DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-4-246-251

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 573.61+616.98:578.828.6-06:616-002.828-022.369-078

Кузнецова М.В.[1,2], Чарушина И.П.[1], Максимова А.В.[2], Баландина С.Ю.[3], Демаков В.А.[2,3], Фельдблюм И.В.[1]

ЭПИДЕМИОЛОГО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУР *CANDIDA ALBICANS*, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В СТАЦИОНАРЕ ДЛЯ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

[1] ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава РФ, 614990, Пермь;
[2] ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов» УрО РАН, 614081, Пермь;
[3] ГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», 614990, Пермь

Исследовано 70 культур Candida albicans, выделенных от 19 пациентов (n = 45) и с объектов больничной среды (n = 25) в июле 2013 г. и в октябре 2014 г. в специализированном отделении для ВИЧ-инфицированных. Дана генотипическая характеристика кандид на основе ПЦР интронной области гена 25S рРНК, а также их биологические особенности с учетом генотипа. Частота встречаемости кандид A, B, C и D генотипов составила 58,6, 10, 18,6 и 12,8% соответственно. Выявлено существенное преобладание C. albicans генотипа A в различных комменсальных (зев) и транзиторных (кожные покровы) локусах. Они же в большинстве случаев послужили причиной кандидозной инфекции, в том числе инвазивного кандидоза. Кроме того, представители этой группы чаще (85%) контаминировали предметы больничной среды (p = 0,0013). Культуры C. albicans генотипа D (Candida dubliniensis) были малочисленными, они выделялись только из экологических биотопов пациентов без клиники кандидоза, не обнаруживались в окружающей среде, проявляли наименьшую активностью экзоферментов (фосфолипазы и протеазы) и оказались чувствительны к протестированным антимикотикам. В различных биотопах одного пациента, как правило, персистировал единственный штамм, в ряде случаев выделялись и генотипически отличные культуры. Пребывание пациента в стационаре способствовало присоединению C. albicans других генотипов, в двух случаях отмечена полная смена культур. Таким образом, в больничной среде специализированных стационаров могут формироваться и длительно циркулировать госпитальные штаммы C. albicans, обладающие высокой ферментативной активностью, источником которых служат сами ВИЧ-инфицированные пациенты, что повышает риск возникновения кандидозной инфекции.

Ключевые слова: *ВИЧ-инфекция; Candida albicans; генотипирование; 25S рРНК; биологические свойства.*

Для цитирования: *Кузнецова М.В., Чарушина И.П., Максимова А.В., Баландина С.Ю., Демаков В.А., Фельдблюм И.В. Эпидемиолого-микробиологическая характеристика культур Candida albicans, циркулирующих в стационаре для ВИЧ-инфицированных пациентов. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (4): 246-251. DOI:hppt://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-4-246-251*

Kuznetsova M.V.[1,2], Charuchina I.P.[1], Maksimova A.V.[2], Balandina S.Yu.[3], Demakov V.A.[2,3], Feldblum I.V.[1]

THE EPIDEMIOLOGICAL MICROBIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF CULTURES OF CANDIDA ALBICANS CIRCULATING IN HOSPITAL FOR HIV-INFECTED PATIENTS

[1]The E.A. Wagner Permskii state medical academy of Minzdrav of Russia, 614990 Perm, Russia
[2]The institute of ecology and genetics of microorganisms of th Uralskii branch of the Russian academy of sciences, 614081 Perm, Russia
[3]The Permskii state national research institute, 614990 Perm, Russia

The study was organized relating to 70 cultures of Candida albicans isolates from 19 patients (n=45) and from objects of hospital environment(n=25) in July 2013 and October2014 in specialized department for HIV-infected patients. The genetypical characteristic was given related to candida on the basis of polymerase chain reaction of intronic area of gene 25s pRNA and also their biological characteristics taking into account genotype. The rate of prevalence of Candida genotypes A, B, C and B made up to 58.6%, 10%, 18.6% and 12,8% correspondingly. It was established significant predominance of C.albicans genotype A in various commensal (pharynx) and transitory (skin) loci. In most cases, they were a cause of candidiasis, including invasive candidiasis. Besides, representatives of this group more frequently (85%) contaminated objects of hospital environment (p=0.0013). The cultures of C.albicans genotype B (Candida dubliniensis) were small in numbers and were isolated only from ecological biotypes of patients without clinic of candidiasis, were not detected in environment, were least active with exo-enzymes (phospholipase and protease) and were sensitive to tested anti-mycotic. In various biotops of single patients as a rule the only one strain persisted. In a number of cases genotypically different cultures were isolated. The residence of patient in hospital enhanced joining of C.albicans of other genotypes and in two cases were established a total change of cultures. Thus, in hospital environment of specialized hospitals can develop and long-time circulate hospital strains of C.albicans with high enzyme activity. The source are HIV-infected patients themselves that increases risk of of development of candidiasis.

