

На правах рукописи

ФИЛИНА ЮЛИЯ СЕРГЕЕВНА

«Характеристика грибов рода *Candida*, выявляемых у ВИЧ-
инфицированных пациентов»

14.01.09- инфекционные болезни

Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата
медицинских наук

Москва- 2018 год

Работа выполнена в ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Волчкова Елена Васильевна

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор

Несвижский Юрий

Владимирович

Официальные оппоненты:

Гаджикулиева Мадина Маратовна - доктор медицинских наук, ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава России, кафедра инфекционных болезней, профессор кафедры.

Кравченко Алексей Викторович - доктор медицинских наук, профессор, ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора», специализированный научно-исследовательский отдел эпидемиологии и профилактики СПИД, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация: ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Минобрнауки России

Защита состоится «___» _____ 2018 года в ___ часов на заседании Диссертационного совета Д.208.040.05 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, 37/1 и на сайте <http://sechenov.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2018 года

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, доцент

Брагина Анна Евгеньевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Микозы , вызванные грибами рода *Candida*, являются значимой проблемой для практического здравоохранения, особенно для пациентов с ВИЧ инфекцией [Макеева И.М. и др., 2009].

Представители рода *Candida* - это возбудители оппортунистических инфекций, многократно усиливающие свой патогенный потенциал в условиях нарушений в иммунной системе хозяина [Михайлова Ю. В., М. В. Руднева, 2013], вследствие чего может не только ухудшаться прогноз основного заболевания у ВИЧ-инфицированных пациентов, но и быть у них причиной летального исхода [Pang и др., 2018].

Вместе с тем, нарастающая резистентность. к антимикотическим препаратам *Candida spp.* у ВИЧ-инфицированных пациентов, нередко получающих длительное время антифунгальные препараты, как с профилактической, так и с лечебной целью [Gago и др., 2014] обуславливают необходимость разработки эффективных схем лечения на основе изучения устойчивости *Candida spp.* к противогрибковым препаратам, на видовом и генетическом уровнях [Enwuru и др., 2008].

Грибы рода *Candida*, составляя значительную часть биоценоза макроорганизма [Neville B.A., 2015], взаимодействуют с другими видами условно-патогенных микроорганизмов и представителями нормофлоры. В микробных сообществах грибы рода *Candida* не только испытывают антагонистическое давление со стороны представителей нормальной микрофлоры, но зачастую образуют ассоциации с другими микроорганизмами, которые, наоборот, способствуют колонизации биотопов грибковой флорой [Qi Hui Sam, 2017]. Однако вопрос об изменении биологических свойств грибов рода *Candida* у пациентов с ВИЧ инфекцией на фоне антимикотической терапии остается недостаточно изученным. В этой связи актуальным представляется анализ особенностей видового состава и биологических характеристик грибов

рода *Candida* у пациентов с ВИЧ инфекцией с различной степенью иммунодефицита.

Степень разработанности темы. По мере увеличения числа инфицированных ВИЧ и длительности их заболевания, нарастает число больных с сопутствующими оппортунистическими инфекциями [Alczuk и др., 2015; Paula и др., 2015].

В последнее время отмечена тенденция к увеличению случаев non-albicans кандидозов, плохо поддающихся лечению [Enoch и др., 2017; McIlroy, 1991]. По данным зарубежных авторов, длительное лечение ВИЧ-инфицированных пациентов препаратами азолового ряда приводит к изменению видового состава *Candida* spp. и характеризуется постепенным нарастанием non-albicans видов, особенно *Candida glabrata*. Данная тенденция является одной из причин рефрактерного кандидоза слизистых оболочек у пациентов с выраженной иммуносупрессией и низким количеством CD4 [Moore RD, 1996; Sánchez-Vargas и др., 2005]. В большинстве ситуаций выполнение видовой идентификации вместе с локальными данными по чувствительности возбудителей достаточно для выбора антимикотической терапии. Таким образом, целенаправленное определение чувствительности может быть необходимым для оптимизации терапии при недостаточном ответе к проводимой антифунгальной терапии [Enwuru и др., 2008; Собкова Ж.В., 2014]. Представленные данные свидетельствуют о скудной и разрозненной информации, касающейся изучения композиции представителей рода *Candida* у ВИЧ-инфицированных пациентов в различных биотопах (полость рта, кишечник) и чувствительности *Candida* spp. к антимикотическим препаратам, как в России, так и за рубежом.

Таким образом, для разработки эффективных схем лечения кандидоза у ВИЧ-инфицированных пациентов, необходимо изучение устойчивости *Candida* spp. к противогрибковым препаратам на видовом и генетическом уровнях.

Цель исследования: Изучение и анализ видового и штаммового дрейфа грибов рода *Candida*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов на стадиях 3, 4А, 4Б, 4В, с орофарингеальным кандидозом на фоне антифунгальной терапии.

Задачи исследования:

- Анализ динамики видового состава грибов рода *Candida* у ВИЧ-инфицированных пациентов на стадиях 3, 4А, 4Б, 4В, на фоне антифунгальной терапии.

- Установить характер взаимодействия *C. albicans* с другими видами грибов данного рода у ВИЧ-инфицированных пациентов.

- Проанализировать влияние антимикотического лечения кандидоза у ВИЧ-инфицированных пациентов на видовой и штаммовый состав *Candida* spp.

- Определить чувствительность штаммов *Candida* spp. к различным антимикотическим препаратам.

- По анализу чувствительности *Candida* spp. к различным антимикотическим препаратам определить возможный альтернативный вариант лечения кандидоза у ВИЧ-инфицированных пациентов

Научная новизна:

1. Впервые охарактеризован видовой состав грибов рода *Candida* выделенных от пациентов с ВИЧ-инфекцией на стадиях 3, 4А, 4Б, 4В в различных биотопах макроорганизма.

