

ДИАГНОСТИКА ИНВАЗИВНЫХ КАНДИДОЗОВ: НАУЧНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Кудряшова И.Б. ©

Кандидат биологических наук, научный сотрудник кафедры молекулярной биологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Рекстина В.В.

Научный сотрудник кафедры молекулярной биологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Аннотация.

*В обзоре отражены достижения и перспективы в диагностике микозов (инвазивных кандидозов) и возможности повышения ее эффективности, в том числе с помощью специфических антител и антигенов, выявленных и полученных с привлечением современных методов молекулярной биологии. Обсуждается перспектива использования белка клеточной стенки дрожжей *Bgl2p* в качестве антигена-маркера микозов человека и животных.*

Ключевые слова: микоз, инвазивный кандидоз, *Candida albicans*, диагностика, антитела, антигены, белки, *Bgl2p*.

Key words: *micosis, invasive candidiasis, Candida albicans, diagnosis, antibodies, antigens, proteins, Bgl2p.*

В окружающей человека среде обитает и находится в непосредственном с ним контакте огромное количество микроорганизмов, значительная часть которых способна вызывать заболевания различной степени тяжести. Среди этих микроорганизмов одно из первых мест занимают дрожжи и мицелиальные грибы, обитающие не только на органических субстратах в природных условиях, но и на кожных покровах и слизистых оболочках человека и других млекопитающих. В определенных условиях в итоге такого тесного контакта может развиваться микоз – болезнь, вызываемая патогенными видами этих микроорганизмов. При попадании патогена в кровь развивается наиболее тяжелая и опасная форма этого заболевания – инвазивный микоз. При этом возбудитель может циркулировать в крови, вызывая сепсис, и/или поражать внутренние органы и ткани [1, 58; 2, 5; 3, 1].

Микозы поражают пациентов в отделениях реанимации и интенсивной терапии [1, 58; 2, 5; 3, 1], проявляются в качестве сопутствующей инфекции у пациентов, страдающих раком и СПИДом [3, 1; 4, 45; 5, 736]. В этих случаях они сильно осложняют лечение и могут явиться основной причиной смертельного исхода болезни. В целом смертность от грибных инфекций выше, чем от малярии, рака груди и сравнима со смертностью от туберкулеза и ВИЧ [2, 5; 3, 1; 5, 736; 6, 371]. Несмотря на большое количество антимикотиков с различными фармакокинетическими, фармакодинамическими свойствами и спектрами действия успех лечения пациентов в значительной степени зависит от того, насколько быстро и качественно проводится диагностика и насколько точно определен возбудитель [2, 5; 7, 3; 8, 177].

Наиболее распространенными возбудителями инвазивных микозов признаны дрожжи рода *Candida* и мицелиальные грибы *Aspergillus*. Инвазивный кандидоз (ИК) – это микоз, вызванный дрожжами *Candida* (93–97% случаев). Основным возбудителем ИК

являются дрожжи вида *Candida albicans* (15–60% случаев ИК) [2, 5]. Однако спектр потенциальных патогенов значительно шире и включает такие виды *Candida* как *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, а также дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, упомянутые выше мицелиальные грибы *Aspergillus* и др. [2, 5; 9, 76]. Как отмечают многие исследователи, соотношение патогенных видов постоянно изменяется – так, в частности, число случаев ИК, вызванного *C. glabrata* и другими видами *Candida* за последнюю декаду заметно возросло [4, 45; 10, 17]. Поэтому ранняя диагностика ИК осложнена не только отсутствием характерных клинических признаков, но и большими затратами времени на идентификацию конкретного вида патогена [2, 5; 3, 1; 7, 3]. В силу своей распространенности, быстрой динамике развития, высокой летальности и большим затратам на лечение, ИК является объектом повышенного внимания не только медиков, но и исследователей по всему миру. Считается, что иницирующим фактором в развитии ИК является снижение иммунитета человека, однако факторы вирулентности грибов, механизм их действия на организм млекопитающих и роль в инициации и развитии патогенеза изучены недостаточно [6, 371]. Изучение молекулярно-биологических аспектов взаимодействия гриба-патогена с клетками млекопитающих, применение прогрессивных методов идентификации возбудителя, а также выявление специфических молекул-маркеров для ранней диагностики заболевания являются в настоящее время актуальной проблемой молекулярной биологии и медицины.

