

Анисимова А.С., Полеева М.В., Аронова Н.В., Цимбалистова М.В., Павлович Н.В.

ОСОБЕННОСТИ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГРИБОВ РОДА *CANDIDA* С ПОМОЩЬЮ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА (MALDI-TOF MS)

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, 344002, Ростов-на-Дону, Россия

Цель работы – сравнительный анализ методов пробоподготовки образцов для эффективной идентификации грибов рода Candida с помощью масс-спектрометрического анализа. Исследовано 265 штаммов дрожжей и дрожжеподобных грибов, выделенных из мокроты больных с пневмониями. Идентификацию отобранных штаммов проводили общепринятыми методами (по культуральным, морфологическим, тинкториальным, ферментативным свойствам) и MALDI-ToF MS с использованием масс-спектрометра Autoflex speed III Bruker Daltonics (Германия) и программного обеспечения Flex Control. Для оценки эффективности определения видовой принадлежности грибов выполнен сравнительный анализ подготовки образцов с помощью 4-х методов: прямого нанесения на мишень, расширенного метода прямого нанесения, экстракции белков с использованием этанола/муравьиной кислоты или трифторуксусной кислоты. Ускоренная схема идентификации грибов культуральным методом не обеспечивает получения четких и однозначных результатов. При использовании масс-спектрометрического анализа достоверность результатов зависит от пробоподготовки образцов. Проведено сравнительное изучение эффективности определения видовой принадлежности грибов при различных методах подготовки материала на коллекции 50 клинических изолятов. Выявлено, что экстракция клеток с помощью ТФУ кислоты не приводит к появлению регистрируемых спектров белков. Применение методов прямого и расширенного прямого нанесения позволило установить вид только у 32-44% штаммов. Наиболее эффективным способом пробоподготовки оказался метод с использованием муравьиной кислоты и этанола, который позволил определить видовую принадлежность у 100% изучаемых грибов (Score 2.0). В зависимости от вида дрожжей, высокий статистический показатель (Score ≥ 2.3) зарегистрирован для 42-100% образцов. Использование MALDI-ToF MS является наиболее достоверным и информативным методом идентификации грибов рода Candida.

Ключевые слова: грибы рода *Candida*; MALDI-ToF MS; методы пробоподготовки.

Для цитирования: Анисимова А.С., Полеева М.В., Аронова Н.В., Цимбалистова М.В., Павлович Н.В. Особенности идентификации грибов рода *Candida* с помощью масс-спектрометрического анализа (MALDI-ToF MS). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (4): 244-249. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-4-244-249>

Для корреспонденции: Анисимова Анастасия Сергеевна, мл. науч. сотр. лаб. природно-очаговых и зоонозных инфекций; e-mail: info@tularemia.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 09.12.2021

Принята к печати 18.03.2022

Опубликовано 17.04.2022

Anisimova A.S., Poleeva M.V., Aronova N.V., Tsimbalistova M.V., Pavlovich N.V.

PECULIARITIES OF *CANDIDA* YEAST IDENTIFICATION BY MASS SPECTROMETRIC ANALYSIS (MALDI-TOF MS)

Federal State Health Institution «Rostov-on-Don Anti-Plague Institute» of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, 344002 Rostov-on-Don, Russia