2. Впервые с помощью диско-диффузионного метода и определения минимальной ингибирующей концентрации изучена чувствительность грибковой флоры *in vitro* к антимикотическим препаратам ряда фармакологических групп, используемым в настоящее время для лечения пациентов с ВИЧ инфекцией.

3. Впервые показана смена видового и штаммового состава грибов рода *Candida* выделенных от пациентов с ВИЧ-инфекцией на стадиях 3, 4А, 4Б, 4В, после проведения стандартного антимикотического лечения.

4. Доказано существование конкурирующих взаимоотношений *C. albicans*, выделенной у ВИЧ-инфицированных пациентов на стадии 3, 4А, 4Б, 4В, из ротоглотки и кишечника, с другими видами грибов данного рода – *C. glabrata*, *C. tropicalis* и *C. krusei*.

5. Впервые показано, что выделенные изоляты грибов рода *Candida*, полученные от ВИЧ-инфицированных пациентов на стадии 3, 4А, 4Б, 4В, в большинстве случаев (60%) представляют собой гомогенные ассоциации, состоящие из *Candida albicans*.

6. Впервые показано, что наряду с гомогенными ассоциациями представителей рода *Candida*, полученных от ВИЧ-инфицированных пациентов на стадии 3, 4А, 4Б, 4В, имеются в меньшем количестве гетерогенные популяции, в состав которых могут входить в различном сочетании разнообразные представители рода *Candida*.

Теоретическая и практическая значимость работы: Результаты диссертационного исследования расширяют теоретические представления о биологических свойствах грибов рода *Candida*, выделенных из разных биотопов тела человека при ВИЧ-инфекции. Определен спектр антимикотических препаратов в отношении грибов рода *Candida*, изолированных из разных биотопов у ВИЧ инфицированных пациентов на стадии 3, 4А, 4Б, 4В. Полученные данные могут быть использованы при выборе эффективных препаратов для эмпирической терапии больных кандидозом. Собранная в результате исследования коллекция чувствительных и резистентных к противогрибковым препаратам изолятов *Candida spp.* от пациентов с ВИЧ-инфекцией депонирована в Российскую коллекцию патогенных грибов.

Положения, выносимые на защиту:

- Изменение видового состава грибов рода *Candida* у ВИЧ-инфицированных пациентов по данным выборочного сравнительного исследования в 2015 и 2017гг.

- Способность *C. albicans*, выделенной у ВИЧ-инфицированных пациентов на стадии 3, 4А, 4Б, 4В, из ротоглотки и кишечника к подавлению других видов грибов данного рода – *C. glabrata*, *C. tropicalis* и *C. krusei*.

- Изменение видового и штаммового состава *Candida* spp. на фоне антимикотического лечения кандидоза у ВИЧ-инфицированных пациентов.

- Различная чувствительность штаммов *Candida* spp. к антимикотическим препаратам.

- Анализ чувствительности *Candida* spp. к различным антимикотическим препаратам.

Внедрение результатов работы в практику: Основные положения диссертации внедрены в практическую работу инфекционных отделений на базе ГБУЗ Инфекционная клиническая больница №2 Департамента здравоохранения г. Москвы.

Материалы диссертации используются в учебном процессе кафедры инфекционных болезней ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет).

Собранная в результате исследования коллекция чувствительных и резистентных к противогрибковым препаратам изолятов *Candida* spp. от пациентов с ВИЧ-инфекцией депонирована в Российскую коллекцию патогенных грибов.

Степень достоверности и апробация результатов диссертационного исследования. Степень достоверности результатов, полученных при проведении исследования, подтверждается достаточным и репрезентативным объёмом выборки выполненных исследований, подтверждена адекватными методами статистической обработки данных. Методы математической обработки полученных результатов соответствуют поставленным задачам. Материалы диссертационного исследования были представлены на конференциях и конгрессах:

Научно-практической конференция ‘Актуальные проблемы микробиологической безопасности: вопросы микологии’, в рамках 7 Общероссийской конференции с международным участием “Неделя медицинского образования- 2016” (Москва, сентябрь 2016г); IV всероссийской научно-практической конференции с международным участием “Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания” (Сочи, 1 – 4 ноября 2017); Межфакультетской студенческой конференции с международным участием «Интеграция специалистов здравоохранения, клинических психологов и социальных работников: наука и практика» (г. Москва, 4 декабря 2015 г.); VI Всероссийской научно –практической конференции с между народным участием молодых ученых и специалистов «Окружающая среда и здоровье. Гигиена и экология урбанизированных территорий», посвященная 85-летию ФГБУ «НИИ ЭЧ и ГОС ИМ. А.Н. Сысина» Минздрава России, (Москва ,13 – 14 сентября 2016 г.); Материалах IX, X Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием, Москва, 2017 г., 2018; 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Madrid, Spain, from 21 - 24 April 2018).

Личный вклад. На основании проведенного анализа отечественной и зарубежной литературы автором, сформулированы цель задачи, выбраны оптимальные методы настоящего исследования. Автор принимал непосредственное участие в клиническом обследовании больных, собирал анамнез, вел клиническое наблюдение, формировал базу данных. Автором лично проведено клиническое обследование ВИЧ инфицированных пациентов на стадии 3, 4А, 4Б, 4В, выполнены микробиологические исследования по теме диссертации, включая сбор, посев биологического материала, приготовление диагностических сред, проведения идентификация *Candida* spp. методом INTEGRAL SYSTEM YEASTS plus, идентификация *Candida* spp. при помощи КАНДИДАтест21, определения чувствительности выделенных штаммов *Candida* к антимикотическим препаратам диско-диффузионный методом.

Статистическая обработка материалов исследования, обобщение полученных результатов, представление их в виде таблиц, рисунков, диаграмм выполнены автором лично, также проведена статистическая обработка, анализ и обобщение полученных данных.

