

**А.М. Бондаренко**

## **ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ КРИПТОКОКІВ ДО АНТИМІКОТИКІВ – ОСНОВА ЕФЕКТИВНОСТІ ЛІКУВАННЯ КРИПТОКОКОВОГО МЕНІНГІТУ**

Центр діагностики та лікування інфекційних хвороб, м. Кривий Ріг



*Проведений аналіз можливості використання системних антимікотиків, які застосовують для лікування криптококового менінгіту. Докладно наведені дані про чутливість криптококів до застосовуваних антимікотиків. Описано фармакокінетику системних антимікотиків. Особливу увагу приділено можливості проникнення антимікотиків у ліквор і створення в ньому мінімальних пригнічуючих концентрацій для криптококів. Дані рекомендації з оптимізації застосування антимікотиків у терапії криптококового менінгіту з урахуванням фармакокінетики антимікотиків та чутливості до них криптококів. Обґрунтована необхідність динамічного визначення чутливості криптококів до антимікотиків у процесі терапії криптококового менінгіту. Проведений докладний аналіз можливості використання та ефективності існуючих методів визначення чутливості криптококів до антимікотиків. Розроблена та запропонована проста і доступна для практичного використання методика визначення чутливості криптококів до системних антимікотиків.*

**Ключові слова:** криптокок, менінгіт, чутливість до антимікотиків.

Відразу необхідно вказати, що дана робота призначена, у першу чергу, саме для клініцистів, які є головним і основним ядром, що керує діяльністю клінік. Широке й безконтрольне протягом більш ніж 70 років застосування антибіотиків у клінічній практиці і ветеринарії привело до зміни пріоритетів в етіологічній структурі інфекційних хвороб людини та тварин. На зміну бактерійним прийшли вірусні та грибкові інфекції, а в структурі бактерійних збудників переважними стали поліантибіотикорезистентні мікроорганізми. Підходить до кінця і ера використання антибіотиків. Сьогодні розробники антибіотиків фактично вже вичерпали можливості одержання нових препаратів і кардинальної модифікації їх груп, які використовувалися раніше. Зв'язане це з тим, що за десятки років ери антибіотиків людиною була зроблена масивна і широкомасштабна селекція мікроорганізмів, не просто резистентних до антибіотиків, а з формуванням у них ефективних різноспрямованих, постійно та неухильно еволюціонуючих систем захисту не тільки від уже існуючих антибіотиків, а і «працюючих» на далеку перспективу. Так, у мікроорганізмів на створений «сьогодні» або перспективний на «завтра» антибіотик ще «учора» формується резистентність. На жаль, у мікроорганізмів створюються не тільки системи захисту від антибіотиків. Поряд з ними в бактерій і грибів активно еволюціонують системи, що забезпечують високий рівень патогенності і вірулентності, а також у процесі «природної» еволюції, створеної антибіотиками, виникають нові, раніше не характерні та не існуючі фактори патогенності у конкретних видів мікроорганізмів. Не останню роль у цьому процесі відіграють відомі різноманітні природні механізми обміну генами між мікроорганізмами і не тільки в межах одного виду, широке поширення векторних генетичних технологій, а також глобальне використання генетично модифікованих організмів (ГМО), значну частину з яких становлять саме мікроорганізми.

Саме процеси генного обміну, природного та трансгенного переносу з формуванням фактично вже тотальної антибіотикорезистентності у більшості мікроорганізмів привели сьогодні до кардинальної зміни в етіологічній структурі, а також до істотної зміни «класичного» патогенезу та клінічної картини більшості інфекційних хвороб.

Яскравою ілюстрацією цього еволюційного процесу може бути криптококова інфекція. Ще 20 років тому криптококовий менінгіт спостерігався винятково в осіб з імунodefіцитом і був основною маркерною інфекцією у хворих вже власне зі СНІДом. У той час наявність криптококового менінгіту у хворого була достатньою для встановлення безпомилкового діагнозу СНІД, що було відбито в багатьох публікаціях, офіційних документах і в першу чергу в діагностичних протоколах. Пройшов час і ця форма криптококової інфекції почала з'являтися і в імунокomпетентних осіб. Спочатку це були одиничні випадки, але за останні роки їх стає усе більше. Багаторазові, динамічні лабораторні дослідження, виконані високочутливими тест-системами різних виробників і в різних лабораторіях, не виявляли у хворих із криптококовим менінгітом ні специфічних антитіл до ВІЛ, ні специфічної вірусної РНК. Ці дані неодноразово підтверджувалися і у нашій клініці. Підтвердження цьому можна знайти також і в недавніх публікаціях, що описують досить високий рівень криптококового менінгіту в імунокomпетентних осіб без ВІЛ/СНІДу [1-6].

Якщо для ВІЛ-інфікованих хворих проблема криптококової інфекції була відома давно, і вже давно був розроблений досить ефективний клінічний протокол лікування цієї інфекції, правда, з фактично довічною підтримуючою етіотропною терапією, то для імунокomпетентної групи пацієнтів такого національного протоколу дотепер не існує. Слід також зазначити, що дана форма криптококозу в імунокomпетентних осіб, як і у хворих з ВІЛ-інфекцією, має досить високий рівень смертності [1-6]. Виходячи із цього і наявних розроблених підходів до терапії криптококозу у хворих з ВІЛ/СНІД, у клінічній практиці для лікування імунокomпетентних пацієнтів із криптококовим менінгітом використовуються протоколи для лікування криптококозу у хворих на ВІЛ/СНІД. Сьогодні для лікування цього криптококового менінгіту використовують усього три основні антимікотики: *амфотерицин В* (у тому числі і його ліпід-асоційовані форми – ЛАФАВ); *флуцитозин* і *флуконазол*. Додатково використовуються – *ітраконазол* і *вориконазол*. Усі вони зареєстровані в нашій країні («Державний реєстр лікарських засобів України» МОЗ України <http://www.dr1z.kiev.ua>). Однак слід також особливо зазна-

чити, що із препаратів амфотерицину зареєстровано всього два комерційні препарати і обидва індійського виробництва. Це Амфотрет і фосфоліпідна емульсія амфотерицину В – Амфоліп. Також слід звернути увагу на той факт, що більш висока ефективність ЛАФАВ, порівняно зі звичайними формами антибіотика (дезоксихоломатом), для терапії менінгітів вірогідно не доведена. Крім цього, необхідно звернути увагу на інформацію, що наведена в офіційних інструкціях до Амфоліпу, в яких є досить цікаві та суперечливі дані [7, 8]. У цих інструкціях рекомендоване використання препарату для лікування криптококового менінгіту, але водночас зазначено, що амфоліп у лікворі не визначається і що чутливість більшості збудників (мінімальна концентрація інгібіції – МІК) до амфотерицину перебуває в межах 0,01-1 мг/мл (10-1000 мкг/мл), у той час як чутливим до амфотерицину можуть вважатися тільки ті штами криптококів, для яких МІК менше ніж 1 мкг/мл. Можливо, в офіційній інструкції з українського сайту має місце друкарська помилка і замість «мкг» написано «мг», але чітко зазначена відсутність препарату у лікворі! Таким чином, у нашому арсеналі препаратів амфотерицину залишається тільки один індійський препарат – Амфотрет. Для флуконазолу перелік зареєстрованих в Україні препаратів по кількісному складу значно ширше.

Згідно з регламентуючими протоколами та інструкціями до препаратів амфотерицину, в/в добова доза антибіотика у дорослого не повинна перевищувати 50 мг (0,5-0,7 мг/кг) [1-6, 9]. При такому дозуванні максимально можлива концентрація препарату в лікворі не перевищує 0,0125-0,05 мкг/мл! Середня ж МІК для чутливих до амфотерицину криптококів (МІК < 1 мкг/мл) коливається, за різними джерелами, від 0,06 до 1 мкг/мл і вкрай рідко буває на рівні нижче 0,1 мкг/мл! [1-4, 10-16]. Таким чином, у лікворі рівень амфотерицину фактично не досягає необхідної МІК для більшості циркулюючих штамів криптококів і може бути достатній тільки для вкрай чутливих до амфотерицину збудників, що фактично в реальності практично неможливо.

