

АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ К ПРОТИВОГРИБКОВЫМ ПРЕПАРАТАМ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ НОВЫХ ПРЕПАРАТОВ



*Кухар Е.В., д.б.н., и.о.профессора,
Байдуйсенова А.У., к.м.н., доцент*

АКТУАЛЬНОСТЬ



- Быстрое развитие устойчивых к антибиотикам бактерий приводит к росту числа инфекций, которые трудно поддаются лечению. В 2018 году в США и Европе от устойчивых инфекций умерло около 50000 человек.
- Резистентность к противогрибковым препаратам проявляется в отсутствии фунгистатического или фунгицидного действия антимикотика на возбудителя. Устойчивость к действию противогрибковых лекарственных препаратов первой линии обнаружена у всех основных возбудителей глубоких и поверхностных микозов человека, включая *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Cryptococcus* spp., *Trichophyton* spp.



ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЙ

- Целью работы является изучение резистентности возбудителей классических и оппортунистических микозов к антимикотикам.
- Работа выполнена в рамках АР19678812 «Использование генетических и биоинформационных методов для идентификации возбудителей зооантропонозных микозов промысловых и сельскохозяйственных животных, циркулирующих на территории Казахстана»



МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

- Определение чувствительности грибов к противогрибковым препаратам проводится методом диско-диффузионным методом отношении основных групп противогрибковых лекарственных средств – полиеновых (амфотерицин В и нистатин) и азоловых антимикотиков (клотримазол, флуконазол, кетоконазол, итраконазол) и фитопрепарата из Прострела желтеющего (*Pulsatilla flavescens* (Zussar.) Juz.) согласно инструкции по определению чувствительности микроорганизмов к противомикробным препаратам (EUCAST. Версия 8.0 2018).



СТАНДАРТНЫЕ ВЕЛИЧИНЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К ЭКСТРАКТАМ

Диаметр зоны отсутствия роста, мм	Степень чувствительности микроорганизмов (бактерий, микомицетов)
0-6	устойчивые
7-15	слабочувствительные
16-24	чувствительные
25 и более	высокочувствительные



РЕЗУЛЬТАТЫ

- При первичном выделении возбудителей дерматофитий из биологического материала были выделены
- дерматомицеты *Trichophyton spp.*, *Microsporum spp.* – 17,1%;
- мицелиальные грибы *Mucor spp.*, *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Alternaria spp.*, *Chaetomium spp.*, *Eurotium spp.*, *Phoma spp.*, *Trichoderma spp.*, *Lecanicillium psalliotae*, *Scopulariopsis brevicaulis* – 50,2%;
- дрожжи родов *Candida spp.*, *Rhodotorula spp.*, *Exophiala spp.* – 5,1%;
- рост отсутствовал/бактериальный рост – 27,6%.



ОСНОВНЫЕ ВОЗБУДИТЕЛИ ПЛЕСНЕВЫХ ОППОРТУНИСТИЧЕСКИХ МИКОЗОВ У ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ

- Наиболее часто встречающиеся: *Alternaria spp.*, *Aspergillus spp.*;
- у лошадей – *Alternaria spp.*, *Aspergillus spp.*, *Phoma spp.*;
- у крупного рогатого скота – *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Mucor spp.*
- Дрожжевые микозы у животных вызваны условно патогенными дрожжами *Candida spp.*, *Rhodotorula spp.*, *Exophiala spp.*