Keywords: *HIV-infection; Candida albicans; genotyping; 25SpRNA; biological characteristics.*

Для корреспонденции: *Кузнецова Марина Валентиновна*, д-р мед. наук, доц. каф. микробиологии и вирусологии с курсом КЛД, ст. науч. сотр. лаб. мол. микробиологии и биотехнологии ИЭГМ УрО РАН, 614081, Пермь, e-mail: mar@iegm.ru

For citation: *Kuznetsova M.V., Charuchina I.P., Maksimova A.V., Balandina S.Yu., Demakov V.A., Feldblum I.V. The epidemiological microbiological characteristics of cultures of Candida albicans circulating in hospital for HIV-infected patients. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (4): 246-251. (in Russ.). DOI: hppt://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-4-246-251*

For correspondence: *Kuznetsova M.V.,* doctor of medical sciences, associate professor of the chair of laboratory molecular microbiology and biotechnology. e-mail: mar@iegm.ru

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 25.11.2016
Accepted 15.01.2017

Спектр микромицетов, выделяемых от ВИЧ-инфицированных людей, за последнее время существенно расширился. Тем не менее, представители рода Candida попрежнему остаются наиболее значимыми этиопатогенами. В зависимости от формы заболевания, по разным данным, на долю *Candida albicans* приходится от 30 до 80% всех дрожжеподобных грибов, что обусловлено высоким уровнем их бессимптомного носительства [1—5, 11, 12]. Самое большое число поражений отмечают в полости рта; далее по убыванию встречаются персистирующий вульвовагинит, инвазивный кандидоз, кандидоз пищевода и поверхностный кандидоз кожи [5].

Инфицирование кандидами может происходить как эндогенным, так и экзогенным путем [6, 12—15]. Длительность пребывания пациентов в стационаре способствует их колонизации внутрибольничными штаммами, поэтому состояние специализированных отделений медицинских организаций, где по результатам ряда исследований выявлено преобладание грибковой флоры над бактериальной, играет немаловажную роль [7]. Ряд вопросов по эпидемиологии внутрибольничных кандидозов ВИЧ-инфицированных пациентов, таких как установление резервуаров, источников и путей передачи инфекции, особенности циркуляции *C. albicans* в больничной среде, остается без ответа. Решение проблемы без применения современных молекулярных методов исследования не представляется возможным. Кроме того, самостоятельный интерес представляет генотипическая характеристика *C. albicans*, изолированных от пациентов и с объектов больничной среды специализированного стационара.

Использование рибосомных последовательностей при идентификации и генотипировании широко применяют для микромицетов, включая *C. albicans* [16, 17]. M. McCullough и соавт.[18] предложили с помощью полимеразной цепной реакции по конечному продукту (specific-ПЦР) с использованием праймера, предназначенного для перекрытия интронного региона гена *25S* рРНК, классифицировать штаммы *C. albicans* на 4 генотипа по длине получаемого ПЦР-продукта. Хорошую дискриминирующую способность на штаммовом уровне имеют методы, в основе которых лежит использование праймеров, комплементарных консервативным повторяющимся последовательностям ДНК. Так, несколько исследований показали, что ПЦР повторяющихся внегенных полиндромных последовательностей (repetitive estrogenic palindromic sequence PCR; rep-ПЦР) хорошо коррелировала с пульс-электрофорезом — молекулярной технологией, которая признана золотым стандартом в изучении эпидемиологии микроорганизмов [19—21].

Цель исследования — микробиологическая и молекулярно-генетическая характеристика культур *C. albicans*, изолированных в стационаре для ВИЧ-инфицированных пациентов с оценкой их эпидемиологической значимости.

Материал и методы. Исследовано 70 штаммов *C. albicans*, изолированных в специализированном отделении Пермской краевой клинической инфекционной больницы в июле 2013 г. (скрининговое исследование) и в октябре 2014 г. (проспективное эпидемиологическое наблюдение). Из них 45 штаммов выделены от 19 пациентов (колонизация и инфекция), 25 штаммов — с объектов больничной среды (тумбочки, ручки дверей, вентиляционные решетки).

Виды штаммов идентифицировали по культурально-морфологическим признакам согласно Приказу № 535 от 22.04.1985 г., МУК 4.2.2942—11. Определение чувствительности штаммов к амфотерицину, флюконазолу и кетоконазолу проводили диско-диффузионным методом согласно МУК 4.2.1890—04, NCCLS M44-P, 2003. Активность фосфолипазы и протеазы оценивали согласно M.F. Price и соавт. (1982), R. Ruchel и др. (1982) в модификации Т.И. Карпуниной и соавт. (2006) [8, 22, 23].

Тотальную ДНК выделяли модифицированным методом, предложенным J. Marmur (1999). Генетическое типирование штаммов проводили посредством трех методов: на основе детерминации последовательности интронной области гена *25S* рРНК с праймерами CA-INT-L (5'-ATAAGGGAAGTCGGCAAAATAGATCCGTAA) и CA-INT-R (5'-CCTTGGCTGTGGTTTCGCTAGATAGTAGAT) [17], ERIC-ПЦР (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequences) с праймером ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG) [24] и RAPD-ПЦР (Random Amplified Polymorphic DNA) с произвольными праймерами A, 6, 13 [25]. Амплификацию проводили на термоциклере DNA Engine Dyad Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Протокол ПЦР для пары CA-INT-L/CA-INT-R: начальный цикл — 96°C, 2 мин, затем 30 циклов (денатурация — 96°C, 30 с, отжиг — 60°C, 3 с, элонгация — 74°C, 30 с), заключительный цикл — 72°C, 3 мин. Температура и время отжига при проведении ERIC- и RAPD-ПЦР: 45°C — 1 мин и 36°C — 30 с соответственно. Электрофоретическое разделение продуктов реакции проводили в 1,2% агарозном геле при напряженности электрического поля 6 В/см. Визуализацию полос и документирование данных осуществляли с помощью системы гель-документации Gel-Doc XR (Bio-Rad, США). Дендрограммы филогенетического родства штаммов построены с применением компьютерного обеспечения Quantity One (версия 4.6.1, Bio-Rad, США).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием статистического пакета Microsoft Excel 2000 и программы Statistica 6.0. При анализе полученных результатов определяли среднее арифметическое и его ошибку ($M \pm m$). Достоверность отличий двух независимых выборок определяли по критерию Манна—Уитни (M-U test). При $p < 0,05$ делали вывод о наличии статистически значимой разницы между сравниваемыми выборками. Сравнение качественных признаков выполняли с использованием коэффициента ассоциации Fisher (φ-критерий) и вычислением χ^2.