Згідно з тими ж інструкціями із застосування препарату, доза амфотерицину може бути підвищена до 1 мг/кг/добу або навіть до 1,5 мг/кг, але тільки через добу при тяжких інфекціях і у випадку резистентності збудника до амфотерицину. Але в тих же інструкціях зазначене, що оптимальна доза антибіотика сьогодні залишається ще невідомою і підбирається експериментальним шляхом, фактично на «страх і ризик» лікаря і пацієнта. Дійсно, добову дозу амфотерицину можна збільшувати, але вже після дози в 0,5 мг/кг/добу різко

## ПЕРЕДОВА СТАТТЯ

зростає токсичність препарату, а відповідно й ризик серйозних тяжких побічних ефектів, аж до летального результату. Крім цього, підвищення дози амфотерицину в 2 рази (до 1 мг/кг/добу), що фактично неможливо через його токсичність, підвищить концентрацію антибіотика в лікворі всього лише до 0,25 мкг/мл, що також є МІК тільки для невеликого числа штамів криптококів. Таким чином, при рекомендованій оптимальній дозі для дорослого 50 і навіть 80-100 мг/добу не вдається досягти в лікворі оптимальних величин МІК амфотерицину для криптококів.

Незважаючи на це, у всіх сучасних і вітчизняних, і закордонних протоколах амфотерицин є препаратом першої та навіть, можна сказати, екстреної лінії етіотропної терапії криптококового менінгіту [1-6]. Правда, необхідно відразу особливо відзначити, що в цих протоколах амфотерицин рекомендовано використовувати разом із флуцитозином. На сьогодні в Україні зареєстрований тільки один комерційний препарат флуцитозину для парентерального введення – Анкотил [17]. Слід зазначити, що, незважаючи на рекомендації про спільне застосування амфотерицину і флуцитозину, їх синергізм або адитивну дію відносно антигрибкової активності, ці препарати – хімічно несумісні, а також підсилюють токсичність один одного! Флуцитозин при зберіганні вище 25 °С може самостійно перетворюватися в цитостатик 5-фторурацил, а механізм антибактерійної дії препарату пов'язаний саме з його метаболічним перетворенням у зазначений цитостатик. Флуцитозин, на відміну від амфотерицину, добре проникає через гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ) у ліквор і досягає в ньому рівня близько 75 % від його концентрації в сироватці крові.

**Висновок очевидний:** використання амфотерицину В і його ліпід-асоційованих форм як препаратів першої лінії або препаратів вибору, згідно з діючим вітчизняним та сучасними закордонними протоколами з лікування криптококового менінгіту [1-6], враховуючи проникнення цих препаратів у ліквор у край низьких дозах, – робить обов'язковим (фактично за життєвими показаннями) визначення чутливості виділених від хворого криптококів, у першу чергу, до амфотерицину, а також до інших антимікотиків, що використовуються у лікуванні криптококозу.

Основними збудниками криптококозу є дріжджоподібні гриби з родини базидоміцетів – *Cryptococcus neoformans*, значно рідше – *C. gattii*, *C. albidus* і *C. laurentii*. *C. neoformans* має три серотипи (А – *C. neoformans* var. *grubii*, D – *C. neoformans* var. *neoformans* і гібридний AD). *C. gattii* має два серотипи (В і С). Найбільше часто зустрічаються 8 основних

генотипів криптококів – VNI і VNII (var. *grubii*, серотип А), VNIV (var. *neoformans*, серотип D), VNIII (серотип AD), VGI, VGII, VGIII та VGIV (*C. gattii*, серотипи В та С).

Необхідно привести дані про чутливість криптококів до основних антимікотиків, що використовуються в клінічній практиці та є перспективними.

Так, МІК для чутливих до **амфотерицину** і його **ліпід-асоційованих форм** криптококів, як правило, перебуває в інтервалі 0,0625-1 мкг/мл (середні показники 0,43-0,55 мкг/мл), а МІК-50 (пригніблення росту 50 % мікроорганізмів у чистій культурі криптококів) і МІК-90 (пригніблення росту 90 % мікроорганізмів у чистій культурі криптококів) відповідно становлять 0,5 і 1 мкг/мл, а резистентними вважаються штами, рівень чутливості яких до амфотерицину більше 1 мкг/мл. У даній ситуації необхідно відзначити, що МІК-50 і МІК-90 по суті є фунгістатичними, а не фунгіцидними, як МІК-100, концентраціями антимікробних препаратів. Необхідно також особливо вказати, що так звана «дозозалежна» чутливість для амфотерицину і його ЛАФАВ не визначається [18-22].

У відношенні **флуцитозину** чутливими до препарату вважаються штами криптококів, МІК препарату для яких становить  $\leq 4$  мкг/мл, а резистентними – з МІК  $\geq 32$  мкг/мл [18-23]. Для чутливих до флуцитозину криптококів його МІК, як правило, перебуває в інтервалі 0,125-8 мкг/мл (середні показники 1,4-1,67 мкг/мл), а МІК-50 і МІК-90 відповідно становлять 2 і 4 мкг/мл [18-23]. «Дозозалежна» чутливість для флуцитозину також не визначається, але може використовуватися так званий «проміжний» показник чутливості, що становить 8-16 мкг/мл [18-23].

МІК **флуконазолу** для чутливих штамів криптококів, як правило, перебуває в інтервалі 0,125-4 мкг/мл (середні показники 1,4-3,12 мкг/мл), а МІК-50 і МІК-90 відповідно становлять 1-4 і 4-8 мкг/мл [18-22]. Відносно чутливості криптококів до флуконазолу є чіткі градації: резистентними вважаються штами, що мають МІК  $\geq 64$  мкг/мл; чутливими – з МІК  $\leq 8$  мкг/мл; дозозалежними – що мають чутливість із МІК 16-32 мкг/мл [18-23].

Рівень чутливості МІК-90 криптококів до **кетоназолу** у більшості випадків перебуває в інтервалі 0,008-0,25 мкг/мл (у середньому 0,05 мкг/мл) [18-22]. Також слід вказати, що сьогодні не існує єдиної думки про те, який рівень МІК для криптококів дозволяє їх вважати чутливими або резистентними для даного препарату. Так, чутливими до кетоназолу вважають штами криптококів, для яких МІК-90 буде  $\leq 0,125$  або 0,25 мкг/мл, а резистентними – при МІК-

90 >0,125, >0,5 або  $\geq 1$  мкг/мл [18-22]. Використовуючи крайні показники інтервалів, можна прийняти те, що чутливими до кетоконазолу будуть штами криптококів, для яких рівень MIK-90 препарату буде  $\leq 0,125$ , а резистентними відповідно при MIK-90  $\geq 1$  мкг/мл.

MIK **ітраконазолу** для більшості штамів збудників криптококового менінгіту перебуває на рівні 0,03-4 мкг/мл, а MIK-90 – 0,25-0,5 мкг/мл [18-22]. В той же час чутливими до ітраконазолу вважаються штами криптококів, для яких MIK-90 препарату становить  $\leq 0,125$  мкг/мл, а резистентними при MIK  $\geq 1$  мкг/мл [18-22]. Стає очевидним, що для більшості штамів криптококів MIK-90 ітраконазолу перебуває в проміжному інтервалі між чутливістю та резистентністю, а отже в найкращому разі препарат може мати фунгістатичні властивості.

MIK-90 **вориконазолу** для більшості штамів криптококів перебуває в інтервалі 0,015-0,25 мкг/мл [18-20, 24-26]. Рівень MIK-90 **позаконазолу** для більшості штамів криптококів знаходиться в інтервалі 0,002-0,125 мкг/мл, становлячи в середньому 0,016 мкг/мл [18-20, 24-26]. MIK-90 **альбаконазолу** для криптококів перебуває в інтервалі від  $\leq 0,0012$  до 1,25 мкг/мл, становлячи в середньому 0,039-0,156 мкг/мл. Фунгіцидна концентрація альбаконазолу значно вище – 20 мкг/мл [18-20, 24-26]. **Ізавуконазол** має високу активність відносно збудників криптококозу. Його MIK-90 для більшості штамів криптококів знаходиться в інтервалі 0,002-0,063 мкг/мл, становлячи в середньому 0,016 мкг/мл [18-20, 24-26]. MIK-90 **равуконазолу** для більшості штамів криптококів перебуває в інтервалі 0,25-1 мкг/мл, причому існує пряма залежність MIK препарату від MIK флуконазолу. У випадку чутливості криптококів до флуконазолу (при його MIK-90  $\leq 8$  мкг/мл) MIK-90 равуконазолу для цих штамів становить близько 0,25 мкг/мл. При дозозалежній чутливості криптококів до флуконазолу (його MIK-90 в інтервалі 16-32 мкг/мл) MIK-90 равуконазола для цих штамів становить близько 1 мкг/мл, а при резистентності криптококів до флуконазолу (його MIK-90  $\geq 64$  мкг/мл) MIK-90 равуконазолу для цих штамів становить вже 4 мкг/мл [18-20, 24-26]. Таким чином, до цих азолів у збудників системних мікозів існує перехресна чутливість і резистентність, що, швидше за все, пов'язано з тим, що равуконазол є хоч і новим антимікотиком, але все-таки похідним флуконазолу.