Внедрение результатов в практику принадлежит автору.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.01.09- 'Инфекционные болезни'. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно – пунктам 1,2,3,4 'Инфекционные болезни'.

Публикации по теме диссертации. По теме диссертации опубликовано 11 научных работ, в т. ч. 4 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ (2 оригинальные и 2 обзорные), в которых полностью отражены результаты диссертационного исследования.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 119 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания методов и материалов исследования, результатов работы, заключения, выводов, практических рекомендаций, приложения. Диссертация содержит 13 рисунков, 15 таблиц и 9 диаграмм и 10 фотографий, а также 3 клинических примера. В работе использованы 50 отечественных и 103 иностранных источников литературы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

Методология и методы исследования: Дизайн обследования пациентов был основан на открытом, контролируемом, рандомизированном и проспективном исследовании. Лабораторные исследования осуществлялись на кафедрах инфекционных болезней, а также микробиологии, вирусологии, иммунологии Сеченовского Университета. Все исследования проведены с согласия Комитета по этике при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

протокол № 04-18, на основании требований Хельсинской декларации Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» от июня 1964 г. с учётом критериев включения и исключения.

Всего было обследовано 48 человек. В 2014г. в исследование было включено 19 пациентов, в 2017г.- 29 человек, из них 51% мужчин и 49% женщин (медиана возраста составила 38 лет). Возрастной состав представлен на рис.2. Возраст пациентов колебался от 20 до 69 лет, 65% составили лица от 20 до 40 лет, как у женщин, так и у мужчин преобладали лица молодого возраста, что отражено на рис.3. Срок наблюдения за пациентами, к моменту обследования составил в среднем 6 лет с колебаниями от 1 года до 18 лет. Перед началом АРТ у 39,9% больных количество CD4+-лимфоцитов было менее 200 клеток/мкл. Среднее количество CD4+-лимфоцитов на момент включения в исследование составило 265 клеток/мкл, из них данный показатель был менее 350 клеток/мкл у 77,8%, менее 50 клеток/мкл у 33,1% обследуемых пациентов. Показатель медианы количества CD4+- 153 клеток/мкл (min 0 max 696) в 2017г. и 113 клеток/мкл (min 0 max 412) в 2015г., что является показателем гомогенности и сопоставимости двух групп обследуемых пациентов по выраженности иммуносупрессии.

Показатель медианы иммунорегуляторного индекса составил 0,175 (min 0 max 2,26) (со средним значением 0,399) в 2017г. и 0,23 (min 0 max 1,28) (со средним значением 0,318) в 2015г., что также является показателем гомогенности и однородности обследуемых пациентов, в отношении выраженности иммуносупрессии.

Принимая во внимание совокупность клинико-лабораторных данных, стадию ВИЧ-инфекции 3 (субклиническую) имели 2% пациентов; 4А -10% пациентов, стадию 4Б -8% и подавляющее большинство— стадия 4В-80% (79% в 2015г., 80% в 2017г.).

При обследовании пациентов были диагностированы заболевания, вызванные *Candida spp.* различной локализации. Кандидозный эзофагит был выявлен у 63% пациентов, грибковый колит у 2%, себорейный дерматит у 12%.

При исследовании мокроты с целью диагностики оппортунистических инфекций методом ПЦР *C. albicans* была обнаружена у 34,69%, *C. glabrata* у 16,32%, *C. krusei* у 8,16% пациентов.

Анализ полученных результатов выявил преимущественное присутствие у пациентов ВЭБ, ЦМВ, *C. albicans*, *C. glabrata* в различных сочетаниях.

Объекты исследования – образцы мазков из кишечника и ротоглотки ВИЧ-инфицированные пациенты на стадии 3, 4А, 4Б, 4В, находившихся на стационарном лечении в ИКБ №2 с апреля 2015- по апрель 2017гг.

Методы исследования. Для выполнения работы использовали микробиологические, биохимические, молекулярно-генетические и статистические методы.

Лабораторные методы исследования. Всем пациентам, включенным в исследование, было проведено стандартное клинико-эпидемиологическое обследование (сбор анамнеза, оценка жалоб, данные физикального осмотра), лабораторные методы обследования (общеклинический и биохимический анализы крови, серологическое исследование для определения маркеров вирусных гепатитов и ВИЧ-инфекции, определен иммунный статус пациентов (включая количество CD4 клеток/мкл, CD4%, CD8 клеток/мкл, CD8%, CD4/8), определение наличия и уровня РНК ВИЧ в сыворотке крови (анализатор для проведения ПЦР Abbott m2000rt 9K 1501). У обследованных пациентов также была произведена диагностика оппортунистических инфекций методом ПЦР на основании исследования мокроты, включая ВЭБ ЦМВ, ВГ 6 типа, ВПГ1,2 типа, МБТ, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* (прибор для преаналитической подготовки ПЦР-анализов "Кобас АмплиПреп" Кобас АмплиПреп, анализатор "Кобас ТакМан 48", прибор для преаналитической подготовки ПЦР-анализов "Кобас АмплиПреп", анализатор

для проведения ПЦР Abbott m2000rt 9K 1501, прибор m2000 04J72-01 Abbott Molecular).

Для выделения культур *Candida* spp. образцы фекалий и мазков из ротоглотки, полученные у ВИЧ-инфицированных пациентов культивировались на среде Сабуро-2 и Кандида-хром агаре, после чего производилась ориентировочная дифференцировка грибов по цвету колоний. Идентификация *Candida* spp. выполнена методом ПЦР-РВ, «АмплиСенс *C. albicans* / *C. glabrata* / *C. krusei*-МУЛЬТИПРАЙМ-FL» (Чехия), INTEGRAL SYSTEM YEASTS plus., а также при помощи тест-системы КАНДИДАтест21(Erba Lachema , Чехия). Оценка чувствительности к антимикотическим препаратам проводилась диско-диффузионным методом (Oxoid, Великобритания). Были выполнены биохимические исследования ферментативной активности с помощью коммерческих тест-систем (Remel, Erba Lachema, Чехия) для подтверждения видовой принадлежности представителей рода *Candida* spp. Особенности морфологии клеток культур грибов рода *Candida* изучали с помощью флуоресцентного микроскопа AxioImager.Z1 (Carl Zeiss, Германия).