К настоящему моменту рядом отечественных и иностранных авторов опубликованы весьма подробные и информативные обзоры, посвященные анализу традиционных методов диагностики ИК, возможностям диагностики с применением современных технологий, а также их преимуществам и недостаткам [2, 5; 3, 1; 7, 3; 8, 177; 11, 2181; 12, 441; 13, 465; 14, 1284]. Не ставя себе задачей пересказ их содержания, мы постараемся остановиться на основных направлениях и тенденциях в совершенствовании диагностики ИК, в том числе выявлении высокоспецифичных антигенов, перспективных для повышения ее эффективности.

В упомянутых обзорах приведен ряд методов, признанных на данный момент эффективными для диагностики ИК: микроскопические, культуральные, серологические, включая ИФА (ELISA), молекулярно-генетические (ПЦР, секвенирование), физико-химические (MALDI-TOF масс-спектрометрия, ЯМР – ядерно-магнитный резонанс), а также технологии, основанные на использовании микрочипов (ДНК-микрочипы, микрофлюидные чипы), т.е. от традиционных методов – до наиболее новаторских.

В целом общепринятая на данный момент лабораторная диагностика особо опасных микозов – ИК, основана на использовании традиционных методов, таких как микроскопические исследования, выделение чистой культуры возбудителя с доказательством его двухфазности (явление конверсии из мицелиальной формы в дрожжевую), использование антигенов и антител, а также применении методов, связанных с выявлением и анализом нуклеиновых кислот, при этом согласно рекомендациям ESCMID (Европейское общество клинической микробиологии и инфекционных заболеваний) от 2012 г. посеvy крови и других «стерильных» в норме биосубстратов остаются основными методами диагностики ИК [15, 9]. Однако, как признают авторы указанных выше публикаций, культуральные микробиологические тесты малоэффективны для ранней диагностики ИК - при выделении чистой культуры возбудителей их видовая идентификация возможна не ранее, чем через 2-3 недели, при этом отрицательный результат при культивировании образцов крови не исключает наличия диссеминированной формы ИК, т.е. поражения внутренних органов. Прямое микроскопическое исследование нативного клинического материала позволяет лишь обнаружить клетки дрожжей или их отсутствие. Гистологические исследования с использованием антител (иммуногистохимические исследования) и флуоресцентно-

меченых олигонуклеотидных проб (гибридизация *in situ*) более информативны, с их помощью можно различать виды *Candida*, но их использование связано с получением соответствующего клинического материала, которое может быть крайне нежелательно или невозможно в силу высокой инвазивности [3, 1; 14, 1284, 7, 3].

Дополнительные возможности в получении информации о возбудителе дает серологическая диагностика – обнаружение *Candida* путем выявления циркулирующих в организме антигенов и антител к ним. В комплексе с микроскопическими и культуральными методами, она используется для ранней диагностики кандидозов и оценки иммунного ответа пациента [12(11), 441; 11, 2181; 13, 465]. Недостатком метода является сложность дифференцировки инфекции от колонизации только по наличию антител к *Candida*. Поскольку *Candida* являются обычными комменсалами кожных покровов, контакт приводит к образованию антител вне зависимости от наличия инфекции. Большая часть здоровых людей и неинфицированных пациентов госпиталей, имеют от умеренного до высокого титра IgG ко многим белкам клеточной поверхности *C. albicans*, связываемым с вирулентностью [13, 465]. Кроме того, их определение может быть затруднительным у иммунокомпроментированных пациентов [13, 465].

Внедрение в практику иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA) позволило повысить эффективность диагностики и стандартизовать качественную и количественную детекцию циркулирующих в крови антител/антигенов. Метод был разработан в начале 1990-х и с успехом используется для идентификации многих заболеваний, в том числе и для обнаружения *Candida* [12, 441; 11, 2181; 13, 465]. Метод позволяет проводить прямое определение в сыворотке и других биологических жидкостях. Высокая чувствительность детекции ферментативной метки, простота методов регистрации и относительно низкая цена обеспечивают этому методу широкое применение в клинической практике [11, 2181]. Основным недостатком этого метода – низкая специфичность и кросс-реактивность с другими антителами/антигенами [12, 441; 11, 2181; 13, 465]. Однозначного мнения относительно роли серологических методов в ранней диагностике ИК среди специалистов нет – как пишут Н. Васильева с соавторами: «Эффективные стандартизированные серологические методы диагностики не разработаны» [2, 5]. В то же время существуют и общепринятые в ранней диагностике ИК методы, такие как определение антигена маннана и антител к маннозным цепям маннопротеинов, определение β -D-глюкана и определение антител к ростовым трубкам *C. albicans*, используемые в комплексе с культуральными и микроскопическими [3, 1; 12, 441].

