

АЗЕРБАЙДЖАНСКАЯ РЕСПУБЛИКА

На правах рукописи

**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ АЗОЛ-РЕЗИСТЕНТНЫХ
ШТАММОВ ASPERGILLUS FUMIGATUS
В АЗЕРБАЙДЖАНЕ**

Специальность: 2414.01 – Микробиология

Отрасль науки: Медицина

Соискатель: **Равил Мулкадар оглы Гусейнов**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора философии

Баку – 2024

Диссертационная работа выполнена на кафедре Медицинской Микробиологии и Иммунологии Азербайджанского Медицинского Университета.

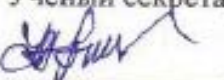
Научный руководитель: доктор философии по медицине,
доцент
Самир Сабир оглы Джавадлы


Официальные оппоненты: доктор мед. наук, профессор
Мурад Гияс оглы Мамедов
доктор философии по медицине
Фарида Хафиз гызы Гейдарова
доктор философии по медицине
Рауф Физули оглы Азизов

Диссертационный совет BED 4.19 Высшей Аттестационной Комиссии при Президенте Азербайджанской Республики, действующий на базе Азербайджанского Медицинского Университета

Председатель дис. совета: доктор мед. наук, профессор

**Магеррам Зульфугар оглы
Нифтуллаев**

Ученый секретарь дис. совета: доктор фил. по мед., доцент

**Севиндж Фетулла гызы
Фетуллаева**

Председ. научного семинара: доктор мед. наук, профессор

**Мехман Габиб оглы
Алиев**



İMZANI TƏSDİQ EDİRƏM
Azerbaycan Tibb Universitetinin
ELMI KATIBI
Tibb elmləri doktoru, professor
Nazim Adil oğlu Panahov

25.01.24

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. *Aspergillus fumigatus* – повсеместно распространенный грибок, вызывающий различные состояния у человека, включая колонизацию, аллергический бронхолегочный аспергиллез (АБЛА), тяжелую астму с грибковой сенсибилизацией (ТАГС), хронический легочный аспергиллез (ХЛА) и инвазивный аспергиллез (ИА). Малый диаметр спор облегчает их проникновение в нижние дыхательные пути, что делает *A.fumigatus* основным этиологическим агентом аспергиллеза¹. Пациенты с иммуносупрессией и легочными заболеваниями (хроническая обструктивная болезнь легких – ХОБЛ, легочный туберкулез – ЛТ и т.д.) относятся к группам риска развития аспергиллезов².

Препаратами первой линии при лечении заболеваний, вызываемых грибами рода *Aspergillus*, являются азоловые препараты (итраконазол-ИТР, вориконазол-ВОР, посаконазол-ПОС, исавуконазол-ИСА и др.), которые воздействуют на продукт гена *сyp51A* – 14 α -деметилазу, блокируя тем самым синтез основного компонента клеточной стенки – эргостерола. Результатом становится накопление токсических метилированных стеролов в клетке и ее повреждение.

Общее руководство Европейского Сообщества по Клинической Микробиологии и Инфекционным болезням, Европейской Конфедерации Медицинской Микологии и Европейского Респираторного сообщества *ESCMID-ECMM-ERS* (англ. *The European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases, the European Confederation of Medical Micology and the European Respiratory Society*) рекомендует ВОР и ИСА в качестве препаратов первой линии при лечении ИА. ПОС рекомендован для профилактики аспергиллеза у пациентов с острой миелоидной лейкемией (ОМЛ) и миелодиспластическим синдромом. Сообщество по Инфекционным

¹ Dagenais, T. R., Keller, N. P. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis // *Clin Microbiol Rev*, - 2009, 22 (3), p. 447-465

² Kosmidis, C., Denning, D. W. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis / *Thorax*, - 2015, 70 (3), p. 270-277.

Болезням Америки *IDSА* (англ. *Infectious Diseases Society of America*) рекомендует ВОР как препарат первой линии (сильная рекомендация) и комбинацию ИСА/липосомальный Амфотерицин В (АМВ) как альтернативную терапию (умеренная рекомендация). Пероральный прием итраконазола (ИТР) и ВОР рекомендован при ХЛА³.

Однако, нерациональное использование азолов в лечении пациентов и сельском хозяйстве привели к селекции азол-резистентных штаммов. Первый резистентный изолят был выявлен в 1997 году и был связан с точечной мутацией гена *суп51А* (M220R)⁴. Известно несколько механизмов резистентности к азолам: 1) модификация 14 α -деметилазы; 2) повышенная экспрессия 14 α -деметилазы; 3) эффлюкс механизмы – повышенная экспрессия эффлюкс транспортера Cdr1B; 4) альтернативные пути синтеза стеролов; 5) экстра- и интрацеллюлярное расщепление лекарственных средств.

Точечные мутации чаще всего связаны с длительным лечением азолами⁵. Другим основным типом мутации является формирование tandemных повторов (ТП) в промотерном регионе в комбинации с точечными мутациями гена *суп51А*. Данный тип мутации связывают с нерациональным использованием триазоловых фунгицидов в сельском хозяйстве (TR₃₄/L98H, TR₅₃, и TR₄₆/Y121F/T289A)^{6,7}. Смертность среди пациентов с

³ Ullmann, A. J. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline/ Aguado, J. M., Arkan-Akdagli, S., Denning, D. W. [et al.] // *Clin Microbiol Infect*, - 2018, 24 Suppl 1, p. e1-e38.

⁴ Denning, D. W. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus* / Venkateswarlu, K., Oakley, K. L., Anderson, M. J. [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother* 1997, 41 (6), p. 1364-1368.

⁵ Camps, S. M. Rapid induction of multiple resistance mechanisms in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy: a case study and review of the literature / van der Linden, J. W., Li, Y., Kuijper, E. J. [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother*, - 2012, 56 (1), p. 10-16.

