

## Сравнительная оценка видовой идентификации вагинальных изолятов дрожжевых грибов методом MALDI-TOF MS и традиционными (биохимическим и фенотипическим) методами

В. В. Муравьева<sup>1</sup>, Т. В. Припутневич<sup>1</sup>, М. Г. Завьялова<sup>1</sup>,  
А. С. Анкирская<sup>1</sup>, Е. Н. Ильина<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГБУН «НИИ физико-химической медицины» ФМБА России, Москва, Россия

**Цель исследования.** Сравнить результаты видовой идентификации дрожжевых грибов, выделенных из вагинального отделяемого женщин с вульвовагинальным кандидозом, традиционными микробиологическими методами и MALDI-TOF MS.

**Материалы и методы.** Методом MALDI-TOF MS проанализировано 2304 изолята дрожжевых грибов.

**Результаты.** В соответствии со значением *score*, свидетельствующем о точности идентификации, наилучшие результаты (*score* — 2–2,3) отмечены у 55,5% культур *C. albicans* и 67,9% не-*albicans* видов *Candida*. Один штамм (0,2%) среди не-*albicans* видов *Candida*, впоследствии идентифицированный методом секвенирования как *Pichia fabianii*, не был опреде-

лен (*score* < 1,7). Определение видовой принадлежности 1294 штаммов продублировано традиционной идентификацией. С помощью биохимического типирования идентифицировано 98,6% дрожжевых изолятов. Совпадение результатов отмечено у 1287 штаммов: у всех штаммов *C. albicans* и у 278 (97,5%) не-*albicans* видов *Candida*. Исключение составили 7 штаммов четырех видов: *C. nivariensis*, *C. lambica*, *C. famata* и *Pichia fabianii*.

**Выводы.** Проведенное исследование показало высокую степень совпадения результатов идентификации дрожжевых грибов методом MALDI-TOF MS и традиционными методами.

**Ключевые слова:** вульвовагинальный кандидоз, дрожжевые грибы, масс-спектрометрия, MALDI-TOF MS.

## Comparative Assessment of Species Identification of Vaginal Yeast Isolates Using MALDI-TOF MS and Conventional (Biochemical and Phenotypic) Methods

V.V. Muravyova<sup>1</sup>, T.V. Priputnevitch<sup>1</sup>, M.G. Zavyalova<sup>1</sup>, A.S. Ankirskaya<sup>1</sup>, E.N. Ilyina<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after V.I. Kulakov, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Scientific Research Institute of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia

**Objective.** To compare results of species identification of yeast isolated from vaginal discharge in women with vulvovaginal candidiasis using conventional microbiological methods and MALDI-TOF MS.

**Materials and Methods.** A total of 2304 isolates of yeast were tested by MALDI-TOF MS method. Species identification of 1294 isolates was also performed using conventional methods.

**Results.** According to score values (indicates accuracy of identification), the best results (score 2-2.3) were yielded in 55.5% of *C. albicans* and 67.9% of non-*albicans Candida* spp. One isolate (0.2%) of non-*albicans Candida* spp. subsequently identified by sequenc-

ing method as *Pichia fabianii* was not determined (score <1.7). Biochemical typing could identify 98.6% of yeast isolates. Coincident results were received in 1287 isolates: all isolates of *Candida albicans* and 278 (97.5%) of non-*albicans Candida* spp. Exceptions were 7 isolates belonging to 4 species: *C. nivariensis*, *C. lambica*, *C. famata*, and *Pichia fabianii*.

**Conclusions.** This study demonstrated a high coincidence rate for identification of yeast by MALDI-TOF MS versus conventional methods.

