

*На правах рукописи*

**Воропаев Александр Дмитриевич**

**Особенности грибов рода *Candida*, выделенных от ВИЧ-инфицированных  
пациентов**

1.5.11 – Микробиология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор

Несвижский Юрий Владимирович

**Официальные оппоненты:**

**Багирова Наталия Сергеевна** – доктор медицинских наук, федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации бактериологическая лаборатория централизованного научно-клинического лабораторного отдела научно-исследовательского института клинической онкологии имени академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова, старший научный сотрудник

**Заславская Майя Исааковна** – доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины, профессор кафедры

**Ведущая организация**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 года в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 64.1.004.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10, <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Борисова Ольга Юрьевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Заболевания, вызываемые оппортунистическими микроорганизмами у пациентов, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), число которых в последние годы значительно увеличивается, представляют серьезную проблему для современного здравоохранения (Černáková L. et al., 2020). *Candida spp.* – убиквитарные условно-патогенные микроорганизмы, способные вызывать инфекции различной локализации, а также состояния угрожающие жизни иммунокомпрометированных пациентов (Pankhurst C. L., 2013). Рецидивирующий орофарингеальный кандидоз значительно ухудшает качество жизни иммунокомпрометированных пациентов (Orlandini R. K. et al., 2020). У 90% ВИЧ-инфицированных лиц наблюдается как минимум один эпизод орофарингеального кандидоза (Meunier F., 1989). В структуре оппортунистических инфекций у ВИЧ-инфицированных пациентов кандидозы занимают значимую долю наравне с туберкулезом (Вознесенский С. Л. и др., 2022).

Растущее применение и распространение противогрибковых препаратов с целью профилактики и лечения, в том числе длительного лечения хронических рецидивирующих кандидозов слизистых, ведет не только к распространению устойчивых штаммов *C. albicans*, но и к повышению доли не-*albicans* видов грибов рода *Candida* (Chamilos G. et al., 2018). Распространение не-*albicans* видов у ВИЧ-инфицированных способствует развитию рефрактерного кандидоза слизистых оболочек. В случае *C. albicans* имеет место приобретенная устойчивость, что создает проблему как для каждого отдельно взятого пациента, так и для эпидемиологии кандидозов при потенциальном распространении подобных штаммов (Moore R. D., 1996). На сегодняшний день в России ограничено представлены данные о клональной структуре популяции *Candida spp.*, в частности *C. albicans*, полученные при помощи мультилокусного-сиквенс типирования (Bougnoux M.-E. et al., 2003).

### Степень разработанности темы исследования

Этиологический фактор кандидоза – эукариотический условно-патогенный микроорганизм, представленный почти 200 видами. Среди них наиболее распространенным в популяции людей является *C. albicans* (Dadar M. et al., 2018). Достаточно часто *Candida spp.* высеваются от пациентов в виде монокультуры одного вида, однако при ряде состояний было отмечено параллельное присутствие в биотопе нескольких видов или штаммов данных грибов (Александрова Н. А. и др., 2016). В отношении ВИЧ-инфицированных пациентов в России литературные данные о распространенности и чувствительности к антимикотикам *Candida spp.* в качестве возбудителей орофарингеального кандидоза на сегодняшний день немногочисленны (Кузнецова М. В. и др., 2017; Оборин Д. А. и др., 2016; Филина Ю. С. и др., 2018). Вид *Candida*

*spp.* весьма четко коррелирует с чувствительностью к антимикотикам *in vitro* (Pfaller M. A. et al., 2010). В России существуют единичные публикации о механизмах устойчивости к противогрибковым препаратам у штаммов *Candida* (Багирова Н. С. и др., 2022; Беженар М. Б. и др., 2020). Информация о сиквенс-типах штаммов, циркулирующих на территории России, представлена всего двумя штаммами, без какой-либо сопроводительной информации (Jolley K. A. et al., 2018). В связи важностью проблемы кандидозов для ВИЧ-инфицированных пациентов, представляется необходимым изучение видового разнообразия, генетических механизмов и распространённости резистентности в популяции *Candida spp.* на примере выборки пациентов с ВИЧ-инфекцией и орофарингеальным кандидозом в Московском регионе.

### **Цель исследования**

Охарактеризовать структуру популяции и биологические свойства штаммов *Candida spp.* у ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингеальным кандидозом в г. Москва.

### **Задачи исследования**

1. Провести сравнение методов видовой идентификации *Candida spp.*
2. Определить долю *Candida spp.* в составе условно-патогенной микрофлоры ротовой полости ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингеальным кандидозом.
3. Оценить видовое разнообразие и состав ассоциаций штаммов грибов рода *Candida* в полости рта ВИЧ-инфицированных.
4. Охарактеризовать клональную структуру популяции *C. albicans* при помощи мультилокусного сиквенс-типирования (МЛСТ).
4. Оценить спектр устойчивости к противогрибковым препаратам штаммов грибов рода *Candida*, выделенных от ВИЧ-инфицированных с орофарингеальным кандидозом.
5. Исследовать молекулярные механизмы устойчивости к противогрибковым препаратам штаммов грибов рода *Candida*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингеальным кандидозом.

### **Научная новизна**

Впервые в ходе микробиологического исследования штаммов, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингеальным кандидозом в г. Москва, охарактеризован состав условно-патогенной микрофлоры ротовой полости и структура популяции штаммов *Candida spp.* с применением мультилокусного сиквенс-типирования, выявлено преобладание в структуре возбудителей грибов рода *Candida spp.* (53%), среди которых 42% были представлены *C. не-albicans*.

В структуре популяции *Candida spp.* установлено преобладание гетерогенных по видовому составу ассоциаций штаммов грибов рода *Candida*, представленных, преимущественно, *не-albicans* видами. Большинство выделенных в ходе исследования штаммов

*C. albicans* (72,7%) и все штаммы *C. krusei* входили в состав гетерогенных ассоциаций, что свидетельствует об этиологической значимости не-*albicans* видов грибов рода *Candida* в развитии кандидозов слизистых.

Впервые проведено мультилокусное сиквенс-типирование устойчивых к азолам штаммов *C. albicans* с охарактеризованными механизмами приобретенной устойчивости к противогрибковым препаратам и установлено, что исследованные штаммы относятся к следующим сиквенс-типам: 3923, 3349, 363, 255, 624, 1469, 3299, 573, 3090, 747, 2724, 1411, 767, 3185, 2014, 4016, 1561, 1322, что также подтверждает неоднородность популяции данного вида в исследованной выборке.

В ходе определения спектра устойчивости к противогрибковым препаратам штаммов грибов рода *Candida*, выделенных в исследованной группе пациентов, выявлен повышенный уровень устойчивости флуконазолу (76,9%). У штаммов *C. albicans*, выделенных из гетерогенных ассоциаций, значительно чаще наблюдалась устойчивость к имидазолам и к итраконазолу ( $p < 0,05$ ).

Установлено, что устойчивость к препаратам азолового ряда у исследованных штаммов *C. albicans* связана с несколькими вариантами повышенной экспрессии генов *ERG11*, *CDR1*, *CDR2* и *MDR1*, а также ранее описанными несинонимичными мутациями в гене *ERG11*, приводящим к аминокислотным заменам E266D, G464S, I471L, D116E и V488I, что подтверждает множественность вовлеченных в формирование устойчивости механизмов с возможным наличием региональных особенностей распространения штаммов с приобретенной устойчивостью.

Среди изученных штаммов *C. albicans* отмечено одновременное повышение экспрессии *ERG11* и как минимум одного из исследуемых генов (72%,  $p < 0,05$ ), а также сочетанная экспрессия *CDR1* и *CDR2* (59%,  $p < 0,01$ ), что может говорить о возможности одномоментной активации исследуемых генов.

Наиболее часто встречаемая в исследованной выборке *C. albicans* мутация в гене *ERG11* (E266D), ранее ассоциированная с повышением МПК флуконазола, в настоящем исследовании ассоциировалась с более низкой МПК итраконазола и позаконазола ( $p < 0,05$ ). У штаммов *C. albicans* впервые выявлена мутация в гене *ERG11* (S16V), находящаяся вне активного центра фермента, не приводящая к повышению устойчивости к противогрибковым препаратам.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Проведенный анализ фенотипических и генетических характеристик штаммов *Candida spp.*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингеальным кандидозом в г. Москва, дополняет современные представления об этиологической и патогенетической роли

грибов рода *Candida* в развитии микозов у иммунокомпрометированных лиц с учетом региональных особенностей циркулирующих штаммов.

Проведено сравнение методов видовой идентификации культур грибов рода *Candida*, и обоснованы методологические подходы к лабораторной диагностике кандидозов на основе применения комплекса микробиологических методов. Отмечено, что хромогенные питательные среды могут служить оптимальным методом для выделения чистых культур и предварительной идентификации видов штаммов *Candida spp.* до применения таких методов как MALDI-TOF масс-спектрометрия и ПЦР.