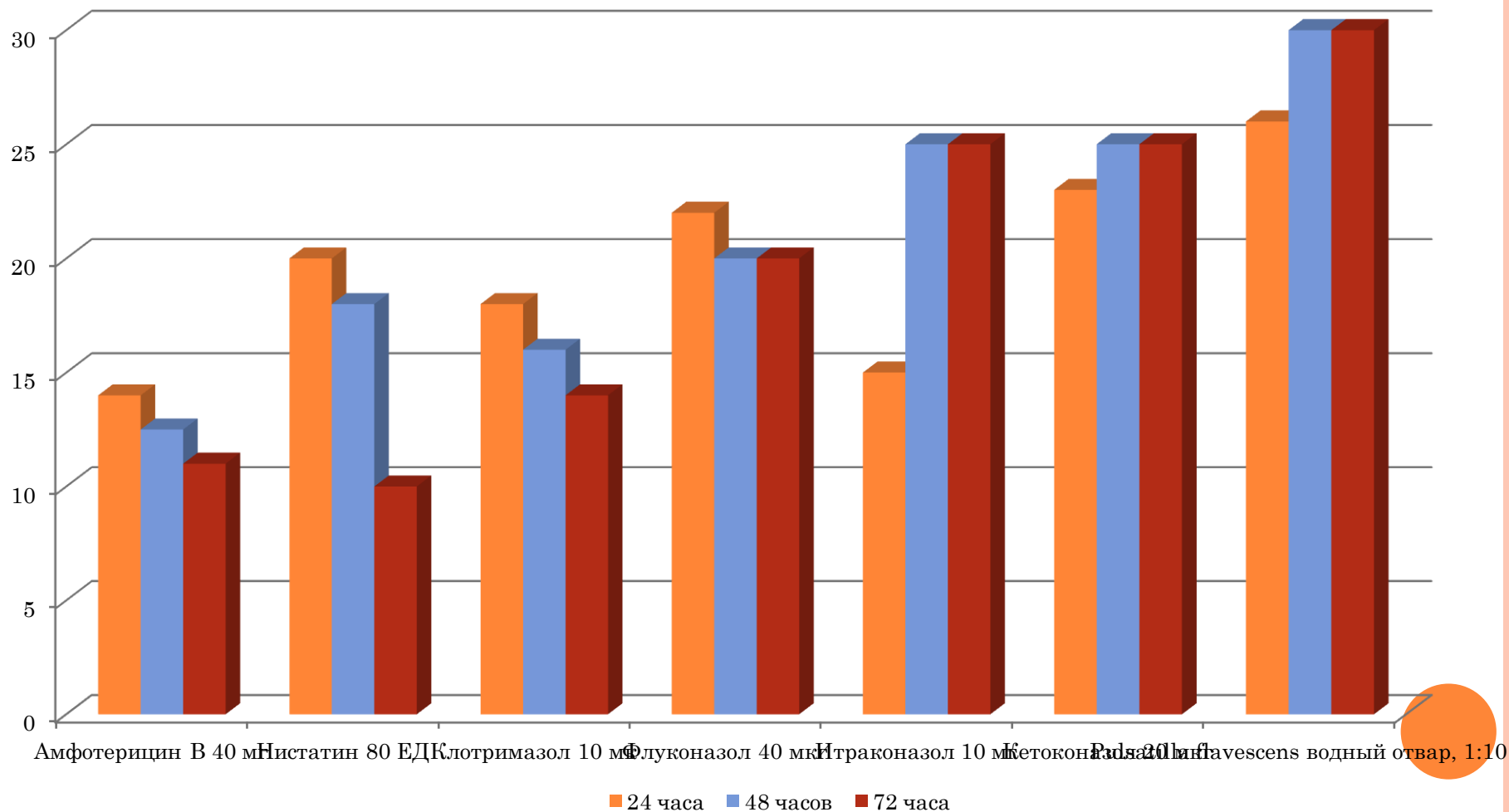


ОСНОВНЫЕ ВОЗБУДИТЕЛИ КЛАССИЧЕСКИХ И ПЛЕСНЕВЫХ ОППОРТУНИСТИЧЕСКИХ МИКОЗОВ У ПАЦИЕНТОВ ДЕРМАТОЛОГОВ

- Предварительный анализ биоматериала от людей позволил выделить классических возбудителей дерматомикозов в 40% случаев, плесневых амикозов – в 28%.
- Основными возбудителями плесневых оппортунистических микозов у человека были *Alternaria spp.*, *Aspergillus spp.*
- При этом *Alternaria spp.* выделена в 14% случаев, *Aspergillus spp.* – в 8%.