⁶ Snelders, E. Triazole fungicides can induce cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus* / Camps, S. M., Karawajczyk, A., Schaftenaar, G. [et al.] // *PLoS One*, - 2012, 7 (3):e31801, p. 1-11.

⁷ Berger, S. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: A Consequence of Antifungal Use in Agriculture? / El Chazli, Y., Babu, A. F., Coste, A. T. [et al.] // *Frontiers in Microbiology*, - 2017, 8:1024, p. 1-6.

резистентными штаммами варьирует в пределах 50-100% и выше по сравнению с азол-чувствительными штаммами на 23%-31%. Вследствие отсутствия конкретного фактора риска, позволяющего предугадать развитие резистентности, обе вышеперечисленные организации (*ESCMID-ECMM-ERS* и *IDSA*) рекомендуют проведение мониторинга азоловой резистентности. При отсутствии эффекта от лечения, рекомендуется постановка теста на чувствительность с целью определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) антимикотического препарата и при обнаружении азоловой резистентности – корректировка лечения. Однако, многие лаборатории не проводят рутинного МИК-теста для плесневых грибов. Поэтому в регионах, где частота азоловой резистентности в окружающей среде превышает 10%, рекомендуется проведение эмпирического лечения^{3,8}. Для определения показателей резистентности в клинических материалах и образцах из окружающей среды в странах Европы были проведены широкомасштабные исследования. Учитывая актуальность проблемы азоловой резистентности, проведение аналогичного исследования в Азербайджане являлось необходимым.

Объект и предмет исследования. В ходе диссертационной работы была проведена ретроспективная оценка эпидемиологического бремени грибковых заболеваний среди населения Азербайджанской Республики за 2018 год.

Была проведена проспективная оценка распространенности резистентных штаммов *A.fumigatus* в окружающей среде Азербайджанской Республики при помощи взятия 229 образцов почвы (218) и воздуха (11).

Проводилось также проспективное исследование в 2-х группах пациентов: в группе пациентов со всеми типами (легочные заболевания, отомикоз и онихомикоз) основных заболеваний (выборка n=163) и в группе пациентов лишь с легочными заболеваниями (выборка n=1170).

⁸ Verweij, P. E. International expert opinion on the management of infection caused by azole-resistant *Aspergillus fumigatus* / Ananda-Rajah, M., Andes, D., Arendrup, M. C. [et al] // *Drug Resist Updat*, - 2015, 21-22, p. 30-40

Цель исследования. Оценка эпидемиологии аспергиллезов и азоловой резистентности и генетический анализ азол-резистентных штаммов *A.fumigatus*, изолированных из окружающей среды и различных клинических материалов.

Задачи исследования:

1. Ретроспективная оценка бремени грибковых патологий, в том числе аспергиллезов, в Азербайджане;
2. Изоляция штаммов *A.fumigatus* из окружающей среды и различных клинических материалов и выявление резистентных штаммов методом серийных разведений (МИК);
3. Молекулярно-генетический анализ штаммов *A.fumigatus* с выявленной резистентностью с целью выявления типов мутаций, ответственных за резистентность к азолам;
4. Филогенетический анализ штаммов *A.fumigatus* с целью выявления генетической связи между штаммами из окружающей среды и клинических материалов.

Методы исследования: использовались микроскопический, культуральный (микологический), молекулярно-генетический и статистический методы исследования.

Основные положения, выносимые на защиту:

— по результатам наших подсчетов эпидемиологическое бремя грибковых заболеваний в Азербайджане довольно высоко, в особенности у пациентов с заболеваниями легких, у которых *Aspergillus spp.* чаще всего обнаруживается. Это свидетельствует о значимости проблемы грибковых патологий в стране;

— частота выявления резистентных штаммов среди клинических изолятов в Азербайджане довольно высока, в то время как распространенность резистентных штаммов в окружающей среде Азербайджана низкая. Это наводит на мысль о важности изучения и контроля уровня резистентности штаммов в клинических образцах;

— причиной азоловой резистентности штаммов *A.fumigatus* в Азербайджане является мутация TR₃₄/L98H, селективируемая под воздействием азоловых фунгицидов, применяемых в аграрной промышленности.

Научная новизна исследования:

- впервые в Азербайджане была проведена оценка бремени грибковых заболеваний, включая аспергиллёзы;
- впервые в Азербайджане были определены частоты распространения резистентных штаммов *A.fumigatus* среди клинических образцов и в окружающей среде;
- впервые в Азербайджане была выявлена генетическая мутация *A.fumigatus*, связанная с резистентностью к азолам;
- это первое исследование в Азербайджане, в котором изучена эпидемиологическая связь между штаммами *A.fumigatus*, выделенными из окружающей среды и клинических образцов.

Научно-практическая значимость исследования:

- анализ профиля резистентности предоставит основу для усовершенствования программ профилактики и терапии. Полученные результаты помогут снизить смертность при инфекциях, вызванных *Aspergillus*, что в свою очередь сократит расходы на лечение пациентов;
- сравнительный анализ мутаций штаммов, выделенных из окружающей среды и клинических образцов, позволит определить пути заражения и факторы возникновения резистентности;
- разработка комплексов мероприятий относительно использования фунгицидных средств послужит уменьшению частоты распространенности резистентных штаммов.

Апробация и применение результатов диссертации:

Материалы диссертации обсуждены: в научно-практической конференции «Təbabətın Aktual Problemləri», посвященной 100-летию Азербайджанской Народной Республики (Баку, 2018), в сборнике научных произведений Научно-Исследовательского Института Медицинской Профилактики, посвященного 100-летию Азербайджанской Народной Республики (Баку, 2018), сборнике материалов Международной Научной Конференции, посвященной 85-летию юбилею Рафиг Ашраф оглы Аскерова (Баку, 2018), научной конференции «9th Trends in Medical Mycology» (Ницца, 2019), материалах международного научно-практического конгресса, посвященного

90-летию Азербайджанского Медицинского Университета (Баку, 2020), онлайн конференции «ASM Microbe Online» (2020), научной конференции «9th Advances Against Aspergillosis» (Лугано, 2020), научной конференции «Integration of Education, Science and Business in Modern Environment: Winter Debates» - International Electronic Scientific and Practical Journal «WayScience»(2020), научной конференции «10th Trends in Medical Mycology» (Абердин, 2021), научной конференции «1st international Azerbaijan Laboratory medicine congress & LAB EXPO» (Баку, 2023).