To carry the comparative analysis of sample preparation methods for the most effective identification of Candida yeast by mass spectrometric analysis. 265 strains of yeast and yeast-like fungi isolated from the sputum of patients with pneumonia were investigated. The selected strains were identified by conventional methods (cultural, morphological, tinctorial, enzymatic properties) and MALDI-ToF MS using the Autoflex speed III Bruker Daltonics mass spectrometer (Germany) and Flex Control software. To evaluate the effectiveness of fungi species determination, the comparative analysis of sample preparation was performed using 4 methods: direct application to the target, an extended direct application method, protein extraction using ethanol/formic acid or trifluoroacetic acid. The accelerated scheme of identification of fungi by the culture method does not provide clear and unambiguous results. When using mass spectrometric analysis, the reliability of the results depended on the sample preparation. A comparative study of the effectiveness of fungi species determination by various methods of the sample preparation of 50 clinical isolates was carried out. It was revealed that the extraction of cells using TFC acid does not lead to the appearance of the recordable protein spectra. The use of direct and extended direct application methods made it possible to establish the species only in 32-44% of the strains. The most effective method of sample preparation was the method using formic acid and ethanol, which allowed us to determine the species affiliation in 100% of the studied fungi (Score 2.0). Depending on the yeast species, a high statistical indicator (Score ≥ 2.3) was registered for 42-100% of samples. The results of present study show that the use of MALDI-ToF MS is the most reliable and informative method of Candida spp. identification.

Key words: *Candida* fungi; MALDI-ToF MS; sample preparation methods.

For citation: Anisimova A.S., Poleeva M.V., Aronova N.V., Tsimbalistova M.V., Pavlovich N.V. Peculiarities of *Candida* yeast identification by mass spectrometric analysis (MALDI-ToF MS). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (4): 244-249 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-4-244-249>

For correspondence: Anisimova A.S., Junior Researcher at the Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections; e-mail: info@tularemia.ru

Information about authors:

Anisimova A.S., <https://orcid.org/0000-0002-4010-2138>;
Poleeva M.V., <https://orcid.org/0000-0001-8086-376X>;
Aronova N.V., <https://orcid.org/0000-0002-7772-9276>;
Tsimbalistova M.V., <https://orcid.org/0000-0002-4091-649X>;
Pavlovich N. V., <https://orcid.org/0000-0001-8287-4294>.

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 09.12.2021

Accepted 18.03.2022

Published 17.04.2022

Введение. Интенсификация промышленного и сельскохозяйственного производства, сокращение зелёных массивов, использование различных химикатов, другие факторы деятельности человека ведут к постоянному ухудшению экологической обстановки на планете. Следствием подобных процессов является изменение естественного биоценоза, которое при снижении иммунного статуса организма человека, обуславливает преодоление межвидового барьера (от диких животных к человеку) и появление новых инфекционных заболеваний. При этом всё большее значение приобретают заболевания, вызванные ассоциацией микроорганизмов, в частности, вирусы-бактерии-грибы. Грибы в редких случаях являются возбудителями болезней, однако, присоединяясь к бактериальным возбудителям, они осложняют течение инфекционного процесса. Роль грибов в инфекционной патологии человека в последние годы существенно возрастает. Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) отмечает, что около 20% населения мира страдает микозами. Несмотря на все усилия по профилактике, диагностике и лечению, количество выявляемых кандидозов имеет тенденцию к увеличению [1].

Эта проблема резко усугубилась из-за развития пандемии новой коронавирусной инфекции (COVID-19), вызванной вирусом SARS-CoV-2. Данное заболевание характеризуется полисимптомокомплексом, однако наиболее тяжёлое течение определяет вирусное поражение лёгких при резком снижении иммунного статуса организма (цитокиновый хаос, лейкопения и др.). Широкое применение антибактериальных и кортикостероидных препаратов, рекомендованных для лечения пациентов с COVID-19, значительно повышает риск появления микотических осложнений [2]. Иллюстрацией может служить тот факт, что при исследовании микробного спектра мокроты у больных с ковидной пневмонией чётко показано присутствие различных видов дрожжей в диагностических количествах (около 40% пациентов) [3, 4].

Кандидозное поражение органов при бактериальных или вирусных болезнях существенно осложняет течение инфекционного процесса и снижает эффективность этиотропной терапии, что может повышать процент неблагоприятных исходов заболевания. Это обуславливает необходимость определения всех ассоциантов (вирусы, бактерии, грибы), вызывающих поражение лёгких.