Результаты. При оценке распространенности кандид в зеве и на коже ВИЧ-инфицированных пациентов выявлено их достоверное преобладание в зеве ($p = 0,0199$). В крови *C. albicans* встречались значительно реже, чем в сайтах персистирования данного вида ($p < 0,005$). Генетическая дискриминация на основе гена *25S* рРНК позволила распределить

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-4-246-251

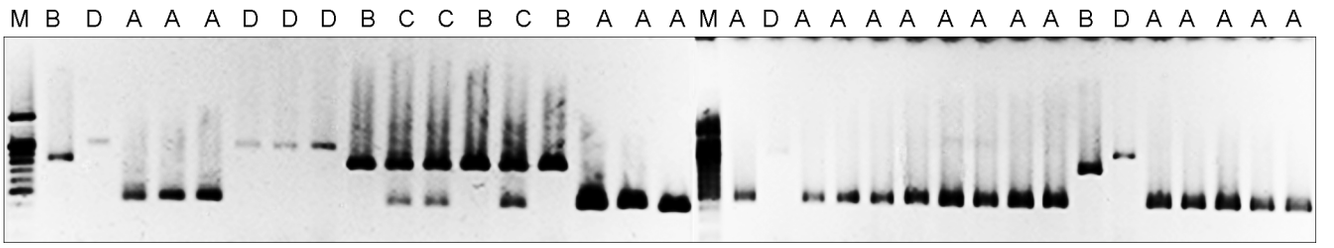

Рис. 1. Пример электрофореграмм продуктов амплификации интронной области гена *25S* рРНК *C. albicans*.
M — маркер молекулярных масс 100 bp + 1,5 kb; A, B, C, D — определенный генотип клинического изолята.

все культуры *C. albicans* в 4 геномогруппы (рис. 1): генотип A (450 п. н.), генотип B (840 п. н.), генотип C (450 и 840 п. н.), а также генотип D (1080 п. н.), выделенный D.J. Sullivan и соавт. [26, 27] в *Candida dubliniensis*, но таксономический статус последнего как отдельного вида вызывает дискуссию из-за недостаточного количества фенотипических и генетических признаков. Частота встречаемости кандид A, B, C и D генотипов составила 58,6, 10, 18,6 и 12,8% соответственно. Грибы *C. albicans*, отнесенные к генотипу A, преобладали как у пациентов (44,5%), так и в группе изолятов с предметов больничной среды (84%) (см. таблицу). Второй по значимости оказалась группа с генотипом C, самым малочисленным — представительство культур генотипов B и D, при этом последние обнаружены только в экологических биотопах без признаков кандидозной инфекции. Показано, что штаммы *C. albicans*, относящиеся к различным генотипам, за исключением генотипа D, могут сохраняться/циркулировать на предметах больничной среды (тумбочки, ручки дверей, вентиляционные решетки).

При оценке частоты встречаемости *C. albicans* различных генотипов в материалах ВИЧ-инфицированных пациентов и предметах больничной среды выявлено, что культуры генотипа A достоверно чаще выделяли с предметов больничной среды ($p = 0{,}0013$), а генотипа D — от пациентов ($p = 0{,}0141$). Преимущественного сайта выделения культур, принадлежащих к определенному генотипу, при сравнении взятых биотопов (зев и другие, кожные покровы и другие и т.д.) не обнаружено ($p \geq 0{,}05$). Тем не менее, анализ распределения кандид в биотопах показал, что *C. albicans* генотипа A встречаются достоверно чаще у пациентов и на предметах больничной среды, чем представители других генотипов ($p < 0{,}05$).

Интересным представлялось оценить биологические свойства *C. albicans*, отнесенных к разным генотипам. Фосфолипазная активность ($M \pm m$) составила 2,86 ± 0,38, 2,52 ± 0,31, 2,49 ± 0,35 и 1,86 ± 0,48 усл. ед. для культур генотипов A, B, C и D соответственно. Уровень протеазной активности для соответствующих групп — 1,4 ± 0,56, 1,33 ± 0,33, 1,72 ± 0,86 и 1,24 ± 0,15 усл. ед. Выявлена умеренная корреляция между данными свойствами ($r = 0{,}5046$; $p = 0{,}05$). Обращает на себя внимание, что культуры генотипа D проявляли наименьшую ферментативную активность в обоих случаях, хотя разница с кандидами других генотипов оказалась статистически незначимой во всех вариантах (M-U test: $p > 0{,}05$). Показательно, что не обнаружено достоверных отличий в активности фосфолипазы и протеазы для групп изолятов из разных биотопов (фосфолипаза: 2,51 ± 0,42 усл. ед. — зев, 2,63 ± 0,14 усл. ед. — кожные покровы, 2,62 ± 0,03 усл. ед. — кровь; протеаза: 1,49 ± 0,43 усл. ед. — зев, 1,32 ± 0,57 усл. ед. — кожные покровы), а также от пациентов из больничной среды (M-U test: $p > 0{,}05$). При анализе чувствительности *C. albicans* к антимикотикам выявлено, что все культуры были чувствительны к амфотерицину и флуконазолу. К кетоконазолу были устойчивы 9 штаммов генотипа A и 3 штамма генотипа B, тогда как в группе C и D все культуры были чувствительными.

