

## Формирование биопленок у изолятов *Candida* spp., выделенных из гемокультуры от больных с опухолями и без опухолей системы крови

Мальчикова А.О., Клясова Г.А.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, Москва, Россия

Контактный адрес:  
Анна Олеговна Мальчикова  
Эл. почта: anmalchikova@gmail.com

Ключевые слова: кандидемия,  
*Candida* spp., биопленки, опухоли  
системы крови.

**Цель.** Определить способность к формированию биопленок у изолятов *Candida* spp., выделенных из гемокультуры от больных с опухолями и без опухолей системы крови.

**Материалы и методы.** Определение способности *Candida* spp. к формированию биопленок проводили в соответствии с методикой, предложенной Pierce С. и Tumbarello М. Изоляты *Candida* spp., имеющие значение оптической плотности от 0,1 и более, оценивали как образующие биопленки.

**Результаты:** Всего было исследовано 109 изолятов *Candida* spp.: *C. albicans* (n=22), *C. parapsilosis* (n=22), *C. tropicalis* (n=22), *C. krusei* (n=21), *C. glabrata* (n=22). Из них 55 изолятов было выделено от больных с опухолями системы крови и 54 – от больных без опухолей системы крови. Формирование биопленок было определено у 54% (n=59) *Candida* spp. Частота образования биопленок была выше среди *Candida* не-*albicans* (60%) в сравнении с *C. albicans* (32%, p=0,02). Изоляты *C. tropicalis* (82%) и *C. krusei* (81%) достоверно чаще формировали биопленки в сравнении с *C. parapsilosis* (50%), *C. albicans* (32%) и *C. glabrata* (27%) (p<0,05). Ведущими продуцентами биопленок в обеих группах были *C. krusei* и *C. tropicalis*. *C. parapsilosis*, выделенные от больных с опухолями системы крови, достоверно чаще образовывали биопленки, чем в группе сравнения (73% против 27%, p=0,03). Минимальная продукция биопленок среди *Candida* spp, выделенных от больных с опухолями системы крови, выявлена у *C. albicans* (18%), а в группе сравнения – у *C. glabrata* (18%).

**Выводы:** Формирование биопленок было неодинаковым у разных видов *Candida* и преобладало у *C. tropicalis* и *C. krusei*. Выявлены различия в частоте образования биопленок у разных видов *Candida* spp, выделенных от больных с опухолями и без опухолей системы крови.

## Biofilm formation by *Candida* spp. isolated from blood culture in patients with or without hematological malignancies

Malchikova A.O., Klyasova G.A.

National Medical Research Center of Hematology, Moscow, Russia

Contacts:  
Anna O. Malchikova  
E-mail: anmalchikova@gmail.com

Key words: candidemia,  
*Candida* spp., biofilm,  
hematological malignancies.

**Objective:** To evaluate the biofilm formation by isolates of *Candida* spp. obtained from blood culture in patients with or without hematological malignancies.

**Materials and methods:** Biofilm formation by *Candida* spp. was determined by the method of Pierce С. and Tumbarello М. Isolates with optical density (OD) >0.1 were considered as biofilm-forming.

**Results:** A total of 109 isolates of *Candida* spp. (*C. albicans* [n=22], *C. parapsilosis* [n=22], *C. tropicalis* [n=22], *C. krusei* [n=21], *C. glabrata* [n=22]) obtained from patients with or without hematological malignancies (55 and 54 isolates, respectively) were studied. Biofilm formation was determined in 54% of *Candida* spp. isolates (n=59). Biofilm production was observed more often in non-*albicans* species compared to *C. albicans* (60% versus 32%, p=0.02). The incidence of biofilm formation was significantly higher in isolates of *C. tropicalis* (82%) and *C. krusei* (81%) compared to isolates of *C. parapsilosis* (50%), *C. albicans* (32%), and *C. glabrata* (27%) (p<0.05). The leading biofilm-forming species were *C. tropicalis* and *C. krusei* in the both patient cohorts. Biofilm production was more frequent in *C. parapsilosis* isolated from patients with hematological malignancies compared to patients without hematological malignancies (73% versus 27%, p=0.03). The lowest incidence of biofilm formation was found in *C. albicans* (18%) isolated from patients with hematological malignancies and *C. glabrata* (18%) isolated from patients without hematological malignancies.

