

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи

Воропаев Александр Дмитриевич

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

1.5.11. Микробиология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Несвижский Юрий Владимирович

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Актуальность темы исследования.....	4
Степень разработанности темы исследования.....	5
Цель исследования.....	8
Задачи исследования	8
Научная новизна	8
Теоретическая и практическая значимость работы.....	10
Методология и методы исследования	11
Штаммы микроорганизмов.....	12
Культуральное исследование	13
Видовая идентификация.....	13
Определение чувствительности к противогрибковым и антибактериальным препаратам.....	17
Мультилокусное сиквенс-типирование штаммов <i>C. albicans</i>	18
Исследование экспрессии генов <i>ERG11</i> , <i>MDR1</i> , <i>CDR1</i> , <i>CDR2</i>	19
Секвенирование гена <i>ERG11</i>	20
Статистическая обработка результатов	21
Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации	22
Основные положения, выносимые на защиту	23
Степень достоверности и апробация результатов	23
ГЛАВА 1. ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГРИБОВ РОДА <i>CANDIDA SPP.</i> ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	25
1.1. Эпидемиология кандидозов	29
1.2. Устойчивость <i>Candida spp.</i> к противогрибковым препаратам	36
1.3. Механизмы устойчивости грибов рода <i>Candida</i> к противогрибковым препаратам	38
1.3.1 Эффлюксные переносчики	42
1.3.2 Повышенная экспрессия <i>ERG11</i>	45

1.3.3	Мутации в гене <i>ERG11</i>	46
1.3.4	Изменение метаболического пути	51
	РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	53
	ГЛАВА 2. АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГРИБОВ РОДА <i>CANDIDA</i>	53
	ГЛАВА 3. ОСОБЕННОСТИ ОППОРТУНИСТИЧЕСКОЙ МИКРОФЛОРЫ РОТОГЛОТКИ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ	60
	ГЛАВА 4. ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ ГРИБОВ РОДА <i>CANDIDA</i> , ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РОТОГЛОТКИ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ.....	65
4.1.	Структура популяции грибов рода <i>Candida</i> в ротоглотке ВИЧ-инфицированных пациентов	65
4.2.	Чувствительность грибов рода <i>Candida</i> , выделенных из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов, к противогрибковым препаратам	67
	ГЛАВА 5. ГЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ <i>C. ALBICANS</i>	72
5.1.	Мультилокусное сиквенс-типирование штаммов <i>C. albicans</i>	72
5.2.	Экспрессия генов <i>CDR1</i> , <i>CDR2</i> , <i>MDR1</i> и <i>ERG11</i> у штаммов <i>C. albicans</i> , выделенных из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов	75
5.3.	Мутации в гене <i>ERG11</i> у штаммов <i>C. albicans</i> , выделенных из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов	82
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	89
	ВЫВОДЫ	101
	ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	103
	ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	104
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	105
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	106
	Приложение 1	149

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Заболевания, вызываемые оппортунистическими микроорганизмами у пациентов, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), число которых в последние годы значительно увеличивается, представляют серьезную проблему для современного здравоохранения [75]. *Candida spp.* – повсеместно встречающиеся условно-патогенные грибы, способные вызывать инфекции кожи и слизистых различной локализации, а также угрожающие жизни состояния у иммунокомпromетированных пациентов [20]. Рецидивирующий орофарингеальный кандидоз значительно ухудшает качество жизни иммунокомпromетированных пациентов [140]. У 90% ВИЧ-инфицированных лиц наблюдается как минимум один эпизод орофарингеального кандидоза [178]. Всего в данной группе пациентов ежегодно регистрируется около 2 млн случаев орофарингеального кандидоза и 1,3 млн случаев кандидоза пищевода [133]. Кандидозы занимают значимую долю в структуре оппортунистических инфекций у пациентов с ВИЧ-инфекцией наравне с туберкулезом [33].

В настоящий момент доступны три основные группы противогрибковых препаратов: азолы, полиены, эхинокандины [55]. Новые препараты появляются достаточно медленно, поэтому распространение устойчивости к противогрибковым препаратам среди грибов рода *Candida* становится серьезной проблемой [84].

Растущее применение и распространение противогрибковых препаратов с целью профилактики и лечения, в том числе длительного лечения хронических рецидивирующих кандидозов слизистых, ведет не только к распространению устойчивых штаммов *C. albicans*, но и к повышению доли не-*albicans* видов грибов рода *Candida* [77]. Распространение не-*albicans* видов у ВИЧ-инфицированных способствует развитию рефрактерного кандидоза слизистых оболочек, из-за повышенного уровня природной устойчивости к противогрибковым препаратам. В случае *C. albicans* имеет место приобретенная устойчивость к противогрибковым

препаратам из ряда азолов, что создает проблему как для каждого отдельно взятого пациента, так и для эпидемиологии кандидозов при потенциальном распространении подобных штаммов [188]. На сегодняшний день информация о распространении штаммов *Candida spp.* представлена данными мультилокусного-сиквенс типирования [158]. Данные о клональной структуре популяции *Candida spp.*, в частности *C. albicans*, в России представлены ограниченно, в связи с чем данное исследование представляется актуальным.

Степень разработанности темы исследования

Candida albicans считается наиболее распространенным видом среди возбудителей кандидоза [68]. Обычно у пациента выделяется один вид *Candida spp.*, однако при некоторых нозологиях отмечается одновременное присутствие в биотопе нескольких штаммов одного или разных видов [138]. Кроме того, у определенных групп иммунокомпрометированных пациентов отмечается повышение доли не-*albicans* видов грибов рода *Candida*, обладающих повышенным уровнем природной и приобретенной устойчивости к противогрибковым препаратам. Так, среди онкологических больных одного крупного центра в г. Москва в качестве возбудителей кандидемий наиболее распространены *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. glabrata* и *C. lusitaniae*, причем доля не-*albicans* видов значительно преобладает [3]. Существуют исследования микрофлоры кишечника ВИЧ-инфицированных детей, в которых отмечено нарастание доли не-*albicans* видов, по сравнению с предшествующими исследованиями [15]. Несколько исследований среди взрослых пациентов напротив говорят о преобладании *C. albicans* в структуре возбудителей кандидозов на территории Российской Федерации, и не уделяют внимания проблеме устойчивости [10; 37].

Методы видовой идентификации *Candida spp.* на сегодняшний день достаточно разнообразны. Существуют классические методы, в том числе микроскопия, тест на образование ростовых трубок, с помощью которого возможно дифференцировать *C. albicans* от других видов. Хромогенные питательные среды позволяют по биохимической активности ориентировочно дифференцировать некоторые виды, чаще всего *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C.*

glabrata, а также облегчают разделение смешанных культур. Биохимические тест системы с применением более подробных биохимических характеристик позволяют достаточно точно определять вид (API, Remel, Vitek, MicroScan, BD Phoenix) [6]. MALDI-TOF масс-спектрометрия – основной метод видовой идентификации микроорганизмов во многих современных бактериологических лабораториях, так как обладает высокой точностью и скоростью получения результата. Ошибки видовой идентификации, как и для вышеуказанных методов встречаются в отношении редких видов *Candida spp.* Молекулярно-генетические методы представлены ПЦР тест-системами с использованием видоспецифических праймеров, позволяющие точно идентифицировать определенный набор видов, а также секвенирование внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS), либо рибосомальной рибонуклеиновой кислоты (рРНК) большой субъединицы рибосомы (rRNA LSU) грибов, являющиеся референтными методами видовой идентификации в настоящее время [6; 260].

Несмотря на разнообразие методов видовой идентификации, по различным причинам, далеко не во всех бактериологических лабораториях рутинно определяют вид *Candida spp.*, применение молекулярно-генетических методов еще менее распространено [184]. Методы выявления различных известных механизмов устойчивости для повышения скорости и точности определения чувствительности к противогрибковым препаратам в настоящий момент находятся на стадии исследований [195]. Тест-системы для рутинного определения механизмов устойчивости *Candida spp.* в клинических лабораториях в настоящее время не существуют, преимущественно из-за многообразия таких механизмов, обладающих при этом равноценной значимостью [186]. Отчасти по этой причине до сих пор отсутствуют данные о распространенности различных механизмов устойчивости возбудителей кандидозов во многих странах, в том числе в Российской Федерации.

Также остается открытым вопрос значимости распространения устойчивых штаммов в проблеме резистентности к противогрибковым препаратам у различных видов *Candida* [51]. Информация о сиквенс-типах штаммов, циркулирующих на

территории России, представлена всего двумя штаммами сиквенс-типов 714 и 737, выделенных из крови в 2014 году, без какой-либо дополнительной сопроводительной информации. Данные о наличии тех или иных механизмов резистентности к противогрибковым препаратам отсутствуют в использованной базе данных и связанных со штаммами публикациях [158].

В соответствии с большинством клинических рекомендаций, при назначении противогрибковых препаратов следует учитывать локальную эпидемиологическую ситуацию [12]. При стабильном состоянии пациента и подтвержденном возбудителе рекомендуется использовать флуконазол или вориконазол [27]. Таким образом флуконазол остается широко используемым противогрибковым препаратом, несмотря на фунгистатическое действие и описанные механизмы природной и приобретенной устойчивости [61].

Рутинное определение чувствительности к противогрибковым препаратам в принципе проводится не повсеместно, но рекомендуется для инвазивных микозов [59]. В настоящее время проводятся исследования по сравнению результатов определения фенотипической устойчивости и выявленных молекулярно-генетически механизмов резистентности [116]. Чувствительность к противогрибковым препаратам зависит от вида *Candida spp.* [12].

В России существуют единичные публикации о механизмах устойчивости к противогрибковым препаратам у штаммов *Candida* [4; 19]. Литературных данных на данную тему в группе ВИЧ-инфицированных пациентов не обнаружено [34]. Приобретенный характер устойчивости *C. albicans* требует отдельного изучения ее механизмов у данного вида.

В связи с обозначенными проблемами представляется важным изучение видового разнообразия, генетических механизмов и распространённости резистентности в популяции *Candida spp.* у ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингеальным кандидозом в Московском регионе.

Цель исследования

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

Задачи исследования

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

Научная новизна

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

В структуре популяции *Candida spp.* установлено преобладание гетерогенных по видовому составу ассоциаций штаммов грибов рода *Candida*, представленных, преимущественно, *не-albicans* видами. Большинство выделенных в ходе исследования штаммов *C. albicans* (72,7%) и все штаммы *C. krusei* входили в состав

гетерогенных ассоциаций, что свидетельствует об этиологической значимости не-*albicans* видов грибов рода *Candida* в развитии кандидозов слизистых.

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

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

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

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

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

Теоретическая и практическая значимость работы

Проведенный анализ фенотипических и генетических характеристик штаммов *Candida spp.*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингеальным кандидозом в г. Москва, дополняет современные представления об этиологической и патогенетической роли грибов рода *Candida* в развитии микозов у иммунокомпрометированных лиц с учетом региональных особенностей циркулирующих штаммов.

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

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

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

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

исследований для выявления механизмов устойчивости к противогрибковым препаратам *Candida spp.*

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

Методология и методы исследования

Объекты исследования – штаммы условно-патогенных микроорганизмов, в том числе *Candida spp.*, выделенные из ротоглотки пациентов с ВИЧ-инфекцией стадий 3, 4А, 4Б, 4В, находившихся на стационарном лечении в Инфекционной клинической больнице №2 Департамента здравоохранения г. Москвы на кафедре Инфекционных болезней Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) под наблюдением врача-инфекциониста Филиной Ю.С. с апреля 2015 по апрель 2017 гг. У всех обследованных лиц было получено информированное согласие на использование данных лабораторных анализов в научных целях.

Для выполнения работы использовали микробиологические, биохимические, молекулярно-генетические исследования, математические и статистические методы обработки данных.

Лабораторные исследования осуществлялись на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии имени А.А. Воробьева Института Общественного

Здоровья имени Ф.Ф. Эрисмана ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), а также в лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора. Все исследования проведены с согласия Комитета по биомедицинской этике ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора (протокол № 34 от 06.12.2018 г.) на основании требований Хельсинской декларации Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» от июня 1964 г. Дизайн обследования пациентов был основан на открытом, контролируемом, рандомизированном, ретроспективном, поперечном исследовании.

Штаммы микроорганизмов

В работе использовано 98 штаммов микроорганизмов, в том числе 52 штамма *Candida spp.*, выделенных из ротоглотки 31 ВИЧ-инфицированного пациента с признаками орофарингеального кандидоза. В исследовании использовалась контрольная выборка, состоящая из 85 штаммов микроорганизмов, которые были выделены от 30 ВИЧ-инфицированных пациентов, не имеющих клинических признаков орофарингеального кандидоза.

У всех пациентов был подтвержден диагноз ВИЧ-инфекции на основе клинико-эпидемиологических данных и обнаружения специфических антител/антигенов методом иммуноферментного анализа и иммунного блоттинга (ИБ) к белкам вируса иммунодефицита человека (Profiblot 48 TECAN, АвтоБлот 3000). Распределение пациентов по стадиям ВИЧ-инфекции в соответствии с российской клинической классификацией было следующим: 3 стадия (2%), 4А стадия (10%), 4Б стадия (8%), 4В стадия (80%) [8]. Среднее количество CD4+ лимфоцитов на момент включения в исследование составило 265 клеток/мкл. У 77,8% пациентов наблюдалось количество CD4+ лимфоцитов менее 350 клеток/мкл, а у 33,1% – менее 50 клеток/мкл. Медианное значение составило 113 клеток/мкл.[34]. У пациентов основной группы присутствовали клинические признаки орофарингеального кандидоза. На момент исследования пациенты не

получали противогрибковой терапии. Обследованы пациенты в возрасте 20-69 лет, 65% составили лица возрастом 20-40 лет. К моменту обследования срок наблюдения за пациентами в среднем составил 6 лет.

Культуральное исследование

Первичные посевы мазков из ротоглотки производились на 5% кровяной агар с дефибрированной бараньей кровью (Blood Agar Base, Himedia, Индия), инкубировались в термостате в аэробных условиях 18–48 часов при 37 С°. Для выделения чистой культуры грибов использовался 1,5% декстрозный агар Сабуро (Himedia, Индия), посевы инкубировались в термостате в аэробных условиях 18–48 часов при 37 С°. Далее культуры микроскопировали с окраской по Граму (Remel Gram Stain Kit, Remel, США) и пересевали на хромогенный агар для выделения чистой культуры и ориентировочной видовой идентификации. Для выделения чистой культуры бактерий использовался 5% кровяной агар с дефибрированной бараньей кровью (Blood Agar Base, Himedia, Индия), маннит-солевой агар (Himedia, Индия), HiChrome UTI Agar (Himedia, Индия), с посевом методом истощающего штриха [165]. В дальнейшем в исследование включались штаммы условно-патогенных микроорганизмов.

Видовая идентификация

Видовая идентификация производилась различными классическими и современными микробиологическими методами. В исследовании использовался метод идентификации штаммов, основанный на культивировании на кукурузном агаре (Corn Meal Agar, Himedia, Индия) по методу Дальмау. Этот метод позволяет выявить способность грибов образовывать истинные или ложные гифы [60]. Суть метода состоит в культивировании штаммов на бедных питательных средах под покровным стеклом, что стимулирует образование гиф/псевдомицелия у грибов рода *Candida*. Для выявления способности грибов к формированию ростовых трубок проводилось инкубирование суточных культур в сыворотке крови (Сыворотка лошадиная нормальная, Микроген, Россия) при температуре 37°С в течение 3 часов. После этого проводилась микроскопия нативных препаратов. Образование истинных гиф и формирование ростовых трубок характерно только

для *C. albicans*. [60]. Микроскопию окрашенных и нативных препаратов проводили на ручном световом микроскопе AxioImager.Z1 (Carl Zeiss, Германия), оснащенном окулярами PI 10×/23, объективами N-ACHROPLAN 10×/0.25 M27, 20×/0.45 M27, 40×/0.65 Ph2 M27, 100×/1.25 Oil M27 и камерой AxioCam ERc 5s.

Для ориентировочного определения вида грибов использовалась хромогенная среда Chromogenic Candida Agar (Oxoid, Великобритания). Культуры инкубировались при 37°C в течение 24 часов. Визуальная оценка происходила путем дифференцировки грибов по цвету колоний, в соответствии с инструкцией к дифференциальной среде. [207]. В состав среды входит 5-бром-4-хлор-3-индолил-бета-D-галактопиранозид (X-NAG), позволяющий выявлять продукцию фермента бета-N-ацетилгалактозаминидазы, что свойственно для вида *C. albicans*. Помимо этого, в состав среды входит 5-бromo-6-хлоро-3-индолил фосфат p-толуидиновой соли (BCIP), служащий субстратом для щелочной фосфатазы. Продукция щелочной фосфатазы характерна для *C. parapsilosis* и *C. tropicalis* [205] (Таблица 1).

Таблица 1 – Рост различных видов *Candida spp.* на хромогенном агаре Chromogenic Candida Agar (Oxoid, Великобритания) [205]

Хромоген	X-NAG	BCIP	Типичный вид колоний
Фермент	Гексозаминидаза	Щелочная фосфатаза	
<i>C. tropicalis</i>	+		Темно-синие
<i>C. albicans</i> <i>C. dubliniensis</i>	+		Зеленые
<i>C. krusei</i>		+	Сухие, неравномерно розово-коричневые
<i>C. glabrata</i> <i>C. kefyr</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. lusitaniae</i>		+/-	Бежевые/желтые/коричневые

Также использовались биохимические тест-системы Remel RapID YEAST PLUS (Remel, США) в соответствии с инструкцией производителя. Тест-система Remel позволяет идентифицировать до 40 различных дрожжевых грибов, в том числе *Candida spp.*: *C. apicola*, *C. ciferrii*, *C. colliculosa*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C.*

guilliermondii, *C. intermedia*, *C. kefir*, *C. krusei*, *C. lambica*, *C. lusitaniae*, *C. marina*, *C. parapsilosis*, *C. rugosa*, *C. stellatoidea*, *C. tropicalis*, *C. utilis*, *C. zeylanoides*, *C. albicans*. Стандартизованные суспензии клеток вносились в лунки планшетов тест-систем, проводилось инкубирование при 30°C в течение 4 часов, после чего производился визуальный или полуавтоматический учет результатов тестов в каждой отдельной лунке. Результаты интерпретировались в соответствии с инструкцией производителя, либо с помощью официального программного обеспечения [126]. Биохимические реакции приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Принципы биохимической идентификации в тест-системе Remel RapID Yeast Plus (Remel, США) [126]

Субстрат	Принцип	Ссылка
Глюкоза	Метаболизм углеводов приводит к снижению pH и изменению цвета индикатора.	[176]
Мальтоза		
Сахароза		
Трегалоза		
Раффиноза		
Эфиры жирных кислот	Гидролиз эфиров жирных кислот приводит к снижению pH и изменению цвета индикатора.	[172]
ρ-Нитрофенил-N-ацетил-β, D-галактозаминид	Ферментативный гидролиз бесцветного ариль-замещенного гликозида или фосфоэфира высвобождает желтый σ- или ρ-нитрофенил, который обнаруживается с помощью реагента RapID Yeast Plus A.	[213]
ρ-Нитрофенил-α, D-глюкозид		
ρ-Нитрофенил-β, D-глюкозид		
σ-Нитрофенил-β, D-галактозид		
ρ-Нитрофенил-α, D-галактозид		
ρ-Нитрофенил-β, D-фукуозид		
ρ-Нитрофенил фосфат		
ρ-Нитрофенил фосфорилхолин		
Мочевина	Гидролиз мочевины приводит к образованию щелочных продуктов, которые повышают pH и меняют цвет индикатора.	[215]
Пролин-β-нафтиламид	Ферментативный гидролиз ариламидного субстрата освобождает свободный β-нафтиламин, который обнаруживается с помощью реагента RapID Yeast Plus Reagent B.	[196]
Гистидин β-нафтиламид		
Лейцил-глицин β-нафтиламид		

Кроме того, проводилась видовая идентификация выделенных микроорганизмов с помощью микробиологического анализатора VactoSCREEN (НПФ «Литех», Россия) на базе MALDI-TOF масс-спектрометра LaserToF LT2 Plus (Analysis Instruments, Великобритания). Для этого использовалась пробоподготовка с предварительной обработкой муравьиной кислотой. Суточные культуры с агара Сабуро наносились на мишень при помощи микробиологической петли, покрывались 1 мкл 80% раствора муравьиной кислоты, и инкубировались до высыхания раствора. Затем лунки мишени покрывались 1 мкл раствора матрицы, представляющего собой насыщенный раствор альфа-циановой матрицы (10 мг/мл) в стандартном растворе, включающем в себя 2,5% трифторуксусной кислоты и 50% ацетонитрила. После высыхания раствора матрицы образцы исследовались на масс-спектрометре в соответствии с инструкцией производителя.

Результаты идентификации подтверждались с помощью ПЦР с использованием набора реагентов для одновременного выявления ДНК *Candida albicans*, *Candida glabrata* и *Candida krusei* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс *C. albicans/C. glabrata/C. krusei* – МУЛЬТИПРАЙМ-FL» (АмплиСенс, Россия). Выделение ДНК производили из чистых культур *Candida spp.* с помощью реагентов «ДНК-сорб-АМ» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкцией производителя [29]. Для постановки ПЦР использовался амплификатор Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, США).

Бактерии идентифицировали с использованием микроскопии по Граму, посевов на дифференциально-диагностические среды и биохимических тест систем Remel RapID (Remel, США) и Mikrolatest (ErbaLachema, Чехия) в соответствии с инструкцией производителя. Выявление генов карбапенемаз проводилось с помощью наборов реагентов для выявления генов карбапенемаз KPC и OXA-48-подобных (OXA-48 и OXA-162) и класса МБЛ групп VIM, IMP и NDM методом ПЦР с ГФЛ-детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени

MDR KPC/OXA-48-FL (АмплиСенс, Россия) и MDR MBL-FL (АмплиСенс, Россия) [81].

Определение чувствительности к противогрибковым и антибактериальным препаратам

Была произведена оценка чувствительности к противогрибковым препаратам диско-диффузионным методом и методом микроразведений в соответствии с рекомендациями Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ) по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (2021-01), основанных на стандартах CLSI M44 (3-е издание) и M60 (3-е издание) и стандартах и критериях Европейского комитета по определению чувствительности к антибиотикам (EUCAST) (10.0) [24]. Использовались диски для определения чувствительности с вориконазолом (нагрузка 1 мкг), флуконазолом (нагрузка 25 мкг) Oxoïd (Великобритания). Для приготовления инокулюма использовали суточные культуры исследуемых *Candida spp.* и 5 мл физиологического раствора. Мутность инокулюма доводили 0,5 McFarland (1×10^6 - 5×10^6 клеток/мл) с помощью денситометра и стандартов мутности (Remel, США). Не позднее 15 минут после приготовления суспензию в трех направлениях стерильным ватным тампоном засеивали на плотную питательную среду Мюллер-Хинтона, содержащую 2% глюкозу и 0,5 мкг/мл красителя метиленового синего (Himedia, Индия) для грибов и стандартный агар Мюллер-Хинтона (Himedia, Индия) для бактерий. Диски располагали на поверхности агара на расстоянии, исключающем перекрывание зон задержки роста. Инкубацию проводили 24 часа при $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Учет результатов производили по зоне полного подавления роста. Интерпретацию зон задержки роста также проводили в соответствии со стандартами CLSI M60 (3-е издание) и EUCAST (10.0). Учет результатов проводили измерением диаметра зоны задержки роста, и оценивали как «чувствительные», «чувствительные при повышенной экспозиции» и «резистентные».

Также проведена оценка чувствительности методом серийных микроразведений с помощью планшетов Sensititre YeastOne10 (Trek diagnostic

system, Великобритания) в соответствии с инструкцией производителя. Для этого инокулюм подготавливался аналогично диско-диффузионному методу, после чего вносился в модифицированную среду RPMI-1640 (Trek diagnostic system, Великобритания) и распределялся по 96-луночным планшетах для серийных микроразведений с внесенными субстанциями [86]. Учет результатов производился визуально, по сравнению с ростом в лунке с положительным контролем в соответствии с критериями EUCAST (10.0) [227].

Мультилокусное сиквенс-типирование штаммов *C. albicans*

Для мультилокусного сиквенс-типирования штаммов *C. albicans* использовались следующие праймеры:

- CaACC1-F gcaagagaaattttaattcaatg,
- CaACC1-R ttcatcaacatcatccaagt,
- CaVPS-F tcggtgagagatattcgactt,
- CaVPS-F acggatggatctccagtcc,
- CaADP1-F gagccaagtatgaatgatttg,
- CaADP1-R ttgatcaacaaccgataat,
- CaSYA1-F agaagaattgttgctgttactg,
- CaSYA1-R gttaccttaccaccagcttt,
- CaAAT1a-F actcaagctagatttttggc,
- CaAAT1a-R cagcaacatgattagccc,
- CaMPI-F accagaaatggccattgc,
- CaMPI-R gcagccatgcattcaattat,
- CaZWF1-F gtttcattgatcctgaagc,
- CaZWF1-Rgccattgataagctacctggat [82].

Для амплификации генов домашнего хозяйства использовалась реакционная смесь Qiagen PCR Master Mix, 2x (Германия) и амплификатор Applied Biosystems Veriti (США) со следующей программой: 95 С° 15 минут, 30 циклов 95 С° 30 секунд, 55 С° 1 минута, 72 С° 1 минута, затем 72 С° 4 минуты.

Очистка продуктов ПЦР проводилась с помощью набора ExoSAP-IT (Applied biosystems, США) в соответствии с инструкцией производителя: 15 мин при 37 С°, 15 минут при 80 С°.

Реакция секвенирования проводилась с помощью набора реагентов BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems, США) со следующими параметрами: 95 С° 1 минута, 35 циклов 95 С° 15 секунд, 55 С° 15 секунд, 72 С° 30 секунд, затем 72 С° 7 минут.

Очистка продуктов реакции секвенирования производилась с помощью набора реагентов BigDye Xterminator Purification Kit (Applied biosystems, США) в соответствии с инструкцией производителя. Для секвенирования использовался генетический анализатор 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) [244]

Исследование экспрессии генов *ERG11*, *MDR1*, *CDR1*, *CDR2*

Уровни экспрессии генов *ERG11*, *MDR1*, *CDR1*, *CDR2* были измерены с помощью количественной ПЦР и метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$ для анализа. Выделение РНК проводилось с помощью реагента для выделения суммарной РНК «ExtractRNA» (ЗАО Евроген, Россия) в соответствии с инструкцией производителя из суточной чистой культуры исследуемого штамма. Обратная транскрипция проводилась с помощью набора «Реверта-L» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкцией производителя: 30 минут при 37 С°.

В работе использовались следующие праймеры [53]:

- *ERG11*-F aactacttttgtttataatttaagatggactattga,
- *ERG11*-R aatgatttctgctggttcagtaggt,
- *MDR1*-F ttacctgaaacttttgcaaaaaca,
- *MDR1*-R acttgtgattctgtcgttaccg,
- *CDR2*-F ggtattggctggctcctaattgtga,
- *CDR2*-R gcttgaatcaataagtgaatggattac,
- *CDR1*-F ttagccagaactttcactcatgatt,
- *CDR1*-R tatttatttctcatgttcatatggattga,
- *PMA1*-F ttgaagatgaccaccaatcc,

- *PMA1*-R gaaacctctggaagcaaatgg,
- *ACT1*-F ttggatgaagcccaatcc,
- *ACT1*-R catatcgtcccagttggaaca.

Для проведения ПЦР в реальном времени в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I использовалась 2,5-кратная реакционная смесь M-427 (ЗАО Синтол, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Амплификация проводилась с использованием Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems 7500, США) со следующими параметрами: 95 °С 3 минуты, 40 циклов 95 °С 10 секунд, 55 °С 20 секунд, регистрация сигнала происходила при температуре 55 °С.

Гены домашнего хозяйства *ACT* и *PMA* использовались в качестве контрольных генов для определения уровней экспрессии. Базовые значения $2^{-\Delta\Delta C_t}$ исследуемых штаммов для генов *ERG11*, *MDR1*, *CDR1*, *CDR2* получены при исследовании чувствительных штаммов (n=7). Уровень экспрессии исследуемого штамма считался достоверно повышенным в случае, если он превышал базовые средние значения для чувствительных штаммов (m) более чем на 3 стандартных отклонения (3σ) [171].

Секвенирование гена *ERG11*

Для поиска мутаций в гене *ERG11* отобраны 18 устойчивых к флуконазолу и вориконазолу штаммов *C. albicans*.

Для секвенирования гена *ERG11* по Сэнгеру использовались праймеры [112]:

- *ERG11*-1-F atggctattgtgaaactgtcatt
- *ERG11*-1-R ggatcaatatcaccacgttctc
- *ERG11*-2-F attggagacgtgatgctgctcaa
- *ERG11*-2-R ccaaatgattctgctggttcagt.

Амплификация *ERG11* для секвенирования проводилась с использованием набора реактивов Qiagen PCR Master Mix, 2x (Германия) по следующей программе с использованием прибора Applied Biosystems Veriti (США): 95 °С 15 минут, 35 циклов 95 °С 40 секунд, 60 °С 40 секунд, 72 °С 1,5 минуты, затем 72 °С 10 минут.

Очистка продуктов ПЦР проводилась с помощью набора ExoSAP-IT (Applied biosystems, США) в соответствии с инструкцией производителя: 15 мин при 37 C°, 15 минут при 80 C°.

Реакция секвенирования проводилась с помощью набора реагентов BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems, США) со следующими параметрами: 95 C° 1 минута, 35 циклов 95 C° 15 секунд, 55 C° 15 секунд, 72 C° 30 секунд, затем 72 C° 7 минут.

Очистка продуктов производилась с помощью набора реагентов BigDye Xterminator Purification Kit (Applied biosystems, США) в соответствии с инструкцией производителя. Для секвенирования использовался генетический анализатор 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) [244].

Статистическая обработка результатов

Для статистического анализа и визуализации данных использовалось программное обеспечение Microsoft Excel, Python библиотеки SciPy [228], Matplotlib [145]. Для непрерывных величин проводилось определение нормальности распределения по Шапиро-Уилку. Для оценки значимости различий между группами использовался точный критерий Фишера для дискретных величин и U-критерий Манна-Уитни для непрерывных. Для корреляционного анализа проводился анализ таблиц сопряженности, использовался коэффициент корреляции Пирсона. Критический уровень ошибки при проверке статистических гипотез принимался за общепринятую в медицине величину $p < 0,05$ [11]. Точность видовой идентификации определялась как доля штаммов *Candida*, для которых правильно определен вид с помощью используемого теста как способа классификации данных микроорганизмов.

Анализ данных мультилокусного сиквенс-типирования (МЛСТ) штаммов *C. albicans* проводился при помощи программного обеспечения PhyloViz и алгоритма goeBURST [134] с построением минимального остовного дерева, а также библиотеки Python SciPy для иерархической кластеризации методом определения невзвешенной средней связи (UPGMA) на основании расстояния Хэмминга и

построения дендрограммы. Информация об известных генотипах и штаммах *C. albicans* получена из базы данных PubMLST [158].

Уровень экспрессии исследуемых генов оценивался с помощью метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$, где $\Delta C_t = C_{t,x} - C_{t,R}$ – разница между пороговыми циклами исследуемого и контрольных генов *act* и *pma*, учитывалось среднее значение, а $-\Delta\Delta C_t = -(\Delta C_{t,q} - \Delta C_{t,cb})$ – разница между значением, полученным для образца q и базовым значением, полученным для чувствительных штаммов [171]. Повышенным считался уровень экспрессии, превышающий базовые средние значения для чувствительных штаммов (m) более чем на 3 стандартных отклонения (3σ).

Для анализа данных секвенирования по Сэнгеру гена *ERG11* *C. albicans* использовалось программное обеспечение MEGA 11 [239]. Выравнивание полученных последовательностей производилось с последовательностью гена *ERG11* штамма *C. albicans* (Robin) Berkhout SC5314 [235] с использованием алгоритма MUSCLE [243]. Поиск выявленных нуклеотидных и аминокислотных замен производился в базах данных Candida Genome Database, UniProt, а также по данным литературы, изложенным в таблице 1 [241; 252].

Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации

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

научным сотрудником лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, к.б.н. Ю.Н. Урбан.

Основные положения, выносимые на защиту

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

2. Штаммы *Candida spp.*, выделенные у ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингеальным кандидозом в г. Москва, в подавляющем большинстве устойчивы к азолам, в частности к флуконазолу. Устойчивые штаммы *C. albicans* относились к 18 различным сиквенс типам и обладали несколькими вариантами повышенной экспрессии генов *ERG11*, *CDR1*, *CDR2* и *MDR1*, а также мутациями в гене *ERG11*.

Степень достоверности и апробация результатов

Степень достоверности результатов, полученных при проведении исследования, подтверждается адекватным объемом исследований объектов наблюдения: 98 штаммов микроорганизмов, выделенных из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов с клиническими проявлениями орофарингеального кандидоза в г. Москва, в том числе 52 штамма *Candida spp* (Приложение 1), и 85 штаммами контрольной выборки, а также использованием оптимально подобранных методов статистической обработки данных. Для получения результатов использовались современные микробиологические и молекулярно-генетические методы исследований, анализ результатов проводился при помощи современного программного обеспечения для математической и статистической обработки данных.

Исследования проводились в рамках темы НИР «Экология условно патогенных микробов и их роль в патологии человека» кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии имени академика А.А. Воробьева Института общественного здоровья имени Ф.Ф. Эрисмана ФГАО ВО Первый МГМУ имени

И.М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский университет) и НИОКТР «Молекулярно-генетическая и фенотипическая характеристика возбудителей оппортунистических инфекций; мониторинг их устойчивости к антибактериальным препаратам.» (2021–2025 гг.), Рег. № 121021000287–0 ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.

Диссертация апробирована на заседании научной конференции кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии имени академика А.А. Воробьева Института общественного здоровья имени Ф.Ф. Эрисмана Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) (протокол №5 от 20 марта 2023 г.).

Основные положения диссертации были доложены и обсуждены на научных конференциях:

1. Четвертый Съезд Микологов России (Москва, 12–14 апреля 2017 г.);
2. Конференция по медицинской микологии "Социально-значимые микозы" (Москва, 11–12 апреля 2019 г.);
3. Российско-китайский конгресс по медицинской микробиологии, эпидемиологии, клинической микологии и иммунологии (XXII Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 12–15 июня 2019 г.);
4. Четвертый международный микологический форум (Москва, 14–15 апреля 2020 г.);
5. Всероссийский конгресс по медицинской микробиологии, эпидемиологии, клинической микологии и иммунологии (XXIII Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 9–11 ноября 2020 г.);
6. Всероссийский конгресс по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXIV Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 9–11 июня 2021 г.)

ГЛАВА 1. ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГРИБОВ РОДА *CANDIDA SPP.* ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Грибы рода *Candida* представляют собой одноклеточные дрожжи, способные к образованию псевдомицелия, бластоспор - клеток, образующихся путем почкования латерально на стволовых клетках псевдомицелия, хламидоспор – толстостенных клеток округлой формы, переживающих неблагоприятные условия окружающей среды [57].

Будучи частью нормальной микрофлоры тела человека, *Candida* могут служить причиной различных заболеваний, проявляя свои патогенные свойства. Кандидозное поражение тканей и органов, включая орофарингеальный кандидоз, является закономерным этапом развития прогрессирующего иммунодефицитного состояния, связанного с поражением системы общего и местного иммунитета у пациентов с ВИЧ-инфекцией. Так, к примеру, в исследовании Бухарина и соавторов показан антагонистический характер взаимодействия бактериальной и грибковой микробиоты кишечника детей с патологией опорно-двигательного тракта, в то же время отмечается возможность возникновения бактериально-грибковых ассоциаций и усиление персистентного потенциала грибов условно-патогенными бактериями [31]. В работах Заславской и соавторов показан антагонистический характер взаимодействий энтерококков и грибов рода *Candida* [1].

В качестве факторов вирулентности грибов рода *Candida* рассматриваются секреторные ферменты, такие как аспартил-протеазы (Saps), токсины, такие как кандидализин, гемолизин, фосфолипазы участвующие в тканевой инвазии, а также формирование гиф и образование биопленок [251].

Способность к образованию гиф у *C. albicans* рассматривается как фактор вирулентности [105]. Отмечено, что образование гиф позволяет *Candida* пережить фагоцитоз [177]. Наблюдается взаимосвязь между уровнем вирулентности, образование гиф и биопленок, чувствительностью к каспофунгину и регуляторными субъединицами Cdc55 и Rts1 протеин-фосфатазы-2А (PP2A) [249].

В данных процессах важную роль играет кальциневрин и шаперон белка теплового шока 90 (Hsp90). Рассматриваются терапевтические возможности ингибиторов HSP90, HDAC в отношении устойчивых к азолам *C. albicans* в экспериментах на мышах [141]. В образовании гиф важную роль играет метаболический путь глицерола высокой осмолярности (HOG) и митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK) [73]. Ведется поиск веществ, ингибирующих образование гиф у *C. albicans* [143]. Исследования с помощью атомно-силовой микроскопии показывают, что флуконазол сильнее подавляет рост гиф *C. albicans*, чем каспофунгин [150]. При этом часть исследований на отдельных штаммах *C. albicans* показывает отсутствие связи между вирулентностью и приобретенной устойчивостью [261].