Полученные данные о выявленной доле *C. ne-albicans*, а также данные об устойчивости к противогрибковым препаратам возбудителей орофарингеального кандидоза, выделенных у ВИЧ-инфицированных пациентов в г. Москва, свидетельствуют о распространении природной и приобретенной устойчивости и могут быть использованы для актуализации современных клинических рекомендаций по терапии кандидозов в данной группе пациентов.

Результаты исследования по фенотипической и генотипической характеристике изученных штаммов могут послужить основой для разработки методологических подходов по микробиологическому мониторингу популяции возбудителей кандидозов.

Собранная в результате исследования рабочая коллекция чувствительных и резистентных к противогрибковым препаратам штаммов *Candida spp.* депонирована в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ – Оболенск», с регистрационными номерами F-2010 – F-2032, F2084-F2101. Данная коллекция может быть использована для научных исследований и дальнейшей разработки протоколов молекулярно-генетических исследований для выявления механизмов устойчивости к противогрибковым препаратам *Candida spp.*

Материалы диссертации используются в педагогическом процессе на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии имени академика А.А. Воробьева ИОЗ имени Ф.Ф. Эрисмана Сеченовского Университета при изучении дисциплин «Микробиология», «Микробиология полости рта», читаемых студентам и аспирантам по направлениям подготовки (специальностям): 31.05.01 Лечебное дело, 32.05.01 Медико-профилактическое дело, 31.05.03 Стоматология, 33.05.01 Фармация, 31.05.02 Педиатрия, 06.06.01 Биологические науки, 32.06.01 Медико-профилактическое дело (Акт внедрения № 104 от 17.06.2022г). Предложения по совершенствованию лабораторной диагностики кандидозов внедрены в работу клинико-диагностической лаборатории Консультативно-диагностического центра ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора (Акт внедрения от 10.06.2022 ).

## Методология и методы исследования

Методология работы спланирована соответственно поставленной цели и задачам исследования. В работе использовались классические бактериологические, биохимические, молекулярно-генетические и биоинформатические методы исследования, математические и статистические методы обработки данных.

Протокол исследования был одобрен локальным Комитетом по биомедицинской этике ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора (протокол № 34 от 06.12.2018 г.) Лабораторные исследования осуществлялись на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии имени А.А. Воробьева Института Общественного Здоровья имени Ф.Ф. Эрисмана ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), а также на базе лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии и лаборатории микробиологии и профилактики кишечных инфекций ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.

**Штаммы микроорганизмов.** В работе использовано 98 штаммов микроорганизмов, в том числе 52 штамма *Candida spp.*, выделенных из ротоглотки 31 ВИЧ-инфицированного пациента с признаками ОФК. В качестве контрольной выборки использовалось 85 штаммов микроорганизмов, выделенных от 30 ВИЧ-инфицированных пациентов без признаков ОФК. Обследование пациентов проводилось на базе Инфекционной клинической больницы № 2 Департамента здравоохранения г. Москвы в 2015-2017 гг. Исследование экспрессии генов *ERG11*, *MDR1*, *CDR1*, *CDR2* проведено у 25 штаммов *C. albicans*: 18 устойчивых к флуконазолу и вориконазолу штаммов и 7 чувствительных штаммов в качестве контрольных образцов. Поиск мутаций в гене *ERG11* и МЛСТ проведены для 18 устойчивых к флуконазолу и вориконазолу штаммов *C. albicans*.

**Микробиологические методы.** Первичные посевы мазков из ротоглотки производились на 5% кровяной агар с дефибрированной бараньей кровью (Blood Agar Base, Himedia, Индия), маннит-солевой агар (Himedia, Индия) и 1,5% декстрозный агар Сабура (Himedia, Индия), посевы инкубировались 18–48 часов при 37°C. Видовая идентификация грибов рода *Candida* производилась различными методами: использовалось культивирование на кукурузном агаре по методу Дальмау (Veena M. S., 2021), тест на образование ростовых трубок, хромогенная среда Chromogenic *Candida* Agar (Oxoid, Великобритания), биохимические тест-системы Remel RapID YEAST PLUS (Remel, США). Видовая идентификация бактерий проводилась с использованием дифференциально-диагностических питательных сред, биохимических тест систем Remel RapID (Remel, США) и Mikrolatest (ErbaLachema, Чехия). Все выделенные микроорганизмы также идентифицировали с помощью микробиологического анализатора VastoSCREEN (НПФ «Литех», Россия) на базе MALDI-TOF масс-спектрометра LaserToF LT2 Plus (Analysis Instruments,

Великобритания). Оценка чувствительности к антибактериальным и противогрибковым препаратам проводилась диско-диффузионным методом и методом микроразведений (Sensititre YeastOne10, Trek diagnostic system, Великобритания) в соответствии с рекомендациями Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ) по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (2021-01) (Козлов Р. С. и др., 2021).

**Молекулярно-генетические методы исследования.** Для выделения ДНК из чистых культур *Candida spp.* использовались наборы реагентов «ДНК-сорб-АМ» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Для видовой идентификации *Candida spp.* использовалась ПЦР тест-система «АмплиСенс *C. albicans/C. glabrata/C. krusei*– МУЛЬТИПРАЙМ-FL» (АмплиСенс, Россия) и амплификатор 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, США). Выявление генов карбапенемаз с помощью наборов реагентов MDR KPC/OXA-48-FL и MDR MBL-FL (АмплиСенс, Россия). Уровни экспрессии генов *ERG11*, *MDR1*, *CDR1*, *CDR2* и контрольных генов домашнего хозяйства *ACT* и *PMA* были измерены с помощью количественной ПЦР. Выделение РНК проводилось с помощью реагента для выделения суммарной РНК «ExtractRNA» (ЗАО Евроген, Россия), обратная транскрипция – с помощью набора «Реверта-L» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), ПЦР в реальном времени в присутствии SYBR Green I – с 2,5-кратной реакционной смесью М-427 (ЗАО Синтол, Россия) в соответствии с инструкцией производителя, соответствующими праймерами (Chau A. S. et al., 2004). Амплификация гена *ERG11* и генов домашнего хозяйства *ACC1*, *VPS*, *ADP1*, *SYA1*, *AAT1a*, *MPI*, *ZWF1* для последующего секвенирования проводилась с использованием набора реактивов Qiagen PCR Master Mix, 2x (Германия) и соответствующих праймеров (Bougnoux M.-E. et al., 2003; Wang B. et al., 2015). Реакция секвенирования и очистка проводились с помощью наборов реагентов BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit и BigDye Xterminator Purification Kit (Applied biosystems, США) в соответствии с инструкцией производителя. Для секвенирования использовался генетический анализатор 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

**Биоинформатические и статистические методы.** Анализ данных мультилокусного сиквенс-типирования (МЛСТ) штаммов *C. albicans* проводился при помощи алгоритма goeBURST (Francisco A. P. et al., 2009) с построением минимального остовного дерева, а также иерархической кластеризации методом определения невзвешенной средней связи (UPGMA) на основании расстояния Хэмминга и построения дендрограммы. Информация об известных генотипах и штаммах *C. albicans* получена из базы данных PubMLST (Jolley K. A. et al., 2018). Уровень экспрессии исследуемых генов оценивался с помощью метода  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak K. J. et al., 2001). Повышенным считался уровень экспрессии, превышающий базовые средние значения для



чувствительных штаммов ( $m$ ) более чем на 3 стандартных отклонения ( $3\sigma$ ). Для анализа данных секвенирования гена *ERG11* *C. albicans* использовалось программное обеспечение MEGA 11 (Tamura K. et al., 2021). Выравнивание полученных последовательностей производилось с последовательностью гена *ERG11* штамма *Candida albicans* (Robin) Berkhout SC5314 (Hargrove T.Y. et al., 2017) с использованием алгоритма MUSCLE (Jones T. et al., 2004). Поиск выявленных нуклеотидных и аминокислотных замен производился в базах данных *Candida* Genome Database, UniProt, а также по данным литературы (Skrzypek M.S. et al., 2017; The UniProt Consortium, 2023). Для статистического анализа и визуализации данных использовалось программное обеспечение Microsoft Excel, PhyloViz, MEGA11, Python библиотеки SciPy, Matplotlib. Для непрерывных величин проводилось определение нормальности распределения по Шапиро-Уилку. Для оценки значимости различий между группами использовался точный критерий Фишера для дискретных величин и U-критерий Манна-Уитни для непрерывных. Для корреляционного анализа проводился анализ таблиц сопряженности, использовался коэффициент корреляции Пирсона. Критический уровень ошибки при проверке статистических гипотез принимался за общепринятую в медицине величину  $p < 0,05$  (Герасимов А. Н., 2015).