ДИНАМИКА ЗНАЧЕНИЙ ДИАМЕТРОВ ЗОН ЗАДЕРЖКИ РОСТА ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ГРИБА *C. PARAPSILOSIS* К ПРОТИВОГРИБКОВЫМ ПРЕПАРАТАМ



ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ *C. PARAPSILOSIS* К ПРОТИВОГРИБКОВЫМ ПРЕПАРАТАМ

Противогрибковые препараты в диске	Диаметр зон подавления роста культуры <i>C. parapsilosis</i> (мм)			
	устойчивые	промежуточно-чувствительные	чувствительные	высоко-чувствительные
Амфотерицин В 40 мг		14		
Нистатин 80 ЕД			20	
Клотримазол 10 мкг			18	
Флуконазол 40 мкг			22	
Итраконазол 10 мг		15		
Кетоконазол 20 мкг				25
<i>Pulsatilla flavescens</i> водный отвар, 1:10				25



АНАЛИЗ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ДРОЖЖЕЙ *C. PARAPSILOSIS* К ПРОТИВОГРИБКОВЫМ ПРЕПАРАТАМ

- Анализ чувствительности дрожжей *C. parapsilosis* к противогрибковым препаратам показал следующее:
- в первые сутки фунгицидный эффект достоверно оказывают Нистатин, Флуконазол и Кетоконазол;
- к третьим суткам активность Нистатина против *C. parapsilosis* резко снижается, равно, как и действие Амфотерицина, Клотримазола и Флуконазола. На этом фоне отчетливо проявилось действие Итраконазола и Кетоконазола, которое усиливалось по мере накопления антибиотика в агаре.
- Отсутствие резистентности штамма *C. parapsilosis* выявлено к фитопрепарату, он оказывал фунгистатические свойства на дрожжи.



РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К АНТИМИКОТИКАМ НОВОГО ВОЗБУДИТЕЛЯ ДЕРМАТОФИТИИ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

- *Trichophyton benhamiae* – зоофильный вид, передающийся человеку в основном от морских свинок и иногда от кроликов. Описаны редкие случаи заражения кошек новым представителем дерматомицетов *T. benhamiae* [3]. За последние 15 лет он был выявлен у животных в Японии, Европе, Соединенных Штатах. В течение последнего десятилетия *T. benhamiae* входил в состав перечня представителей комплекса *T. mentagrophytes* и носил название *Trichophyton* spp. или *Arthroderma benhamiae*. Затем, благодаря анализу последовательности ITS-rDNA регионе, *T. benhamiae* как самостоятельный вид был включен в новую предложенную таксономию дерматофитов.



ИЗОЛЯТЫ *T. BENHAMIAE* №19 и *T. BENHAMIAE* №20

- Результаты анализа показывают, что штамм *T. benhamiae* №19, протестированный против панели из пяти распространенных противогрибковых средств на разных питательных средах, на первые сутки оказался чувствительным ко всем фунгицидным препаратам, кроме амфотерицина. К исходу третьих суток штамм по-прежнему был высоко чувствителен к клотримазолу. В то же время наблюдалось наличие слабой фунгистатической активности других противогрибковых препаратов на среде Сабуро, практически отсутствующее на агаре АГВ



РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ПРОТИВОГРИБКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ ШТАММА *T. VENHAMIAE* №19