Первичное обсуждение работы проводилось на межкафедральном совещании кафедр «Медицинская Микробиология и Иммунология», «Инфекционные болезни», «Эпидемиология», «Здоровье детей и подростков и здоровье трудящихся» и «Биологическая химия» (06.12.2021, Протокол № 04). Диссертационная работа была представлена и обсуждена на единовременном научном семинаре Совета по защите диссертаций ВЕД 4.19, действующего при Азербайджанском Медицинском Университете (15.12.2023, Протокол № 02).

Опубликованные научные работы. На основе результатов диссертационной работы опубликовано 19 научных работ: 9 статей, из которых 4 - в зарубежных журналах; 10 тезисов, из которых 5 - в зарубежных конференциях.

Результаты диссертационной работы используются в учебном процессе на кафедре Медицинской Микробиологии и Иммунологии Азербайджанского Медицинского Университета.

Организация, в которой выполнялась диссертационная работа: Научно-Исследовательская Учебно-Клиническая Микробиологическая Лаборатория при кафедре Медицинской Микробиологии и Иммунологии Азербайджанского Медицинского Университета.

Структура и объем диссертации. Диссертация написана в формате А4, шрифтом Times New Roman 14 с межстрочным интервалом 1,5 на русском языке. Состоит из Содержания (2595 знаков), Введения (14939 знаков), 4-х глав, охватывающих Обзор литературы (49408), Материалов и методов исследования

(47480), Результаты исследования (32535), Обсуждения полученных результатов (41077), Результаты (1364 знака), Практических рекомендаций (1311 знаков), Использованной литературы и списка условных сокращений (3086) Объем диссертации составляет 177 страниц (193795 знаков). Диссертация иллюстрирована 26 таблицами, 29 рисунками и 3 диаграммами. Использованная литература состоит из 207 источников, большинство из которых на английском языке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка бремени грибковых заболеваний. Для оценки общего бремени грибковых заболеваний и доли *Aspergillus*-ассоциированных состояний в рамках диссертационной работы был проведен анализ эпидемиологических исследований, доступных в международных базах данных (Pubmed, Google Scholar и elibrary.ru). Поиск проводился с использованием терминов, включая «грибковые инфекции и Азербайджан», основные заболевания (например, «бронхиальная астма» (БА), хроническая обструктивная болезнь легких» и т.д.) и специфические грибковые инфекции (например, «инвазивный аспергиллез»). В следствие отсутствия достаточных данных по Азербайджану, была использована модель LIFE (англ. Leading International Fungal Education). Принципом использованного моделирования является расчет бремени грибковых патологий среди групп пациентов с высоким риском развития грибковых инфекций. При этом мы опирались на данные литературы, предоставляющие частоты распространенности той или иной формы грибковых инфекций среди разных групп пациентов⁹.

Перспективный анализ. Целью проспективного анализа была оценка частот изоляции штаммов *Aspergillus spp.* как во всех группах пациентов, так и в группах пациентов с различными легочными заболеваниями. В первом случае представилось возможным сравнить частоты изоляции штаммов в группах

⁹ Osmanov, A., Denning, D. W. Burden of serious fungal infections in Ukraine // *Mycoses*, - 2015, 58 Suppl 5, p. 94-100.

пациентов с легочными и внелегочными патологиями. Во втором же случае, сравнивались частоты изоляции штаммов в группах с конкретными легочными патологиями.

Для проведения проспективного анализа использовались тест Хи-квадрат (χ^2)/точный тест Фишера и бинарная логистическая регрессия. При помощи теста Хи-квадрат (χ^2) (или точного теста Фишера, используемого при малых выборках) вычислялась статистическая значимость изоляции штаммов *Aspergillus spp.* и *A.fumigatus* при различных патологиях. Бинарная логистическая регрессия использовалась для выявления связи между независимыми переменными (в нашем случае пол, возраст и заболевание пациента) и зависимой переменной (в нашем случае рост или отсутствие роста штаммов *A.fumigatus*). Иными словами, регрессионный анализ выдавал отношение шанса (ОШ) изоляции *A.fumigatus* к шансу отсутствия изоляции *A.fumigatus* с учетом диагноза, пола и возраста пациентов. Данный метод позволил моделировать вероятность изоляции штаммов *A.fumigatus* в зависимости от пола, возраста и болезней пациентов.

Выделение штаммов *Aspergillus*. В период 2017-2019 годов были собраны клинические материалы пациентов, обратившихся в Научно-Исследовательскую Учебно-Клиническую Микробиологическую Лабораторию (НИУКМЛ), Учебно-Терапевтическую, Учебно-Хирургическую клиники Азербайджанского Медицинского Университета и Научно-Исследовательский Институт Легочных Заболеваний (НИИЛЗ) Азербайджанской Республики. Собранные образцы были инокулированы в 2 чашки Петри с Сабуро декстрозным агаром (СДА) с хлорамфениколом (0.5 г/л) (Pronadisa, Испания) и инкубированы при температуре 37°C в течение 7 дней. Из колоний, характерных для *Aspergillus spp.*, были приготовлены нативные препараты с применением окрашивания лактофенолом хлопковым синим¹⁰. Морфологическая идентификация была проведена с использованием таксономических ключей и

¹⁰ Leck, A. Preparation of lactophenol cotton blue slide mounts // *Community Eye Health*, - 1999, 12 (30), p. 24.

руководств¹¹. Все изоляты, фенотипически идентифицированные как комплекс *A.fumigatus*, были инкубированы при 48°C для исключения криптических видов¹² и далее идентифицированы секвенированием внутренних транскрибируемых спейсерных регионов ITS1 и ITS4 (англ. Internal Transcribed Spacers)¹³.