Распределение штаммов *C. albicans*, относящихся к различным генотипам по 25S рРНК, с учетом источника выделения

Источник выделения	Число штаммов, *n*/%				
	общее	генотип			
		A	B	C	D
Пациенты, всего	45	20/44,5	6/13,3	10/22,2	9/20,0
Зев	26	9/34,6	3/11,5	8/30,8	6/23,1
Кожные покровы	15	8/53,3	2/13,3	2/13,3	3/20,0
Кровь	4	3/75,0	1/25,0	—	—
Предметы больничной среды	25	21/84,0	1/4,0	3/12,0	—
Всего...	70	41/58,6	7/10	13/18,6	9/12,8

Специальное исследование было направлено на оценку длительности циркуляции *C. albicans* в стационаре и определение эпидемиологических связей. Анализ 38 штаммов, выделенных в два этапа/срока из разных локусов пациентов в 2014 г., показал, что у 11 человек при поступлении в отделение во всех материалах обнаружены культуры одного генотипа, у 3 больных — культуры разных генотипов. Через неделю у 12 пациентов выделялись штаммы идентичных генотипов, при этом в 5 случаях к уже имеющимся присоединились штаммы, принадлежащие к другому генотипу, а в 2 произошла полная смена культур. Таким образом, в большинстве случаев во всех материалах, взятых из различных локусов пациента, присутствовали штаммы сходного генотипа. Это подтверждает возможность эндогенного инфицирования. В момент поступления, а особенно после пребывания в стационаре одновременно от одного больного могли быть выделены штаммы *C. albicans*, относящиеся к разным генотипам, что обусловлено экзогенным путем инфицирования, особенно в условиях высокой обсемененности объектов больничной среды.

Молекулярный скрининг, ориентированный на внутривидовую дифференцировку выделенных культур, проводили с помощью технологии Rep-ПЦР, хорошо зарекомендовавшей себя для типирования кандид [28]. Для общей характеристики и формирования геномогрупп использовали ERIC-ПЦР, в сомнительных случаях для улучшения дискриминации использовали RAPD-ПЦР с 3 праймерами, что считается обязательным при данном способе типирования [29]. В результате сравнительного анализа культуры *C. albicans* распределились в 9 геномогруппах, включающих идентичные или близкородственные изоляты, и 30 изолятов представляли индивидуальные геномовариантны (рис. 2, см. обложку). В состав геномогрупп IV и VII входили штаммы, выделенные только с объектов внешней среды стационара и рук больных, в остальных

присутствовали изоляты, полученные как с объектов больничной среды, так и из нестерильных локусов (зев) обследованных пациентов. Значительный интерес представляла геномогруппа VI, в которую вошел изолят, выделенный из крови пациентки Г. с инвазивным кандидозом (№ 60), а также изоляты из зева больного Д. и с объектов больничной среды в этой же палате (№№ 26, 56, 58, 59). Более того, сравнительный анализ ДНК *C. albicans*, полученных в разные сроки, показал, что штамм, изолированный из крови пациентки Пк. с инвазивным кандидозом (2013), и культуры геномогруппы VI (2014) полностью идентичны и принадлежат к генотипу А на основе типирования *25S* рРНК (рис. 3), т. е. инвазивный кандидоз у двух больных, госпитализированных в разное время, вызван одним штаммом *C. albicans*. Кроме того, этот же штамм циркулировал во внешней среде инфекционного стационара и оказался причиной кандидозного поражения полости рта других пациентов, которые не были связаны между собой вне лечебного учреждения. По-видимому, пациентка, находившаяся на лечении в стационаре в июле 2013 г., стала источником контаминировавшего объекты больничной среды отделения госпитального штамма *C. albicans*, который вызвал поражение полости рта и инвазивный кандидоз больных, госпитализированных в 2014 г.

Обсуждение. Известно, что у здоровых лиц *C. albicans* могут кратковременно или в течение длительного периода колонизировать кожные покровы, слизистые оболочки и пищеварительный тракт. «Доброкачественность поведения» кандид у здоровых лиц не обусловлена комменсализмом, а скорее служит результатом сильных врожденных и адаптивных реакций иммунной системы хозяина, которые ограничивают рост потенциально опасного микроорганизма в экологических биотопах [30]. Присутствие генотипически сходных кандид в различных локусах или их длительное персистирование в пределах одного способствует альтерации, определяющей начальную фазу воспаления. В организме иммунокомпрометированных людей чрезмерный рост *C. albicans* вкупе с повреждением слизистой в местах микробного обсеменения может облегчить последующую инвазию в ткани и/или их гематогенную транслокацию, вызывая различные, в том числе и системные кандидозы [29]. Возрастающая частота инвазивных кандидозов и высокая смертность, связанная с диссеминированной формой заболевания, актуализируют молекулярные исследования для понимания эпидемиологии грибковых инфекций.

Генотипическая характеристика кандид на основе последовательности интронной области *25S* рРНК позволила выявить преобладание *C. albicans* генотипа А в различных локусах пациентов и на объектах больничной среды в специализированном стационаре. Учитывая, что представители *C. albicans* этого генотипа составляют большинство при поверхностных кандидозах (75,6%) [31], оральном кандидозе (57,1%) и часто выделяются со слизистой полости рта у здоровых лиц (64,7%) [16], преимущественное распространение их у ВИЧ-инфицированных людей вполне ожидаемо. Результаты, показывающие, что *C. albicans* генотипа D обнаружены только в экологических биотопах без признаков кандидозной инфекции согласуются с исследованием Y. Takagi и соавт. [16], в котором культуры данного генотипа были обнаружены только у здоровых людей, но не у больных кандидозом. Интересно, что в этой же работе подчеркнуто, что кандиды генотипа С встречались только в группе пациентов с кандидозной инфекцией. По нашим данным, представители этой группы у ВИЧ-инфицированных пациентов обнаруживались на коже и в зеве без признаков инфекционного процесса.