Відносно нової групи антимікотиків **ехінокандинів** (каспофунгіну, мікафунгіну і анідулафангіну) необхідно особливо вказати, що незважаючи на їхню високу активність відносно більшості збудників системних

мікозів, **криптококи до ехінокандинів – резистентні!** [2, 15, 24-26].

У сучасних умовах якості антимікробних препаратів у нашій країні, незважаючи на контроль їх якості при державній реєстрації і періодичний її контроль за час періоду реєстрації, суттєво залежить від виробника, країни походження, ступеня очищення і реальної активності антимікробної речовини у комерційному фармакологічному препараті. Екстрена перевірка реальної активності антимікробних засобів у практиці клініциста сьогодні фактично неможлива, тому що сполучена з технічними труднощами самого лабораторного дослідження, з документальним оформленням необхідності такого дослідження, досить тривалим періодом його виконання і, найголовніше, його високою вартістю. Необхідно особливо відзначити, що офіційно такі дослідження можуть бути виконані тільки на базі державних лабораторій контролю якості лікарських засобів, які територіально розташовані у великих містах і обласних центрах країни, а також адміністративно перебувають у зовсім іншому секторі охорони здоров'я та не мають прямого зв'язку із клінічним сектором медицини. Така ситуація також значно утруднює та фактично унеможливорює оперативне визначення активності і якості антимікробних препаратів у практиці клініциста.

Таке положення робить насущною і життєво важливою необхідність, особливо для терапії хворих з тяжким перебігом мікробних інфекцій, визначення дійсної чутливості виділеного збудника до реального і конкретного фармакологічного антимікробного препарату, який застосовують або планують використовувати для етіотропного лікування. Такий підхід відразу вирішує дві основні проблеми – *дозволяє оцінити перспективну ефективність етіотропної терапії наявними в арсеналі клініциста антимікробними препаратами і максимально індивідуалізувати лікування хворого*. Такий індивідуальний підхід не тільки виправданий, але й обумовлений тим, що активність антибіотиків у лабораторних тест-системах для визначення мікробної чутливості (паперових дисках, Е-смужках, стандартах для методу серійних розведень та ін.) на практиці суттєво відрізняється від їх фармакологічних комерційних препаратів. Але в клініці використовуються не лабораторні стандарти антибіотиків, а саме їх фармакологічні препарати, що відрізняються від препаратів у стандартах активності чистотою, як правило, обов'язковою присутністю допоміжних речовин (стабілізаторів) і необхідністю використовувати спеціальні розчинники. Це суттєво відрізняє результат визначення чутливості мікроорганізмів за допомогою стандартів антибіотиків від

## ПЕРЕДОВА СТАТТЯ

реальної чутливості збудника до фармакологічних антимікробних препаратів, які використовуються у хворих. Особливе значення це має для тих антимікробних препаратів, які використовуються в низьких дозах через їх високу токсичність, що мають вкрай низьку, пов'язану з особливостями фармакокінетики, концентрацію в тканинах і рідинах макроорганізму, що найчастіше граничить із МІК для відповідних мікроорганізмів. Саме тому для цієї групи антимікробних препаратів надто важливе точне кількісне визначення МІК для збудника і саме до того комерційного фармакологічного препарату, який буде використовуватися для пацієнта.

Але тут виникає серйозна перешкода у вигляді відсутності відповідних вітчизняних протоколів, методичних рекомендацій і галузевих стандартів, що регламентують даний вид дослідження у хворих із криптококовим менінгітом.

Сьогодні для визначення чутливості мікроорганізмів до етіотропних препаратів існує 5 методів дослідження: 1 – *метод серійних розведень у бульйоні та агарі*; 2 – *диско-дифузійний метод*; 3 – *Е-тест*; 4 – *автоматизовані (рідше роботизовані) автоматичні системи (комплекси) детекції мікроорганізмів і їх чутливості до антимікробних препаратів* і 5 – *молекулярно-генетичний метод*. У кожного з них є свої переваги та недоліки. Якщо перші чотири методи фактично міцно взаємозалежні, то молекулярно-генетичний метод кардинально від них відрізняється. Він має вкрай високу точність, тому що за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) дозволяє виявити наявність резистентності в певного виду і навіть штаму мікроорганізмів у його генетичному апараті (кільцевій ДНК або плазмідах). Даний метод можна віднести до експрес-методів. Так, при використанні Real-time ПЛР ампліфікаторів або термоциклерів результат одержують через кілька годин. Метод ПЛР не вимагає навіть виділення чистої культури збудника і дозволяє одночасно детектувати конкретні мікроорганізми в біологічних субстратах, взятих від хворого, і виявляти наявність у них генів стійкості до різних антимікробних препаратів (можливо одночасно до декількох). Єдиним, але істотним недоліком такого методу є його «якісний» результат. Він не може нам дати даних про МІК конкретного антимікробного препарату для конкретного збудника інфекції. Так, ми одержуємо результат швидко, маємо високий рівень вірогідності наявності у конкретного збудника резистентності і навіть її виду до певного набору етіотропних препаратів, але не можемо визначити їх МІК. Однак найголовніший недолік методу полягає в тому, що за його допомогою ми не можемо визначити чут-

ливість мікроорганізмів до антимікробних засобів, а тим більше її кількісну характеристику у вигляді рівня МІК.

Близьким по апаратних засобах до цього методу є автоматизований комп'ютеризований спосіб детекції мікроорганізмів і визначення їх чутливості до етіотропних препаратів. На відміну від молекулярно-генетичного, принцип цього способу припускає вирощування збудника на живильних середовищах у мікроконтейнерах, що містять у тому числі й середовища з антимікробними препаратами в різних концентраціях. Облік результатів зчитує комп'ютер за допомогою оптичної системи й відповідного програмного забезпечення, у результаті чого ми одночасно ідентифікуємо мікроорганізм і одержуємо рівень його МІК для використовуваних у тесті антибактерійних препаратів.

Обидва методи дослідження мають високу чутливість і вірогідність, але головним недоліком, що фактично робить неможливим їх застосування у звичайній клініці, є необхідність використання висококваліфікованого персоналу, а також вкрай висока вартість апаратного забезпечення і видаткових матеріалів (відповідних праймерних тестів для ПЛР і мікропланшетів з живильними середовищами для автоматизованої системи).

Самим оптимальним вибором серед зазначених вище п'яти методів можна вважати Е-тест (повна назва «Epsilometer test», скорочено E-test), який був розроблений ще в 1988 році і випущений у клінічну практику через 3 роки виробником «AB Biodisk» [27]. На жаль, незважаючи на багаторічне існування, цей метод не знайшов широкого застосування у вітчизняній медицині. По суті, Е-тест не є чимось особливим. Це модифікований диско-дифузійний метод з інтегрованою в нього частиною методу серійних розведень. При використанні звичайних картонних дисків, у диск вводиться конкретна й головна кінцева кількість антимікробного препарату (наприклад, 10 мкг), який при нанесенні диска на агарове середовище буде в ньому дифундувати і створювати певні концентрації препарату, що прогресивно знижуються зі збільшенням відстані від диска (ступінь дифузії має дуже складну і багатофакторну залежність). В Е-тесті замість диска сьогодні нерідко використовується полімерна (добре сорбуюча) пластинка, на яку також наноситься антимікробний препарат і ця смужка також, як і диски, накладається на агар, в який дифундує препарат, що втримується у пластинці. Існує кілька технічних варіантів виконання Е-тесту – у вигляді «смужки», «гребінки» (гребінця), «зірки», що містять один або кілька антимікробних препаратів.