Образцы почвы и воздуха были взяты из 8 регионов Азербайджанской Республики (Баку-Абшерон, Горный Ширван, Гянджа-Газах, Шеки-Загатала, Ленкорань, Губа-Хачмаз, Аран и Нахчыван) в течение 2017-2019 годов. В общей сложности было собрано 229 образцов из: общественных парков (79), больничных парков (39), овощных полей (38), частных садов (25), зерновых полей (13), воздуха больниц (11), фруктовых садов (10), подсолнечных полей (2), виноградников (2) оливковой рощи (1), шафранового поля (1), арахисового поля (1) и других участков (7). 2 грамма из каждого образца почвы суспендировались в 8 мл дистиллированной воды, содержащей 1% Твин 20 и хлорамфеникол (0,5 г/л). После 1-часовой седиментации 100 мкл супернатанта инокулировалось на СДА с хлорамфениколом (Pronadisa, Испания). Чашки инкубировались в течение 72 часов при температуре 37 °С и изучались на наличие роста плесневого гриба^{13,14}. Морфологическая и генетическая идентификация проводилась аналогично процедурам для клинических штаммов, описанным выше.

Молекулярно-генетическая идентификация штаммов.

Молекулярно-генетическая идентификация штаммов проводилась в Центре Рекомбинантной ДНК и Рекомбинантного Протеина Университета имени Аднан Мендереса (REDPROM, Турецкая Республика).

¹¹ McClenny, N. Laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic observation and culture: the traditional approach // *Med Mycol*, - 2005, 43 Suppl 1, p. S125-S128.

¹²Riat, A. Azole Resistance of Environmental and Clinical *Aspergillus fumigatus* Isolates from Switzerland / Plojoux, J., Gindro, K., Schrenzel, J. [et al] // *Antimicrob Agents Chemother*, - 2018, 62 (4):e02088-17, p. 1-7

¹³ Schoch, C. L. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi / Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V. [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA*, - 2012, 109 (16), p. 6241-6246.

Для получения роста, достаточного для экстракции ДНК, изоляты *Aspergillus* инкубировались в течение 5-7 дней. Далее готовились суспензии спор в 1 мл физиологического раствора и центрифугировались в течение 5 минут при 12000 rpm. Супернатант удалялся, а к оставшемуся осадку добавлялось 100 мкл буфера ДНК-экстракции (1М Трис HCl [pH 7.5), IGEPAL® SA-630, Твин 20, протеиназа К [10мг/мл]). Микроцентрифужные пробирки, содержащие смесь спор и буфера ДНК-экстракции, инкубировались 30 минут при 56°C с последующим нагреванием до 100°C на 8 минут. Для амплификации были использованы два олигонуклеотидных праймера ITS 1 и ITS 4 (ITS 1, 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G- 3'; ITS 4, 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT G-3') (Metabion International, Martinsried, Германия). 2 мкл из каждого тестируемого образца было добавлено в Master Mix Раствор ((2.5 U Taq-полимеразы (Fermentas), 10X Taq буфера (100 mM Трис-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl), 2 mM MgCl₂, 0.4 pmol праймеров, 0.2 mM dNTP)), в конечном объеме 30 мкл.

ПЦР была проведена на термальном циклере «Applied Biosystems SimpliAmp». Было проведено 35 циклов амплификации, состоящих из фазы денатурации (95°C - 30 сек), отжига (50°C - 30 сек), элонгации (72 °C - 1 мин), и финальной элонгации при 72°C на 8 мин. Полученные ампликоны были разделены электрофорезом в агарозном геле с последующей секвенацией (Macrogen, <http://dna.macrogen.com/eng/>)¹⁴. Полученные таким образом последовательности нуклеотидов были обработаны в средстве поиска основного локального выравнивания BLAST (англ. Basic Local Alignment Search Tool), которое включает в себя семейство программ, предназначенных для нахождения гомологии изучаемой последовательности с базой данных известных последовательностей нуклеиновых кислот или белков. Для использования программы достаточно зайти на страницу <http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov>

¹⁴ Oryaşın, E. Antimicrobial susceptibility patterns of environmental and hospital isolations of enterococci in Aydın / Biyik, H. N., BaşbülbüL, G., BozdoğAn, B. // *Turkish Journal of Biology*, - 2013, 37, p. 514-519.

Тест для определения чувствительности к антимикотическим препаратам. Все штаммы *A.fumigatus* были протестированы на чувствительность к ИТР, ВОР и ПОС в соответствии с методом Европейского Комитета по Определению Чувствительности к Антимикробным Препаратам EUCAST (англ. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)¹⁵. Каждый антимикотический агент был разведен в среде RPMI 1640 с 2% глюкозой и добавлен в количестве 100 мкл в лунки для микроразведений. Для приготовления инокулума использовались споры 2-5-дневной культуры на агаре СДА, из которых готовилась суспензия в стерильной воде с Твином 20 (1%). Концентрация спор в суспензиях при помощи гемоцитометра доводилась до $2\text{-}5 \times 10^6$ конидий/мл, из которой 10-кратным разведением получалась конечная концентрация в $2\text{-}5 \times 10^5$ конидий/мл. В лунки для микроразведений, содержащие антимикотические препараты, добавлялось по 100 мкл инокулума с последующей инкубацией 37 °С в течение 48 часов. МИК считалась та, при которой не наблюдалось визуального роста гриба в питательной среде. Изоляты с МИК для ИТР и ВОР ≥ 2 мг/л и для ПОС ≥ 0.25 мг/л считались резистентными.

Молекулярно-генетический анализ резистентных штаммов. Молекулярно-генетический анализ штаммов проводился в Лаборатории Генетики Университета Вагенинген (Wageningen University and Research, Laboratory of Genetics, Нидерланды). Экстракция ДНК, амплификация и секвенирование продуктов ПЦР были сделаны на основе протоколов, описанных ранее¹⁶.