Считается, что из внешней среды *C. albicans* выделяются реже, чем другие виды кандид, что может быть следствием их большей патогенности (адаптации к паразитизму) для человека [32]. Предметы больничной среды контаминировали представители 3 генотипов, со значительным преобладанием *C. albicans* генотипа А, который доминировал и у пациентов ($p < 0,05$). Встречаемость *C. albicans* генотипа А показана в подавляющем большинстве исследований, где использовали типирование на основе гена *25S* рРНК, но соотношение кандид различных генотипов в клинических образцах варьировало и отличалось среди сообщений [16, 17, 31]. Однако в единственном исследовании, где определяли связь между генотипом культуры и источником изоляции, существенной разницы в распределении кандид не выявлено [33]. Преимущественного сайта выделения культур, принадлежащих к определенному генотипу, при сравнении взятых биотопов (зев и другие, кожные покровы и другие и т.д.) у ВИЧ-инфицированных пациентов в представленной работе также не обнаружено ($p > 0,05$).

Патогенность кандид обусловлена в первую очередь продукцией фосфолипазы [34] и протеазы [35]. Выявлено, что уровень активности данных ферментов у *C. albicans*, изолированных у ВИЧ-позитивных людей, по принятой классификации определен как средний и высокий [36]. Ранее M. Ollert и соавт. [37] показали, что протеолитическая актив-

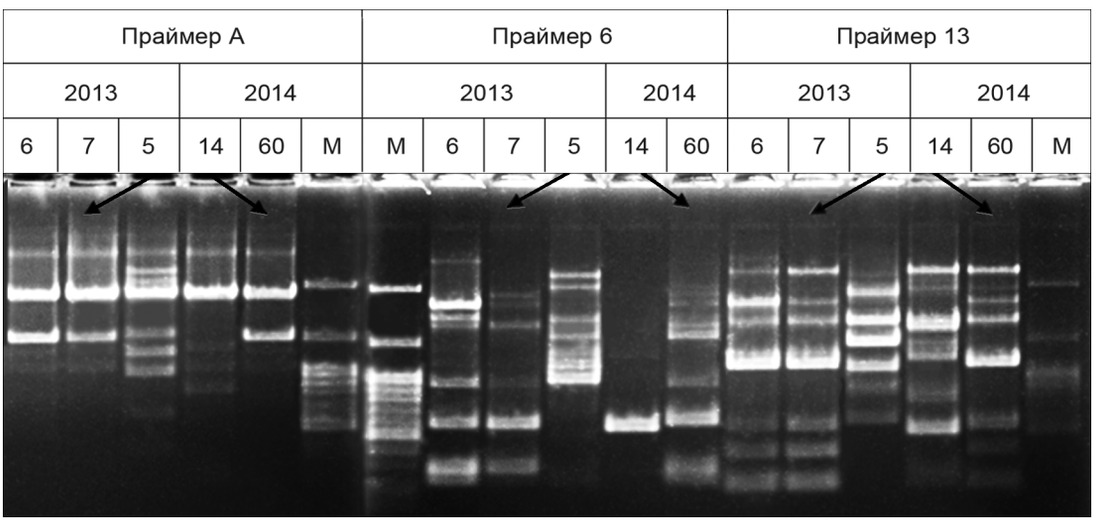

Рис. 3. Электрофореграммы продуктов RAPD-ПЦР с использованием праймеров А, 6, 13.
М — маркеры молекулярных масс 100 bp и 1 kb; №№ — изоляты *C. albicans*, выделенные от больных.

ность культур, выделенных от больных СПИДом, была выше, чем от не зараженных вирусом, и доказали важность фермента в патогенезе орального кандидоза при ВИЧ-инфекции. Сходные данные получены и в отношении фосфолипазы [38]. Впервые проведена оценка и сравнение биологических свойств *C. albicans* разных генотипов. Фосфолипазная активность убывала в ряду A > B > C > D, протеазная активность — в ряду C > A > B > D. Кандиды генотипа D проявляли наименьшую ферментативную активность в обоих случаях, что может быть косвенным подтверждением того, что культуры данного генотипа, по-видимому, редко становятся возбудителями кандидозов, а присутствуют как транзиторная факультативная микрофлора, в том числе и у пациентов с ВИЧ-инфекцией.

В настоящее отмечают рост резистентности *C. albicans* к флуконазолу [9, 29]. В сообщениях об устойчивости кандид к антимикотикам, выделенными от ВИЧ-инфицированных пациентов, приведены сильно отличающиеся показатели. Например, только 43,8% культур *C. albicans*, изолированных у ВИЧ-позитивных людей с хронической патологией ЛОР-органов, были чувствительны к флуконазолу [10]. В другом исследовании флуконазол-резистентный орофарингеальный кандидоз был выявлен в 38,4% случаев [4]. В работе P.A. Khan и соавт. [39] изолировано 10,3% резистентных *C. albicans*. В нашем исследовании все культуры оказались чувствительны к данному препарату, и только несколько штаммов генотипов A и B показали устойчивость к кетоконазолу.