**Key words:** vulvovaginal candidiasis, yeast, mass-spectrometry, MALDI-TOF MS.

### Введение

В последние годы отмечается тенденция к возрастанию роли грибов в развитии опасных для жизни инфекций. Это связано с использованием широкого спектра антибактериальных препаратов, длительной госпитализацией больных и увеличением числа пациентов с ослабленным иммунитетом. *Candida albicans* остается основным возбудителем микозов, но в то же время заметно увеличивается роль других, менее распространенных оппортунистических дрожжевых грибов, в том числе *Candida non-albicans*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Saccharomyces* [1–3]. В настоящее время более 100 видов дрожжевых грибов, выделенных из различных локусов организма человека, способны участвовать в патологических процессах с вовлечением различных систем и органов. Наряду с инвазивными грибковыми инфекциями микозы слизистых оболочек представляют значимую проблему. Вульвовагинальный кандидоз (ВВК) — самая частая причина обращения женщины к врачу-гинекологу. Показатели заболеваемости ВВК по-прежнему остаются высокими [4, 5].

Проблема, связанная с терапией грибковых инфекций, сопряжена с вопросом резистентности потенциальных возбудителей к антимикотическим препаратам. Так, к числу «проблемных» видов относятся *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Rhodotorula* spp. и некоторые представители рода *Trichosporon*, устойчивые к флуконазолу. Кроме того, *Rhodotorula*

spp. природно устойчивы к вориконазолу и эхинокандинам, а *Trichosporon* и *Cryptococcus* — к эхинокандинам [1, 6, 7].

Точная и быстрая идентификация дрожжей является залогом успеха терапии: зная видовую принадлежность возбудителя и его видоспецифическую чувствительность к противогрибковым препаратам, можно своевременно корректировать лечение. Поэтому оперативное слежение за изменениями в структуре возбудителей микозов, формированием резистентности их к антимикотическим препаратам не теряет своей актуальности.

Совершенствование лабораторной базы, внедрение новых технологий позволяют перманентно улучшать качество диагностики, сокращать время проведения исследований. Классическая фенотипическая идентификация и коммерческие биохимические тест-системы (хромогенный агар и биохимические или ферментативные панели, например API ID или VITEK ID-YST (bioMérieux, Франция), Auxacolor (Bio-Rad Ltd) и др.) способны определять видовую принадлежность большинства дрожжевых грибов с высокой степенью достоверности. Однако процесс идентификации трудоемок, занимает много времени и иногда дает ошибочный результат, особенно, когда это касается видов, отсутствующих в базах данных [8, 9]. Для преодоления неточностей классических методов идентификации на основе нуклеиновых кислот применяются молекулярно-генетические методы, обладающие высокой достоверностью [10–12], но требующие значительного

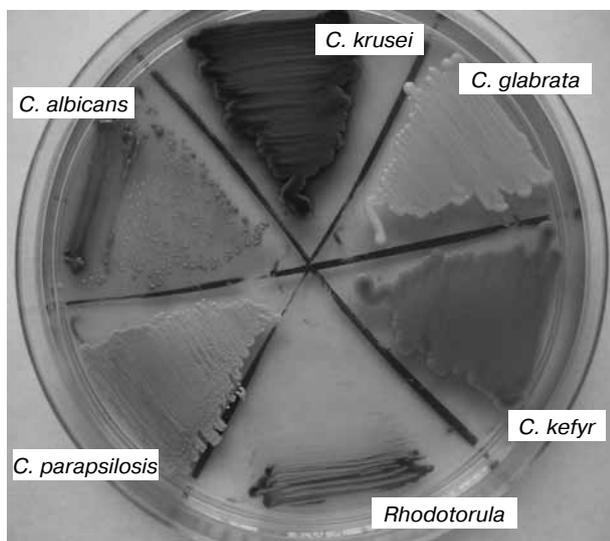
времени пробоподготовки, дорогостоящих реагентов и высокой квалификации персонала.

В последнем десятилетии в практику бактериологических лабораторий внедряется принципиально новый способ идентификации микроорганизмов — метод *матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с использованием времяпролетной масс-спектрометрии* (MALDI-TOF MS), который позиционируется как быстрая, надежная и экономически выгодная альтернатива перечисленным выше методам идентификации [13–16]. Он основан на экстракции пептидов и белков из клеток гриба и работает по принципу «fingerprint» (молекулярного «отпечатка пальца»), который сравнивается с эталонными спектрами в базе MALDI biotyper.