Головною відмінністю Е-тесту від «дискового» є те, що у пластинці цей препарат розподілений не рівномірно, як у диску, а його вміст на різних ділянках пластинки поступово зростає від нижньої частини, де втримується мінімальна кількість препарату, до верхньої частини, де його вміст максимальний (наприклад, від 0,1 до 300 мкг), внаслідок чого міняється і зона дифузії препарату. Якщо при дифузії з диска вона має форму рівномірного кола, то при дифузії зі смужки – це еліпс із максимальною концентрацією препарату у верхній частині і мінімальною в нижній частині смужки. Експериментальним шляхом, як і в диско-дифузійному методі, були визначені певні розміри зон затримки росту, відповідні до вмісту досліджуваного антимікробного препарату в мкг/мл у їх крайніх границях. Наприклад, через певний інтервал часу в 10 мм від диска вміст препарату в агаровому середовищі буде не нижче 20 мкг/мл, в 15 мм – 10 мкг/мл, 25 мм – 2 мкг/мл. Зі смужкою трохи складніше. Тому її градуюють, після реального визначення концентрації антибактерійного препарату в середовищі на границі із самою смужкою, вказуючи на смужці саме цю концентрацію. Таким чином, при використанні дисків по зоні затримки росту ми можемо визначити не тільки чутливість мікроорганізму, але й напівкількісно МІК антимікробного препарату, при використанні спеціальних таблиць [28]. Але в більшості випадків при використанні дисків за рівнем затримки росту досліджуваного збудника ми одержуємо якісний результат – «чутливий» або «стійкий» до антимікробного препарату, що втримується у диску. При використанні тест-смужок ми також одержуємо напівкількісний результат МІК препарату по смужці й вже по ньому оцінюємо, чи має досліджуваний мікроорганізм – «чутливість», «дозозалежну чутливість» або «резистентність» до препарату в смужці. На відміну від диска, смужка дає про МІК інформацію відразу – це закінчення еліпса зони затримки росту збудника, що границить із показником МІК, зазначеним на смужці.

При всій простоті, доступності і відносно невисокій вартості дифузійних методів, вони мають істотний недолік – досить широкий розкид даних МІК, враховуючи напівкількісний результат. Не варто віддаватися ілюзії і при використанні Е-тесту – дані його МІК також дуже варіабельні. Недоліком є також необхідність використання великого обсягу агар-утримуючих живильних середовищ, технічні складності при їх приготуванні (особливе значення має щільність живильного агару, із чим прямо зв'язана інтенсивність дифузії антимікробного препарату і можливість посіву на нього досліджуваного мікроорганізму), а отже

висока кінцева собівартість тестів. У даному зв'язку необхідно особливо вказати, що процес дифузії антимікробних препаратів в агарі вкрай складний, вкрай залежний від властивостей самих препаратів (розчинності, полярності, молярної маси та ін.), властивостей живильного середовища (щільності, хімічного складу, можливості формування хімічних або фізико-хімічних комплексів із досліджуваним препаратом та ін.), властивостей матеріалу диска або смужки, необхідності суворої стандартизації всіх етапів і компонентів дослідження, що реально виконати неможливо. Крім цього, різні виробники, наприклад дисків, можуть вносити в них різну кількість препарату, хоча вказують ті самі зони затримки росту для досліджуваних культур. Особливо очевидні ці відмінності між вітчизняними, російськими та закордонними виробниками дисків з антимікробними препаратами. Наприклад, вітчизняні та російські диски з амфотерицином містять його в дозі 40 мкг/диск, а закордонні всього 10 або 20 мкг/диск, а із флуконазолом – відповідно 40 і 10 або 25 мкг/диск?!

Таким чином, єдиним оптимальним, відносно недорогим, досить доступним, повторюваним, високоінформативним і вірогідним, хоч і «самим старим» методом вивчення чутливості мікроорганізмів до антимікробних препаратів залишається *метод серійних розведень*. Цей метод єдиний із зазначених вище, що дозволяє з мінімальною похибкою, а отже з високим ступенем вірогідності одержати повноцінні кількісні результати МІК-50, МІК-90 і МІК-100 досліджуваного антимікробного препарату для досліджуваного мікроорганізму.

Саме тому і саме цей метод є референтним (референс- або контрольним) методом, або стандартом, серед усіх п'яти зазначених вище методів. Як при діагностиці інфекцій «золотим стандартом» є «культуральний метод» (виділення чистої культури збудника), таким «золотим стандартом» при дослідженні чутливості мікроорганізмів до антибактерійних препаратів є метод серійних розведень, незважаючи на його «похилий вік» і деякі технічні складності. Сьогодні метод існує у двох технічних модифікаціях. «Старий» – макрометод (пробірковий) і «новий» – мікрометод (мікропланшетний або стриповий), що вимагає апаратного забезпечення у вигляді імуноферментного аналізатора (ІФА) або рідера. Принципові відмінності між модифікаціями – відсутні! У першій модифікації результат візуально враховує дослідник, у другій обліком займається рідер. Відразу необхідно вказати, що в цьому випадку ніякого імуноферментного аналізу не проводиться, а рідер використовується як звичайний спектрофотометр або

## ПЕРЕДОВА СТАТТЯ

ще простіше – фотоелектроколориметр. За допомогою цього приладу враховується всього лише наявність прозорості середовища (оптична щільність), а отже відсутність росту досліджуваної культури мікроорганізму (низька оптична щільність у лунці, приблизно рівна показникам для контролю середовища) або, навпаки, поява «помутніння» середовища, а отже наявність росту (висока оптична щільність, що наближається до щільності в лунці контролю росту культури мікроба). У цьому і є вся реальна різниця між модифікаціями методу. Мікрометод, у випадку якщо його освоїв персонал лабораторії – більш простий, економний, компактний, гнучкий і продуктивніший порівняно з макрометодом. Однак він менш наочний, вимагає апаратного забезпечення (ІФА-рідера, який вже майже став буденним), що навіть сьогодні не завжди доступно нашим клінікам, а також висококваліфікованого персоналу.

Необхідно також особливо вказати ще на деякі дуже істотні складності при застосуванні дифузійних методів і методів серійних розведень. Суть проблеми полягає в тому, що переважна більшість антимікотиків нерозчинні або практично не розчинні у воді! Отже, для введення їх у диски, смужки, а також у живильні середовища необхідно використовувати додаткові, найчастіше органічні розчинники (наприклад, диметилсульфоксид) або речовини, здатні створювати з антимікотиком хімічні водорозчинні комплекси (наприклад, ЛАФАВ). Найбільше гостро ця проблема стоїть при виконанні дифузійних методів, тому що через низький рівень розчинності або взагалі нерозчинності у воді ступінь дифузії досліджуваного антимікотика в живильний агар вкрай низький, а також вкрай залежний від фізико-хімічних властивостей середовища та носія антимікотика (диска або пластини). Тому ця проблема виливається в досить низький рівень повторюваності методу, а отже значне зниження його вірогідності, чутливості і специфічності.

Крім цього, слід особливо вказати, що якщо раніше лабораторіям клінік було дозволено для визначення чутливості мікроорганізмів самим створювати диски з антимікробними препаратами, то сьогодні існуюча нормативна база це фактично забороняє [28]. У пункті 3.3 методичних рекомендацій 9.9.5-143-2007 «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактерійних препаратів» (наказ МОЗ України №167 від 05/04/2007) дослівно сказано: «Виготовлення дисків з АБП для визначення чутливості диско-дифузійним методом у лабораторних умовах **не допускається**.» [28]. Дозволено використовувати диски промислового виробництва і тільки зареєстровані МОЗ Украї-

ни. З однієї сторони, це несе в собі ряд позитивних моментів. Промислові диски мають високий ступінь стандартизації – по «носієві» (матеріалу й розмірам диска) і по вмісту в диску антимікробного препарату. Також більшість сучасних виробників випускають ці диски в зручному контейнері (у вигляді «дозатора»), що дозволяє накладати диски на середовище в напівавтоматичному режимі. Але сьогодні доводиться стикатися з високою вартістю таких дисків і головне з відсутністю реєстрації такої продукції (у багатьох виробників така реєстрація просто закінчилася і вони не прагнуть перереєструвати свою продукцію). Таким чином, використання промислових дисків на сьогодні суттєво утруднене, а в багатьох випадках практично неможливе.

Тому сьогодні в реаліях нашої країни *єдиним оптимальним з наведених вище методів і їх модифікацій є тільки метод серійних розведень*, що є в той же час «золотим стандартом» у даній групі досліджень. Але в даній ситуації все ж таки необхідно сказати, що незважаючи на всі переваги наведених вище методів, найпростішим і доступним (і в плані виробництва, і у плані застосування) все ж таки залишається диско-дифузійний метод.

У зв'язку із ситуацією, що склалася, необхідно або терміново міняти нормативну базу, або створювати пріоритетні умови для виробників дифузійних тестів, або створювати власне виробництво, яке зможе повністю забезпечити потреби лабораторій країни. Але все ж простіше тимчасово дозволити лабораторіям створення дисків для своїх потреб, використовуючи стандартизовані і навіть методики згідно з ДСТ (державними стандартами, які вже давно існують ще з часів СРСР). Однак необхідно особливо відзначити, що, як було зазначено вище, стандарти вмісту антимікробних препаратів у дисках у нашій країні та за кордоном суттєво відрізняються. Так, наприклад, якщо вміст амфотерицину В у дисках згідно з вітчизняним стандартом регламентується на рівні 40 мкг, то у дисках європейських виробників вміст цього антибіотика значно нижче – 10 і 20 мкг, хоча оцінка чутливості (чутливий, дозозалежна чутливість або резистентний) і МІК по розміру зон затримки росту приблизно однакові у всіх виробників (при зоні затримки росту  $\geq 14$  мм штам мікроорганізму вважається чутливим до амфотерицину, а при зоні затримки росту  $< 14$  мм відповідно – резистентним) [18-20].