Конидии каждого штамма были инокулированы в глюкозный бульон с дрожжевым экстрактом (ГБДЭ 2% глюкозы, 0.3% дрожжевого экстракта, 1% пептона) и инкубированы 24 часа при 37°С. Полученная таким образом мицелиальная масса была

¹⁵ Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds / EUCAST definitive document E.DEF9.3.2. - 2020.

¹⁶ Snelders, E. Emergence of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* and Spread of a Single Resistance Mechanism / van der Lee, H. A. L., Kuijpers, J., Rijs, A. [et al.] // *Plos Medicine*, - 2008, 5 (11), p. 1629-1637.

использована для экстракции ДНК. Были секвенированы полные кодирующие последовательности генов *cyp51A* и *cyp51B*. Для исключения возможности возникновения изменений в последовательностях, связанных с самим процессом ПЦР-амплификации, каждый изолят был анализирован дважды. Мицелий был перенесен на лист ватмана 1 и далее перенесен в полипропиленовую пробирку объемом 50 мл, содержащим 6 стеклянных шариков. Далее пробирка была перенесена в жидкий азот на 10 секунд, после чего содержимое пробирки в течение 30 секунд тщательно перемешивалось при помощи вортекса. После этого к смеси добавлялось 0,8 мл буфера для экстракции (200 мМ Tris-Cl pH 8,0, 0,5 М NaCl, 0,01 М ЭДТА, 1% додецилсульфата натрия). Полученная смесь аккуратно перемешивалась и к ней добавлялся равный объем фенол-хлороформа для получения эмульсии. Полученная эмульсия переносилась в микропробирки и центрифугировалась при 15000 rpm в течение 15 мин. Жидкая часть над полученным осадком экстрагировалась дважды: фенол-хлороформом и хлороформом. ДНК была получена при помощи преципитации в этаноле и центрифугирования^{17,18}. Полные последовательности генов *cyp51A* и *cyp51B* были амплифицированы при помощи праймеров P450-A1 (5'-ATGGTGCCGATGCTATGG-3') и P450-A2 (5'-CTGTC-TCACTTGGATGTG-3') для *cyp51A* и P450-B1 (5'-ATGGGTCTCATCGCGTTC-3') и P450-B2 (5'-TCAGGCTTTGGTAGCGG-3') для *cyp51B* гена. ПЦР проводилась в объеме 100 мкл, содержащем 10 мМ (NH₄)₂SO₄, 10 мМ KCl, 20 мМ трис-Cl (pH 8,8), 2 мМ MgSO₄, 10 нг бычьего сывороточного альбумина, 0.1% тритона X-100, 250 мкМ

¹⁷ Mellado, E. A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of *cyp51A* alterations / Garcia-Effron, G., Alcázar-Fuoli, L., Melchers, W. J. [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* - 2007, 51 (6), p. 1897-1904.

¹⁸ Diaz-Guerra, T. M. A point mutation in the 14alpha-sterol demethylase gene *cyp51A* contributes to itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus* / Mellado, E., Cuenca-Estrella, M., Rodriguez-Tudela, J. L. // *Antimicrob Agents Chemother.* - 2003, 47 (3), p. 1120-1124.

каждого dATP, dGTP, dCTP и dTTP (Perkin-Elmer Cetus, Мадрид, Испания), 1 мкМ каждого праймера, 2,5 ед. ДНК-полимеразы Pfu (Promega) и 50 нг геномной ДНК. Амплификацию проводили в термоциклере (Perkin-Elmer Cetus). Продукты ПЦР анализировались электрофорезом на 0.8 или 1.3% агарозных гелях и визуализировались трансиллюминацией после окрашивания бромидом этидия.

ДНК секвенировались при помощи «ABI Prism 377» ДНК-секвенатора (Perkin-Elmer), следуя инструкциям производителя.

Филогенетический анализ штаммов. Для выявления генетического сходства между изолятами использовался филогенетический анализ штаммов. Для нахождения сходных последовательностей ДНК был использован алгоритм ClustalW¹⁹. При этом применялся метод присоединения соседей²⁰. Расчет филогенетических дистанций проводился методом максимального правдоподобия²¹. Анализы проводились при помощи пакета программ MEGA X²².

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эпидемиологическое бремя грибковых инфекций в Азербайджане. Оценка бремени грибковых заболеваний была проведена за 2018 год (таблица 1)²³. Предполагаемое бремя

¹⁹ Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // *Nucleic Acids Res.* - 1994, 22 (22), p. 4673-4680.

²⁰ Gascuel, O., Steel, M. Neighbor-joining revealed // *Mol Biol Evol.* - 2006, 23 (11), p. 1997-2000.

²¹ Kannan, L., Wheeler, W. C. Maximum Parsimony on Phylogenetic networks // *Algorithms for Molecular Biology.* - 2012, 7 (1), p. 9.

²² Kumar, S. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms / Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. [et al.] // *Molecular Biology and Evolution.* - 2018, 35 (6), p. 1547-1549.

²³ Huseyov R.M. The burden of serious fungal infections in Azerbaijan / Javadov S., Osmanov A., Khasiyev S [et al.] // *Therapeutic Advances in Infectious Disease.* 2021, 8, p. 1–13.