Ключевой задачей диагностики ИК, определяющей стратегию лечения, является не только идентификация рода гриба-возбудителя, но и определение его видовой принадлежности в возможно более короткие сроки. Наиболее точными и быстрыми современными методами для выполнения этой задачи являются молекулярно-генетические и протеомные.

Молекулярно-генетические методы основаны на анализе особенностей структуры нуклеиновых кислот (ПЦР в режиме реального времени, секвенирование 18(26)S рРНК и др.) и предназначены для выявления вариаций в структуре определенных участков ДНК (аллеля, гена, региона хромосомы) вплоть до расшифровки первичной последовательности, что обеспечивает выявление не только рода возбудителя и конкретного вида внутри рода, но и фенотипических вариантов, т.е. типирование внутри вида [12, 441; 16, 1559; 17, 130; 10, 17]. В пользу применения молекулярно-генетических методов свидетельствуют хорошо отработанные технологии репликации специфических последовательностей, не требующие больших материальных затрат, кроме того методы ПЦР хорошо адаптированы к разным задачам и в целом наиболее аккуратны и точны для определения *Candida* и других грибов [12, 441]. К. Клэнси с соавторами приводят следующие данные расширенного анализа, показавшего, что по обобщенным данным,

полученным разными исследователями, чувствительность и специфичность результатов ПЦР в определении предполагаемого ИК может достигать 95% и 92% соответственно [14, 1284]. Однако и у этих методов есть свои недостатки: это риск ложноположительных результатов при определении ИК за счет колонизации или загрязнения, недостаточная стандартизация и многоцентровая проверка достоверности – исследователи используют различные платформы для детекции, разные фракции крови и целевые гены. Поэтому, стандартизированные коммерческие тест-системы для проведения анализов в настоящее время еще находятся в стадии разработки [3, 1; 7, 3; 14, 1284], а такие перспективные для диагностики методы определения как, например, петлевая изотермическая амплификация (LAMP), обсуждаются в литературе, однако до их применения на практике видимо, еще далеко [12, 441].

Как отмечают российские и зарубежные специалисты, очень быстрые и точные результаты при проведении видовой идентификации возбудителя дает метод времяпролетного масс-спектрометрического анализа (MALDI-TOF MS, МАЛДИ) – метод видовой идентификации микроорганизмов, основанный на анализе масс-спектрометрического профиля белков с точным подтверждением не только наличия, но и видовой принадлежности микроорганизма [18, 87; 19, 17]. Время, необходимое для определения вида возбудителя ИК, не превышает при этом 15 минут [3, 1; 18, 87; 19,17].

Следующим этапом в развитии геномных и протеомных методов диагностики является использование микрочипов. При крайне малом расходе реагентов и исследуемого материала, использование микрочипов (microarray, ДНК-микрочипы) и технологий микрофлюидики дает уникальные по производительности, скорости и точности результаты при диагностике ИК [12, 441]. Однако их применение возможно лишь в высокоспециализированных научно-исследовательских лабораториях, имеющих соответствующее оборудование и квалифицированный персонал. Кроме того, стоимость самих чипов пока еще достаточно высока, чтобы применять их в рутинной практике.

Хорошие результаты показал метод ядерно-магнитного резонанса (NMR, ЯМР-спектроскопия) с использованием T2Candida panel – качественной платформы для диагностики ИК, получившей одобрение FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов, США). Этот полностью автоматизированный метод позволяет с очень высокой чувствительностью и специфичностью (до 91.1 % и до 99.4 % соответственно) проводить видовую идентификацию *Candida* менее чем за 5 часов в цельной крови и др. высоковязких образцах без их предварительной подготовки [12, 441; 20, 35]. Поскольку использование этого метода связано с наличием соответствующей дорогостоящей аппаратуры, а интерпретация полученных результатов достаточно сложна, его используют лишь в единичных лабораториях.