Зважаючи на те, що дана робота присвячена криптококовому менінгіту, а препаратом вибору і першої лінії етіотропної терапії є амфотерицин В, що практично не проникає в ліквор, вирішено було

самостійно створити диски з різним вмістом амфотерицину В та оцінити різницю між результатами тесту. У ролі досліджуваного штаму криптококів був обраний *C. neoformans*, чутливий до амфотерицину В, виділений від хворого на криптококовий менінгіт. МІК амфотерицину В для цього штаму становила 0,5 мкг/мл.

Матеріалом дисків служили «порожні» диски (без вмісту антимікробних препаратів) «Диски картонні для лабораторних тест-систем» (ТУ В ОП 1436150-001-95) вітчизняного виробника ТОВ «Аспект», що випускає диски з антимікробними препаратами для визначення чутливості мікроорганізмів. Зважаючи на те, що амфотерицин В практично не розчинний у воді, спочатку його розчиняли у диметилсульфоксиді, а потім із цього «маткового» розчину готували «водні» розчини (суспензії) амфотерицину В зі вмістом препарату в 10 мкл розчину, рівним кількості препарату, що вводилась у диск – від 0,15625 мкл/10 мкг до 200 мкл/10 мкл. Обсяг в 10 мкл був обраний дослідним шляхом при нанесенні різних обсягів дистильованої води на картонний диск із метою з'ясувати, який саме максимальний обсяг рідини без залишку пов-

ністю поглинеться паперовим диском. Таким обсягом виявилися 10 мкл. Тому в експерименті на «порожній» диск, накладений на живильний агар із чистою культурою криптококів, наносили по 10 мкл розчину антибіотика кожного з розведень амфотерицину В. На диск наносили дозу препарату, рівну його вмісту у внесеному обсязі, та одержували диски зі вмістом амфотерицину відповідно від 0,15625 до 200 мкг на диск: 200; 160; 80; 40; 20; 10; 5,0; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125 і 0,15625 мкг. В експерименті для активного росту криптококів готували відповідний живильний агар (середовище Сабуро з рН не нижче 6,0), на який «газоном» наносили відомий нам штам *C. neoformans*. Чашки із чистою культурою криптококів підсушували, а потім наносили на неї сухі чисті диски, на які відразу наносили по 10 мкл розчинів амфотерицину В у відповідних концентраціях, наведених вище. Далі чашки інкубували в термостаті при температурі 35 °С 70-74 години, після чого враховували результати тесту у вигляді виміру діаметра зон затримки росту культури криптококів навколо дисків з антибіотиком. Зведені дані, отримані в експерименті, наведено в таблиці 1.

Таблиця 1

Зведена таблиця чутливості культури криптококів до амфотерицину В

	Вміст амфотерицину В у диску (мкг)											
	200	160	80	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,156
Зона затримки росту, мм експеримент № 1	32	29	27	24	23	25	25	23	20	17	16	15
Зона затримки росту, мм експеримент № 2	24	23	22	18	17	17	16	16	15	13	12	11
Зона затримки росту, мм експеримент № 3	31	30	29	27	25	24	22	21	19	17	15	14
Зона затримки росту, мм експеримент № 4	27	24	25	22	20	19	19	17	16	15	13	13
Зона затримки росту, мм експеримент № 5	29	27	27	26	25	25	23	20	20	19	14	11
Середні показники, мм	28,6	26,6	26	23,4	22	22	21	19,4	18	16,2	14	12,8

Аналіз наведених у таблиці даних дозволив створити математичну модель, що описує (з імовірністю більше 93 %) залежність зони затримки росту досліджуваного штаму криптококів від вмісту в диску амфотерицину В:

$$ZD = 17,65 + 2,45 \cdot \ln V,$$

де: ZD – діаметр зони затримки росту криптококів у мм;

ln – натуральний логарифм;

V – вміст амфотерицину в диску у мкг

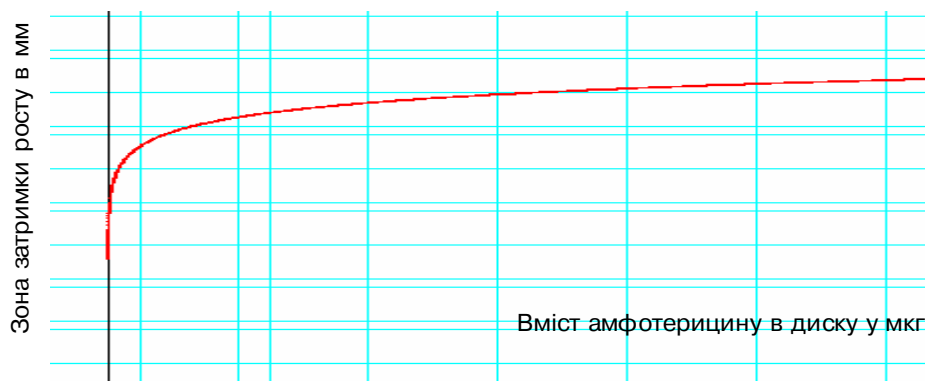
Графік цієї залежності наведено нижче на мал. 1.

Зважаючи на те, що на границі зони затримки росту даного штаму криптококів концентрація амфотерицину в живильному агарі рівна його МІК-100 (0,5 мкг/мл для даного штаму), наведена вище регресійна модель описує одночасно залежність від рівня вмісту амфотерицину В у диску і розмірів зони затримки росту досліджуваної культури *C. neoformans*, і відстані від диска, на якій концентрація антибіотика в агарі буде рівна зазначеній МІК-100 (0,5 мкг/мл).

Як видно з наведених даних та виходячи з оцінки результатів тесту, досліджуваний штам *C. neoformans*



## ПЕРЕДОВА СТАТТЯ



Мал. 1. Залежність зони затримки росту *C. neoformans* від вмісту в диску амфотерицину В.

дійсно виявився чутливим до амфотерицину В, так як при використанні дисків зі вмістом амфотерицину В 10, 20 і 40 мкг (згідно зі стандартами зазначених вище виробників дисків) розмір діаметра зони затримки росту у всіх випадках був більше 14 мм. У той же час у кожному з експериментів розмір зон затримки росту криптококів суттєво не відрізнявся при використанні цих дисків, незважаючи на те, що вміст антибіотика в них відрізнявся у 2-4 рази! Таким чином, виявилось, що фактично, починаючи з дози амфотерицину 10 мкг/диск, зона затримки росту мікроорганізмів суттєво не змінювалась зі збільшенням вмісту антибіотика в диску. Тому, виходячи з отриманих даних, на практиці дійсно можливе використання дисків з амфотерицином, починаючи з дози антибіотика в диску 5 і більш (10, 20, 40) мкг/диск, але все-таки необхідно в даній ситуації додержуватися вітчизняного стандарту (40 мкг/диск). Слід також вказати, що наведена вище залежність носить логарифмічний характер і показує те, що зі збільшенням навіть майже в 20 разів вмісту в диску амфотерицину (диск із 200 мкг порівняно з дисками з 10 мкг) зона затримки росту криптококів збільшується незначно (у середньому всього на 30 %). Це говорить про те, що дифузія амфотерицину в гелі (живильному агарі), навіть при його великому вмісті в диску, має невисокий рівень і відбувається швидко насичення гелю цим антибіотиком. Розкид величин зон затримки росту криптококів у п'ятьох експериментах, проведених з тим самим штамом збудника, тим самим препаратом, швидше за все, пов'язаний з розкидом параметрів живильного середовища, від властивостей якого дуже залежить процес дифузії речовин у гелі. Наведені експериментальні дані ілюструють те, що використання диско-дифузійної методики при самостійному внесенні в диски необхідної, регламентованої існуючим стандартом кількості

антимікробного препарату, технічно абсолютно доступно і легально, тому що практично не суперечить існуючій нормативній базі. Адже, по суті, використовувати в якості носія диски для внесення в них антимікробних препаратів не виготовляються самостійно в лабораторії з підручних матеріалів, вони промислового виробництва і відповідають всім необхідним стандартам, а також зареєстровані у відповідному державному реєстрі. На них тільки наноситься необхідна кількість антимікробного препарату, яка також регламентована вітчизняним стандартом. Тому наведена вище диско-дифузійна методика по всіх параметрах відповідає нормативній базі, що регламентує діяльність мікробіологічних відділів або лабораторій клінік, а отже може вільно використовуватися на практиці. Крім цього, існуюча нормативна база вимагає від клінік створення так званих «локальних (місцевих) протоколів», одним з яких може і повинен бути діагностичний протокол по диско-дифузійних методах дослідження.