#### **Личное участие соискателя в получении результатов**

Диссертантом выполнены микробиологические культуральные исследования микрофлоры, в том числе *Candida spp.*, выделенной из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов с признаками ОФК в г. Москва, молекулярно-генетические исследования полученных штаммов, в том числе МЛСТ, определение экспрессии генов *ERG11*, *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* и выявление мутаций в гене *ERG11* с помощью секвенирования по Сэнгеру у штаммов *C. albicans*. Обработку и анализ данных микробиологических исследований проводили в соавторстве с главным научным сотрудником, заведующей лабораторией микробиологии и профилактики кишечных инфекций, к.б.н. Е.И. Лиханской. Обработку и анализ данных молекулярно-генетических исследований, биоинформационный анализ, проводили в соавторстве со старшим научным сотрудником лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, к.б.н. Ю.Н. Урбан.

#### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Установлено, что у ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингеальным кандидозом в г. Москва значительную долю видовой структуры занимают не-*albicans* виды *Candida*. Наиболее часто выделяются гетерогенные ассоциации *C. albicans* и *C. krusei*. Гомогенные ассоциации представлены штаммами *C. albicans* различных сиквенс-типов.

2. Штаммы *Candida spp.*, выделенные у ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингеальным кандидозом в г. Москва, в подавляющем большинстве устойчивы к азолам, в частности к флуконазолу. Устойчивые штаммы *C. albicans* относились к 18 различным сиквенс

типам и обладали несколькими вариантами повышенной экспрессии генов *ERG11*, *CDR1*, *CDR2* и *MDR1*, а также мутациями в гене *ERG11*.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Степень достоверности результатов, полученных при проведении исследования, подтверждается адекватным объемом исследований объектов наблюдения: 98 штаммов микроорганизмов, выделенных из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов с клиническими проявлениями ОФК в г. Москва, в том числе 52 штамма *Candida spp.*, а также использованием оптимально подобранных методов статистической обработки данных. Для получения результатов использовались современные микробиологические и молекулярно-генетические методы исследований, анализ результатов проводился при помощи современного программного обеспечения для математической и статистической обработки данных.

Исследования проводились в рамках темы НИР «Экология условно патогенных микробов и их роль в патологии человека» кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии имени академика А.А. Воробьева Института общественного здоровья имени Ф.Ф. Эрисмана ФГАО ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский университет) и НИОКТР «Молекулярно-генетическая и фенотипическая характеристика возбудителей оппортунистических инфекций; мониторинг их устойчивости к антибактериальным препаратам.» (2021–2025 гг.), Рег. № 121021000287–0 ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.

Диссертация апробирована на заседании научной конференции кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии имени академика А.А. Воробьева Института общественного здоровья имени Ф.Ф. Эрисмана ФГАО ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский университет) (протокол №5 от 20 марта 2023 г.).

Материалы диссертационного исследования представлены на конференциях и конгрессах: Четвертом Съезде Микологов России (Москва, 12–14 апреля 2017 г.); Конференции по медицинской микологии "Социально-значимые микозы" (Москва, 11–12 апреля 2019 г.); Российско-китайском конгрессе по медицинской микробиологии, эпидемиологии, клинической микологии и иммунологии (XXII Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 12–15 июня 2019 г.); Четвертом международном микологическом форуме (Москва, 14–15 апреля 2020 г.); Всероссийском конгрессе по медицинской микробиологии, эпидемиологии, клинической микологии и иммунологии (XXIII Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 9–11 ноября 2020 г.); Всероссийском конгрессе по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXIV Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 9–11 июня 2021 г.).

**Публикации.** По результатам исследования опубликовано 9 работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых изданиях, 6 тезисов в материалах конференций.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа изложена на 151 странице машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания методов и материалов исследования, результатов работы, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы. Диссертация содержит 16 рисунков и 17 таблиц. В работе использованы 263 источника литературы: 37 отечественных и 226 иностранных.

### ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

#### Анализ эффективности различных методов видовой идентификации грибов рода *Candida*

Исследование проводилось на 52 штаммах грибов рода *Candida*, выделенных из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов с клиническими проявлениями ОФК. Результаты применения хромогенного агара (Oxoid) для идентификации грибов рода *Candida* оказались сравнимыми с результатами, полученными с помощью биохимических тест-систем (Remel), по сравнению с ПЦР (Таблица 1).

Таблица 1 – Сравнение методов видовой идентификации *Candida spp.*

Вид	Морфология (ростовые трубки, истинные гифы) (%/абс. ч)	Хромогенный агар (%/абс. ч)	Remel RapID Yeast Plus (%/абс. ч)	ПЦР (АмплиСенс <i>C. albicans/ C. glabrata/ C. krusei</i> ) (%/абс. ч)	MALDI-TOF MS (%/абс. ч)
<i>C. albicans</i> (n=30)	100/30	100/30	100/30	100/30	100/30
<i>C. glabrata</i> (n=11)	-	64/7	72,7/8	100/11	100/11
<i>C. krusei</i> (n=5)	-	80/4	80/4	100/5	100/5
<i>C. tropicalis</i> (n=6)	-	100/6	100/6	-	100/6
Всего (n=52)	100/30	90,1/47	95/49	100/46	100/52

Таким образом, можно заключить, что, при недоступности MALDI-TOF масс-спектрометрии, использование хромогенных агаров по данным нашего исследования – оптимальный метод ориентировочной видовой идентификации грибов рода *Candida*.

#### Особенности оппортунистической микрофлоры ротоглотки у ВИЧ-инфицированных пациентов

В ходе исследования выделено 98 штаммов микроорганизмов из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов с клиническими проявлениями ОФК, из которых более половины *Candida spp* (Рисунок 1).

У условно-патогенных энтеробактерий выявлена устойчивость к бета-лактамам антибиотикам, в частности к пенициллинам – 74% штаммов, цефалоспорином III-IV поколения – 70% штаммов, карбапенемам – 1% штаммов, а также к аминогликозидам – 40% и фторхинолонам

– 35% штаммов. Ген КРС выявлен у 1 штамма *Enterobacter cloacae*, ОХА48 – у 2 штаммов *K. pneumoniae*, и 1 штамма *E. aerogenes*. Помимо этого, было выделено 15 штаммов *Staphylococcus spp.*, включая 8 штаммов *S. aureus* (53%). Из всех выявленных *S. aureus* 50% относились к фенотипу метициллин-резистентного золотистого стафилококка (MRSA).

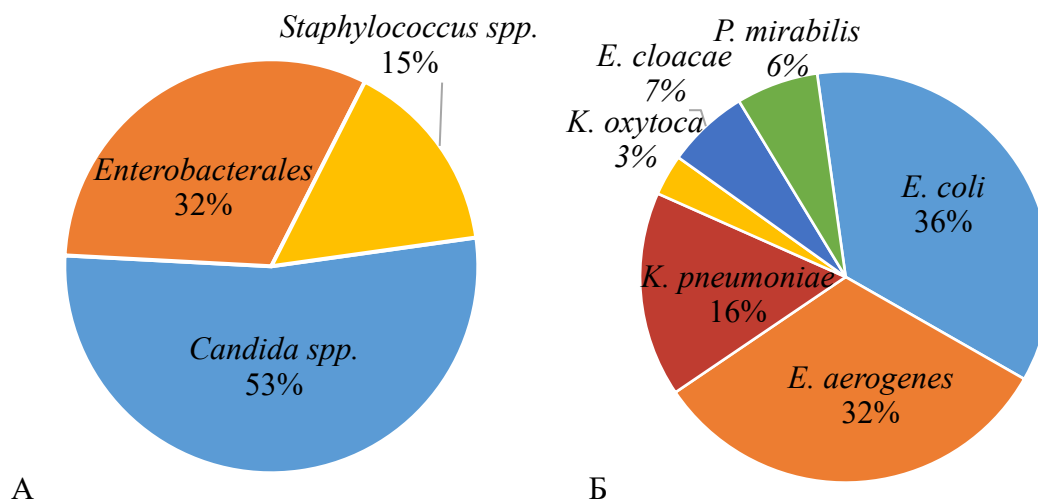


Рисунок 1 – Штаммы микроорганизмов, выделенные из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов.

Примечание: А. Условно-патогенная микрофлора, выделенная от ВИЧ инфицированных пациентов с ОФК, Б. Видовая структура штаммов представителей *Enterobacteriales spp.*, выделяемых у ВИЧ инфицированных пациентов

Среди 52 штаммов грибов рода *Candida* значительную долю занимали *C. не-albicans* – 42% штаммов *Candida spp* (n=22) (Рисунок 2).

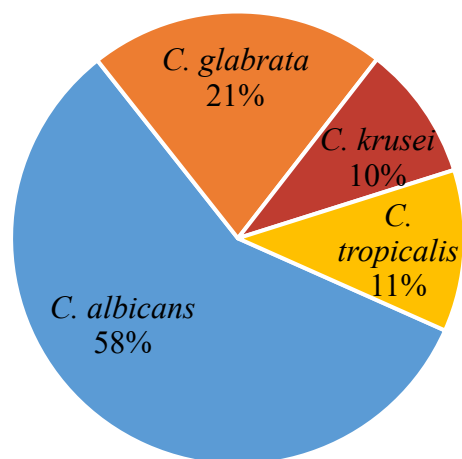


Рисунок 2 – Видовая структура штаммов представителей *Candida spp.*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов

У пациентов контрольной группы с ВИЧ-инфекцией без клинических проявлений ОФК было выделено 85 штаммов микроорганизмов, из которых только 2 штамма *Candida spp.* и 2 штамма энтеробактерий (2%): *E. cloacae* и *E. coli*, что статистически значимо меньше, чем в

основной группе ( $p < 0,05$ ). Представители рода *Staphylococcus spp.* были выделены в значительно большем количестве, чем в основной группе ( $p < 0,05$ ) – 32 штамма, 31% – штаммы *S. aureus* (Таблица 2).