Описана взаимосвязь между способностью отдельных штаммов к образованию биопленок и повышенной смертностью при кандидемии, особенно *C. albicans* [210]. Отмечается повышенная устойчивость к ряду противогрибковых препаратов в фенотипе биопленок [64]. Механизм повышения устойчивости в виде биопленок пока неясен и требует изучения [219]. В форме биопленок также повышается экспрессия секретлируемых аспартил-протеаз (SAP), факторов вирулентности, участвующих в процессах инфекции и колонизации, кроме того ассоциируемых с повышением устойчивости к азолам и амфотерицину В [73]. *C. albicans* способны формировать биопленки совместно с другими микроорганизмами, например с бактериями *C. acnes* [92]. *C. tropicalis* также образуют сложно организованные биопленки [174]. Способность к образованию биопленок связывают с наличием и экспрессией определенных генов, а также гидрофобностью поверхности клетки [169]. В составе биопленок *Candida* устойчивы к высоким концентрациям азолов и амфотерицина В [70].

В систематическом обзоре Orlandini и соавторами показано, что активность таких факторов вирулентности как фосфолипаза и гемолитические ферменты, выше у *C. albicans*, выделенных из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов, по сравнению с неинфицированными лицами [54].

Большинство грибковых инфекций в мире вызываются грибами рода *Candida*. Наиболее часто кандидоз вызывают *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C.*

krusei, реже другие виды. Чаще других видов среди возбудителей кандидоза выделяются *C. albicans* (30-80%) [178]. *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* и *C. tropicalis* относятся к III группе патогенности, как возбудители оппортунистических глубоких микозов. Прочие *Candida spp.* относятся к четвертой группе патогенности в подавляющем большинстве случаев вызывают неинвазивные кандидозы [32]. Имеются существенные различия между видами *Candida spp.*: так *C. glabrata* генетически ближе к *Saccharomyces cerevisiae*, чем к представителям своего рода, поэтому она в меньшей степени рассматривается как комменсал, кроме того, по-видимому, *C. glabrata* способны к половому процессу, что увеличивает вероятность мутационной изменчивости, ведущей в том числе и к развитию устойчивости к противогрибковым препаратам [127].

Несмотря на достижения современной медицины, проблемы, связанные с микозами, остаются актуальными [242]. Особенно важным является кандидозное осложнение основного заболевания или его терапии, особенно для иммунокомпрометированных пациентов, число которых продолжает расти [138].

Растущее применение и распространение антибиотиков, гормональных, иммунодепрессивных препаратов, препаратов, подавляющих Т-клеточное звено иммунитета, таких как ингибиторы кальциневрина, блокаторы фактора некроза опухолей альфа (ФНО-а), иммуносуппрессирующие аналоги нуклеозидов, генно-инженерных биологических препаратов и их длительное, нерациональное использование ведет к увеличению числа случаев оппортунистических инфекций, в том числе и кандидозов [77]. Также, существуют врожденные нарушения иммунного ответа, для которых характерно развитие различных форм кандидозов [211]. Пациенты с сахарным диабетом также склонны к развитию кандидозов, есть данные о влиянии повышенных уровней фруктозы в сыворотке крови на повышение чувствительности *Candida spp.* к противогрибковым препаратам за счет увеличения продукции транспортеров *CDR1* и *MDR1* [237].

Распространенной причиной является иммунокомпрометированность пациентов в принципе, в том числе пациентов с гематологическими заболеваниями, длительной нейтропенией, трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток,

трансплантацией органов, наследственными иммунодефицитами, такими как хроническая гранулематозная болезнь (ХГБ), тяжелые комбинированные иммунодефициты (ТКИН), острой реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) с вовлечением ЖКТ, легких, печени, рефрактерной к лечению стероидами, и так далее [6]. Так, большой проблемой являются заболевания, вызываемые оппортунистическими микроорганизмами у ВИЧ-инфицированных пациентов, число которых в последние годы значительно увеличивается [75].

Грибковые инфекции на втором месте после туберкулеза среди причин смерти пациентов с синдромом приобретенного иммунного дефицита (СПИД) [41]. У пациентов с ВИЧ-инфекцией наиболее часто из поверхностных кандидозов наблюдаются орофарингеальный кандидоз, кандидозный эзофагит и кандидозный вульвовагинит [34]. У 90% ВИЧ-инфицированных лиц наблюдается как минимум один эпизод орофарингеального кандидоза [178]. У 60% ВИЧ-инфицированных лиц в отсутствие необходимой терапии регистрируются рецидивирующие формы кандидозов слизистых [109]. Кандидозный стоматит часто отмечается при манифестации ВИЧ-инфекции [225]. Развитие кандидозов пищевода и слизистых оболочек наблюдается при снижении числа CD4⁺ лимфоцитов [66].

Развитие устойчивости к азолам у ВИЧ-инфицированных пациентов с рецидивирующим орофарингеальным кандидозом отмечено некоторыми исследователями уже в 1994 году [103]. Тем не менее, исследования, посвященные механизмам устойчивости к противогрибковым препаратам в данной группе пациентов встречаются не так часто [208].

Противогрибковый иммунитет у человека в норме регулирует колонизацию *Candida* слизистых различных биотопов макроорганизма [13]. Значительную роль в регуляции колонизации иммунитетом занимают мононуклеарные фагоциты: моноциты и макрофаги, а также гранулоциты [206]. В противогрибковом иммунитете участвуют pathogen associated molecular pattern (PAMPs), в том числе модулируя функцию CD4⁺ Т-лимфоцитов, поэтому при СПИД и альтерированной функции Т-хелперов снижается противогрибковый иммунитет [238]. Противогрибковый иммунитет также регулируется продукцией IL17 CD4⁺ Т-

хелперов [78]. В патогенезе грибковой инфекции и носительства в принципе имеет большое значение баланс Т-регуляторных лимфоцитов и Т-хелперов: Т-регуляторные лимфоциты стимулируют дифференцировку Т-хелперов, подавляя интерлейкин 2 (IL-2) [28]. Есть данные о способности *C. albicans* к управлению экспрессией PAMPs в зависимости от условий среды, что позволяет успешно колонизировать различные биотопы, не вызывая иммунного ответа [91]. Таким образом, несмотря на безусловную роль неспецифического, в том числе клеточного иммунитета, специфический иммунитет, в частности CD4+ клетки, также играют значительную роль, что наблюдается на примере патогенеза кандидозов у ВИЧ-инфицированных пациентов с СПИД [30]. Несмотря на комменсализм грибов рода *Candida*, отмечается их вероятная роль в онкогенезе, в частности в дисплазии эпителия полости рта [156].

В литературе имеются данные о видовом разнообразии возбудителей кандидозов у пациентов с ВИЧ-инфекцией, известно, что чаще встречаются не-*albicans* виды [200]. Этот факт имеет значение при выборе противогрибковых препаратов. Однако, информация о структуре популяции этих грибов у данного контингента пациентов практически отсутствует.

Изучение структуры популяции штаммов грибов рода *Candida*, обнаруживаемых у ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингеальным кандидозом, может иметь важное клиническое значение, в том числе для выбора адекватной терапии противогрибковыми препаратами.

1.1. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ КАНДИДОЗОВ

Каждый год от инфекций, вызванных грибами, погибает около 1,6 миллиона людей [220]. Ежегодно в мире регистрируется более 150 миллионов случаев кандидозов слизистых и около 400 тыс. случаев инвазивного кандидоза, заболеваемость варьируется от 2,4 до 29,0 на 100 тысяч населения. Смертность от инвазивного и диссеминированного кандидоза достигает 200 тысяч случаев в год. Летальность среди отдельных групп больных достигает 73%. Затраты на

здравоохранение, связанные с кандидозами, достигают двух миллиардов долларов только в США [137].

У пациентов, имеющих факторы риска, инвазивный кандидоз может возникать как внутрибольничная инфекция. Так, в США *Candida spp.* составляют 20% от возбудителей внутрибольничных инфекций и 25% от возбудителей инфекций кровотока [20].

В 2019 году устойчивые к противогрибковым препаратам грибы рода *Candida* отнесены к серьезным угрозам, связанным с лекарственной устойчивостью. Одно из первых сообщений об устойчивости к азолам было опубликовано в 1983 году – устойчивый штамм от пациента с хроническим кандидозом кожи и слизистых по фамилии Дарлингтон (Darlington strain), длительное время получавшего кетоконазол без эффекта [181]. Данный штамм подробно изучен, у него, к примеру, обнаружены измененное строение эргостеролов, сниженная активность *ERG3*, крайне распространенная мутация Y132H одновременно с мутацией I471T в гене *ERG11* [130].

У ВИЧ-инфицированных пациентов ежегодно регистрируется около 2 млн случаев орального кандидоза и 1,3 млн случаев кандидоза пищевода ежегодно [133].

В России распространенность инвазивного кандидоза достигает 8,29 на 100 тысяч населения [21]. В Российской Федерации проводилась часть глобального многоцентрового исследования по определению чувствительности штаммов *Candida spp.* к флуконазолу и вориконазолу, и, в отдельных случаях к другим противогрибковым препаратам (1997-2007), в котором было отмечено распространение природной и приобретенной устойчивости к азолам [72]. В исследовании инвазивного кандидоза у пациентов с COVID-19 в России ведущим возбудителем была *C. albicans*, хотя отмечен рост *C. auris* (13%) [18]. Инвазивный кандидоз у недоношенных новорожденных в Санкт-Петербурге чаще всего вызывался *C. albicans* (45,4%), а также *C. parapsilosis* (21,2%). 94% штаммов были чувствительны к флуконазолу [5].

Опубликовано значительное количество работ, в основном по инвазивным кандидозам, по всему миру, в том числе результатов многоцентровых исследований, позволяющих оценить видовой состав, резистентность к противогрибковым препаратам и некоторые другие свойства, что говорит об актуальности проблемы [221]. В большинстве подобных исследований поднимается проблема повышенной устойчивости к противогрибковым препаратам и снижения доли *C. albicans*. Опубликованы систематические обзоры и мета-анализы, учитывающие данные большого числа публикаций, включая относительную частоту встречаемости *C. albicans* по сравнению с другими видами, резистентность к противогрибковым препаратам, эффективность различных методов лечения [200].

Например, в Танзании у 17–75% здоровых людей из полости рта выделяется *C. albicans*. При этом у ВИЧ-инфицированных доля *C. albicans* снижена, по сравнению с контрольной группой из здоровых лиц, но остается на уровне 80% [142].

В выборке ВИЧ-инфицированных пациентов в Белоруссии чаще выделялись *C. albicans*, несмотря на значительную долю не-*albicans* штаммов – 35,6%. Только 43,8% всех штаммов обладали чувствительностью к флуконазолу [35].

В группе онкологических больных в одном центре в г. Москве в 2022 году доля не-*albicans* видов среди возбудителей кандидемий достигла 79,3%, в первую очередь за счёт *C. parapsilosis* [19].

В выборке пациентов с опухолями крови на базе гематологического центра в г. Москва с 2006 по 2017 г. из 75 случаев кандидемий 34,7% были вызваны *C. albicans*, а на втором месте *C. parapsilosis* (20%). Таким образом, *C. parapsilosis*, по-видимому, играет значительную роль в эпидемиологии кандидемий как у детей, так и у взрослых с онкогематологическими заболеваниями [22].

В исследовании микрофлоры кишечника ВИЧ-инфицированных детей в России отмечается увеличение частоты выделения *Candida spp.* и снижение доли *C. albicans* в зависимости от стадии ВИЧ-инфекции [25]. Также представлены

данные по антагонизму *Candida spp.* и *Klebsiella pneumoniae* в микробиоценозе толстого кишечника у ВИЧ-инфицированных детей в России [14].

В группе 123 ВИЧ-инфицированных пациентов в г. Брянск у 35 чел. (28,5%) выявлена *C. albicans*, 23 чел. (18,7%) – *C. tropicalis*, 11 чел. (8,9%) – *C. glabrata*, 9 чел. (7,3%) – *C. krusei*. Таким образом не-*albicans* виды встречаются чаще, но среди них нет выраженного преобладания одного из видов [26].

В исследовании влияния терапии флуконазолом орофарингеального кандидоза у ВИЧ-инфицированных пациентов в г. Москва отмечено замещение чувствительных штаммов *C. albicans* штаммами *C. glabrata*, *C. krusei* и *C. tropicalis* [9].

В исследовании 8650 микологических посевов ВИЧ-инфицированных пациентов в г. Пермь грибы рода *Candida* чаще всего выделялись из зева (82,1% случаев *C. albicans*) и мокроты (63,3% *C. albicans*) [10]. По результатам исследования эпидемиологии *C. albicans* в стационаре для ВИЧ-инфицированных также в г. Пермь, *C. albicans* встречались и в колонизации у пациентов, в том числе полости рта, и в качестве возбудителей инвазивных кандидозов, а кроме того, выделялись с объектов внутрибольничной среды. Проведенное молекулярно-генетическое типирование с помощью RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, случайно амплифицируемая полиморфная ДНК) выявило факты передачи определенных штаммов *C. albicans* в стационаре [37].

Описано использование MLST (типирование на основе мультилокусных последовательностей) для типирования грибов рода *Candida*, что может быть использовано для локальной эпидемиологической диагностики кандидозов, в т.ч. ИСМП [67]. Также MLST применяется для выявления преобладающих типов в отдельных группах больных [193]. Возможно молекулярно-генетическое типирование только лишь по одной последовательности *ERG11* [42]. Для *C. parapsilosis* используется метод типирования с использованием STR-маркеров (коротких tandemных повторов) [36].

По части исследований опубликованы обновления, включая предпринятые меры по снижению заболеваемости. Так, например, в крупнейшем исследовании по

надзору за кандидемией на территории США было зарегистрировано снижение заболеваемости и устойчивости к флуконазолу, связываемое с улучшением техники катетеризации и первичным назначением эхинокандинов, однако наблюдается увеличение частоты выделения *C. glabrata* по сравнению *C. albicans*, и повышение резистентности к эхинокандинам [95]. При этом уровень устойчивости *C. albicans* к азолам в большинстве исследований незначительный [50].

В многоцентровом исследовании распространенности кандидемии в Канаде обнаружено повышение доли *C. glabrata* и устойчивости к эхинокандинам. В то же время общая устойчивость остается на низком уровне [234].

В исследовании, проводимом в Великобритании на протяжении 15 лет и включающем 32 тысячи клинических штаммов 94 видов дрожжевых грибов, устойчивость к флуконазолу наблюдалась у 2,5% штаммов *C. albicans*. Исследование указывает на необходимость видовой идентификации дрожжевых грибов, выделенных из клинического материала, так как значительная часть не-*albicans* видов демонстрировала повышенные уровни МПК к флуконазолу [124].

В исследовании на базе одного центра в Швеции исследовано 233 штамма *Candida spp.* от пациентов с кандидемией, преобладали *C. albicans* (65%), *C. glabrata* преимущественно выделялись у пожилых лиц, а *C. parapsilosis* - у детей. Сниженная чувствительность к флуконазолу отмечалась только у *C. glabrata* (97%) [233].

В исследовании кандидозов полости рта на базе одного центра в Китае с 2010 по 2013 гг. *C. albicans* была самым распространенным видом, однако доля *C. glabrata* значительно увеличилась. Кандидоз полости рта наблюдался как осложнение ВИЧ-инфекции, стоматита, связанного с анемией или радиационным воздействием, синдромом Шегрена, пемфигоидом [80]. В другом небольшом исследовании в Китае отмечалась повышенная экспрессия *MDR1*, *CDR1*, *CDR2*, *TAC1* в планктонных клетках по сравнению с биопленками. Экспрессия *ERG11* также повышалась в планктонных клетках в присутствии флуконазола, однако снижалась через 24 часа. Также в биопленках наблюдалось постепенное

формирование устойчивости к флуконазолу *in vitro* [118]. В Тайване с 1999 года проводилось исследование устойчивости дрожжевых грибов к противогрибковым препаратам, в ходе которого приобретенная устойчивость к флуконазолу чаще всего встречалась среди *C. tropicalis* (9,2%), относящихся при этом к кладам 4 и 5, выделяемым при мультилокусном сиквенстипировании (МЛСТ). Устойчивые к флуконазолу штаммы *C. tropicalis* из Китая также преимущественно (76,7%) относились к 4 кладе [40].

В исследовании на базе одного центра в Японии с 2008 по 2013 гг. выделено 133 штамма *Candida spp.* из гемокультур, всего два штамма *C. glabrata* обладали устойчивостью к азолам и эхинокандинам. В японском популяционном исследовании 2021 года в группе пациентов с гематологическими новообразованиями показана профилактическая эффективность флуконазола в определенных дозировках [224].

В исследовании, проводимом в Сингапуре в 2012–2015 гг., было выделено 26 устойчивых к азолам штаммов *Candida spp.* У всех *C. albicans* обнаружена повышенная экспрессия *CDR2*, у двух штаммов также повышена экспрессия *MDR1*. В гене *ERG11* выявлены не синонимичные мутации A114S, Y257H и E266D [187].

Исследование на юге Италии на базе одного клинического центра интересно тем, что в нем отмечено повышение доли *C. albicans* на протяжении времени исследования, что, возможно, объясняется также увеличением доли устойчивых к противогрибковым препаратам штаммов, в том числе из ряда азолов [104].

В 2019 году опубликованы результаты исследования М. Castanheira, и соавторов в котором проанализированы данные о 2936 инвазивных штаммах *Candida spp.* со всего мира, отмечается распространение приобретенной устойчивости и рост доли видов с природной резистентностью. Также обнаружено, что наибольший вклад в устойчивость к азолам *C. parapsilosis* и *C. tropicalis* вносят мутации Y132F в гене *ERG11*. В тоже время доля устойчивых к азолам *C. albicans* в мире оценена менее чем в 1% [45]. В недавнем систематическом обзоре о применении флуконазола у ВИЧ-инфицированных пациентов для профилактики и

терапии орофарингеального кандидоза показана высокая эффективность – 95,6% и достаточная безопасность – 39,3% [85].

В Швейцарии по итогам 15-летнего многоцентрового эпидемиологического исследования увеличилась частота кандидемий, а также доля не-*albicans* видов за счёт *C. glabrata*. Уровень устойчивости к флуконазолу составляет около 1%, его потребление не возрастает [255].

В многоцентровом эпидемиологическом исследовании инвазивных кандидозов в Европе выявлено 150 случаев, вызванных смешанными культурами грибов. Устойчивость к флуконазолу выявлена в 6,4% случаев. Также обнаружены мутации в гене *FKS1*, обеспечивающие устойчивость к эхинокандинам, в том числе и у *C. albicans* [180].

В Юго-Восточной Азии кандидоз полости рта наиболее часто встречается именно у ВИЧ-инфицированных пациентов, с частотой от 21,1 до 97% [161].

У пациентов с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) отмечается повышенная частота возникновения инвазивного кандидоза: от 0,8 до 14% [90]. Для получения более достоверной информации необходимо проведение крупных многоцентровых исследований [52].

На данный момент известны случаи возникновения устойчивости у *Candida spp.* к эхинокандинам, в том числе к микафунгину, даже при отсутствии факторов риска, таких как резистентность к азолам или иммуносупрессия у пациента [214].

У *C. glabrata* отмечается наличие полирезистентности, обусловленной мутациями в гене *FKS1*, кодирующем 1,3-β-D глюкан-синтазу – мишень эхинокандинов [209]. В связи с этим разрабатываются ПЦР тест-системы и другие методики для выявления маркеров резистентности *C. glabrata* к эхинокандинам [231]. В исследовании Diaz-García и соавторов отмечено, что большинство устойчивых к эхинокандинам штаммов *C. glabrata* выделяются из брюшной полости, а не из гемокультур. При этом устойчивость развивается при назначении противогрибковых препаратов чаще чем при распространении устойчивых штаммов [51].

Аналогичные механизмы обнаружены и у *C. auris*, правда с некоторыми отличиями, связанными с генетическими особенностями вида [219].

Вопрос значимости распространения устойчивых штаммов в проблеме резистентности к противогрибковым препаратам у различных видов *Candida* остается открытым, в то же время существуют вполне конкретные актуальные клинические рекомендации по назначению препаратов, к которым выявлены случаи массовой устойчивости.

1.2. УСТОЙЧИВОСТЬ *CANDIDA SPP.* К ПРОТИВОГРИБКОВЫМ ПРЕПАРАТАМ

В последнее время повышается доля устойчивых к противогрибковым препаратам штаммов *Candida spp* [41]. В исследовании SENTRY на 20788 инвазивных штаммах *Candida spp.* отмечено снижение доли *C. albicans* и нарастание устойчивости к флуконазолу, которая, впрочем остается на уровне 0,1% для *C. albicans* [256]. По данным отечественного исследования КРИТ (Кандидоз в отделениях Реанимации и Интенсивной Терапии) устойчивость к флуконазолу достигает 21% [6]. Отмечается повышение доли не-*albicans* видов [56]. При этом природно-чувствительные к азолам *C. albicans* приобретают устойчивость за счет разнообразных механизмов приобретенной резистентности, таких как повышенная экспрессия генов эффлюксных переносчиков и амплификация гена белка-мишени [129].

Флуконазол остается широко используемым противогрибковым препаратом, несмотря на фунгистатическое действие и описанные механизмы природной и приобретенной устойчивости [61].

Рутинное определение чувствительности к противогрибковым препаратам в принципе проводится не повсеместно, но рекомендуется для инвазивных видов микозов [59]. В настоящее время проводятся исследования по сравнению результатов определения фенотипической устойчивости и выявленных молекулярно-генетически механизмов резистентности [116].

Устойчивость к противогрибковым препаратам зависит от вида *Candida*. Так, *C. krusei*, *C. inconspicua* и *C. norvegensis* обладают полной, а *C. glabrata* частичной природной устойчивостью к флуконазолу, что, в то же время, редко встречается у *C. albicans*, *C. tropicalis* и *C. parapsilosis* [218]. *C. albicans* обладает диплоидным геномом с высокой пластичностью, что обуславливает особенности механизмов патогенности и устойчивости к противогрибковым препаратам [6]. Имеются данные о развитии устойчивости к эхинокандинам среди *C. albicans* посредством анеуплоидии 5 или 2 хромосом. На 5 хромосоме находятся гены *TAC1*, промотор генов *CDR1* и *CDR2*, расположенных на хромосоме 3, и *ERG11*, кодирующий мишень препаратов ряда азолов. В то же время на левом плече хромосомы 5 находятся гены *PGA4*, *CHT2*, *CNB1*, и *MID1*, ассоциированные с устойчивостью к эхинокандинам [224].

По всему миру отмечаются вспышки, вызванные не так давно открытым видом *C. auris*. *C. auris* изолируется из воды открытых водоемов и других разнообразных источников, включая фрукты и яблоки, которые, к тому же зачастую обрабатываются фунгицидами с целью повышения сроков хранения [71]. Имеются определенные сложности с идентификацией данного вида идентифицировать стандартными биохимическими методами. Среди штаммов этого вида отмечается устойчивость ко всем трем группам противогрибковых препаратов [155].

Тем не менее, несмотря на представленные данные литературы, по различным причинам, далеко не во всех бактериологических лабораториях рутинно определяют вид *Candida spp.*, применение молекулярно-генетических методов еще менее распространено [184]. В то же время некоторые авторы предполагают широкое распространение высокопроизводительного секвенирования (next generation sequencing, NGS) для диагностики в том числе инвазивных микозов в ближайшем будущем [102].

Устойчивость к противогрибковым препаратам определяют диско-диффузионным методом и с помощью определения минимальной подавляющей концентрации (МПК) в планшетах с микроразведениями препаратов [202]. Для диско-диффузионного метода используется агар Мюллер-Хинтон с добавлением

метиленового синего в целях облегчения визуализации зон задержки роста. В настоящее время доступны критерии интерпретации зон задержки роста CLSI только для двух препаратов: для флуконазола и вориконазола. В рекомендациях EUCAST, используемых в качестве основы для составления рекомендаций Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ) (2021–01), отсутствуют критерии интерпретации для диско-диффузионного метода, имеются лишь критерии для МПК, определяемых референсным методом микроразведений в планшетах в модифицированной среде RPMI-1640. В связи с этим, во многих лабораториях ограничены возможности определения чувствительности к различным противогрибковым препаратам помимо флуконазола и вориконазола. Кроме того, существуют существенные различия между коммерческими тест-системами для определения чувствительности к противогрибковым препаратам [87]. Определение чувствительности в принципе значительно замедляет микробиологические исследования, поэтому ведутся разработки ускоренных методов, например на основе содержания хитина, определяемого с помощью калькофлуора белого [195]. Исследуется возможность определения чувствительности к противогрибковым средствам с помощью MALDI TOF масс-спектрометрии [175]. Также ведутся исследования возможностей выявления различных известных механизмов устойчивости для повышения скорости и точности определения чувствительности к противогрибковым препаратам.

1.3. МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ ГРИБОВ РОДА *CANDIDA* К ПРОТИВОГРИБКОВЫМ ПРЕПАРАТАМ

Описаны определенные молекулярно-генетические механизмы резистентности к противогрибковым препаратам [16].

Азолы, например, триазол флуконазол, ингибируют фермент цитохрома P450 ланостерол диметилазу (14 α -диметилазу), играющую ключевое значение в биосинтезе эргостерола. Свободный атом азольного кольца связывает атом железа

в группе гема фермента, что предотвращает активацию кислорода и деметилирование ланостерола, в следствие чего ингибируется биосинтез эргостерола [144]. Эргостерол является неотъемлемым компонентом клеточной стенки грибов, поэтому такое воздействие токсично, метилированные стеролы накапливаются в клетке, ее развитие останавливается, в конце концов клетка погибает. Азолы, в отличие от эхинокандинов, обладают фунгицидным действием при определенных условиях [167].

Существует четыре вида механизмов резистентности к азолам (Рисунок 1):

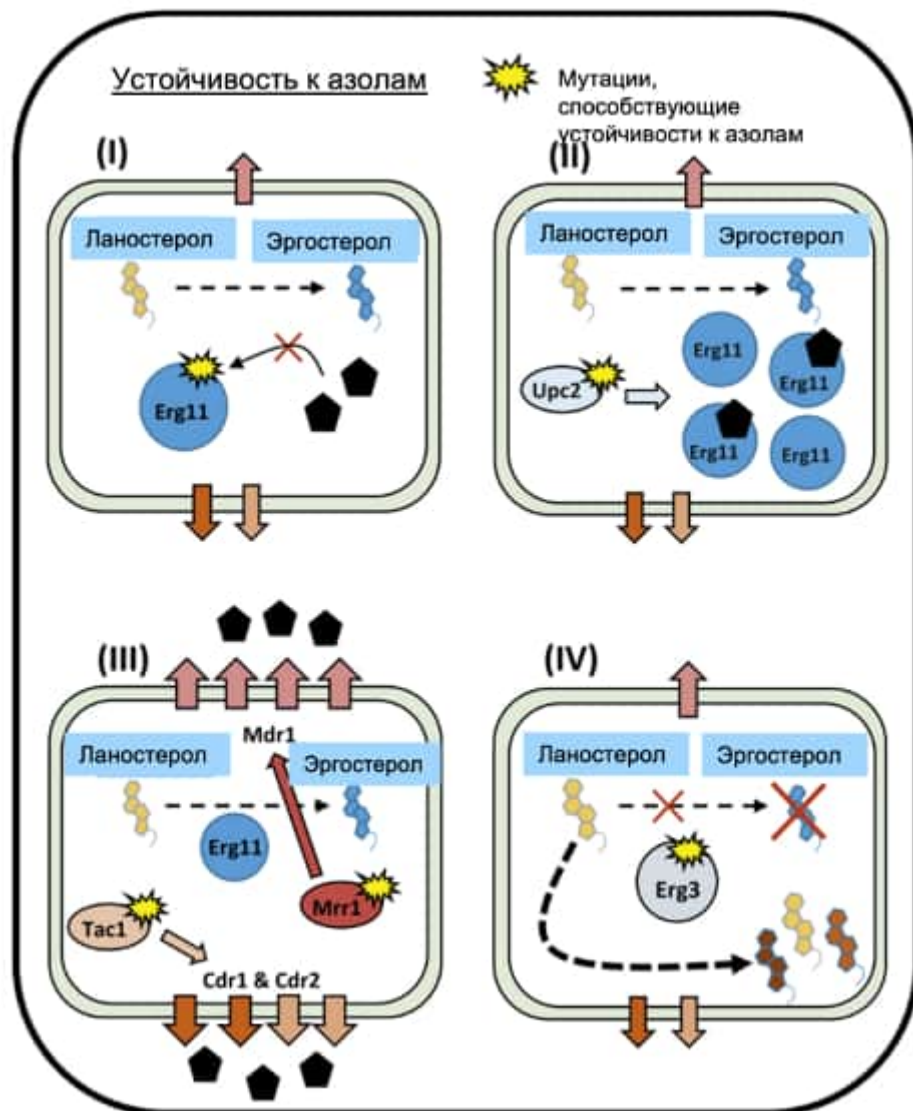


Рисунок 1 – Механизмы устойчивости *Candida spp.* к противогрибковым препаратам [223]

- Эффлюксные насосы:
 - гены *CDR1,2* и *MDR1* у *C. albicans*,

- *cgCDR1* и *cgPDR1* у *C. glabrata*,
- *cdCDR1* и *cdMDR1* у *C. dubliniensis*
- Снижение проницаемости клеточной стенки
- Увеличение продукции мишени - *ERG11*
- Смена мишени – мутации в *ERG3*
- Изменение метаболического пути.

Описано множество механизмов регуляции устойчивости и вирулентности *C. albicans*, так ГФИ-*N*-ацетилглюкозаминилтрансфераза, отвечающая за синтез гликозилфосфатидилинозитола (ГФИ-якоря), регулирует синтез *ERG11*, и контролирует образование гиф, штаммы с делецией гена, отвечающего за синтез главной субъединицы этого фермента, чувствительны к азолам и неспособны к образованию гиф [182]. Экспериментальные данные говорят о повышенной устойчивости *C. albicans* к флуконазолу в виде гиф [232].

Также устойчивость грибов рода *Candida* регулируется эпигенетическими механизмами, такими как метилирование или алкилирование гистоновых белков [191]. Ингибиторы деацетилаз гистонов (HDAC) в некоторых случаях снижают устойчивость к азолам [107]. Существуют также механизмы модификации РНК после транскрипции, влияния некодирующих РНК [108].

На сегодняшний день считается, что выявление устойчивых штаммов *Candida spp.* молекулярно-генетическими методами более трудоемко, чем фенотипическими методами, из-за большого числа механизмов [129]. Однако, обсуждается возможность использования нанопорового секвенирования для выявления ассоциированных с устойчивостью мутаций *Candida spp.* [240].

Существуют исследования, показывающие возможность развития приобретенной устойчивости к азолам у *C. albicans in vitro* [179]. Отмечается значимость исходных характеристик, что подчеркивает актуальность проблемы возможного распространения штаммов с имеющимися предпосылками для развития устойчивости [132].

Показана роль прочих микроорганизмов, например, *Pseudomonas aeruginosa* индуцирует устойчивость *C. albicans* к флуконазолу с помощью одной из основных сигнальных молекул ее Quorum-sensing [123].

В целях борьбы с распространением устойчивости ведется разработка как новых форм существующих противогрибковых препаратов, так и совершенно новых классов противогрибковых препаратов с другими мишенями и механизмом действия [248]. Также постепенно появляются и получают распространение новые лекарственные формы существующих препаратов [7]. Для разработки новых противогрибковых препаратов используются различные методы геномного редактирования с целью поиска новых терапевтических мишеней, в том числе CRISPR/SpRY [117].

Пероральный ингибитор глюкан-синтазы ибрексафунгерп – препарат из первого нового класса противогрибковых за более чем 20 лет, одобрен к применению управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) в июне 2021 года [151].

Исследуются препараты, направленные на различные механизмы устойчивости к противогрибковым препаратам. Так, описаны фенотиазины, способные изменять устойчивость к противогрибковым препаратам за счет снижения функции эффлюксных переносчиков [163].

Исследуются и другие вещества, снижающие устойчивость к противогрибковым препаратам, например, некоторые терпены снижают интенсивность мембранного транспорта и митохондриальную активность у грибов рода *Candida* [46].

Также описан синергизм некоторых известных препаратов в отношении различных грибов. Например, применение комбинации флуконазола и гентамицина [197].

Также испытываются вещества, действующие на процесс адгезии и формирования биопленок [152]. В том числе исследуется возможность терапевтического применения *Quorum-sensing* молекул грибов рода *Candida*, например фарнезола и тирозола, регулирующих переход от образования гиф к

дрожжевой форме существования [164]. Изучается противогрибковая активность различных растительных дефензинов [48].

1.3.1 Эффлюксные переносчики

Эффлюксные переносчики считаются самым распространенным механизмом устойчивости к противомикробным препаратам у грибов рода *Candida* [204]. Отмечена значимость двух основных типов ферментов: ABC (АТФ-binding cassette - АТФ-связывающие кассетные транспортёры) и MFS (Major-Facilitator superfamily - суперсемейство основных посредников) [159].

Эффлюксные насосы ABC гидролизуют АТФ, поэтому активны лишь при наличии ксенобиотиков в клетке [101]. MFS транспортеры функционируют благодаря протонному хемиосмотическому градиенту. Электрохимический потенциал на клеточной мембране создается с помощью АТФ-азы Р-типа.

Наибольшее значение имеют ABC транспортеры *CDR1*, *CDR2* (*Candida* drug resistance), MFS транспортеры *MDR1* (multidrug resistance) и *FLU1* (fluconazole resistance). У *S. cerevisiae* имеются аналогичные транспортные системы [136]. Эффлюксные насосы *CDR1*, *CDR2* обуславливают резистентность ко всем азолам, а *MDR1* преимущественно к флуконазолу. Кроме того, *CDR1* и *CDR2* могут способствовать устойчивости к топическим препаратам тербинафину и аморолфину, но не к эхинокандинам, амфотерицину В или флюцитозину [189]. Роль *FLU1*, несмотря на название, при дальнейших исследованиях оказалась не столь велика.

Ген *MDR1* изначально назывался *BEN^t*, так как ассоциировался с устойчивостью *S. cerevisiae* к беномилу, фунгициду из класса бензимдазолов и метатрексату [190]. В настоящее время обсуждается гипотеза возможного распространения устойчивости к препаратам из ряда азолов по причине их применения в агрономии, особенно в отношении *C. tropicalis* и *C. krusei* в юго-восточной Азии [83]. *MDR1* может обеспечивать устойчивость к флуконазолу, но не итраконазолу и тербинафину [262].

Утрата *CDR1* приводит к повышенной чувствительности *C. albicans* к азолам, в то время как потеря *MDR1* не оказывает существенного влияния на базовый уровень устойчивости к азолам [201].

В настоящее время изучаются ингибиторы эффлюксных переносчиков, в том числе *CDR1*, в связи с чем уже выявлены мутации в *CDR1*, обуславливающие устойчивость к подобному воздействию [153]. ABC эффлюксные системы *CDR1* и *CDR2* ингибируются при недостатке магния, что может использоваться для лечения в будущем [139]. Также рассматривается возможность использования существующих лекарственных препаратов, таких как блокатор кальциевых каналов верапамил, который ингибирует эффлюксные системы *Candida spp.* и проявляет синергизм с флуконазолом [258].

Снижение уровня экспрессии MFS-транспортеров у *C. albicans* и *C. glabrata* также отрицательно влияет на уровень вирулентности [73]. Значительное влияние в устойчивости *C. albicans* к азолам играют zinc cluster транскрипционные факторы (ZCFs) *MRR1*, *TAC1*, *UPC2*, *TAC1* находится на левом плече пятой хромосомы, там же находится *ERG11* [230].

Регуляция экспрессии эффлюксных насосов тесно связана со многими глобальными биохимическими процессами, происходящими в клетке. Транскрипционный фактор *FLO8*, который влияет на переход между формой дрожжевых клеток, псевдогиф, филаментной и гиф у *C. albicans* также снижает экспрессию *CDR1* и *CDR2* [121]. Кроме того, делеция *FLO8* у *C. glabrata* приводит к снижению способности к образованию биопленок, гидрофобности, адгезии, вирулентности, а также снижению экспрессии *EPA1*, *EPA6* и *EPA7*. С другой стороны, подобные изменения не приводили к изменению чувствительности к противогрибковым препаратам, хотя уровни экспрессии *CDR1*, *CDR2* и *SNQ2* повышались [122].

Спонтанные мутации в связывающем АТФ центре также влияют на активность ABC транспортеров [74]. Есть данные о роли эффлюксных насосов *CDR1,2* в устойчивости *C. albicans* при хроническом поверхностном кандидозе [185].

Для исследования эффлюксных систем используют молекулярно-генетические методы, такие как оценка уровня экспрессии с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, нозерн-блоттинг [216], а также проточную цитометрию с оценкой уровня эффлюкса флуоресцентных красителей [157]. Для оценки уровня экспрессии методом количественной ПЦР используют метод $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [171]. Повышенный уровень определяется по-разному: в сравнении с базовыми средними значениями, полученными для коллекционных или клинических штаммов, либо штаммов в отсутствие воздействия, как превышающий их более чем на 3 стандартных отклонения, пятикратно, либо же просто констатируется кратность превышения [173]. Также проводятся сравнения уровней экспрессии в различных группах, например с помощью t-критерия Стьюдента, критерия Уилкоксона [212]. Есть сообщения о методиках выявления повышенной экспрессии эффлюксных переносчиков с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии [154].

В исследованиях на клинических штаммах показаны немногочисленные, но разнообразные данные. Селективное ингибирование *MDR1* и *CDR1* у данного штамма не приводит к снижению устойчивости к флуконазолу или вориконазолу. Однако, ингибирование *CDR1* приводило к восстановлению чувствительности к итраконазолу и позаконазолу [236]. Так, в одном из первых исследований, характеризующем распространенность различных механизмов устойчивости среди небольшой выборки лиц со СПИД и рецидивирующим орофарингеальным кандидозом из США, преобладающим механизмом оказалась повышенная экспрессия эффлюксных переносчиков *CDR*, как *CDR1*, так и *CDR2* (55%) штаммов, а также *MDR1*, также 55% штаммов. Гиперэкспрессия *ERG11* наблюдалась в 35% штаммов. Не синонимичные мутации *ERG11* у трех устойчивых штаммов не наблюдались вообще, у 17 штаммов выявлена как минимум одна мутация [208].