При микологическом исследовании важным этапом является идентификация грибов до вида с оценкой их чувствительности к антимикотикам, так как в литературе имеются данные о постепенной смене наиболее распространённых видов кандид на более экзотические [1]. Осуществляется постепенный переход от наиболее часто выделяемой при различных заболеваниях *C. albicans* к видам *C. non-albicans* (*C. tropicalis*, *C. gla-*

brata, *C. parapsilosis*). *C. glabrata* является наиболее распространённым видом в Северной Европе и США, тогда как в Испании и Бразилии более часто выявляется *C. parapsilosis*. В Азиатском регионе превалирует *C. tropicalis* [5, 6]. Увеличивается уровень резистентности к антимикотикам у изолятов, отличных от *C. albicans* (особенно *C. tropicalis* и *C. glabrata*) [7]. Следует учитывать, что *C. tropicalis* относится к опасным видам, так как способна проникать в кровь и периферические органы [8, 9]. Не очень распространены, но считаются опасными грибы вида *C. krusei*, характеризующиеся устойчивостью к различным антимикотикам. Важным этапом культурального исследования является правильная идентификация гриба и мониторинг возможной смены вида грибов в процессе лечения.

Диагностика микозов хорошо разработана и включает культуральный, иммунологический, молекулярно-генетический методы. Поскольку кандиды относятся к условно-патогенным возбудителям и являются частыми сапрофитами слизистых оболочек человека, иммунологические и молекулярно-генетические методы не являются информативными. Одним из современных методов для быстрой идентификации микроорганизмов является использование времяпролётной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) [10]. Эта технология внесла существенные изменения в работу микробиологических лабораторий, так как позволяет сократить время идентификации чистых культур до нескольких минут и повысить достоверность получаемых результатов. Идентификация микроорганизмов происходит по масс-спектрам рибосомальных белков и проводится в режиме реального времени путём автоматического сравнения полученных масс-пиков образца с базой данных [11]. Важной характеристикой полученного результата является условный показатель, отражающий точность (достоверность) проведенной оценки. Согласно требованиям программного обеспечения MALDI Biotyper для приборов фирмы Bruker Daltonics (Германия) значение этого показателя (Score) должно быть не менее 2,3 для высокой степени вероятности определения вида. По данным ряда авторов, при проведении идентификации кандидат с помощью масс-спектрометрического анализа получаемые результаты не всегда отвечают необходимому уровню достоверности, в частности, в отдельных случаях кандиды либо не определяются, либо характеризуются показателем Score 1,7 – <2,0, что свидетельствует о достоверной идентификации рода, но не вида [12]. Данный факт относится преимущественно к виду *C. albicans*. Нельзя исключать, что кандиды в связи с особенностями своей клеточной стенки требуют особой пробоподготовки. В рекомендациях нет единого мнения

по выбору оптимальных методов проведения белкового профилирования кандид (Методические рекомендации МР 4.2.0089-14, Методические указания для работы на приборах серии flex компании Bruker Daltonics «Прямое белковое профилирование»; 2010 г.).

Целью исследования явился сравнительный анализ методов пробоподготовки образцов для получения наиболее эффективных результатов идентификации грибов рода *Candida* с помощью масс-спектрометрического анализа.

Материал и методы. В работе использованы 265 штаммов грибов рода *Candida*, полученных при исследовании клинических образцов мокроты от больных с пневмонией. Грибы культивировали на агаре Сабуро и хромогенной среде HiCrome Candida Agar (HiMedia, Индия) при температуре 37° С. Видовую идентификацию проводили по культуральным, морфологическим, тинкториальным, ферментативным свойствам (ферментация глюкозы, лактозы, сахарозы, галактозы, мальтозы, трегалозы). Учёт результатов проводили в соответствии с Методическими рекомендациями НИ-ИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи РАМН «Грибы рода *Candida*. Методы выделения, идентификации на видовом уровне и определение чувствительности к противогрибковым препаратам» [14].