Таблица 1

Бремя серьезных грибковых инфекций в Азербайджане

	Число пациентов с сопутствующим заболеванием					Частота (к 100000)	Общее бремя
	Без заболе ваний	Респи ратор ные	ВИЧ/ СПИД	ОМЛ/ Рак	ОИТ		
Эзофагеальный кандидоз	–	–	579	–	–	5.8	579
Оральный кандидоз	–	–	808	–	–	8.1	808
Кандидемия	–	–	–	–	499	5	499
Candida- перитонит	–	–	–	–	75	0.75	75
рВВК	159489	–	–	–	–	3196	159489
АБЛА	–	4927	–	–	–	49.4	4927
ТАГС	–	6504	–	–	–	65.2	6504
ХЛА	–	2307	–	–	–	86.8	2307
ИА	–	36	–	81	577	7.0	693
Криптококко- вый менингит	–	–	5	–	–	0.05	5
ПЦП	–	–	55	–	–	0.55	55
Мукормикоз	–	–	–	20	–	0.2	20
Грибковый кератит	?	–	–	?	–	0.12	12
Аллергический грибковый синусит	50000	–	–	–	–	50	50000
Общее бремя	209489	14351	1447	101	1151	–	225974

Примечания: АБЛА – аллергический бронхолегочный аспергиллез, ВИЧ/СПИД – Вирус/синдром приобретенного иммунодефицита, ИА – инвазивный аспергиллез, ОИТ – отделение интенсивной терапии, ОМЛ – острый миелоидный лейкоз, ПЦП – пневмоцистная пневмония, рВВК – рецидивирующий вульвовагинальный кандидоз, ТАГС – тяжелая астма с грибковой сенсибилизацией, ХЛА – хронический легочный аспергиллез

грибковых инфекций составило 225974 (2.3% населения). Доля аспергиллезов составила $\approx 3.5\%$ от общего числа грибковых патологий. Наиболее частой патологией был рецидивирующий вульвовагинальный кандидоз (рВВК) $\approx 70\%$ от общего числа грибковых патологий. Если не учитывать долю рВВК, то доля аспергиллезов среди остальных грибковых патологий составила **12%**, что является очень высокой цифрой.

Бремя инфекций недооценено, так как эпидемиологических данных относительно данной проблемы из Кавказского региона очень мало. Трудность дифференциальной диагностики между грибковыми патологиями и сопутствующими заболеваниями, связанная со схожестью клинических симптомов – еще один фактор, затрудняющий оценку бремени грибковых патологий.

Культуральный метод, считающийся «золотым» стандартом, обладает низкой чувствительностью. Часто, для точной и своевременной диагностики нужно проведение комплекса исследований. В Азербайджане основными методами диагностики грибковых инфекций являются микроскопический, культуральный и гистопатологический методы. Обнаружение факта инвазии грибами тканей при биопсии/аутопсии является дефинитивным (окончательным) диагнозом грибковой инфекции. При невозможности идентификации гриба микроскопией, необходимо проведение культурального или молекулярного методов исследований. Однако, культуральный метод обладает низкой чувствительностью для изоляции грибов в образцах. С другой стороны, у пациентов с иммуносупрессией и низким уровнем тромбоцитов проведение биопсии и гистопатологического исследования невозможно. Кроме того, часто пациенты отказываются проходить через инвазивные процедуры. В таких ситуациях очень эффективны серологические маркеры – ГМ и β -D-глюкан. Лучшее понимание проблемы грибковых инфекций послужит основой при разработке превентивных и терапевтических мер, и создания референтной микологической лаборатории в Азербайджане.

Результаты проспективного анализа. Была оценена распространенность резистентных штаммов *A.fumigatus* в окружающей среде Азербайджанской Республики. Был выделен 31 изолят из 229 образцов почвы (218) и воздуха (11) (таблица 2).

Таблица 2

Штаммы *A.fumigatus*, выделенные из окружающей среды

Регион	Образцы (n)	<i>A.fumigatus</i> (n)	Резистентные изоляты (n)
Баку-Абшерон	131	26	1
Горный Ширван	21	2	0
Гянджа-Газах	18	1	0
Шеки-Загатала	9	0	0
Ленкорань	21	1	0
Аран	18	0	0
Губа-Хачмаз	6	0	0
Нахчыван	5	1	0
Всего	229	31	1

Географическое распределение штаммов показано на рисунке 1.

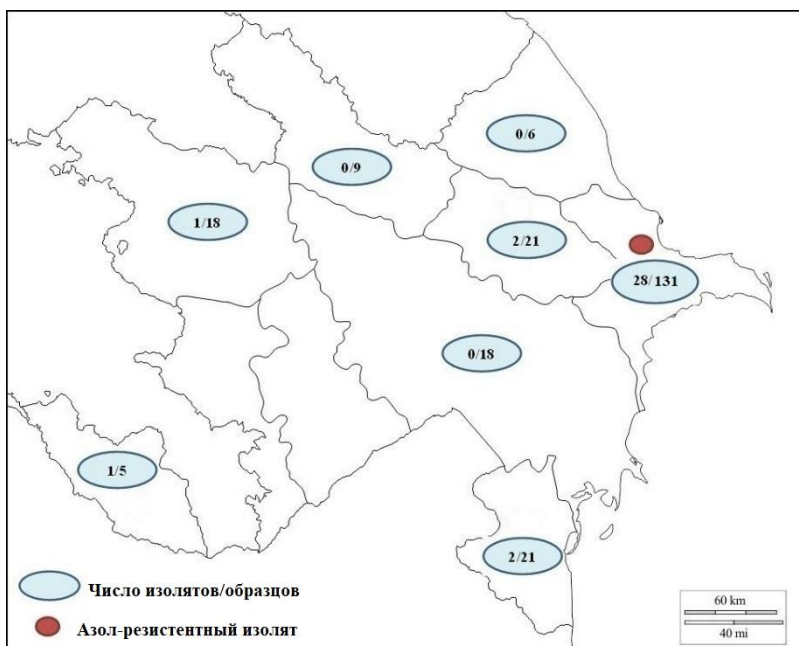


Рисунок 1. Географическое распределение штаммов *A.fumigatus*, изолированных из окружающей среды 8 регионов Азербайджанской Республики.

Примечания: синие кружки: число *A.fumigatus* /число образцов. Красный кружок: место выявления резистентного штамма.

В ходе диссертационной работы проводилось также проспективное исследование в 2-х группах пациентов: в группе пациентов со всеми типами (легочные заболевания, отомикоз и онихомикоз) основных заболеваний (выборка n=163) и в группе пациентов лишь с легочными заболеваниями (выборка n=1170).