В небольшом исследовании Cernicka и Subik в Словакии, у большинства устойчивых к флуконазолу штаммов выявлена повышенная экспрессия *MDR1*,

уровень экспрессии *CDR1/2* был ниже чем у контрольного устойчивого штамма, у нескольких штаммов отмечался повышенный уровень экспрессии *ERG11* [76].

В исследовании 2012–2015 гг. в Сингапуре, у всех *C. albicans* обнаружена повышенная экспрессия *CDR2*, у двух штаммов также повышена экспрессия *MDR1* [187].

В исследовании Shi и соавторов экспрессия *MDR1* и *CDR1,2* была сопряжена с ранними стадиями образованием биопленок у *C. albicans* и увеличивалась при инкубации с флуконазолом. При этом достоверных различий в экспрессии различных типов эффлюксных переносчиков выявлено не было. Также при добавлении флуконазола повышалась экспрессия *ERG11* как в биопленках, так и в планктонных клетках [118].

1.3.2 Повышенная экспрессия *ERG11*

Увеличение концентрации продукта *ERG11* с помощью амплификации генов, повышения скорости транскрипции или снижения утилизации продукта приводит к устойчивости к терапевтическим концентрациям препарата, развитию умеренной резистентности, например, у *C. glabrata* [79].

Повышенная экспрессия *ERG11*, как и ряд других механизмов, обеспечивает устойчивость к короткоцепочечным азолам, флуконазолу, в то время как активность итраконазола и позаконазола сохраняется [236].

Этот механизм может также задействоваться при мутациях в гене транскрипционного фактора *upc2p*, повышающих его активность и продукцию *ERG11* [128]. Вопрос о вкладе таких мутаций в данный механизм в настоящее время продолжает изучаться, так как имеются данные об устойчивых штаммах *Candida spp.* без мутаций в *upc2p*, а также ряде мутаций, встречающихся как у чувствительных, так и у устойчивых штаммов.

В исследованиях на клинических штаммах отмечаются противоречивые данные. Так в одном исследовании, проводимом в Китае, не обнаружено значимого

повышения экспрессии *ERG11* у устойчивых к флуконазолу *C. albicans* по сравнению с чувствительными контрольными штаммами [263].

Повышение экспрессии *ERG11* может происходить вследствие анеуплоидии и возникновения изохромосомы из двух левых плечей пятой хромосомы, где и находится ген *ERG11*, а также регулятор транскрипции *TAC1*, влияющий на экспрессию *CDR1* и *CDR2* [230].

1.3.3 Мутации в гене *ERG11*

Мутации в гене *ERG11*, который кодирует ланостерол 14 α -диметилазу, могут привести к изменению структуры этого фермента, что препятствует его связыванию с азолами [38]. У большинства устойчивых к азолам штаммов наблюдаются аминокислотные замены в регионах 105-165, 266-287, и 405-488 [89].

Некоторые мутации, такие как Y132H, Y132F, T315A, S405F, G464S, R467K, E266D и I471T, ассоциированы с наличием устойчивости к азолам [263]. Разумеется, подобные мутации должны значительно изменять конформацию фермента, и существуют мутации, не производящие такого эффекта, например: K128T, V437I, F72L, K99T, F105L, D116E, K119N, K128T, G129A, K147R, D153E, E266D, E266Q, K287R, G303D, L305P, K342R, V437I, D446N [208]. Эффект некоторых мутаций неясен, например Y79C, D81G, F126L, V130I, Y132F, K143R, K143E, F145L, A149V, E165Y, T199I, T229A, P230L, I253V, R265G, R267H, D278E, D278N, S279F, H283D, D294G, G307S, M374V, F380S, P386L, E391G, H400R, V404L, N440K, G448E, G448V, G448R, F449L, F449S, G450E, V452A, G465S, F487L, V488G, T494P, P503L и D504G (Таблица 3) [263].

Влияние данного механизма показано в исследовании каталитической активности *ERG11*. При этом каталитическая толерантность, обусловленная мутациями, практически не проявляется в отношении позаконазола и итраконазола, что позволяет использовать их для терапии инфекций, вызванных штаммами с устойчивостью, обусловленной преимущественно мутациями в *ERG11* [244].

Таблица 3 – Ассоциированные с устойчивостью к азолам аминокислотные замены в *ERG11 C. albicans* (“, “-одновременно, “/”-отдельно)

Регион (hot spot)	Мутация	Устойчивость к флуконазолу	Упоминание в литературе
	F14L/ V19A/ L35S/ R44G/ W57K/ K90E/ G100E/ S110P/ A114V/ R138K/ M140T/ R157K/ S175G/ S203F/ F205L/ N237Y/ K274H/ A298T/ A298V/ I304N/ I304T/ H310R/ H334C/ K344R/ P360S/ I366T/ H373L/ L376V/ F380L/ K398N/ S405P/ G421D/ R426K/ A432C/ V439L/ N440K/ S442F/ G443E/ D446G/ V439L/ S442F/ G443E/ D446G/ Y447G /G450R/ H468Y/ I471V/ L480S/ R492G/ T494I/ T513P/ W520G/ W520R/ E521D	Неизвестно	[226]
	Y33C/ Y39C/ P49R/T / W54Stop	R	[76]
	A61V	R, МПК×4	[53]
	Y79C (+T199I)/ K99T	R	[115]
105-165	K108E	R, в сочетании с Y132H и S405F	[213]
	F105L	R, МПК 128 мкг/мл	[183]
	A107T	R	[53]
	A114S	R, МПК×4	[113; 187; 263] Китай, Сингапур
	D116E	МПК 8-64 мкг/мл	[76; 208]
	K119L	R	[76]
	F126L (иногда с K143R, E266D, S405F, V437I)	МПК 64 мкг/мл	[120; 208]
	K128T	Не связана с устойчивостью	[208]
	G129, G646S	МПК×32	[43]
	V130I	R	[115]
	Y132H/F	R, МПК×4	[43; 53; 88; 113; 115; 120; 130; 162; 208; 263] Darlington

Продолжение таблицы 3

105-165	N136Y, Y132H (1 штамм)	R	[229]
	M140R	S	[263]
	K143E (с T229, P503L)	R	[88; 89; 113; 115; 120]
	K143Q, K143R	МПК×4	[53; 88; 89; 97; 113; 115; 120; 208; 216]
	F145L	Неизвестно	[53; 88; 89; 115]
	K147R	S	[183]
	A149V	R	[89]
	D153E	S	[89]
	V159I	S	[229]
	K161N/ R163T/ E165K	S	[263]
	E165Y	S	[89]
Y221H	S	[229]	
D225Y/ D225H/ P375Q/ R381I	S	[263]	
T229A	R	[89; 208]	
T229A+ F449S/ K143E	МПК 64 мкг/мл	[120; 208]	
P230L	позаконазол, итраконазол R	[253]	
I253V	R	[115]	
Y257H (G464S)	МПК×4	[53; 113; 253; 263] Китай	
R265G	S	[115]	
E266D	МПК 8-256 мкг/мл	[53; 76; 89; 113; 115; 120; 183; 216; 263] Китай, США, по всему миру.	
E266Q	S	[43]	
R267H (+K128T, K143R, E266D, D278E)	R	[44; 89]	
L276S	S	[229]	
D278E	R	[44; 89]	
D278N (+D116E, K128T, Y132H, G464S)	R	[168]	
S279F, Y132H/ G465S	Флуконазол, итраконазол R	[89]	
H283D	R	[115]	
H283R (+Y132H и G464S)	R	[53]	

Продолжение таблицы 3

	K287R	МПК>256 мкг/мл	[44; 183]
	G303D/ L305P/ K342R	S	[115]
	G307S (+D116E, G450E/ Y257H, G464S)	64 мкг/мл	[53; 115; 208]
	T315A	МПК×5	[217]
	F380S	R	[115]
	V404L/I	R	[166]
405-488	S405F (+Y132H)	R	[43; 53; 88; 120; 208]
	V437I	R/- не установлено	[43; 76; 115; 120; 166; 208; 216]
	D446E	МПК×4	[88]
	D446N	4-64 мкг/мл	[208]
	Y447H, G307S	Флуконазол, итраконазол R	[229]
	G448E	МПК>256 мкг/мл	[88; 183]
	G448R	R	[216]
	G448V, Y132H	МПК×64	[53]
	F449S	R, 4 мкг/мл	[53; 208]
	F449L	R	[89; 120]
	F449V	МПК×4	[88; 166]
	F449Y	R	[263]
	G450E (+D116E или Y132H)	8-256 мкг/мл, МПК×4	[53; 88; 89; 115; 120; 183; 208]
	G450V, G307S	R	[213]
	V452A	R	[53; 89]
	V456I (+E266D, G464S, V488I)	R	[226; 229]
	Y460H	R	[226]
	G464S (+G129A, R467K)	МПК×4-64	[43; 88; 89; 168; 183; 194; 208; 246] Китай, по всему миру
	G465S, Y132H, S279F	Флуконазол, итраконазол R	[89]
	R467I, G464S	МПК×4	[53]
R467K	R	[43; 166; 250; 259]	
I471T (+Y132H)	×4	[130; 263] Darlington	

Продолжение таблицы 3

Q474K	R	[263]
T486P	R	[76]
F487L, V488G, T494P	R	[213]
V488I	R/S	[53; 76; 115; 183; 194]
L491V, T494A, D504G	R	[76]
P503L, K143E	R	[115]
V509M	R	[53; 166]

Данный механизм обуславливает видовую резистентность *C. krusei* [198]. У грибов рода *Penicillium* альтернативные варианты CYP51 также обеспечивают природную устойчивость к азолам [93].

Для *C. parapsilosis* также отмечено увеличение числа устойчивых к азолам штаммов, часто связанное с наличием мутации A395T, приводящей к аминокислотной замене Y132F [96]. Публикуются данные о клональных вспышках кандидемий, вызванных *C. parapsilosis* с мутацией Y132F в гене *ERG11* [106; 125]. Замена Y132H, в том числе и у *C. albicans*, приводит к снижению сродства к флуконазолу, увеличивая МПК в 4 раза [112]. Ведутся поиски веществ, в том числе различных тетразолов, инактивирующих CYP51 с мутацией Y132F у *C. parapsilosis* [78]. Распространение подобных штаммов чаще всего отмечается при нозокомиальных вспышках и связывается с колонизацией такими штаммами поверхностей стационара, кожных покровов медицинского персонала и нарушением протоколов дезинфекции и обработки рук.

Замена K143R также может обеспечивать устойчивость к полиенам, однако происходит нарушение структуры клеточной стенки, ведущее к снижению защитных свойств клетки [97].

В небольшом исследовании из Китая у устойчивых к флуконазолу *C. albicans* выявлены мутации A114S и Y257H, а также G487T, T916C, T395A. Локус A114 в гене *ERG11* расположен недалеко от активного центра, что может объяснять сниженное связывание азолов. Y257 при этом находится в G спирали вдали от активного центра фермента. F449 находится в конце I спирали, замены в этом локусе способны изменить функциональность активного центра [111].

В исследовании, проводимом в Сингапуре в 2012–2015 гг., в гене *ERG11* выявлены не синонимичные мутации A114S, Y257H и E266D [187].

У штамма Darlington обнаружены крайне распространенная мутация *ERG11* - Y132H вместе с I471T. Причем известно, что I147T способна приводить к увеличению аффинности фермента к субстрату с одновременным снижением аффинности к азолам [130].

1.3.4 Изменение метаболического пути

Данный механизм обусловлен мутациями в гене *ERG3*. Мутация в гене *ERG3* предотвращает образование 14 α -метил-3,6-диола из 14 α -метилфестостерола, он замещает эргостерол, мембраны клеток грибов продолжают функционировать. Данный механизм также обуславливает резистентность к полиенам, которые также действуют на эргостерол мембран клеток грибов [148]. Резистентность к амфотерицину В, хотя и встречается редко, возникает при одновременных мутациях в генах *ERG11* и *ERG3* или *ERG5* и отдельных мутациях в гене *ERG6* [39] или *ERG2* [110], что приводит к снижению синтеза эргостерола [55]. Подобные мутации одновременно приводят к снижению вирулентности *C. albicans* [73].

Данные о резистентности к противогрибковым препаратам позволяют говорить о циркуляции устойчивых штаммов грибов *Candida spp.* среди ВИЧ-инфицированных пациентов, что обуславливает необходимость микробиологического мониторинга чувствительности к противогрибковым препаратам. В большинстве отечественных и зарубежных рекомендаций флуконазол считается одним из эффективных препаратов для профилактики и лечения кандидозов. Неэффективное применение противогрибковых препаратов для профилактики и лечения поверхностных кандидозов может приводить к появлению устойчивых штаммов. Такие штаммы потенциально способны к распространению среди населения, что также необходимо исследовать. Резистентные штаммы могут приводить к значительным трудностям в терапии инвазивных форм кандидозов. Это обуславливает необходимость исследования

молекулярных механизмов резистентности, поиска методов борьбы с ней, а также своевременного выявления. В то же время приведённые литературные данные свидетельствуют о том, что механизмы приобретенной устойчивости к противогрибковым препаратам чаще всего изучены на отдельных штаммах, реже – небольших группах штаммов, выделенных от различных категорий пациентов.

Таким образом, в последнее время в мире возрастает заболеваемость инфекциями, вызываемыми грибами рода *Candida*, в том числе инвазивными формами, от части за счет возрастания числа иммунокомпрометированных пациентов, в частности ВИЧ-инфицированных, восприимчивых к данным инфекциям. Повсеместно наблюдается нарастание доли не-*albicans* видов *Candida spp.*, обладающих повышенной природной устойчивостью к противогрибковым препаратам в структуре заболеваемости. Отмечается повышение устойчивости к противогрибковым препаратам, в особенности из группы азолов, в том числе среди *C. albicans*, однако наиболее крупные исследования отмечают устойчивость к флуконазолу у *C. albicans* на уровне 1%. В то же время большая часть данных представлена локальными исследованиями, крупные многоцентровые исследования проводились более десяти лет назад. Данные о распространенности молекулярно-генетических механизмов устойчивости к противогрибковым препаратам в Российской Федерации практически отсутствуют.

В связи с вышесказанным цель данного исследования состоит в характеристике структуры популяции и биологических свойств штаммов *Candida spp.* у ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингеальным кандидозом в г. Москва.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 2. АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГРИБОВ РОДА *CANDIDA*

Для успешной диагностики и лечения кандидозов необходимо не только обнаружить наличие грибов *Candida*, но и точно определить их видовую принадлежность. Различные виды грибов рода *Candida* имеют разные патогенные свойства и могут различаться по чувствительности к противогрибковым препаратам. Точная видовая идентификация позволяет выбрать наиболее эффективное лечение, учитывая особенности конкретного вида *Candida*, и предотвратить развитие лекарственной устойчивости [58]. Диагностика кандидозов проводится микробиологическими методами, такими как микроскопия нативных и фиксированных окрашенных, например, по Граму препаратов, а также культивирование на различных жидких и плотных питательных средах, таких как бульон или агар Сабуро, Чапека-Докса, картофельном, кукурузном агарах, наконец специализированных хромогенных плотных питательных средах для грибов рода *Candida*, позволяющих проводить одновременную видовую идентификацию и ускорять выделение чистой культуры исследуемых штаммов [207]. Также широко распространены биохимические методы, основанные на исследовании ферментативной активности, чаще всего реализованные в виде коммерческих тест-систем для применения в условиях клинических микробиологических лабораторий. Так, *C. albicans* обладает способностью продуцировать фермент β -N-ацетилгалактозаминидазу, что используется при приготовлении хромогенных питательных сред. Добавление гексозаминов с хромогенным или флуоресцентным индикатором позволяет проводить видовую идентификацию одновременно с выделением чистой культуры [205]. Кроме того, у таких видов, как *C. parapsilosis* и *C. tropicalis* имеется фермент щелочная фосфатаза. Добавление субстрата данного фермента – 5-бromo-6-хлоро-3-индолил фосфат р-толуидиновой соли в питательную среду позволяет производить выявление данного фермента и, таким

образом, расширять спектр выявляемых с помощью данного метода видов грибов рода *Candida* [160]. На хромогенных питательных средах зеленый цвет колоний штаммов *C. albicans* и *C. dubliniensis* обусловлен той же хромогенной реакцией, что и темно-синий цвет колоний штаммов *Candida tropicalis*. *Candida glabrata*, *Candida kefir*, *Candida parapsilosis* и *Candida lusitanae* также обладают естественной пигментацией и активностью щелочной фосфатазы, что позволяет проводить видовую идентификацию по цвету и морфологии колоний при использовании хромогенных питательных сред (Рисунок 2).

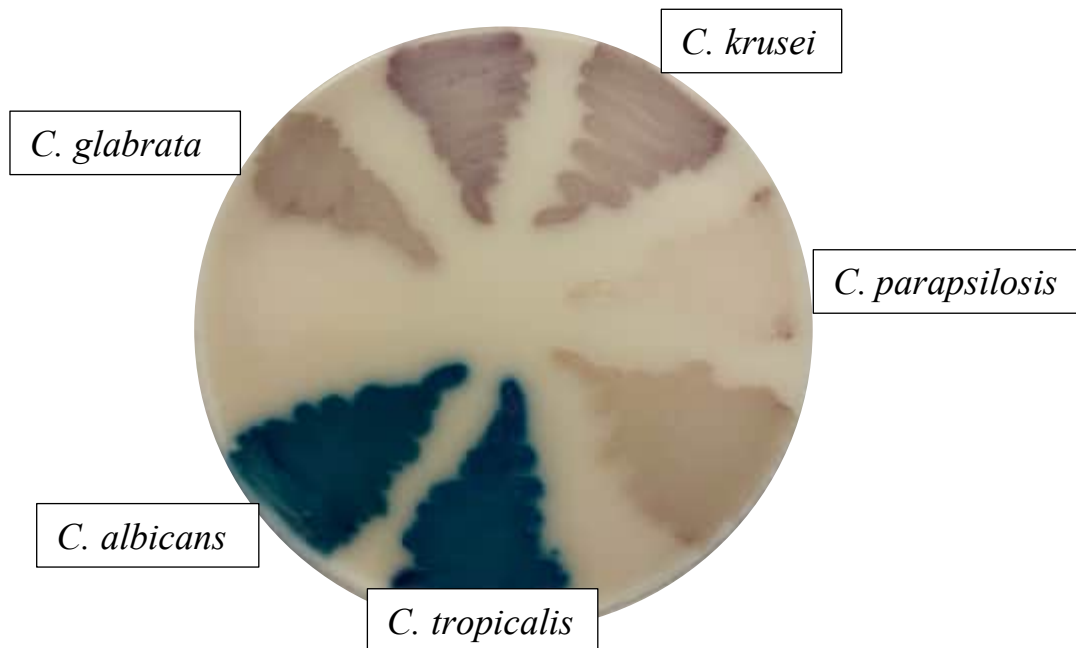


Рисунок 2 – рост *Candida spp.* на хромогенном агаре Chromogenic Candida Agar, Oxoid, Великобритания

Некоторые биохимические реакции позволяют дифференцировать более крупные таксоны дрожжевых грибов [215]. Так, *Candida spp.*, кроме некоторых штаммов *C. krusei* (*Pichia kudriavzevii*), в отличие от *Cryptococcus spp.* не утилизируют мочевину [215].

Физико-химические методы включают в себя MALDI-TOF масс-спектрометрию, на сегодняшний день позволяющую быстро и эффективно дифференцировать различные виды *Candida* при использовании дополнительной пробоподготовки, связанной с особенностями строения клеточной стенки грибов [2]. Библиотеки белковых спектров для масс-спектрометрии постоянно пополняются и уже включают такие эпидемиологически значимые виды, как *C.*

auris [199]. Молекулярно-генетические методы, такие как ПЦР с использованием видоспецифических праймеров распространены в качестве метода для обнаружения возбудителя непосредственно в биоматериале, в особенности при инфекциях урогенитального тракта [99]. Секвенирование ДНК, а именно ITS либо rRNA LSU служит основным референтным методом видовой идентификации. Стоит отметить, что род *Candida spp.* генетически неоднороден, в настоящее время таксономия данного рода претерпевает некоторые изменения в связи с появлением новых данных в этой области [57].

При использовании большинства реализаций перечисленных выше методов с той или иной частотой могут наблюдаться ошибки в видовой идентификации *Candida spp.*, в то же время использование референтных методов не всегда доступно в клинической лаборатории, поэтому, в рамках настоящей работы было проведено сравнительное исследование эффективности применения различных методов для видовой идентификации. Оценка проводилась на 52 штаммах представителей грибов рода *Candida*, выделенных из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов с клиническими проявлениями орофарингеального кандидоза: *C. albicans* (58%), *C. glabrata* (21%), *C. krusei* (10%) и *C. tropicalis* (11%). Были использованы следующие методы: тест на образование ростовых трубок в сыворотке для идентификации *C. albicans*; культивирование по методу Дальмау с последующей микроскопией нативных препаратов, позволяющее выявлять некоторые стадии жизненного цикла грибов, в том числе образование истинных гиф штаммами *C. albicans*; культивирование на хромогенных питательных средах (в качестве примера использовалась среда Chromogenic Candida Agar, Oxoid, Великобритания); миниатюризированные биохимические тест-системы (в качестве примера использовалась тест-система Remel RapID Yeast Plus, Remel, США); MALDI-TOF MS (BactoSCREEN, НПФ «Литех», Россия); тест-система для одновременного выявления ДНК *C. albicans*, *C. glabrata* и *C. krusei* в клиническом материале методом мультиплексной ПЦР в реальном времени с использованием видоспецифических праймеров с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс *C.albicans/C.glabrata/C.krusei*– МУЛЬТИПРАЙМ-FL» (АмплиСенс, Россия) (Таблица 4).

Таблица 4 – Методы видовой идентификации *Candida spp.*

Вид	Морфологические структуры	Хромогенный агар, цвет колоний	Remel RapID Yeast Plus	ПЦР (АмплиСенс <i>C.albicans/C.glabrata/C.krusei</i>)	MALDI-TOF MS
<i>C. albicans</i>	ростовые трубки, истинные гифы	зеленый	+	+	+
<i>C. glabrata</i>	псевдогифы отсутствуют	коричневый	+	+	+
<i>C. krusei</i>	псевдогифы, продолговатые псевдоконидии	розово-коричневый	+	+	+
<i>C. tropicalis</i>	псевдогифы, редко истинные гифы	темно-синий	+	-	+
<i>C. parapsilosis</i>	многократно разветвленные псевдогифы с одиночными бластоконидиями, образующимися вдоль гиф	бежевый	+	-	+

Тест на образование ростовых трубок, являющихся предшественниками истинных гиф, в присутствии сыворотки с последующей микроскопией нативных препаратов (микроскоп AxioImager.Z1, объектив 40×/0.65 Ph2 M27, Carl Zeiss, Германия) позволяет дифференцировать *C. albicans* от остальных видов.

В некоторых случаях способность к формированию ростовых трубок и гиф рассматривается в контексте степени патогенности штаммов *C. albicans*. В нашей выборке все штаммы *C. albicans* обладали способностью к формированию ростовых трубок. Данный метод позволяет установить вид *C. albicans*, что важно в силу различий в природной устойчивости к противогрибковым препаратам по сравнению с другими представителями рода *Candida* (Рисунок 3).

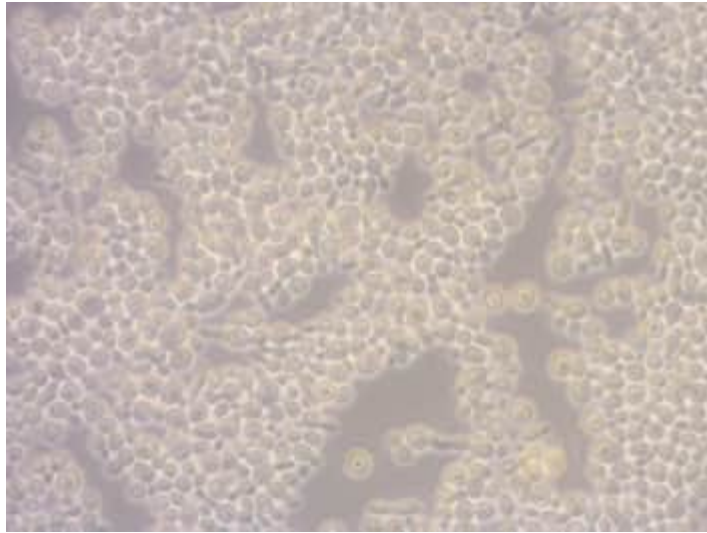


Рисунок 3 – Тест на образование ростовых трубок штаммами *C. albicans*, микроскоп AxioImager.Z1, объектив 40×/0.65 Ph2 M27, Carl Zeiss, Германия

Культивирование грибов рода *Candida* на кукурузном агаре по методу Дальмау, с дальнейшей микроскопией нативных препаратов, позволяет изучать различные микроморфологические структуры этих грибов, таких как бластоконидии, или собственно дрожжевые клетки, псевдогифы, истинные гифы (Рисунок 4).



Рисунок 4 – Культивирование штаммов *C. albicans* по методу Дальмау, микроскоп AxioImager.Z1, объектив 40×/0.65 Ph2 M27, Carl Zeiss, Германия

Псевдогифы *C. parapsilosis* многократно ветвятся, бластоконидии располагаются вдоль гиф и расположены одиночно. У *C. lusitaniae* псевдогифы рудиментарны. *C. krusei* также образуют нити псевдомицелия с утолщениями на концах – псевдоконидии. *C. glabrata* не способны к образованию псевдогиф.

Несмотря на некоторые различия микроморфологии грибов рода *Candida*, например формы и характера ветвления псевдогиф, данный метод также преимущественно позволяет установить видовую принадлежность *C. albicans* по способности к образованию истинных гиф. В нашей выборке у всех исследованных штаммов *C. albicans* была выявлена способность к формированию истинных гиф при использовании данного метода.

Для всех образцов проведена видовая идентификация с помощью микробиологического анализатора VactoSCREEN (НПФ «Литех», Россия) на базе MALDI-TOF масс-спектрометра LaserToF LT2 Plus (Analysis Instruments, Великобритания). Вид *Candida spp.* был корректно определен при помощи MALDI-TOF MS для всех исследованных штаммов.

С помощью ПЦР тест-системы (АмплиСенс) ПЦР удалось установить видовую принадлежность всех образцов, кроме штаммов *C. tropicalis*, возможность идентификации этого вида не предусмотрена используемой тест-системой. Метод ПЦР использовался как подтверждающий видовую идентификацию в расчетах показателей точности видовой идентификации прочих методов.

Точность видовой идентификации определяли как долю штаммов *Candida*, для которых с помощью используемого теста вид определен правильно в сравнении с методом ПЦР (АмплиСенс). Для хромогенной питательной среды (Chromogenic *Candida* Agar, Oxoid, Великобритания) точность видовой идентификации составила 90,1%. В число штаммов с ошибочной идентификацией вошли 2 штамма *C. glabrata*, которые при росте на хромогенном агаре были идентифицированы как *C. parapsilosis*, 1 штамм *C. glabrata* – как *C. krusei* и 1 – как *C. albicans*, 1 штамм *C. krusei* был идентифицирован как *C. albicans*. Для биохимического метода точность видовой идентификации составила 95%. Всего 2 штамма *C. glabrata* при проведении биохимической идентификации были идентифицированы как *C. krusei*, 1 штамм *C. krusei* был идентифицирован как *C. glabrata* (Таблица 5).

Таблица 5 – Сравнение методов видовой идентификации *Candida spp.*

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

Результаты применения хромогенного агара (Oxoid) для идентификации грибов рода *Candida* оказались сравнимыми с результатами, полученными с помощью биохимических тест-систем (Remel), а также ПЦР. Кроме того, использование хромогенного агара позволяет сократить трудозатраты, так как сочетает этапы выделения чистой культуры и идентификации, в отличие от классического культурального метода. Однако, ПЦР остается наиболее точным и быстрым методом идентификации грибов *Candida*, который к тому же позволяет производить идентификацию напрямую в биоматериале, что является преимуществом в плане затраты времени на проведение исследования даже по сравнению с MALDI-TOF масс-спектрометрией. Тем не менее, данный метод позволяет идентифицировать только представленные в тест-системе виды, поэтому для точной видовой идентификации необходимо использование прочих рутинных методов.

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

ГЛАВА 3. ОСОБЕННОСТИ ОПОРТУНИСТИЧЕСКОЙ МИКРОФЛОРЫ РОТОГЛОТКИ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

В настоящее время наблюдается стремительный рост числа иммунокомпрометированных пациентов, в частности ВИЧ-инфицированных пациентов. Этот тревожный тренд сопровождается заметным увеличением заболеваемости и распространением различных инфекций, среди которых и кандидозы. Отмечается рост доли не-*albicans* видов *Candida spp.*, обладающих повышенным уровнем природной устойчивости к противогрибковым препаратам [133]. В то же время, данные о видовом составе микрофлоры ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов с клиническими проявлениями орофарингеального кандидоза, в особенности на территории Российской Федерации, ограниченно представлены в литературе [23].

В связи с этим, в данном исследовании мы провели изучение видового состава условно-патогенной микрофлоры ротоглотки 31 ВИЧ-инфицированного пациента с клиническими проявлениями орофарингеального кандидоза, а также 30 ВИЧ-инфицированных пациентов без клинических проявлений орофарингеального кандидоза, которые служили контрольной группой.

Всего в испытуемой группе ВИЧ-инфицированных пациентов с клиническими проявлениями орофарингеального кандидоза было выделено 98 штаммов микроорганизмов: *Candida spp.* (n=52), бактерии из порядка *Enterobacterales* (n=31) и рода *Staphylococcus* (n=15). Более половины всех выделенных микроорганизмов составили штаммы грибов, являющихся представителями грибов рода *Candida spp.* Всего в исследовании получено 52 штамма грибов рода *Candida* (Рисунок 5).

Также у пациентов с орофарингеальным кандидозом выявлен 31 (32%) штамм энтеробактерий родов *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter* и *Proteus*. Клебсиеллы были представлены 5 штаммами *Klebsiella pneumoniae* – 16% и 1 штаммом *Klebsiella oxytoca* – 3,2% от общего числа энтеробактерий, соответственно.

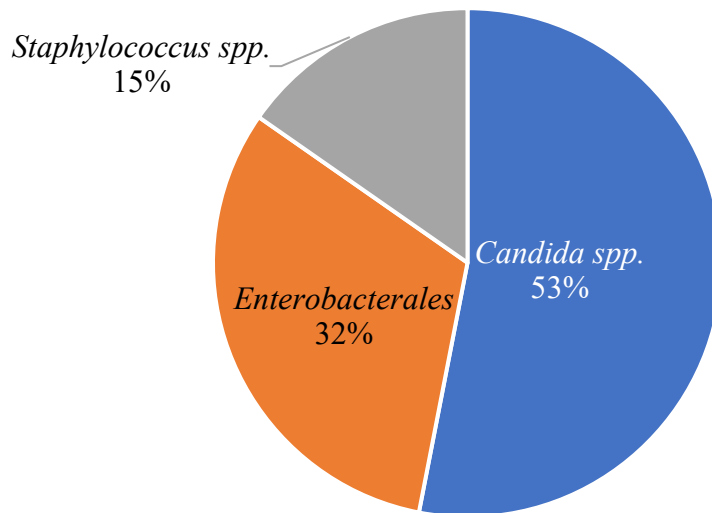


Рисунок 5 – Условно-патогенная микрофлора, выделенная от ВИЧ инфицированных пациентов с орофарингеальным кандидозом

Среди представителей рода *Escherichia* были выявлены только штаммы *Escherichia coli* – 11 штаммов (35,5%). Среди *Enterobacter spp.* были выделены *Enterobacter aerogenes* – 10 штаммов (32,2%), *Enterobacter cloacae* – 2 штамма (6,5%). Среди представителей рода *Proteus spp.* были выявлены только представители вида *Proteus mirabilis* – 2 штамма (6%), (Рисунок 6).

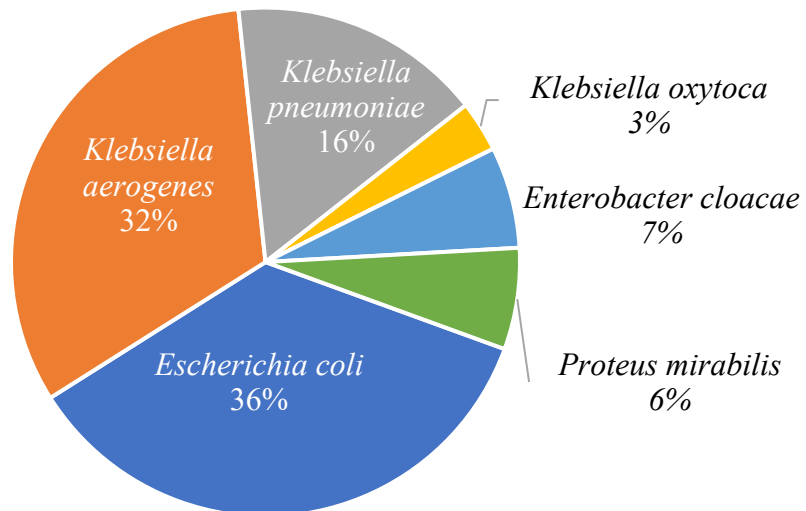


Рисунок 6 – Видовая структура штаммов представителей *Enterobacterales spp.*, выделяемых у ВИЧ инфицированных пациентов

Учитывая литературные данные о распространенности устойчивых штаммов условно-патогенных бактерий в данной группе пациентов, была произведена оценка устойчивости выделенных микроорганизмов к антибактериальным препаратам. У условно-патогенных энтеробактерий и стафилококков,

колонизирующих ротоглотку ВИЧ-инфицированных с орофарингеальным кандидозом, выявлена устойчивость к бета-лактамам антибиотикам, в частности к пенициллинам (ампициллину, амоксициллину) – 74% штаммов, цефалоспорином III-IV поколения (цефтазидиму, цефепиму) – 70% штаммов, карбапенемам (меропенему, имипенему, эртапенему) – 1% штаммов, а также аминогликозидам (амикацину и гентамицину) – 40% штаммов и фторхинолонам (ципрофлоксацину и левофлоксацину) – 35% штаммов. Кроме того, 17 штаммов энтеробактерий (55%), а именно 5 штаммов *K. pneumoniae*, 2 штамма *E. cloacae* и 10 штаммов *K. aerogenes*, обладали резистентностью как минимум к 2 группам антибактериальных препаратов, к бета-лактамам (пенициллинам, цефалоспорином III-IV поколения) и аминогликозидам (амикацин, гентамицин), 5 штаммов *K. pneumoniae* также одновременно обладали устойчивостью и к фторхинолонам. Наибольшая устойчивость выделенных штаммов энтеробактерий отмечена к амоксициллину – 74%, гентамицину – 44% и ципрофлоксацину – 35%. Кроме того, учитывая распространенность устойчивости к бета-лактамам антибиотикам, ассоциированной с продукцией бета-лактамаз и, в частности, карбапенемаз, у энтеробактерий проводилось выявление генов карбапенемаз методом ПЦР с использованием наборов реагентов MDR KPC/OXA-48-FL и MDR MBL-FL (АмплиСенс, Россия). Ген карбапенемазы *KPC* был выявлен у одного штамма *E. cloacae*. Ген карбапенемазы *OXA48* был выявлен у 2 штаммов *K. pneumoniae*, и одного штамма *E. aerogenes*.

Помимо грибов рода *Candida* и представителей *Enterobacterales* из ротоглотки обследованных ВИЧ-инфицированных пациентов с клиническими проявлениями орофарингеального кандидоза было выделено 15 штаммов рода *Staphylococcus spp.* различных видов, включая 8 штаммов *S. aureus* (53%), 3 штамма *S. epidermidis* (20%), и 4 штамма *S. hominis* (27%). Для штаммов *Staphylococcus spp.* также была произведена оценка устойчивости к антибактериальным препаратам. Из всех выявленных *S. aureus* 50% (4 штамма) оказались резистентными к азитромицину, оксациллину, цефокситину и относились к фенотипу метициллин-резистентного

золотистого стафилококка (MRSA). Аналогичная резистентность была обнаружена у 60% идентифицированных коагулазоотрицательных стафилококков.

Среди общего числа 52 штаммов грибов рода *Candida*, *C. albicans* составляли 58% (n=30), или 30,7% от общего числа всех выделенных микроорганизмов. Наиболее часто встречающиеся не-*albicans* виды *Candida spp.* были представлены *C. glabrata* – 50,0% (21,1% от общего числа штаммов грибов), *C. tropicalis* - 27,3% (11,5% от общего числа штаммов *Candida spp.*), и *C. krusei* - 22,7% (9,6% от общего числа штаммов *Candida spp.*) (Рисунок 7).