Таким образом, появление новых технологий и подходов к решению задач быстрой и эффективной диагностики ИК не решает эти задачи в полной мере. Несмотря на отмеченные выше недостатки и ограничения серологических методов, они все же остаются в числе наиболее доступных и эффективных вкпе с культуральными и микроскопическими, а тот потенциал, который заложен в использовании новых антигенов и антител к ним продолжает привлекать внимание исследователей. Хотя обнаружение *Candida* путем выявления циркулирующих в организме антигенов и антител к ним разрабатывалось и совершенствовалось на протяжении последних 30 – 40 лет, значительный прогресс в этой области достигнут сравнительно недавно, благодаря развитию методов молекулярной биологии, биотехнологии и появлению новых инструментов протеомного анализа.

Зоной первичного контакта и дальнейших взаимоотношений макро- и микроорганизма является клеточная поверхность последнего и ее внешняя часть –

клеточная стенка [5, 736; 6, 371]. Компонентами клеточной стенки являются полисахариды и разнообразные гликопротеины – белки, выполняющие структурные и ферментативные функции [21, 171]. Внимание многих исследователей, занятых разработкой более перспективных методов диагностики ИК, посвящено изучению роли этих соединений в процессе патогенеза [6, 371] и возможности использования в качестве антигенов-маркеров ИК. Перспективной группой таких антигенов могут служить как компоненты клеточной стенки дрожжей, так и продукты метаболизма грибов, выделяемые ими в окружающую среду, а также некоторые внутриклеточные белки [13, 465; 21, 1].

Полисахариды, являющиеся основными структурными компонентами клеточной стенки дрожжей – маннозные цепи маннопротеинов и (1,3)- β -D-глюкан – достаточно давно используются в качестве антигенов для определения присутствия *C. albicans* в моче, сыворотке, и других физиологических жидкостях [3, 1; 22, 232; 23,521; 24,1]. Маннозные цепи маннопротеинов являются поверхностным антигеном грибов рода *Candida*, они циркулируют в крови больных ИК, имеют высокую иммуногенность, показано, что положительные результаты определения маннана могут коррелировать с наличием ИК. Но, несмотря на наличие соответствующих коммерческих наборов для ИФА, вариабельность результатов все же высока, а чувствительность определения низка благодаря тому, что манновый антиген достаточно быстро выводится из сыворотки пациентов [13, 465]. Проведенный М. Микульской с соавторами анализ многочисленных данных, полученных разными исследователями показал, что, в среднем, чувствительность определения маннана в сыворотке может достигать 58%, а специфичность — 93%. Чувствительность и специфичность определения антиманновых антител были оценены в 59% и 83% соответственно, однако при комбинированном использовании обоих методов чувствительность и специфичность возростала до 83% и 86%, значительно повышая их прогностическую ценность [22, 232]. Хорошо изученным в плане диагностики и прогнозирования развития ИК биомаркером является (1,3)- β -D-глюкан (BDG). Он также, как маннан, присутствует в кровотоке при грибных инфекциях. Существуют различные стандартизованные тест-системы, позволяющие подтвердить или исключить наличие грибной инфекции, в том числе ИК, по наличию или отсутствию BDG, циркулирующего в крови [3, 1; 7, 3]. Прогностическая ценность определения BDG очень высока - снижение его уровня на фоне терапии свидетельствует об успешном лечении и благоприятном течении ИК, в то время как высокий уровень характерен для пациентов, у которых терапия не дала положительных результатов [7, 3; 23,521]. Но, как отмечают исследователи, диагностическая значимость этого метода сравнительно низка, поскольку BDG не специфичен для какого-либо конкретного вида грибов, показатели специфичности сильно варьируют и использовать его можно только как дополнительный [3, 1; 7, 3; 23,521].

Более эффективным оказалось использование искусственно сконструированных антител с комбинированной специфичностью к известным иммуногенным антигенам *C. albicans*. Было показано, что антитело bsmAb (MP65/bglu mAb), сконструированное из антител к (1,3)- β -D-глюкану и антител к MP65, мажорному иммуногенному маннопротеину клеточной поверхности *Candida*, участвующему в морфогенезе гиф и прикреплении клеток дрожжей, связывается одновременно с обоими антигенами, что значительно повышает специфичность и чувствительность анализа. Такие биспецифичные антитела (антитела с комбинированной специфичностью), сконструированные из антител к антигенам с известными вирулентными свойствами, с успехом могут быть использованы для создания ИФА тест-систем [24, 1].