Цель настоящего исследования: сравнить результаты видовой идентификации дрожжевых грибов, выделенных из вагинального отделяемого женщин с ВВК, при использовании традиционных микробиологических методов и MALDI-TOF масс-спектрометрии.

### Материал и методы

Дрожжевые грибы культивировали на среде Сабуро в течение 24–48 часов при температуре 37 °С. При классической фенотипической видовой идентификации для дифференциации *C. albicans* от *Candida* не-*albicans* видов использовали посев на хромогенный агар Candida ID 2 (Bio Merieux, Франция) или HiCrome Candida agar (Himedia, Индия) (см. рисунок), проростковый тест и тест на способность формировать хламидоспоры



Пример фенотипической характеристики клинических изолятов дрожжевых грибов с использованием хромогенного агара (HiCrome Candida agar, Himedia).

на рисовом агаре. Учитывая, что некоторые виды дрожжевых грибов (*C. dubliniensis*, *C. tropicalis*) на хромогенных средах иногда могут вырабатывать пигмент, подобный *C. albicans*, а вид *C. dubliniensis* способен формировать «ложные» ростковые трубки, оценку принадлежности гриба к *C. albicans* проводили на основании положительного результата трех указанных тестов. Видовую принадлежность не-*albicans* видов *Candida* и части штаммов *C. albicans* определяли с помощью автоматического бактериологического анализатора VITEK2 Compact, используя карты VITEK ID-YST (bioMérieux, Франция). Все изоляты грибов также идентифицировали методом MALDI-TOF MS с помощью масс-спектрометра «Autoflex III» (Bruker Daltonics, Германия).

При MALDI-TOF MS использовали прямое двукратное (дублированное) нанесение части одной колонии гриба, выросшего на среде Сабуро, на 96-клеточную стальную панель (Bruker Daltonics, Германия) с последующим высушиванием на воздухе. Затем добавляли 2 мкл матрицы: насыщенный раствор  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричной кислоты в 50% ацетонитриле и 2,5% трифторуксусной кислоте (Bruker Daltonics, Германия) и повторно подсушивали при комнатной температуре. Масс-спектры калибровали с помощью рибосомальных белков *Escherichia coli* (бактериальный стандарт). Белковые спектры были проанализированы с помощью MALDI Biotyper (версия 3.1.66, Bruker Daltonics, Германия). Результаты выражались в виде *оценочного коэффициента (score)* в диапазоне от 0 до 3. При значениях *score* >1,7 результат соответствует высокой степени достоверности идентификации до рода, а при значениях *score* >2,0 — надежной идентификации до вида. В то же время значение *score* >1,7 оценивается как минимальное значение оценочного коэффициента, требуемое для видовой идентификации [17]. При значении *score* <1,7 результат идентификации считали недействительным и повторяли исследование, используя стандартный метод предварительной экстракции.

В случае отрицательного результата идентификации проводилось исследование последовательности гена 18S рРНК методом секвенирования.

### Результаты исследований

За двухлетний период (с октября 2010 г. по октябрь 2012 г.) нами исследовано 2304 изолята дрожжевых грибов, выделенных из вагинального отделяемого женщин с ВВК. Из них 2235 штаммов относились к роду *Candida* (97%) и 69 (3%) принадлежали к 4 другим родам (*Saccharomyces*, *Rhodotorula*,