24 часа

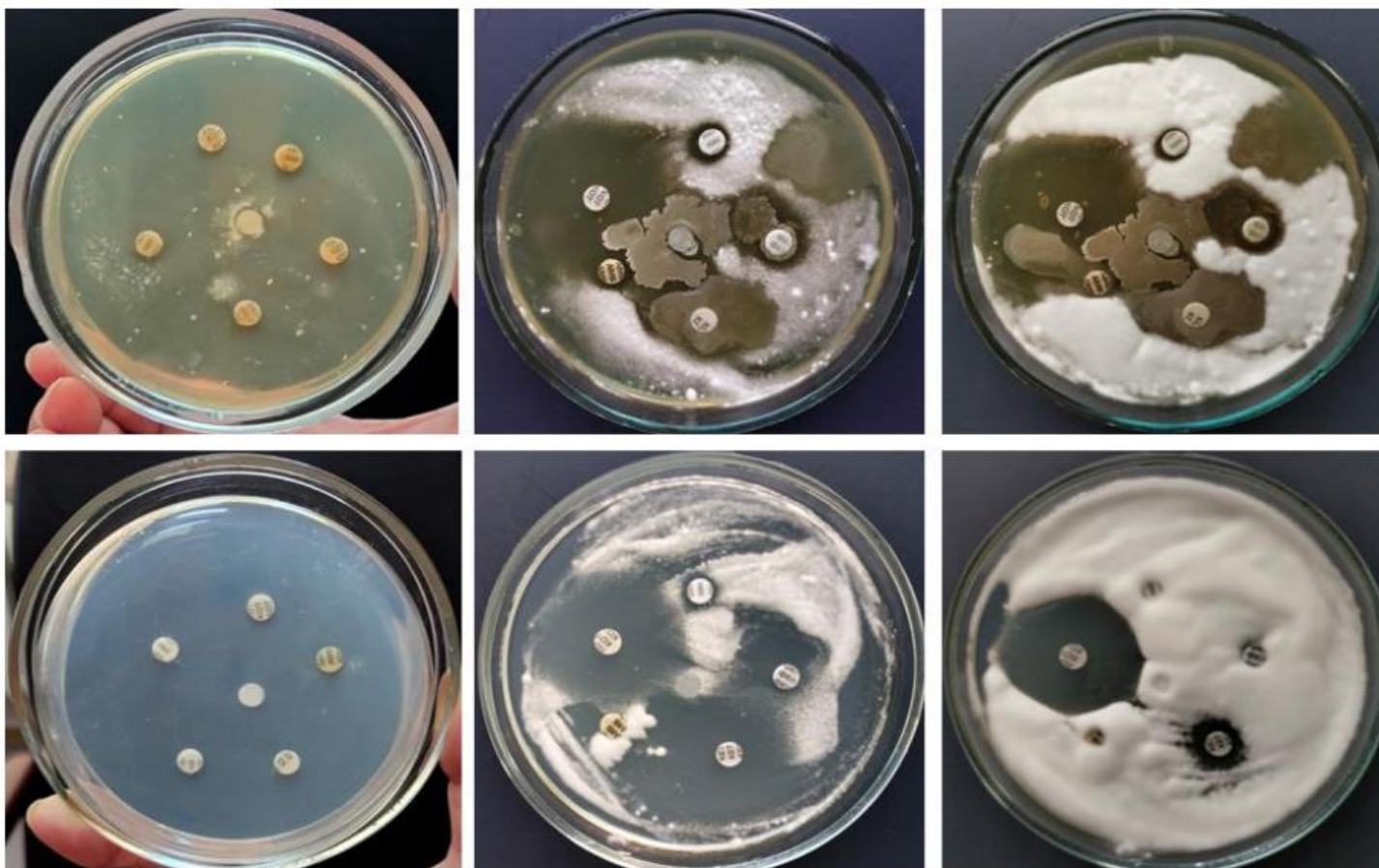
48 часов

72 часа

сверху – среда Сабуро, снизу – среда АГВ



РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ПРОТИВОГРИБКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ ШТАММА Т. ВЕННАМИАЕ №20: СВЕРХУ – СРЕДА САБУРО, СНИЗУ – СРЕДА АГВ