**Conclusions:** Biofilm formation varied among the *Candida* spp., with the highest incidence in *C. tropicalis* (82%) and *C. krusei* (81%). There were differences in the biofilm formation incidence among *Candida* spp. isolated from patients with or without hematological malignancies.

### Введение

Кандидемия остается одним из тяжелых инфекционных осложнений у больных, находящихся на лечении в отделениях гематологии и реанимации [1]. Ведущими возбудителями кандидемии являются *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* и *C. glabrata* [2, 3].

Разные виды *Candida* spp. обладают неодинаковой способностью к развитию инфекции, и одним из параметров, оказывающих влияние на это, является способность к формированию биопленок [4].

Активное внедрение в практику инвазивных медицин-

ских устройств, таких как сосудистые катетеры, стенты, шунты, протезы, эндотрахеальные трубки, привело к увеличению выделения из гемокультуры *Candida* spp., образующих биопленки. Так, по результатам ретроспективного исследования, проведенного в многопрофильном стационаре г. Рима и включавшего 294 пациента, выделение *Candida* spp. в составе биопленок при кандидемии увеличилось с 36% до 67% в период с 2000 г. по 2004 г. [5]. Определено, что разные виды *Candida* spp. имеют неодинаковую способность к формированию биопленок.

Летальность при кандидемии, вызванной *Candida* spp. в составе биопленок, достоверно выше в сравнении с возбудителями инфекции, неспособными формировать биопленки (51,2% против 31,7%,  $p=0,004$ ) [6]. Более высокая частота летальных исходов при кандидемии, вызванной продуцентами биопленок, наблюдалась у тяжелой категории больных при лечении азолами и составила 76,9% [7].

**Целью** настоящего исследования было определение способности к формированию биопленок среди изолятов *Candida* spp., выделенных из гемокультуры от больных с опухолями и без опухолей системы крови.

## Материалы и методы

Материалом для исследования были изоляты *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* и *C. glabrata*, выделенные из гемокультуры от больных с опухолями и без опухолей системы крови. Основная доля *Candida* spp. (80%), выделенных от больных без опухолей системы крови, была получена из гемокультуры пациентов, находящихся в отделениях реанимации. Изоляты для исследования были взяты из коллекции *Candida* spp., собранной в ходе многоцентрового проспективного исследования. В исследование включали первый изолят *Candida* spp., выделенный из гемокультуры. Идентификация всех изолятов была проведена методом времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) на анализаторе Microflex (Bruker Daltonics, Германия) в автоматическом режиме с использованием программы MALDI Biotyper RTC, версия 3.0 (Bruker Daltonics, Германия). Для идентификации полученных изолятов до вида изолированные колонии *Candida* spp. получали на агаризованных средах Сабуро с хлорамфениколом (Sigma-Aldrich, США). Исследуемую культуру в двух повторностях наносили на ячейки слайда (мишени), после чего немедленно добавляли 1 мкл специального реагента – матрицы ( $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричная кислота и раствор, содержащий 50% ацетонитрила и 2,5% трифторуксусной кислоты). Исследование изолятов перед нанесением матрицы включало в себя дополнительный этап экстракции белков муравьиной кислотой. После высушивания слайда с нанесенными образцами при комнатной температуре его помещали в вакуумную камеру MALDI-TOF масс-спектрометра, после чего с каждого образца снимали до 100 белковых масс-спектров, при сопоставлении которых с компьютерной базой данных выдавался результат идентификации микроорганизма. В качестве критерия надежной видовой идентификации использовали рекомендуемые значения коэффициента совпадения (Score) от 2,0 и выше. До проведения исследования изо-

ляты хранили при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$  в триптиказо-соевом бульоне с добавлением 20% глицерина.

