

Постановка чутливості до дріжджеподібних грибів

Останні роки в усьому світі відмічається різке зростання стійкості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів (АБП), що негативно впливає на контроль над багатьма важливими хворобами.



**Роман
Михалко,**

директор
Українського Наукового
Інституту Сертифікації

Проблема антибіотико-резистентності мікроорганізмів визнана глобальною і в даний час однією зі стратегічних задач у всьому світі є стримування розвитку і розповсюдження антибіотико-резистентних мікроорганізмів. Тому проведення лабораторних досліджень з метою визначення чутливості мікроорганізмів — збудників інфекційних хвороб людини до АБП набуває все більш важливого значення.

Серед дріжджеподібних грибів, здатних спричиняти інфікування людини найбільш розповсюдженими є види родів *Candida*, *Coccidioides*, *Paracoccidioides*, *Blastomyces*, *Histoplasma*, *Sporothrix*, *Emmonsia*. Вони спричиняють ураження волосся, шкіри, слизових оболонок ротової порожнини та статевих органів, а в випадку пригнічення імунітету інфікують внутрішні органи, спричиняючи тяжкі розлади здоров'я та летальні випадки.



**Андрій
Чуєнко,**

к.б.н., начальник
випробувальної
лабораторії Українського
Наукового Інституту
Сертифікації

Дріжджеподібні гриби — гриби які можуть існувати як в міцеліальній, так і в дріжджовій формах. Зазвичай це спричиняється зміною температури, і ці мікроорганізми також описуються як термодиморфні гриби.

Наприклад, патогенний для людини гриб *Talaromyces marneffeii* при кімнатній температурі росте у вигляді міцелію а при температурі людського тіла — у вигляді дріжджів.

Для лікування інфекцій, викликаних дріжджеподібними грибами застосовують антифунгальні препарати у різних лікарських формах

(мазі, краплі, таблетки тощо). Антифунгальні засоби поділяють на групи залежно від хімічної структури, способу застосування (системний чи місцевий / зовнішній), джерела отримання, механізму дії тощо.

Антифунгальні засоби порушують життєдіяльність мікроскопічних грибів мікроміцетів, справляючи фунгіцидний чи фунгістатичний ефекти залежно від дози та механізму дії. Традиційно для антифунгальних засобів природного походження використовували термін «антибіотики» (гризани, полієни-макроліди, поліпептиди-кандини). Нині поділ за джерелом походження втратив актуальність, оскільки більшість природних антимікотиків отримують хімічним синтезом.

Механізм дії антифунгальних засобів полягає в пошкодженні клітинної оболонки, порушенні синтезу її компонентів (сфінголіпідів, ергостеролу, глюканів), інгібуванні синтезу нуклеїнових кислот, білка або порушенні поділу клітин.

За хімічною структурою антифунгальні засоби поділяють таким чином:

- полієни,
- азоли (похідні імідазолу, триазолу),
- аліламіни,
- тіокарбомати,
- морфоліни,
- похідні гідроксипіридону
- та препарати інших груп.

Для системного застосування рекомендовані:

- полієни (амфотерицин В, ліпідні форми амфотерицину В),
- похідні азолів (флуконазол, ітраконазол, кетоконазол, тербінафін),
- гризани (гризеофульвін), кандини (каспофунгін).

До місцевих антимікотиків належать:

- полієни (ністатин, леворин, амфотерицин В),
- похідні азолів (біфоназол, ізоконазол, кетоконазол, клотримазол та ін.),
- препарати інших груп (нафтифін, тербінафін, циклопірокс, аморфолін, хлорнітрофенол).

Основною проблемою використання протигрибних препаратів, як і інших антибіотиків, є поступова поява у грибів резистентності до них. Це означає, що з часом антимікотична дія препаратів знижується і пацієнт має отримувати більшу дозу ліків, які досить часто мають негативні побічні ефекти. Тому для якісного лікування мікозів мають бути рекомендовані препарати, що характеризуються високою фунгіцидною активністю при мінімальних концентраціях, а також пригнічувати широкий спектр патогенних дріжджеподібних грибів.

Мірою фунгіцидної активності антимікотика є його мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) — найменша концентрація речовини в поживному середовищі за якої ріст грибів не відбувається. Також використовують показник зони затримки росту — чим вона більша тим чутливішим є дріжджеподібний грибок до дії препарату.

Чутливість антигрибних препаратів рекомендовано визначати за стандартними методиками (метод двократних розведень, диско-дифузійний метод), відповідно до наказу МОЗ України №167 від 05.04.2007 р. «Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів».

