoformans* обладали устойчивостью к анидулафунгину,

Таблица 3. Диапазоны минимальных подавляющих концентраций противогрибковых препаратов для штаммов дрожжевых грибов (n = 40)

Вид	Число штаммов (абс.)	Противогрибковый препарат, диапазон МПК в мкг/мл									
		Азолы					Эхинокандины			амфотерицин В	флуцитозин
		флуконазол	итраконазол	вориконазол	позаконазол	кетоконазол	анидулафунгин	каспофунгин	микафунгин		
<i>Candida albicans</i>	11	0,25 – 128	0,03 – 0,25	≤0,008 – 0,25	≤0,008 – 0,12	≤0,008 – 0,03	0,03 – 0,12	0,03 – 0,06	≤0,008 – 0,03	0,12 – 0,5	≤0,03 – 0,12
<i>Candida glabrata</i>	11	8 – 128	0,5 – >16	0,25 – 4	1 – >8	0,25 – 4	≤0,015 – 0,03	0,06 – 0,12	≤0,008 – 0,015	0,25 – 0,5	≤0,03
<i>Candida krusei</i>	4	32 – 64	0,12 – 0,25	0,06 – 0,25	0,12 – 0,25	0,12 – 0,25	0,03	0,06 – 0,25	0,12	0,12 – 0,5	2 – 8
<i>Candida rugosa</i>	1	8	0,12	0,06	1	0,06	≤0,015	0,03	0,015	≤0,12	≤0,06
<i>Candida tropicalis</i>	8	1 – 32	0,03 – 0,5	0,015 – 0,5	0,015 – 1	≤0,008 – 0,5	0,03 – 0,12	0,015 – 0,12	0,015 – 0,03	0,25 – 0,5	≤0,03 – >64
<i>Cryptococcus neoformans</i>	4	2 – 16	0,03 – 0,06	0,015 – 0,06	0,03 – 0,25	0,015 – 0,06	> 8	16	> 8	0,25 – 1	2 – 8
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	8	0,25	0,06	0,5	0,015	0,12	0,25	0,06	0,5	≤0,06

каспофунгину и микафунгину. Наличие у *Cryptococcus neoformans* мукополисахаридной капсулы и низкое содержание 1,3-β-D-глюкана в клеточной стенке определяют природную устойчивость возбудителя криптококкоза к эхинокандинам [1, 2]. Полученные нами данные подтверждают довольно высокую активность широко распространенных азоловых препаратов (флуконазол, итраконазол, вориконазол) и амфотерицина В в отношении *Cryptococcus neoformans*.

Закключение

При наличии в стационаре фтизиатрической клиники больных ВИЧ-инфекцией крайне важно проводить видовую идентификацию всех выделенных из диагностического материала штаммов грибов-оппортунистов, многие из которых могут обладать устойчивостью к различным широко распространенным системным противогрибковым препаратам.

С учетом вариабельной активности флуконазола и итраконазола в отношении клинических штаммов *Candida spp.*, а также вероятности развития у пациентов криптококкоза в алгоритм лабораторной диагностики вторичных микозов у больных ВИЧ-инфекцией следует включать определение лекарственной чувствительности штаммов дрожжевых грибов стандартизованным методом.

Как потенциально опасную ситуацию для ВИЧ-инфицированных пациентов следует оценивать крайне высокий уровень частоты обнаружения в респираторном материале штаммов *C. glabrata*, *C. krusei* и *C. tropicalis* – видов, в целом с низкой чувствительностью к азолам.

Высокий уровень активности анидулафунгина, каспофунгина и микафунгина в отношении штаммов *C. glabrata*, нередко устойчивых к флуконазолу и итраконазолу, предполагает использование эхинокандинов для эмпирической терапии кандидозов, вызванных данным возбудителем.

Литература

1. Атлас грибковых заболеваний / Под ред. К.А. Кауфмана, Д.Л. Манделла / пер. с англ. под ред. Ю.В. Сергеева. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 240 с.
2. Диагностика и лечение микозов / Под ред. Д. Р. Хоспентала, М. Дж. Риналди / пер. с англ. под ред. Ю.В. Сергеева. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 448 с.
3. Кулько А.Б. Исследование чувствительности к противогрибковым препаратам клинических штаммов *Candida krusei*, выделенных от больных туберкулезом легких // Антибиотики и химиотерапия. – 2008. – Т. 53. – № 11-12. – С. 22-24.
4. Кулько А.Б. Чувствительность к противогрибковым препаратам клинических штаммов грибов рода *Candida*, выделенных от больных туберкулезом легких // Туберкулез и социально значимые заболевания. – 2013. – № 2. – С. 35-38.
5. Макарова М.В., Краснова М.А., Алексеева Л.П. и соавт. Микробиологическое и молекулярно-генетическое обследование больных с сочетанной инфекцией – ВИЧ и туберкулез / Лабораторные исследования при туберкулезе / Под ред. В.И. Литвинова, А.М. Мороза. – М.: МНПЦБТ, 2013. – С. 239-244.
6. Маликов В.Е., Колупаев В.Е., Кулько А.Б. Стандартизация методов исследования в лабораторной диагностике кандидозов // Кремлевская медицина. Клинический вестник. – 2005. – № 1. – С. 44-48.
7. Саттон Д., Фотергилл А., Риналди М. Определитель патогенных и условно патогенных грибов: пер. с англ. – М.: Издательство Мир, 2001. – 468 с.
8. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Грибковые инфекции. Руководство для врачей. – М.: Изд-во Бином, 2008. – 480 с.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard / 3rd ed. – CLSI document M27-A3, 2008. – 40 p.
10. EUCAST Definitive Document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) // Clin. Microbiol. Infect. – 2008. – Vol. 14. – P. 398-405.
11. Hoog de G.S., Guarro J., Gene J., Figueras M.J. Atlas of clinical fungi. Electronic Version 3.1 – CBS: Reus, 2011. [Электронный ресурс] URL: <http://www.cbs.knaw.nl/index.php/atlas-of-clinical-fungi/272-atlas-of-clinical-fungi-usb>. (Дата обращения 25.06.2015).
12. Kulko A., Mitrokhin S. Species distribution and antimycotic susceptibility of *Candida* strains isolated from pulmonary tuberculosis patients // 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Copenhagen, Denmark. 2-5 April 2005. Abstracts. Clinical Microbiology and Infection. – 2005. – Vol. 11. – Suppl. 2. – P. 714-715.

Сведения об авторах

Кулько Александр Борисович – ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГКУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения г. Москвы», кандидат биологических наук

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10.

Тел. +7 (499) 268-70-33

e-mail: kulko-fungi@yandex.ru

Тарасенко Татьяна Львовна – врач-бактериолог КДЛ Клиники № 2 ГКУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения г. Москвы»

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Барболина, д. 3.

Тел. +7 (499) 268-25-91