Определение способности *Candida* spp. к формированию биопленок проводили в соответствии с методикой, предложенной Pierce С. и Tumbarello М. и соавт. [6, 8]. Способность изолятов *Candida* к формированию биопленок определяли количественно, используя соль тетразолия – 2,3-би-(2-метокси-4-нитро-5-сульфопенил)-2Н-тетразолиум-5-карбоксанилид (ХТТ, Sigma-Aldrich, США). Для этого изолированные колонии *Candida* spp. получали на агаризованных средах, содержащих глюкозу и дрожжевой пептон (YPD, Sigma-Aldrich, США). Суточную культуру переносили в жидкую среду YPD (20 мл среды в колбе Эрленмейера объемом 150 мл) и инкубировали на шейкере (BioSan, Латвия) при 160 об/мин и температуре  $30^{\circ}\text{C}$  в течение 12-16 ч. Далее дрожжевые клетки центрифугировали при 3000 g в течение 5 мин, трёхкратно отмывали холодным стерильным 0,1 М фосфатным буфером и суспендировали в жидкой среде Сабуро, содержащей 8% глюкозы, до количества  $3 \times 10^7$  КОЕ/мл (подсчет осуществляли в камере Горяева). Суспензию в количестве 100 мкл переносили в стерильные 96-луночные плоскодонные планшеты в двух повторностях. В лунки 12-го ряда суспензию не вносили и использовали как контроль фона. После 24 ч инкубации при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  планктонные клетки удаляли и трёхкратно отмывали лунки планшетов стерильным 0,15 М фосфатным буфером.

Раствор ХТТ готовили в 0,01 М фосфатном буфере с последующим фильтрованием через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. Непосредственно перед исследованием к раствору ХТТ добавляли 1 мкМ раствора менадиона, приготовленного в ацетоне. В лунки с исследуемыми изолятами *Candida* spp. вносили 100 мкл раствора «ХТТ-менадион» и инкубировали при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 5 ч в темноте. Учет результатов выполняли спектрофотометрически с помощью микропланшетного ридера iMark (Bio-Rad, США) при длине волны 490 нм. Изоляты *Candida* spp., имеющие оптическую плотность (ОП)  $\geq 0,1$ , расценивали как формирующие биопленки;  $< 0,1$  – не способные к формированию биопленок. В качестве положительного контроля использовали *C. parapsilosis* ATCC 22019 в каждом эксперименте [9], в качестве отрицательного контроля – *C. albicans* 2215.

Для анализа результатов исследования была создана база данных. Статистически значимыми считали различия при вероятности безошибочного прогноза 95% ( $p < 0,05$ ).

## Результаты

Способность к формированию биопленок была исследована у 109 изолятов *Candida* spp., включая *C. albicans* (n=22), *C. parapsilosis* (n=22), *C. tropicalis* (n=22), *C. glabrata* (n=22) и *C. krusei* (n=21). Изоляты были получены из гемокультуры от больных с опухолями (n=55) и без опухолей системы крови (n=54) (Таблица 1).

При изучении способности к формированию биопленок было выявлено неоднородное распределение ОП у изолятов *Candida* spp. (Рисунок 1). Значения ОП варьировали от 0,001 до 1,403 (медиана – 0,131), у 6% изолятов они были  $\geq 1,0$ , а у одного изолята (*C. albicans*)

соответствовали нулевому значению. Наиболее выраженный диапазон колебаний ОП от 0,019 до 1,403 с медианой 0,771 был определен у *C. krusei*, из которых 24% изолятов имели значения ОП  $\geq 1,0$ . Медиана значений ОП у других видов *Candida* spp. была ниже и составила 0,216 у *C. tropicalis*, 0,108 – *C. parapsilosis*, 0,063 – *C. albicans*, 0,059 – *C. glabrata*. Значения ОП других видов *Candida* spp. были от 0,001 до 0,577 и варьировали в меньшей степени, за исключением одного изолята *C. glabrata*, имевшего значение ОП 1,077.