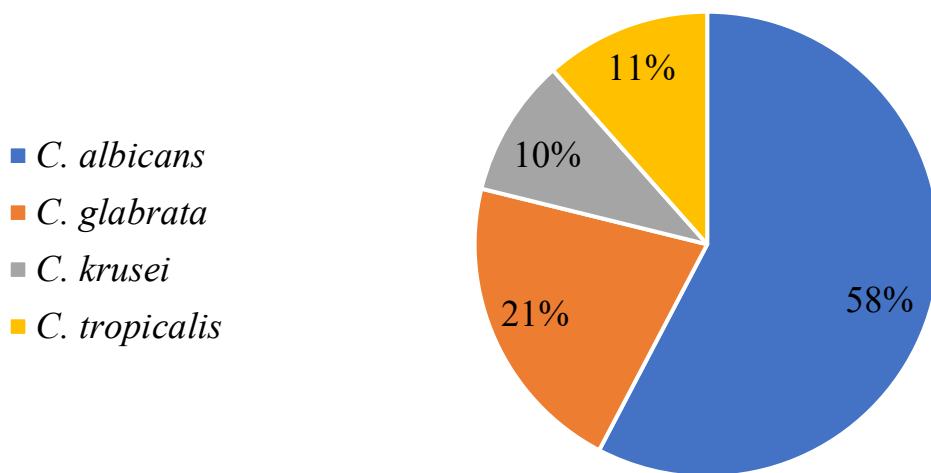


Рисунок 7 – Видовая структура штаммов представителей *Candida spp.*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов

У пациентов контрольной группы с ВИЧ-инфекцией без клинических проявлений орофарингеального кандидоза было выделено 85 штаммов микроорганизмов. Значительную долю выделенных штаммов микроорганизмов составили представители нормальной микрофлоры ротоглотки: 26 штаммов рода *Streptococcus* (31%), альфа-гемолитических стрептококков *S. peroris*, *S. parasanguinis*, *S. salivarius*, *S. oralis*, *S. infantis*, *S. vestibularis*, 4 штамма *Actinomyces spp.* (4,7%) видов *A. odontolyticus* и *A. dentalis*, 2 штамма *Rothia spp.* (2%) видов *R. aeria* и *R. dentocariosa*, 1 штамм *Micrococcus luteus* (1,1%), 9 штаммов *Corynebacterium spp.* (10,6%) видов *C. propinquum*, *C. accolens*, *C. mucifaciens*. Среди выделенных в данной группе пациентов микроорганизмов только 2 – штамма *Candida spp.* (*C. albicans*), что статистически значимо меньше, чем в

основной группе ($p < 0,05$). Также выделено всего 2 штамма энтеробактерий (2%): *E. cloacae* и *E. coli*, что также статистически значимо меньше, чем в основной группе пациентов ($p < 0,05$). Выделен один штамм *Pseudomonas stutzeri*, в то время как в группе ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингеальным кандидозом не выделены представители *Pseudomonas spp.* Представители рода *Staphylococcus spp.* были выделены в значительно большем количестве, чем в основной группе ($p < 0,05$) – 32 штамма, из которых 31% – штаммы *S. aureus* ($n=10$) ($p > 0,05$) (Таблица 6).

Таблица 6 – Сравнительный анализ таксономической структуры условно-патогенной микрофлоры полости рта у ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингеальным кандидозом (ОФК) /без него (Контрольная группа), $p < 0,05$

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

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

**ГЛАВА 4. ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ
ГРИБОВ РОДА *CANDIDA*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РОТОГЛОТКИ
ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ**

**4.1. СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИИ ГРИБОВ РОДА *CANDIDA* В
РОТОГЛОТКЕ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ**

В ходе исследования структуры популяции грибов рода *Candida*, выделенных из ротоглотки 31 пациента с ВИЧ-инфекцией и орофарингеальным кандидозом, было обнаружено значительное разнообразие и неоднородность микробного пейзажа. Данные по исследованному биотопу и группе пациентов на сегодняшний день в литературе практически не представлены [23]. Анализ структуры популяции выделенных штаммов грибов рода *Candida* показал (Таблица 7), что 18 штаммов (34,6%) были выделены в виде монокультуры, а 34 штамма или 65,4% от общего числа – в виде смешанных культур от 13 пациентов.

Таблица 7 – Частота выявления и видовой спектр грибов рода *Candida* в микробиоценозе ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов

Виды грибов	Всего, шт.	Монокультура		Ассоциации					
				Всего		Гомогенные		Гетерогенные	
		Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
<i>C. albicans</i>	30	8	26,7	22	73,3	16	53,3	6	20,0
<i>C. glabrata</i>	11	7	63,6	4	36,4	0	0,0	4	36,4
<i>C. tropicalis</i>	6	3	50,0	3	50,0	0	0,0	3	50,0
<i>C. krusei</i>	5	0	0,0	5	100,0	0	0,0	5	100,0
Итого:	52	18	34,6	34	65,4	16	30,8	18	34,6
В т.ч. <i>C. не-albicans</i>	22	10	45,5	12	54,5	0	0,0	12	54,5
В т.ч. «минорные» компоненты сообщества	11	3	27,3	8	72,7	0	0,0	8	72,7

Следовательно, в ротоглотке обследованных ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингеальным кандидозом наблюдалось формирование ассоциаций штаммов *Candida spp.*: гомогенных, включающих штаммы только одного вида, и гетерогенных, состоящих из штаммов грибов рода *Candida*

различных видов. Было выявлено 16, или 30,8% от общего числа, штаммов *Candida spp.* из гомогенных ассоциаций, и 18 (34,6%) – из гетерогенных. Гомогенные ассоциации были представлены штаммами различных сиквенс типов, значительно различающимися профилями устойчивости. Всего было обнаружено 13 ассоциаций штаммов *Candida spp.*, из которых 9 включали 2 вида (69,2%), а 4 (30,8%) – три и более вида.

В целом выделенные штаммы видов *C. albicans*, *C. glabrata* и *C. krusei* с различной частотой образовывали ассоциации ($p < 0,01$). Наиболее часто выделялись ассоциации, включающие в себя *C. krusei* (100,0%) и *C. albicans* (73,3%). *C. krusei* выделялись только в виде смешанных культур со штаммами других видов *Candida spp.* Штаммы *C. glabrata* существенно реже, чем *C. albicans* и *C. krusei*, выделялись в виде ассоциаций с другими видами *Candida spp.* (36,4%, $p < 0,05$). Также не наблюдалось одновременного выделения различных штаммов *C. glabrata* от одного пациента. В то же время *C. tropicalis* выделялись в составе смешанных культур в половине случаев (50%), либо в составе монокультур, но не в виде гомогенных ассоциаций, таким образом они не значимо отличались по склонности к образованию ассоциаций от других видов штаммов *Candida spp.* По результатам проведенного в рамках данной части исследования корреляционного анализа *C. albicans* реже выделялась в биотопе ротоглотки одновременно с *C. glabrata* ($r = -0,573$) и «минорными» компонентами сообщества – совокупностью штаммов видов *C. tropicalis* и *C. krusei*. ($r = -0,829$).

Анализ характера ассоциаций показал, что штаммы *C. albicans* чаще всего образуют гомогенный тип ассоциаций. Это составляет 72,7% или 53,3% от общего числа анализируемых штаммов. Другие виды грибов формировали только гетерогенные ассоциации, что является существенным отличием популяции *C. non-albicans* от *C. albicans* ($p < 0,001$).

Таким образом, *Candida spp.* присутствуют в микрофлоре ротоглотки пациентов с ВИЧ-инфекцией и орофарингеальным кандидозом в виде монокультуры или ассоциаций: гомогенных или гетерогенных. Наиболее часто

образуют ассоциации *C. albicans* (73,3%) и *C. krusei* (100,0%), при этом *C. albicans* формирует ассоциации гомогенного типа в 72,7% случаев.

4.2. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ГРИБОВ РОДА *CANDIDA*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РОТОГЛОТКИ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ, К ПРОТИВОГРИБКОВЫМ ПРЕПАРАТАМ

Выделенные штаммы *Candida spp.* исследовались на чувствительность к основным группам противогрибковых препаратов (Таблица 8).

Таблица 8 – Чувствительность *Candida spp.*, выделенных из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов, к противогрибковым препаратам различных фармакологических групп (клотримазол – CLOT, кетоконазол – KCZ, итраконазол – ITR, флуконазол – FLU, нистатин – NYS, амфотерицин В – AmB)

Виды грибов	Имидазолы				Триазолы				Полиены			
	KCZ		CLOT		ITR		FLU		NYS		AmB	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
<i>C. albicans</i>	16	53,3	18	60,0	10	33,3	7	23,3	29	96,7	24	80,0
<i>C. glabrata</i>	6	54,5	4	36,4	1	9,1	3	27,3	11	100,0	5	45,5
<i>C. tropicalis</i>	4	66,7	5	83,3	6	100,0	0	0,0	4	66,7	4	66,7
<i>C. krusei</i>	2	40,0	4	80,0	4	80,0	0	0,0	3	60,0	3	60,0
Итого:	8	53,8	1	59,6	1	40,4	10	19,2	47	90,4	36	69,2
В т.ч. <i>C. не-albicans</i>	12	54,5	13	59,1	11	50,0	3	13,6	18	81,8	12	54,5
В т.ч. «минорные» компоненты сообщества	6	54,5	9	81,8	10	90,9	0	0,0	7	63,6	7	63,6

Исходя из полученных данных, препараты полиенового ряда, включая нистатин, оказались наиболее эффективными в отношении штаммов грибов рода *Candida*. Эффективность нистатина составила 90,4%. С другой стороны, триазолы, включая флуконазол, проявили наименьшую эффективность с показателем 23,1%.

Детальный анализ показал межвидовые различия в чувствительности штаммов грибов рода *Candida* к противогрибковым препаратам. Нистатин оказался наиболее эффективным против *C. albicans* и *C. glabrata*. Штаммы *C. tropicalis* проявили высокую чувствительность к итраконазолу (100%), а *C. krusei* - к итраконазолу и клотримазолу (80%). Резистентность к флуконазолу наиболее часто наблюдалась у *C. albicans* (23,3%) и *C. tropicalis* (40%). *C. glabrata* была слабо

чувствительна к итраконазолу (9,1%), а *C. krusei* - к кетоконазолу (40%). Однако, не было обнаружено штаммов, полирезистентных или панрезистентных к препаратам азолового ряда, среди выделенных штаммов *Candida spp.*

В целом, исследованные штаммы грибов рода *Candida*, включая группу *C. не-albicans*, не различались статистически по спектру чувствительности к противогрибковым препаратам. Однако, при анализе зависимости чувствительности к противогрибковым препаратам от структуры популяции грибов, были выявлены определенные межвидовые различия. Например, совокупность *C. tropicalis* и *C. krusei*, как "минорных" компонентов популяции, оказалась более чувствительной к итраконазолу (90,9%) (Таблица 9).

Таблица 9 – Чувствительность различных групп штаммов грибов рода *Candida* к противогрибковым препаратам (%) (клотримазол – CLOT, кетоконазол – KCZ, итраконазол – ITR, флуконазол – FLU, нистатин – NYS, амфотерицин В – AmB)

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

Изученные штаммы *C. albicans*, как в гомогенных, так и в гетерогенных ассоциациях, оказались чувствительными к полиенам, включая нистатин, но устойчивыми к флуконазолу. Однако, было обнаружено, что штаммы *C. albicans*, выделенные из гомогенных ассоциаций, были устойчивыми к флуконазолу, в то время как штаммы, выделенные из гетерогенных ассоциаций, были устойчивыми к клотримазолу, итраконазолу и флуконазолу – трем препаратам из этой группы. Кроме того, было обнаружено, что штаммы *C. albicans*, выделенные в виде

монокультуры, чувствительны к имидазолам в 2,2 раза реже, чем к триазолам ($p < 0,05$). Частота чувствительности к полиенам у таких штаммов при этом отличалась не значимо. Подобных штаммов, устойчивых к триазолам, в свою очередь, выделено в 3 раза меньше, чем устойчивых к полиенам ($p < 0,01$).

Устойчивость штаммов *C. albicans*, выделенных в виде монокультуры, к отдельным противогрибковым препаратам из групп имидазолов, триазолов и полиенов практически не различалась. При этом было выявлено, что штаммы *C. albicans*, выделенные в форме монокультур, были чувствительны к полиеновым препаратам и клотримазолу, 87,5 и 100,0%, соответственно, и устойчивы к триазолам, особенно к флуконазолу (25,0%). Полиены в целом оказались в 2,17 раз эффективнее ($p < 0,05$) за счет более высокой чувствительности к нистатину, чем к амфотерицину В (в 2,25 раз, $p < 0,05$).

Штаммы *C. albicans*, выделенные в виде монокультур, статистически значимо не отличались от *C. не-albicans* по чувствительности к протестированным противогрибковым препаратам. Однако первые оказались более чувствительны к препаратам группы полиенов за счет более высокой чувствительности к амфотерицину В ($p < 0,05$).

Изоляты *C. albicans*, полученные из гомогенных ассоциаций, чаще всего были чувствительны к препаратам полиенового ряда и реже к триазолам, особенно к флуконазолу (25%, $n=4$). При этом чувствительность к полиенам была выше в сравнении с имидазолами в 1,45 раза ($p < 0,05$) и в 2,89 раза выше в сравнении с триазолами ($p < 0,001$). Количество штаммов, чувствительных к имидазолам, было в два раза больше, чем количество штаммов, чувствительных к триазолам ($p < 0,05$). Штаммы *C. albicans*, полученные из гомогенных ассоциаций, не отличались от монокультурных штаммов по устойчивости к противогрибковым препаратам и различным фармацевтическим группам.

Среди *C. albicans*, выделенных из гетерогенных ассоциаций, отмечалась устойчивость к препаратам азолового ряда – всего 1 штамм (16,7%) обладал чувствительностью ко всем препаратам данной группы. По сравнению с полиенами число штаммов, чувствительных к имидазолам, было меньше в 2,67 раз, и к

триазолам – 3,99 раз (в обоих случаях $p < 0,05$). В то же время имидазолы и триазолы практически не различались между собой по эффективности в отношении данной группы штаммов *C. albicans*.

Штаммы *C. albicans* из гетерогенных ассоциаций отличались от монокультурных штаммов и компонентов гомогенных ассоциаций значительно более низкой чувствительностью к имидазолам в целом: в 2,75 и 2,50 раз соответственно ($p < 0,05$), и особенно к клотримазолу: в 5,24 и 3,74 раз соответственно ($p < 0,05$).

В группе *C. не-albicans*, выделенных в виде гетерогенных ассоциаций, также выявлена значительная доля штаммов, чувствительных к полиенам, в первую очередь, к нистатину (75%). Изоляты, чувствительные к полиенам, встречались в 1,55 раз чаще ($p > 0,05$), чем к имидазолам, и 1,70 раз ($p < 0,05$) – к триазолам. Статистически значимых различий между долями чувствительных к имидазолам и триазолам штаммов *C. не-albicans*, выделенных в виде гетерогенных ассоциаций, выявлено не было. Чувствительные к итраконазолу *C. не-albicans*, выделенные из гетерогенных ассоциаций, встречались в четыре раза чаще, чем *C. albicans* ($p < 0,05$), что не было свойственно монокультурным штаммам.

Значительная доля штаммов *C. не-albicans*, выделенных в виде монокультуры, были чувствительны к полиенам, особенно к нистатину (90%), и резистентны к обоим триазоловым препаратам.

В группе *C. не-albicans*, выделенных в форме гетерогенных ассоциаций, также была высокая доля штаммов, чувствительных к полиенам, особенно к нистатину (75%). Чувствительные к полиенам штаммы встречались в 1,55 раза чаще, чем к имидазолам ($p > 0,05$), и в 1,70 раза чаще, чем к триазолам ($p < 0,05$). Чувствительность к имидазолам не отличалась от триазолов по частоте обнаружения в группе штаммов *C. не-albicans*, выделенных в виде монокультур. Число штаммов, чувствительных к итраконазолу, было в 3,99 раза выше, чем к флуконазолу ($p < 0,05$).

Монокультурные штаммы *C. не-albicans* и штаммы из гетерогенных ассоциаций статистически не отличались по резистентности к противогрибковым

препаратам. Однако, среди штаммов из гетерогенных ассоциаций было более высокое число штаммов, чувствительных к итраконазолу в 2,22 раза и к амфотерицину В в 1,67 раза, а также более низкое число штаммов, чувствительных к флуконазолу в 1,80 раза (все значения $p > 0,05$). Монокультурные штаммы *C. не-albicans* в основном сохраняли тенденции, наблюдаемые у штаммов *C. albicans*. Однако, штаммы *C. не-albicans* были менее чувствительны к амфотерицину В в 2,19 раза ($p < 0,05$) по сравнению с штаммами *C. albicans*. В популяции штаммов *C. не-albicans*, выделенных из гетерогенных ассоциаций, частота выделения штаммов, чувствительных к клотримазолу, была почти в три раза выше ($p < 0,05$), а к итраконазолу – в четыре раза выше ($p < 0,05$), по сравнению с штаммами *C. albicans*, выделенными из гетерогенных ассоциаций.

Таким образом, большинство штаммов грибов рода *Candida*, выделенных из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов с клиническими проявлениями орофарингеального кандидоза, устойчивы к флуконазолу (76,9%). Штаммы *C. tropicalis* (83%) и *C. krusei* (80%) чувствительны к клотримазолу и итраконазолу, а *C. albicans* (96,7%) и *C. glabrata* (100%) – к полиенам. Кроме того, на чувствительность к противогрибковым препаратам влияет структура популяции. Среди штаммов *C. albicans*, выделенных из гетерогенных ассоциаций, по сравнению с монокультурными, резистентность к имидазолам встречалась более чем в 2,5 раза чаще. Чувствительные к итраконазолу штаммы *C. не-albicans* из гетерогенных ассоциаций встречались в 4 раза чаще по сравнению с *C. albicans*.

ГЛАВА 5. ГЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ

C. ALBICANS

5.1. МУЛЬТИЛОКУСНОЕ СИКВЕНС-ТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ

C. ALBICANS

Для исследования структуры популяции и состава гомогенных ассоциаций резистентных штаммов *C. albicans* использовалось мультилокусное сиквенс-типирование (МЛСТ). Анализ аллельного профиля штаммов *C. albicans* проводили с помощью мультилокусного сиквенс-типирования на основе последовательностей генов домашнего хозяйства ACC1, AAT1a, ADP1, MPIb, SYA1, VPS1, ZWF1b. Ген ACC1 кодирует Ацетил-КоА-карбоксилазу, VPS1 – белок, сортирующий вакуолярные белки, ADP1 – АТФ-зависимую пермеазу, AAT1a – аспаратаминотрансферазу, MPIb – маннозофосфатизомеразу, SYA1 – аланин-тРНК лигазу, ZWF1b – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу *C. albicans*. Было выявлено 9 аллельных вариантов гена AAT1a, 8 – ACC1, 8 – ADP1, 7 – MPIb, 7 – SYA1, 13 – VPS13, 12 – ZWF1b. В результате проведенного исследования выявлены следующие сиквенс-типы *C. albicans*: 3923, 3349, 363, 255, 624, 1469, 3299, 573, 3090, 747, 2724, 1411, 767, 3185, 2014, 4016, 1561, 1322 (Таблица 10).

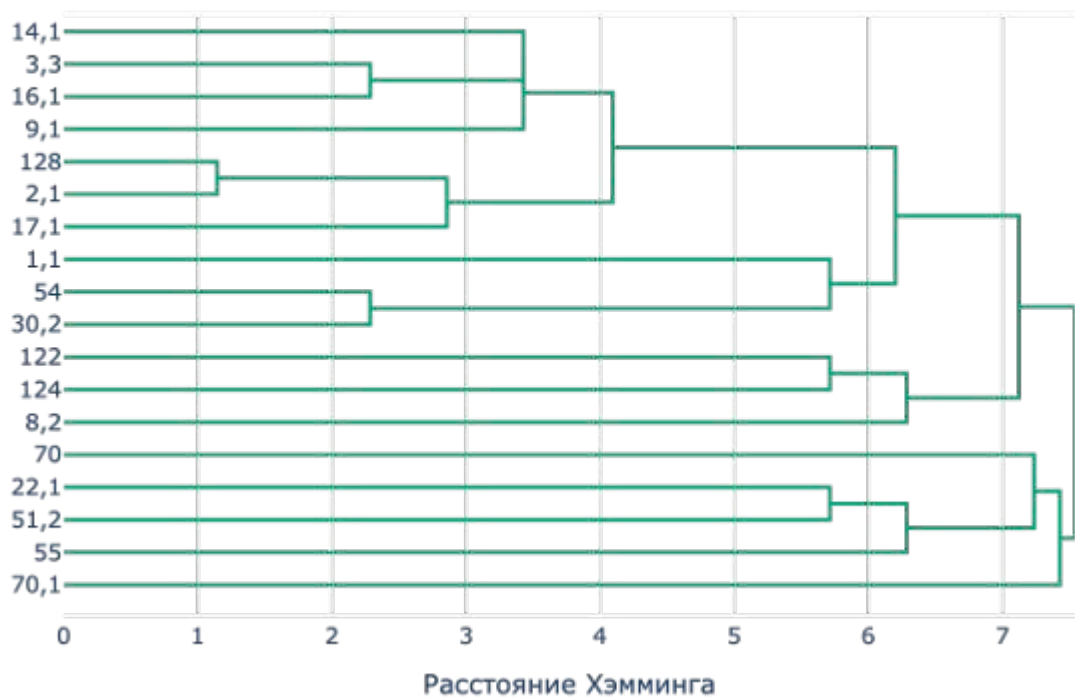
Таблица 10 – Данные МЛСТ штаммов *C. albicans* (ST – сиквенс-тип)

№	ST	AAT1a	ACC1	ADP1	MPIb	SYA1	VPS13	ZWF1b
122	3923	13	124	14	4	34	32	161
124	3349	60	10	21	4	34	11	15
128	363	8	3	8	4	7	3	8
14,1	255	8	7	8	4	7	42	32
16,1	624	8	7	30	4	7	10	8
17,1	1469	8	3	30	4	116	3	22
1,1	3299	8	3	133	169	31	10	22
22,1	573	8	5	5	9	2	6	12
2,1	3090	8	3	30	4	7	3	8
30,2	747	80	3	6	4	31	45	13
3,3	2724	8	7	8	4	34	10	8
51,2	1411	120	3	6	9	2	78	28
54	767	13	3	60	4	31	45	13
55	3185	133	3	6	95	147	4	12

Продолжение таблицы 10

70	2014	117	32	21	34	2	55	5
70,1	4016	202	124	6	5	76	126	271
8,2	1561	80	8	21	106	34	41	6
9,1	1322	8	14	8	4	7	13	8

Также проведен анализ данных МЛСТ при помощи иерархической кластеризации методом определения невзвешенной средней связи (UPGMA) на основании расстояния Хэмминга. Типированные штаммы дифференцировались друг от друга как минимум по двум локусам из семи. Получены кластеры штаммов, с 2-5 общими аллелями различных локусов. Однако, не выявлено штаммов с идентичными сиквенс-типами и заменами в одном локусе какого-либо из генов домашнего хозяйства, что означает крайне низкую вероятность их генетического родства в рамках инфекции у одного пациента. Так, штаммы 14,1 и 16,1, 70 и 70,1, 1,1 и 30,2, 8,2 и 9,1 выделены от соответствующих пациентов. Не было выявлено каких-либо взаимосвязей между принадлежностью штамма к тому или иному кластеру и частотой образования различных типов ассоциаций, биохимической активности, устойчивости к противогрибковым препаратам и ее механизмами (Рисунок 8).

Рисунок 8 – Дендрограмма на основе данных МЛСТ штаммов *C. albicans*

Был проведен анализ полученных данных МЛСТ исследованных штаммов и штаммов из базы данных PubMLST, содержащей информацию о штаммах со всего мира [158], при помощи программного обеспечения Phyloviz и алгоритма goeBURST с построением минимального остовного дерева [134]. Выявленные сиквенс-типы встречались среди штаммов из Великобритании, Китая, США, Франции, Южной Кореи, Израиля, Колумбии, ЮАР, Нидерландов, Японии, Марокко, Кувейта. Данные о наличии ВИЧ-инфекции у пациентов, от которых получены данные штаммы, отсутствуют. Большая часть штаммов выделена из ротоглотки (n=8), фекалий (n=6), мочи и вагинальных мазков (n=6), из крови (n=4), с кожи (n=1) (Рисунок 9). Информация о сиквенс-типах, циркулирующих на территории России, представлена всего двумя штаммами сиквенс-типов 714 и 737, выделенных из крови в 2014 году, без какой-либо дополнительной сопроводительной информации и литературных данных [158]. Данные о наличии тех или иных механизмов резистентности к противогрибковым препаратам отсутствуют в использованной базе данных и связанных со штаммами публикациях.

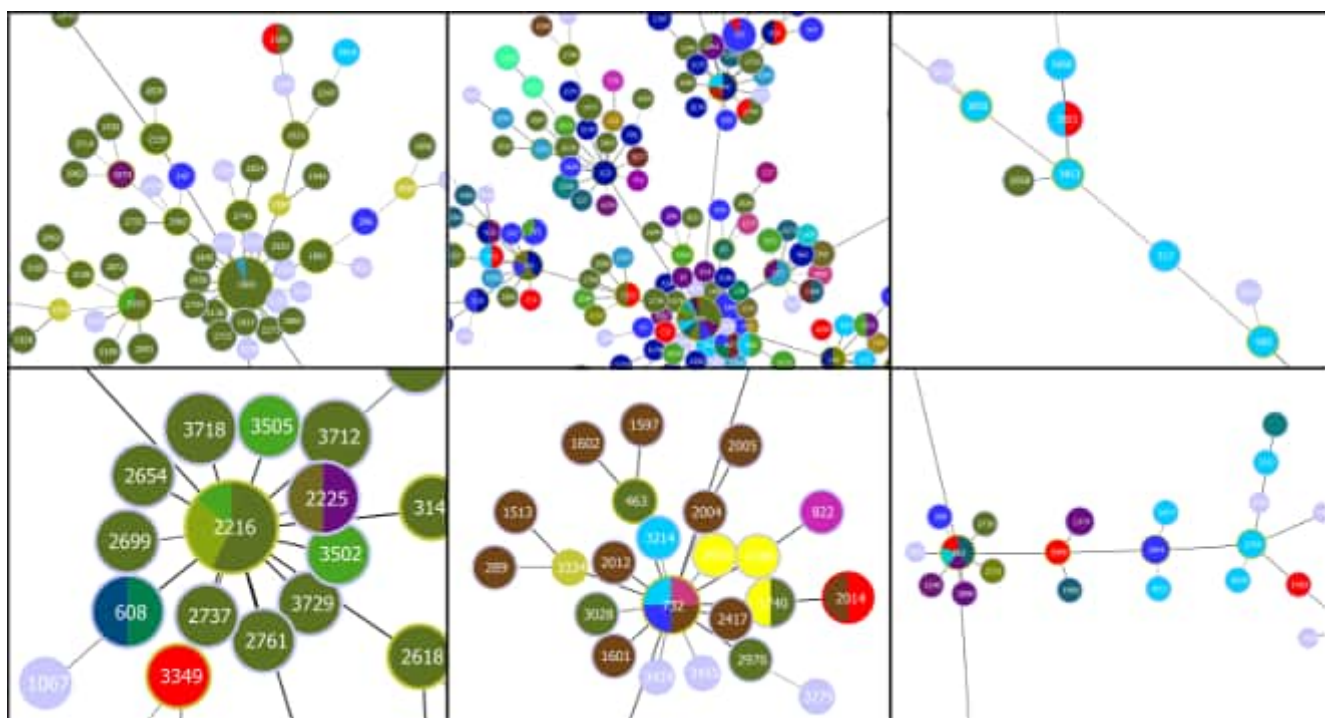


Рисунок 9 – МЛСТ штаммов *C. albicans*

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

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

5.2.ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* И *ERG11* У ШТАММОВ *C. ALBICANS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РОТОГЛОТКИ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

При орофарингеальном кандидозе у пациентов с ВИЧ-инфекцией показана значительная частота выделения *Candida* не-*albicans*, в том числе *C. glabrata* и *C. krusei*. Известно, что виды *C. glabrata* и *C. krusei* обладают повышенным уровнем природной устойчивости к противогрибковым препаратам из группы азолов, в особенности к флуконазолу [58]. Среди видов *C. albicans*, *C. parapsilosis* и *C. tropicalis* встречается приобретенная устойчивость к азолам, штаммы данных видов дикого типа, то есть без приобретенной устойчивости, обладают невысоким уровнем устойчивости к данным противогрибковым препаратам [135].

Доля *C. albicans* в нашей выборке составила 56%, большая часть (76,7%) штаммов обладали устойчивостью к флуконазолу и вориконазолу. В то же время доля *C. tropicalis* и *C. parapsilosis*, способных к формированию приобретенной устойчивости, была незначительной, а остальные штаммы принадлежали видам *C. glabrata* и *C. krusei*, которым свойственна природная устойчивость к азолам. В связи с этим, механизмы приобретенной устойчивости исследовались у устойчивых к азолам штаммов *C. albicans*.

Для исследования выборочно отобрано 25 штаммов *C. albicans*: 18 устойчивых к флуконазолу и вориконазолу и 7 чувствительных, в качестве контрольных для определения базовых уровней экспрессии исследуемых генов. Исследовались

уровни экспрессии РНК генов эффлюксных переносчиков *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* и гена *ERG11*, кодирующего 14-альфа-ланостерол-деметилазу, один из ферментов синтеза эргостеролов клеточной стенки грибов, являющийся мишенью для противогрибковых препаратов из группы азолов (Таблица 11).

Таблица 11 – Показатели экспрессии *ERG11*, *MDR1*, *CDR1*, *CDR2*

№ штамма	2 ^{-ΔΔCT} <i>ERG11</i> '	2 ^{-ΔΔCT} <i>MDR1</i> '	2 ^{-ΔΔCT} <i>CDR1</i> '	2 ^{-ΔΔCT} <i>CDR2</i> '
1,1	28,17	16,43	386,01	0,57
70,1	7,65	2,18	183,02	25,47
2,1	12,65	70,44	46,55	151,25
124	22,46	13,49	227,41	45,91
8,2	3,96	4,82	215,15	4,93
9,1	125,04	78,70	489,73	64,71
16,1	18,42	12,01	943,91	16,38
17,1	13,61	7,60	126,16	21,72
51,2	3,55	350,52	4287,24	9094,84
30,2	19,92	37,23	57,31	71,14
122	53,93	15,42	6,60	266,41
55	17,34	102,06	336,82	93,76
14,1	139,22	2,44	294,24	482,98
3,3	36,92	114,04	263,35	178,63
22,1	5,16	35,59	361,41	33,30
54	34,69	18,04	164,94	255,26
70	14,23	17,43	184,93	130,31
128	13,08	3,67	11,00	2,74
201/2	0,22	5,64	0,80	10,56
213/1	4,37	21,71	0,13	6,53
203/1	0,33	0,36	0,93	0,12
229/1	3,13	0,02	10,26	0,12
v36a3	27,23	0,39	1,12	1,29
244/1	28,22	0,49	3,88	1,39
245/1	26,06	0,92	1,25	0,30

В результате проведенного исследования было обнаружено, что у каждого из наблюдаемых устойчивых штаммов *C. albicans* в нашей выборке наблюдается значительное ($p < 0,01$) повышение уровня экспрессии по крайней мере одного из изучаемых генов. Большинство штаммов *C. albicans* также демонстрируют

повышенные уровни экспрессии генов *ERG11*, и эффлюксных переносчиков *CDR1* либо *CDR2* ($p < 0,05$). (Рисунок 10).

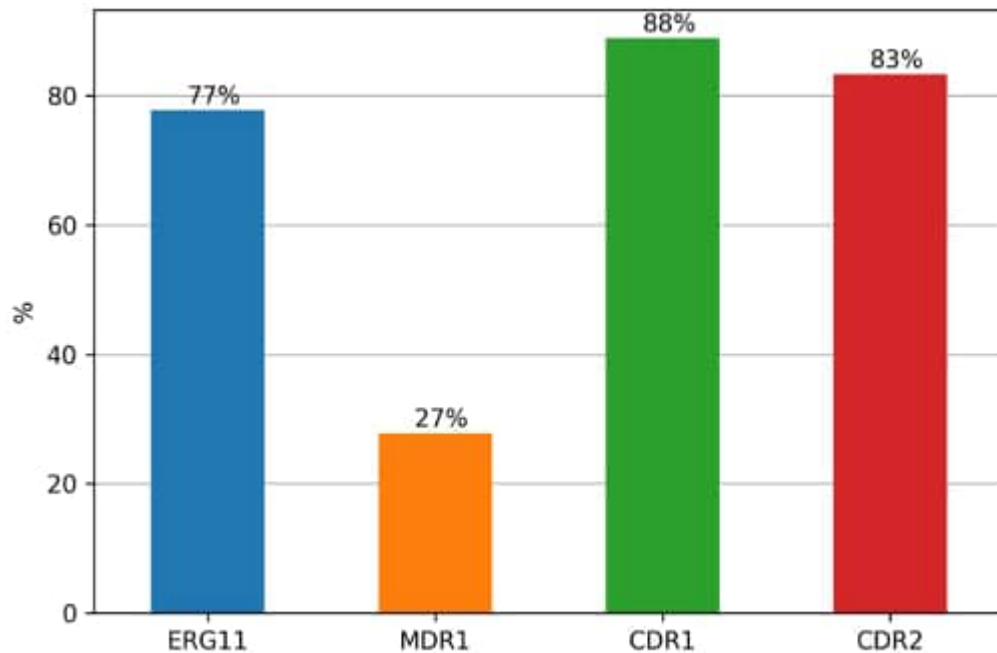


Рисунок 10 – Доли штаммов *C. albicans* с повышенным уровнем экспрессии *ERG11*, *MDR1*, *CDR1*, *CDR2*

Данное наблюдение может быть связано с наличием общих факторов транскрипции у генов *ERG11*, *CDR1* и *CDR2*. Факторы транскрипции могут активироваться в ответ на внешнее воздействие, такое как повышение концентрации противогрибковых препаратов из группы азолов. Кроме того, могут возникать мутации в генах факторов транскрипции, приводящие к постоянному повышению их уровня экспрессии, а также уровня экспрессии регулируемых ими генов.

Уровни экспрессии *ERG11* были значительно повышенными у 14 штаммов *C. albicans* (77%) (Рисунок 11А). У одного штамма был повышен уровень экспрессии только *ERG11*. Повышение уровня экспрессии гена *ERG11* может быть обусловлено мутациями в генах факторов транскрипции, приводящих к постоянной повышенной экспрессии данного гена у штаммов, подвергшихся длительному воздействию противогрибковых препаратов, в том числе из группы азолов.

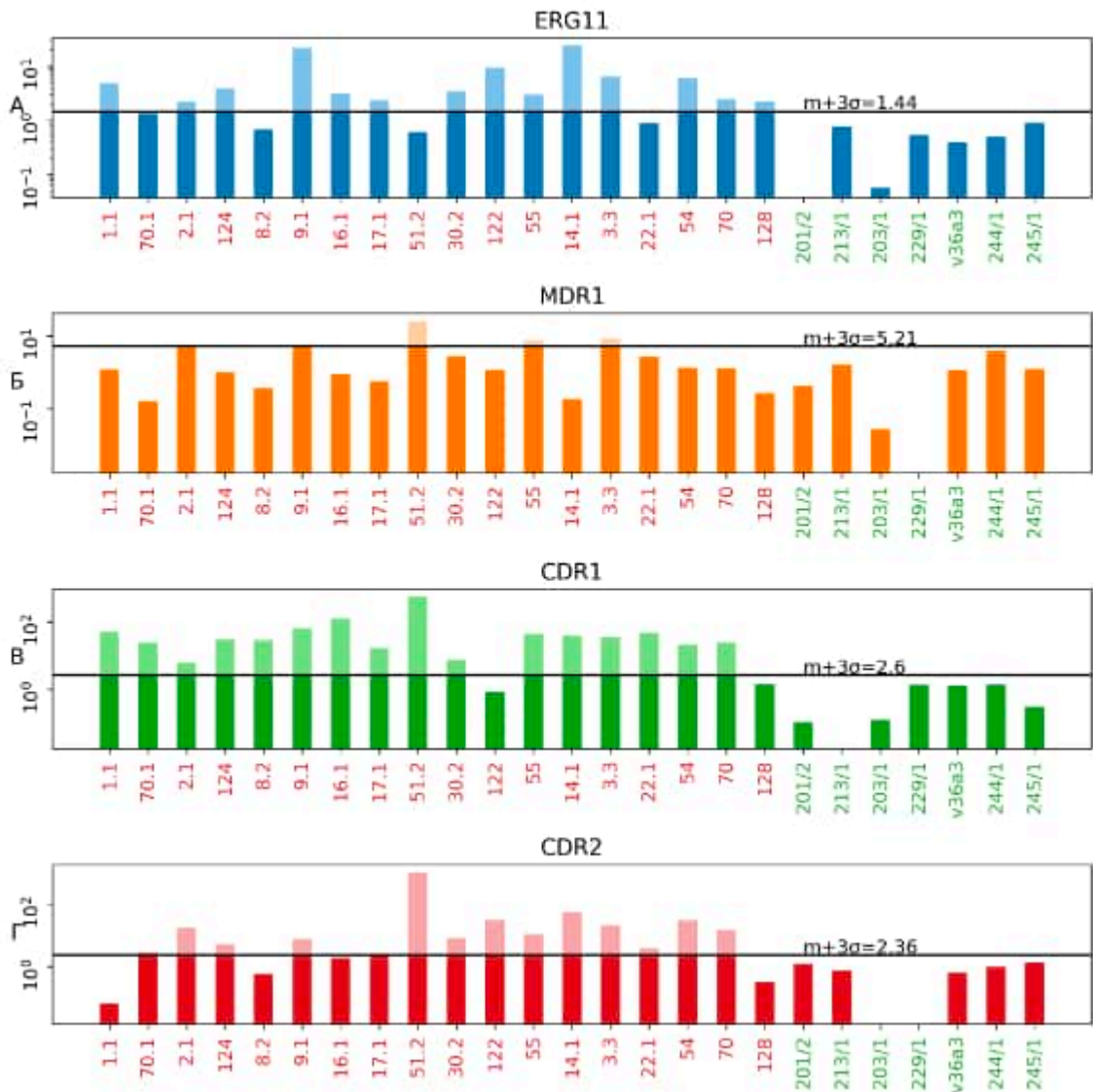


Рисунок 11 – Уровни экспрессии *ERG11* (А), *MDR1* (Б), *CDR1* (В), *CDR2* (Г) ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)
 Примечание: линией обозначен уровень $m+3\sigma$, красным цветом обозначены номера устойчивых штаммов *C. albicans*, зеленым – номера чувствительных штаммов

Уровень экспрессии гена *MDR1* был повышен лишь у 5 штаммов *C. albicans* в нашей выборке (27%), значительно реже других генов ($p < 0,05$) (Рисунок 11Б).