Таблица 1. Результаты идентификации дрожжевых грибов методом MALDI-TOF MS

Виды идентифицированных грибов	Число штаммов	Не идентифицировано (score < 1,7)	Уровень идентификации			
			(score 1,7 – < 2)		(score >2)	
			абс.	%	абс.	%
<i>Candida</i> (всего)	2235	0	936	41,9	1299	58,1
<i>C. albicans</i>	1762	0	785	44,5	977	55,5
<i>C. ne-albicans</i> :	542	1 (0,2%)	173	31,9	368	67,9
<i>C. glabrata</i>	229	0	65	28,4	164	71,6
<i>C. parapsilosis</i>	74	0	30	40,5	44	59,5
<i>C. krusei</i>	59	0	20	33,9	39	66,1
<i>C. kefyr</i>	39	0	2	5,1	37	94,9
<i>C. tropicalis</i>	20	0	7	35,0	13	65,0
<i>C. lusitaniae</i>	19	0	6	31,6	13	68,4
<i>C. dubliniensis</i>	11	0	11	100,0	0	0
<i>C. norvegensis</i>	10	0	7	70,0	3	30,0
<i>C. guilliermondii</i>	5	0	1		4	
<i>C. utilis</i>	3	0	1		2	
<i>C. lambica</i>	2	0	1		1	
<i>C. nivariensis</i>	1	0	0		1	
<i>C. pelliculosa</i>	1	0	0		1	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	64	0	19		45	70,3
<i>Trichosporon asahii</i>	3	0	3		0	0
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1	0	0		1	
<i>Pichia fabianii</i>	1	1*	0		0	0
<b>Итого ...</b>	<b>2304</b>	<b>1 (0,04%)</b>	<b>958</b>	<b>41,56</b>	<b>1345</b>	<b>58,4</b>

**Примечание.** \* – указанный вид гриба отсутствует в базе данных.

*Trichosporon*, *Pichia*). Идентифицировано 19 видов дрожжевых грибов.

Лидирующее место в этиологической структуре ВВК занимает вид *C. albicans* – 1762 штамма (76,5%), доля *Candidas* не-*albicans* видов (542 штамма) составила 23,5%. Наиболее часто среди не-*albicans* видов встречались *C. glabrata* (42,3%), *C. parapsilosis* (13,7%), *Saccharomyces cerevisiae* (11,8%), *C. krusei* (10,9%) и *C. kefyr* (7,2%). Прочие виды (*C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. norvegensis*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*, *C. nivariensis*, *C. utilis*, *Trichosporon asahii*, *C. pelliculosa*, *C. lambica*, *C. famata*, *Rhodotorula rubra*, *Pichia fabianii*) идентифицировали значительно реже (от 0,2 до 3,7%).

Методом MALDI-TOF MS было определено 2303 изолята дрожжевых грибов (99,9%). В соответствии со значением *score*, свидетельствующем о точности идентификации, наилучшие результаты (*score* 2–2,3) отмечены у 55,5% культур *C. albicans* и 67,9% не-*albicans* видов *Candida* (табл. 1). С меньшей степенью достоверности (*score* 1,7–<2) идентифицировано 44,5% штаммов *C. albicans* и 31,9%

не-*albicans* видов *Candida*. Один штамм (0,2%) среди не-*albicans* видов, впоследствии идентифицированный методом секвенирования как *Pichia fabianii*, не был определен (*score* <1,7). Видовая принадлежность большинства не-*albicans* штаммов *Candida* установлена с высокой степенью достоверности (*score* 2–2,3): от 65,0% (*C. tropicalis*) до 94,9% (*C. kefyr*). Исключение составили *C. norvegensis* и *C. dubliniensis* (не более 30%).

Определение видовой принадлежности 1294 дрожжевых изолятов (1009 *C. albicans* и 285 не-*albicans* видов *Candida*), идентифицированных методом MALDI-TOF MS, было продублировано традиционной идентификацией. Полное совпадение результатов отмечено у 1287 штаммов: у всех штаммов *C. albicans* и у 278 – не-*albicans* видов *Candida*. Сравнение результатов идентификации 285 штаммов не-*albicans* видов *Candida* представлено в табл. 2, из которой следует, что идентичные результаты получены у 278 штаммов (97,5%). Исключение составили 7 штаммов 4 видов: *C. nivariensis*, *C. lambica*, *C. famata* и *Pichia fabianii*.