Таблица 2 – Сравнительный анализ таксономической структуры условно-патогенной микрофлоры ротоглотки у ВИЧ-инфицированных пациентов с ОФК /без ОФК,  $p < 0,05$

Микроорганизм	ОФК		Контрольная группа	
	Кол-во	%	Кол-во	%
<b><i>Candida spp.</i></b>	<b>52</b>	<b>53</b>	<b>2</b>	<b>2,3</b>
<i>C. albicans</i>	30	30,6	2	2
<i>C. glabrata</i>	11	11,2	0	0
<i>C. krusei</i>	5	5,1	0	0
<i>C. tropicalis</i>	6	6,1	0	0
<b><i>Enterobacterales</i></b>	<b>31</b>	<b>31,6</b>	<b>2</b>	<b>2,3</b>
<i>Escherichia coli</i>	11	11,2	1	1,2
<i>Klebsiella aerogenes</i>	10	10,2	0	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	5,1	0	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	1	0	
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	2	1	1,2
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	0	0	1	
<b><i>S. aureus</i></b>	<b>8</b>	<b>8,2</b>	<b>10</b>	<b>11,7</b>
<b>Всего</b>	<b>98</b>		<b>85</b>	

Таким образом, грибы рода *Candida* доминируют в ротоглотке ВИЧ-инфицированных пациентов с ОФК, в нашей выборке их доля составила 53%, в отличие от пациентов без данного осложнения основного заболевания, у которых они практически не выделялись. При этом *C. non-albicans* составили 42% от всех выделенных штаммов *Candida spp.* На долю бактериальной составляющей приходились различные представители порядка *Enterobacterales* (32%), рода *Staphylococcus* (15%), в том числе *S. aureus* (7,5%), обладающие высоким уровнем устойчивости к антибактериальным препаратам.

#### Структура популяции грибов рода *Candida* в ротоглотке ВИЧ-инфицированных пациентов

Анализ структуры популяции грибов рода *Candida*, показал, что в ротоглотке обследованных ВИЧ-инфицированных пациентов с ОФК наблюдалось формирование ассоциаций штаммов *Candida spp.*: гомогенных, включающих штаммы только одного вида и гетерогенных, состоящих из штаммов грибов рода *Candida* различных видов. Гомогенные ассоциации были представлены штаммами различных сиквенс типов, значительно различающимися профилями устойчивости. Всего было обнаружено 13 ассоциаций штаммов *Candida spp.*, из которых 9 включали 2 вида (69,2%), а 4 (30,8%) – три и более вида. Выделенные штаммы видов *C. albicans*, *C. glabrata* и *C. krusei* с различной частотой образовывали ассоциации ( $p < 0,01$ ). Штаммы *C. glabrata* существенно реже, чем *C. albicans* и *C. krusei*, выделялись в виде ассоциаций с другими видами *Candida spp.* (36,4%,  $p < 0,05$ ) (Таблица 3).

Таблица 3 – Частота выявления и видовой спектр грибов рода *Candida* в микробиоценозе ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов

Виды грибов	Всего, шт.	Монокультура		Ассоциации					
				Всего		Гомогенные		Гетерогенные	
		Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
<i>C. albicans</i>	30	8	26,7	22	73,3	16	53,3	6	20,0
<i>C. glabrata</i>	11	7	63,6	4	36,4	0	0,0	4	36,4
<i>C. tropicalis</i>	6	3	50,0	3	50,0	0	0,0	3	50,0
<i>C. krusei</i>	5	0	0,0	5	100,0	0	0,0	5	100,0
<b>Итого:</b>	52	18	34,6	34	65,4	16	30,8	18	34,6
В т.ч. <i>C. не-albicans</i>	22	10	45,5	12	54,5	0	0,0	12	54,5

*C. albicans* реже выделялась одновременно с *C. glabrata* ( $r=-0,573$ ) и совокупностью штаммов видов *C. tropicalis* и *C. krusei* ( $r=-0,829$ ). Штаммы *C. albicans* чаще всего образуют гомогенный тип ассоциаций (72,7% или 53,3% от общего числа). Остальные виды грибов формировали только гетерогенные ассоциации, что существенно отличало *C. albicans* ( $p < 0,001$ ).

Таким образом, грибы рода *Candida* присутствуют в микрофлоре биотопа ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов с симптомами ОФК в виде монокультуры или ассоциаций: гомогенных или гетерогенных. Наиболее часто образуют ассоциации *C. albicans* (73,3%) и *C. krusei* (100,0%), при этом *C. albicans* формирует ассоциации гомогенного типа в 72,7% случаев.

#### Чувствительность грибов рода *Candida*, выделенных из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов, к противогрибковым препаратам

Выделенные из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов штаммы грибов рода *Candida* были исследованы на чувствительность к основным группам противогрибковых препаратов (Таблица 4).

Таблица 4 – Чувствительность *Candida spp.*, выделенных из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов, к противогрибковым препаратам различных фармакологических групп (клотримазол – CLOT, кетоконазол – KCZ, итраконазол – ITR, флуконазол – FLU, нистатин – NYS, амфотерицин В – AmB)

Виды грибов	Имидазолы				Триазолы				Полиены			
	KCZ		CLOT		ITR		FLU		NYS		AmB	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
<i>C. albicans</i>	16	53,3	18	60,0	10	33,3	7	23,3	29	96,7	24	80,0
<i>C. glabrata</i>	6	54,5	4	36,4	1	9,1	3	27,3	11	100,0	5	45,5
<i>C. tropicalis</i>	4	66,7	5	83,3	6	100,0	0	0,0	4	66,7	4	66,7
<i>C. krusei</i>	2	40,0	4	80,0	4	80,0	0	0,0	3	60,0	3	60,0
Итого:	8	53,8	1	59,6	1	40,4	10	19,2	47	90,4	36	69,2
В т.ч. <i>C. не-albicans</i>	12	54,5	13	59,1	11	50,0	3	13,6	18	81,8	12	54,5

Исходя из полученных данных, наименьшей эффективностью отличались триазолы, в том числе флуконазол (23,1%), а наибольшей – полиены, в том числе нистатин (90,4%), в особенности

в отношении *C. albicans* и *C. glabrata*. Изоляты *C. albicans*, выделенные в форме гомогенных ассоциаций были чувствительны к полиенам в 1,45 раза чаще ( $p<0,05$ ), чем к имидазолам и в 2,89 раза ( $p<0,001$ ) чаще, чем к триазолам (Таблица 5).

Таблица 5 – Чувствительность различных групп штаммов грибов рода *Candida* к противогрибковым препаратам (%) (клотримазол – CLOT, кетоконазол – KCZ, итраконазол – ITR, флуконазол – FLU, нистатин – NYS, амфотерицин В – AmB)

Виды грибов	Форма	Имидазолы			Триазолы			Полиены		
		CLOT	KCZ	Всего	ITR	FLU	Всего	NYS	AmB	Всего
<i>C. albicans</i>	Все (n=30)	<b>60,0</b>	53,3	56,7	33,3	23,3	28,3	96,7	80,0	88,3
	Монокультуры (n=8)	<b>57,5</b>	50,0	<b>68,8</b>	37,5	25,0	31,1	100,0	<b>87,5</b>	93,8
	Гомогенные ассоциации (n=16)	<b>62,5</b>	62,5	<b>62,5</b>	37,5	25,0	31,3	100,0	81,3	90,6
	Гетерогенные ассоциации (n=6)	<b>16,7</b>	33,3	<b>25,0</b>	<b>16,7</b>	16,7	<b>16,7</b>	83,3	50,0	<b>66,7</b>
<i>C. не-albicans</i>	Все (n=22)	59,1	54,5	56,8	50,0	13,6	36,4	81,8	54,5	68,2
	Монокультуры (n=10)	60,0	50,0	55,0	<b>30,0</b>	30,0	30,0	90,0	<b>40,0</b>	65,0
	Гетерогенные ассоциации (n=12)	<b>50,0</b>	41,7	<b>45,8</b>	<b>66,7</b>	0,0	<b>41,7</b>	75,0	66,7	<b>70,8</b>

Количество штаммов, чувствительных к имидазолам, было в 2 раза больше, чем чувствительных к триазолам ( $p<0,05$ ) В группе *C. albicans*, выделенных в виде гетерогенных ассоциаций, по сравнению с полиенами, число штаммов, чувствительных к имидазолам, было меньше в 2,67 раз, к триазолам – в 3,99 раз ( $p<0,05$ ). Чувствительных к имидазолам штаммов *C. albicans*, было в 2,75 и 2,50 раз меньше, чем среди монокультурных штаммов и гомогенных ассоциаций, соответственно ( $p<0,05$ ). В группе *C. не-albicans*, выделенных в виде гетерогенных ассоциаций, было в 1,70 раз больше изолятов, чувствительных к полиенам, чем к триазолам ( $p<0,05$ ). Среди штаммов *C. не-albicans*, выделенных из гетерогенных ассоциаций, чувствительных к клотримазолу было в 3 раза больше, к итраконазолу – в 4, по сравнению с *C. albicans* ( $p<0,05$ ), Монокультурные штаммы *C. не-albicans* были в 2,19 раза реже чувствительны к амфотерицину В ( $p<0,05$ ), чем штаммы *C. albicans*.