24 часа

48 часов

72 часа

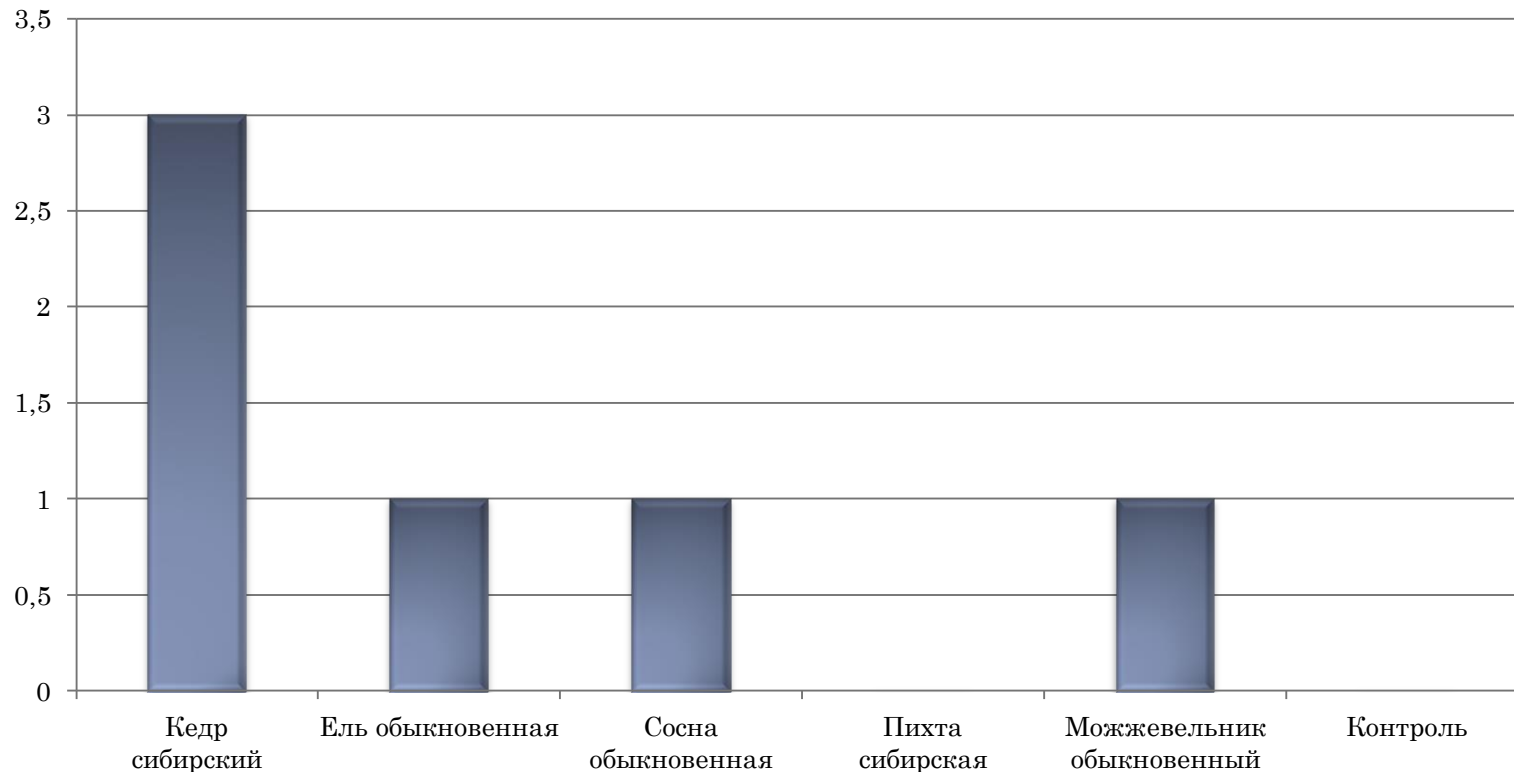


РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К АНТИМИКОТИКАМ У ШТАММОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

- Результаты анализа резистентности штаммов *T. benhamiae* к антимикотикам на среде АГВ и Сабуро показывают, что состав субстрата влияет на резистентность микромицетов. Штамм *T. benhamiae* 19 на среде АГВ на первые сутки оказался чувствительным ко всем фунгицидным препаратам, кроме амфотерицина. К исходу третьих суток штамм сохранял чувствительность только к клотримазолу. В то же время на среде Сабуро наблюдалось наличие слабой фунгистатической активности других противогрибковых препаратов, практически отсутствующее на агаре АГВ.
- Другой штамм *T. benhamiae* 20 в первые сутки был чувствителен ко всем препаратам, на вторые сутки проявил устойчивость к амфотерицину, на третьи сутки на обеих средах сохранилась чувствительность штамма к клотримазолу.
- На среде Сабуро штамм был достаточно устойчив ко всем препаратам (незначительное фунгистатическое действие), на среде АГВ фунгистатическую активность проявил только кетоконазол.