Для дальнейшей работы создана коллекция, включающая 47 изолятов грибов рода *Candida*, отличающихся по морфологии роста и 3 культуры *Geotrichum capitatum*. Видовую идентификацию отобранных штаммов проводили методом времяпролётной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) с использованием масс-спектрометра Autoflex speed III Bruker Daltonics (Германия) и программного обеспечения MALDI Biotyper. Полученные масс-спектры сравнивали с базой белковых спектров микроорганизмов компании Bruker версия 3.1.66 (Bruker Daltonics, Германия). Вероятность соответствия исследуемого спектра известному таксону определяли по показателю Score: высокая достоверность видовой идентификации характеризуется $Score \geq 2,3$; высокая достоверность родовой идентификации и вероятная идентификация вида – $Score 2,0 - < 2,3$; возможная родо-видовая идентификация – $Score 1,7 - < 2,0$; $Score < 1,7$ – отсутствие надёжной идентификации.

Подготовку образцов для масс-спектрометрии осуществляли с помощью 4-х методов: прямым нанесением образцов на мишень, расширенным методом прямого нанесения, путём экстракции белков с использованием этанола и муравьиной кислоты, экстракции трифторуксусной кислотой (МР 4.2.0089-14, МУ для работы на приборах серии flex компании Bruker Daltonics «Прямое белковое профилирование»; 2010 г.) [13]. При прямых методах материал на мишень наносили последовательно на две лунки с истощением образца. В качестве матрицы использована α -циано-4-гидроксикоричная кислота.

Для устранения возможных случайных отклонений учитывали результаты, полученные в 2-3-х экспериментах.

Результаты. В декабре 2020 г. на базе ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора проведено исследование видового состава возбудителей пневмоний у коронапозитивных (COVID-19⁺) и коронанегативных (COVID-19⁻) пациентов ($n=429$). Микрофлора мокроты представлена грамотрицательными и грамположительными бактериями [4]. В 46% случаев от больных, которые имели грибы

в диагностических количествах ($\geq 10^4$ кл./мл), изолированы 199 штаммов. От пациентов с кандидоносительством ($\leq 5 \cdot 10^3$ кл./мл) выделено ещё 66 культур грибов. При сравнительном анализе инфицирования кандидами у COVID-19⁺ и COVID-19⁻ больных достоверная разница не установлена. Высокая частота обнаружения грибов обусловила целесообразность проведения их быстрой и точной видовой дифференциации. Научный и практический интерес представлял видовой спектр грибов.

По культуральным свойствам на среде Сабуро удалось чётко дифференцировать штаммы, относящиеся к видам *C. krusei* и *Geotrichum capitatum*. Другие грибы имели похожую морфологию колоний и для определения их видовой принадлежности необходимы иные методы. Информативным оказался посев на хромогенную среду HiCrome Candida Agar, на которой различные виды грибов приобретали разную окраску. Через 24-48 часов инкубации колонии *C. albicans* приобретали зелёный оттенок, *C. tropicalis* – синий с металлическим блеском, *C. krusei* – пурпурный, *C. glabrata* – белый. Ряд культур из исследуемой коллекции, которые в дальнейшем идентифицированы как *C. kefyr*, *C. inconspicua*, *C. dubliniensis*, давали окраску, подобную другим видам, что затрудняло их дифференциацию. Виды *C. kefyr*, *C. inconspicua* имели белый цвет, как и *C. glabrata*, а *C. dubliniensis* окрашивалась в сине-зелёный цвет, как и *C. albicans*, *G. capitatum* имел пурпурный, аналогичный *C. krusei*.

Попытки уточнить таксономическое положение выделенных грибов с помощью исследования их ферментативной активности (глюкоза, лактоза, сахароза, галактоза, мальтоза, трегалоза) не увенчались успехом. Идентифицированы только два вида грибов рода *Candida* – биохимически инертная *C. krusei* и ферментирующая лактозу *C. kefyr* [14]. Получить однозначные результаты по этим тестам не удалось.

Общепринятые методы идентификации грибов рода *Candida* трудоёмки, требуют много времени, и не всегда дают чёткие результаты.