Средний возраст пациентов в первой группе составил 41.8 (± 18.4) лет. Было изолировано 165 штаммов *Aspergillus*, из которых 87 штаммов были *A.niger*, 28 – *A.flavus*, 19 – *A.fumigatus* и 2 штамма *A.terreus*. 29 изолятов были идентифицированы до уровня рода *Aspergillus*. Распределение видов *Aspergillus* в различных группах пациентов представлено на диаграмме 1.

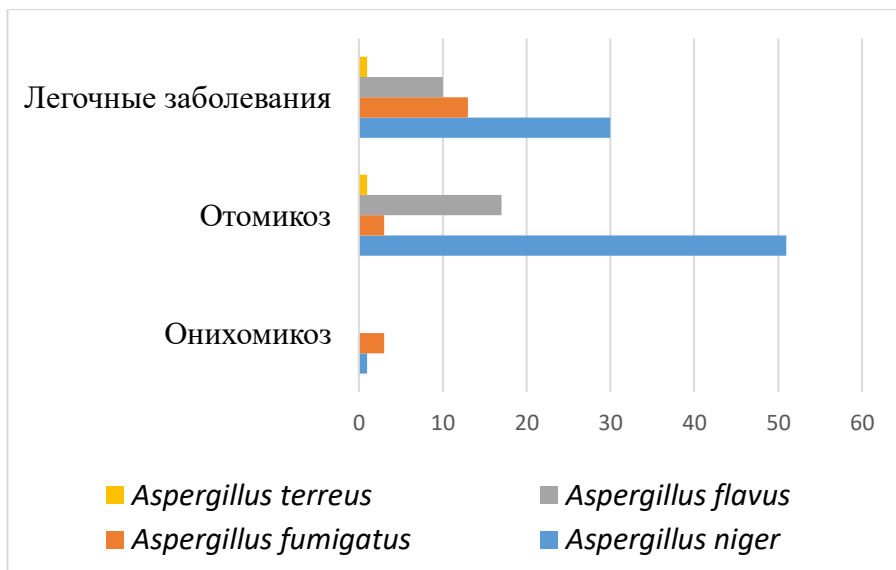


Диаграмма 1. Распределение видов *Aspergillus* в различных группах пациентов.

A.niger преобладал у пациентов с наружным отитом (71%) и легочными заболеваниями (56%). Вторыми по распространенности видами у пациентов с легочными заболеваниями и наружным отитом были *A.fumigatus* (24.0%) и *A.flavus* (23.6%) соответственно.

Таблица 3 сравнивает статистическую значимость различий в преваляровании штаммов *A.fumigatus* и других видов *Aspergillus spp.* в каждой группе пациентов.

Статистически значимые различия в преваляровании вида *A.fumigatus* и других видов *Aspergillus spp.* наблюдались для ЛТ ($p=0.01$), ХОБЛ ($p<0.01$) и отомикозов ($p<0.01$). Иными словами, вероятность выявления *A.fumigatus* по сравнению с *Aspergillus spp.* высока у пациентов с ХОБЛ и низка у пациентов с отомикозом и ЛТ. В то же время у пациентов с другими легочными заболеваниями (БА) статистически значимой разницы в частотах изолирования *A.fumigatus* и *Aspergillus spp.* не наблюдалось ($p\geq 0.05$).

Таблица 3

Штаммы *A.fumigatus* и *Aspergillus spp.*, выделенные у пациентов с различными заболеваниями.

Основное заболевание	<i>A.fumigatus</i> (19)	<i>Aspergillus spp.</i> (146)	<i>p</i>
ХОБЛ	5	3	<0.01
ЛТ	4	5	0.02
БА	1	6	1.000
Отомикоз	3	88	<0.01
Другие	6	44	1.000

Примечания: ЛТ-легочный туберкулез, ХОБЛ-хроническое обструктивное заболевание легких, БА-бронхиальная астма

Результаты бинарного регрессионного анализа показали, что статистически значимым фактором риска изоляции *A.fumigatus* является ХОБЛ (Отношение Шансов 14.056 95% 2.533-69.251, $p=0.01$). Примечательным является тот факт, что результаты логистической регрессии показали, что шансы выявления *A.fumigatus* по сравнению с другими группами пациентов у больных ЛТ ниже примерно в 5 раз (ОШ 0.188 95% 0.043-0.816, $p=0.03$), а у больных отомикозом – ниже в 7 раз (ОШ 0.137 95% 0.037-0.516, $p=0.03$). Такие показатели как пол, возраст и наличие других заболеваний по результатам регрессионного анализа значимого влияния на исход (изолирование *A.fumigatus*) не имели.

Вторая выборка включала 1170 пациентов с различными легочными заболеваниями (средний возраст [\pm стандартное отклонение] 48.8 [\pm 18.15]). Наблюдался рост колоний *Aspergillus spp.* в 22-х клинических образцах (1.9%) 22-х пациентов (таблица 4, диаграмма 2).

7 штаммов были выявлены у пациентов с ХОБЛ, 7- с БА, 4 – с ЛТ, и 4 с другими респираторными заболеваниями (острая респираторная недостаточность, бронхоэктатическая болезнь, и экссудативный плеврит). Было изолировано 4 вида *Aspergillus*: *A.niger*, *A.fumigatus*, *A.flavus* и *A.terreus*. Наиболее частыми изолятами оказались *A.niger* (12) и *A.fumigatus* (7).