Таким образом, большинство штаммов грибов рода *Candida*, выделенных из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов с клиническими проявлениями ОФК, устойчивы к флуконазолу (76,9%). При этом штаммы *C. tropicalis* (83%) и *C. krusei* (80%) чувствительны к клотримазолу и итраконазолу, а *C. albicans* (96,7%) и *C. glabrata* (100%) – к полиенам. Кроме того, на чувствительность к противогрибковым препаратам влияет структура популяции. Среди штаммов *C. albicans*, выделенных из гетерогенных ассоциаций, по сравнению с

монокультурными, резистентность к имидазолам встречалась более чем в 2,5 раза чаще. Чувствительные к итраконазолу штаммы *C. не-albicans* из гетерогенных ассоциаций встречались в 4 раза чаще по сравнению с *C. albicans*.

### Мультилокусное сиквенс-типирование штаммов *C. albicans*

Для исследования структуры популяции и состава гомогенных ассоциаций резистентных штаммов *C. albicans* использовалось мультилокусное сиквенс-типирование (МЛСТ). Было выявлено 9 аллельных вариантов гена AAT1a, 8 – ACC1, 8 – ADP1, 7 – MPIb, 7 – SYA1, 13 – VPS13, 12 – ZWF1b (Рисунок 3).

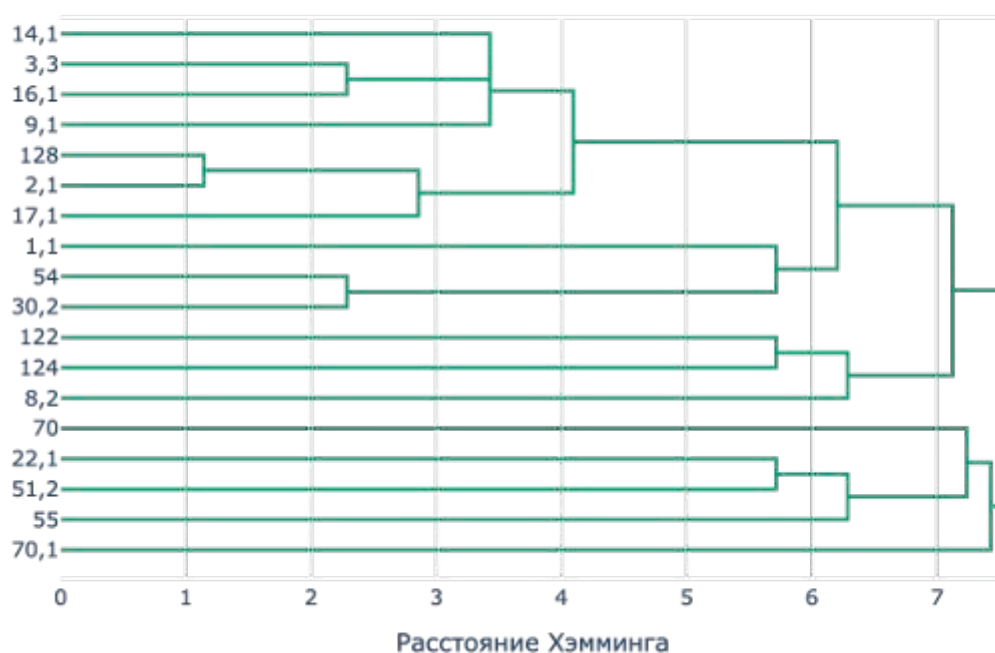


Рисунок 3 – Дендрограмма на основе данных МЛСТ штаммов *C. albicans*

В результате проведенного исследования выявлены следующие сиквенс-типы *C. albicans*: 3923, 3349, 363, 255, 624, 1469, 3299, 573, 3090, 747, 2724, 1411, 767, 3185, 2014, 4016, 1561, 1322. Типированные штаммы дифференцировались друг от друга как минимум по 2 локусам из 7. Однако, не выявлено штаммов с идентичными сиквенс-типами и заменами в одном локусе. Так, штаммы 14,1 и 16,1, 70 и 70,1, 1,1 и 30,2, 8,2 и 9,1 выделены от соответствующих пациентов. Был проведен анализ полученных данных МЛСТ исследованных штаммов и штаммов из базы данных PubMLST (Jolley K. A. et al., 2018). Выявленные сиквенс-типы встречались среди штаммов из Великобритании, Китая, США, Франции, Южной Кореи, Израиля, Колумбии, ЮАР, Нидерландов, Японии, Марокко, Кувейта. Большая часть штаммов выделена из ротоглотки (n=8), фекалий (n=6), мочи и вагинальных мазков (n=6), из крови (n=4), с кожи (n=1). Информация о сиквенс-типах, циркулирующих на территории России, ранее была представлена всего двумя штаммами сиквенс-типов 714 и 737, выделенных из крови в 2014 году, без какой-либо дополнительной сопроводительной информации и литературных данных (Рисунок 4).



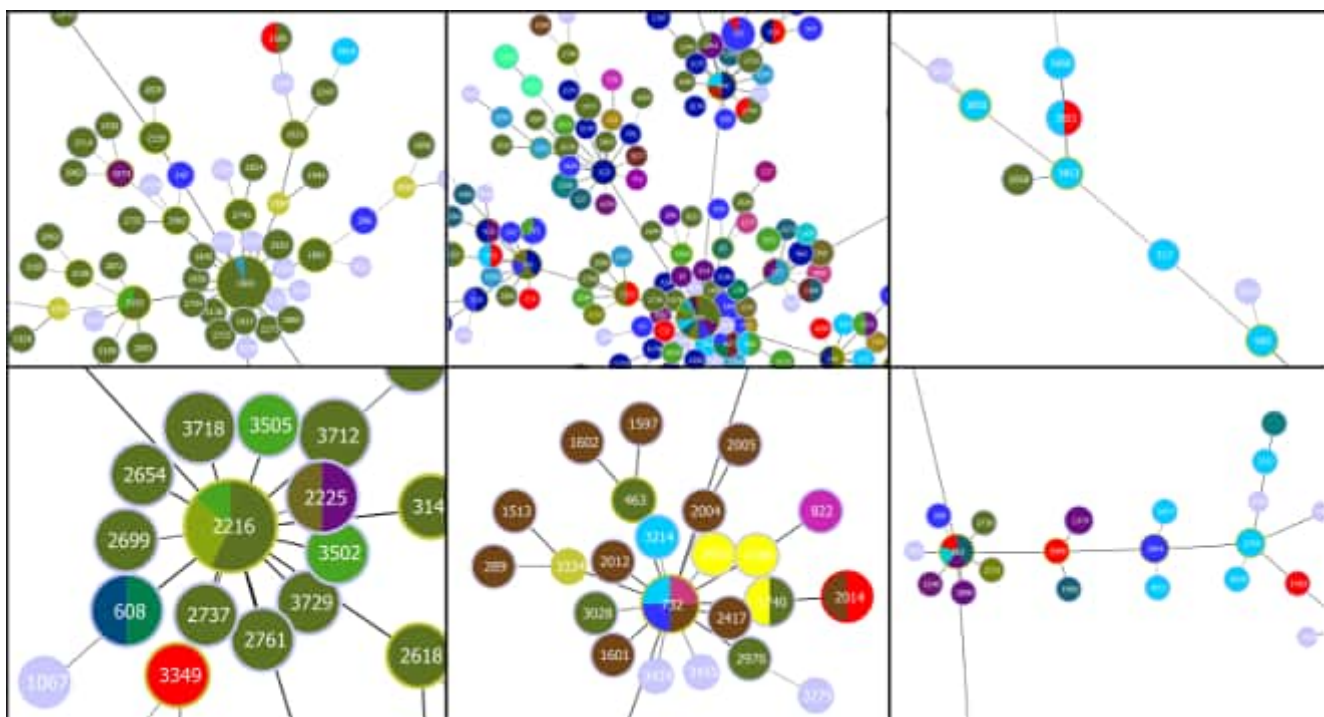


Рисунок 4 – МЛСТ штаммов *C. albicans*

Примечание: красным отмечены исследованные штаммы, темно-зеленым – штаммы из Китая, голубым – из США, синим – из Великобритании, коричневым – из Южной Кореи

Таким образом, штаммы *C. albicans* относились к сиквенс-типам 3923, 3349, 363, 255, 624, 1469, 3299, 573, 3090, 747, 2724, 1411, 767, 3185, 2014, 4016, 1561, 1322. Исследованные сиквенс-типы различались минимум по двум аллелям исследованных генов. Не выявлено генетически родственных штаммов и взаимосвязей полученных кластеров с фенотипом и генотипом. Идентичные сиквенс-типы встречались в Китае, Великобритании, США и Южной Кореи. Данные по России представлены двумя изолятами сиквенс-типов 714 и 737.