Таблица 2. Результаты видовой идентификации дрожжевых грибов (не-*albicans* видов *Candida*) биохимическим методом и MALDI-TOF MS

Виды грибов (окончательная идентификация)	Число штам- мов	MALDI-TOF MS						VITEK ID-YST			
		не идентифи- цировано ( <i>score</i> <1,7)	уровень идентификации				не идентифи- циро- вано	уровень идентификации			
			(score 1,7—<2)		(score >2)			отличная, хорошая		приемлемая	
			абс.	%	абс.	%		абс.	%	абс.	%
<i>C. glabrata</i>	115	0	30	26,1	85	73,9	0	115	100,0		
<i>C. parapsilosis</i>	54	0	23	42,6	31	57,4	0	54	100,0		
<i>C. krusei</i>	27	0	8	29,6	19	70,4	0	27	100,0		
<i>C. kefyr</i>	22	0	1	4,5	21	95,5	0	22	100,0		
<i>C. tropicalis</i>	14	0	5	35,7	9	64,3	0	14	100,0		
<i>C. lusitanae</i>	11	0	3	27,3	8	72,7	0	11	100,0		
<i>C. dubliniensis</i>	7	0	7	100,0	0	0	0	7	100,0		
<i>C. norvegensis</i>	2	0	1		1		0	2	100,0		
<i>C. guilliermondii</i>	5	0	1		4		0	5	100,0		
<i>C. utilis</i>	3	0	1		2		0	3	100,0		
<i>C. lambica</i>	1	0	0		1		1	0			
<i>C. nivariensis</i>	1	0	1	0	1		2*	0			
<i>C. pelliculosa</i>	1	0	0	0	1		0	1	100,0		
<i>C. famata</i>	3	3*	0	0	0	0	0	3	100,0		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13	0	4	30,8	9	69,2	0	13	100,0		
<i>Trichosporon asahii</i>	3	0	3	100,0	0	0	0	3	100,0		
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1	0	0	0	1		0	1			
<i>Pichia fabianii</i>	1	1*	0	0	0	0	1*	0	0		<i>C.utilis</i>
Всего ...	285	4 (1,4%)	88	30,9	193	67,7	4 (1,4%)	281	98,6		

Примечание. \* — указанные виды грибов отсутствуют в базе данных.

С помощью MALDI-TOF MS правильно идентифицирован 281 штамм (98,6%), в том числе 67,7% с высокой степенью достоверности (*score* 2–2,3), а у 4 штаммов (1,4%) не получено правильной идентификации; из них 3 штамма — *C. famata* — вида, отсутствующего в базе MALDI Biotyper на момент исследования, идентифицированы как *C. parapsilosis* (*score* 1,7—<2). Изолят *Pichia fabianii* не был идентифицирован (*score* <1,7) также из-за отсутствия в базе данных. Повторное исследование масс-спектров указанных штаммов с использованием стандартного метода экстракции белков не улучшило качество видовой идентификации.

По данным биохимического типирования, видовая принадлежность грибов установлена в 98,6% случаев (281 штамм). Два штамма *C. nivariensis* не были идентифицированы с помощью Vitek2 Compact из-за отсутствия этого вида в базе данных. Один штамм *C. lambica* не удалось дифференцировать с видами *C. krusei* и *C. norvegica* и один

штамм (*Pichia fabianii*) определен как *C. utilis* (качество идентификации соответствовало оценке «приемлемая идентификация»). Для уточнения видовой принадлежности *Pichia fabianii* потребовалось секвенирование гена 18S rRNA. В пользу большей достоверности биохимической идентификации *C. famata* свидетельствует неспособность данного штамма формировать псевдомицелий, что характерно для *C. famata* и не свойственно для *C. parapsilosis*. Суммарно идентичные результаты двух методов идентификации получены у 1287 (99,4%) изученных штаммов грибов (в 100% — для *C. albicans* и 97,5% — для не-*albicans* видов *Candida*).

### Обсуждение результатов

Целью нашего исследования было определить возможности MALDI-TOF MS для быстрой видовой идентификации дрожжевых грибов. При идентификации 2304 клинических изолятов дрожжевых грибов методом MALDI-TOF MS мы использова-

ли прямое нанесение образца на мишень MALDI. Идентифицировано 18 видов дрожжевых грибов четырех родов. Не удалось установить видовую принадлежность одного изолята — *Pichia fabianii*.