Все перечисленные исследования выполнены на базе ИКБ №2, а также ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского.

Статистическая обработка результатов. Результаты исследования обрабатывали с помощью программы STATISTICA for Windows версия 6.0. Использовали непараметрические и параметрические методы. Критерием статистической достоверности получаемых данных считали общепринятую в медицине величину $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

Всего получено 84 изолята идентифицированных как грибы рода *Candida*, в т.ч. *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, причём *C. albicans* доминировала по численности. Был произведён анализ изменения видового

состава *Candida* spp., полученных при исследовании мазков из ротоглотки и кишечника в 2015 и 2017гг [диаграмма 1].

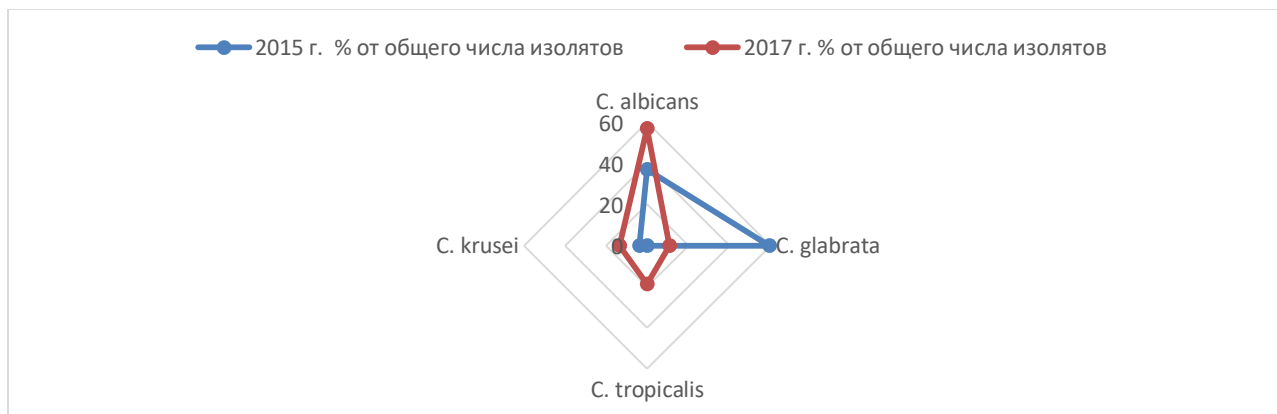


Диаграмма 1. Изменение спектра грибов рода *Candida*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов в 2015 и 2017гг.

Видовой состав грибов рода *Candida* изменился к 2017г. ($p < 0,05$) за счет вытеснения *C. glabrata* (43,8% в 2015г и 10,8% в 2017г) штаммами *C. krusei* (0% в 2015г и 13,5% в 2017г) и *C. tropicalis* (0% в 2015г и 18,9% в 2017г).

В 2017 г. впервые выявлены *C. tropicalis*, повысилось доленое участие *C. albicans* и *C. krusei* (соответственно в 1,54 и 3,65 раз, $p > 0,05$). В то же время, пул *C. glabrata* в 2017 г. был существенно сокращен - в 5,49 раза ($p < 0,001$). Следовательно, анализ динамики видового состава грибов рода *Candida* показал его существенное изменение в 2017г., по сравнению с данными 2015г.. [диаграмма 1]. По данным корреляционного анализа, *C. albicans* конкурирует с другими видами грибов данного рода – обнаружена отрицательная связь средней силы с *C. glabrata* ($r = -0,418$), *C. tropicalis* ($r = -0,529$) и *C. krusei* ($r = -0,475$).

Среднее количество изолятов, полученных от одного пациента, в общем составило 1,60. При этом оно также не было постоянным, а заметно возросло с 1,29 в 2015 г. до 1,95 в 2017 г., т.е. увеличилось в 1,51 раза и свидетельствует о том, что в образцах 2017г. *Candida* spp. демонстрировали большую тенденцию к образованию ассоциаций.

Было проанализировано изменение долевого участия гетерогенных ассоциаций грибов рода *Candida* у ВИЧ-инфицированных пациентов в 2017г., по сравнению с 2015г.

Установлено, что если в 2015 г. лишь у 25,0% пациентов обнаруживались ассоциации грибов рода *Candida*, то в 2017 г. их доля возросла в 2,10 раза и достигла 52,6%. При этом наибольшую долю среди ассоциаций составляли бинарные ассоциации в различном сочетании.

Из полученных данных следует, что в 2017г. впервые были получены трехкомпонентные ассоциации при одновременном возрастании долевого участия двухкомпонентных ассоциаций.

С целью выявления наиболее часто встречающихся вариантов, был произведен анализ компонентной структуры выделенных ассоциаций *Candida* spp. Выделенные изоляты грибов рода *Candida* в большинстве случаев (60%), представляли собой гомогенные ассоциации, состоящие из *Candida albicans*, как в 2015, так и в 2017гг. В то время как гетерогенные популяции были многовариантными и в их состав входили различные представители рода *Candida* в разнообразных сочетаниях.

Таким образом, анализ компонентной структуры ассоциаций показал, что их гомогенные варианты, включающие микробы только одного вида, встречаются в 1,60 раза чаще, чем гетерогенные. При этом выборки пациентов 2015 и 2017 гг. практически не различались по данной характеристике.