У 13 штаммов (59%) одновременно был повышен уровень экспрессии *CDR1* и *CDR2* (Рисунок 12). Выявлена равноценная взаимосвязь повышения экспрессии *CDR1* и *CDR2* ($p < 0,01$). У 2 штаммов (9%) повышен уровень только *CDR1*, *CDR2*, без повышения экспрессии других генов. Данное наблюдение может быть объяснено тем, что гены *CDR1* и *CDR2* находятся в одном локусе на 3 хромосоме *C. albicans* [63].

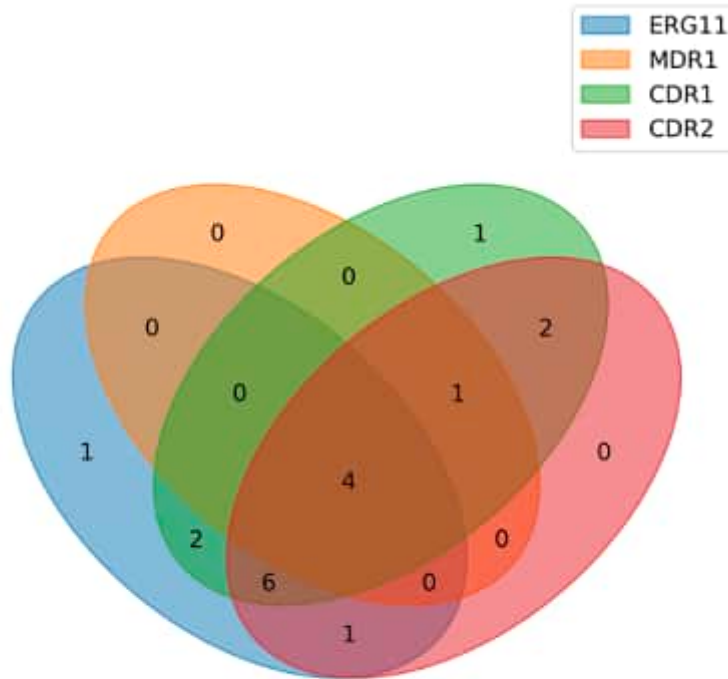


Рисунок 12 – Диаграмма Венна по количеству штаммов *C. albicans* с выявленной повышенной экспрессией генов *ERG11*, *MDR1*, *CDR1*, *CDR2*

У 1 штамма повышен уровень экспрессии только гена *CDR1*, без повышения экспрессии других исследованных генов, при этом в выборке отсутствуют штаммы, у которых повышен уровень экспрессии только *CDR2* (Рисунок 11В, Г). При этом уровень экспрессии *CDR2*, но не *CDR1* был повышен только у одного штамма. У данного штамма, помимо этого, отмечалась повышенная экспрессия *ERG11*, и не был повышен уровень экспрессии *MDR1*. Таким образом, при повышении уровня экспрессии гена *CDR2* наблюдается одновременное повышение экспрессии гена фермента-мишени противогрибковых препаратов азолового ряда, что может позволять подобным штаммам поддерживать уровень устойчивости к данным противогрибковым препаратам.

В то же время повышенная экспрессия *CDR1* без *CDR2* отмечалась у трех штаммов, у одного из них без повышенной экспрессии других генов, у двух – *ERG11*, но не *MDR1*. Повышение уровня экспрессии гена *CDR2* у штаммов *C. albicans* реже ассоциируется повышением МПК противогрибковых препаратов из группы азолов, чем повышение уровня экспрессии гена *CDR1*. У 1 штамма была выявлена повышенная не менее чем в 10 раз, по сравнению с другими штаммами,

экспрессия всех исследуемых генов, за исключением *ERG11*. Штаммы с изолированным повышением экспрессии *MDR1* или *MDR1* и *ERG11* отсутствовали.

У 5 штаммов (22%) было выявлено одновременное повышение уровня экспрессии генов *MDR1*, *CDR1* и *CDR2*, а у 4 штаммов (18%) – одновременное повышение уровня экспрессии всех исследуемых генов. Таким образом, при повышении экспрессии *MDR1* наблюдалось одновременное повышение экспрессии генов *CDR1* или *cdr2* (100%, n=5), а также *ERG11* (92,9%, n=4) ($p < 0,05$). При этом обратного влияния повышения экспрессии генов *CDR1*, *CDR2* и *ERG11* на повышение экспрессии гена *MDR1* не выявлено. Повышение экспрессии гена *MDR1* наблюдалось достоверно чаще при отсутствии повышения экспрессии гена *ERG11* ($p < 0,05$). У 10 штаммов (45,5%) было обнаружено одновременное повышение экспрессии *CDR1*, *CDR2* и *ERG11*. Выявлены взаимосвязи между повышением уровней экспрессии *ERG11* и *CDR1*, *ERG11* и *CDR2* ($p < 0,05$). Кроме того, выявлена взаимосвязь между повышением экспрессии *ERG11* и одновременным повышением экспрессии *CDR1*, *CDR2* ($p < 0,05$). Также выявлена взаимосвязь между повышением экспрессии *CDR2* и одновременным повышением экспрессии *ERG11* и *CDR1* ($p < 0,05$).

Кроме того, у штаммов *C. albicans* с повышенной экспрессией *CDR2* МПК противогрибкового препарата вориконазола были значительно ниже, чем у штаммов без повышенной экспрессии данного гена ($p < 0,05$) (Рисунок 13).

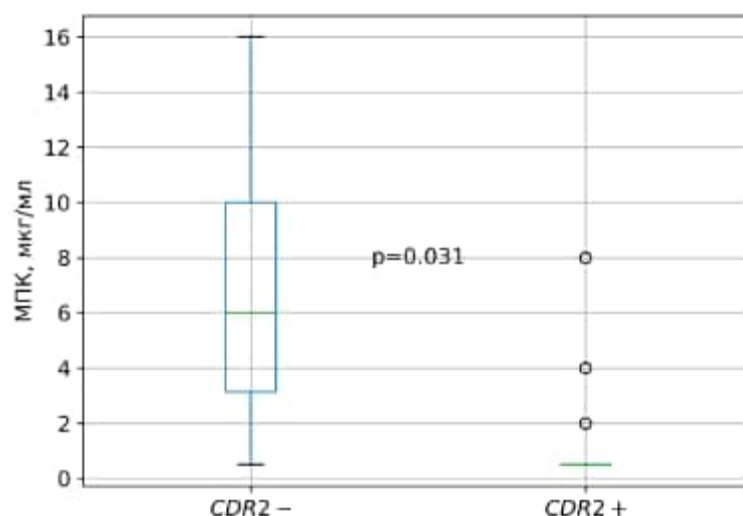


Рисунок 13 – МПК вориконазола (мкг/мл) и наличие повышенной экспрессии *CDR2* у штаммов *C. albicans*

Данный факт может быть связан с ограниченным влиянием повышения экспрессии эффлюксного переносчика *CDR2* на устойчивость к этим представителям триазолов. В то же время не было выявлено взаимосвязи между наличием экспрессии *CDR2* и фенотипической устойчивости к итраконазолу ($p>0,05$), несмотря на также наблюдаемый повышенный уровень МПК данного препарата для штаммов с отсутствием выявленного повышения экспрессии *CDR2*.

Все исследованные штаммы *C. albicans* были фенотипически устойчивыми к вориконазолу, как и к флуконазолу. Также штаммы *C. albicans* с повышенной экспрессией гена *ERG11* обладали более высокой МПК амфотерицина В: $0,86\pm 0,49$ мкг/мл ($p<0,05$), однако ни один штамм не был отнесен к категории устойчивых к амфотерицину В в соответствии с критериями интерпретации (Рисунок 14). Устойчивыми к амфотерицину В считаются *C. albicans* с МПК более 1 мкг/мл [24].

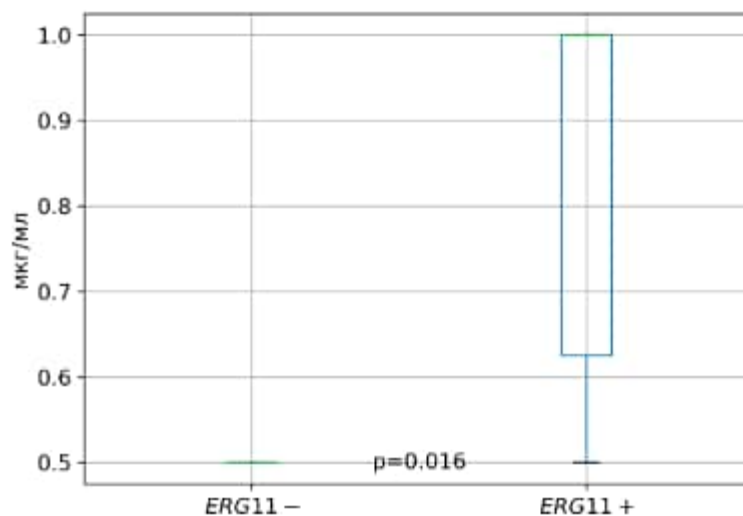


Рисунок 14 – МПК амфотерицина В (мкг/мл) и наличие повышенной экспрессии *ERG11* у штаммов *C. albicans*

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

повышением экспрессии гена *ERG11* как минимум с одним из исследуемых генов (72%).

5.3. МУТАЦИИ В ГЕНЕ *ERG11* У ШТАММОВ *C. ALBICANS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РОТОГЛОТКИ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

Известно, что ряд несинонимичных мутаций в гене *ERG11*, кодирующем ланостерол 14 α -диметилазу, являющуюся мишенью для противогрибковых препаратов из ряда азолов, предотвращают ее связывание с данными препаратами, что обуславливает приобретенную устойчивость у штаммов *C. albicans*, зачастую на более высоком уровне, чем устойчивость, обусловленную повышением уровня экспрессии продукта данного гена или генов эффлюксных переносчиков, за счет перманентного закрепления данного признака у таких штаммов [186].

В связи вышесказанным, наличие мутаций в гене *ERG11* выборочно было исследовано у 18 устойчивых к флуконазолу и вориконазолу штаммов *C. albicans* с исследованными уровнями экспрессии гена *ERG11* и генов эффлюксных переносчиков *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* без выявленных закономерностей уровней экспрессии данных генов и устойчивости.

Для поиска мутаций в гене *ERG11* использовалось секвенирование по Сэнгеру, подробная методика описана в разделе "Материалы и методы". Обнаружены точечные несинонимичные мутации в гене *ERG11*, которые приводят к изменению аминокислотной последовательности ланостерол 14 α -диметилазы (СУРА51), в том числе в центре связывания данного фермента с препаратами из группы азолов (Таблица 12).

Были выявлены мутации в гене *ERG11*, приводящие к аминокислотным заменам S16V, D116E, E266D, G464S, I471T, V488I. У четырех штаммов обнаружена замена E266D, G464S – у двух, I471T – у одного, а V488I – у трех штаммов, S16V – у двух штаммов. У одного штамма выявлены аминокислотные замены E266D и G464S.

Таблица 12 – Мутации в гене *ERG11* штаммов *C. albicans*

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

У исследованных штаммов *C. albicans* выявлена повышенная экспрессия генов *ERG11* (60%), *MDR1* (10%), *CDR1* (80%), *CDR2* (60%). 7 штаммов (38,9%) оказались носителями 6 мутаций: E266D (22,2%), G464S (11,1%), I471L (5,6%), D116E (16,7%), V488I (16,7%), S16V (11,1%). E266D обнаружена у четырех штаммов, G464S – у двух, I471L – у одного, V488I – у трех (Таблица 13).

Таблица 13 – Долевая структура мутаций в гене *ERG11* штаммов *C. albicans*

Мутация	Абс.	%
E266D	4	22,2
G464S	2	11,1
I471L	1	5,6
D116E	3	16,7
V488I	3	16,7
S16V	2	11,1

Ранее не описанная мутация, приводящая к аминокислотной замене S16V, обнаружена у штаммов 30,2 и 70,1. Она находится на конце аминокислотной последовательности, не в центре фермента, ответственном за связывание с

препаратами азолового ряда и, таким образом, не должна оказывать заметного влияния на устойчивость к противогрибковым препаратам (Рисунок 15). В нашей выборке также не выявлено взаимосвязи между наличием мутации S16V и МПК какого-либо из протестированных противогрибковых препаратов.

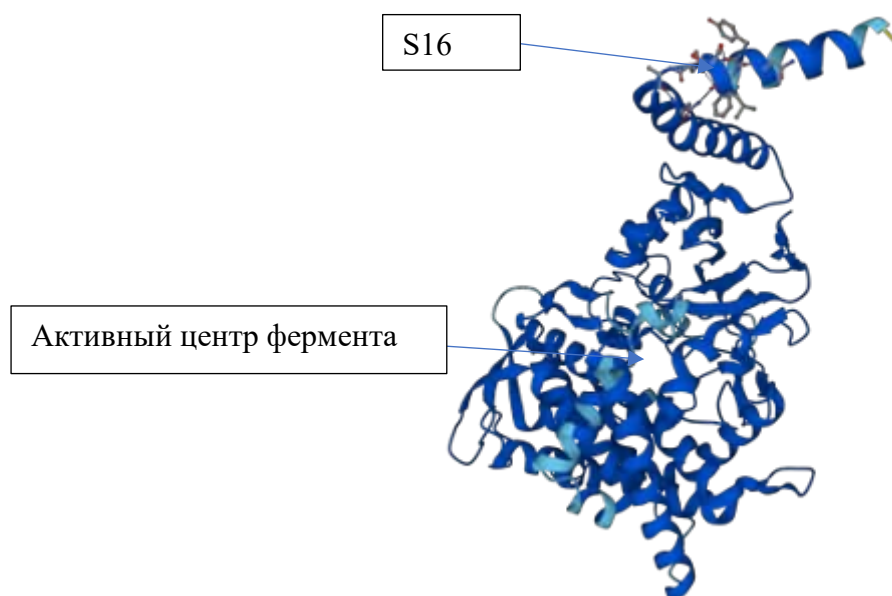


Рисунок 15 – Структура ланостерол 14-альфа-диметилазы с расположением замены S16V и активного центра фермента

У одного штамма выявлены E266D и G464S одновременно. У двух штаммов одновременно выявлены мутации E266D и D116E. У одного штамма одновременно выявлены мутации E266D и V488I (Таблица 14).

Таблица 14 – Ассоциации мутаций в гене *ERG11*

Мутации	Кол-во	%
D116E, V488I, S16V	1	5.6
E266D, D116E	2	11.1
E266D, G464S	1	5.6
E266D, V488I	1	5.6
G464S, S16V	1	5.6
I471L, V488I	1	5.6

У 6 из 7 штаммов с выявленными мутациями (92,3%) было обнаружено две мутации одновременно, у одного – 3. Наиболее часто встречались одновременно с

другими мутации E266D и V488I – по 3 случая (17%). Каких-либо взаимосвязей одновременного выявления различных мутаций выявлено не было.

Наиболее часто мутации выявлялись в штаммах с повышенной экспрессией *CDR1* и *CDR2* (Таблица 15). Различие между штаммами с повышенной экспрессией данных генов по частоте выявления мутаций было несущественным.

Таблица 15 – Общая частота выявления мутаций в гене *ERG11* у штаммов с повышенной экспрессией генов *ERG11*, *MDR1*, *CDR1* и *CDR2*

Ген	Всего штаммов	Носителей мутаций	
		Кол-во	%
<i>ERG11</i>	14	4	28,6
<i>MDR1</i>	5	1	20,0
<i>CDR1</i>	16	6	37,5
<i>CDR2</i>	14	6	42,9

Среди исследованных штаммов заметно чаще других встречалась мутация E266D (32,3%), особенно среди штаммов с повышенной экспрессией *ERG11* (42,9%) и *MDR1* (50,0%). У штамма *C. albicans* с наиболее высокой экспрессией генов *MDR1*, *CDR1* и *CDR2* были выявлены замены E266D и V488I. При этом у данного штамма не было выявлено повышенной экспрессии гена *ERG11*.

При наличии у штамма *C. albicans* мутации V488I в гене *ERG11* с высокой долей вероятности ($p < 0,05$) отсутствовала повышенная экспрессия гена *ERG11*. Из 18 штаммов 6 обладали повышенной экспрессией *ERG11* и не имели мутации V488I, в то же время у трех штаммов была выявлена мутация V488I и отсутствовала повышенная экспрессия *ERG11*. У одного штамма не было выявлено ни повышенной экспрессии *ERG11* ни мутации V488I. Данная мутация ассоциирована с устойчивостью к флуконазолу. Также известно, что ассоциированные с устойчивостью мутации в гене *ERG11* приводят к постоянному изменению МПК соответствующих препаратов, в отличие от более ресурсоемкого механизма повышения количества фермента-мишени азолов, являющегося продуктом гена *ERG11* [245]. Поэтому, при некоторых мутациях в гене *ERG11* может не наблюдаться повышение экспрессии этого гена, а также ослабление прочих

механизмов резистентности. Мутация G464S, напротив, встречалась только у штаммов с повышенной экспрессией гена *ERG11* ($p < 0,05$) (Таблица 16).

Таблица 16 – Частота выявления отдельных мутаций у штаммов с повышенной экспрессией генов *ERG11*, *MDR1*, *CDR1* и *CDR2*

Мутация	<i>ERG11</i>		<i>MDR1</i>		<i>CDR1</i>		<i>CDR2</i>	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
E266D	3	42,9	1	50,0	3	27,3	3	27,3
G464S	2	28,6	0	0	2	18,2	1	9,1
I471L	0	0	0	0	1	9,1	1	9,1
D116E	2	28,6	0	0	2	18,2	3	27,3
V488I	0	0	1	50,0	3	27,3	3	27,3

Кроме того, выявлена корреляционная взаимосвязь между МПК противогрибковых препаратов среди штаммов с выявленным повышенным уровнем экспрессии исследуемых генов и мутациями в гене *ERG11*. Так, у штаммов с выявленной повышенной экспрессией ассоциированных с устойчивостью генов выявлена взаимосвязь между МПК препаратов из ряда азолов: флуконазола и вориконазола ($r=0,877$), итраконазола ($r=0,888$), позаконазола ($r=0,884$), а также позаконазола и вориконазола ($r=0,979$), итраконазола ($r=0,999$). Данный факт может указывать на влияние выявленных механизмов на устойчивость ко всей группе противогрибковых препаратов из ряда азолов. По-видимому, длительное применение таких противогрибковых препаратов, как флуконазол может приводить к развитию устойчивости к более новым противогрибковым препаратам, например к вориконазолу, итраконазолу, позаконазолу.

Помимо этого, в данной подгруппе штаммов установлена взаимосвязь между МПК анидулафунгина и препаратов из ряда азолов ($r > 0,559$), а также каспофунгина ($r=0,706$), что может говорить о распространении приобретенной устойчивости за пределы, группы противогрибковых препаратов азолового ряда, применяемой у обследованных пациентов, на более современную группу эхинокандинов. Тем не менее, в подгруппе штаммов с теми или иными мутациями в гене *ERG11* отсутствовала выраженная взаимосвязь между МПК анидулафунгина и каспофунгина.

В исследованной выборке все штаммы *C. albicans* были устойчивы к флуконазолу и вориконазолу, однако не выявлено каких-либо закономерностей или статистически значимых различий между МПК данных препаратов и выявленными мутациями в гене *ERG11*. В то же время, наличие мутации E266D, напротив, ассоциируется с более высокой чувствительностью к итраконазолу и позаконазолу, чем при ее отсутствии – в 216,88 раз ($p < 0,05$): $\text{МПК}_{\text{E266D}^+} = 0,0375 \pm 0,0075$ мкг/мл, $\text{МПК}_{\text{E266D}^-} = 8,1133 \pm 5,4323$ мкг/мл для итраконазола и $\text{МПК}_{\text{E266D}^+} = 2,75 \pm 2,22$, $\text{МПК}_{\text{E266D}^-} = 0,02 \pm 0,13$ для позаконазола (Рисунок 16).

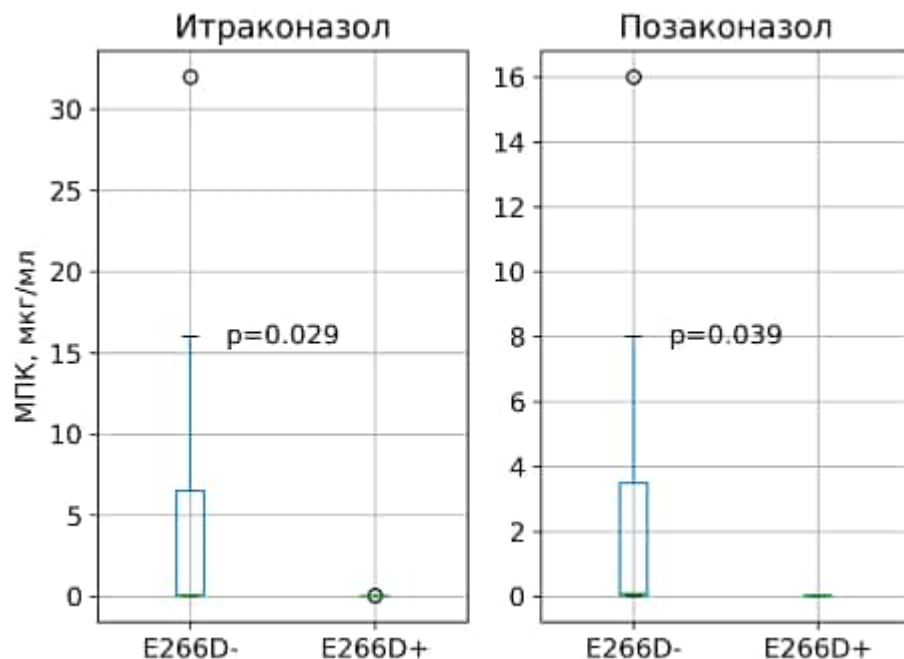


Рисунок 16 – МПК позаконазола итраконазола (мкг/мл) и наличие мутации E266D у штаммов *C. albicans*

Устойчивыми к итраконазолу либо позаконазолу считаются штаммы *C. albicans* с МПК более чем 0,06 мкг/мл для соответствующего препарата [24]. При этом, в нашей выборке встречались как устойчивые, так и чувствительные к итраконазолу и позаконазолу штаммы *C. albicans*. Однако, также не было выявлено существенных различий между количеством устойчивых к итраконазолу либо позаконазолу штаммов *C. albicans* с мутацией E266D в гене *ERG11* и без нее (Таблица 17).

Таблица 17 – МПК противогрибковых препаратов для исследованных штаммов *C. albicans* (мкг/мл) (AND-Анидулафунгин, AMB-Амфотерицин В, MIC-Микафунгин, CAS- Каспофунгин, FCZ-5-Флуцитозин, POS- Позаконазол, VOR-Вориконазол, ITR- Итраконазол, FLU- Флуконазол)

№ штамма	AND	AMB	MIC	CAS	FCZ	POS	VOR	ITR	FLU
1,1	0,06	2	0,015	0,12	0,06	8	8	16	256
70,1	0,03	0,5	0,008	0,06	0,06	0,03	0,5	2	16
2,1	0,06	1	0,015	0,12	0,06	0,015	0,5	2	8
124	0,015	0,5	0,015	0,06	0,06	0,03	0,5	2	16
8,2	0,06	0,5	0,015	0,06	0,06	16	16	32	256
9,1	0,06	1	0,015	0,12	0,06	8	8	16	256
16,1	0,03	1	0,008	0,12	0,06	0,015	4	0,03	64
17,1	0,06	0,5	0,015	0,12	0,06	2	2	2	32
51,2	0,03	0,5	0,015	0,06	0,06	0,015	0,5	2	16
30,2	0,06	1	0,015	0,12	0,06	0,25	0,5	2	128
122	0,03	2	0,008	0,06	0,06	0,03	0,5	2	16
55	0,015	0,5	0,008	0,03	0,06	0,03	0,5	2	8
14,1	0,06	0,5	0,06	0,12	0,06	4	4	8	128
3,3	0,03	1	0,008	0,06	0,06	0,03	0,5	2	8
22,1	0,03	0,5	0,015	0,12	0,12	0,03	0,5	2	16
54	0,03	1	0,008	0,06	0,06	0,03	0,5	2	8
70	0,03	2	0,008	0,06	0,06	0,12	0,5	2	8
128	0,03	1	0,008	0,06	0,06	0,03	0,5	2	8

Это может быть связано с особенностями формирования устойчивости к длинноцепочечным триазолам, так как, тем не менее, данная мутация ассоциируется с повышением устойчивости к флуконазолу как в предшествующих, так и в настоящем исследовании [53; 76; 89; 113; 115; 120; 183; 216; 263].

Таким образом, у 7 из 18 (38,9%) устойчивых к азолам штаммов *C. albicans*, с известными сиквенс-типами, в нашей выборке выявлены мутации в гене *ERG11*, ассоциированные с повышением МПК препаратов данного ряда. Наиболее часто встречалась мутация E266D (22,2%). В то же время мутация E266D ассоциировалась с более низкой МПК итраконазола и позаконазола. Выявлены взаимосвязи между E266D и повышенной экспрессией *ERG11* и *MDR1*, а также между заменами D116E, V488I и повышенной экспрессией гена *CDR2*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Свойства и состав оппортунистических микроорганизмов, выделенных от пациентов с ВИЧ-инфекцией и клиническими проявлениями орофарингеального кандидоза, отличаются от типичных. Так, по сравнению с контрольной выборкой штаммов от пациентов с ВИЧ-инфекцией без орофарингеального кандидоза, видовой состав условно-патогенных микроорганизмов был более ограниченным.

В данной выборке штаммов, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов с клиническими проявлениями орофарингеального кандидоза, свойства и видовой состав оппортунистических микроорганизмов являются нетипичными. По сравнению с исследованной контрольной выборкой штаммов от ВИЧ-инфицированных пациентов без орофарингеального кандидоза, видовой состав оппортунистических представителей микробиоты представляется достаточно скудным. В подавляющем большинстве случаев нормальная микрофлора подавлена *Candida spp.* либо энтеробактериями.

Значительную часть микробиоты ротоглотки занимают грибы рода *Candida*, среди которых распространены не-*albicans* виды, отмечается повышенная частота устойчивости к азолам. Известно о связи между количеством CD4⁺ лимфоцитов и возникновением кандидозов, однако уровень распространения не-*albicans* видов *Candida* и приобретенной устойчивости к азолам в мире оценивается гораздо ниже, чем в исследованной выборке [133].

Среди энтеробактерий и стафилококков также наблюдается высокий уровень резистентности к антибактериальным препаратам. Отмечено наличие генов карбапенемаз KPC и OXA48. По сравнению с исследованной контрольной группой, достаточно высока частота выделения метициллин-резистентных золотистых стафилококков.

Данные исследования подтверждают разнообразие видов грибов рода *Candida*, играющих роль в развитии орофарингеального кандидоза у ВИЧ-инфицированных пациентов. Было обнаружено, что доля штаммов *C. albicans*, по сравнению с контрольной выборкой, снижена.

Также было отмечено, что популяция грибов рода *Candida* может иметь разнообразную структуру. Показано, что штаммы могут присутствовать в биотопе ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов в виде монокультуры или же ассоциаций, состоящих из штаммов одного или различных видов. Данный факт находит подтверждение в исследованиях похожих групп пациентов. Так, по данным А.Б. Кулько и соавторов, у ВИЧ-инфицированных пациентов, больных туберкулезом, значительно чаще выделяются штаммы двух и более видов *Candida spp* [23].

Популяционная структура и гомогенные ассоциации *C. albicans* исследовались при помощи МЛСТ. Исследованные штаммы отличаются как минимум по двум локусам, штаммы, выделенные от одного пациента, принадлежат различным кластерам, что подтверждает факт наличия гомогенных ассоциаций, представленных штаммами одного вида, в отдельном локусе одного пациента. Подобных данных не найдено в ходе исследования литературы.

Выявлены штаммы *C. albicans* сиквенс-типов 3923, 3349, 363, 255, 624, 1469, 3299, 573, 3090, 747, 2724, 1411, 767, 3185, 2014, 4016, 1561, 1322. Данные сиквенс-типы встречались среди штаммов из Великобритании, Китая, США, Франции, Южной Кореи, Израиля, Колумбии, ЮАР, Нидерландов, Японии, Марокко, Кувейта. Стоит отметить, что данные о большинстве изолятов получены из Китая, США и Великобритании, что ограничивает возможность исследования эпидемиологии кандидозов, ассоциированных с данными сиквенс-типами. Большая часть штаммов выделена из ротоглотки (n=8), фекалий (n=6), мочи и вагинальных мазков (n=6), из крови (n=4), с кожи (n=1), что говорит о том, что инфекции, вызываемые штаммами исследованных сиквенс-типов, не ограничиваются кандидозами кожи и слизистых, в том числе орофарингеальным кандидозом. В то же время значительная часть штаммов данных сиквенс-типов ранее выделялась из локусов колонизации обследованных пациентов.

Доступная информация о сиквенс-типах, циркулирующих на территории России, ограничивается всего двумя типами – 714 и 737. Эти сиквенс-типы были выделены из образцов крови в 2014 году, однако, к сожалению, дополнительные

сопроводительные данные отсутствуют. Конкретно данные о наличии или отсутствии ВИЧ-инфекции у пациентов, от которых были получены эти штаммы, также недоступны. Кроме того, использованная база данных и связанные публикации не содержат информацию о наличии или отсутствии конкретных механизмов резистентности к противогрибковым препаратам у этих штаммов. Таким образом, невозможно полноценное исследование генетических характеристик, эпидемиологии и профиля резистентности к противогрибковым лекарственным препаратам у штаммов этих сиквенс-типов из-за ограниченности имеющихся данных. Для более полного изучения циркулирующих сиквенс-типов в регионе требуются дальнейшие исследования.

В ходе анализа полученных данных обращено внимание на ряд общих свойств, наблюдаемых во всех формах организации популяции штаммов *Candida spp.* Так, для всех структурных вариантов популяции штаммов *C. albicans* характерна низкая чувствительность к триазолам, и, особенно к флуконазолу. Повышенный уровень устойчивости к данному препарату отмечается в ряде исследований, но не для большинства штаммов [17]. Однако, исследование устойчивости к противогрибковым препаратам в контексте различных форм организации популяции *Candida spp.* ранее не проводилось.

Лидирующие позиции по эффективности занимают полиены, среди них – нистатин, а промежуточные – имидазолы. Препараты из группы полиенов относятся к препаратам резерва по данным большинства клинических рекомендаций [6]. При этом не прослеживаются значимых отличий по чувствительности внутри отдельных фармакологических групп препаратов. Кроме того, среди всех штаммов *C. albicans* по чувствительности к противогрибковым препаратам заметно выделяются штаммы, выделенные из гетерогенных ассоциаций. В то же время штаммы, образующие гомогенные ассоциации, практически не отличаются от монокультурных по чувствительности к противогрибковым препаратам.

Общие свойства популяции штаммов *C. non-albicans* во многом сходны с таковыми для *C. albicans*. Исключение составила чувствительность штаммов *C.*

не-*albicans* к имидазолам, которая статистически значимо не отличается от чувствительности к полиенам и триазолам.

Вместе с тем отчетливо проявились особенности чувствительности штаммов *Candida spp.* к противогрибковым препаратам, которые зависят от структуры популяции. Так, наименьшая чувствительность к имидазолам суммарно, а также по отдельности ко всем тестируемым препаратам за исключением нистатина и флуконазола, свойственна выделенным из гетерогенных ассоциаций штаммам *C. albicans*. При этом в группе монокультурных штаммов *C. albicans* уровень устойчивости к имидазолам сопоставим с устойчивостью к полиенам.

Популяция *C. не-albicans* продемонстрировала более узкий спектр подобных свойств. Среди монокультурных штаммов этих микробов наибольшая устойчивость отмечается к итраконазолу и амфотерицину В. В то же время штаммы, выделенные из гетерогенных ассоциаций, наиболее устойчивы к флуконазолу. Не-*albicans* виды *Candida* в целом проявляют более широкий уровень природной и приобретенной устойчивости к противогрибковым препаратам [19].

Мы установили, что наибольшая чувствительность для *C. albicans* и *C. glabrata* наблюдается в отношении полиенов, в том числе нистатина, а для *C. krusei* и *C. tropicalis* – в отношении клотримазола и итраконазола. Подавляющее большинство исследованных штаммов устойчивы к флуконазолу. Однако чувствительность штаммов грибов рода *Candida* к противогрибковым препаратам зависит не только от вида, но и от структуры популяции. Примечательно, что *C. albicans*, выделенные из гетерогенных ассоциаций приобретают широкий спектр резистентности, в отличие от других штаммов из числа не-*albicans*. Для штаммов *C. glabrata* этот эффект менее выражен.

Полученные данные показывают, что популяция *Candida spp.*, в ротоглотке ВИЧ-инфицированных пациентов, неоднородна как по видовому составу, так и по структуре и устойчивости к противогрибковым препаратам. Это означает, что орофарингеальный кандидоз нельзя рассматривать как результат внутрибольничного инфицирования, которое должно вести к закономерной синхронизации характеристик исследуемой популяции микроорганизмов. В связи

с этим, можно предполагать, что, по крайней мере в данной группе пациентов, грибы рода *Candida* не представляют эпидемиологической опасности. Однако данное предположение требует более тщательного изучения, и его необходимо учитывать при назначении противогрибковых препаратов ВИЧ-инфицированным пациентам.

В ходе анализа была также показана значимость структуры популяции штаммов грибов рода *Candida* в их межвидовой дифференциации. Диапазон устойчивости к противогрибковым препаратам был шире в популяции *C. albicans*, по сравнению с *C. не-albicans*. Этот факт может быть обусловлен более высокой адаптивностью *C. albicans* к факторам окружающей среды [65].

Детальный анализ полученных данных показал, что структура популяции грибов рода *Candida* не является случайным явлением, а представляет собой определенную закономерность, которая влияет на их биологические свойства. Очевидно, что структура микробиоценоза биотопа может лишь частично объяснить неоднородность популяции микромицет по устойчивости к противогрибковым препаратам. Возможно, эти эффекты напрямую связаны со способностью *Candida spp.* существовать в более сложных формах организации сообщества, таких как биопленки [69]. Для решения данного вопроса необходимы дополнительные направленные экспериментальные исследования. Кроме того, важно определить роль организма ВИЧ-инфицированных пациентов в формировании структуры рассматриваемой популяции, а также влияние межмикробных взаимодействий на распространение лекарственной устойчивости среди грибов *Candida spp.*

Различные механизмы устойчивости к азолам, включая повышение экспрессии генов эффлюксных переносчиков подробно описаны для одного из первых выявленных устойчивых к азолам штаммов *C. albicans* – штамма Дарлингтон, выделенного от пациента с рецидивирующим кандидозом кожи и слизистых оболочек (Darlington strain) [236]. Селективное ингибирование *MDR1* и *CDR1* у данного штамма не приводило к снижению устойчивости к флуконазолу или вориконазолу. Однако, при ингибировании *CDR1* восстанавливалась чувствительность к итраконазолу и позаконазолу. Это позволяет предположить

влияние *MDR1* на устойчивость к короткоцепочечным азолам – флуконазолу и вориконазолу, но не к итраконазолу и позаконазолу. Повышенная экспрессия *ERG11* также обеспечивает устойчивость лишь к короткоцепочечным азолам [236]. В другом подобном исследовании описывается серия из 17 штаммов *C. albicans*, выделенных за два года от ВИЧ-инфицированного пациента, получавшего терапию азолами против рецидивирующего орофарингеального кандидоза. За период исследования уровень устойчивости возрос более чем в 200 раз, были выявлены мутации в гене *ERG11*, регуляторах транскрипции *TAC1*, *UPC2*, что приводило к повышенной экспрессии *CDR1*, *CDR2*, *ERG11*. Уровень экспрессии *MDR1* также был повышен [222].

В ходе проведенного исследования установлено, что у каждого из устойчивых штаммов в нашей выборке повышен уровень экспрессии по крайней мере одного из изучаемых генов. У 59% штаммов были одновременно повышены уровни *CDR1* и *CDR2*. Подобные результаты можно считать достаточно характерными для устойчивых к азолам клинических штаммов *C. albicans*, в нескольких исследованиях отмечается экспрессия именно этих переносчиков [4]. В нашей выборке выявлено равноценное взаимное влияние экспрессии генов в данной паре ($p < 0,01$), Это может быть обусловлено тем, что гены, кодирующие эффлюксные переносчики *CDR1* и *CDR2*, расположены в одном локусе на хромосоме 3, вследствие чего часто и обнаруживается их одновременная повышенная экспрессия [146]. Трисомия хромосомы 3 сопряжена с повышением устойчивости к триазолам и выявляется у некоторых штаммов при длительном воздействии азолами [62]. Следует отметить, что *CDR1*, *CDR2* также регулируются общими механизмами, такими как промотор *TAC1*, расположенный в одном локусе на левом плече хромосомы 5 вместе с геном *ERG11*, промоторами *CANDT80*, *CAFCCR1* и *CAFCCR3* [149].