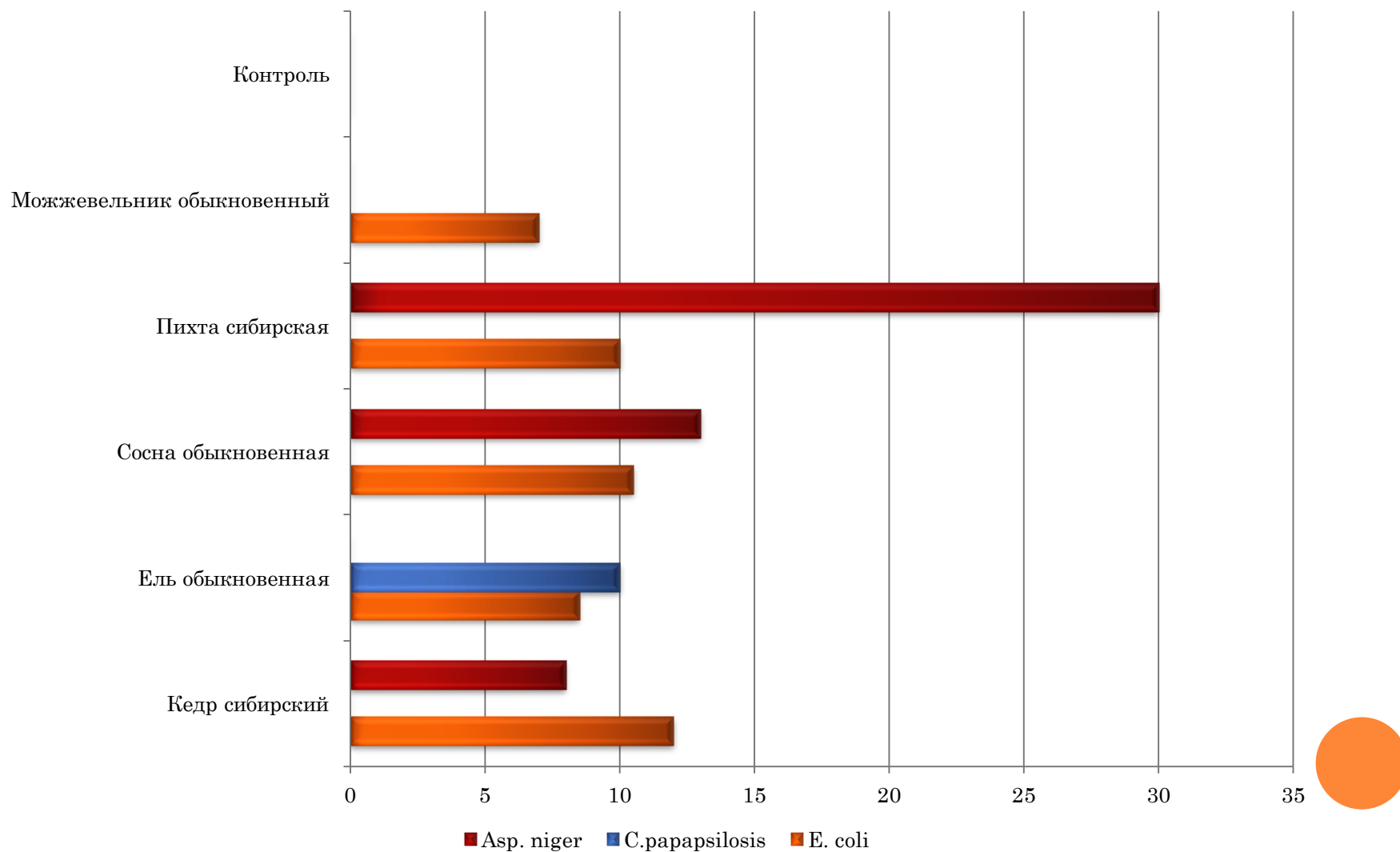
ВЫЯВЛЕНИЕ ПРОТИВОГРИБКОВОЙ МИНИМАЛЬНОЙ ПОДАВЛЯЮЩЕЙ КОНЦЕНТРАЦИИ – ПРОТИВ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ, ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОППОРТУНИСТИЧЕСКИХ МИКОЗОВ