В большинстве случаев во всех материалах, взятых из различных локусов пациента, присутствовали штаммы сходного генотипа, и это подтверждает возможность эндогенного инфицирования пациентов *C. albicans*. Так, в исследовании H. Hattori и соавт. [31] выявлено, что штаммы, изолированные из комменсальных областей (паховая область, желудочно-кишечный тракт), были идентичны культурам, вызывающим впоследствии поверхностный кандидоз этих пациентов. В другой работе показано, что у ВИЧ-инфицированных пациентов рецидивирующий оральный кандидоз после лечения антимикотиками, как правило, был вызван тем же самым штаммом. При этом одновременно от одного больного могли быть выделены штаммы, относящиеся к разным генотипам, что в условиях высокой обсемененности кандидами объектов внешней среды стационара вполне объяснимо. Например, описано персистирование 3 различных MLST-вариантов *C. albicans* (определенных путем мультилокусного сиквенс-типирования) у одного пациента с инфекцией кровотока в короткий период времени (10 дней) [41]. Таким образом, полученные данные в целом согласуются с опубликованными ранее исследованиями зарубежных авторов, которые все же подчеркивали, что мультивариабельность культур встречается чаще в группе здоровых лиц (при комменсализме), чем при кандидозной инфекции [16, 42].

Сравнительный анализ ДНК *C. albicans*, полученных в разные сроки, показал, что штаммы, изолированные из крови пациентов с инвазивным кандидозом в 2013 и 2014 гг., принадлежат к генотипу A на основе ПЦР гена *25S* рРНК и полностью идентичны в различных реакциях rep-ПЦР, т. е. инвазивный кандидоз у двух больных, госпитализированных в разное время, вызван одним штаммом. Кроме того, этот же штамм циркулировал во внешней среде инфекционного стационара и служил причиной кандидозного поражения полости рта других пациентов, которые не были связаны между собой вне лечебного учреждения. Можно полагать, что больничная среда становится резервуаром кандид, которые далее контактно-бытовым путем через различные предметы и объекты внешней среды передаются другим пациентам и могут вызывать различные виды кандидозной инфекции.

Заключение. В результате проведенного исследования с использованием молекулярно-генетических методов выяснены и уточнены эпидемиологические аспекты кандидоза у ВИЧ-инфицированных пациентов. Установлено, что сами больные с носительством или различными формами инфекции служат источником *C. albicans*, которые контаминируют предметы больничной среды и, что существенно важно, могут длительно на них циркулировать и передаваться контактно-бытовым путем новым поступающим в стационар пациентам. Некоторые из кандид становятся комменсалами на коже и слизистых оболочках, другие — вызывают поверхностные и/или инвазивные кандидозы с тяжелым течением и летальностью. В больничной среде могут формироваться и длительно циркулировать госпитальные штаммы *C. albicans*, обладающие ферментативной активностью, сопоставимой с активностью штаммов, изолированных от пациентов, что повышает риск возникновения кандидозной инфекции в стационарах для лечения ВИЧ-инфицированных больных.

Впервые дана генотипическая характеристика изолированных в специализированном стационаре кандид на основе последовательности интронной области гена *25S* рРНК, а также отмечены их биологические особенности с учетом генотипа. Показано, что у ВИЧ-инфицированных людей могут быть выделены *C. albicans* разных генотипов. При этом в нескольких биотопах одного пациента, как правило, персистирует единственный штамм, но возможно одномоментное выделение и генотипически отличных культур. Выявлено существенное преобладание *C. albicans* генотипа A в различных комменсальных (зев) и транзиторных (кожные покровы) локусах, и они же чаще всего были причиной кандидозной инфекции, в том числе инвазивного кандидоза. Показано, что в отличие от других представители именно этой группы контаминируют предметы окружающей среды (тумбочки, ручки дверей, вентиляционные решетки). Обращает на себя внимание, что культуры *C. albicans* генотипа D оказались самыми малочисленными, были обнаружены только в экологических биотопах пациентов без клиники кандидоза, они не контаминировали предметы больничной среды, проявляли наименьшую активностью экзоферментов (фосфолипазы и протеазы) и были чувствительны к протестированным антимикотикам. Характеристика различных субпопуляций, в том числе на основе генотипов, и корреляции с распространенностью, клиническими проявлениями (персистирование, инфекционный процесс), могут иметь значение для объяснения взаимоотношений *C. albicans* (комменсализм или патогенность) с организмом здорового или иммунокомпромитированного хозяина и понимания патогенеза кандидоза.

Финансирование. *Исследование не имело спонсорской поддержки.*

Конфликт интересов. *Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 11—42 см. REFERENCES)

1. Андреев В.А., Зачиняева А.В., Москалев А.В., Сбойчаков В.Б., ред. *Медицинская микология*. Руководство. М.: ГЭОТАР — Медиа; 2008.
2. Аравийский Р.А., Климко Н.Н., Васильева Н.В. *Диагностика микозов*. СПб.: Издательский дом СПбМАП; 2004.
3. Дрожжина В.А., Каспина А.И., Степанова Е.В., Виноградова А.Н. Кандидоз слизистой оболочки рта у больных ВИЧ-инфекцией на фоне проведения антиретровирусной терапии. *Институт стоматологии*. 2008; 2(39): 74—6.
4. Михед Т.М., Красавцев Е.Л., Редько Д.Д. Кандидоз ротовой полости у ВИЧ-инфицированных. *Проблемы здоровья и экологии*. 2010; (1): 43—7.
5. Баринова А.Н., Плавинский С.Н., Зайцева Е.Е. Микозы у ВИЧ-инфицированных больных. *Проблемы медицинской микологии*. 2012; 14(2): 34—8.
6. Елинов Н.П., Василева Н.В., Степанова А.А., Чилина Г.А., ред. Candida. Кандидозы. *Лабораторная диагностика*. СПб.: Коста; 2010.