Формирование биопленок было определено у 54% (n=59) исследованных *Candida* spp. Различия в частоте образования биопленок были выявлены между *C. albicans* и *Candida* не-*albicans*, а также внутри видов (Таблица 2). Изоляты *Candida* не-*albicans* достоверно чаще образовывали биопленки в сравнении с *C. albicans* (60% против 32%,  $p=0,02$ ). Образование биопленок преобладало среди *C. tropicalis* (82%, n=18) и *C. krusei* (81%, n=17) и определялось достоверно чаще в сравнении с *C. parapsilosis* (50%, n=11), *C. albicans* (32%, n=7) и *C. glabrata* (27%, n=6),  $p<0,05$  (Рисунок 2). Продукция биопленок была минимальной у *C. glabrata* (27%) и *C. albicans* (32%).

Далее был проведен анализ образования биопленок среди *Candida* spp., выделенных из гемокультуры от больных с опухолями и без опухолей системы крови (Таблица 2). Формирование биопленок было выявлено у 60% *Candida* spp., выделенных от больных с опухолями системы крови, и у 48% *Candida* spp., полученных от больных без опухолей системы крови ( $p=0,2$ ). *C. albicans* образовывали биопленки реже при выделе-

нии их от больных с опухолями системы крови и составили всего 18% против 46% в группе сравнения ( $p=0,17$ ), в то время как среди *Candida* не-*albicans* этот показатель был сходным (71% и 72%). Формирование биопленок было сопоставимо высоким в анализируемых группах для *C. tropicalis* (82% в обеих группах) и *C. krusei* (91% и 70%), Рисунок 3. Статистически значимые различия в частоте образования биопленок были получены для *C. parapsilosis*. Изоляты *C. parapsilosis*, выделенные от больных с опухолями системы крови, достоверно чаще были продуцентами биопленок в сравнении с *C. parapsilosis*, полученными от больных без опухолей системы крови (73% против 27%,  $p=0,03$ ).

При анализе частоты формирования биопленок внутри анализируемых групп было выявлено, что среди *Candida* spp., выделенных от больных с опухолями системы крови, образование биопленок преобладало у изолятов *Candida* не-*albicans* в сравнении с *C. albicans* (71% против 18%,  $p=0,002$ ) и наблюдалось достоверно чаще среди изолятов *C. krusei* (91%) и *C. tropicalis* (82%) в сравнении с *C. glabrata* (36%) и *C. albicans* (18%,  $p<0,05$ ), а также у *C. parapsilosis* (73%) в сравнении с *C. albicans* (18%,  $p<0,05$ ) (Таблица 2, Рисунок 3). Минимальная частота образования биопленок была зафиксирована у *C. albicans* (18%).

При изучении *Candida* spp., выделенных от больных без опухолей системы крови, не было выявлено различий в частоте формирования биопленок у *Candida* не-*albicans* и *C. albicans* (72% и 46%,  $p=0,8$ ) (Таблица 2). Так же, как и в группе сравнения, образование биопленок преобладало среди изолятов *C. tropicalis* (82%) и *C. krusei* (70%) и наблюдалось достоверно чаще в сравнении с *C. glabrata* (18%,  $p<0,05$ ), а у *C. tropicalis* (82%) в сравнении с *C. parapsilosis* (27%,  $p<0,05$ ). Самая низкая частота формирования биопленок была определена у *C. glabrata* (18%) и, в отличие от группы сравнения, у *C. parapsilosis* (27%).