МПК масляных экстрактов хвойных растений против условно-патогенных дрожжей *Candida parapsilosis* (логарифм разведения)



МПК ЭКСТРАКТОВ ХВОЙНЫХ РАСТЕНИЙ ПРОТИВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ОППОРТУНИСТИЧЕСКИХ ПЛЕСНЕВЫХ МИКОЗОВ *ASPERGILUS NIGER*



РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ОППОРТУНИСТОВ К ЭКСТРАКТАМ ХВОЙНЫХ РАСТЕНИЙ

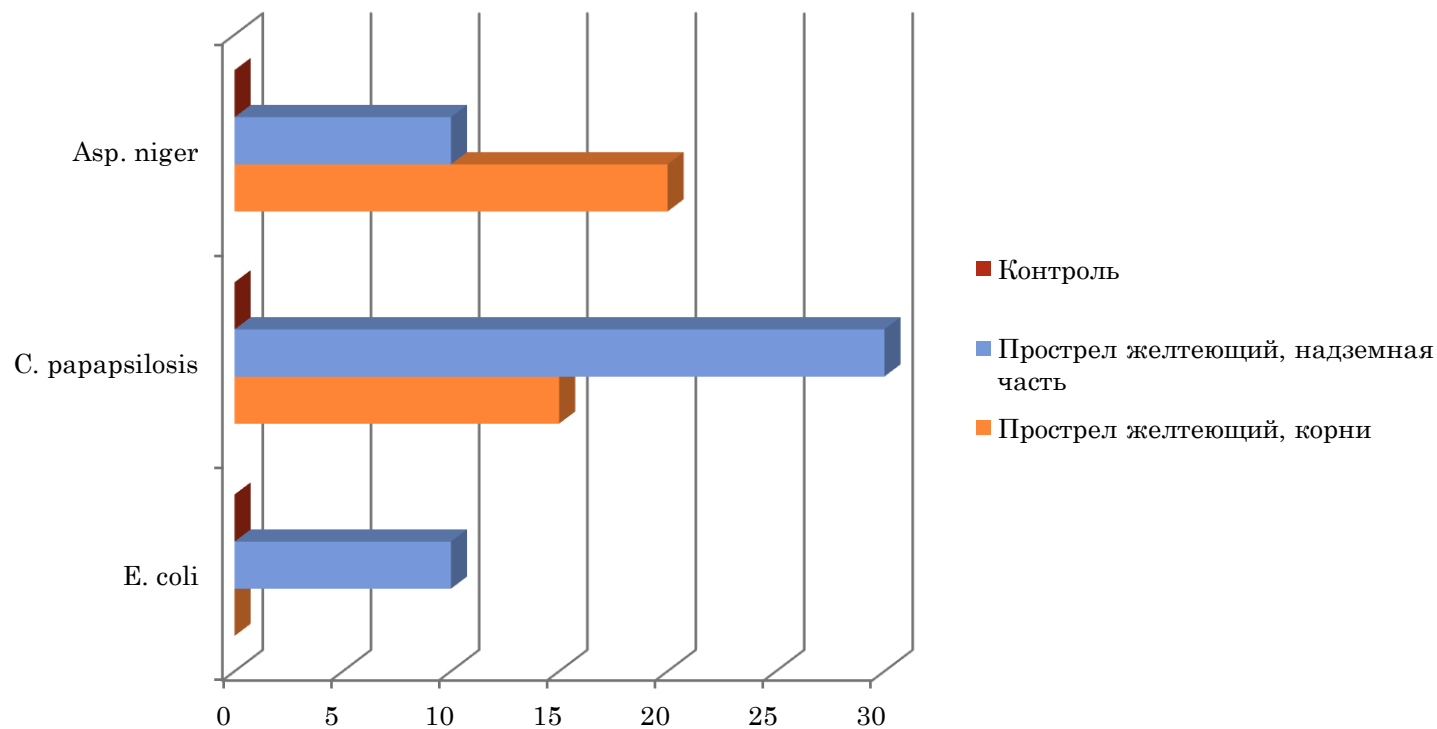
- Отсутствие фунгицидной или фунгистатической активности против условно-патогенных дрожжей регистрировали у водных отваров и настоев, а также у водно-спиртовых экстрактов всех анализируемых хвойных растений. Против *Candida parapsilosis* оказались активными только масляные экстракты растений, которые оказывали кратковременный фунгистатический эффект. Наши результаты согласуются с данными других авторов, заявлявших о высокой резистентности дрожжей *C. parapsilosis* против фунгицидных препаратов