В то же время в исследованной выборке имеются штаммы с изолированной экспрессией *CDR1* либо *CDR2*. У одного штамма был повышен уровень экспрессии только *CDR1*, без одновременного повышения уровней экспрессии других генов. Эти данные также находят подтверждение в результатах других исследователей:

экспериментальная делеция *CDR2* у изначально устойчивого к противогрибковым препаратам из группы азолов клинического штамма *C. albicans* оказывает заметно меньшее воздействие на устойчивость к азолам по сравнению с отсутствием *CDR1* [49].

У подавляющего большинства штаммов (77%) был выявлен повышенный уровень экспрессии гена белка мишени азолов – *ERG11*. Также с высокой вероятностью обнаруживалось одновременное повышение экспрессии *ERG11* с как минимум одним из исследуемых генов ($p < 0,05$). Однако в литературе имеются противоречивые сведения относительно распространенности экспрессии этого гена и его влияния на устойчивость к различным группам противогрибковых препаратов [245]. Многие исследователи отмечают, что в случае повышенной экспрессии *ERG11* минимальная подавляющая концентрация для препарата пропорционально повышается, в то время как мутационные механизмы обеспечивают полную устойчивость к противогрибковому препарату [98]. Конститутивная повышенная экспрессия *ERG11* часто возникает при мутациях в гене транскрипционного фактора *UPC2*, повышающих его активность [128]. *UPC2* активируется анаэробными условиями роста, снижением концентрации эргостерола и азолами [62]. Вопрос о вкладе таких мутаций в данный механизм в настоящее время продолжает изучаться, так как имеются данные об устойчивых штаммах *Candida spp.* без мутаций в *UPC2*, а также ряде мутаций, встречающихся как у чувствительных, так и у устойчивых штаммов [111].

Уровень экспрессии гена эффлюксного переносчика *MDR1* повышен в наименьшем числе образцов (27%), хотя при этом в работах ряда исследователей данный механизм был более распространенным. В исследовании Cernicka у всех 22 устойчивых к флуконазолу штаммов *C. albicans* была выявлена повышенная экспрессия гена *MDR1* [76]. В исследовании Shi и соавторов также наблюдалась повышенная экспрессия гена *MDR1* у всех 23 клинических изолятов *C. albicans* [118]. Однако, по-видимому, изолированная повышенная экспрессия *MDR1* не оказывает воздействия, сравнимого с другими эффлюксными переносчиками. Тем не менее он способен обеспечивать устойчивость к флуконазолу – наиболее часто

рекомендуемому противогрибковому препарату [100]. Также есть данные лабораторных исследований о повышении экспрессии *MDR1* в присутствии амфотерицина В [254]. Ген *MDR1* находится на хромосоме 6 и регулируется фактором транскрипции *MRR1* (Multidrug resistance regulator 1), мутации в котором могут приводить к конститутивному повышению его экспрессии [94]. В свою очередь *MRR1* активируется хроматин-ремоделирующим комплексом Swi/Snf, который влияет на экспрессию многих генов [170].

В нашей выборке повышенный уровень экспрессии *MDR1* сопровождался одновременным повышением уровней экспрессии *CDR1*, *CDR2* и *ERG11* ($p < 0,05$). Это наблюдение может быть обусловлено функционированием транскрипционного фактора *EFG1*, который к тому же регулирует образование гиф и другие факторы вирулентности *C. albicans*, и рассматривается в качестве терапевтической мишени для новых препаратов [47; 147]. Возможно также положительное влияние транскрипционного фактора *UPC2*, регулирующего преимущественно транскрипцию гена *ERG11*, на экспрессию генов *MDR1* и *CDR1* [128; 131]. Нарушение работы *UPC2* даже при наличии положительных мутаций в генах *TAC1*, *MRR1* и *ERG11* может приводить к значительному снижению МПК флуконазола [257].

Практически в половине случаев (45,5%) наблюдалось повышение экспрессии *CDR1*, *CDR2* и *ERG11*. Выявлена двусторонняя зависимость повышения экспрессии данных генов ($p < 0,05$). Кроме того, установлена зависимость одновременного повышения уровня экспрессии *CDR1*, *CDR2* при повышении уровня экспрессии гена *ERG11* ($p < 0,05$) и *ERG11*, *CDR1* при повышении уровня экспрессии гена *CDR2* ($p < 0,05$). В литературе встречаются случаи возникновения анеуплоидии левого плеча пятой хромосомы *C. albicans*, где находится *ERG11*, а также регулятор транскрипции *TAC1*, влияющий на экспрессию *CDR1* и *CDR2*, что ведет к одновременной повышенной экспрессии гена 14- α -диметилазы и эффлюксных насосов *CDR1* и *CDR2* [49; 224]. В то же время гены *PGA4*, *CHT2*, *CNB1*, и *MID1* на левом плече этой же хромосомы ассоциируются с устойчивостью к эхинокандинам. Таким образом, появление подобной перестройки может быть

механизмом множественной устойчивости к противогрибковым препаратам [230]. Также может играть роль транскрипционный фактор Ace2, который активирует гены *CDR1*, *CDR2*, *ERG11* и снижает экспрессию *MDR1* [192; 247].

Представляет интерес более подробное изучение механизмов повышения экспрессии указанных генов, расширение выборки наблюдений в целях уточнения результатов исследования. Кроме того, в настоящее время механизмы одновременной активации исследуемых генов до конца не изучены [119].

Нельзя также исключать вероятную роль прочих механизмов приобретенной устойчивости, таких как повышение экспрессии других, менее изученных переносчиков, мутации в гене *ERG11*, а также в факторах активации экспрессии генов, обеспечивающих устойчивость к противогрибковым препаратам, нарушение проницаемости клеточных мембран.

Ген *ERG11* был секвенирован у 18 штаммов *C. albicans*. Среди 7 штаммов выявлены мутации, приводящие к аминокислотным заменам, в большинстве своем связываемые с устойчивостью к азолам. В то же время, в нашей выборке не были обнаружены такие часто встречающиеся в литературе мутации, как Y132H и Y132F, T315A, S405F, что позволяет говорить об особенностях механизмов устойчивости у штаммов *Candida spp.* на территории Российской Федерации [43]. В то же время выявлены ранее описанные в литературе: E266D – у четырех штаммов, G464S – у двух штаммов, I471L – у одного штамма.

Широкое применение противогрибковых препаратов оказывает мощное давление на популяцию *C. albicans*, которое выражается в смещении в сторону устойчивости к противогрибковым препаратам. Это на практике проявляется в повышении МПК, в частности за счет выживания штаммов с мутациями в гене *ERG11*.

Тем не менее, в нашей выборке у четырех штаммов была выявлена мутация E266D, обеспечивающая заметное возрастание чувствительности к итраконазолу, более чем на 2 порядка. Это может быть связано с редким применением данного препарата для терапевтической практики конкретного контингента пациентов. В литературе встречаются противоречивые данные относительно влияния данной

мутации на устойчивость *C. albicans* к азолам [53; 76; 115; 183; 194]. В отдельных исследованиях данная мутация обеспечивала повышение МПК противогрибковых препаратов азолового ряда, в том числе итраконазола, но, в то же время, усиливала каталитическую активность фермента ланостерол 14 α -диметилазы. В том же исследовании отмечается пониженное влияние мутаций в *ERG11* на МПК итраконазола [244]. Итраконазол также, как и флуконазол является триазолом, но относится к длинноцепочечным азолам, что обычно обеспечивает его повышенную активность, но также, по-видимому, особенности, связанные с конкретными механизмами устойчивости. Хотя МПК итраконазола в высокой степени коррелирует с таковыми для другого длинноцепочечного триазола - позаконазола, а также вориконазола, флуконазола и даже анидулафунгина, подобных закономерностей в их отношении в нашей выборке не обнаружено. Интересна также выявленная взаимосвязь МПК анидулафунгина и каспофунгина среди штаммов с выявленной повышенной экспрессией: данные препараты относятся к одной группе - эхинокандинов, однако для каспофунгина не установлены критерии интерпретации МПК из-за значительной межлабораторной вариабельности результатов [114].

К тому же мутация V488I в нашей выборке ассоциировалась с отсутствием повышения экспрессии *ERG11*. Это может объясняться тем, что мутации в *ERG11* обеспечивают постоянное нарушение связывания с противогрибковыми препаратами, в то время как повышение экспрессии *ERG11* лишь обеспечивает повышение МПК пропорционально количеству фермента [236]. При отсутствии генетических изменений, приводящих к постоянной повышенной экспрессии *ERG11*, данный механизм, по-видимому, может не задействоваться без необходимости [128].

В то же время мутации D116E и V488I в некоторой степени ассоциировались с повышением экспрессии *CDR2*. Продукт *CDR2* является эффлюксным переносчиком, у этого гена есть общие механизмы регуляции экспрессии с *ERG11*, однако закономерности между его экспрессией и мутациями в *ERG11* в литературе не описаны и подлежат дальнейшему изучению [230].

Несмотря на то, что в нашей выборке не было выявлено взаимосвязей между различными мутациями в гене *ERG11*, сочетание мутаций, например E266D и G464S выявлялось ранее и связывалось с устойчивостью к азолам в Китае, США и других странах [208].

В предшествующих исследованиях мутации E266D, G464S, I471L и D116E связывают многократным повышением МПК флуконазола [208]. Аминокислотная замена I471L обнаружена у одного из первых исследованных устойчивых к азолам штаммов *C. albicans* – Дарлингтон (Darlington strain) [130].

В настоящем исследовании не встречались замены Y132H, F105L, K287R, G450E, R467K, выявленные исследователями во многих странах, что может быть связано с особенностями устойчивых штаммов *C. albicans* на территории Российской Федерации [88].

Эти данные могут помочь пролить свет на механизмы одновременной активации исследуемых генов. Исследования в этой области имеют значение для развития текущих протоколов назначения противогрибковой терапии и разработки новых противогрибковых препаратов.

Несмотря на то, что, по данным предварительного обследования включенных в исследование пациентов, на момент отбора образцов они не получали лекарственную терапию в отношении орофарингеального кандидоза, по результатам исследования можно предположить, что выявленные механизмы устойчивости являются следствием длительного, широкого, а порой и бесконтрольного применения азолов, в частности флуконазола. Кроме того, нельзя исключать опасность широкого распространения штаммов *Candida spp.* с приобретенной устойчивостью. Возможно приобретение устойчивости, выходящей за рамки спектра короткоцепочечных азолов. Подобные явления могут приводить к неэффективной терапии случаев инвазивного кандидоза дорогостоящими резервными препаратами.

Изложенные выше литературные данные не содержат привязки тех или иных механизмов резистентности к конкретным сиквенс-типам. В настоящем исследовании получены совокупные данные о выборке устойчивых к азолам

штаммов *C. albicans*, их сиквенс-типах и молекулярно-генетических механизмах устойчивости к противогрибковым препаратам.

Таким образом, в ходе исследования охарактеризованы структура популяции и биологические свойства штаммов *Candida spp.* у ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингеальным кандидозом в г. Москва.

ВЫВОДЫ

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

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

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

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

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

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

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

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

2. Для идентификации и выделения штаммов различных видов *Candida spp.* из смешанных культур предпочтительно использование хромогенных питательных сред в комплексе с такими методами как MALDI-TOF MS и ПЦР.

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

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

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

Целесообразно проведение более широкого и подробного исследования механизмов устойчивости к противогрибковым препаратам, которое может позволить получить данные, влияющие на рекомендации по индивидуальной терапии кандидозов.

Необходимым является объединение данных с результатами исследования клональной структуры популяции грибов рода *Candida*, что может быть значимым при исследовании и контроле распространения штаммов с приобретенной устойчивостью к противогрибковым препаратам и дальнейшей адаптации региональных рекомендаций по диагностике и лечению инфекций, вызванных данным возбудителем.

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ВИЧ – вирус иммунодефицита человека;
- ГФИ – гликозилфосфатидинозитол;
- МПК – минимальная подавляющая концентрация;
- МЛСТ – мультилокусное сиквенс-типирование;
- σ – стандартное отклонение;
- ABC – ATP-binding cassette (АТФ-связывающие кассетные транспортёры);
- BCIP – 5-бromo-6-хloro-3-индолил фосфат р-толуидиновой соли;
- CDR1* – *Candida* drug resistance 1;
- CDR2* – *Candida* drug resistance 2;
- CDC – Centers for Disease Control (центр по борьбе и профилактике болезней);
- FDA – управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США;
- flu1* – fluconazole resistance;
- m – базовые средние значения для чувствительных штаммов;
- MRSA – метициллин-резистентный золотистый стафилококк;
- MDR1* – multidrug resistance; и
- mrr1* – multidrug resistance regulator 1;
- MFS – Major-Facilitator superfamily (суперсемейство основных посредников);
- MLST – типирование на основе мультилокусных последовательностей;
- MUSCLE – Multiple Sequence Comparison by Log-expectation (множественное сравнение последовательностей по математическому ожиданию логарифма правдоподобия);
- NGS – высокопроизводительное секвенирование (next generation sequencing);
- PAMP – pathogen associated molecular pattern;
- RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA, случайно амплифицируемая полиморфная ДНК;
- X-NAG – 5-бром-4-хloro-3-индолил-бета-D-галактопиранозид.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александрова, Н. А. Взаимоотношения *Candida* с энтерококками на уровне вагинального биотопа / Н. А. Александрова, М. И. Заславская. – Текст : электронный // Проблемы Медицинской Микологии. – 2016. – Т. 18. – № 4. – С. 53-55. – URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=27686107> (дата обращения: 06.07.2023).
2. Андреевич, Р. И. Аннотация maldi-масс-спектров клеточной биомассы штаммов *Candida albicans* berkhout / Р. И. Андреевич, С. В.А., В. Н.В. – Текст : электронный // Проблемы медицинской микологии. – 2022. – Т. 24. – № 1. – С. 41-52. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/annotatsiya-maldi-mass-spektrov-kletochnoy-biomassy-shtamnov-candida-albicans-berkhout> (дата обращения: 12.05.2022).
3. Багирова, Н. С. Кандидемия у онкологических больных: особенности таксономической структуры / Н. С. Багирова, И. Н. Петухова, З. В. Григорьевская. – Текст : электронный // Клиническая Лабораторная Диагностика. – 2022. – Т. 67. – С. 399-406. – URL: <http://www.medlit.ru/journalsview/lab/view/journal/en/2022/issue-7/2616-candidemia-in-cancer-patients-features-of-the-taxonomic-structure> (дата обращения: 01.05.2023).
4. Беженар, М. Б. Механизмы развития резистентности к противогрибковым препаратам грибов рода *Candida* при рецидивирующем течении урогенитального кандидоза / М. Б. Беженар, К. И. Плахова. – Текст : электронный // Молекулярная Генетика, Микробиология И Вирусология. – 2020. – Т. 38. – № 1. – С. 15-23. – URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=42811927> (дата обращения: 11.12.2021).
5. Бузмакова, А. Л. Инвазивный Кандидоз У Недоношенных Новорожденных / А. Л. Бузмакова, Е. В. Шагдилеева. – Текст : электронный // Проблемы Медицинской Микологии. – 2022. – Т. 24. – № 2. – С. 51. – URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=48666039> (дата обращения: 20.04.2023).
6. Веселов, А. В. Инвазивный кандидоз: современные аспекты эпидемиологии, диагностики, терапии и профилактики у различных категорий пациентов (в вопросах и ответах) / А. В. Веселов, Р. С. Козлов. – Текст : электронный //

Клиническая Микробиология И Антимикробная Химиотерапия. – 2016. – Т. 18. – № S2. – С. 1-104. – URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=27025705> (дата обращения: 01.05.2023).

7. Веселов, А. В. Суспензия позаконазола у гематологических пациентов подросткового возраста. краткий обзор клинических данных / А. В. Веселов, Г. Г. Солопова. – Текст : электронный // Проблемы Медицинской Микологии. – 2021. – Т. 23. – № 3. – С. 13-28. – URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=47265431> (дата обращения: 01.05.2023).

8. ВИЧ-инфекция и СПИД: Национальное руководство. ВИЧ-инфекция и СПИД / В. В. Беляева, Е. В. Буравцова, Т. Н. Ермак, [и др.]. – Москва : Общество с ограниченной ответственностью Издательская группа «ГЭОТАР-Медиа», 2020. – 696 с. – URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=44858250> (дата обращения: 25.04.2022). – Текст : электронный.

9. Влияние антимикотической терапии на видовой и штаммовый состав грибов рода *Candida* полости рта больных ВИЧ-инфекцией / Ю. С. Филина, А. И. Шатохин, Е. В. Волчкова [и др.]. – Текст : электронный // Стоматология. – 2018. – Т. 97. – № 6. – С. 28-33. – URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=36647239> (дата обращения: 09.07.2022).

10. Встречаемость грибов рода *Candida* в разных биотопах у ВИЧ-инфицированных. / Д. А. Оборин, Т. А. Варецкая, Л. П. Быкова [и др.]. – Текст : электронный. – Санкт-Петербургская общественная организация «Человек и его здоровье», 2016. – С. 128-129. – URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=26509505> (дата обращения: 09.07.2022).

11. Герасимов, А. Н. Параметрические и непараметрические методы в медицинской статистике / А. Н. Герасимов. – Текст : электронный // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2015. – Т. 14. – № 5. – С. 6-12. – URL: <https://www.epidemvac.ru/jour/article/view/65> (дата обращения: 05.01.2023).

12. Диагностика и лечение инвазивных микозов: современные рекомендации / Н. В. Васильева, Н. Н. Климко, В. А. Цинзерлинг [и др.]. – Текст : непосредственный // Вестник Санкт-Петербургской медицинской академии

последипломного образования. – 2010. – С. 5-18.

13. Заславская, М. И. Нейтрофил-Стимулирующая Активность Дрожжевой И Гифальной Форм *Candida Albicans* (robin) Berkhout / М. И. Заславская, А. Н. Маянский. – Текст : электронный // Проблемы Медицинской Микологии. – 2006. – Т. 8. – № 3. – С. 40-44. – URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=18055355> (дата обращения: 16.05.2023).

14. Захарова, Ю. В. Взаимодействие грибов рода *Candida* с условно-патогенными бактериями при ВИЧ-инфекции / Ю. В. Захарова. – Текст : электронный // Успехи Медицинской Микологии. – 2016. – Т. 15. – URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=26481284> (дата обращения: 09.07.2022).

15. Захарова, Ю. В. Характеристика грибов рода *Candida*, изолированных от ВИЧ-инфицированных детей / Ю. В. Захарова. – Текст : электронный // Успехи Медицинской Микологии. – 2014. – Т. 13. – С. 290-292. – URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=22741869> (дата обращения: 09.07.2022).

16. Иванова, Л. В. Резистентность грибов-патогенов к антимикотикам / Л. В. Иванова, Е. П. Баранцевич, Е. В. Шляхто. – Текст : электронный // Проблемы Медицинской Микологии. – 2011. – Т. 13. – № 1. – С. 14-17. – URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=16038211> (дата обращения: 01.05.2023).

17. Инвазивный Кандидоз У Новорожденных В Санкт-Петербурге: Описание Клинического Случая И Результаты Проспективного Исследования / Е. В. Шагдилеева, Р. Р. Файзуллина, О. А. Белова [и др.]. – Текст : электронный // Проблемы Медицинской Микологии. – 2019. – Т. 21. – № 4. – С. 17-23. – URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=41575256> (дата обращения: 12.03.2023).

18. Инвазивный кандидоз у пациентов с COVID-19 в России / О. П. Козлова, А. В. Сатурнов, Д. А. Гусев [и др.]. – Текст : электронный // Проблемы Медицинской Микологии. – 2022. – Т. 24. – № 2. – С. 1. – URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=48666106> (дата обращения: 16.09.2022).

19. Кандидемия у онкологических больных: фенотипические и молекулярно-генетические характеристики резистентности к противогрибковым лекарственным средствам, гены факторов патогенности *Candida spp.* / Н. С. Багирова, Е. А.

Горемыкина, П. В. Слукин [и др.]. – Текст : электронный // Сибирский онкологический журнал. – 2022. – Т. 21. – № 3. – С. 70-80. – URL: <https://www.siboncoj.ru/jour/article/view/2165> (дата обращения: 04.07.2022).

20. Караев, З. О. Нозокомиальные микозы: состояние и перспективы решения проблемы / З. О. Караев. – Текст : электронный // Проблемы Медицинской Микологии. – 2007. – Т. 9. – № 3. – С. 21-23. – URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=18028399> (дата обращения: 01.05.2023).

21. Климко, Н. Н. Микотический сепсис. / Н. Н. Климко. – Текст : электронный // Сепсис: избранные вопросы диагностики и лечения. – Москва : Издательский дом «АБВ-пресс», 2018. – С. 416. – URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=35238168> (дата обращения: 14.11.2021).

22. Лечение кандидемий, вызванных *Candida albicans* и *Candida non-albicans*, у больных с опухолями системы крови / Г. А. Клясова, А. О. Мальчикова, К. С. Тандилова [и др.]. – Текст : электронный // Терапевтический Архив. – 2019. – Т. 91. – № 8. – С. 84-92. – URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=39212885> (дата обращения: 23.07.2022).

23. Медико-социальная характеристика больных туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией, на этапе оказания специализированной стационарной помощи / А. И. Щелканова, М. В. Сеницын, Н. И. Чистякова [и др.]. – Текст : электронный // Инфекционные Болезни: Новости, Мнения, Обучение. – 2019. – Т. 8. – № 1 (28). – С. 40-46. – URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=37254879> (дата обращения: 20.04.2023).

24. Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии. Клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» / Р. С. Козлов, М. В. Сухорукова, М. В. Эйдельштейн, [и др.]. – 2021. – URL: <https://www.antibiotic.ru/files/321/clrec-dsma2021.pdf> (дата обращения: 05.01.2023). – Текст : электронный.

25. Микробиоценоз кишечника детей на разных стадиях ВИЧ-инфекции / Ю. В. Захарова, А. С. Быков, А. Ю. Нуртазина [и др.]. – Текст : электронный //

Иммунопатология, Аллергология, Инфектология. – 2020. – № 2. – URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=44093777> (дата обращения: 09.07.2022).

26. Мозжерова, М. А. Видовой спектр дрожжевых грибов *Candida* у ВИЧ-инфицированных пациентов Брянской области / М. А. Мозжерова, В. Е. Колупаев. – Текст : электронный // Успехи Медицинской Микологии. – 2017. – Т. 17. – С. 187-191. – URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=29972976> (дата обращения: 09.07.2022).

27. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению ВИЧ - инфекции у взрослых / А. И. Мазус, Г. Д. Каминский, В. Н. Зимина, [и др.]. – Москва, 2014. – URL: [https://mosgorzdrav.ru/uploads/imperavi/RU/клинические%20рекомендации%20\(взрослые\).pdf](https://mosgorzdrav.ru/uploads/imperavi/RU/клинические%20рекомендации%20(взрослые).pdf) (дата обращения: 29.09.2018). – Текст : электронный.

28. Попов, С. В. Анализ регуляторных Т-лимфоцитов при грибковых инфекциях / С. В. Попов, И. Ю. Шмельков, С. В. Хайдуков. – Текст : электронный // Медицинская иммунология. – 2020. – Т. 22. – № 6. – С. 1055-1064. – URL: <https://www.mimmun.ru/mimmun/article/view/2047> (дата обращения: 14.11.2021).

29. Разработка методики на основе количественной мультиплексной ПЦР для диагностики вульвовагинального кандидоза / Ю. А. Савочкина, Т. А. Румянцева, Т. И. Долгова, А. Е. Гушин. – Текст : электронный // Клиническая Лабораторная Диагностика. – 2015. – Т. 60. – № 4. – С. 56-62. – URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=23405314> (дата обращения: 10.01.2023).

30. Роль клеток-регуляторов CD4⁺CD25⁺ в развитии хронических инфекционных заболеваний / А. А. Воробьев, С. И. Быковская, Е. П. Пашков, А. С. Быков. – Текст : электронный // Вестник Российской Академии Медицинских Наук. – 2006. – № 9-10. – С. 24-29. – URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=9313047> (дата обращения: 11.11.2022).

31. Роль межмикробных взаимодействий *Candida spp.* при патологии опорно-двигательного аппарата у детей / О. В. Бухарин, Н. Б. Перунова, О. Е. Челпаченко [и др.]. – Текст : электронный // Проблемы медицинской микологии. – 2013. – Т. 15. – № 3. – С. 14-17. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/rol-mezhmikrobnyh-vzaimodeystviy-candida-spp-pri-patologii-oporno-dvigatel'nogo-apparata-u-detey> (дата

обращения: 25.06.2023).

32. СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней (в ред. N 4 от 25.05.2022, утверждены Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 28.01.2021). – Роспотребнадзор РФ, 2021. – URL: (дата обращения: 19.04.2023). – Текст : электронный.

33. Сочетанные вторичные заболевания у ВИЧ-инфицированных больных / С. Л. Вознесенский, Т. Н. Ермак, Г. М. Кожевникова, Е. В. Абрамова. – Текст : электронный // Инфекционные Болезни. – 2022. – Т. 20. – № 2. – С. 97-103. – URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=49354938> (дата обращения: 16.11.2022).

34. Филина, Ю. С. Характеристика грибов рода *Candida*, выявляемых у ВИЧ-инфицированных пациентов: : специальность 14.09.01- инфекционные болезни: дис. на соиск. уч. степ. к-та мед. наук / / Филина Юлия Сергеевна. ; ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) – Москва , 2018. – 119 с, — Место защиты : ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). – Текст : непосредственный.

35. Щемерова, М. С. Чувствительность грибов рода *Candida*, выявленных у ВИЧ-инфицированных пациентов, имеющих хроническую инфекционно-воспалительную патологию ЛОР-органов / М. С. Щемерова, П. А. Затолока. – Текст : электронный // Оториноларингология. Восточная Европа. – 2014. – № 2 (15). – С. 69-73. – URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=21672360> (дата обращения: 09.07.2022).

36. Эпидемиологическое расследование вспышки кандидемий, вызванной *C. parapsilosis*, в центре детской гематологии/онкологии / О. С. Кожушная, Г. Г. Солопова, А. Д. Воропаев [и др.]. – Текст : электронный // Клиническая Микробиология И Антимикробная Химиотерапия. – 2020. – Т. 22. – № 4. – С. 266-270. – URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=44831780> (дата обращения: 05.01.2023).

37. Эпидемиолого-микробиологическая характеристика культур *Candida*

albicans, циркулирующих в стационаре для ВИЧ-инфицированных пациентов / М. В. Кузнецова, И. П. Чарушина, А. В. Максимова [и др.]. – Текст : электронный // Клиническая Лабораторная Диагностика. – 2017. – Т. 62. – № 4. – URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=28945828> (дата обращения: 09.07.2022).

38. A Clinical Isolate of *Candida albicans* with Mutations in *ERG11* (Encoding Sterol 14 α -Demethylase) and *ERG5* (Encoding C22 Desaturase) Is Cross Resistant to Azoles and Amphotericin B / С. М. Martel, J. E. Parker, O. Bader [et al.]. – Text : electronic // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2010. – Vol. 54. – № 9. – P. 3578-3583. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.00303-10> (date accessed: 01.05.2023).

39. A Nonsense Mutation in the *ERG6* Gene Leads to Reduced Susceptibility to Polyenes in a Clinical Isolate of *Candida glabrata* / P. Vandeputte, G. Tronchin, G. Larcher [et al.]. – Text : electronic // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2008. – Vol. 52. – № 10. – P. 3701-3709. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.00423-08> (date accessed: 08.09.2022).

40. A predominant genotype of azole-resistant *Candida tropicalis* clinical strains / K.-Y. Tseng, Y.-C. Liao, F.-C. Chen [et al.]. – Text : electronic // The Lancet Microbe. – 2022. – Vol. 3. – № 9. – P. 646. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2666524722001793> (date accessed: 13.01.2023).

41. AIDS-Related Mycoses: Updated Progress and Future Priorities / J. C. Hoving, G. D. Brown, B. L. Gómez [et al.]. – Text : electronic // Trends in Microbiology. – 2020. – Vol. 28. – № 6. – P. 425-428. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X20300111> (date accessed: 20.07.2021).

42. Al-Baqсами, Z. F. Antifungal drug susceptibility, molecular basis of resistance to echinocandins and molecular epidemiology of fluconazole resistance among clinical *Candida glabrata* isolates in Kuwait / Z. F. Al-Baqсами, S. Ahmad, Z. Khan. – Text : electronic // Scientific Reports. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 6238. – URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-63240-z> (date accessed: 13.03.2023).

43. Amino Acid Substitutions in the Cytochrome P-450 Lanosterol 14 α -Demethylase (CYP51A1) from Azole-Resistant *Candida albicans* Clinical Isolates Contribute to Resistance to Azole Antifungal Agents / D. Sanglard, F. Ischer, L. Koymans, J. Bille. – Text : electronic // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1998. – Vol. 42. – № 2. – P. 241-253. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.42.2.241> (date accessed: 01.05.2023).

44. Amino acid variations of cytochrome P-450 lanosterol 14 alpha-demethylase (CYP51A1) from fluconazole resistant clinical isolates of *Candida albicans* / E. K. Manavathu, S. Kallakuri, M. T. Arganoza, J. A. Vázquez. – Text : electronic // Revista Iberoamericana De Micologia. – 1999. – Vol. 16. – № 4. – P. 198-203. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18473547/> (date accessed: 05.01.2023).

45. Analysis of global antifungal surveillance results reveals predominance of Erg11 Y132F alteration among azole-resistant *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* and country-specific isolate dissemination / M. Castanheira, L. M. Deshpande, S. A. Messer [et al.]. – Text : electronic // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2020. – Vol. 55. – № 1. – P. 105799. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857919302468> (date accessed: 12.03.2023).

46. Ansari, M. A. Cellular energy status is indispensable for perillyl alcohol mediated abrogated membrane transport in *Candida albicans* / M. A. Ansari, Z. Fatima, S. Hameed. – Text : electronic // ADMET and DMPK. – 2017. – Vol. 5. – № 2. – P. 126. – URL: <http://www.pub.iapchem.org/ojs/index.php/admet/article/view/388> (date accessed: 12.03.2023).

47. Anti-EFG1 2'-OMethylRNA oligomer inhibits *Candida albicans* filamentation and attenuates the candidiasis in *Galleria mellonella* / D. Araújo, D. Mil-Homens, M. Henriques, S. Silva. – Text : electronic // Molecular Therapy - Nucleic Acids. – 2022. – Vol. 27. – P. 517-523. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2162253121003218> (date accessed: 10.01.2023).

48. Antifungal Activity, Structural Stability, and Immunomodulatory Effects on

Human Immune Cells of Defensin from the Lentil *Lens culinaris* / E. Finkina, I. Bogdanov, A. Ignatova [et al.]. – Text : electronic // Membranes. – 2022. – Vol. 12. – № 9. – P. 855-872. – URL: <https://www.mdpi.com/2077-0375/12/9/855> (date accessed: 02.09.2022).

49. Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond / Y. Lee, E. Puumala, N. Robbins, L. E. Cowen. – Text : electronic // Chemical Reviews. – 2021. – Vol. 121. – № 6. – P. 3390-3411. – URL: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrev.0c00199> (date accessed: 12.03.2023).

50. Antifungal Susceptibility of Clinical Yeast Isolates from a Large Canadian Reference Laboratory and Application of Whole-Genome Sequence Analysis To Elucidate Mechanisms of Acquired Resistance / L. R. McTaggart, A. Cabrera, K. Cronin, J. V. Kus. – Text : electronic // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2020. – Vol. 64. – № 9. – P. 1-18. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.00402-20> (date accessed: 10.04.2022).

51. Antifungal susceptibility testing identifies the abdominal cavity as a source of *Candida glabrata*-resistant isolates / J. Díaz-García, A. Mesquida, A. Gómez [et al.]. – Text : electronic // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2021. – Vol. 65. – № 12. – P. 1-11. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.01249-21> (date accessed: 01.03.2023).

52. Antifungal susceptibility testing in *Candida*, *Aspergillus* and *Cryptococcus* infections: are the MICs useful for clinicians? / M. Bassetti, A. Vena, E. Bouza [et al.]. – Text : electronic // Clinical Microbiology and Infection. – 2020. – Vol. 26. – № 8. – P. 1024-1033. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X20300999> (date accessed: 30.08.2021).

53. Application of Real-Time Quantitative PCR to Molecular Analysis of *Candida albicans* Strains Exhibiting Reduced Susceptibility to Azoles / A. S. Chau, C. A. Mendrick, F. J. Sabatelli [et al.]. – Text : electronic // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2004. – Vol. 48. – № 6. – P. 2124-2131. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.48.6.2124-2131.2004> (date accessed: 02.09.2022).

12.03.2023).

54. Are *Candida albicans* isolates from the oral cavity of HIV-infected patients more virulent than from non-HIV-infected patients? Systematic review and meta-analysis / R. K. Orlandini, D. A. N. Bepu, M. da C. P. Saraiva [et al.]. – Text : electronic // Microbial Pathogenesis. – 2020. – Vol. 149. – P. 104477. – URL: (date accessed: 06.08.2021).

55. Arendrup, M. C. Multidrug-Resistant *Candida*: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment / M. C. Arendrup, T. F. Patterson. – Text : electronic // The Journal of Infectious Diseases. – 2017. – Vol. 216. – № suppl_3. – P. S445-S451. – URL: http://academic.oup.com/jid/article/216/suppl_3/S445/4107052/MultidrugResistant-Candida-Epidemiology-Molecular (date accessed: 29.09.2018).

56. Arendrup, M. C. Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida* / M. C. Arendrup. – Text : electronic // Clinical Microbiology and Infection. – 2014. – Vol. 20. – P. 42-48. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14603311> (date accessed: 01.05.2023).

57. Atlas of clinical fungi. Atlas of clinical fungi. Volume 1 / G. S. de Hoog, J. Guarro Safont, J. Gené, S. A. Ahmed. – 4th edition. – Westerdijk : Fungalbio Diversity Institute, 2020. – 779 p. – URL: <https://www.clinicalfungi.org> (date accessed: 25.04.2023). – Text : electronic.

58. Azole Resistance in *Candida glabrata* Clinical Isolates from Global Surveillance is Associated with Efflux Overexpression / M. Castanheira, L. M. Deshpande, A. P. Davis [et al.]. – Text : electronic // Journal of Global Antimicrobial Resistance. – 2022. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213716522001084> (date accessed: 17.05.2022).

59. Badali, H. Antifungal Resistance Testing and Implications for Management / H. Badali, N. P. Wiederhold. – Text : electronic // Current Fungal Infection Reports. – 2019. – Vol. 13. – № 4. – P. 274-283. – URL: <https://doi.org/10.1007/s12281-019-00354-6> (date accessed: 28.09.2021).

60. Beena, M. S. Characterization and Virulence of *Candida* Isolated from Children with Dental Caries and Its Susceptibility to Various Antimicrobial Agents / M. S. Beena.

– Text : electronic // Dental Caries / ed. E. Zabokova Bilbilova. – IntechOpen, 2021. – P. 20. – URL: <https://www.intechopen.com/books/dental-caries/characterization-and-virulence-of-em-candida-em-isolated-from-children-with-dental-caries-and-its-su> (date accessed: 20.12.2022).

61. Berkow, E. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective / E. Berkow, S. Lockhart. – Text : electronic // Infection and Drug Resistance. – 2017. – Vol. 10. – P. 237-245. – URL: <https://www.dovepress.com/fluconazole-resistance-in-candida-species-a-current-perspective-peer-reviewed-article-IDR> (date accessed: 13.03.2023).

62. Bhattacharya, S. Candidiasis and Mechanisms of Antifungal Resistance / S. Bhattacharya, S. Sae-Tia, B. C. Fries. – Text : electronic // Antibiotics. – 2020. – Vol. 9. – № 6. – P. 312. – URL: <https://www.mdpi.com/2079-6382/9/6/312> (date accessed: 25.08.2021).

63. Billmyre, R. B. Drug resistance and evolvability in an emerging human fungal pathogen / R. B. Billmyre. – Text : electronic // mBio. – 2022. – Vol. 13. – № 5. – P. 1-4. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mbio.01876-22> (date accessed: 13.01.2023).

64. Biofilm formation is a risk factor for mortality in patients with *Candida albicans* bloodstream infection-Scotland, 2012-2013 / R. Rajendran, L. Sherry, C. J. Nile [et al.]. – Text : electronic // Clinical Microbiology and Infection. – 2016. – Vol. 22. – № 1. – P. 87-93. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X15008757> (date accessed: 01.05.2023).

65. Biofilm of *Candida albicans* : formation, regulation and resistance / R. Pereira, R. O. Santos Fontenelle, E. H. S. Brito, S. M. Morais. – Text : electronic // Journal of Applied Microbiology. – 2021. – Vol. 131. – № 1. – P. 11-22. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jam.14949> (date accessed: 02.04.2022).

66. Bonacini, M. The causes of esophageal symptoms in human immunodeficiency virus infection. A prospective study of 110 patients / M. Bonacini, T. Young, L. Laine. – Text : electronic // Archives of Internal Medicine. – 1991. – Vol. 151. – № 8. – P. 1567-1572. – URL: <https://doi.org/10.1001/archinte.1991.00400080067012> (date accessed:

01.05.2023).

67. Bougnoux, M.-E. Usefulness of multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans* / M.-E. Bougnoux, S. Morand, C. d'Enfert. – Text : electronic // Journal of Clinical Microbiology. – 2002. – Vol. 40. – № 4. – P. 1290-1297. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.40.4.1290-1297.2002> (date accessed: 01.05.2023).