При идентификации возбудителей инфекционных заболеваний широкое распространение получил метод масс-спектрометрии (MALDI-ToF MS), который позволяет получать быстрые и достоверные результаты исследования (МР 4.2.0089-14) [13]. Для дальнейшей работы по идентификации грибов с помощью масс-спектрометрического анализа сформирована коллекция из 50 клинических штаммов, отличающихся по тем или иным признакам, включая 3 штамма *G. capitatum*. Все образцы выделены от больных в этиологически значимых количествах, что предполагает их участие в патогенезе пневмонии.

При проведении масс-спектрометрического анализа с помощью прямого нанесения образцов на мишень в большом количестве случаев видовой принадлежность различных грибов не установлена. При исследовании материала в первой лунке достоверно определить таксон не удалось у 88% штаммов ($Score \leq 1,7$), тогда как во второй лунке (с меньшим количеством исследуемой культуры) – принадлежность не установлена у 40% штаммов (табл. 1).

Частота достоверных результатов выше во второй лунке, что, по-видимому, связано с лучшей кристаллизацией материала при более тонком нанесении материала на пластину. Однако, и в этом случае процент штаммов,

Сравнительный анализ результатов белкового профилирования образцов при двукратном последовательном нанесении материала с помощью прямого метода

Вид грибов, количество штаммов, <i>n</i>	Уровень достоверности (Score)	Идентификация штаммов методом прямого нанесения, % (абс.)	
		1 лунка нанесения	2 лунка нанесения
Общее количество штаммов, <i>n</i> =50	2,0-<2,3	2 (1)	44 (22)
	1,7-<2,0	10 (5)	16 (8)
	<1,7	88 (44)	40 (20)
<i>C. albicans</i> , <i>n</i> =33	2,0-<2,3	0	42 (14)
	1,7-<2,0	15 (5)	18 (6)
	<1,7	85 (28)	39 (13)
<i>C. non-albicans</i> , <i>n</i> =17	2,0-<2,3	6 (1)	47 (8)
	1,7-<2,0	0	12 (2)
	<1,7	94 (16)	41 (7)

идентифицированных до вида (Score>2,0), составлял менее 50% (см. табл. 1).

Это определило целесообразность изучения влияния пробоподготовки на эффективность идентификации грибов методом MALDI-ToF масс-спектрометрии. Для реализации данной цели использован прямой и расширенный прямой методы (с учётом результатов второго последовательного нанесения), методы экстракции образцов муравьиной и трифторуксусной кислотой (ТФУ). Ни у одного из исследуемых штаммов при применении прямого и расширенного прямого методов нанесения не удалось определить видовую принадлежность с высокой степенью достоверности (Score≥2,3). 32-44% штаммов грибов имели точность идентификации с показателем достоверности 2,0-<2,3 (табл. 2). Проведенное исследование показало непригодность использования ТФУ-кислоты при идентификации грибов методом MALDI-ToF, так как получить белковые профили с помощью этого метода не удалось.

Наиболее эффективным оказался метод пробоподготовки с помощью обработки клеток грибов этанолом и муравьиной кислотой. Точность оценки таксономической принадлежности исследованных грибов с показателем достоверности Score≥2,0 составила 100% для всех видов грибов, из них 50% имели высокие показатели Score≥2,3. При использовании данного метода в исследуемой коллекции точно определено таксономическое положение всех видов грибов рода *Candida* и *G. capitatum*. Некоторые особенности экстракции белков с этанолом и муравьиной кислотой наблюдались при исследовании штаммов *G. capitatum*. Для получения более высокой достоверности результата требовалось увеличить в 2 раза количество микробного материала для экстракции по сравнению с грибами рода *Candida*.

При сравнительном изучении методов пробоподготовки грибов для белкового профилирования с помощью MALDI-ToF MS выявлено, что наиболее адекватным и эффективным методом является экстракция микробных белков с использованием муравьиной кислоты и этанола.