#### Экспрессия генов *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* и *ERG11* у штаммов грибов рода *Candida*, выделенных из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов

Исследовались уровни экспрессии РНК генов эффлюксных переносчиков *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* и гена *ERG11* (Рисунок 5).

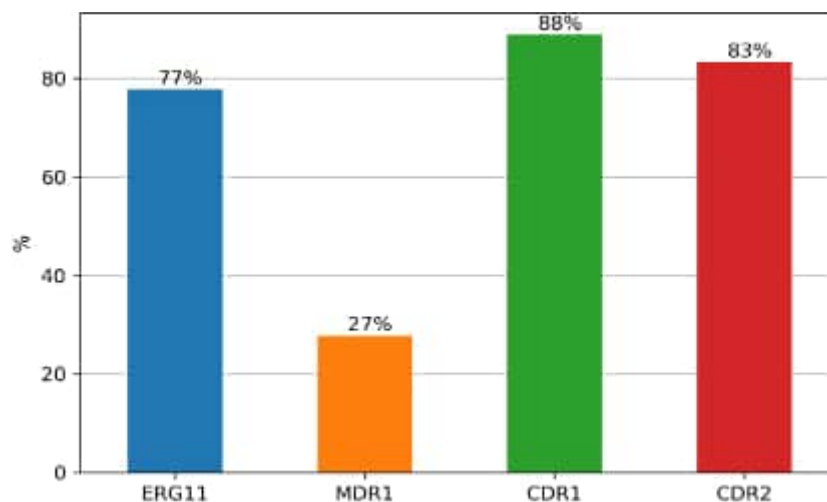


Рисунок 5 – Доли штаммов с повышенным уровнем экспрессии *ERG11*, *MDR1*, *CDR1*, *CDR2*

В ходе проведенного исследования было установлено, что у каждого из устойчивых штаммов в нашей выборке значительно ( $p < 0,01$ ) повышен уровень экспрессии по крайней мере одного из изучаемых генов. У большинства штаммов *C. albicans* были повышены уровни экспрессии генов *ERG11*, *CDR1* либо *CDR2* ( $p < 0,05$ ). У 1 штамма был повышен уровень экспрессии только *ERG11* (Рисунок 6А).

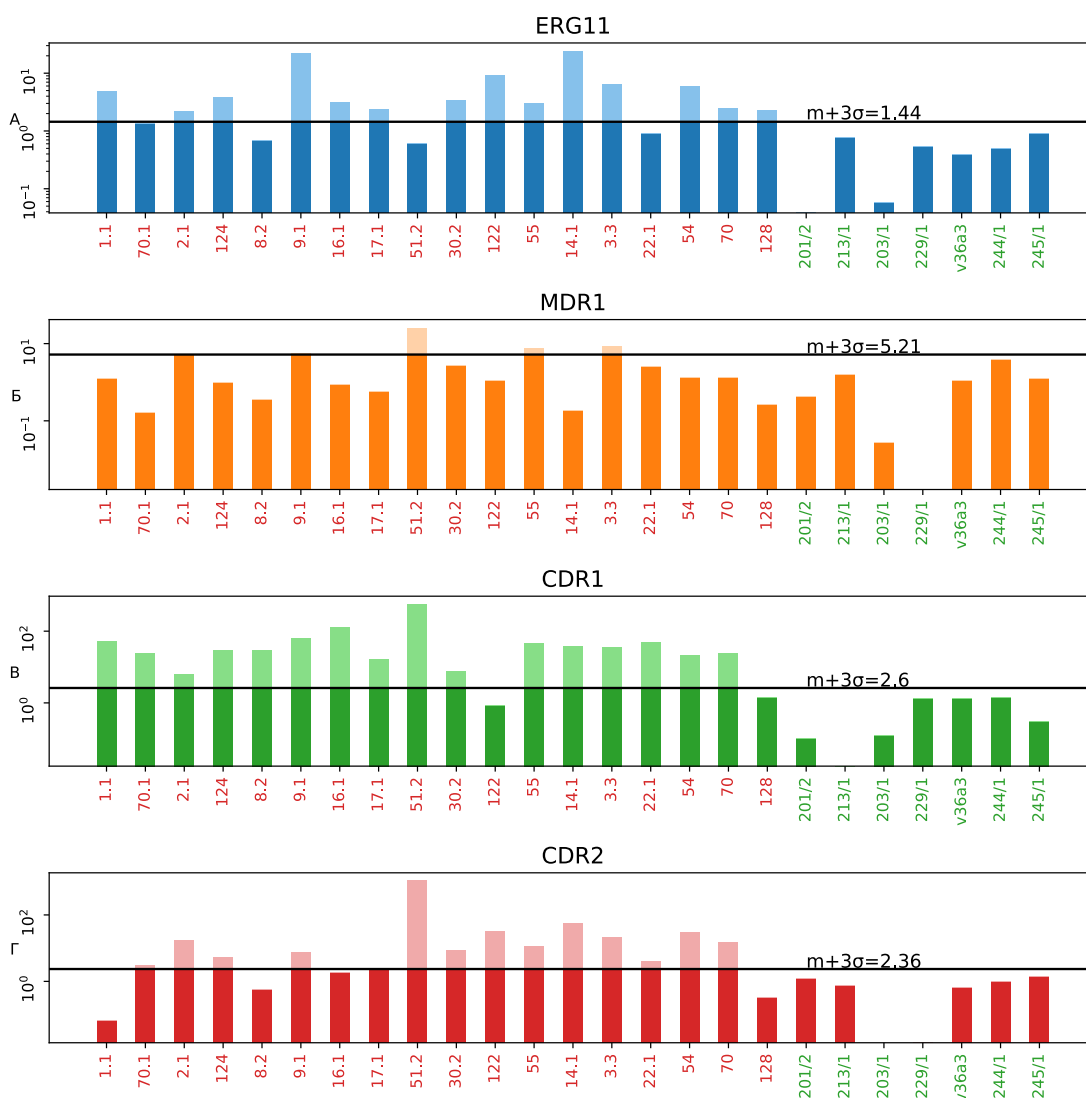


Рисунок 6 – Уровни экспрессии *ERG11* (А), *MDR1* (Б), *CDR1* (В), *CDR2* (Г) ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )

Примечание: линией обозначен уровень  $m+3\sigma$ , красным цветом обозначены номера устойчивых штаммов *C. albicans*, зеленым – номера чувствительных штаммов

Уровень экспрессии гена *MDR1* был повышен значительно реже других генов ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 6Б). У 13 штаммов (59%) одновременно был повышен уровень экспрессии *CDR1* и *CDR2* (Рисунок 6В, Г), выявлена равноценная взаимосвязь повышения экспрессии *CDR1* и *CDR2* ( $p < 0,01$ ). При повышении экспрессии *MDR1* наблюдалось одновременное повышение экспрессии генов *CDR1* или *CDR2* (100%,  $n=5$ ), а также *ERG11* (92,9%,  $n=4$ ) ( $p < 0,05$ ). Повышение экспрессии гена *MDR1* наблюдалось достоверно чаще при отсутствии повышения экспрессии

гена *ERG11* ( $p < 0,05$ ). У 10 штаммов (45,5%) было обнаружено одновременное повышение экспрессии *CDR1*, *CDR2* и *ERG11*, выявлены взаимосвязи между повышением уровней экспрессии *ERG11* и *CDR1*, *ERG11* и *CDR2* ( $p < 0,05$ ). Кроме того, выявлена взаимосвязь между повышением экспрессии *ERG11* и одновременным повышением экспрессии *CDR1*, *CDR2* ( $p < 0,05$ ). Также выявлена взаимосвязь между повышением экспрессии *CDR2* и одновременным повышением экспрессии *ERG11* и *CDR1* ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 7).