Эффективность антимикотических препаратов различных фармакологических групп в отношении Candida spp. выделенных из различных биотопов (ротоглотка, кишечник) от ВИЧ-инфицированных пациентов.

В соответствии с поставленными целями исследования, нами было изучено изменение видового состава грибов рода *Candida* после применения

флуконазола, как препарата первой линии для лечения кандидоза в соответствии с национальными рекомендациями [Покровский В.В. и др., 2013] [диаграмма 2].

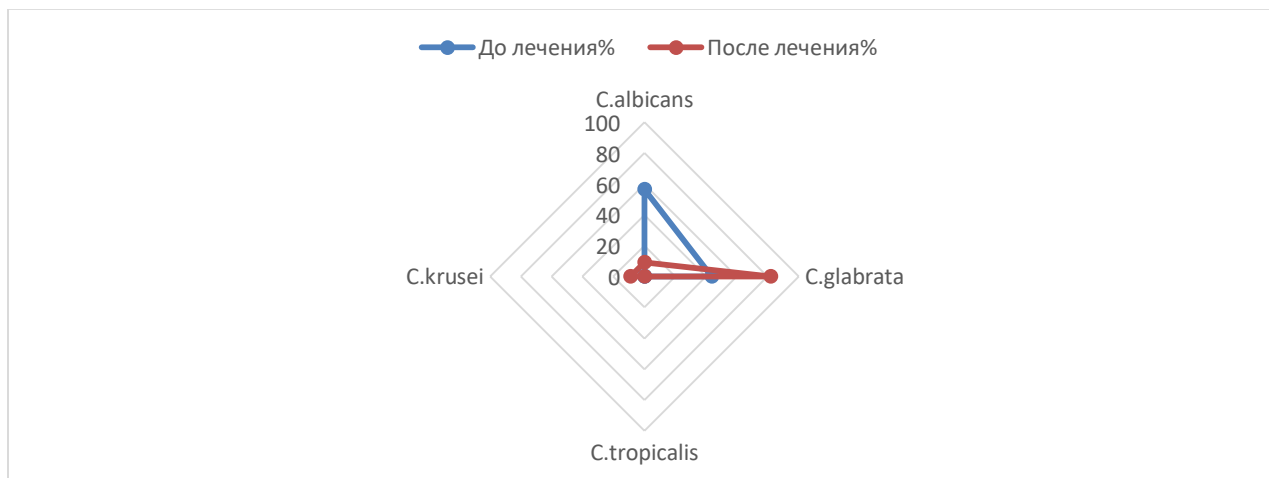


Диаграмма 2. Изменение спектра грибов рода *Candida*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов после 2х недельной терапии флуконазолом.

Анализ динамики видового состава грибов рода *Candida* в ходе лечения выявил его существенное изменение: отмечено сокращение пула *C. albicans* в 6,18 раз ($p < 0,05$), увеличение доли *C. glabrata* в 1,87 раз ($p < 0,05$), а также появление в единичном случае *C. krusei*.

Среднее количество изолятов, полученных от одного пациента, в общем составило 1,29. При этом в процессе лечения этот показатель возрос с 1,14 до 1,57, т.е. увеличился на 37,7%. При анализе полученных данных установлено наличие изменений в гетерогенности ассоциаций грибов рода *Candida*, выделенных у ВИЧ-инфицированных пациентов после 2х недельной терапии флуконазолом.

Анализ динамики архитектуры сообщества грибов рода *Candida* в процессе лечения выявил следующие различия: так в 76,9% случаев до и 71,4% после лечения они встречались как единичный вид, в 23,1-28,6% – как ассоциация видов. Однако, если до лечения двухкомпонентные ассоциации грибов рода *Candida* встречались у 23,1% пациентов, то после лечения их доля снизилась до 14,3%, т.е. в 1,6 раза. При этом наибольшую долю среди ассоциаций составляли

бинарные. Интересен факт появления после лечения четырехкомпонентной ассоциации.

Особый интерес представлял анализ компонентов, образующих ассоциацию грибов рода *Candida* после 2-х недельной терапии флуконазолом.

Анализ компонентной структуры ассоциаций продемонстрировал, что их гомогенные варианты встречаются в 1,5 раза чаще, чем гетерогенные. При этом выборки пациентов до и после лечения практически не различались по данной характеристике.

С целью изучения эффективности антимикотических препаратов в отношении *Candida* spp. полученных из различных биотопов, была произведена оценка чувствительности данных изолятов диско-диффузионным методом [диаграмма 3].

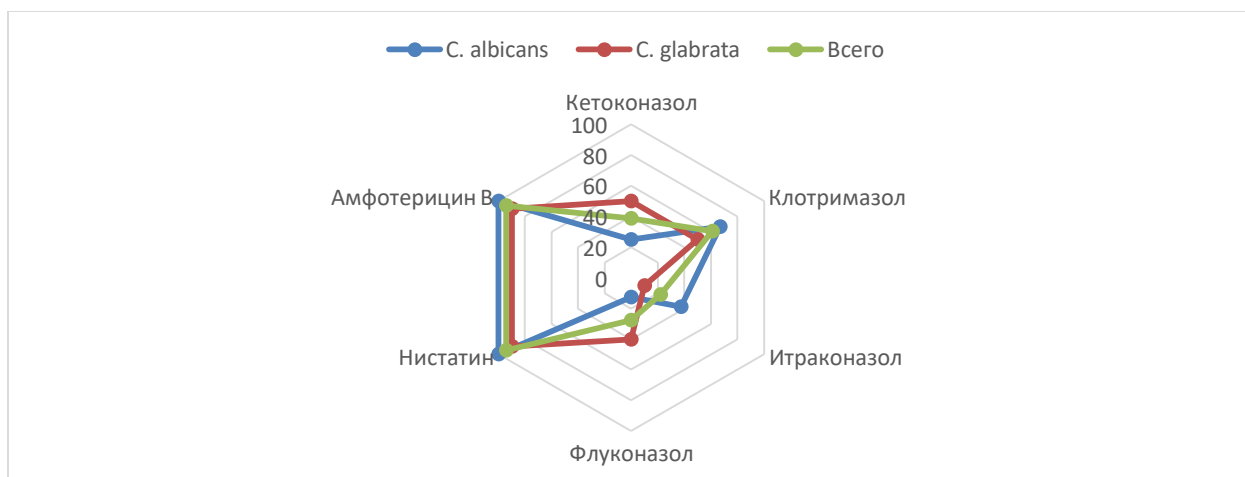


Диаграмма 3. Эффективность антимикотических препаратов различных фармакологических групп в отношении *Candida* spp. выделенных из кишечника.