Заключение. По мнению некоторых авторов, сегодня человечество переживает эпидемию оппортунистических инфекций, вызываемых условно-патогенными микроорганизмами. Среди них важное место занимают грибы, из которых наиболее частыми возбудителями микозов являются грибы рода *Candida* [15].

Подтверждение получено при изучении этиологической структуры внебольничных пневмоний на фоне пандемического распространения коронавируса инфекции. Часто (около 40%) из мокроты больных изолированы различные виды грибов [3, 4]. При идентификации до вида выделенных грибов мы столкнулись с определенными трудностями. Традиционные методы диагностики не всегда давали однозначный результат, позволяющий определить таксономическое положение грибов. Некоторые виды кандид, например, *C. albicans* и *C. dubliniensis* имеют идентичную окраску на хромогенной среде и морфологию колоний.

В настоящее время широкое применение в лабораторной практике получили методы автоматической идентификации микроорганизмов с использованием анализаторов, например, Microscan, Vitek, MALDI-ToF MS и др., которые позволяют быстро получить информацию о виде возбудителя заболевания.

Вместе с тем, проведенное нами исследование с помощью MALDI-ToF MS по идентификации дрожжей, выделенных от больных с пневмониями, показало, что на достоверность получаемых результатов значительно влияет пробоподготовка образцов для белкового профилирования. Как установлено, при прямом и расширенном прямом методах нанесения достоверно определить видовую принадлежность грибов (Score ≥ 2,0) удается лишь в 32 – 44% случаев. Следует отметить, что несколько лучшие результаты были получены при изучении белковых спектров во второй лунке при более тонком нанесении материала. Использование метода экстракции с помощью ТФУ-кислоты оказалось неинформативным. В то же время доказано, что наиболее оптимальным способом подготовки культур дрожжевых грибов для масс-спектрометрической идентификации является применение этанола и муравьиной кислоты. В этом случае определяется видовая принадлежность 100% грибов с показателем Score ≥ 2,0 и, в зависимости от вида, 42 – 100% со Score ≥ 2,3.

Таким образом, для идентификации грибов MALDI-ToF MS является наиболее предпочтительным, быстрым и информативным методом определения их видовой принадлежности. В условиях чрезвычайной ситуации (например, пандемия коронавирусной инфекции) при большом объеме проводимых исследований данный метод является удобным подспорьем в лабораторной практике изучения возбудителей оппортунистических инфекций.

Результаты сравнительного изучения трех методов пробоподготовки образцов дрожжей для масс-спектрометрического анализа

Вид грибов, количество штаммов, <i>n</i>	Уровень достоверности (Score)	Идентификация штаммов разными методами пробоподготовки, % (абс.)		
		Прямой метод нанесения	Расширенный метод прямого нанесения	Экстракция этанолом и муравьиной кислотой
Общее количество штаммов, <i>n</i> =50	≥2,3	0	0	50 (25)
	2,0-<2,3	44 (22)	32 (16)	50 (25)
	1,7-<2,0	16 (8)	46 (23)	0
	<1,7	40 (20)	22 (11)	0
<i>C. albicans</i> , <i>n</i> =33	≥2,3	0	0	42 (14)
	2,0-<2,3	42 (14)	27 (9)	58 (19)
	1,7-<2,0	18 (6)	45 (15)	0
	<1,7	39 (13)	27 (9)	0
<i>C. krusei</i> , <i>n</i> =4	≥2,3	0	0	100 (4)
	2,0-<2,3	50 (2)	50 (2)	0
	1,7-<2,0	25 (1)	50 (2)	0
	<1,7	25 (1)	0	0
<i>C. glabrata</i> , <i>n</i> =4	≥2,3	0	0	75 (3)
	2,0-<2,3	50 (2)	25 (1)	25 (1)
	1,7-<2,0	25 (1)	25 (1)	0
	<1,7	25 (1)	50 (2)	0
<i>Geotrichum capitatum</i> , <i>n</i> =3	≥2,3	0	0	66 (2)
	2,0-<2,3	33 (1)	33 (1)	33 (1)
	1,7-<2,0	0	66 (2)	0
	<1,7	66 (2)	0	0
<i>C. dubliniensis</i> , <i>n</i> =2	≥2,3	0	0	50 (1)
	2,0-<2,3	50 (1)	100 (2)	50 (1)
	1,7-<2,0	0	0	0
	<1,7	50 (1)	0	0
<i>C. kefir</i> , <i>n</i> =2	≥2,3	0	0	50 (1)
	2,0-<2,3	50 (1)	100 (2)	50 (1)
	1,7-<2,0	0	0	0
	<1,7	50 (1)	0	0
<i>C. tropicalis</i> , <i>n</i> =1	≥2,3	0	0	1
	2,0-<2,3	1	0	0
	1,7-<2,0	0	1	0
	<1,7	0	0	0
<i>C. inconspicua</i> , <i>n</i> =1	≥2,3	0	0	0
	2,0-<2,3	0	1	1
	1,7-<2,0	0	0	0
	<1,7	1	0	0