Методи визначення чутливості мікроорганізмів

Методи серійних розведень

1. На першому етапі досліджень у пацієнта з ознаками грибкової інфекції відбирають зразки шляхом мазків, зіскобів, або прямого посіву на рідкі або агаризовані поживні середовища.
2. Наступним етапом є виділення чистої культури збудника та ідентифікація його до виду з допомогою класичних мікологічних методів у поєднанні з молекулярно-біологічними способами ідентифікації (різними видами ПЛР, методами секвенування геному, мас-спектроскопією MALDI-TOF та магнітним резонансом).
3. Далі згідно макрометоду визначення МІК готують ряд суспензій клітин гриба в рідкому живильному середовищі з додаванням антифунгального засобу в концентраціях починаючи від 1-2 до 0,125 мкг/см³ чи нижче.

ВАЖЛИВО!

Контролюють ріст грибів візуально. МІК визначається за найменшою концентрацією антимікотика, яка пригнічує видимий ріст мікроорганізму. Даний метод рекомендовано для визначення чутливості одиночних штамів.

Мікрометод

Для збільшення продуктивності застосовують мікрометод визначення МІК. Тестування проводиться в об'ємі 0,2 см³ і менше, що дозволяє значно скоротити кількість витратних матеріалів. Його перевагами є висока продуктивність і можливість тривалого зберігання заздалегідь приготованих планшет. Методика не має технічних відмінностей від макрометоду, але вимагає оснащення лабораторії багатоканальними піпетками, стерильними 96-лунковими планшетами з кришками для імунологічних досліджень (з плоским дном).

Після внесення робочих розчинів антимікотиків в лунки, запаянні в поліетилен планшети можуть зберігатися при температурі -60 °C і нижче до моменту використання. Перед проведенням дослідження планшети витримують до досягнення ними кімнатної температури, після чого їх інокують приготованою суспензією досліджуваного мікроорганізму.

ВАЖЛИВО!

Облік результатів проводять візуально або спектрофотометрично, порівнюючи ріст мікроорганізму в присутності антимікотика із ростом культури в лунці без антимікотика. За МІК приймають мінімальну концентрацію, що забезпечує повне пригнічення видимого росту досліджуваного штаму.

Визначення МІК партії штамів (до 30 клінічних штамів) рекомендують проводити на агаризованих поживних середовищах що містить послідовні подвійні розведення. При постановці методів серійних розведень в агарі обов'язково проводять контроль росту культури на чашці Петрі з поживним середовищем, яке не містить фунгіциду і чистоти культури. Кожне тестування штамів супроводжується внутрішнім контролем якості дослідження з використанням відповідних контрольних (референсних) штамів.

Методи серійних розведень є найточнішими і найінформативнішими, проте їх постановка в практичних лабораторіях пов'язана зі значними методичними труднощами: необхідність використання субстанцій антимікотиків з відомим рівнем активності, суворого дотримання режимів зберігання, ретельного виконання контролю якості поживних середовищ, трудомісткості приготування робочих розчинів антимікотиків.

Диско-дифузійний метод

Диско-дифузійний метод (ДДМ) заснований на здатності фунгіциду дифундувати з просочених ними паперових дисків в поживне середовище і пригнічувати ріст мікроорганізмів посіяних на поверхні агару. Для визначення чутливості ДДМ використовують поживні середовища такі ж, як і для методу розведень в агарі, а тому використовуються і ті ж методи контролю їх якості. На поверхню середовища стерильно наносять не більше 6 дисків з антимікотиком та поміщають їх у термостат. Через визначений проміжок часу проводять заміри зон затримки росту та роблять висновок щодо чутливості або резистентності досліджуваного штаму до антимікотичу шляхом порівняння отриманих даних з такими, що наведеними в довідниковій літературі.

Автоматичний метод

В останні роки активно використовують автоматичний метод визначення чутливості різних збудників інфекцій, в тому числі і дріжджеподібних грибів, до антибіотиків (антимікотиків). Для цього використовують автоматичні аналізатори типу VITEK 2. З використанням даного приладу можна протягом 18 годин визначити чутливість 50 видів дріжджеподібних грибів (27 видів роду *Candida*, 5 видів роду *Cryptococcus*, 2 видів роду *Geotrichum*, *Kloeckera* spp., *Kodamaea ohmeri*, 2 видів роду *Malassezia*, *Pichia farinosa*, 2 видів роду *Prototheca*, 2 видів *Rhodotorula*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Sporobolomyces salmonicolor*, *Stephanoascus ciferrii*, 3 видів *Trichosporon* та *Zygosaccharomyces bailii*).

Основними перевагами автоматичного методу є його швидкість та простота використання, можливість точно інтерпретувати отримані результати, здатність підключати міжнародні бази даних для обміну інформацією, можливість тестування чутливості до повного спектру антимікотиків. ■

ВАЖЛИВО!