Таблица 1. Распределение *Candida* spp., включенных в исследование

Изоляты	<i>Candida</i> spp., выделенные из гемокультуры от больных		
	Всего, n	С опухолями системы крови, n	Без опухолей системы крови, n
<i>C. albicans</i>	22	11	11
<i>C. parapsilosis</i>	22	11	11
<i>C. tropicalis</i>	22	11	11
<i>C. glabrata</i>	22	11	11
<i>C. krusei</i>	21	11	10
<b>Всего</b>	<b>109</b>	<b>55</b>	<b>54</b>

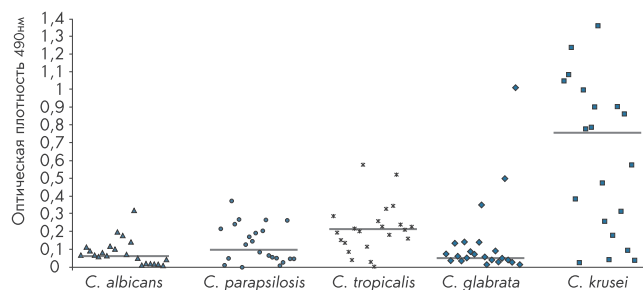
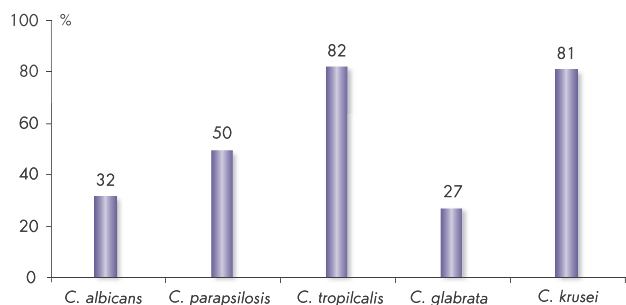


Рисунок 1. Распределение значений ОП изолятов *Candida* spp., выделенных из гемокультуры от больных с опухолями и без опухолей системы крови

## Обсуждение

Способность к формированию биопленок является одним из важнейших факторов вирулентности возбудителей кандидемии [9, 11]. В нашем исследовании частота образования биопленок у исследуемых изолятов *Candida* spp., выделенных из гемокультуры от больных с опухолями и без опухолей системы крови, составила 54% (n=59). По данным литературы, продукция биопленок среди *Candida* spp. является вариабельной. В исследовании, проведенном в Швеции [12], биопленки образовывали 58,8% *Candida* spp. из 393 изолятов, выделенных из гемокультуры; в исследовании, проведенном в Турции – 20,2% (20 из 99) [13]. При анализе *Candida* spp., выделенных из гемокультуры (n=36) и мазков из зева (n=22), этот показатель составил 82,75% [14].

Наше исследование продемонстрировало различия в способности к формированию биопленок среди *C. albicans* и *Candida* не-*albicans*. Так, достоверно чаще биопленки образовывали изоляты *Candida* не-*albicans* (60%) в сравнении с *C. albicans* (32%,  $p=0,02$ ). Эти различия сохранились при анализе *Candida* spp., выделен-



**Рисунок 2.** Частота образования биопленок у разных видов *Candida* spp.

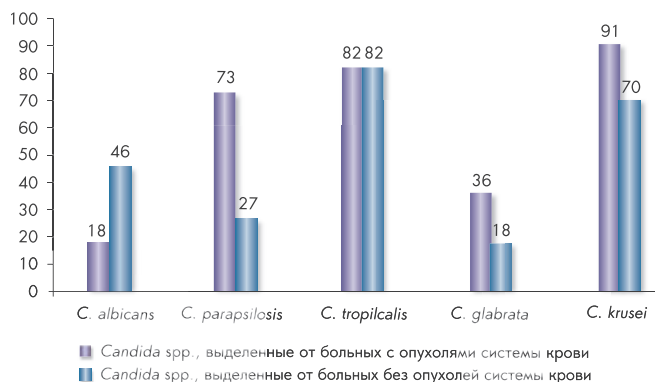
ных от больных с опухолями системы крови (71% против 18%,  $p=0,002$ ), при этом не было получено различий у больных без опухолей системы крови (72% против 46%,  $p=0,8$ ). Другие исследователи также отмечали более высокую частоту формирования биопленок среди *Candida* не-*albicans*, которая составляла от 54% до 77%, в то время как этот показатель среди *C. albicans* варьировал от 26,7% до 30,6% ( $p<0,05$ ) [6, 15, 16].