Практически все штаммы *Candida* spp. выделенные из ротоглотки, оказались чувствительны к полиенам, причём они были чувствительны к нистатину в 100 % случаев.

В тоже время, выделенные штаммы оказались устойчивы к производным триазола, но максимальный эффект флуконазола установлен в отношении *C.*

glabrata (53,3%). Частота резистентности к итраконазолу превышала 90% у всех представителей рода *Candida* spp.

Полученные из кишечника штаммы также продемонстрировали высокую чувствительность к полиенам и устойчивость к триазолам.

Основываясь на полученных данных представляло особый интерес изучить изменение чувствительности грибов *Candida* после применения флуконазола, как основного препарата для лечения кандидоза [Покровский В.В. и др., 2013] [диаграмма 4] .

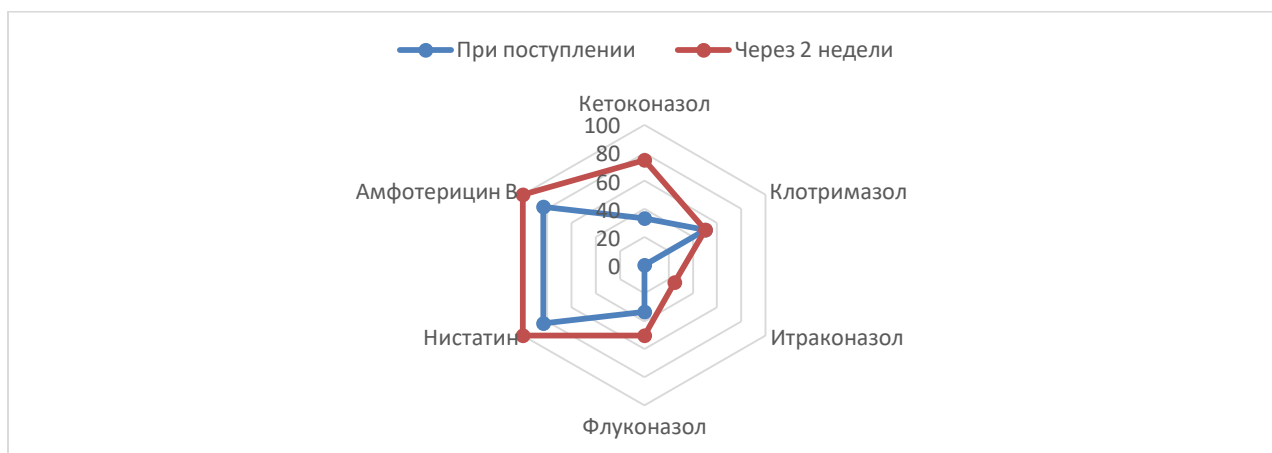


Диаграмма 4. Дрейф чувствительности грибов вида *Candida*, выделенных из кишечника, к антимикотическим препаратам после проведенного лечения.

Оценка изменения чувствительности к антимикотическим препаратам грибов рода *Candida* выделенных из ротоглотки выявила значительный рост чувствительности к итраконазолу ($p < 0,001$), однако чувствительность к остальным препаратам достоверно не изменилась ($p > 0,05$). Была установлена высокая чувствительность исследуемых штаммов к полиенам, причём изоляты *Candida* spp. из ротоглотки, в 100,0% случаев были чувствительны к нистатину. Изоляты, полученные из кишечника, также продемонстрировали рост чувствительности к триазолам. Практически все штаммы сохранили чувствительность к полиенам.

Проведён анализ видового и штаммового дрейфа грибов рода *Candida*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов на стадии 3, 4А, 4Б, 4В с

орофарингеальным кандидозом на фоне антимикотической терапии. В результате на основании клинико-лабораторного исследования установлено, что лечение кандидоза у ВИЧ-инфицированных пациентов приводит к изменению видового и штаммового состава *Candida spp.*: после эрадикации *C. albicans*, чувствительной к флуконазолу, ее место в биотопе занимают более устойчивые штаммы других видов, включая *C. glabrata* и *C. krusei*. Подобные изменения могут являться причиной неэффективности проводимой антимикотической терапии.

На основании полученных данных, для повышения эффективности противокандидозной терапии ВИЧ-инфицированных пациентов целесообразно критически оценивать шаблонный подход к лечению кандидоза любой локализации препаратами азолового ряда. Особое значение приобретает систематический мониторинг антимикотической чувствительности *Candida. spp.*, в связи с частым выявлением штаммов *Candida*, устойчивых к наиболее используемым антимикотическим лекарственным препаратам.

Таким образом, проведённое исследование пациентов с ВИЧ-инфекцией подтверждает универсальное значение изменения чувствительности представителей рода *Candida spp.* к антимикотическим препаратам при длительном применении. Аналогичных исследований в отечественной литературе мы не встретили.