Видовая идентификация с высокой степенью достоверности (*score* 2–2,3) была выявлена у 55,5% культур *C. albicans* и у 67,9% не-*albicans* видов *Candida*. С меньшей достоверностью (*score* 1,7–<2) идентифицировано 44,5% штаммов *C. albicans* и 31,9% не-*albicans* видов *Candida*.

Полученные нами данные, касающиеся высокой степени достоверности идентификации до вида (*score* > 2,0), несколько ниже, чем в исследованиях, в которых использовался стандартный метод пробоподготовки с предварительной экстракцией белков. Так, N. Dhiman и соавт. [15] в проспективном исследовании 138 штаммов дрожжей и 103 архивных штаммов идентифицировали на уровне вида (*score* >2,0) в 92,0% и 81,6% случаев, соответственно. По данным van Veen S.Q. и соавт. [16], точная видовая идентификация 80 изолятов дрожжей 14 видов 7 родов получена в 87,5% случаев. G. Marklein и соавт. [13] оценивали 267 клинических изолятов 28 видов 7 родов. Из них 92,5% были определены правильно с высокой степенью достоверности. L. G. Stevenson и соавт. [14] при исследовании 194 клинических изолятов дрожжевых грибов у 192 определили видовую принадлежность к 23 видам 6 родов, причем у 169 (88%) штаммов — с большой точностью (*score* >2) и у 23 (12%) — с меньшей (*score* 1,7–< 2).

Нами получены значительно лучшие результаты прямой детекции белков, чем в исследовании A. Pinto и соавт. [18], которые при исследовании 88 клинических изолятов дрожжей достоверную идентификацию до вида получили только для 14% *C. albicans*, 35% *C. glabrata* и 13% *C. lusitanae*. Возможно, лучшие, по сравнению с другими авторами, результаты при использовании этой методики связаны с техникой нанесения образца на стальную панель MALDI. Чаще более достоверные результаты были получены нами во втором образце, нанесенном более тонким слоем, что, возможно, способствует лучшей деструкции клеточных структур гриба и высвобождению белковой субстанции при воздействии лазера.

Сравнение результатов идентификации 1294 культур дрожжевых грибов методом MALDI-TOF MS и традиционными методами, свидетельствующее о высокой частоте идентичных результатов (99,4%), дает основание доверять результатам проведенного нами масс-спектрометрического исследования. Прямая детекция белков без использования предварительной экстракции заметно сокра-

щает время идентификации и экономически менее затратна.

В последнее время появились сообщения о попытках оптимизировать метод выделения белковой субстанции, используя упрощенную методику экстракции белка путем прямой обработки образца гриба, нанесенного на мишень MALDI, 0,25% муравьиной кислотой. При этом предполагается, что существенно сократив время идентификации, можно сделать ее более дешевой при сохранении высокой степени достоверности. Мы сопоставили полученные нами данные с результатами видовой идентификации дрожжей, полученными в исследованиях с таким упрощенным протоколом пробоподготовки. Так, van B.H. Herendael и соавт. [17] при сравнении результатов идентификации 167 клинических образцов дрожжевых грибов методами стандартной и упрощенной экстракции у 163 изолятов (97,6%) получили идентичные данные. У 135 из 163 образцов (82,8%) значение *score* было выше 1,7, которое авторы оценили как минимально необходимое для видовой идентификации. В нашем исследовании (без предварительной экстракции) за счет снижения порога оценочного спектрального коэффициента (*score* >1,7) нам, так же как и L. G. Stevenson и соавт. [14], удалось повысить идентификацию на видовом уровне до 99,9%.

X. Iriart и соавт. [19] сравнили результаты идентификации дрожжевых грибов, выполненной тремя методами: рутинными лабораторными тестами, биохимическим типированием с помощью Vitek2 и методом масс-спектрометрии по короткому протоколу (Vitek MS). Показано, что 184 из 192 штаммов (95,8%) дрожжевых грибов были правильно идентифицированы с помощью Vitek MS при использовании модифицированной методики экстракции белков.