На жаль, це фактично якісний тест, що не дозволяє визначити реальну МІК мікроорганізму до конкретного препарату. Але навіть у вітчизняних посібниках і регламентованих методиках по визначенню чутливості мікроорганізмів до антимікробних агентів існують відповідні таблиці інтервального перерахування залежності МІК від зони затримки росту [28]. В них існує три градації МІК – «чутливий», «помірно резистентний» і «резистентний» і відповідні їм інтервальні МІК, отримані дослідним шляхом за тестовими мікроорганізмами з відомими для них МІК. Слід особливо вказати, що в наведених вище нормативних методичних рекомендаціях дані про протигрибкові препарати, а також дані про методики визначення чутливості мікроскопічних грибів до антимікотиків відсутні!

У нашому випадку визначити інтервальні концентрації МІК також досить просто. Суть основного прин-

ципу дифузійних методів полягає в тому, що на межі росту досліджуваної культури мікроорганізму і властиво її зони затримки росту навколо диска з антимікробним препаратом і створюється в гелі (живильному агарі) саме МІК-90 або навіть МІК-100 препарату, що втримується в диску. Таким чином, використовуючи тестові культури з відомими для них МІК-90 і МІК-100, ми по їх зонах затримки росту навколо диска дослідним шляхом визначаємо залежність МІК від величини зони затримки росту. Фактично ми вивчаємо процес дифузії антимікробного препарату з диска в агар, з'ясовуючи залежність його концентрації від відстані віддалення від центру диска. Слід відразу особливо вказати, ця залежність не носить лінійного характеру, а описується показовою функцією ( $y=a^x$  при  $a>0$ ;  $a\neq 1$ )! [18-20]. Знаючи показники зон затримки росту і відповідні їм МІК, дуже просто одержати рівняння регресії (вірогідну математичну модель), що описує цю залежність, і вже по ній чітко знати або розраховувати – якому значенню зони затримки росту відповідає певний рівень МІК (або конкретна концентрація антимікробного препарату в агарі). Наприклад, для амфотерицину в де-

кількох дослідженнях були одержані такі рівняння для цього антимікотика з вмістом його у диску 10 і 20 мкг [18, 19]. Нижче наведені рівняння регресії, отримані авторами досліджень і уточнені нами, спираючись на дані їх публікацій.

$$MIK=2^{(4,81 - 0,296 \cdot ZD)} \quad MIK=e^{(3,096 - 0,1702 \cdot ZD)}$$

(вірогідність моделі 83,1 %) (вірогідність моделі 71 %) рівняння регресії, отримане дослідниками [18, 19]

$$MIK=e^{(7,30408-2,68112 \cdot \ln ZD)}=1486,35 \cdot ZD^{(-2,68112)}$$

(вірогідність моделі 93,1 %)

рівняння регресії, уточнене нами, де: МІК – мінімальна пригноблююча концентрація в мкг/мл;

ZD – діаметр зони затримки росту в мм.

Дослідниками була описана показова функція з підставою “2”, наше рівняння виявилось більш точним. Отримана та ж показова функція, але по підставі “e” (2,71828...) м з більш значимим ступенем вірогідності моделі, сягаючої 93,1 %. Графік функції отриманого уточненого рівняння регресії наведений нижче, на мал. 2.



Мал. 2. Графік рівняння регресії – залежності МІК від зони затримки росту.

Так, дійсно метод простий і доступний. Але чи він досконалий? Спеціально були проаналізовані інформаційні джерела, в яких приводяться дані дослідження чутливості дріжджоподібних грибів (кандид, криптококів та ін.) до амфотерицину В за допомогою диско-дифузійного методу з використанням стандартних дисків промислового виробництва різних виробників [18-20]. Виявилось, що не все так благополучно, як видається. Так, при використанні різних штамів мікроорганізмів, що мають різну чутливість до анти-

мікробного препарату, яка відрізняється в рази (наприклад, 0,125, 0,5, 1,0, 2,0 і навіть 8,0 мкг/мл), ці штами мали ту саму зону затримки росту! Крім цього, нерідко резистентні до амфотерицину криптококи, що мають МІК-90 2-8 мкг/мл (високий рівень резистентності), мали зону затримки росту менше 10 мм, що хибно свідчило, навпаки, про їх високу чутливість до амфотерицину! На щастя, рівень такої грубої помилки не виходив за межі 10 %, але це дуже високий рівень помилки, коли вирішується питання

## ПЕРЕДОВА СТАТТЯ

про життя пацієнта. У той же час рівень помилки тесту, коли реально чутливі до амфотерицину мікроскопічні гриби мали зону затримки росту більше 14 мм (відповідно оцінювані як резистентні до амфотерицину штами), насправді мали МІК амфотерицину менше 1 мкг/мл, тобто були чутливими до препарату. Рівень такої помилки становив вже 40-50 %! Відповідно в цьому випадку хворі втратили шанс на використання ефективного етіотропного препарату, який був замінений іншим антимікробним засобом. На щастя, така помилка не фатальна, але, проте, її рівень дуже високий!

У даній ситуації, зважаючи на те, що Е-тести є, по суті, таким же дифузійним методом, як дисковий метод, рівень помилок при оцінці результатів Е-тесту можна також очікувати на досить високому рівні.

Таким чином, як і було зазначено вище, найбільш оптимальним і точним методом визначення чутливості мікроорганізмів до антимікробних засобів залишається метод серійних розведень. Нижче наведена реально працююча практична методика визначення чутливості криптококів до антимікотиків на прикладі амфотерицину В. Цей макрометод розроблений на базі взятого за прототип «Стандарту визначення чутливості дріжджових грибів до антимікотиків мікроорганізмів – M27-A2, 2002 р.» (NCCLS. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Second Edition*. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) document M27-A2 (ISBN 1-56238-469-4). NCCLS, 940 Westvalley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2002) [23]. Цей стандарт розроблений у США Національним комітетом зі стандартів для клінічних лабораторій (NCCLS), що є по суті своєї діяльності міжнародним комітетом. Щоб уникнути плутанини, необхідно вказати, що сьогодні NCCLS перейменований у «Clinical and Laboratory Standards Institute» (CLSI, або «Інститут клінічних і лабораторних стандартів»), а розроблені стандарти можуть зараз позначатися, як CLSI/NCCLS [<http://clsi.org/about-clsi>]. Також слід указати, що на зміну стандарту M27-A2 прийшли нові стандарти M27-A3 у 2008 р. та M27-S4 у 2012 р. [29, 30].

В ролі досліджуваного штаму криптококів був обраний *C. neoformans*, в якого заздалегідь був визначений рівень МІК амфотерицину, рівний 8 мкг/мл, що відповідає високому рівню резистентності до препарату, тому що резистентними до амфотерицину В вважаються криптококи, для яких рівень МІК препарату  $\geq 1$  мкг/мл (а в нашому випадку 8 мкг/мл)! Опис повністю робочої методики докладно наведено нижче.

### Методика серійних розведень для визначення чутливості грибів *C. neoformans* (криптококів) до амфотерицину В

1. Готуємо «матковий» розчин. Беремо наважку амфотерицину В 4 мг і розчиняємо її у 2,5 мл (2500 мкл) диметилсульфоксиду (ДМСО або димексиду). Одержуємо вміст амфотерицину, рівний 1600 мкг в 1 мл.

2. Беремо стерильні! пробірки типу «Еппендорф» на 1 мл – 10 шт. і в кожную наливаємо по 500 мкл (0,5 мл) ДМСО. Всі пробірки маркіруємо по номерах від №1 до № 10.

3. Готуємо серію розведень амфотерицину в ДМСО. «Матковий» розчин маркіруємо як пробірку № М. Вміст амфотерицину в ній рівний 1600 мкг/1 мл (проб. № М). Далі у кожную послідовуючу пробірку відбираємо 500 мкл (0,5 мл) із попередньої, добре перемішуємо і одержуємо вміст амфотерицину 800 мкг/мл (№ 1), 400 мкг/мл (№ 2), 200 мкг/мл (№ 3), 100 мкг/мл (№ 4), 50 мкг/мл (№ 5), 25 мкг/мл (№ 6), 12,5 мкг/мл (№ 7), 6,25 мкг/мл (№ 8), 3,125 мкг/мл (№ 9), 1,56 мкг/мл (№ 10). Одержуємо первинні маткові розчини амфотерицину в ДМСО.