68. *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update / M. Dadar, R. Tiwari, K. Karthik [et al.]. – Text : electronic // Microbial Pathogenesis. – 2018. – Vol. 117. – P. 128-138. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401017317175> (date accessed: 01.05.2023).

69. *Candida albicans* biofilms and polymicrobial interactions / N. O. Ponde, L. Lortal, G. Ramage [et al.]. – Text : electronic // Critical Reviews in Microbiology. – 2021. – Vol. 47. – № 1. – P. 91-111. – URL: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/1040841X.2020.1843400> (date accessed: 02.04.2022).

70. *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa / M. M. Harriott, E. A. Lilly, T. E. Rodriguez [et al.]. – Text : electronic // Microbiology. – 2010. – Vol. 156. – № 12. – P. 3635-3644. – URL: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.039354-0> (date accessed: 12.03.2023).

71. *Candida auris* on apples: diversity and clinical significance / A. Yadav, K. Jain, Y. Wang [et al.]. – Text : electronic // mBio. – 2022. – P. 518-522. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mbio.00518-22> (date accessed: 04.04.2022).

72. *Candida krusei* , a Multidrug-Resistant Opportunistic Fungal Pathogen: Geographic and Temporal Trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005 / M. A. Pfaller, D. J. Diekema, D. L. Gibbs [et al.]. – Text : electronic // Journal of Clinical Microbiology. – 2008. – Vol. 46. – № 2. – P. 515-521. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.01915-07> (date accessed: 01.05.2023).

73. Cavalheiro, M. In the Crossroad Between Drug Resistance and Virulence in

Fungal Pathogens / M. Cavaleiro, M. C. Teixeira. – Text : electronic // Stress Response Mechanisms in Fungi: Theoretical and Practical Aspects / ed. M. Skoneczny. – Cham : Springer International Publishing, 2018. – P. 223-259. – URL: https://doi.org/10.1007/978-3-030-00683-9_7 (date accessed: 11.10.2021).

74. Cdr1p highlights the role of the non-hydrolytic ATP-binding site in driving drug translocation in asymmetric ABC pumps / A. Banerjee, A. Moreno, M. F. Khan [et al.]. – Text : electronic // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. – 2020. – Vol. 1862. – № 2. – P. 183131. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273619302792> (date accessed: 28.09.2021).

75. Černáková, L. Microbial interactions and immunity response in oral *Candida* species / L. Černáková, C. F. Rodrigues. – Text : electronic // Future Microbiology. – 2020. – Vol. 15. – № 17. – P. 1653-1677. – URL: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb-2020-0113> (date accessed: 01.03.2023).

76. Cernicka, J. Resistance mechanisms in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates from vaginal candidiasis / J. Cernicka, J. Subik. – Text : electronic // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2006. – Vol. 27. – № 5. – P. 403-408. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857906000562> (date accessed: 01.05.2023).

77. Chamilos, G. Call for Action: Invasive Fungal Infections Associated With Ibrutinib and Other Small Molecule Kinase Inhibitors Targeting Immune Signaling Pathways / G. Chamilos, M. S. Lionakis, D. P. Kontoyiannis. – Text : electronic // Clinical Infectious Diseases. – 2018. – Vol. 66. – № 1. – P. 140-148. – URL: <https://academic.oup.com/cid/article/66/1/140/4237395> (date accessed: 01.05.2023).

78. Characterisation of *Candida parapsilosis* CYP51 as a Drug Target Using *Saccharomyces cerevisiae* as Host / Y. N. Ruma, M. V. Keniya, J. D. A. Tyndall, B. C. Monk. – Text : electronic // Journal of Fungi. – 2022. – Vol. 8. – № 1. – P. 69. – URL: <https://www.mdpi.com/2309-608X/8/1/69> (date accessed: 01.04.2022).

79. Characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate / H.

vanden Bossche, P. Marichal, F. C. Odds [et al.]. – Text : electronic // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1992. – Vol. 36. – № 12. – P. 2602-2610. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.36.12.2602> (date accessed: 12.03.2023).

80. Characterization of oral candidiasis and the *Candida* species profile in patients with oral mucosal diseases / L. Hu, C. He, C. Zhao [et al.]. – Text : electronic // Microbial Pathogenesis. – 2019. – Vol. 134. – P. 103575. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401019302979> (date accessed: 12.03.2023).

81. Clinical microbiology procedures handbook / eds. L. S. Garcia, H. D. Isenberg. – 3. – Washington, DC : ASM Press, 2010. – 2540 p. – URL: <https://www.clinmicronow.org/doi/book/10.1128/9781683670438.CMPH> (date accessed: 07.12.2018). – Text : electronic.

82. Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans* / M.-E. Bounoux, A. Tavanti, C. Bouchier [et al.]. – Text : paper // Journal of Clinical Microbiology. – 2003. – Vol. 41. – № 11. – P. 5265-5266.

83. Collateral consequences of agricultural fungicides on pathogenic yeasts: A One Health perspective to tackle azole resistance / D. Castelo-Branco, S. R. Lockhart, Y. Chen [et al.]. – Text : electronic // Mycoses. – 2022. – Vol. 65. – № 3. – P. 303-311. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/myc.13404> (date accessed: 01.03.2023).

84. Colombo, A. L. Emerging multidrug-resistant *Candida* species: / A. L. Colombo, J. N. de A. Júnior, J. Guinea. – Text : electronic // Current Opinion in Infectious Diseases. – 2017. – Vol. 30. – № 6. – P. 528-538. – URL: <http://journals.lww.com/00001432-201712000-00004> (date accessed: 02.04.2022).

85. Comparative Efficacy and Safety of Antifungal Agents in the Prophylaxis of Oropharyngeal Candidiasis among HIV-Infected Adults: A Systematic Review and Network Meta-Analysis / S. G. Rajadurai, M. K. Maharajan, S. K. Veetil, D. Gopinath. – Text : electronic // Life. – 2022. – Vol. 12. – № 4. – P. 515. – URL: <https://www.mdpi.com/2075-1729/12/4/515> (date accessed: 05.04.2022).

86. Comparison of the Sensititre YeastOne® dilution method with the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3 microbroth dilution reference method for

determining MIC of eight antifungal agents on 102 yeast strains : *Infectiologie - Bactériologie - Parasitologie* / S. Bertout, C. Dunyach, P. Drakulovski [et al.]. – Text : electronic // *Pathologie Biologie*. – 2011. – Vol. 59. – № 1. – P. 48-51. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0369811410001094> (date accessed: 10.11.2022).

87. Comparison of Two Commercial Colorimetric Broth Microdilution Tests for *Candida* Susceptibility Testing: Sensititre YeastOne versus MICRONAUT-AM / S. Philips, F. Van Hoecke, E. De Laere [et al.]. – Text : electronic // *Journal of Fungi*. – 2021. – Vol. 7. – № 5. – P. 356. – URL: <https://www.mdpi.com/2309-608X/7/5/356> (date accessed: 01.05.2023).

88. Contribution of Clinically Derived Mutations in *ERG11* to Azole Resistance in *Candida albicans* / S. A. Flowers, B. Colón, S. G. Whaley [et al.]. – Text : electronic // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2015. – Vol. 59. – № 1. – P. 450-460. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.03470-14> (date accessed: 01.05.2023).

89. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14alpha-demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans* / P. Marichal, L. Koymans, S. Willemsens [et al.]. – Text : electronic // *Microbiology*. – 1999. – Vol. 145. – № 10. – P. 2701-2713. – URL: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-145-10-2701> (date accessed: 01.05.2023).

90. Coronavirus Disease 2019–Associated Invasive Fungal Infection / J. W. Baddley, G. R. Thompson, S. C.-A. Chen [et al.]. – Text : electronic // *Open Forum Infectious Diseases*. – 2021. – Vol. 8. – № 12. – URL: <https://academic.oup.com/ofid/article/doi/10.1093/ofid/ofab510/6429240> (date accessed: 08.12.2021).

91. Cottier, F. Face/off: the interchangeable side of *Candida albicans* / F. Cottier, R. A. Hall. – Text : electronic // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2020. – Vol. 9. – P. 471. – URL: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2019.00471/full> (date accessed: 13.03.2023).

92. *Cutibacterium acnes* protects *Candida albicans* from the effect of micafungin in biofilms / C. Bernard, N. Renaudeau, M.-L. Mollichella [et al.]. – Text : electronic // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2018. – Vol. 52. – № 6. – P. 942-946. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857918302358> (date accessed: 01.05.2023).

93. CYP51 Parologue Structure Is Associated with Intrinsic Azole Resistance in Fungi / N. Van Rhijn, M. Bromley, M. Richardson, P. Bowyer. – Text : electronic // mBio. – 2021. – Vol. 12. – № 5. – P. 1-7. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.01945-21> (date accessed: 13.01.2023).

94. Deciphering azole resistance mechanisms with a focus on transcription factor-encoding genes TAC1, MRR1 and UPC2 in a set of fluconazole-resistant clinical isolates of *Candida albicans* / F. Morio, F. Pagniez, M. Besse [et al.]. – Text : electronic // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2013. – Vol. 42. – № 5. – P. 410-415. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857913002720> (date accessed: 01.05.2023).

95. Declining Incidence of Candidemia and the Shifting Epidemiology of Candida Resistance in Two US Metropolitan Areas, 2008–2013: Results from Population-Based Surveillance / A. A. Cleveland, L. H. Harrison, M. M. Farley [et al.]. – Text : electronic // PLOS ONE. – 2015. – Vol. 10. – № 3. – P. 1-12. – URL: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0120452> (date accessed: 01.03.2023).

96. Demirci-Duarte, S. Species distribution, azole resistance and related molecular mechanisms in invasive *Candida parapsilosis* complex isolates: Increase in fluconazole resistance in 21 years / S. Demirci-Duarte, S. Arikan-Akdagli, D. Gülmez. – Text : electronic // Mycoses. – 2021. – Vol. 64. – № 8. – P. 823-830. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/myc.13296> (date accessed: 07.09.2022).

97. Derkacz, D. K143R Amino Acid Substitution in 14- α -Demethylase (Erg11p) Changes Plasma Membrane and Cell Wall Structure of *Candida albicans* / D. Derkacz, P. Bernat, A. Krasowska. – Text : electronic // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23. – № 3. – P. 1631. – URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/3/1631> (date accessed: 17.02.2022).

98. Detection of *ERG11* Overexpression in *Candida albicans* isolates from environmental sources and clinical isolates treated with inhibitory and subinhibitory concentrations of fluconazole / J. M. V. Oliveira, J. C. Oliver, A. L. T. Dias [et al.]. – Text : electronic // Mycoses. – 2021. – Vol. 64. – № 2. – P. 220-227. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/myc.13208> (date accessed: 17.06.2021).

99. Development of a Real-Time Polymerase Chain Reaction Method for the Identification of *Candida* Species / H. Ağca, B. Dalyan CiLo, G. E. ÖzmerdiVen [et al.]. – Text : electronic // Mikrobiyoloji Bulteni. – 2015. – Vol. 49. – № 1. – P. 56-65. – URL: <http://www.mikrobiyolbul.org/linkout.aspx?pmid=25706731> (date accessed: 03.05.2023).

100. Directed Mutational Strategies Reveal Drug Binding and Transport by the MDR Transporters of *Candida albicans* / A. Banerjee, J. Pata, S. Sharma [et al.]. – Text : electronic // Journal of Fungi. – 2021. – Vol. 7. – № 2. – P. 68. – URL: <https://www.mdpi.com/2309-608X/7/2/68> (date accessed: 26.07.2021).

101. Do multiple drug resistance transporters interfere with cell functioning under normal conditions? / D. A. Knorre, K. V. Galkina, T. Shirokovskikh [et al.]. – Text : electronic // Biochemistry (Moscow). – 2020. – Vol. 85. – № 12. – P. 1560-1569. – URL: <https://doi.org/10.1134/S0006297920120081> (date accessed: 17.10.2021).

102. El-Kamand, S. The Use of Whole Genome and Next-Generation Sequencing in the Diagnosis of Invasive Fungal Disease / S. El-Kamand, A. Papanicolaou, C. O. Morton. – Text : electronic // Current Fungal Infection Reports. – 2019. – Vol. 13. – № 4. – P. 284-291. – URL: <https://doi.org/10.1007/s12281-019-00363-5> (date accessed: 28.09.2021).

103. Emergence of fluconazole-resistant strains of *Candida albicans* in patients with recurrent oropharyngeal candidosis and human immunodeficiency virus infection. / M. Ruhnke, A. Eigler, I. Tennagen [et al.]. – Text : electronic // Journal of Clinical Microbiology. – 1994. – Vol. 32. – № 9. – P. 2092. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC263948/> (date accessed: 23.10.2021).

104. Emerging issue of fluconazole-resistant candidemia in a tertiary care hospital of southern Italy: time for antifungal stewardship program / D. F. Bavaro, F. Balena, L.

Ronga [et al.]. – Text : electronic // Journal of Medical Mycology. – 2022. – Vol. 32. – № 1. – P. 101206. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1156523321000962> (date accessed: 13.01.2023).

105. Engineered Control of Cell Morphology In Vivo Reveals Distinct Roles for Yeast and Filamentous Forms of *Candida albicans* during Infection / S. P. Saville, A. L. Lazzell, C. Monteagudo, J. L. Lopez-Ribot. – Text : electronic // Eukaryotic Cell. – 2003. – Vol. 2. – № 5. – P. 1053-1060. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/EC.2.5.1053-1060.2003> (date accessed: 01.05.2023).

106. Environmental Clonal Spread of Azole-Resistant *Candida parapsilosis* with Erg11-Y132F Mutation Causing a Large Candidemia Outbreak in a Brazilian Cancer Referral Center / D. Y. Thomaz, J. N. de Almeida, O. N. E. Sejas [et al.]. – Text : electronic // Journal of Fungi. – 2021. – Vol. 7. – № 4. – P. 259. – URL: <https://www.mdpi.com/2309-608X/7/4/259> (date accessed: 01.04.2022).

107. Epigenetic mechanisms of drug resistance in fungi / Z. Chang, V. Yadav, S. C. Lee, J. Heitman. – Text : electronic // Fungal Genetics and Biology. – 2019. – Vol. 132. – P. 103253. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S108718451930163X> (date accessed: 13.03.2023).

108. Epigenetic Regulation of Antifungal Drug Resistance / S. Patra, M. Raney, A. Pareek, R. Kaur. – Text : electronic // Journal of Fungi. – 2022. – Vol. 8. – № 8. – P. 875. – URL: <https://www.mdpi.com/2309-608X/8/8/875> (date accessed: 26.08.2022).

109. Epstein, J. B. Oral Candidiasis: Pathogenesis and Host Defense / J. B. Epstein, E. L. Truelove, K. T. Izutzu. – Text : electronic // Clinical Infectious Diseases. – 1984. – Vol. 6. – № 1. – P. 96-106. – URL: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/clinids/6.1.96> (date accessed: 01.05.2023).

110. *ERG6* and *ERG2* Are Major Targets Conferring Reduced Susceptibility to Amphotericin B in Clinical *Candida glabrata* Isolates in Kuwait / S. Ahmad, L. Joseph, J. E. Parker [et al.]. – Text : electronic // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2019. – Vol. 63. – № 2. – P. 1-18. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.01900-18>

(date accessed: 13.03.2023).

111. *ERG11* mutations and expression of resistance genes in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates / Y. Xu, F. Sheng, J. Zhao [et al.]. – Text : electronic // Archives of Microbiology. – 2015. – Vol. 197. – № 9. – P. 1087-1093. – URL: <http://link.springer.com/10.1007/s00203-015-1146-8> (date accessed: 10.04.2022).

112. *ERG11* mutations associated with azole resistance in *Candida albicans* isolates from vulvovaginal candidosis patients / B. Wang, L.-H. Huang, J.-X. Zhao [et al.]. – Text : electronic // Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. – 2015. – Vol. 5. – № 11. – P. 909-914. – URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2221169115001902> (date accessed: 13.03.2023).

113. *Erg11* mutations associated with azole resistance in clinical isolates of *Candida albicans* / M.-J. Xiang, J.-Y. Liu, P.-H. Ni [et al.]. – Text : electronic // FEMS Yeast Research. – 2013. – Vol. 13. – № 4. – P. 386-393. – URL: <https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1111/1567-1364.12042> (date accessed: 01.05.2023).

114. EUCAST Technical Note on *Candida* and micafungin, anidulafungin and fluconazole / M. C. Arendrup, M. Cuenca-Estrella, C. Lass-Flörl, W. W. Hope. – Text : electronic // Mycoses. – 2014. – № 57. – P. 377-379. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/myc.12170> (date accessed: 08.09.2022).

115. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil / G. H. Goldman, M. E. da Silva Ferreira, E. dos Reis Marques [et al.]. – Text : electronic // Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. – 2004. – Vol. 50. – № 1. – P. 25-32. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0732889304000719> (date accessed: 04.11.2021).

116. Evaluation of two commercial broth microdilution methods using different interpretive criteria for the detection of molecular mechanisms of acquired azole and echinocandin resistance in four common *Candida* species / H. J. Lim, J. H. Shin, M.-N. Kim [et al.]. – Text : electronic // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2020. –

Vol. 64. – № 11. – P. 1-11. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.00740-20> (date accessed: 10.04.2022).

117. Evans, B. A. SpRY Cas9 Can Utilize a Variety of Protospacer Adjacent Motif Site Sequences To Edit the *Candida albicans* Genome / B. A. Evans, D. A. Bernstein. – Text : electronic // mSphere. – 2021. – Vol. 6. – № 3. – P. e00303-21. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mSphere.00303-21> (date accessed: 06.03.2023).

118. Expression of fluconazole resistance-associated genes in biofilm from 23 clinical isolates of *Candida albicans* / C. Shi, J. Liu, W. Li [et al.]. – Text : electronic // Brazilian Journal of Microbiology. – 2019. – Vol. 50. – № 1. – P. 157-163. – URL: <https://doi.org/10.1007/s42770-018-0009-2> (date accessed: 11.10.2021).

119. Facilitators of adaptation and antifungal resistance mechanisms in clinically relevant fungi / M. W. J. Hokken, B. J. Zwaan, W. J. G. Melchers, P. E. Verweij. – Text : electronic // Fungal Genetics and Biology. – 2019. – Vol. 132. – P. 103254. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1087184519301975> (date accessed: 28.07.2021).

120. Favre, B. Multiple amino acid substitutions in lanosterol 14 α -demethylase contribute to azole resistance in *Candida albicans* / B. Favre, N. S. Ryder, M. Didmon. – Text : electronic // Microbiology. – 1999. – Vol. 145. – № 10. – P. 2715-2725. – URL: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-145-10-2715> (date accessed: 10.04.2022).

121. FLO8 deletion leads to azole resistance by upregulating CDR1 and CDR2 in *Candida albicans* / W.-J. Li, J.-Y. Liu, C. Shi [et al.]. – Text : electronic // Research in Microbiology. – 2019. – Vol. 170. – № 6. – P. 272-279. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923250819300890> (date accessed: 29.09.2021).

122. FLO8 deletion leads to decreased adhesion and virulence with downregulated expression of EPA1, EPA6, and EPA7 in *Candida glabrata* / J.-T. Zhao, K.-Z. Chen, J.-Y. Liu [et al.]. – Text : electronic // Brazilian Journal of Microbiology. – 2022. – Vol. 53. – № 2. – P. 727-738. – URL: <https://link.springer.com/10.1007/s42770-022-00703-7> (date accessed: 13.01.2023).

123. Fluconazole resistance in *Candida albicans* is induced by *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing / H. M. H. N. Bandara, D. L. A. Wood, I. Vanwonderghem [et al.]. – Text : electronic // Scientific Reports. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 7769. – URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-64761-3> (date accessed: 01.05.2023).

124. Fluconazole Resistance in Isolates of Uncommon Pathogenic Yeast Species from the United Kingdom / A. M. Borman, J. Muller, J. Walsh-Quantick [et al.]. – Text : electronic // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2019. – Vol. 63. – № 8. – P. 211-219. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.00211-19> (date accessed: 10.04.2022).

125. Fluconazole-resistant *Candida parapsilosis* clonally related genotypes: first report proving the presence of endemic isolates harbouring the Y132F ERG11 gene substitution in Spain / E. Alcoceba, A. Gómez, P. Lara-Esbrí [et al.]. – Text : electronic // Clinical Microbiology and Infection. – 2022. – Vol. 28. – № 8. – P. 1113-1119. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X22001021> (date accessed: 10.01.2023).

126. Freydiere, A.-M. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods / A.-M. Freydiere, R. Guinet, P. Boiron. – Text : electronic // Medical Mycology. – 2001. – Vol. 39. – № 1. – P. 9-33. – URL: <https://academic.oup.com/mmy/article-lookup/doi/10.1080/mmy.39.1.9.33> (date accessed: 01.05.2023).

127. Gabaldón, T. Genomes shed light on the secret life of *Candida glabrata*: not so asexual, not so commensal / T. Gabaldón, C. Fairhead. – Text : electronic // Current Genetics. – 2019. – Vol. 65. – № 1. – P. 93-98. – URL: <http://link.springer.com/10.1007/s00294-018-0867-z> (date accessed: 01.05.2023).

128. Gain-of-Function Mutations in *UPC2* Are a Frequent Cause of *ERG11* Upregulation in Azole-Resistant Clinical Isolates of *Candida albicans* / S. A. Flowers, K. S. Barker, E. L. Berkow [et al.]. – Text : electronic // Eukaryotic Cell. – 2012. – Vol. 11. – № 10. – P. 1289-1299. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/EC.00215-12> (date accessed: 01.05.2023).

129. Garcia-Effron, G. Molecular Markers of Antifungal Resistance: Potential Uses

in Routine Practice and Future Perspectives / G. Garcia-Effron. – Text : electronic // Journal of Fungi. – 2021. – Vol. 7. – № 3. – P. 197. – URL: <https://www.mdpi.com/2309-608X/7/3/197> (date accessed: 15.07.2021).

130. Genetic Analysis of Azole Resistance in the Darlington Strain of *Candida albicans* / H. Kakeya, Y. Miyazaki, H. Miyazaki [et al.]. – Text : electronic // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2000. – Vol. 44. – № 11. – P. 2985-2990. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.44.11.2985-2990.2000> (date accessed: 01.05.2023).

131. Genomewide Location Analysis of *Candida albicans* Upc2p, a Regulator of Sterol Metabolism and Azole Drug Resistance / S. Znaidi, S. Weber, O. Zin Al-Abdin [et al.]. – Text : electronic // Eukaryotic Cell. – 2008. – Vol. 7. – № 5. – P. 836-847. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/EC.00070-08> (date accessed: 01.05.2023).

132. Gerstein, A. C. *Candida albicans* genetic background influences mean and heterogeneity of drug responses and genome stability during evolution in fluconazole / A. C. Gerstein, J. Berman. – Text : electronic // mSphere. – 2020. – Vol. 5. – № 3. – P. e00480-20. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mSphere.00480-20> (date accessed: 12.03.2023).

133. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision / F. Bongomin, S. Gago, R. Oladele, D. Denning. – Text : electronic // Journal of Fungi. – 2017. – Vol. 3. – № 4. – P. 57. – URL: <http://www.mdpi.com/2309-608X/3/4/57> (date accessed: 01.05.2023).

134. Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach / A. P. Francisco, M. Bugalho, M. Ramirez, J. A. Carriço. – Text : paper // BMC Bioinformatics. – 2009. – Vol. 10. – P. 1-15.

135. Global Prevalence of Antifungal-Resistant *Candida parapsilosis*: A Systematic Review and Meta-Analysis / D. Yamin, M. H. Akanmu, A. Al Mutair [et al.]. – Text : electronic // Tropical Medicine and Infectious Disease. – 2022. – Vol. 7. – № 8. – P. 188. – URL: <https://www.mdpi.com/2414-6366/7/8/188> (date accessed: 24.08.2022).

136. Godinho, C. P. Physiological Genomics of Multistress Resistance in the Yeast Cell Model and Factory: Focus on MDR/MXR Transporters / C. P. Godinho, I. Sá-

Correia. – Text : electronic // *Yeasts in Biotechnology and Human Health: Physiological Genomic Approaches : Progress in Molecular and Subcellular Biology* / ed. I. Sá-Correia. – Cham : Springer International Publishing, 2019. – *Physiological Genomics of Multistress Resistance in the Yeast Cell Model and Factory.* – P. 1-35. – URL: https://doi.org/10.1007/978-3-030-13035-0_1 (date accessed: 11.10.2021).

137. Guinea, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia / J. Guinea. – Text : electronic // *Clinical Microbiology and Infection.* – 2014. – Vol. 20. – P. 5-10. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14603268> (date accessed: 01.05.2023).

138. Hager, C. L. The mycobiome in HIV / C. L. Hager, M. A. Ghannoum. – Text : electronic // *Current Opinion in HIV and AIDS.* – 2018. – Vol. 13. – № 1. – P. 69-72. – URL: <https://journals.lww.com/01222929-201801000-00011> (date accessed: 24.08.2022).

139. Hans, S. Insights into the modulatory effect of magnesium on efflux mechanisms of *Candida albicans* reveal inhibition of ATP binding cassette multidrug transporters and dysfunctional mitochondria / S. Hans, Z. Fatima, S. Hameed. – Text : electronic // *BioMetals.* – 2021. – Vol. 34. – № 2. – P. 329-339. – URL: <https://doi.org/10.1007/s10534-020-00282-w> (date accessed: 10.04.2022).

140. Health threat caused by fungi of medical interest: where are we in 2021? / Text : electronic // *Frontiers in Bioscience-Landmark.* – 2021. – Vol. 26. – № 9. – P. 409. – URL: <https://imrpess.com/journal/FBL/26/9/10.52586/4955> (date accessed: 01.05.2023).

141. Heat shock protein 90 (Hsp90)/Histone deacetylase (HDAC) dual inhibitors for the treatment of azoles-resistant *Candida albicans* / C. Li, J. Tu, G. Han [et al.]. – Text : electronic // *European Journal of Medicinal Chemistry.* – 2022. – Vol. 227. – P. 113961. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523421008102> (date accessed: 13.01.2023).

142. High Oral Carriage of Non-*albicans Candida spp.* among HIV-infected individuals / M. F. Mushi, C. I. Mtemisika, O. Bader [et al.]. – Text : electronic //

International Journal of Infectious Diseases. – 2016. – Vol. 49. – P. 185-188. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971216311080> (date accessed: 21.06.2022).

143. Histone acetylation increases in response to ferulic, gallic, and sinapic acids acting synergistically in vitro to inhibit *Candida albicans* yeast-to-hyphae transition: Phenol synergism against *C. albicans* hyphae and histone acetylation / C. R. S. Câmara, Q. Shi, M. Pedersen [et al.]. – Text : electronic // *Phytotherapy Research*. – 2019. – Vol. 33. – № 2. – P. 319-326. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.6222> (date accessed: 13.03.2023).

144. Hitchcock, C. A. Cytochrome *P* -450-dependent 14 α -sterol demethylase of *Candida albicans* and its interaction with azole antifungals / C. A. Hitchcock. – Text : electronic // *Biochemical Society Transactions*. – 1991. – Vol. 19. – № 3. – P. 782-787. – URL: <https://portlandpress.com/biochemsoctrans/article/19/3/782/82187/Cytochrome-P-450-dependent-14-sterol-demethylase> (date accessed: 07.04.2022).

145. Hunter, J. D. Matplotlib: A 2D Graphics Environment / J. D. Hunter. – Text : electronic // *Computing in Science & Engineering*. – 2007. – Vol. 9. – № 3. – P. 90-95. – URL: <http://ieeexplore.ieee.org/document/4160265/> (date accessed: 12.03.2023).

146. Hyperexpression of CDRs and HWP1 genes negatively impacts on *Candida albicans* virulence / B. Maras, A. Maggiore, G. Mignogna [et al.]. – Text : electronic // *PLOS ONE*. – 2021. – Vol. 16. – № 6. – URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0252555> (date accessed: 16.12.2021).

147. Hypoxia and Temperature Regulated Morphogenesis in *Candida albicans* / P. R. Desai, L. van Wijlick, D. Kurtz [et al.]. – Text : electronic // *PLOS Genetics*. – 2015. – Vol. 11. – № 8. – P. e1005447. – URL: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1005447> (date accessed: 12.03.2023).

148. Identification and Characterization of Four Azole-Resistant *erg3* Mutants of *Candida albicans* / C. M. Martel, J. E. Parker, O. Bader [et al.]. – Text : electronic // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2010. – Vol. 54. – № 11. – P. 4527-4533. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.00348-10> (date accessed: 12.03.2023).

149. Identification of genetic markers of resistance to echinocandins, azoles and 5-fluorocytosine in *Candida glabrata* by next-generation sequencing: a feasibility study / C. Biswas, S. C.-A. Chen, C. Halliday [et al.]. – Text : electronic // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2017. – Vol. 23. – № 9. – P. 676.e7-676.e10. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X17301830> (date accessed: 12.03.2023).

150. *In Situ* Imaging of *Candida albicans* Hyphal Growth via Atomic Force Microscopy / A. Çolak, M. A. C. Ikeh, C. J. Nobile, M. Z. Baykara. – Text : electronic // *mSphere*. – 2020. – Vol. 5. – № 6. – P. 946-1020. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mSphere.00946-20> (date accessed: 13.01.2023).

151. In vitro activity of ibrexafungerp against *Candida* species isolated from blood cultures. Determination of wild type populations using the EUCAST method / A. Mesquida, J. Díaz-García, C. Sánchez-Carrillo [et al.]. – Text : electronic // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2022. – Vol. 28. – № 1. – P. 140.e1-140.e4. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X21005590> (date accessed: 13.01.2023).

152. In vitro and in vivo activity of a possible novel antifungal small molecule against *Candida albicans* / C. S. Shinobu-Mesquita, E. Martins, J. B. Júnior [et al.]. – Text : electronic // *Journal de Mycologie Médicale*. – 2020. – Vol. 30. – № 2. – P. 100939. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1156523319300526> (date accessed: 13.03.2023).

153. Inhibitor Resistant Mutants Give Important Insights into *Candida albicans* ABC Transporter Cdr1 Substrate Specificity and Help Elucidate Efflux Pump Inhibition / M. Niimi, K. Niimi, K. Tanabe [et al.]. – Text : electronic // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2021. – Vol. 66. – № 1. – P. 1-24. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.01748-21> (date accessed: 20.11.2021).

154. Investigation of fluconazole susceptibility to *Candida albicans* by MALDI_TOF MS and real-time PCR for *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* and *ERG11* / C. Maenchantrarath, P. Khumdee, S. Samosornsuk [et al.]. – Text : electronic // *BMC Microbiology*. – 2022. – Vol. 22. – № 1. – P. 153. – URL:

<https://doi.org/10.1186/s12866-022-02564-4> (date accessed: 12.03.2023).

155. Investigation of the First Seven Reported Cases of *Candida auris*, a Globally Emerging Invasive, Multidrug-Resistant Fungus—United States, May 2013–August 2016 / S. Vallabhaneni, A. Kallen, S. Tsay [et al.]. – Text : electronic // American Journal of Transplantation. – 2017. – Vol. 17. – № 1. – P. 296-299. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1600613522248345> (date accessed: 12.03.2023).

156. Is *Candida albicans* an opportunistic oncogenic pathogen? / A. S. Sultan, V. I. Theofilou, A. Alfaifi [et al.]. – Text : electronic // PLOS Pathogens. – 2022. – Vol. 18. – № 4. – P. 1010413. – URL: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1010413> (date accessed: 19.04.2022).

157. Iyer, K. R. Flow Cytometric Measurement of Efflux in *Candida* Species / K. R. Iyer, N. Robbins, L. E. Cowen. – Text : electronic // Current Protocols in Microbiology. – 2020. – Vol. 59. – № 1. – P. e121. – URL: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cpmc.121> (date accessed: 25.06.2021).

158. Jolley, K. A. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications / K. A. Jolley, J. E. Bray, M. C. J. Maiden. – Text : electronic // Wellcome Open Research. – 2018. – Vol. 3. – P. 124. – URL: <https://wellcomeopenresearch.org/articles/3-124/v1> (date accessed: 05.07.2023).

159. K. Redhu, A. MFS transporters of *Candida* species and their role in clinical drug resistance / A. K. Redhu, A. H. Shah, R. Prasad. – Text : electronic // FEMS Yeast Research. – 2016. – Vol. 16. – № 4. – P. fow043. – URL: <https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1093/femsyr/fow043> (date accessed: 12.03.2023).

160. Kantarcioğlu, A. S. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains / A. S. Kantarcioğlu, A. Yücel. – Text : electronic // Mycoses. – 2002. – Vol. 45. – № 5-6. – P. 160-165. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1439-0507.2002.00727.x> (date

accessed: 03.05.2023).

161. Karajacob, A. S. Revisiting oral thrush in South-East Asian patients: A review of published studies (2000–2020) / A. S. Karajacob, A. R. Al-Maleki, S. T. Tay. – Text : electronic // Journal of Oral Pathology & Medicine. – 2022. – Vol. 51. – № 1. – P. 98-105. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jop.13266> (date accessed: 10.04.2022).

162. Kelly, S. L. Y132H substitution in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase confers fluconazole resistance by preventing binding to haem / S. L. Kelly, D. C. Lamb, D. E. Kelly. – Text : electronic // FEMS Microbiology Letters. – 1999. – Vol. 180. – № 2. – P. 171-175. – URL: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08792.x> (date accessed: 12.03.2023).

163. Kolaczowski, M. Phenothiazines as potent modulators of yeast multidrug resistance / M. Kolaczowski. – Text : electronic // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2003. – Vol. 22. – № 3. – P. 279-283. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857903002140> (date accessed: 12.03.2023).

164. Kovács, R. Fungal Quorum-Sensing Molecules: A Review of Their Antifungal Effect against *Candida* Biofilms / R. Kovács, L. Majoros. – Text : electronic // Journal of Fungi. – 2020. – Vol. 6. – № 3. – P. 99. – URL: <https://www.mdpi.com/2309-608X/6/3/99> (date accessed: 12.03.2023).

165. Kumar, Y. Comparative Study Between Different Types of Media used for the Isolation of Uropathogens with Special Reference to *E.coli* / Y. Kumar, L. Kunj, P. Ramteke. – Text : electronic // Journal of Pure and Applied Microbiology. – 2017. – Vol. 11. – № 1. – P. 499-504. – URL: <http://www.microbiologyjournal.org/comparative-study-between-different-types-of-media-used-for-the-isolation-of-uropathogens-with-special-reference-to-e-coli-yashab-kumar-lata-kunj-and-pramod-w-ramteke-sam-higginbottom-institute/> (date accessed: 20.12.2022).

166. Lee, M.-K. Drug resistance genes and trailing growth in *Candida albicans* isolates / M.-K. Lee. – Text : electronic // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2004. – Vol. 53. – № 2. – P. 217-224. – URL: <https://academic.oup.com/jac/article->

lookup/doi/10.1093/jac/dkh040 (date accessed: 12.03.2023).

167. Lee, W. A novel mechanism of fluconazole: fungicidal activity through dose-dependent apoptotic responses in *Candida albicans* / W. Lee, D. G. Lee. – Text : electronic // Microbiology. – 2018. – Vol. 164. – № 2. – P. 194-204. – URL: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.000589> (date accessed: 07.04.2022).

168. Li, X. Changes in susceptibility to posaconazole in clinical isolates of *Candida albicans* / X. Li. – Text : electronic // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2003. – Vol. 53. – № 1. – P. 74-80. – URL: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkh027> (date accessed: 01.05.2023).

169. Lipid composition and cell surface hydrophobicity of *Candida albicans* influence the efficacy of fluconazole-gentamicin treatment / J. Suchodolski, J. Muraszko, A. Korba [et al.]. – Text : electronic // Yeast. – 2020. – Vol. 37. – № 1. – P. 117-129. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/yea.3455> (date accessed: 12.03.2023).

170. Liu, Z. *Candida albicans* swi/snf and mediator complexes differentially regulate mrr1-induced *MDR1* expression and fluconazole resistance / Z. Liu, L. C. Myers. – Text : electronic // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2017. – Vol. 61. – № 11. – P. 1-24. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.01344-17> (date accessed: 24.08.2022).

171. Livak, K. J. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method / K. J. Livak, T. D. Schmittgen. – Text : electronic // Methods. – 2001. – Vol. 25. – № 4. – P. 402-408. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202301912629> (date accessed: 12.03.2023).

172. Lodder, J. The Yeasts: A Taxonomic Study. The Yeasts / J. Lodder, N. J. W. K.-V. Rij. – North-Holland Publishing Company, 1952. – 736 p. – URL: <https://www.elsevier.com/books/the-yeasts-a-taxonomic-study/kurtzman/978-0-444-81312-1> (date accessed: 24.04.2023). – Text : electronic.

173. Lohberger, A. Distinct roles of *Candida albicans* drug resistance transcription factors TAC1, MRR1, and UPC2 in virulence / A. Lohberger, A. T. Coste, D. Sanglard.

– Text : electronic // Eukaryotic Cell. – 2014. – Vol. 13. – № 1. – P. 127-142. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/EC.00245-13> (date accessed: 01.05.2023).

174. Lopes, W. Revealing colonial characteristics of *Candida tropicalis* by high-resolution scanning electron microscopy / W. Lopes, M. H. Vainstein, A. Schrank. – Text : electronic // Clinical Microbiology and Infection. – 2019. – Vol. 25. – № 2. – P. 188-189. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X18307651> (date accessed: 12.03.2023).