Метод биохимической видовой идентификации в нашем исследовании показал высокую достоверность (98,6%). В то же время у него есть свои ограничения и недостатки: длительность исследования (до 48 часов), затратность и самое главное — ограниченность рамками базы данных, в которую не включены редкие виды. Так, в нашем исследовании не были идентифицированы такие виды, как *C. nivariensis*, *C. lambica*, *Pichia fabianii*. Как и в исследовании G. Marklein и соавт. [13], *Pichia fabianii* по биохимическим параметрам ошибочно была идентифицирована как *C. utilis*, и только 18S rRNA секвенирование позволило нам уточнить видовую принадлежность гриба. Существенные преимущества у MALDI-TOF MS: быстрота выполнения, малая затратность на реагенты и гибкая система пополнения базы данных.

Что касается этиологической структуры ВВК, то за последние два года мониторинга видового спектра возбудителей она не претерпела существенных изменений, в сравнении с предшествующими годами [20]. В последнее время в литературе появилась информация о новых видах возбудителей грибковых инфекций: *C. nivariensis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. ciferri*, *C. palmioleophila*, *C. bracarensis*, *C. fermentati* и некоторых других [12, 18, 21]. Использование молекулярно-генетических методов (секвенирование) позволило разделить некоторые близкородственные виды. Так, из группы *C. parapsilosis* были выделены *C. orthopsilosis* и *C. metapsilosis*, вид *C. glabrata* оказался гетерогенным и из него выделен вид *C. bracarensis* [22]. Аналогичная ситуация оказалась с близкородственными видами *C. dubliniensis* и *C. albicans*. *C. palmioleophila* также является новым возбудителем и его часто по биохимическим параметрам ошибочно идентифицируют как *C. guilliermondii* или *C. famata* [23].

В нашем исследовании новых видов из числа перечисленных выше, кроме *C. dubliniensis* и *C. nivariensis*, выявлено не было, в то время как на момент исследования использованная в работе база данных MALDI Biotyper включала все эти виды, за исключением *C. bracarensis*. Учитывая весомую долю штаммов *C. glabrata* (229), нельзя исключить возможность присутствия среди них этого вида. Что

касается *C. palmioleophila*, то появились единичные сообщения о недооцененной роли этого возбудителя в этиологии ВВК. По данным Н.В. Фоменко и М.К. Иванова [24], на долю этого вида приходится 18,6% среди грибов рода *Candida* (по результатам молекулярно-генетического исследования ДНК грибов, экстрагированных из образцов вагинального отделяемого). В нашем исследовании за двухлетний период наблюдения не было идентифицировано ни одного штамма этого вида, хотя он присутствует в базе данных MALDI Biotyper. Можно полагать, что пополнение базы данных новыми видами расширит наши представления об этиологической структуре ВВК.

Таким образом, проведенное нами исследование показало высокую степень совпадения результатов идентификации дрожжевых грибов методом MALDI-TOF MS и традиционными методами. Полученные нами результаты при использовании метода прямого нанесения изолята на MALDI-мишень без предварительной экстракции продемонстрировали высокий процент корректной идентификации до вида с учетом значения *score* >1,7, минимально необходимого для определения вида гриба. Быстрота идентификации дрожжевых грибов, экономичность и возможность пополнения базы данных позволят со временем широко внедрять MALDI-TOF MS в рутинную практику микробиологических лабораторий.