Идея использования для диагностики различных белков-антигенов и их сочетания привела к выявлению новых биомаркеров ИК. Внедрение метода иммунопротеомного

анализа (сочетание двумерного электрофореза с последующим количественным Вестерн-блоттингом и масс-спектрометрией) вкуче с биоинформатическим анализом, позволило получать качественные и точные профили серологического ответа на белки *Candida* и выделить из них участвующие в процессе патогенеза, т.е. те, которые можно использовать как диагностические и прогностические биомаркеры.

А. Питарч с соавторами, используя серологический протеомный анализ, исследовали профили реактивности IgG антител к внутриклеточным белкам *Candida albicans* [25, 79]. Они обнаружили, что число идентифицируемых таким образом иммуногенных белков, связанных с клеточной стенкой дрожжей, в среднем было значительно выше для образцов из сыворотки больных ИК, чем в норме. В числе важных антигенов-маркеров ИК были идентифицированы мажорный конститутивный белок клеточной стенки *C. albicans* 1,3-β-глюкантрансфераза Vgl2p, ассоциированная с клеточной поверхностью Eno1p (енолаза-1) и некоторые другие. Была также выявлена положительная корреляция с неблагоприятным прогнозом в лечении и высокой летальностью для тех больных ИК, у которых титр антител (IgG) к белкам Vgl2p и Eno1p был низким. Высокий титр антител к этим белкам свидетельствовал о положительном прогнозе в развитии заболевания. Авторы считают, что высокая концентрация антител к Vgl2p может каким-то образом стимулировать суперэкспрессию Eno1p при компенсаторном ответе *C. albicans*, вызывая увеличение продукции защитных нейтрализующих антител к енолазе. Полученные результаты позволили авторам сделать вывод о том, что уровень антител к Vgl2p является весьма значимым диагностическим маркером ИК, вызванного видом *C. albicans*, а серологический ответ на Vgl2p и Eno1p в совокупности является также прогностическим маркером клинического исхода течения заболевания [25, 79]. Оказалось также, что штаммы *C. albicans* с делецией гена, кодирующего синтез белка Vgl2p, обладали сниженной вирулентностью [26, 367].

Позже, этими же авторами [27, 5165] было показано, что 15 из 22 обнаруженных в сыворотке пациентов IgG антител к выделенным из лизатов протопластов *C. albicans* белкам, могут быть использованы для диагностики ИК (при отсутствии нейтропении). С помощью иммуноферментного анализа была показана эффективность использования для этой цели обнаруженных в их числе антител к белку Hsp90 (белок теплового шока). Еще более точную идентификацию ИК у пациентов в отсутствие нейтропении дало использование сочетания антител к белкам Hsp90 и Eno1p, по сравнению с каждым из этих биомаркеров в отдельности [27, 5165].

В работе Джил-Бона с соавторами с помощью протеомного анализа были изучены белки, секретируемые патогенными дрожжами *C. albicans* (везикулы и свободный от везикул секретируемый материал) [28,142]. Было показано, что эти белки потенциально способны взаимодействовать с иммунной системой хозяина, что указывает не только на важность их участия в патогенном процессе, но и на возможность использования в качестве биомаркеров инфекций, вызванных *C. albicans*, либо как антигенов для разработки новых не клеточных вакцин. В числе таких биомаркеров были обнаружены белки Met6, Hsp90, Pgl1, Tdh3, Eno1 и белок Vgl2p [28,142]. Авторы отдельно отметили, что белок Vgl2p обладает протективными свойствами – внутриперитонеальная инъекция 0,3 мкг очищенного белка Vgl2p мышам в 25% случаев предотвращала их гибель от диссеминированного кандидоза после внутривенной инъекции летальной дозы клеток *C. albicans*. Мыши, которым не вводили Vgl2p, погибали в 100% случаев [28,142]. Значение Vgl2p, как возможного маркера ИК, было отмечено и другими авторами. Так, А. Мочон с соавторами, анализируя состав белков клеточной поверхности *C. albicans* и наличие соответствующих антител в образцах сыворотки больных ИК в норме и при колонизации, обнаружили антитела к 33 белкам с антигенными свойствами, которыми была обогащена сыворотка выздоравливающих пациентов. В числе белков с антигенными свойствами