Нами были выявлены различия в частоте образования биопленок у разных видов *Candida* spp. Образование биопленок преобладало у изолятов *C. tropicalis* (82%) и *C. krusei* (81%) в сравнении с *C. parapsilosis* (50%), *C. albicans* (32%) и *C. glabrata* (27%,  $p<0,05$ ) и

**Таблица 2.** Частота образования биопленок среди *C. albicans* и не-*albicans* видов *Candida*, выделенных из гемокультуры от больных с опухолями и без опухолей системы крови

Изоляты	<i>Candida</i> spp., образующие биопленку (ОП >0,1) и выделенные от больных		
	Всего, n (%)	С опухолями системы крови, n (%)	Без опухолей системы крови, n (%)
<i>C. albicans</i> (n=22)	7 (32)*	2 (18)*	5 (46)
<i>Candida</i> не- <i>albicans</i> (n=87)	52 (60)*	31 (71)*	21 (72)
<b>Всего (n=109)</b>	<b>59 (54)</b>	<b>33 (60)</b>	<b>26 (48)</b>

\*  $p<0,05$ .



**Рисунок 3.** Частота образования биопленок среди изолятов *Candida* spp. (ОП >0,1), выделенных из гемокультуры от больных с опухолями и без опухолей системы крови

было минимальным у изолятов *C. glabrata* (27%). Другими исследователями были получены сходные результаты. Так, в исследование, проведенное в Швеции [12], были включены помимо изолятов *C. albicans* (n=243), *C. glabrata* (n=81), *C. parapsilosis* (n=33), *C. tropicalis* (n=8) и *C. krusei* (n=5) и более редкие виды *Candida* spp. (14 изолятов *C. dubliniensis*, 8 изолятов *C. lusitanae*, и 1 изолят *C. pelliculosa*), выделенные из гемокультуры. Лидерами в продукции биопленок, помимо *C. tropicalis* (100%) и *C. krusei* (100%), были *C. lusitanae* (100%). Формирование биопленок было определено у 95% *C. glabrata*, у 66,7% *C. parapsilosis* и только у 11% *C. albicans*. По данным другого исследования [17], включившего 108 изолятов *Candida* spp., выделенных из мочи (n=34), дыхательных путей (n=27), крови (n=22), мазков из половых органов (n=16) и других локусов, образование биопленок преобладало также среди *C. krusei* (80,7%) и *C. tropicalis* (72,7%). Биопленки реже выявляли у *C. glabrata* (62,5%), *C. albicans* (55,1%) и *C. parapsilosis* (50%). У таких редких видов, как *C. dubliniensis* и *C. kefyr*, этот показатель составил 66,7% и 57,1% соответственно.

Наряду с изучением частоты формирования биопленок у *Candida* spp., имеются публикации, в которых оцениваются разные категории способности к образованию биопленок. В исследовании Rajendran R. и соавт. из Швейцарии [18], включившем 280 изолятов *Candida* spp., выделенных из гемокультуры, все исследуемые изоляты по способности формирования биопленок были разделены на 3 категории в зависимости от значений ОП: высокая (>0,3), средняя (0,15-0,3) и низкая (<0,15). Изоляты *C. tropicalis* были отнесены к категории высокой и средней способности формирования биопленок (по 50% в каждой категории), в то время как все изоляты *C. glabrata* имели низкую способность к формированию биопленок. *C. albicans* в равных долях попали в 3 исследуемые категории (33%, 34% и 33% соответственно), а среди *C. parapsilosis* 55% изолятов обладали высокой способностью к формированию биопленок и 45% – низкой.