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 5–10 см. REFERENCES)

- Багирова Н.С. Инвазивные грибковые инфекции: пересмотр определений, новое в диагностике по данным EORTC/MSGERC. *Злокачественные опухоли*. 2020; 3s1: 39-48. DOI: 10.18027 / 2224-5057-2019-10-3s1-39-48.
- Бондаренко А.П., Шмыленко В.А., Троценко О.Е., Котова В.О., Бутакова Л.В., Базыкина Е.А. Характеристика бактериальной микрофлоры, выделенной из проб мокроты больных пневмонией в Хабаровске и Хабаровском крае в начальный период пандемии COVID-19 (май-июнь 2020 г.). *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 3:43-9. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-43-49.
- Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Носков А.К., Ковалёв Е.В., Чемисова О.С. и др. Особенности этиологии внебольничных пневмоний, ассоциированных с COVID-19. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 4:99-105. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-4-99-105.
- Попов Д.А., Овсенко С.Т., Вострикова Т.Ю. Применение метода MALDI-ToF MS в современной микробиологической лаборатории. *Поликлиника*. 2016; 1-3: 53-6.
- Муравьёва В.В., Припутневич Т.В., Завьялова М.Г., Анкирская А.С., Ильина Е.Н. Сравнительная оценка видовой идентификации вагинальных изолятов дрожжевых грибов методом MALDI-ToF MS и традиционными (биохимическим и фенотипическим) методами. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2014; 16 (1):11-7.
- Чеботарь И.В., Поликарпова С.В., Бочарова Ю.А., Маянский Н.А. Использование времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) для идентификации бактериальных и грибковых возбудителей III-IV групп патогенности. *Лабораторная служба*. 2018; 7(2):78-86. DOI: 10.17116/labs20187278-86.
- Кубась В.Г. Этиология, патогенез и лабораторная диагностика кандидоза. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.rusmedserv.com/mycology/html/kandidoz3.htm> (дата обращения 15.11.21).

15. Селькова Е.П. Кандидозы: клиника и лабораторная диагностика. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.gabrich.com/science/candid-obzor.html> (дата обращения 15.11.21).