была найдена и 1,3-β-глюкантрансфераза Vgl2p [21, 1]. Таким образом, использование белка Vgl2p в качестве специфического антигена-маркера для диагностики ИК представляется весьма целесообразным [25, 79; 27, 142; 21, 1]. В то же время, идея его использования для получения вакцины требует очень осторожного подхода – по нашим данным, белок Vgl2p имеет в своем составе амилоидогенные последовательности и способен к амилоидизации, т.е. к образованию амилоидных фибрилл *in vitro* [29, 91; 30, 175; 31, 4]. Поэтому он может быть использован только для получения сыворотки, содержащей антитела против Vgl2p из иммунизированных этим белком животных. Использование Vgl2p в качестве компонента вакцины для лечения человека в свете его амилоидных свойств представляется опасным в виду возможного побочного эффекта – амилоидоза органов и тканей.

Vgl2p – одна из основных глюкантрансфераз клеточной стенки грибов – белок с очень высокой консервативностью, иммунологически гомологичный у разных видов дрожжей, в том числе у *S. cerevisiae* и *C. albicans* [32, 6259]. Это позволяет получать этот белок-антиген из непатогенных дрожжей *S. cerevisiae*, что является большим преимуществом.

Попытки получить очищенный белок Vgl2p из клеточных стенок дрожжей *S. cerevisiae* предпринимались неоднократно, но в силу чрезвычайно прочного нековалентного закрепления в клеточной стенке дрожжей и очень высокой способностью к агрегированию, его получение было связано с большими методическими трудностями. Обработка клеточных стенок детергентами, использование ферментов и нагревания позволяли получить некоторое количество белка, большая часть которого терялась при дальнейших попытках очистить его с помощью колоночной хроматографии [32, 6259; 33, 2102; 34, 372]. Ранее в нашей группе был разработан метод экстракции белка Vgl2p из клеточных стенок дрожжей *S. cerevisiae* в воду нагреванием, позволивший получать достаточно высокий выход белка [30, 175] без привлечения затратных по времени и дорогостоящих процедур очистки на хроматографических колонках, использованных другими исследователями [32, 6259; 33, 2102; 34, 372]. Способ получения белка Vgl2p, был разработан с учетом его особенностей, в частности, устойчивостью к протеазам и термической обработке [30, 175].

Однако этот метод был достаточно эффективен только для получения аналитических количеств белка Vgl2p. Перспектива его использования для целей диагностики или получения сыворотки, содержащей антитела, для лечения ИК требовала разработки более простого и доступного метода выделения больших количеств белка. Метод был нами усовершенствован и упрощен, что позволило использовать коммерческие пекарские дрожжи *S. cerevisiae* и получать из них электрофоретически гомогенный белок с выходом не менее 75-100 мкг/г сухих дрожжей.

Метод был зарегистрирован в виде патента «Способ получения белка Vgl2p, являющегося гомологом антигена - маркера возбудителей микозов человека и животных» [35].

Как очевидно из приведенного материала, несмотря на достижения в разработке методов диагностики ИК, в клинической лабораторной практике они используются далеко не полностью, и диагностика базируется, в основном, на традиционных подходах к установлению вида, рода возбудителя и его свойств. Использование новых антигенов-маркеров ИК в сочетании с традиционными культуральными и микроскопическими методами может значительно приблизить к выполнению этой жизненно важной задачи.

Литература:

1. О.В. Шеховцова, Е.В. Шаталова - Механизм формирования госпитальных штаммов возбудителей внутрибольничных инфекций и способ их предупреждения// *Клин. Лаб. Диагн.* – 2012. – 7. - 58-61.
2. Н. В. Васильева, Н. Н. Климко, В. А. Цинзерлинг - Диагностика и лечение инвазивных микозов: современные рекомендации // *Вестник Санкт–Петербургской медицинской академии последипломного образования.* – 2010. – 2. – 4. – 5–18.
3. А.В.Веселов, Р.С.Козлов - Инвазивный кандидоз: современные аспекты эпидемиологии, диагностики, терапии и профилактики у различных категорий пациентов (в вопросах и ответах)// *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.- Приложение.- 2016.- 18.- 2. - 1-105.*
4. D. Diekema, S. Arbefeville, L. Boyken, J. Kroeger, M. Pfaller - The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades// *Diagn Microbiol Infect Dis.* - 2012. - 73(1). - 45-8.
5. F. Lanternier, S. Cypowyj, C. Picard, J. Bustamante, O. Lortholary, J. Casanova, A. Puel - Primary immunodeficiencies underlying fungal infections// *Curr Opin Pediatr.* - 2013. - 25(6). - 736-47.
6. N. Gow, M. Netea - Medical mycology and fungal immunology: new research perspectives addressing a major world health challenge//*Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* - 2016. – 5. – 371-1709.
7. J. Perfect - Fungal diagnosis: how do we do it and can we do better?//*Current Medical Research and Opinion.* – 2013. - 29(14). - 3-11.
8. D. Denning, D. Perlin, E. Muldoon, A. Colombo, A. Chakrabarti, M. Richardson, T. Sorrell - Delivering on Antimicrobial Resistance Agenda Not Possible without Improving Fungal Diagnostic Capabilities// *Emerging Infectious Diseases.* - 2017. - 23. - 2. - 177-183.
9. M. Arendrup, T. Boekhout, M. Akova, J. Meis, O. Cornely, O. Lortholary - ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections//*Clinical Microbiology and Infection.* 2014. – 20. - Supplement 3. - 76-98.
10. D. Enoch, H. Yang, S. Alivu, C. Micallef - The Changing Epidemiology of Invasive Fungal Infections//*Methods Mol. Biol.* – 2017. – 1508. - 17-65.
11. P. White, A. Archer, R. Barnes - Comparison of non-culture-based methods for detection of systemic fungal infections, with an emphasis on invasive *Candida* infections//*Journal of Clinical Microbiology.* – 2005. – 43. – 2181–2187.
12. M. Safavieh, C. Coarsey, N. Esiobu, A. Memic, J. Vyas, H. Shafiee, W. Asghar - Advances in *Candida* detection platforms for clinical and point-of-care applications//*Crit. Rev. Biotechnol.* - 2017. - 37(4). - 441-458.
13. S. Yeo, B. Wong - Current Status of Nonculture Methods for Diagnosis of Invasive Fungal Infections// *Clin. Microbiology Rev.* – 2002. – 15. - 3. - 465–484.
14. C. Clancy, M. Nguyen - Finding the “Missing 50%” of Invasive Candidiasis: How Nonculture Diagnostics Will Improve Understanding of Disease Spectrum and Transform Patient Care//*Clin. Infect. Dis.* – 2013. – 56(9). – 1284-92.
15. M. Cuenca-Estrella, P. Verweij, M. Arendrup, S. Arikian-Akdagli, J. Bille, J. Donnelly, H. Jensen, C. Lass-Flörl, M. Richardson, M. Akova, M. Bassetti, T. Calandra, E. Castagnola, O. Cornely, J. Garbino, A. Groll, R. Herbrecht, W. Hope, B. Kullberg, O. Lortholary, W. Meersseman, G. Petrikos, E. Roilides, C. Viscoli and A. Ullmann - ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures// *Clin Microbiol Infect.* – 2012. - 18 (Suppl. 7). - 9–18.