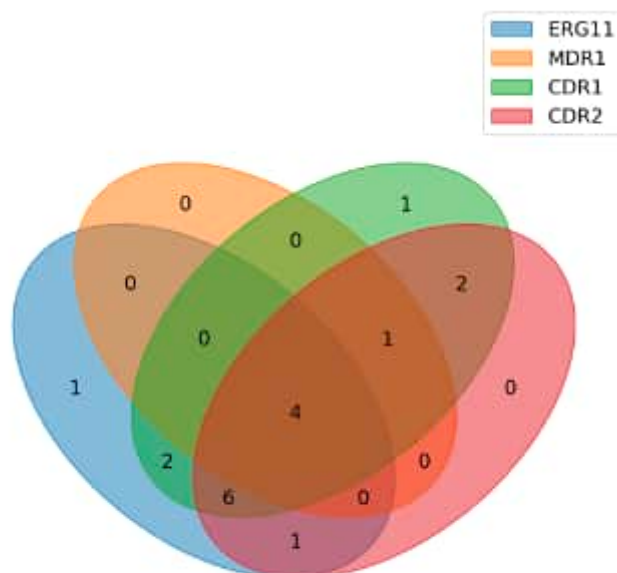


Рисунок 7 – Диаграмма Венна по количеству штаммов *C. albicans* с выявленной повышенной экспрессией генов *ERG11*, *MDR1*, *CDR1*, *CDR2*

Кроме того, у штаммов *C. albicans* с повышенной экспрессией *CDR2* МПК противогрибкового препарата вориконазола были значительно ниже, чем у штаммов без повышенной экспрессии данного гена ( $p < 0,05$ ). Также штаммы *C. albicans* с повышенной экспрессией гена *ERG11* обладали более высокой МПК амфотерицина В:  $0,86 \pm 0,49$  мкг/мл ( $p < 0,05$ ) (Таблица 6).

Таблица 6 – МПК противогрибковых препаратов для исследованных штаммов *C. albicans* (мкг/мл) (AND-Анидулафунгин, AMB-Амфотерицин В, MIC-Микафунгин, CAS- Каспофунгин, FCZ-5-Флуцитозин, POS- Позаконазол, VOR- Вориконазол, ITR- Итраконазол, FLU- Флуконазол)

№ штамма	AND	AMB	MIC	CAS	FCZ	POS	VOR	ITR	FLU
1,1	0,06	2	0,015	0,12	0,06	8	8	16	256
70,1	0,03	0,5	0,008	0,06	0,06	0,03	0,5	2	16
2,1	0,06	1	0,015	0,12	0,06	0,015	0,5	2	8
124	0,015	0,5	0,015	0,06	0,06	0,03	0,5	2	16
8,2	0,06	0,5	0,015	0,06	0,06	16	16	32	256
9,1	0,06	1	0,015	0,12	0,06	8	8	16	256
16,1	0,03	1	0,008	0,12	0,06	0,015	4	0,03	64
17,1	0,06	0,5	0,015	0,12	0,06	2	2	2	32
51,2	0,03	0,5	0,015	0,06	0,06	0,015	0,5	2	16
30,2	0,06	1	0,015	0,12	0,06	0,25	0,5	2	128
122	0,03	2	0,008	0,06	0,06	0,03	0,5	2	16

Продолжение таблицы 6

№ штамма	AND	AMB	MIC	CAS	FCZ	POS	VOR	ITR	FLU
55	0,015	0,5	0,008	0,03	0,06	0,03	0,5	2	8
14,1	0,06	0,5	0,06	0,12	0,06	4	4	8	128
3,3	0,03	1	0,008	0,06	0,06	0,03	0,5	2	8
22,1	0,03	0,5	0,015	0,12	0,12	0,03	0,5	2	16
54	0,03	1	0,008	0,06	0,06	0,03	0,5	2	8
70	0,03	2	0,008	0,06	0,06	0,12	0,5	2	8
128	0,03	1	0,008	0,06	0,06	0,03	0,5	2	8

Таким образом, было установлено, что у 100% штаммов *C. albicans*, выделенных из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов с ОФК, приобретенная устойчивость связана с несколькими вариантами повышенной экспрессии генов *ERG11*, *CDR1*, *CDR2* и *MDR1*, в том числе одновременным повышением экспрессии *CDR1* и *CDR2* (59%), одновременным повышением экспрессии гена *ERG11* как минимум с одним из исследуемых генов (72%).

**Мутации в гене *ERG11* *C. albicans* в популяции грибов рода *Candida*, выделенных из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов**

Были выявлены мутации в гене *ERG11*, приводящие к следующим аминокислотным заменам: E266D, S16V, D116E, G464S, I471T, V488I. E266D обнаружена у четырех штаммов, G464S – у двух штаммов, I471T – у одного штамма, V488I – у трех штаммов (Таблица 7).

Таблица 7 – Мутации в гене *ERG11* штаммов *C. albicans*

№ штамма	S16V	E266D	G464S	I471L	D116E	V488I
16,1	-	+	+	-	-	-
124	-	+	-	-	+	-
122	-	+	-	-	+	-
51,2	-	+	-	-	-	+
30,2	+	-	+	-	-	-
22,1	-	-	-	+	-	+
70,1	+	-	-	-	+	+
128	-	-	-	-	-	-
1,1	-	-	-	-	-	-
8,2	-	-	-	-	-	-
2,1	-	-	-	-	-	-
9,1	-	-	-	-	-	-
17,1	-	-	-	-	-	-
55	-	-	-	-	-	-
14,1	-	-	-	-	-	-
3,3	-	-	-	-	-	-
54	-	-	-	-	-	-
70	-	-	-	-	-	-

Мутация S16V обнаружена у двух штаммов. Данная мутация не описана в литературе, но расположена вне активного центра фермента и, таким образом, не должна оказывать заметного

влияния на устойчивость к противогрибковым препаратам. В нашей выборке также не выявлено взаимосвязи между наличием мутации S16V и МПК какого-либо из протестированных противогрибковых препаратов (Рисунок 8).

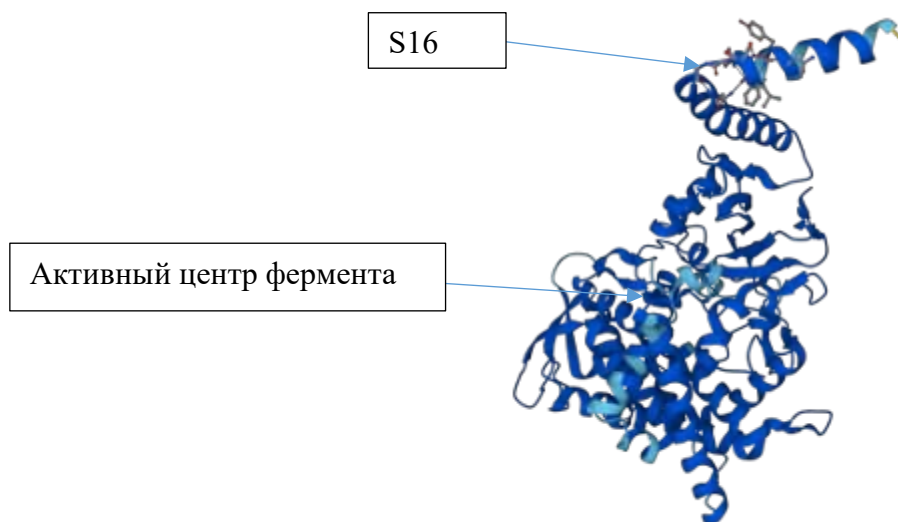


Рисунок 8 – Структура ланостерол 14-альфа-диметилазы с расположением замены S16V и активного центра фермента

Среди исследованных штаммов заметно чаще других встречалась мутация E266D (32,3%), особенно среди штаммов с повышенной экспрессией *ERG11* (42,9%) и *MDR1* (50,0%). При наличии у штамма *C. albicans* мутации V488I в гене *ERG11* с высокой долей вероятности ( $p < 0,05$ ) отсутствовала повышенная экспрессия гена *ERG11*. Мутация G464S встречалась только у штаммов с повышенной экспрессией гена *ERG11* ( $p < 0,05$ ). Помимо этого, в данной подгруппе штаммов установлена взаимосвязь между МПК анидулафунгина и препаратов из ряда азолов ( $r > 0,559$ ), а также каспофунгина ( $r = 0,706$ ). В то же время, наличие мутации E266D, напротив, ассоциируется с более высокой чувствительностью к итраконазолу ( $p < 0,05$ ): МПК  $v_{488I}^+ = 0,0375 \pm 0,0075$  мкг/мл, МПК  $v_{488I}^- = 8,1133 \pm 5,4323$  мкг/мл.

Таким образом, у большинства (70%) устойчивых к азолам штаммов *C. albicans* в нашей выборке выявлены те или иные мутации в гене *ERG11*, ассоциированные с повышением минимальной подавляющей концентрации препаратов данного ряда. Наиболее часто встречалась мутация E266D (32,3%). В то же время мутация E266D ассоциировалась с более низкой МПК итраконазола. Выявлены взаимосвязи между E266D и повышенной экспрессией *ERG11* и *MDR1*, а также между D116E, V488I и повышенной экспрессией *CDR2*.

## ВЫВОДЫ

1. Грибы рода *Candida* доминируют в составе микрофлоры ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингеальным кандидозом (53%). Среди выделенных микроорганизмов на долю *C. albicans* приходится только 30,7%.