В нашей работе не было получено статистически значимых различий в частоте образования биопленок среди всех *Candida* spp., выделенных от больных с опухолями и без опухолей системы крови (60% против 48%,  $p=0,2$ ). Ведущими продуцентами биопленок в обеих группах были *C. krusei* и *C. tropicalis*. Различия были выявлены у *C. parapsilosis*, которые достоверно чаще образовывали биопленки у больных с опухолями системы крови в сравнении с *C. parapsilosis*, выделенными от больных без опухолей системы крови (73% против 27%,  $p=0,03$ ). В исследовании Girmenia C. и соавт. [19] также была показана высокая частота формирования биопленок среди 29 изолятов *C. parapsilosis*, выделенных из гемокультуры от больных с опухолями системы крови, которая составила 93%. В то же время, по данным литературы, изоляты *C. parapsilosis*, полученные от больных без опухолей системы крови, образуют биопленки с частотой от 22,7% до 100% [20, 21]. Можно предположить, что кроме видовой принадлежности, на способность образования биопленок *Candida* spp. оказывают влияние дополнительные факторы.

При анализе внутри групп была выявлена минимальная частота формирования биопленок у разных видов

*Candida* spp. Так, наиболее низкий процент образования биопленок среди *Candida* spp., выделенных от больных с опухолями системы крови, был определен у *C. albicans* (18%), а в группе сравнения (больные без опухолей системы крови) – у *C. glabrata* (18%). В литературе представлено ограниченное число исследований по изучению способности к формированию биопленок у изолятов *Candida* spp., выделенных у разных категорий больных. Результаты исследования, проведенного в Венгрии [15], в которое было включено 93 изолята *Candida* spp. из гемокультуры от больных многопрофильного стационара, в том числе от больных с опухолями системы крови, показали высокую частоту образования биопленок среди *C. parapsilosis* (75%) и *C. tropicalis* (67%). Минимальная частота формирования биопленок наблюдалась у *C. albicans* (30,6%), *C. glabrata* (29%) и *C. krusei* (25%). В исследовании, проведенном в Италии [21], в которое было включено 297 изолятов *Candida* spp., выделенных из гемокультуры (n=276) и других стерильных локусов (n=42) от больных, находящихся в отделении реанимации, частота образования биопленок среди исследуемых изолятов составила 30% и была минимальной у *C. albicans* (34%), *C. glabrata* (26%) и *C. parapsilosis* (23%).