4. Готуємо серію розведень амфотерицину в живильному середовищі.

Беремо стерильні! пробірки на 10 мл – 13 шт. і в кожную наливаємо по 5 мл живильного середовища. Всі пробірки маркуємо за номерами від № 1 до № 13.

Розставляємо ці пробірки в ряд із пробірками з розведеним амфотерицином у ДМСО відповідно по номерах – № 1 із ДМСО напроти № 1 з живильним середовищем, № 2 напроти – № 2 і т.д. до пробірок № 11-12-13 (це будуть контролю).

У кожную пробірку з живильним середовищем вносимо по 50 мкл (0,05 мл) розчину з відповідного номера пробірки, що містить амфотерицин у ДМСО. Добре перемішуємо. Одержуємо 100-кратні розведення амфотерицину.

У пробірку № 11 додаємо 0,05 мл ДМСО – це буде «Контроль росту культури із ДМСО». У пробірку № 12 не додаємо нічого – це буде «Контроль росту культури без ДМСО» У пробірку № 13 не додаємо нічого – це буде «Контроль чистоти середовища».

5. Тепер вносимо в кожную пробірку № 1-12 по 0,1 мл досліджуваної маткової культури криптококів ( $10^6$ /мл). Добре перемішуємо і ставимо в термостат при 35 °C! на 70-74 години! У пробірку № 13 культуру не вносимо!

Кінцева концентрація криптококів не менше  $10^4$ /мл (10.000/мл)!!!

6. Облік росту культури проводять через 70-74 години!

Наведена вище методика повністю повторювана та відповідає міжнародним стандартам CLSI/NCCLS, а отже може бути на законних підставах використана в роботі мікробіологічних лабораторій, даючи хворим криптококовим менінгітом реальний шанс вижити й повернутися до повноцінного життя.

На початку статті я вже говорив, що вона призначена саме для клініцистів. Відповідальність за здоров'я й головне життя пацієнта, яке завжди перебуває в небезпеці при розвитку у пацієнта тяжких інфекційних захворювань, а особливо з ураженням ЦНС, лежить на клініцисті. Саме лікар, а не головний лікар, начмед або лікарі-лаборанти, несе цю юридичну, у тому числі й кримінальну відповідальність. Тому одним з основних завдань клініциста, благо для цього є нормативна база, є необхідність – повністю підкорити та змусити лабораторію працювати на лікаря і головне на пацієнта (у чому й полягає її головне завдання), а не дозволяти лабораторії перебувати в клініці в самостійному автономному режимі, установлюючи свої умови та правила роботи.

Слід особливо вказати, що при всій важливості і необхідності лабораторних досліджень для клінічної медицини, лабораторія не відіграє провідної ролі в клініці і винятково «існує для клініциста», а в жодному разі не навпаки. Однак сьогодні в умовах гнітючого підпорядкування діяльності клінік так званим «протоколам» («галузевим стандартам») і недостатнього фінансування багато лабораторій успішно нав'язують і диктують клініцистам свої умови, цілком «законно» відмовляючись від виконання життєво необхідних досліджень для хворих. Головним аргументом «відмов» у лаборантів є відсутність відповідних протоколів, що регламентують сьогодні їх діяльність. Це дуже зручна позиція для лабораторії, тому що дозволяє їй скоротити роботу до мінімуму або навіть відмовитися від необхідних для клініциста досліджень. Такий стан речей абсолютно неприйнятний, особливо в секторі бактеріологічних і вірусологічних лабораторій або відповідних відділів лабораторій у клінічному секторі медицини, який займається діагностикою та лікуванням інфекційних хвороб.

Як не банально звучить фраза – «кадри вирішують все», але вона виявляється актуальною практично завжди! Більшість співробітників у штаті клінічних лабораторій не є лікарями, а мають сугобо біологічну освіту, а в штаті бактеріологічних, вірусологічних і імунологічних відділів лабораторій – таких співробітників переважна більшість. Лаборанти-біологи, незважаючи на проходження незліченного числа курсів перепідготовки, підвищення кваліфікації і навіть первинної спеціалізації – не мають клінічного мислення,

а тому дуже далекі від хворого і власне клініциста. Саме із цієї причини між лабораторією та клініцистами нерідко виникає непереборна прірва нерозуміння і проблема федералізації лікувальної установи з вимогою автономії для лабораторії всередині клініки. І якщо при потуранні адміністрації клініки лабораторії все-таки вдається цього досягти, виникає автономна «держава в державі», яка живе «своїм життям» і яку знову, але на жаль, вже використовуючи «жорсткі» засоби, доводиться повертати в лоно лікарні. Якщо з «соратника» клініки лабораторія перетворюється в постійно опірною супротивника, рішення по такій лабораторії повинно бути прийняте негайно – невідкладна, але повноцінна зміна штату лабораторії із залученням висококваліфікованого персоналу, що розуміє своє місце в клінічній ієрархії.

У жодному разі не можна применшувати ні ролі лабораторії, ні ролі її персоналу, яка значна у забезпеченні якісної роботи клініки. Але в той же час робота лабораторії повинна бути повністю й цілком підпорядкована проблемам і потребам клініциста за принципом: *«лабораторія – для клініциста, а не клініцист – для лабораторії»*. Але це в жодному разі не тиранія клініциста над лабораторією. Тому вимоги до неї повинні бути об'єктивними і правочинними. Клініцист безпосередньо повинен сам розуміти, а тому повинен повноцінно пояснити лабораторії, що він конкретно від неї вимагає, і якщо лабораторія по якій-небудь причині, відмінній від реальних технічних обмежень (наприклад, апаратних або кадрових), відмовляється забезпечувати насущні запити клініциста, з нею необхідно вчиняти, використовуючи старий армійський принцип *«не можеш – навчимо, не прагнеш – змусимо»!*

Саме тому й була написана ця стаття, яка дає докладну інструкцію клініцисту, що базується на існуючій міжнародній і вітчизняній нормативній базі, як навчити (або примусово зобов'язати) лабораторію виконувати для клініциста вкрай важливий метод дослідження, від якого прямо залежить життя хворого із криптококовим ураженням ЦНС – кількісне (у вигляді МІК) і головне динамічне визначення чутливості криптококів до необхідних антимікотиків, яке по суті, є простим, недорогим, а головне високоінформативним і вірогідним методом, доступним для самої звичайної клінічної лабораторії, що має мікробіологічний відділ.

Залишається мало – ввести в офіційну нормативну базу МОЗ України, а саме в галузеві стандарти з діагностики і лікування криптококового менінгіту, обов'язкове визначення чутливості збудника до антимікотиків, які використовуються в етіотропній терапії, за допомогою наведених вище методик.