REFERENCES

1. Bagirova N.S. Invasive fungal infections: revision of definitions, new in diagnostics according to EORTC/MSGERC. *Zlokachestvennye opukholi*. 2020; 3s1: 39-48. DOI: 10.18027 / 2224-5057-2019-10-3s1-39-48 (in Russian)
2. Song G., Liang G., Liu W. Fungal Co-infections Associated with Global COVID-19 Pandemic: A Clinical and Diagnostic Perspective from China. *Mycopathologia*. 2020; 185(4):599-606. DOI: 10.1007/s11046-020-00462-9.
3. Bondarenko A.P., Shmylenko V.A., Trotsenko O.E., Kotova V.O., Butakova L.V., Bazykina E.A. Characteristics of bacterial microflora isolated from sputum of patients with pneumonia registered in Khabarovsk city and Khabarovsk territory in the initial period of COVID-19 pandemic in may-june, 2020. *Problemy osobo opasnykh infektsii*. 2020; 3:43-9. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-43-49. (in Russian)
4. Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Noskov A.K., Kovalev E.V., Chemisova O.S. et al. Features of the etiology of community-acquired pneumonia associated with COVID-19. *Problemy osobo opasnykh infektsii*. 2020; 4:99-105. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-4-99-105. (in Russian)
5. Steinbach W.J., Roilides E., Berman D., Hoffman J.A., Groll A.H., Bin-Hussain I. et al. Results from a prospective, international, epidemiologic study of invasive candidiasis in children and neonates. *International pediatric fungal network. pediatr. infect. dis. j.* 2012; 31:1252-7. DOI: 10.1097/INF.0b013e3182737427.
6. Kathuria S., Singh P.K., Sharma C., Prakash A., Masih A., Kumar A. et al. Multidrug-resistant *Candida auris* misidentified as *Candida haemulonii*: characterization by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and DNA sequencing and its antifungal susceptibility profile variability by Vitek 2, CLSI broth microdilution, and Etest method. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53(6):1823-30. DOI: 10.1128/JCM.00367-15.
7. Pana Z.D., Roilides E., Warris A., Groll A. H., Zaoutis T. Epidemiology of invasive fungal disease in children. *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.* 2017; 6: S3-11. DOI: 10.1093/jpids/pix046.
8. Togano T., Suzuki Y., Nakamura F., Tse W, Kume H. Epidemiology of visceral mycoses in patients with acute leukemia and myelodysplastic syndrome: analyzing the national autopsy database in Japan. *Med. Mycol. J.* 2021; 59(1):50-7. DOI: 10.1093/mmy/myaa029.
9. Kume H., Yamazaki T., Togano T., Abe M., Tanuma H., Kawana S. et al. Epidemiology of visceral mycoses in autopsy cases in Japan: comparison of the data from 1989, 1993, 1997, 2001, 2005 and 2007 in Annual of Pathological Autopsy Cases in Japan. *Med. Mycol. J.* 2011; 52(2):117-27. DOI: 10.3314/jjmm.52.117.
10. Oliver J.C., Laghi L., Parolin C., Foschi C., Marangoni A., Liberatore A. et al. Metabolic profiling of *Candida* clinical isolates of different species and infection sources. *Sci. Rep.* 2020; 10(1):16716. DOI: 10.1038/s41598-020-73889-1.
11. Popov D.A., Ovseenko S.T., Vostrikova T.Yu. Application of the MALDI-TOF MS method in a modern microbiological laboratory. *Poliklinika*. 2016; 1-3: 53-6. (in Russian)
12. Murav'eva V.V., Pripitnevich T.V., Zav'yalova M G., Ankirskaya A.S., Il'ina E. N. Comparative assessment of species identification of vaginal yeast isolates by MALDI-ToF MS and traditional (biochemical and phenotypic) methods. *Klinicheskaya mikrobiologiya I antimikrobnaya khimioterapiya*. 2014; 16 (1):11-7. (in Russian)
13. Chebotar' I.V., Polikarpova S.V., Bocharova Yu.A., Mayanskii N.A. Use of time-of-flight mass spectrometry with matrix-activated laser desorption / ionization (MALDI-ToF MS) for identification of bacterial and fungal pathogens of III-IV pathogenicity groups. *Laboratornaya sluzhba*. 2018; 7(2):78-86. DOI: 10.17116/labs20187278-86. (in Russian)
14. Kubas' V.G. Etiology, pathogenesis and laboratory diagnosis of candidiasis. Available at: <http://www.rusmedserv.com/mycology/html/kandidoz3.htm> (accessed 15 November 2021) (in Russian)
15. Sel'kova E.P. Candidiasis: clinic and laboratory diagnostics. Available at: <http://www.gabrich.com/science/candid-obzor.html> (accessed 16 November 2021). (in Russian)