7. Чарушина И.П. Сравнительный анализ микобиоты стационаров различного профиля. *Проблемы медицинской микологии.* 2015; 17(1): 47—51.
8. Карпунина Т.И., Олина А.А., Машуров М.Г., Чемурзиева Н.В., Драбкова В.А. Фосфолипазы оппортунистических грибов: их возможная роль в патогенезе и диагностике микозов. *Проблемы медицинской микологии*. 2006; 8(4): 41—6.
9. Корнишева В.Г., Могилева Е.Ю. Микозы при ВИЧ-инфекции. Обзор литературы. *Проблемы медицинской микологии.* 2013; 15(4): 10—9.
10. Щемерова М.С., Затолока П.А. Чувствительность грибов рода Candida, выявленных у ВИЧ-инфицированных пациентов, имеющих хроническую инфекционно-воспалительную патологию ЛОР-органов. *Оториноларингология восточная Европа.* 2015; (2): 69—73.

REFERENCES

1. Andreev V.A., Zachinyaeva A.V., Moskalev A.V., Sboychakov V.B., eds. *Medical Mycology*. Guide [Meditsinskaya mikologiya. Rukovodstvo]. Moscow: GEOTAR — Media; 2008. (in Russian)
2. Araviyskiy R.A., Klimko N.N., Vasil'eva N.V. *Diagnosis of Fungal Infections [Diagnostika mikozov]*. St. Petersburg: Izdatel'skiy dom SPbMAP; 2004. (in Russian)
3. Drozhzhina V.A., Kaspina A.I., Stepanova E.V., Vinogradova A.N. Candidiasis of the oral mucosa in patients with HIV infection on a background antiretroviral therapy. *Institut stomatologii*. 2008; 2(39): 74—6. (in Russian)
4. Mikhed T.M., Krasavtsev E.L., Red'ko D.D. Candidiasis of the oral cavity in HIV-infected. *Problemy zdorov'ya i ekologii.* 2010; (1): 43—7. (in Russian)
5. Barinova A.N., Plavinskiy S.N., Zaytseva E.E. Mycoses in HIV-infected patients. *Problemy meditsinskoy mikologii*. 2012; 14(2): 34—8. (in Russian)
6. Elinov N.P., Vasileva N.V., Stepanova A.A., Chilina G.A., eds. *Candida. Candidiasis. Laboratory diagnosis [Candida. Kandidozy. Laboratornaya diagnostika]*. St. Petersburg: Kosta; 2010. (in Russian)
7. Charushina I.P. Comparative analysis of the mycobiota of hospitals. *Problemy meditsinskoy mikologii.* 2015; 17(1): 470—51. (in Russian)
8. Karpunina T.I., Olina A.A., Mashurov M.G., Chemurzieva N.V., Drabkova V.A. Phospholipase of opportunistic fungi: their possible role in the pathogenesis and diagnosis of fungal infections. *Problemy meditsinskoy mikologii*. 2006; 8(4): 41—6. (in Russian)
9. Kornisheva V.G., Mogileva E.Yu. Mycoses in HIV infection. *Problemy meditsinskoy mikologii.* 2013; 15(4): 10—9. (in Russian)
10. Shchemerova M.S., Zatoloka P.A. The sensitivity of fungi of the genus Candida were detected in HIV-infected patients with chronic infectious-inflammatory pathology of ENT organs. *Otorinolaringologiya vostochnaya Evropa*. 2015; (2): 69—73. (in Russian)
11. Owotade F.J., Patel M. Virulence of oral Candida isolated from HIV-positive women with oral candidiasis and asymptomatic carriers. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* 2014; 118(4): 455—60.
12. Ribeiro Ribeiro A.L., de Alencar Menezes T.O., de Melo Alves-Junior S., de Menezes S.A., Marques-da-Silva S.H., Rosário Vallinoto A.C. Oral carriage of Candida species in HIV-infected patients during highly active antiretroviral therapy (HAART) in Belém, Brazil. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* 2015; 120(1): 29—33.
13. Brusselaers N., Blot S., Vogelaers D. Deep-seated Candida infections in the Intensive Care Unit. Neth. *J. Crit. Care*. 2011; 15(4): 184—90.
14. Eggimann P., Garbino J., Pittet D. Epidemiology of Candida species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect. Dis*. 2003; 3(11): 685—702.
15. Nucci M., Anaisse E.J. Revisiting the source of candidemia: skin or gut? Clin. Infect. Dis. 2001; 33(12): 1959—67.
16. Takagi Y., Fukano H., Shimozato K., Tanaka R., Horii T., Kawamoto F. et al. Genotypes of Candida albicans isolated from healthy individuals and their distribution in patients with oral candidiasis. *J. Infect. Chemother*. 2013; 19(6): 1072—9.
17. Iwata T., Hattori H., Chibana H., Mikami Y., Tomita Y., Kikuchi A. et al. Genotyping of Candida albicans on the basis of polymorphisms of ALT repeats in the repetitive sequence (RPS). *J. Dermatol. Sci*. 2006; 41(1): 43—54.
18. McCullough M.J., Clemons K.V., Stevens D.A. Molecular and phenotypic characterization of genotypic Candida albicans subgroups and comparison with Candida dubliniensis and Candida stellatoidea. *J. Clin. Microbiol*. 1997; 37(2): 417—21.
19. Chen K.W., Lo H.J., Lin Y.H., Li S.Y. Comparison of four molecular typing methods to assess genetic relatedness of Candida albicans clinical isolates in Taiwan. *J. Med. Microbiol*. 2005; 54(Pt.3): 249—58.
20. Costa F., Manaia C.M., Figueira M.H., Pinto E. Genotypic analysis of Candida albicans isolates obtained from removable prosthesis wearers. *Lett. Appl. Microbiol.* 2008; 46(4): 445—9.