# ПЕРЕДОВА СТАТТЯ

## Література

1. Guidelines for Prevention and Treatment of Opportunistic Infections in HIV-infected Adults and Adolescents. Recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America, 20/11/2014: [Електронний ресурс] / Режим доступу: <http://aidsinfo.nih.gov/guidelines>, 12/12/2014
2. Essentials of Clinical Mycology / Ed.: C.A. Kauffman, P.G. Pappas, J.D. Sobel, W.E. Dismukes. – Second Edition. – New York: Springer Science+Business Media, 2011. – 533 p.
3. Clinical Mycology / Ed.: W.E. Dismukes, P.G. Pappas, J.D. Sodel. – New York: Oxford University Press, 2003. – 519 p.
4. Treatment of acute cryptococcal meningitis in HIV infected adults, with an emphasis on resource – limited settings (Review) / D. Sloan, S. Dlamini, N. Paul, M. Dedicoat / Cochrane HIV/AIDS Group // The Cochrane Library. – 2008, Issue 4. – 2008. – 41 p.: [Електронний ресурс] / Режим доступу: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD005647.pub2/pdf>, 12/12/2014
5. Наказ МОЗ України № 182 від 13.04.2007 «Про затвердження Клінічних протоколів», додаток «Клінічний протокол діагностики та лікування опортуністичних інфекцій і загальних симптомів у ВІЛ-інфікованих дорослих та підлітків»: [Електронний ресурс] / Режим доступу: [http://www.moz.gov.ua/ua/portal/dn\\_20070413\\_182.html](http://www.moz.gov.ua/ua/portal/dn_20070413_182.html), 10/12/2014
6. Проблема криптококової інфекції в сучасному світі / [В.М. Козько, А.В. Гаврилов, О.В. Загороднева та ін.] // Інфекційні хвороби. – 2012. – № 4. – С. 90-95.
7. Амфоліп (Ampholip). Інструкція: [Електронний ресурс] / Режим доступу: [http://www.vidal.ru/drugs/ampholip\\_23386](http://www.vidal.ru/drugs/ampholip_23386), 12/12/2014
8. Амфоліп (Ampholip). Інструкція для медичного застосування препарату: [Електронний ресурс] / Режим доступу: [http://www.drlz.kiev.ua/ibp/lz\\_www.nsf/id/D570C618CA591085C2257AA90065E4DD/\\$file/UA57040101\\_5AE3.mht](http://www.drlz.kiev.ua/ibp/lz_www.nsf/id/D570C618CA591085C2257AA90065E4DD/$file/UA57040101_5AE3.mht), 12/12/2014
9. Амфотрет (Amphotret). Інструкція для медичного застосування препарату: [Електронний ресурс] / Режим доступу: [http://www.drlz.kiev.ua/ibp/lz\\_www.nsf/id/36742B08EBE5B4D2C2257AA90065E686/\\$file/UA57050101\\_D709.mht](http://www.drlz.kiev.ua/ibp/lz_www.nsf/id/36742B08EBE5B4D2C2257AA90065E686/$file/UA57050101_D709.mht), 12/12/2014
10. Kethireddy S. CNS pharmacokinetics of antifungal agents / S. Kethireddy, D. Andes // Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. – 2007. – Vol. 3, N 4. – P. 571-583.
11. Arthur J. Amphotericin B Pharmacokinetics in Humans / J. Arthur, J.R. Atkinson, J.E. Bennet // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1978. – Vol. 13, N 2. – P. 271-276.
12. Pharmacokinetic Profile of ABELCET (Amphotericin B Lipid Complex Injection): Combined Experience from Phase I and Phase II Studies / [A. Adedoyin, J.F. Bernardo, C.E. Swenson et al.] // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1997. – Vol. 41, N 10. – P. 2201-2220.
13. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Amphotericin B Deoxycholate, Liposomal Amphotericin B, and Amphotericin B Lipid Complex In Vitro Model of Invasive Pulmonary Aspergillosis / [M. Lestner, S.J. Howard, J. Goodwin et al.] // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2010. – Vol. 54, N 8. – P. 3432-3441.
14. Monitoring and impact of fluconazole serum and cerebrospinal fluid concentration in HIV-associated cryptococcal meningitis – infected patients / [W. Manosuthi, P. Chetchotisakd, T.L. Nolen et al.] // HIV Medicine. – 2010. – N 11. – P. 276-281.
15. Gubbins P.O. Antifungal therapy / P.O. Gubbins, E.J. Anaissie // Clin. Mycology / Ed.: Anaissie E.J., McGinnis M.R., Pfaller M.A. – Second Edition. – Elsevier Inc., 2009. – Ch. 7. – P. 165-199.
16. Діагностика й лікування мікозів у відділеннях реанімації й інтенсивної терапії: Російські національні рекомендації / [А.Л. Левіт, Т.К. Луговкина, Ю.В. Лузганов і ін.]. – М.: ТОВ «Компанія БОРГЕС», ПК «БЛОК НОУТ», 2010. – 87 с.
17. Анкотил (Ancotil). Інструкція для медичного застосування препарату: [Електронний ресурс] / Режим доступу: [http://www.drlz.kiev.ua/ibp/lz\\_www.nsf/id/5C0444A43AFBB401C225788C0066053/\\$file/UA32670101\\_67A2.mht](http://www.drlz.kiev.ua/ibp/lz_www.nsf/id/5C0444A43AFBB401C225788C0066053/$file/UA32670101_67A2.mht), 12/12/2014
18. Espinel-Ingroff A. Comparison of Three Commercial Assays and a Modified Disk Diffusion Assay with Two Broth Microdilution Reference Assays for Testing Zygomycetes, Aspergillus spp., Candida spp., and Cryptococcus neoformans with Posaconazole and Amphotericin B / A. Espinel-Ingroff // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44, N 10. – P. 3616-3622.
19. Espinel-Ingroff A. Comparison of Neo-Sensitabs Tablet Diffusion Assay with CLSI Broth Microdilution M38 – Disk Diffusion Methods for Testing Susceptibility of Filamentous Fungi with Amphotericin B, Caspofungin, Itraconazole, Posaconazole and Voriconazole / A. Espinel-Ingroff, E. Canton // J. Clin. Microbiol. – 2008. – Vol. 46, N 5. – P. 1793-1803.
20. Multicenter Evaluation of a New Disk Agar Diffusion Method for Susceptibility Testing of Filamentous Fungi with Voriconazole, Posaconazole, Itraconazole, Amphotericin B and Caspofungin / [A. Espinel-Ingroff, B. Arthington-Skaggs, N. Iqbal et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2007. – Vol. 45, N 6. – P. 1811-1820.
21. Susceptibility Testing of Cryptococcus neoformans: a Microdilution Technique / [M.A. Ghannoum, A.S. Ibrahim, Y. Fu et al.] // J. Clin. Microbiology. – 1992. – Vol. 30, N 11. – P. 2881-2886.
22. Antifungal Susceptibilities of Cryptococcus neoformans / [L.K. Archibald, M.J. Tuohy, D.A. Wilson et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 2004. – Vol. 10, N 1. – P. 143-145.
23. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2002. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Second Edition // NCCLS document M27 – A2 USA. – 2002. – Vol. 22, N 15. – 51 p.: [Електронний ресурс] / Режим доступу: [http://www.rcpa.tv/parts/exams/microbiology/Model\\_Answers/Antifungal%20sens%20testing.pdf](http://www.rcpa.tv/parts/exams/microbiology/Model_Answers/Antifungal%20sens%20testing.pdf), 12/12/2014
24. In vitro susceptibility of Cryptococcus gattii clinical isolates / [A. Gomez-Lopez, O. Zaragoza, D.A.M. Martins et al.] // Clin. Microbiol. Infect. – 2008. – Vol. 14, N 7. – P. 727-730.
25. Веселов А.В. Нові системні антимікотики / А.В. Веселов // Антимікробні препарати. – 2007. – Т. 9, № 1. – С. 73-80.
26. Климко Н.Н. Нові препарати для лікування системних мікозів / Н.Н. Климко, А.В. Веселов // Клін. мікробіол. антимікроб. хіміотерапія. – 2003. – Т. 5, № 4. – С. 342-353.
27. Brown D.F. Evaluation of the E test, a novel method of quantifying antimicrobial activity / D.F. Brown, L. Brown // J. Antimicrob. Chemother. – 1991. – Vol. 27, N 2. – P. 185-190.
28. Наказ МОЗ України № 167 від 05.04.2007 «Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактерійних препаратів»: [Електронний ресурс] / Режим доступу: <http://mozdocs.kiev.ua/view.php?id=6958>, 12/12/2014, 12/12/2014
29. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Reference method for broth dilution antifungal

susceptibility testing of yeasts, 3rd ed. Approved standard M27 – A3. // CLSI document M 27 – A3 USA. – 2008. – Vol. 28, N 14. – 25 p. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.: [Електронний ресурс] / Режим доступу: [http:// http://clsi.org/standards/micro](http://http://clsi.org/standards/micro), 12/12/2014

30. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; 4th informational supplement // CLSI document M27 – S4 USA. – 2012. – Vol. 32, N 17. – 23 p. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.: [Електронний ресурс] / Режим доступу: [http:// http://clsi.org/standards/micro](http://http://clsi.org/standards/micro), 12/12/2014

## DETERMINATION OF CRYPTOCOCCI ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY – THE BASIS OF CRYPTOCOCCAL MENINGITIS TREATMENT EFFECTIVENESS

A.M. Bondarenko

**SUMMARY.** *In this article was analyzed the possibility of using systemic antimycotics for the treatment of cryptococcal meningitis. The article presents data on antifungal susceptibility of cryptococci to the used*

*antimycotics. Particular attention is paid to the possibility of penetration of antifungal agents in the cerebrospinal fluid and the possibility of creating in it minimum inhibitory concentrations of antimycotics for cryptococci. Recommendations on optimization of the use of antifungal agents in the treatment of cryptococcal meningitis with the obligatory account pharmacokinetics of antimycotics and sensitivity to them cryptococci are given. The necessity of dynamic Cryptococcus sensitivity to antimycotics determination in cryptococcal meningitis therapy was explained. A detailed analysis of the using and effectiveness of existing methods for determining the sensitivity of cryptococci was made. Was developed and proposed a simple and accessible method for practical using for the determining sensitivity of cryptococci to the systemic antifungal agents.*

**Key words:** cryptococcus, meningitis, antifungal susceptibility.

Отримано 21.11.2014 р.