Полученные сведения о чувствительности являются полезными при оценке возможных причин неэффективности терапии и безусловно важны для оперативной коррекции схемы медикаментозной терапии, что особенно важно при планировании лечения в ВИЧ-инфицированных пациентов в амбулаторных условиях, а также при длительных курсах антибиотикотерапии больных различными бактериальными инфекциями, как на фоне ВИЧ-инфекции, так и при её отсутствии.

По результатам данного исследования можно сделать вывод о том, что длительное лечение ВИЧ-инфицированных пациентов препаратами азолового

ряда также приводит к изменению видового состава *Candida spp.* и характеризуется постепенным нарастанием non-albicans видов, особенно *Candida glabrata*. Данная тенденция является одной из причин рефрактерного кандидоза слизистых оболочек у пациентов с развитой иммуносупрессией и низким количеством CD4 и обуславливает необходимость тщательно анализировать перед началом лечения чувствительность *in vitro* выделенных штаммов – *Candida spp.*, у которых часто отмечается резистентность к лекарственным препаратам.

В настоящий момент в России отсутствуют рекомендации касающиеся необходимости видовой идентификации *Candida spp.* с целью выбора антимикотической терапии у ВИЧ-инфицированных пациентов.

Таким образом, целенаправленное определение чувствительности может быть необходимым для оптимизации терапии при недостаточном ответе на проводимую антифунгальную терапию.

Повышение эффективности лечения кандидоза у ВИЧ инфицированных пациентов может быть достигнуто путем гибкого подхода. Представляется перспективным индивидуальный подбор антимикотической терапии в зависимости от локализации патологического процесса и микробиологической характеристики каждого из изолятов *Candida spp.* В случае поверхностных микозов целесообразно применение нистатина, к которому чувствительно большинство штаммов, либо назначение эхинокандинов при неэффективности стандартных схем.

С целью повышения эффективности противокандидозной терапии для ВИЧ-инфицированных пациентов важно критически оценивать шаблонный подход к лечению кандидоза любой локализации препаратами азолового ряда.

Особое значение приобретает регулярный мониторинг медикаментозной чувствительности *Candida*, что позволит своевременно выявить причины неэффективности медикаментозной терапии и скорректировать ее схемы.

Представляется клинически оправданным индивидуальный подбор антимикотической терапии в зависимости от локализации патологического процесса и микробиологической характеристики штаммов *Candida*. В случае поверхностных форм кандидоза (в том числе *кандидозный глоссит / стоматит*) целесообразно применение нистатина, к которому чувствительно большинство штаммов, либо назначение эхинокандинов при неэффективности стандартных схем. Таким образом, оптимизация противокандидозного лечения при ВИЧ-инфекции требует дифференцированного подхода.

ВЫВОДЫ.

1. Видовой состав грибов рода *Candida*, выделенных у ВИЧ-инфицированных пациентов на стадии 3, 4А, 4Б, 4В, изменился к 2017г. ($p < 0,05$) при сравнении с данными полученными в 2015г. за счет вытеснения *C. glabrata* (43,8% в 2015г и 10,8% в 2017г) штаммами *C. crusei* (0% в 2015г и 13,5% в 2017г) и *C. tropicalis* (0% в 2015г и 18,9% в 2017г), в материалах, полученных из ротоглотки и кишечника.
2. Обнаружено, что *C. albicans* выделенная у ВИЧ-инфицированных пациентов на стадии 3, 4А, 4Б, 4В, из ротоглотки и кишечника, конкурирует с другими видами грибов данного рода – *C. glabrata* ($r = -0,418$), *C. tropicalis* ($r = -0,529$) и *C. krusei* ($r = -0,475$), о чем свидетельствует отрицательная связь средней силы по данным корреляционного анализа.
3. Установлено, что в образцах 2017г. *Candida* spp., выделенных у ВИЧ-инфицированных пациентов на стадии 3, 4А, 4Б, 4В, демонстрировали большую тенденцию к образованию ассоциаций, что подтверждается возрастанием среднего количество изолятов, полученных от одного пациента с 1,29 в 2015 г. до 1,95 в 2017 г., т.е. увеличилось в 1,51 раза, а также тем, что если в 2015 г. лишь у 25,0% пациентов обнаруживались ассоциации грибов рода *Candida*, то в 2017 г. их доля возросла в 2,10 раза и достигла 52,6%. При этом наибольшую долю среди ассоциаций составляли бинарные ассоциации в различном сочетании.

4. Показано, что выделенные изоляты грибов рода *Candida*, полученные от ВИЧ-инфицированных пациентов на стадиях 3, 4А, 4Б, 4В, в большинстве случаев (60%), представляли собой гомогенные ассоциации, состоящие из *Candida albicans*, как в 2015, так и в 2017 гг. В то время как гетерогенные популяции были многовариантными и в их состав входили различные представители рода *Candida* в разнообразных сочетаниях. Таким образом, анализ компонентной структуры ассоциаций показал, что их гомогенные варианты, включающие микробы только одного вида, встречаются в 1,60 раза чаще, чем гетерогенные.
5. Анализ динамики видового состава грибов рода *Candida*, выделенных у ВИЧ-инфицированных пациентов на стадиях 3, 4А, 4Б, 4В, в ходе лечения выявил его существенное изменение: отмечено сокращение пула *C. albicans* в 6,18 раз ($p < 0,05$), увеличение доли *C. glabrata* в 1,87 раз ($p < 0,05$), а также появление в единичном случае *C. krusei*.
6. Практически все штаммы *Candida* spp. выделенные из ротоглотки, оказались чувствительны к полиенам, причём они были чувствительны также к нистатину во все периоды наблюдения.
7. Полученные из кишечника штаммы продемонстрировали высокую чувствительность к полиенам и устойчивость к триазолам, как в 2015, так и в 2017 гг.
8. Выделенные штаммы, полученные от ВИЧ-инфицированных пациентов на стадиях 3, 4А, 4Б, 4В, оказались устойчивы к производным триазола, но максимальный эффект флуконазола установлен в отношении *C. glabrata* (53,3%). Частота резистентности к итраконазолу превышала 90% у всех представителей рода *Candida* spp., как в 2015, так и в 2017 гг.