21. Lopez-Ribot J.L., McAtee R.K., Kirkpatrick W.R., Perea S., Patterson T.F. Comparison of DNA-based typing methods to assess genetic diversity and relatedness among Candida albicans clinical isolates. *Rev. Iberoam. Micol*. 2000; 17(2): 49—54.
22. Price M.F., Wilkison I.D., Gentry L.O. Plate methods for detection of phospholipase in Candida albicans. Saboraudia. 1982; 20(1): 7—14.
23. Ruchel R., Tgegeler R., Trost M. A comparison of secretory proteinase from different strains of Candida albicans. *Saboraudia*. 1982; 20(3): 233—44.
24. Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*. 1991; 19(24): 6823—31.
25. Haase A., Melder A., Smith-Vaughan H., Kemp D., Currie B. RAPD analysis of isolates of Burkholderia pseudomallei from patients with recurrent melioidosis. *Epidemiol. Infect.* 1995; 115(1): 115—21.
26. Sullivan D.J., Westerneng T.J., Haynes K.A., Bennett D.E., Coleman D.C. Candida dubliniensis sp nov: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology*. 1995; 141(Pt.7): 1507—21.
27. Imran Z.K. Candida albicans ssp. dubliniensis stat.et comb. nov., a new combination for Candida dubliniensis based on genetic criteria. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2015; 9(17): 1205—14.
28. Abaci O., Haliki-Uztan A., Ozturk B., Toksavul S., Ulusoy M., Boyacioglu H. Molecular typing of Candida albicans strains isolated from denture wearers by repetitive sequence-based PCR. Eur. *J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 2011; 30(2): 141—9.
29. Moris D.V., Melhem M.S., Martins M.A., Mendes R.P. Oral Candida spp. colonization in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis*. 2008; 14(2): 224—57.
30. Cassone A., Cauda R. Candida and candidiasis in HIV-infected patients: where commensalism, opportunistic behavior and frank pathogenicity lose their borders. *AIDS*. 2012; 26(12): 1457—72.
31. Hattori H., Iwata T., Nakagawa Y., Kawamoto F., Tomita Y., Kikuchi A., Kanbe T. Genotype analysis of Candida albicans isolates obtained from different body locations of patients with superficial candidiasis using PCRs targeting 25S rDNA and ALT repeat sequences of the RPS.*J. Dermatol. Sci*. 2006; 42(1): 31—46.
32. Dignani M.C., Solomkin J.S., Anaisse E., Mcginnis M.R., Pfaller M.A., eds. Candida. Medical Mycology. *Philadelphia: Churchill Livingstone*; 2003.
33. Millar B.C., Xu J., McMullan R., Walker M.J., Hedderwick S., Moore J.E. Frequency and distribution of group I intron genotypes of Candida albicans colonizing critically ill patients. *Br. J. Biomed. Sci.* 2005; 62(1): 24—7.
34. Ibrahim A.S., Mirbord F., Filler S.G., Banno Y., Cole G.T., Kitajiama Y. et al. Evidence implicating phospholipases as a virulence factor of Candida albicans. *Infect. Immun*. 1995; 63(5): 1993—8.
35. Hube B. Possible role of secreted proteinases in Candida albicans infections. *Rev. Iberoam. Micol*. 1998; 15(2): 65—8.
36. Menezes T.O., Gillet L.C., Menezes S.A., Feitosa R.N., Ishak M.O., Ishak R. et al. Virulence factors of Candida albicans isolates from the oral cavities of HIV-1-positive patients. *Curr. HIV Res.* 2013; 11(4): 304—8.
37. Ollert M.W., Wende C., Gorlich M., Macmullan-Vogel C.G., Borg-von Zepelin M., Vogel C. et al. Increased expression of Candida albicans secretory proteinase, a putative virulence factor, in isolates from human immunodeficiency virus-positive patients. *J. Clin. Microbiol*. 1995; 33(10): 2543—9.
38. De Paula Menezes R., de Melo Riceto É.B., Borges A.S., De Brito Röder D.V., Dos Santos Pedroso R. Evaluation of virulence factors of Candida albicans isolated from HIV-positive individuals using HAART. *Arch. Oral. Biol.* 2016; 66: 61—5.
39. Khan P.A., Malik A., Khan H.S. Profile of candidiasis in HIV infected patients. Iran. *J. Microbiol*. 2012; 4(4): 204—9.
40. Sangeorzan J.A., Bradley S.F., He X., Zarins L.T., Ridenour G.L., Tiballi R.N. et al. Epidemiology of oral candidiasis in HIV-infected patients: colonization, infection, treatment, and emergence of fluconazole resistance. *Am. J. Med.* 1994; 97(4): 339—46.
41. Da Matta D.A., Melo A.S., Guimarães T., Frade J.P., Lott T.J., Colombo A.L. Multilocus sequence typing of sequential Candida albicans isolates from patients with persistent or recurrent fungemia. *Med. Mycol*. 2010; 48(5): 757—62.
42. Shimizu K., Hattori H., Adachi H., Oshima R., Horii T., Tanaka R. et al. Microsatellite-based genotyping of Candida albicans isolated from patients with superficial candidiasis. *Med. Mycol. J.* 2011; 52(2): 129—38.

Поступила 15.11.16
Принята к печати 15.01.17