2. Структура популяции *Candida spp.* в микрофлоре ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингеальным кандидозом представлена монокультурами либо гомогенными/гетерогенными ассоциациями. Наиболее часто встречаются в виде ассоциаций штаммы *C. albicans* (73,3%) и *C. krusei* (100,0%,  $p < 0,05$ ), при этом ассоциации гомогенного типа между штаммами различных сиквенс-типов характерны для *C. albicans* (72,7%,  $p < 0,001$ ).

3. По данным МЛСТ установлена принадлежность 18 штаммов *C. albicans* к сиквенс-типам 3923, 3349, 363, 255, 624, 1469, 3299, 573, 3090, 747, 2724, 1411, 767, 3185, 2014, 4016, 1561, 1322, которые различались минимум по двум аллелям исследованных генов. Не выявлено генетически родственных штаммов и взаимосвязей полученных кластеров с фенотипом и генотипом.

4. *Candida spp.*, выделенные из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингеальным кандидозом, в подавляющем большинстве устойчивы к азолам, в частности к флуконазолу (76,9%). Среди штаммов *C. albicans*, выделенных из гетерогенных ассоциаций, по сравнению с монокультурными, резистентность к имидазолам встречалась более чем в 2,5 раза чаще ( $p < 0,05$ ), а среди *C. non-albicans* из гетерогенных ассоциаций, по сравнению с *C. albicans*, в 4 раза чаще встречалась чувствительность к итраконазолу ( $p < 0,05$ ).

5. Устойчивость к азолам *C. albicans*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингеальным кандидозом в г. Москва, связана с несколькими вариантами повышенной экспрессии генов *ERG11*, *CDR1*, *CDR2* и *MDR1* (100%), в том числе одновременным повышением экспрессии *CDR1* и *CDR2* (59%,  $p < 0,01$ ), *ERG11* с как минимум одним из исследуемых генов (72% ,  $p < 0,05$ ), а также с мутациями в гене *ERG11* (38,9%).

6. Хромогенные питательные среды представляют собой эффективный метод в лабораторной диагностике для выделения чистых культур и предварительной идентификации видов *Candida spp.* до использования MALDI-TOF MS и ПЦР с видоспецифическими праймерами.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При проведении микробиологической диагностики орофарингеального кандидоза необходима видовая идентификация *Candida spp.*, так как значительная доля случаев вызывается *non-albicans* видами *Candida*, обладающими широким спектром природной устойчивости к противогрибковым препаратам.

2. Для идентификации и выделения штаммов различных видов *Candida spp.* из смешанных культур предпочтительно использование хромогенных питательных сред.

3 При проведении микробиологической диагностики орофарингеального кандидоза у ВИЧ-инфицированных пациентов необходимо определение чувствительности к противогрибковым препаратам, учитывая высокую распространенность приобретенной устойчивости *Candida spp.*, в особенности к препаратам азолового ряда.

### ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

В развитии данного направления представляется перспективным расширение выборки и числа наблюдений исследований видового состава, структуры популяции и устойчивости к противогрибковым препаратам возбудителей кандидозов у ВИЧ-инфицированных пациентов и других восприимчивых групп населения.

Более широкое и подробное исследование механизмов устойчивости к противогрибковым препаратам может позволить получить данные, влияющие на рекомендации по индивидуальной терапии кандидозов, поиск новых терапевтических средств, а также контроль за распространением штаммов с приобретенной устойчивостью к противогрибковым препаратам.

Разработка и внедрение в практику рутинной микробиологической диагностики протоколов молекулярно-генетических исследований для выявления наиболее значимых и распространенных механизмов устойчивости к противогрибковым препаратам.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Воропаев, А.Д.** Анализ антимикотической чувствительности грибов рода *Candida*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов / Ю. С. Филина, **А. Д. Воропаев**, М. В. Толочко, Д. А. Екатеринчев, Е. А. Воропаева, Ю. В. Несвижский, Е. В. Волчкова, Е. А. Богданова // Успехи Медицинской Микологии, Четвертый Съезд Микологов России, 12-14 апреля 2017 г., г. Москва. – Москва, 2017. – Т. 17. – С. 128-129.

2. **Воропаев, А.Д.** Характеристика штаммов грибов рода *Candida*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов / **А.Д. Воропаев**, Д.А. Екатеринчев, Ю.С. Филина, Е.В. Волчкова, Е.А. Воропаева, Ю.В. Несвижский // Успехи Медицинской Микологии, Конференция по медицинской микологии, Социально-значимые микозы, 11–12 апреля 2019 г., г. Москва. – Москва, 2019. – Т. 20. – С. 322-323.

3. **Воропаев, А.Д.** Особенности оппортунистических микроорганизмов, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов / **А.Д. Воропаев**, Д.А. Екатеринчев, Ю.С. Филина, Ю.В. Несвижский, Е.А. Воропаева // Проблемы медицинской микологии, Российско-китайский конгресс по медицинской микробиологии, эпидемиологии, клинической микологии и иммунологии (XXII Кашкинские чтения), 12–15 июня 2019 г., г. Санкт-Петербург. – Санкт-Петербург, 2019. – Т. 21. – С. 52-53.

4. **Воропаев, А.Д.** Анализ эффективности различных методов идентификации грибов рода *Candida* / **А.Д. Воропаев**, Д.А. Екатеринчев, Ю.С. Филина, Ю.В. Несвижский, Е.А. Воропаева, Е.И. Лиханская // Успехи Медицинской Микологии, Четвертый международный микологический форум, 14–15 апреля 2020 г., г. Москва. – Москва, 2020. – Т. 21. – С. 317-320.

5. **Воропаев, А.Д.** Механизмы устойчивости к азолам штаммов *Candida albicans*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов / **А.Д. Воропаев, Д.А. Екатеринчев, Ю.С. Филина, Ю.Н. Урбан, Ю.В. Несвижский, Е.А. Воропаева, Е.И. Лиханская** // Проблемы медицинской микологии, Всероссийский Конгресс по медицинской микробиологии, эпидемиологии, клинической микологии и иммунологии (XXIII Кашкинские чтения), 9-11 ноября 2020 г., г. Санкт-Петербург. – Санкт-Петербург, 2020. – Т. 22. – С. 63.

6. **Воропаев, А.Д.** Мутации в гене *ERG11 Candida albicans*, выделенных у ВИЧ-инфицированных пациентов / **А.Д. Воропаев, Д.А. Екатеринчев, В.А. Воропаева, Е.И. Лиханская, Ю.В. Несвижский** // Проблемы Медицинской Микологии, Всероссийский конгресс по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXIV Кашкинские чтения), 9–11 июня 2021 г., г. Санкт-Петербург. – Санкт-Петербург, 2021. – Т. 23. – С. 68.

7. **Воропаев, А.Д.** Структура сообщества грибов рода *Candida* в ротоглотке ВИЧ-инфицированных пациентов / **А.Д. Воропаев, Д.А. Екатеринчев, Ю.В. Несвижский, В.В. Зверев, С.С. Афанасьев, Е.В. Волчкова, М.С. Афанасьев, Е.В. Буданова, Р.Е. Бошьян, Е.И. Лиханская, В.А. Воропаева, Ю.С. Филина, М.Э. Сулейманова, Ю.Н. Урбан** // Инфекция и иммунитет. – 2021. – № 4 (11). – С. 737–744.

8. **Воропаев, А.Д.** Экспрессия *CDR1, CDR2, MDR1* и *ERG11* у устойчивых к азолам штаммов *Candida albicans*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов в городе Москва / **А.Д. Воропаев, Д.А. Екатеринчев, Ю.Н. Урбан, В.В. Зверев, Ю.В. Несвижский, Е.А. Воропаева, Е.И. Лиханская, М.С. Афанасьев, С.С. Афанасьев** // Инфекция и иммунитет. – 2022. – № 5 (12). – С. 929–937.

9. **Воропаев, А.Д.** Взаимосвязь чувствительности *Candida albicans* к антимикотическим препаратам с архитектурой их сообщества в ротоглотке ВИЧ-инфицированных пациентов / **Ю. В. Несвижский, А. Д. Воропаев, С. С. Афанасьев, Е. В. Волчкова, М. С. Афанасьев, Е. А. Воропаева, М. Э. Сулейманова, Е. В. Буданова, Ю. Н. Урбан** // Журнал Микробиологии, Эпидемиологии И Иммунобиологии. – 2023. – Т. 100, № 1. – С. 26-33.

#### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

МПК – минимальная подавляющая концентрация;

ОФК – орофарингеальный кандидоз;

$\sigma$  – стандартное отклонение;

*CDR1* – *Candida* drug resistance 1;

*CDR2* – *Candida* drug resistance 2;

m – базовые средние значения для чувствительных штаммов;

MRSA – метициллин-резистентный золотистый стафилококк;

*MDR1* – multidrug resistance;

MLST – типирование на основе мультилокусных последовательностей;

MUSCLE – Multiple Sequence Comparison by Log-expectation (множественное сравнение последовательностей по математическому ожиданию логарифма правдоподобия);