МИНИМАЛЬНАЯ ПОДАВЛЯЮЩАЯ БАКТЕРИЦИДНАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ ЭКСТРАКТОВ ПРОСТРЕЛА ЖЕЛТЕЮЩЕГО ПРОТИВ БАКТЕРИЙ, ДРОЖЖЕЙ, ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ

Вид сырья	Масляные экстракты	Водно-спиртовые экстракты	Водные экстракты	Водные отвары
<i>Escherichia coli</i>				
Прострел желтеющий, корни	1:64	1:16	-	-
Прострел желтеющий, надземная часть	-	1:128	1:512	1:128
Контроль	-	-	-	-
<i>Candida papapsilosis</i>				
Прострел желтеющий, корни	-	1:8	нативный	1:128
Прострел желтеющий, надземная часть	-	1:32	1:64	1:32
Контроль	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>				
Прострел желтеющий, корни	-	1:128	1:64	1:32
Прострел желтеющий, надземная часть	1:8	1:32	---	1:512
Контроль	-	-	-	-

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МИКРОФЛОРЫ К ВОДНЫМ ОТВАРАМ ПРОСТРЕЛА ЖЕЛТЕЮЩЕГО





СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ФУНГИЦИДНОСТИ ВОДНОГО ОТВАРА НАДЗЕМНОЙ ЧАСТИ ПРОСТРЕЛА ЖЕЛТЕЮЩЕГО С ИЗВЕСТНЫМИ ФУНГИЦИДАМИ НА *C. PARAPSILOSIS*

Чувствительность культуры *C. parapsilosis* к противогрибковым препаратам



ПОКАЗАТЕЛИ ПРОТИВОГРИБКОВОЙ МИНИМАЛЬНОЙ ПОДАВЛЯЮЩЕЙ КОНЦЕНТРАЦИИ *P. URALENSIS* ПРОТИВ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ, ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОППОРТУНИСТИЧЕСКИХ МИКОЗОВ

- Из общего количества проанализированных растений выделяются показатели фунгицидной активности водных экстрактов корней прострела желтеющего против условно-патогенных дрожжей *Candida parapsilosis*, при полном отсутствии фунгицидных свойств у масляных растворов. Фунгицидная активность водных экстрактов корневой части в 2 раза выше водных экстрактов надземной части, в 4-6 раз эффективнее водно-спиртовых экстрактов. Анализ фунгицидной МПК показал, что водные отвары растения Прострел желтеющий надземная часть и корни в первые сутки активно подавляли рост *Aspergillus niger*, что свидетельствует об их фунгистатических свойствах против данного микромицета.



ВЫВОДЫ

- Штаммы *T. benhamiae* обладают высокой резистентностью к препаратам амфотерицин и флуконазол. Штамм дрожжей *C. parapsilosis* резистентен к амфотерицину, клотримазолу и флуконазолу. В условиях *in vitro* на проявление резистентности микромицетов к антимикотикам влияет состав питательного субстрата.
- Сравнительный анализ противогрибковых свойств известных антимикотиков с гуматом калия марки «Казуглегумус» и фитопрепаратом (водный отвар) из Прострела желтеющего (*Pulsatilla flavescens* (Zussar.) Juz.) позволил выявить наличие высокую чувствительность штаммов к ряду антимикотиков и водному отвару *Pulsatilla flavescens*. При этом штамм не проявил устойчивости ни к одному препарату



БЛАГОДАРНОСТИ

- Авторы выражают благодарность Айдархановой Г.С., Кияну В.С., Смагуловой А.М.