175. Machine Learning Approach for *Candida albicans* Fluconazole Resistance Detection Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry / M. Delavy, L. Cerutti, A. Croxatto [et al.]. – Text : electronic // Frontiers in Microbiology. – 2020. – Vol. 10. – № January. – P. 3000. – URL: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.03000/full> (date accessed: 12.03.2023).

176. Manual of Clinical Microbiology / A. Balows, W. J. Hausler Jr., K. L. Herrmann, H. D. Isenberg. – 5th ed. – Washington, D.C. : ASM, 1991. – URL: (date accessed: 24.04.2023). – Text : electronic.

177. May, R. C. In fungal intracellular pathogenesis, form determines fate / R. C. May, A. Casadevall. – Text : electronic // mBio. – 2018. – Vol. 9. – № 5. – P. e02092-18. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.02092-18> (date accessed: 12.03.2023).

178. Meunier, F. Candidiasis / F. Meunier. – Text : electronic // European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. – 1989. – Vol. 8. – № 5. – P. 438-447. – URL: <https://doi.org/10.1007/BF01964058> (date accessed: 12.03.2023).

179. Microevolution of the pathogenic yeasts *Candida albicans* and *Candida glabrata* during antifungal therapy and host infection / P. Pais, M. Galocha, R. Viana [et al.]. – Text : electronic // Microbial Cell. – 2019. – Vol. 6. – № 3. – P. 142-159. – URL: <http://microbialcell.com/researcharticles/2019a-pais-microbial-cell/> (date accessed: 16.10.2021).

180. MixInYeast: A Multicenter Study on Mixed Yeast Infections / N. Medina, J. Soto-Debrán, D. Seidel [et al.]. – Text : electronic // Journal of Fungi. – 2020. – Vol. 7. –

№ 1. – P. 13. – URL: <https://www.mdpi.com/2309-608X/7/1/13> (date accessed: 12.03.2023).

181. Modified response to ketoconazole of *Candida albicans* from a treatment failure / D. W. Warnock, E. M. Johnson, M. D. Richardson, C. F. H. Vickers. – Text : electronic // *The Lancet*. – 1983. – Vol. 321. – № 8325. – P. 642-643. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673683918093> (date accessed: 08.09.2022).

182. Modulation of azole sensitivity and filamentation by GPI15, encoding a subunit of the first GPI biosynthetic enzyme, in *Candida albicans* / P. Jain, P. Garai, S. C. Sethi [et al.]. – Text : electronic // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 8508. – URL: <http://www.nature.com/articles/s41598-019-44919-4> (date accessed: 24.08.2022).

183. Molecular analysis of cyp51 from fluconazole-resistant *Candida albicans* strains / J. Löffler, S. L. Kelly, H. Hebart [et al.]. – Text : electronic // *FEMS Microbiology Letters*. – 2006. – Vol. 151. – № 2. – P. 263-268. – URL: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12580.x> (date accessed: 12.03.2023).

184. Molecular Diagnosis of Yeast Infections / P. L. White, J. S. Price, A. Cordey, M. Backx. – Text : electronic // *Current Fungal Infection Reports*. – 2021. – Vol. 15. – № 3. – P. 67-80. – URL: <https://link.springer.com/10.1007/s12281-021-00421-x> (date accessed: 02.03.2023).

185. Molecular mechanism of azoles resistant *Candida albicans* in a patient with chronic mucocutaneous candidiasis / M. Zhang, F. Zhao, S. Wang [et al.]. – Text : electronic // *BMC Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 20. – № 1. – P. 126. – URL: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-020-4856-8> (date accessed: 12.03.2023).

186. Molecular mechanisms of acquired antifungal drug resistance in principal fungal pathogens and EUCAST guidance for their laboratory detection and clinical implications / T. R. Rogers, P. E. Verweij, M. Castanheira [et al.]. – Text : electronic // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2022. – Vol. 77. – № 8. – P. 2053-2073. – URL: <https://academic.oup.com/jac/article/77/8/2053/6608556> (date accessed:

12.03.2023).

187. Molecular mechanisms of azole resistance in *Candida* bloodstream isolates / J. Q.-M. Teo, S. J.-Y. Lee, A.-L. Tan [et al.]. – Text : electronic // BMC Infectious Diseases. – 2019. – Vol. 19. – № 1. – P. 63. – URL: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-019-3672-5> (date accessed: 10.04.2022).

188. Moore, R. D. Natural History of Opportunistic Disease in an HIV-Infected Urban Clinical Cohort / R. D. Moore. – Text : electronic // Annals of Internal Medicine. – 1996. – Vol. 124. – № 7. – P. 633. – URL: <http://annals.org/article.aspx?doi=10.7326/0003-4819-124-7-199604010-00003> (date accessed: 12.03.2023).

189. Morschhäuser, J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi : Special Section on Antifungal Resistance / J. Morschhäuser. – Text : electronic // Fungal Genetics and Biology. – 2010. – Vol. 47. – № 2. – P. 94-106. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1087184509001479> (date accessed: 16.12.2021).

190. Morschhäuser, J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans* / J. Morschhäuser. – Text : electronic // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. – 2002. – Vol. 1587. – № 2. – P. 240-248. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092544390200087X> (date accessed: 12.03.2023).

191. Moye-Rowley, W. S. Linkage between genes involved in azole resistance and ergosterol biosynthesis / W. S. Moye-Rowley. – Text : electronic // PLOS Pathogens. – 2020. – Vol. 16. – № 9. – URL: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1008819> (date accessed: 29.06.2021).

192. Mulhern, S. M. *Candida albicans* transcription factor Ace2 regulates metabolism and is required for filamentation in hypoxic conditions / S. M. Mulhern, M. E. Logue, G. Butler. – Text : electronic // Eukaryotic Cell. – 2006. – Vol. 5. – № 12. – P. 2001-2013. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/EC.00155-06> (date accessed:

12.03.2023).

193. Multilocus sequence typing for *Candida albicans* strains from the intestinal tract of patients with cirrhosis / J. Zhu, J.-F. Cao, T. Zhang [et al.]. – Text : electronic // European Review for Medical and Pharmacological Sciences. – 2018. – Vol. 22. – № 18. – P. 6063-6071. – URL: https://doi.org/10.26355/eurrev_201809_15944 (date accessed: 12.03.2023).

194. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains / R. Franz, S. L. Kelly, D. C. Lamb [et al.]. – Text : electronic // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1998. – Vol. 42. – № 12. – P. 3065-3072. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.42.12.3065> (date accessed: 12.03.2023).

195. New antifungal susceptibility test based on chitin detection by image cytometry / Y. Wang, A. N. Andriampamonjy, S. Bailly [et al.]. – Text : electronic // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2019. – Vol. 64. – № 1. – P. 1-11. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.01101-19> (date accessed: 10.04.2022).

196. Norris, J. R. Methods in Microbiology / J. R. Norris, D. W. Ribbons. – 1. – Academic Press, 1969. – 727 p. – URL: <https://www.elsevier.com/books/methods-in-microbiology/norris/978-0-12-521506-0> (date accessed: 24.04.2023). – Text : electronic.

197. Novel Combinations of Agents Targeting Translation That Synergistically Inhibit Fungal Pathogens / C. Vallières, R. Raulo, M. Dickinson, S. V. Avery. – Text : electronic // Frontiers in Microbiology. – 2018. – Vol. 9. – № October. – P. 2355. – URL: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.02355/full> (date accessed: 12.03.2023).

198. Novel point mutations in the ERG11 gene in clinical isolates of azole resistant *Candida* species / D. B. dos S. Silva, L. M. C. Rodrigues, A. A. de Almeida [et al.]. – Text : electronic // Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. – 2016. – Vol. 111. – № 3. – P. 192-199. – URL: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762016000300192&lng=en&tlng=en (date accessed: 12.03.2023).

199. Osei Sekyere, J. *Candida auris* : A systematic review and meta-analysis of current updates on an emerging multidrug-resistant pathogen / J. Osei Sekyere. – Text :

electronic // MicrobiologyOpen. – 2018. – Vol. 7. – № 4. – P. e00578. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mbo3.578> (date accessed: 12.03.2023).

200. Pankhurst, C. L. Candidiasis (oropharyngeal) / C. L. Pankhurst. – Text : electronic // BMJ clinical evidence. – 2013. – Vol. 2013. – P. 1304. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3821534/> (date accessed: 24.01.2018).

201. Paul, S. Multidrug resistance in fungi: regulation of transporter-encoding gene expression / S. Paul, W. S. Moye-Rowley. – Text : electronic // Frontiers in Physiology. – 2014. – Vol. 5. – P. 1-14. – URL: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2014.00143/abstract> (date accessed: 12.03.2023).

202. Paving the Way to Overcome Antifungal Drug Resistance: Current Practices and Novel Developments for Rapid and Reliable Antifungal Susceptibility Testing / C. Heuer, J. Bahnemann, T. Scheper, E. Segal. – Text : electronic // Small Methods. – 2021. – Vol. 5. – № 11. – P. 2100713. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/smt.202100713> (date accessed: 10.04.2022).

203. Pellon, A. New Insights in *Candida albicans* Innate Immunity at the Mucosa: Toxins, Epithelium, Metabolism, and Beyond / A. Pellon, S. D. Sadeghi Nasab, D. L. Moyes. – Text : electronic // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2020. – Vol. 10. – № March. – P. 81. – URL: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2020.00081/full> (date accessed: 12.03.2023).

204. Perlin, D. S. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management / D. S. Perlin, R. Rautemaa-Richardson, A. Alastruey-Izquierdo. – Text : electronic // The Lancet Infectious Diseases. – 2017. – Vol. 17. – № 12. – P. e383-e392. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S147330991730316X> (date accessed: 12.03.2023).

205. Perry, J. L. Umbelliferyl-labeled galactosaminide as an aid in identification of *Candida albicans* / J. L. Perry, G. R. Miller. – Text : electronic // Journal of Clinical

Microbiology. – 1987. – Vol. 25. – № 12. – P. 2424-2425. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.25.12.2424-2425.1987> (date accessed: 01.05.2023).

206. Prescott, R. J. Fungal infections of the small and large intestine. / R. J. Prescott, M. Harris, S. S. Banerjee. – Text : electronic // Journal of Clinical Pathology. – 1992. – Vol. 45. – № 9. – P. 806-811. – URL: <http://jcp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jcp.45.9.806> (date accessed: 12.03.2023).

207. Presumptive identification of *Candida* species other than *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. tropicalis* with the chromogenic medium CHROMagar Candida / D. R. Hospenthal, M. L. Beckius, K. L. Floyd [et al.]. – Text : electronic // Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. – 2006. – Vol. 5. – № 1. – P. 1. – URL: <https://annclinmicrob.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-0711-5-1> (date accessed: 12.03.2023).

208. Prevalence of Molecular Mechanisms of Resistance to Azole Antifungal Agents in *Candida albicans* Strains Displaying High-Level Fluconazole Resistance Isolated from Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients / S. Perea, J. L. López-Ribot, W. R. Kirkpatrick [et al.]. – Text : electronic // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2001. – Vol. 45. – № 10. – P. 2676. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC90716/> (date accessed: 23.10.2021).

209. Prevalent mutator genotype identified in fungal pathogen *Candida glabrata* promotes multi-drug resistance / K. R. Healey, Y. Zhao, W. B. Perez [et al.]. – Text : electronic // Nature Communications. – 2016. – Vol. 7. – № 1. – P. 11128. – URL: <https://www.nature.com/articles/ncomms11128> (date accessed: 10.01.2023).

210. Pristov, K. E. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide / K. E. Pristov, M. A. Ghannoum. – Text : electronic // Clinical Microbiology and Infection. – 2019. – Vol. 25. – № 7. – P. 792-798. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X19301491> (date accessed: 11.10.2021).

211. Puel, A. Human inborn errors of immunity underlying superficial or invasive candidiasis / A. Puel. – Text : electronic // Human Genetics. – 2020. – Vol. 139. – № 6-

7. – P. 1011-1022. – URL: <http://link.springer.com/10.1007/s00439-020-02141-7> (date accessed: 13.01.2023).

212. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis / J. R. Naglik, D. Moyes, J. Makwana [et al.]. – Text : electronic // Microbiology. – 2008. – Vol. 154. – № 11. – P. 3266-3280. – URL: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.2008/022293-0> (date accessed: 24.08.2022).

213. Rapid detection of *ERG11* gene mutations in clinical *Candida albicans* isolates with reduced susceptibility to fluconazole by rolling circle amplification and DNA sequencing / H. Wang, F. Kong, T. C. Sorrell [et al.]. – Text : electronic // BMC Microbiology. – 2009. – Vol. 9. – № 1. – P. 167. – URL: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-9-167> (date accessed: 18.10.2022).

214. Rapid Emergence of Echinocandin Resistance in *Candida glabrata* Resulting in Clinical and Microbiologic Failure / J. S. Lewis, N. P. Wiederhold, B. L. Wickes [et al.]. – Text : electronic // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2013. – Vol. 57. – № 9. – P. 4559-4561. – URL: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.01144-13> (date accessed: 29.09.2018).

215. Rapid urea broth test for yeasts. / G. D. Roberts, C. D. Horstmeier, G. A. Land, J. H. Foxworth. – Text : electronic // Journal of Clinical Microbiology. – 1978. – Vol. 7. – № 6. – P. 584-588. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC275077/> (date accessed: 24.04.2023).

216. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans* / T. C. White, S. Holleman, F. Dy [et al.]. – Text : paper // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2002. – Vol. 46. – № 6. – P. 1704-1713.

217. Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol delta5,6-desaturation / S. L. Kelly, D. C. Lamb, D. E. Kelly [et al.]. – Text : paper // FEBS letters. – 1997. – Vol. 400. – № 1. – P. 80-82.

218. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* Species to Fluconazole and Voriconazole as Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion / M. A. Pfaller, D. J. Diekema, D. L. Gibbs [et al.]. – Text : electronic // Journal of Clinical Microbiology. – 2010. – Vol. 48. – № 4. – P. 1366-1377. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.02117-09> (date accessed: 01.05.2023).

219. Review on Antifungal Resistance Mechanisms in the Emerging Pathogen *Candida auris* / F. Chaabane, A. Graf, L. Jequier, A. T. Coste. – Text : electronic // Frontiers in Microbiology. – 2019. – Vol. 10. – № November. – P. 2788. – URL: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.02788/full> (date accessed: 13.03.2023).

220. Richardson, J. P. *Candida albicans*: A Major Fungal Pathogen of Humans / J. P. Richardson. – Text : electronic // Pathogens. – 2022. – Vol. 11. – № 4. – P. 459. – URL: <https://www.mdpi.com/2076-0817/11/4/459> (date accessed: 19.04.2022).

221. Risk factors for isolation of fluconazole and echinocandin non-susceptible *Candida* species in critically ill patients / M. Papadimitriou-Olivgeris, A. Spiliopoulou, F. Fligou [et al.]. – Text : electronic // Journal of Medical Microbiology. – 2021. – Vol. 70. – № 8. – P. 001401. – URL: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.001401> (date accessed: 10.04.2022).

222. Robbins, N. Molecular Evolution of Antifungal Drug Resistance / N. Robbins, T. Caplan, L. E. Cowen. – Text : electronic // Annual Review of Microbiology. – 2017. – Vol. 71. – № 1. – P. 753-775. – URL: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-micro-030117-020345> (date accessed: 10.04.2022).

223. Robbins, N. Antifungal drug resistance: Deciphering the mechanisms governing multidrug resistance in the fungal pathogen *Candida glabrata* / N. Robbins, L. E. Cowen. – Text : electronic // Current Biology. – 2021. – Vol. 31. – № 23. – P. R1520-R1523. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982221013397> (date accessed: 01.04.2022).

224. Sah, S. K. The role of aneuploidy in the emergence of echinocandin resistance in human fungal pathogen *Candida albicans* / S. K. Sah, J. J. Hayes, E. Rustchenko. – Text : electronic // PLOS Pathogens. – 2021. – Vol. 17. – № 5. – P. 1009564. – URL: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1009564> (date accessed: 12.03.2023).

225. Samaranayake, L. P. Oral mycoses in HIV infection / L. P. Samaranayake. – Text : electronic // Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology. – 1992. – Vol. 73. – № 2. – P. 171-180. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/003042209290191R> (date accessed: 12.03.2023).

226. Sanglard, D. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences / D. Sanglard, F. C. Odds. – Text : electronic // The Lancet Infectious Diseases. – 2002. – Vol. 2. – № 2. – P. 73-85. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309902001810> (date accessed: 01.05.2023).

227. Sanguinetti, M. Susceptibility Testing of Fungi to Antifungal Drugs / M. Sanguinetti, B. Posteraro. – Text : electronic // Journal of Fungi. – 2018. – Vol. 4. – № 3. – P. 110. – URL: <http://www.mdpi.com/2309-608X/4/3/110> (date accessed: 12.03.2023).

228. SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python / P. Virtanen, R. Gommers, T. E. Oliphant [et al.]. – Text : electronic // Nature Methods. – 2020. – Vol. 17. – № 3. – P. 261-272. – URL: <http://www.nature.com/articles/s41592-019-0686-2> (date accessed: 25.04.2022).

229. Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature / F. Morio, C. Loge, B. Besse [et al.]. – Text : electronic // Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. – 2010. – Vol. 66. – № 4. – P. 373-384. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0732889309004684> (date accessed: 12.03.2023).

230. Selmecki, A. Aneuploidy and Isochromosome Formation in Drug-Resistant *Candida albicans* / A. Selmecki, A. Forche, J. Berman. – Text : electronic // Science. – 2006. – Vol. 313. – № 5785. – P. 367-370. – URL:

<https://www.science.org/doi/10.1126/science.1128242> (date accessed: 12.03.2023).

231. Set of Classical PCRs for Detection of Mutations in *Candida glabrata* *FKS* Genes Linked with Echinocandin Resistance / C. Dudiuk, S. Gamarra, F. Leonardeli [et al.]. – Text : electronic // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2014. – Vol. 52. – № 7. – P. 2609-2614. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.01038-14> (date accessed: 12.03.2023).

232. Shehata, A. *Candida albicans* blastospores and hyphae respond differentially to fluconazole: additional virulence factor of germination process / A. Shehata. – Text : electronic // *Microbes and Infectious Diseases*. – 2021. – P. 1-18. – URL: https://mid.journals.ekb.eg/article_203027.html (date accessed: 12.03.2023).

233. Species distribution and antifungal drug susceptibilities of yeasts isolated from the blood samples of patients with candidemia / E. Lindberg, H. Hammarström, N. Ataollahy, N. Kondori. – Text : electronic // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 3838. – URL: <http://www.nature.com/articles/s41598-019-40280-8> (date accessed: 24.08.2022).

234. Species distribution and antifungal susceptibility of invasive *Candida* isolates from Canadian hospitals: results of the CANWARD 2011–16 study / J. Fuller, T. C. Dingle, A. Bull [et al.]. – Text : electronic // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2019. – Vol. 74. – № Supplement_4. – P. 48-54. – URL: https://academic.oup.com/jac/article/74/Supplement_4/iv48/5553081 (date accessed: 12.03.2023).

235. Structural analyses of *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase complexed with azole drugs address the molecular basis of azole-mediated inhibition of fungal sterol biosynthesis / T. Y. Hargrove, L. Friggeri, Z. Wawrzak [et al.]. – Text : electronic // *Journal of Biological Chemistry*. – 2017. – Vol. 292. – № 16. – P. 6728-6743. – URL: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)36586-8/abstract](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)36586-8/abstract) (date accessed: 22.03.2023).

236. Structural Insights into the Azole Resistance of the *Candida albicans* Darlington Strain Using *Saccharomyces cerevisiae* Lanosterol 14 α -Demethylase as a Surrogate / D. O. Graham, R. K. Wilson, Y. N. Ruma [et al.]. – Text : electronic // *Journal*

of Fungi. – 2021. – Vol. 7. – № 11. – P. 897. – URL: <https://www.mdpi.com/2309-608X/7/11/897> (date accessed: 12.03.2023).

237. Suchodolski, J. Fructose induces fluconazole resistance in *Candida albicans* through activation of Mdr1 and Cdr1 transporters / J. Suchodolski, A. Krasowska. – Text : electronic // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22. – № 4. – P. 2127. – URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/4/2127> (date accessed: 12.03.2023).

238. T Cell Antifungal Immunity and the Role of C-Type Lectin Receptors / E. A. Speakman, I. M. Dambuza, F. Salazar, G. D. Brown. – Text : electronic // Trends in Immunology. – 2020. – Vol. 41. – № 1. – P. 61-76. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490619302406> (date accessed: 12.03.2023).

239. Tamura, K. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11 / K. Tamura, G. Stecher, S. Kumar. – Text : electronic // Molecular Biology and Evolution. – 2021. – Vol. 38. – № 7. – P. 3022-3027. – URL: <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120> (date accessed: 18.03.2023).

240. Targeted amplification and MinION nanopore sequencing of key azole and echinocandin resistance determinants of clinically relevant *Candida spp.* from blood culture bottles / K. I. Chew, S. Octavia, R. Jureen [et al.]. – Text : electronic // Letters in Applied Microbiology. – 2021. – Vol. 73. – № 3. – P. 286-293. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/lam.13516> (date accessed: 08.10.2021).

241. The *Candida* Genome Database (CGD): incorporation of Assembly 22, systematic identifiers and visualization of high throughput sequencing data / M. S. Skrzypek, J. Binkley, G. Binkley [et al.]. – Text : electronic // Nucleic Acids Research. – 2017. – Vol. 45. – № D1. – P. D592-D596. – URL: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw924> (date accessed: 19.03.2023).

242. The Changing Epidemiology of Invasive Fungal Infections / D. A. Enoch, H. Yang, S. H. Aliyu, C. Micallef. – Text : electronic // Human Fungal Pathogen Identification: Methods and Protocols : Methods in Molecular Biology / ed. T. Lion. – New York, NY : Springer, 2017. – P. 17-65. – URL: <https://doi.org/10.1007/978-1-4939->

6515-1_2 (date accessed: 02.04.2022).

243. The diploid genome sequence of *Candida albicans* / T. Jones, N. A. Federspiel, H. Chibana [et al.]. – Text : electronic // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2004. – Vol. 101. – № 19. – P. 7329-7334. – URL: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0401648101> (date accessed: 01.05.2023).

244. The Evolution of Azole Resistance in *Candida albicans* Sterol 14 α -Demethylase (CYP51) through Incremental Amino Acid Substitutions / A. G. Warrilow, A. T. Nishimoto, J. E. Parker [et al.]. – Text : electronic // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2019. – Vol. 63. – № 5. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.02586-18> (date accessed: 16.10.2021).

245. The Fungal CYP51s: Their Functions, Structures, Related Drug Resistance, and Inhibitors / J. Zhang, L. Li, Q. Lv [et al.]. – Text : electronic // Frontiers in Microbiology. – 2019. – Vol. 10. – № April. – P. 691. – URL: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.00691/full> (date accessed: 12.03.2023).

246. The G464S Amino Acid Substitution in *Candida albicans* Sterol 14 α -Demethylase Causes Fluconazole Resistance in the Clinic through Reduced Affinity / S. L. Kelly, D. C. Lamb, J. Loeffler [et al.]. – Text : electronic // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 1999. – Vol. 262. – № 1. – P. 174-179. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X99911361> (date accessed: 09.09.2022).

247. The Ndr/LATS kinase Cbk1 regulates a specific subset of Ace2 functions and suppresses the hypha-to-yeast transition in *Candida albicans* / R. S. Wakade, L. C. Ristow, M. A. Stamnes [et al.]. – Text : electronic // mBio. – 2020. – Vol. 11. – № 4. – P. 1-21. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.01900-20> (date accessed: 24.08.2022).

248. The PathoYeast database: an information system for the analysis of gene and genomic transcription regulation in pathogenic yeasts / P. T. Monteiro, P. Pais, C. Costa [et al.]. – Text : electronic // Nucleic Acids Research. – 2017. – Vol. 45. – № D1. – P. D597-D603. – URL: <https://academic.oup.com/nar/article->

lookup/doi/10.1093/nar/gkw817 (date accessed: 01.05.2023).

249. The PP2A regulatory subunits, Cdc55 and Rts1, play distinct roles in *Candida albicans*' growth, morphogenesis, and virulence / Q. Han, C. Pan, Y. Wang [et al.]. – Text : electronic // Fungal Genetics and Biology. – 2019. – Vol. 131. – P. 103240. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1087184519300775> (date accessed: 12.03.2023).

250. The R467K Amino Acid Substitution in *Candida albicans* Sterol 14 α -Demethylase Causes Drug Resistance through Reduced Affinity / D. C. Lamb, D. E. Kelly, T. C. White, S. L. Kelly. – Text : electronic // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2000. – Vol. 44. – № 1. – P. 63-67. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.44.1.63-67.2000> (date accessed: 09.09.2022).

251. The role of secretory pathways in *Candida albicans* pathogenesis / C. Rollenhagen, S. Mamtani, D. Ma [et al.]. – Text : electronic // Journal of Fungi. – 2020. – Vol. 6. – № 1. – P. 26. – URL: <https://www.mdpi.com/2309-608X/6/1/26> (date accessed: 12.03.2023).

252. The UniProt Consortium. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023 / The UniProt Consortium. – Text : electronic // Nucleic Acids Research. – 2023. – Vol. 51. – № D1. – P. D523-D531. – URL: <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052> (date accessed: 19.03.2023).

253. Three-Dimensional Models of Wild-Type and Mutated Forms of Cytochrome P450 14 α -Sterol Demethylases from *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* Provide Insights into Posaconazole Binding / L. Xiao, V. Madison, A. S. Chau [et al.]. – Text : electronic // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2004. – Vol. 48. – № 2. – P. 568-574. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.48.2.568-574.2004> (date accessed: 12.03.2023).

254. Transcriptional regulation of drug-resistance genes in *Candida albicans* biofilms in response to antifungals / T. Watamoto, L. P. Samaranayake, H. Egusa [et al.]. – Text : electronic // Journal of Medical Microbiology. – 2011. – Vol. 60. – № 9. – P. 1241-1247. – URL: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.030692-0>

(date accessed: 10.04.2022).

255. Trends of the Epidemiology of Candidemia in Switzerland: A 15-Year FUNGINOS Survey / K.-M. Adam, M. Osthoff, F. Lamoth [et al.]. – Text : electronic // Open Forum Infectious Diseases. – 2021. – Vol. 8. – № 10. – P. 1-9. – URL: <https://academic.oup.com/ofid/article/doi/10.1093/ofid/ofab471/6372012> (date accessed: 10.01.2023).

256. Twenty Years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for Candida Species From 1997–2016 / M. A. Pfaller, D. J. Diekema, J. D. Turnidge [et al.]. – Text : electronic // Open Forum Infectious Diseases. – 2019. – Vol. 6. – № Supplement_1. – P. 79-94. – URL: https://academic.oup.com/ofid/article/6/Supplement_1/S79/5381621 (date accessed: 12.03.2023).

257. *UPC2* Is Universally Essential for Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* / E. M. Vasicek, E. L. Berkow, S. A. Flowers [et al.]. – Text : electronic // Eukaryotic Cell. – 2014. – Vol. 13. – № 7. – P. 933-946. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/EC.00221-13> (date accessed: 12.03.2023).

258. Verapamil inhibits efflux pumps in *Candida albicans*, exhibits synergism with fluconazole, and increases survival of *Galleria mellonella* / Y. Vega-Chacón, M. C. de Albuquerque, A. C. Pavarina [et al.]. – Text : electronic // Virulence. – 2021. – Vol. 12. – № 1. – P. 231-243. – URL: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21505594.2020.1868814> (date accessed: 01.08.2021).

259. White, T. C. The presence of an R467K amino acid substitution and loss of allelic variation correlate with an azole-resistant lanosterol 14alpha demethylase in *Candida albicans*. / T. C. White. – Text : electronic // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1997. – Vol. 41. – № 7. – P. 1488. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC163945/> (date accessed: 23.10.2021).

260. WHO. Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) early implementation protocol for the inclusion of *Candida spp.* / WHO. – 2019.4. – Geneva : World Health Organization, 2019. – 24 p. – URL: <https://www.who.int/publications->

detail-redirect/WHO-WSI-AMR-2019.4 (date accessed: 01.05.2023). – Text : electronic.

261. Whole genome sequencing of a clinical drug resistant *Candida albicans* isolate reveals known and novel mutations in genes involved in resistance acquisition mechanisms / R. A. Khalaf, N. Fattouh, M. Medvecky, J. Hrabak. – Text : electronic // Journal of Medical Microbiology. – 2021. – Vol. 70. – № 4. – P. 8. – URL: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.001351> (date accessed: 13.03.2023).

262. Wirsching, S. Targeted gene disruption in *Candida albicans* wild-type strains: the role of the *MDR1* gene in fluconazole resistance of clinical *Candida albicans* isolates / S. Wirsching, S. Michel, J. Morschhauser. – Text : electronic // Molecular Microbiology. – 2000. – Vol. 36. – № 4. – P. 856-865. – URL: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.2000.01899.x> (date accessed: 01.05.2023).

263. Xu, Y. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* species to fluconazole and detection of *Candida albicans* *ERG11* mutations / Y. Xu, L. Chen, C. Li. – Text : electronic // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2008. – Vol. 61. – № 4. – P. 798-804. – URL: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkn015> (date accessed: 24.08.2022).

Список и характеристика штаммов *Candida spp.*

№	Вид	Характеристика
6,1	<i>C. glabrata</i>	Устойчивый к флуконазолу, итраконазолу.
7,2	<i>C. glabrata</i>	Устойчивый к флуконазолу, кетоконазолу, клотримазолу, итраконазолу, амфотерицину В.
11,2	<i>C. glabrata</i>	Устойчивый к флуконазолу, клотримазолу, итраконазолу, амфотерицину В.
21,1	<i>C. glabrata</i>	Устойчивый к клотримазолу, итраконазолу.
21,2	<i>C. glabrata</i>	Устойчивый к итраконазолу.
22,2	<i>C. glabrata</i>	Устойчивый к флуконазолу, кетоконазолу, клотримазолу, итраконазолу, амфотерицину В
23,2	<i>C. glabrata</i>	Устойчивый к флуконазолу, итраконазолу, амфотерицину В
54	<i>C. albicans</i>	ST 767, устойчивый к флуконазолу, вориконазолу, итраконазолу, повышенная экспрессия генов <i>ERG11</i> , <i>CDR1</i> , <i>CDR2</i> .
55	<i>C. albicans</i>	ST 3185, устойчивый к флуконазолу, вориконазолу, итраконазолу, кетоконазолу, клотримазолу, повышенная экспрессия генов <i>ERG11</i> , <i>CDR1</i> , <i>CDR2</i> , <i>MDR1</i> .
70	<i>C. albicans</i>	ST 2014, устойчивый к флуконазолу, вориконазолу, итраконазолу, клотримазолу, позаконазолу, амфотерицину В, повышенная экспрессия генов <i>ERG11</i> , <i>CDR1</i> , <i>CDR2</i> .
81	<i>C. glabrata</i>	Устойчивый к флуконазолу, кетоконазолу, клотримазолу, итраконазолу, амфотерицину В.
81,3	<i>C. glabrata</i>	Устойчивый к флуконазолу, кетоконазолу, клотримазолу, итраконазолу, амфотерицину В.
122	<i>C. albicans</i>	ST 3923, устойчивый к флуконазолу, вориконазолу, итраконазолу, кетоконазолу, клотримазолу, амфотерицину В, повышенная экспрессия генов <i>ERG11</i> , <i>CDR2</i> , мутации E266D, D116E в гене <i>ERG11</i> .
124	<i>C. albicans</i>	ST 3359, устойчивый к флуконазолу, вориконазолу, итраконазолу, кетоконазолу, повышенная экспрессия генов <i>ERG11</i> , <i>CDR1</i> , <i>CDR2</i> , мутации в гене <i>ERG11</i> E266D, D116E.
128	<i>C. albicans</i>	ST 363, Устойчивый к флуконазолу, вориконазолу и итраконазолу
1,1	<i>C. albicans</i>	ST 3299, устойчивый к флуконазолу, вориконазолу, итраконазолу, кетоконазолу, позаконазолу, амфотерицину В, анидулафунгину, повышенная экспрессия генов <i>ERG11</i> , <i>CDR1</i> .
14,1	<i>C. albicans</i>	ST 255, устойчивый к флуконазолу, вориконазолу, итраконазолу, клотримазолу, кетоконазолу, позаконазолу, анидулафунгину, микафунгину, повышенная экспрессия генов <i>ERG11</i> , <i>CDR1</i> , <i>CDR2</i> .
16,1	<i>C. albicans</i>	ST 624, устойчивый к флуконазолу, вориконазолу, кетоконазолу, клотримазолу, повышенная экспрессия генов <i>ERG11</i> , <i>CDR1</i> , мутации в гене <i>ERG11</i> E266D, G464S.
17,1	<i>C. albicans</i>	ST 1469, устойчивый к флуконазолу, вориконазолу, анидулафунгину, итраконазолу, кетоконазолу, позаконазолу, повышенная экспрессия генов <i>ERG11</i> , <i>CDR1</i> , <i>CDR2</i> .
2,1	<i>C. albicans</i>	ST 3090, устойчивый к анидулафунгину, флуконазолу, вориконазолу, итраконазолу, кетоконазолу, повышенная экспрессия генов <i>ERG11</i> , <i>CDR1</i> , <i>CDR2</i> , <i>MDR1</i> .
201,2	<i>C. albicans</i>	Чувствительный штамм.

Продолжение приложения 1

203,1	<i>C. albicans</i>	Чувствительный штамм.
213,1	<i>C. albicans</i>	Чувствительный штамм.
213,4	<i>C. krusei</i>	Устойчивый к флуконазолу и клотримазолу.
22,1	<i>C. albicans</i>	ST 573, устойчивый к флуконазолу, вориконазолу, итраконазолу, кетоконазолу, клотримазолу, повышенная экспрессия генов CDR1, CDR2, мутации I471L, V488I в гене ERG11.
22,2	<i>C. glabrata</i>	Устойчивый к флуконазолу, кетоконазолу, клотримазолу, итраконазолу, амфотерицину В
225,2	<i>C. krusei</i>	Устойчивый к флуконазолу и кетоконазолу
229,1	<i>C. albicans</i>	Чувствительный штамм
238,1	<i>C. tropicalis</i>	Устойчивый к флуконазолу, клотримазолу, нистатину и амфотерицину В.
239,2	<i>C. glabrata</i>	Устойчивый к флуконазолу, клотримазолу, кетоконазолу и итраконазолу.
244,1	<i>C. albicans</i>	Чувствительный штамм.
245,1	<i>C. albicans</i>	Чувствительный штамм.
250,3	<i>C. tropicalis</i>	Устойчивый к флуконазолу, кетоконазолу, клотримазолу.
253,3	<i>C. tropicalis</i>	Устойчивый к флуконазолу
3,3	<i>C. albicans</i>	ST 2724, устойчивый к флуконазолу, вориконазолу, итраконазолу, клотримазолу, повышенная экспрессия генов ERG11, CDR1, CDR2, MDR1.
30,2	<i>C. albicans</i>	ST 747, устойчивый к флуконазолу, вориконазолу, анидулафунгину, итраконазолу, клотримазолу, позаконазолу, повышенная экспрессия генов ERG11, CDR1, CDR2, мутация G464S в гене ERG11.
33,1	<i>C. glabrata</i>	Чувствительный штамм.
51,2	<i>C. albicans</i>	ST 1411, устойчивый к флуконазолу, вориконазолу, итраконазолу, повышенная экспрессия генов CDR1, CDR2, MDR1, мутация E266D, V488I в гене ERG11.
70,1	<i>C. albicans</i>	ST 4016, устойчивый к флуконазолу, вориконазолу, итраконазолу, кетоконазолу, повышенная экспрессия генов CDR1, CDR2, мутации в гене ERG11 D116I, V488I.
8,2	<i>C. albicans</i>	ST 1561, устойчивый к анидулафунгину, позаконазолу, итраконазолу, кетоконазолу, флуконазолу, вориконазолу, повышенная экспрессия гена CDR1.
9,1	<i>C. albicans</i>	ST 1322, устойчивый к анидулафунгину, позаконазолу, итраконазолу, кетоконазолу, флуконазолу, вориконазолу, повышенная экспрессия генов ERG11, CDR1, CDR2, MDR1.
v13a3,1	<i>C. krusei</i>	Устойчивый к флуконазолу и кетоконазолу.
v13a3,2	<i>C. krusei</i>	Устойчивый к флуконазолу, нистатину и амфотерицину В.
v13a4,1	<i>C. krusei</i>	Устойчивый к флуконазолу, кетоконазолу итраконазолу, нистатину и амфотерицину В.
v13a4,2	<i>C. tropicalis</i>	Устойчивый к флуконазолу, кетоконазолу, нистатину и амфотерицину В.
v30a,3	<i>C. albicans</i>	Устойчивый к флуконазолу.
v34a	<i>C. tropicalis</i>	Устойчивый к флуконазолу
v36,a3	<i>C. albicans</i>	Чувствительный штамм.

Продолжение приложения 1

v39a	<i>C. albicans</i>	Устойчивый к флуконазолу, клотримазолу, итраконазолу, кетоконазолу, клотримазолу, нистатину и амфотерицину В.
V42a	<i>C. tropicalis</i>	Устойчивый к флуконазолу
v46a2	<i>C. albicans</i>	Устойчивый к флуконазолу, клотримазолу, итраконазолу, клотримазолу и амфотерицину В.
v47a3	<i>C. albicans</i>	ST 979, устойчивый к флуконазолу, вориконазолу, клотримазолу.
V54a3	<i>C. albicans</i>	Устойчивый к флуконазолу, клотримазолу, кетоконазолу, итраконазолу, клотримазолу и амфотерицину В.