Практические рекомендации.

1. Для повышения эффективности противокандидозной терапии у ВИЧ-инфицированных пациентов целесообразно критически оценивать шаблонный подход к лечению кандидоза любой локализации препаратами азолового ряда.

2. Необходим систематический мониторинг антимикотической чувствительности *Candida. spp.* Данные о чувствительности являются полезными при оценке возможных причин неэффективности терапии и безусловно важны для оперативной коррекции схемы медикаментозной терапии.
3. Представляется перспективным индивидуальный подбор антимикотической терапии в зависимости от локализации патологического процесса и микробиологической характеристики каждого из изолятов *Candida spp.*
4. В случае поверхностных микозов целесообразно применение нистатина, к которому чувствительно большинство штаммов, либо назначение эхинокандинов при неэффективности стандартных схем.

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации:

1. **Филина Ю.С.,** Толочко М.В., Богданова Е.А., Усатова Г. Н., Волчкова Е.В. Анализ механизмов формирования устойчивости грибов рода *Candida* к флуконазолу у ВИЧ-инфицированных пациентов// Межфакультетская студенческая конференция с международным участием «Интеграция специалистов здравоохранения, клинических психологов и социальных работников: наука и практика» // Сборник тезисов (г. Москва, 4 декабря 2015 г.), 2015. – стр. 85,
2. **Филина Ю.С.,** Несвижский Ю.В., Волчкова Е.В., Богданова Е.А., Умбетова К.Т., Пак С.Г. // Разработка комплексного подхода к терапии инфекции, вызванной грибами рода *Candida*.//Эпидемиология и инфекционные болезни, том 20, №1, 2015г., стр. 27-31,
3. **Филина Ю.С.,** Пак С.Г., Волчкова Е.В., Несвижский Ю.В., Толочко М.В., Богданова Е.А. // Пути оптимизации терапии инфекции, вызванной грибами рода *Candida*, у ВИЧ- инфицированных пациентов // «Сеченовский вестник» научно-практический рецензируемый журнал, № 2(24) 2016, г., стр. 21-27,

4. **Филина Ю.С.**, Несвижский Ю.В., Волчкова Е.В., Богданова Е.А.// Формирование устойчивости грибов рода *Candida* к флуконазолу у ВИЧ-инфицированных пациентов // Материалы VI Всероссийской научно – практической конференции с между народным участием молодых ученых и специалистов «Окружающая среда и здоровье. Гигиена и экология урбанизированных территорий», посвященная 85-летию ФГБУ «НИИ ЭЧ и ГОС ИМ. А.Н. Сысина» Минздрава России, под редакцией академика РАН Ю.А. Рахманина, 13 – 14 сентября 2016 г., Москва, стр. 513,
5. **Филина Ю.С.**, Воропаев А.Д., Толочко М.В., Екатеринчев Д.А., Воропаева Е.А., Несвижский Ю.В. и др.// Анализ чувствительности грибов рода *Candida*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов, к современным антимикотическим препаратам//Материалы IX Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием, Москва, 27– 29 марта 2017 г., Москва, стр. 295,
6. Воропаев А.Д., Екатеринчев Д.А., Воропаева Е.А., **Филина Ю.С.**, Несвижский Ю.В., Волчкова Е.В.// Анализ штаммового и видового дрейфа грибов рода *candida*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов// Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания. Материалы IV всероссийской научно-практической конференции с международным участием, стр. 248. Сочи, 1 – 4 ноября 2017,.
7. **Филина Ю.С.**, Толочко М.В., Несвижский Ю.В.// Проблемы терапии кандидомикозов и пути их решения// Успехи медицинской микологии. Москва, Том: 17 Номер: 17 Год: 2017 Страницы: 219-223,
8. E. Volchkova, **Y. Filina**, Y. Nesvizhski// Resistance of *Candida* fungi to treatment in HIV-infected patients// 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, which will take place in Madrid, Spain, from 21 - 24 April 2018, abstract,
9. **Филина Ю.С.**, Волчкова Е.В., Несвижский Ю.В., Воропаев А.Д.// Влияние антимикотической терапии на видовой

и штаммовый состав candida spp. у ВИЧ-инфицированных пациентов// Материалы X Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием, Москва, 26-28 февраля 2018 г., Москва, пл. Европы, 2, Гостиница «Рэдиссон Славянская» ,

10. **Filina Y.S.1, Volchkova E.V., Nesvizhskiy Y.V. , Belaya O.F.**// Research antifungal therapy of oropharyngeal candidiasis in HIV-infected patients//**Эпидемиология и инфекционные болезни, том 23, №3, 2018г., стр. 114-118,**

11. **Филина Ю.С., Волчкова Е.В., Несвижский Ю.В. , Белая О.Ф.** // Подходы к подбору антифунгальной терапии у ВИЧ- инфицированного пациента с резистентным к флюконазолу кандидозом.//**Эпидемиология и инфекционные болезни, том 23, №3, 2018г., стр. 138-141.**

Список сокращений.

АРТ – антиретровирусная терапия

ВИЧ - вирус иммунодефицита человека

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

ИБ – иммунноблот

ИФА - иммуноферментный анализ

КВ - кандидозный вульвовагинит

КЭ - кандидозный эзофагит

ОФК - орофарингеальный кандидоз

ПЦР - полимеразная цепная реакция

РНК - рибонуклеиновая кислота

Candida spp. - Candida speciales

СПИД - синдром приобретённого иммунного дефицита

ХВГВ – хронический вирусный гепатит В

ХВГС – хронический вирусный гепатит С

ЦМВ - цитомегаловирусная инфекция