## Литература

- Klyasova G.A., Ohmat V.A., Vasilyeva V.A., et al. Invasive mycoses in patients with acute leukemia and in recipients of hematopoietic stem cells. Results of a multicenter prospective observational study in Russia (RIFI). *Gematologija i transfuziologija*. 2016;61:19. Russian. (Клясова Г.А., Охмат В.А., Васильева В.А. и соавт. Инвазивные микозы у больных острыми лейкозами и у реципиентов гемопозитических стволовых клеток. Результаты многоцентрового проспективного наблюдательного исследования в России (RIFI). *Гематология и трансфузиология*. 2016;61:19.)
- Klyasova G.A., Blokhina E.V., Gracheva A.N., et al. Factors influencing recovery in patients with hemoblastoses and candidemia. *Terapevticheskij arhiv*. 2015;7:77-87. Russian. (Клясова Г.А., Блохина Е.В., Грачева А.Н. и соавт. Факторы, влияющие на излечение у больных гемобластозами и кандидемией. *Терапевтический архив*. 2015;7:77-87.)
- Veselov A.V., Klimko N.N., Kretchikova O.I., et al. *In Vitro* Activity of Fluconazole and Voriconazole Against More Than 10000 Yeast Strains: Results of 5-years Prospective ARTEMIS Disk Study in Russia. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija*. 2008;10(4):345-354. Russian. (Веселов А.В., Клишко Н.Н., Кречикова О.И. и соавт. *In vitro* активность флуконазола и вориконазола в отношении более 10000 штаммов дрожжей: результаты 5-летнего проспективного исследования ARTEMIS Disk в России. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2008;10(4):345-354.)
- Kojic E.M., Darouiche R.O. *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17:255-267.
- Tumbarello M., Posteraro V., Trecarichi E.M., et al. Biofilm Production by *Candida* Species and Inadequate Antifungal Therapy as Predictors of Mortality for Patients with Candidemia. *J Clin Microbiol*. 2007;45(6):1843-1850.
- Tumbarello M., Fiori B., Trecarichi E.M., et al. Risk factors and outcomes of candidemia caused by biofilm-forming isolates in a tertiary care hospital. *PLoS One*. 2012;7:e33705.
- Tascini C., Sozio E., Corte L., et al. The role of biofilm forming on mortality in patients with candidemia: a study derived from real world data. *Infect Dis (Lond)*. 2018;50(3):214-219.
- Pierce C.G., Uppuluri P., Tristan A.R., et al. A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat Protoc*. 2008;3(9):1494-1500.
- Melo A.S., Bizerra F.C., Freymuller E., Arthington-Skaggs B.A., Colombo A.L. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. *Med Mycol*. 2011;49:253-262.
- Nett J., Lincoln L., Marchillo K., et al. Beta-1,3 Glucan as a Test for Central Venous Catheter Biofilm Infection. *J Infect Dis*. 2007;195(11):1705-1712.
- Silva S., Rodrigues C. F., Araújo D., et al. *Candida* Species Biofilms' Antifungal Resistance. *J Fungi (Basel)*. 2017;3(1). pii:E8.
- Pannausorn S., Fernandez V., Römling F. Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species causing bloodstream infection. *Mycoses*. 2012;56:264-272.
- Gokce G., Cerikcioglu N., Yagci A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. *Mycopathologia*. 2007;164:265-269.
- Kumar C.P.G., Menon T. Biofilm production by clinical isolates of *Candida* species. *Med Mycol*. 2006;44:99-101.
- Pongrácz J., Benedek K., Juhász E., Iván M., Kristóf K. *In vitro* biofilm production of *Candida* bloodstream isolates: any association with clinical characteristics? *J Med Microbiol*. 2016;65:272-277.
- Shilpa D., Nitika J., Neerja G., Shipra G. Speciation, biofilm formation and antifungal susceptibility of *Candida* isolates. *Int J Res Dev Pharm I Sci*. 2017;6(2):2517-2521.
- Golia S., Hittinahalli V., Sangeetha K.T., Vasudha C.L. Study of biofilm formation as a virulence marker in *Candida* species isolated from various clinical specimens. *J Evol Med Dent Sci*. 2012;1(6):1238-1246.
- Rajendran R., Sherry L., Nile C.J., et al. Biofilm formation is a risk factor for mortality in patients with *Candida albicans* bloodstream infection – Scotland, 2012-2013. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22:87-93.
- Girmenia C., Martino P., De Bernardis F., et al. Rising Incidence of *Candida parapsilosis* Fungemia in Patients with Hematologic Malignancies: Clinical Aspects, Predisposing Factors, and Differential Pathogenicity of the Causative Strains. *Clin Infect Dis*. 1996;23:506-514.
- Agwan V., Butola R., Madan M., et al. Comparison of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species in a tertiary care center, North India. *Indian J Pathol Microbiol*. 2015;58:475-478.
- Tobudic S., Kratzer C., Lassnigg A., et al. Biofilm formation of *Candida* spp. isolates from patients at a cardiothoracic intensive care unit. *Int J Artif Organs*. 2011;9:818-823.
- Prigitano A., Dho G., Lazzarini C., et al. Biofilm production by *Candida* isolates from a survey of invasive fungal infections in Italian intensive care units. *J Chemother*. 2012;24(1):61-63.