16. F. Saghrouni, J. Ben Abdeljelil, J. Boukadida, M. Ben Said - Molecular methods for strain typing of *Candida albicans*: a review// *Journal of Applied Microbiology*. – 2013 -114. - 1559-1574.
17. А.С. Гаффарова, А.Б. Хайтович - Факторы патогенности *Candida albicans* и их ПЦР-идентификация//*Успехи медицинской микологии*. - 2017. - т.XVII. - 130-133.
18. Е.Р. Рауш, Н.В. Васильева, А. Г. Полищук, Е. В. Шагдилеева, Д.М. Лавникевич, М.В. Руднева, Ю.В. Михайлова, Н.Н. Климко - Определение видов возбудителей инвазивного кандидоза: в поиске быстрых решений// *Проблемы медицинской микологии*. – 2013. – 15. – № 4. – 87–91.
19. P. Nenoff, M. Erhard, J. Simon, G. Muylowa, J. Herrmann, W. Rataj, Y. Gräser - MALDI-TOF mass spectrometry – a rapid method for identification of dermatophyte species// *Med Mycol*. – 2013. – 51. - 17–24.
20. F. Zervou, I. Zacharioudakis, J. Kurpewski, E. Mylonakis - T2 Magnetic Resonance for Fungal Diagnosis// *Methods Mol Biol*. – 2017. – 1508. - 305-319.
21. A. Mochon, J. Matthew A. Kayala, J. Wingard, C. Clancy, M. Nguyen, P. Felgner, P. Baldi, H. Liu - Serological Profiling of a *Candida albicans* Protein Microarray Reveals Permanent Host-Pathogen Interplay and Stage-Specific Responses during Candidemia//*Plos Pathol*. - 2010. - 6(3). – 1-14.
22. M. Mikulska, T. Calandra, M. Sanguinetti, D. Poulain, C.Viscoli - The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia//*Critical Care*. – 2010. – 14. – 222.
23. S. Jaijakul, J.Vazquez, R. Swanson, L. Ostrosky-Zeichner - (1,3)- β -D-Glucan Prognostic Marker of Treatment Response in Invasive Candidiasis//*Clin Infect Dis*. – 2012. - 55 (4). - 521-526.
24. A. Zito , C. Bromuro , G. Mandili, P. Chiani, A. Horenstein - A Murine, Bispecific Monoclonal Antibody Simultaneously Recognizing β -Glucan and MP65 Determinants in *Candida* Species//*PLoS One*. – 2016. - 9. - 11(2). – 1-15.
25. A. Pitarch, A. Jimenez, C. Nombela, C. Gil - Decoding serological response to *Candida* cell wall immunome into novel diagnostic, prognostic, and therapeutic candidates for systemic candidiasis by proteomic and bioinformatic analyses//*Mol. Cell. Proteomics*. - 2006. - 5(1). - 79-96.
26. A. Sarthy, T. McGonigal, M. Coen, D. Frost, J. Meulbroek, R. Goldman - Phenotype in *Candida albicans* of a disruption of the BGL2 gene encoding a 1,3- β -glucosyltransferase//*Microbiology*. -1997. - 143, 367–376.
27. A. Pitarch, C. Nombela, C. Gil. - Serum antibody signature directed against *Candida albicans* Hsp90 and enolase detects invasive candidiasis in non-neutropenic patients // *Proteome Res*. - 2014 Nov.- 7- 13(11). - 5165-84.
28. A. Gil-Bona, A. Llana-Palacios, C. Parra, F.Vivanco, C. Nombela, L. Monteoliva, C. Gil – Proteomics unravels extracellular vesicles as carriers of classical cytoplasmic proteins in *Candida albicans* //*J Proteome Res*. - 2015. – 2. - 14(1). - 142-53.
29. T. Kalebina, T. Plotnikova, A. Gorkovskii, I. Selyakh, O. Galzitskaya, E. Bezsonov, G.Gellissen, I. Kulaev - Amyloid-like properties of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall glucantransferase Bgl2p//*Prion*. - 2008. – 2(2). - 91-96.
30. E. Bezsonov, M. Groenning, O. Galzitskaya A. Gorkovskii, G. Semisotnov, I. Selyakh, R. Ziganshin, V. Rekestina, I. Kudryashova, S. Kuznetsov, I. Kulaev, and T. Kalebina - Amyloidogenic peptides of yeast cell wall glucantransferase Bgl2p as a model for the investigation of its pH-dependent fibril formation//*Prion*. - 2013. - 7(2). - 175-84.

31. В. В. Рекстина, А. А. Горковский, Е. Е. Безсонов, Т. С. Калебина - Амилоидные белки поверхности микроорганизмов: структура, свойства и значение для медицины// Вестник РГМУ. – 2016. – 1(4). 4-13.
32. F. Klebl, W. Tanner - Molecular cloning of a cell wall exo-beta-1,3-glucanase from *Saccharomyces cerevisiae*// J Bacteriol. – 1989. - 171(11). - 6259-64.
33. V. Mrsa, F. Klebl, W. Tanner - Purification and Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* BGL2 Gene Product, a Cell Wall Endo-b-1,3-Glucanase// J. of Bactriol. – 1993. – 175. – 7. - 2102-2210.
34. R. Goldman, P. Sullivan, D. Zakula, J. Capobianco - Kinetics of beta-1,3 glucan interaction at the donor and acceptor sites of the fungal glucosyltransferase encoded by the BGL2 gene//Eur J Biochem. - 1995. - 15. - 227(1-2). - 372-8.
35. Ф.А.Сабирзянов, В.В.Рекстина, М.А.Довженко, И.Б. Кудряшова, Е.С. Лобакова, С.А.Сабирзянова, Т.С. Калебина – Способ получения белка Bg12p, являющегося гомологом антигена-маркера возбудителей микозов человека и животных// Патент № 2563537 - 2015.