## Литература

1. Chen S.C., Marriott D., Playford E.G., et al. Candidaemia with uncommon *Candida* species: predisposing factors, outcome, antifungal susceptibility, and implications for management. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15:662-9.
2. Walsh T.J., Groll A., Hiemenz J., Fleming R., Roilides E., Anaissie E. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10 (Suppl. 1):48-66.
3. Miceli M.H., Díaz J.A., Lee S.A. Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis* 2011; 11 (2):142-51.
4. Мирзабалаева А.К. Инфекционные вульвовагиниты: клиническая проблема и пути ее решения. *Акушерство и гинекология* 2005; 6:51-5.
5. Прилепская В.Н., Байрамова Г.Р. Вульвовагинальный кандидоз. *Клиника, диагностика, принципы терапии*. ГЭОТАР-Медиа, 2010; 80 с.
6. Pfaller M.A., Diekema D.J., Gibbs D.L., et al. Results from the artemis disk global antifungal surveillance study, 1997 to 2007: 10.5-year analysis of susceptibilities of noncandidal yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol* 2009; 47:117-23.
7. Sivasubramanian G., Sobel J.D. Refractory urinary tract and vulvovaginal infection caused by *Candida krusei*. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2009; 20 (11):1379-81.
8. Sanguinetti M., Porta R., Sali M., et al. Evaluation of VITEK 2 and RapID Yeast Plus systems for yeast species identification: experience at a large clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 2007; 45:1343-6.
9. Massonet C., Eldere J.V., Vaneechoutte M., DeBaere T., Verhaegen J., and Lagrou K. Comparison of VITEK 2 with ITS2-fragment length polymorphism analysis for identification of yeast species. *J Clin Microbiol* 2004; 42(5):2209-11.
10. Lau A., Chen S., Sorrell T., et al. Development and clinical application of a panfungal PCR assay to detect and identify fungal DNA in tissue specimens. *J Clin Microbiol* 2007; 45:380-5.
11. Montero C.I., Shea Y.R., Jones P.A., et al. Evaluation of pyrosequencing technology for the identification of clinically relevant non-dematiaceous yeasts and related species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27:821-30.
12. Alcoba-Florez J., delPilarArevalo M., Gonzalez-Paredes F.J., et al. PCR protocol for specific identification of *Candida nivariensis*, a recently described pathogenic yeast. *J Clin Microbiol* 2005; 43(12):6194-6.

13. Marklein M., Josten U., Klanke E., et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol* 2009; 47(9):2912-7.
14. Stevenson L.G., Drake S.K., Shea Y.R., Zelazny A.M., and Murray P.R. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF) for the identification of clinically important yeast species. *J Clin Microbiol* 2010; 48:3482-6.
15. Dhiman N., Hall L., Wohlfiel S.L., Buckwalter S.P., and Wengenack N.L. Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. *J Clin Microbiol* 2011; 49(4):1614-6.
16. van Veen S.Q., Claas E.C., and Kuijper E.J. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin. Microbiol* 2010; 48:900-7.
17. Van Herendael B.H., Bruynseels P., Bensaid M., et al. Validation of a modified algorithm for the identification of yeast isolates using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31(5):841-8.
18. Pinto A., Halliday C., Zahra M., et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identification of yeasts is contingent on robust reference spectra. *PLoS One* 2011; 6(10):e25712.
19. Iriart X., Lavergne R.A., Fillaux J., et al. Routine identification of medical fungi by the new Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight system with a new time-effective strategy. *J Clin Microbiol* 2012; 50 (6):2107-10.
20. Анкирская А.С., Муравьева В.В., Миронова Т.Г. и соавт. Генитальный кандидоз в структуре оппортунистических инфекций влагалища. Принципы лабораторной диагностики и значение мониторинга чувствительности грибов к антимикотикам. *Акушерство и гинекология* 2009; 5:31-7.
21. Cuenca-Estrella M., Gomez-Lopez A., Isla G., et al. Prevalence of *Candida braccarensis* and *Candida nivariensis* in a Spanish collection of yeasts: comparison of results from a reference centre and from a population-based surveillance study of candidemia. *Med Mycol* 2011; 49(5):525-9.
22. Santos C.R., Lima N., Sampaio P., Pais C. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight intact cell mass spectrometry to detect emerging pathogenic *Candida* species. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 71(3):304-5.
23. Jensen R.H., Arendrup M.C. *Candida palmioleophila*: characterization of a previously overlooked pathogen and its unique susceptibility profile in comparison with five related species. *J Clin Microbiol* 2011; 49:549-56.
24. Фоменко Н.В., Иванов М.К. Разнообразие видов микроскопических грибов, выявленных в урогенитальном тракте женщин. *Справочник заведующего КДЛ* 2012; 11:45-53.