Таблица 4

Штаммы *Aspergillus*, ассоциированные с легочными заболеваниями

Основное заболевание	Число больных	<i>A.niger</i> (12)	<i>A.fumigatus</i> (7)	<i>A.flavus</i> (2)	<i>A.terreus</i> (1)
ХОБЛ	178	2	5	0	0
ЛТ	195	1	2	0	1
БА	185	7	0	0	0
Другие	-	2	0	2	0

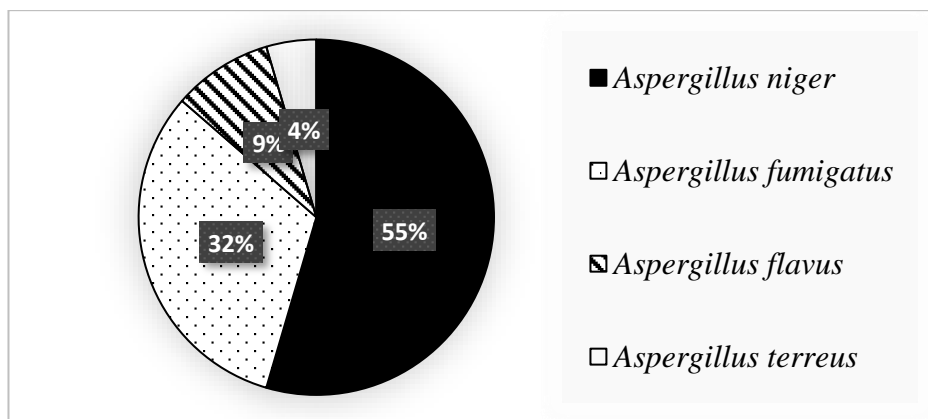


Диаграмма 2. Пропорция изолированных штаммов *Aspergillus*

A.niger чаще всего был ассоциирован с БА (7 штаммов), в то время как у больных с ХОБЛ и туберкулезом превалировал *A.fumigatus* (5 и 2 штамма соответственно).

У больных с ХОБЛ частота изоляции штаммов *Aspergillus* составила 3.9% (у 7-ми из 178 больного), у больных с ЛТ – 2.0% (у 4-ч из 195 больных), у больных с БА- 3.8% (у 7-ми из 185 больных). Результаты теста Хи-квадрат (χ^2) /точного теста Фишера показали наличие связи между ХОБЛ ($p=0.01$) и изоляцией *A.fumigatus*.

Ни один из тестов (Хи-квадрат (χ^2)/точный тест Фишера и бинарная логистическая регрессия) не показал статистически значимых отличий в изоляции *A.fumigatus* для пациентов с ЛТ ($p=0.33$ и $p=0.2$ соответственно).

Кроме того, тест Хи-квадрат (χ^2)/точный тест Фишера показал наличие связи между БА ($p<0.001$) и изоляцией *A.niger*. При применении в качестве зависимой переменной *A.niger* вместо *A.fumigatus* регрессионный анализ также показал зависимость между изоляцией *A.niger* и БА (ОШ 7.303 95% 2.238-23.839, $p<0.001$).

Распространенность азоловой резистентности в Азербайджане. В ходе исследования был проведен тест на определение антимикотической чувствительности 50 штаммов *A.fumigatus*, из которых 19 – из клинических образцов, 31 – из окружающей среды. Результаты теста представлены в таблице 5.

Таблица 5

Резистентные штаммы из клинических образцов и окружающей среды

Источник (n)	Антимикотический агент	Число резистентных штаммов
Клинические изоляты (19)	ИТР+ВОР+ПОС	2
	ПОС	2
Изоляты из окружающей среды (31)	ИТР+ВОР+ПОС	1

Из 50 изолятов 3 были резистентны ко всем тестируемым азолам, 2 – резистентны к ПОС. При этом из 31 изолята

окружающей среды только один был резистентен ко всем азолам (диапазон МИК 1 - ≥ 8 мг/л). Резистентный изолят был обнаружен в регионе Баку-Абшерон. Из 19 клинических штаммов 2 были резистентны ко всем азолам (41с и 68с) (диапазон МИК диапазон 2- ≥ 16 мг/л), 2 штамма (64с и 94с) были резистентны к ПОС (МИК=0.5 мг/л).

Частота изоляции резистентных штаммов среди клинических штаммов была сравнительно высокой – 21%. Главной причиной этого мы считаем малое количество тестированных штаммов (19).

Частота изоляции резистентных штаммов в окружающей среде Азербайджана составила 0.4% (в одном из 229 образцов). Резистентный штамм был изолирован из общественного парка. Резистентность штаммов из окружающей среды часто вызвана мутациями TR₃₄/L98H и TR₄₆/Y121F/T289A, при которых наблюдается резистентность к ИТР и перекрестная резистентность к ВОР и ПОС. В регионах с низким показателем резистентности главной проблемой является профилактика смертности от спорадических случаев с азол-резистентными изолятами²⁴. Таким образом, считаем, что МИК-тестирование должно проводиться в случае отсутствия эффекта от проводимой терапии аспергиллеза. Комбинация ВОР-АМВ рекомендована как лечение первой линии в зонах азоловой резистентностью $\geq 10\%$ ³.

Молекулярно-генетический анализ резистентных штаммов. Был секвенирован ген *сур51А* у 5 штаммов *A.fumigatus*, показавших *in vitro* резистентность к азоловым препаратам. Из них 4 были изолированы из клинических образцов (41с, 64с, 68с, 94с) и один из окружающей среды (118е).

У 4-х из 5-ти штаммов были выявлены те или иные точечные мутации гена *сур51А*. Только у одного штамма 41с была выявлена комбинированная мутация – сочетание тандемных повторов в

²⁴ Lestrade, P. P. A. Triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*: recent insights and challenges for patient management / Meis, J. F., Melchers, W. J. G., Verweij, P. E. et al.] // *Clin Microbiol Infect.* - 2019, 25 (7), p. 799-806.

промотерном регионе с точечной мутацией **TR₃₄/L98H**. Сам факт выявления данного штамма является первым свидетельством наличия в Азербайджане азол-резистентных изолятов *A.fumigatus*. Считается, что селекция штаммов с данным типом мутации происходит в окружающей среде под воздействием применяемых в аграрной промышленности азоловых препаратов. В нашем исследовании штамм с данным типом мутации был выявлен в клиническом образце.

В свете этих результатов, становится ясным, что селекция резистентных штаммов *A.fumigatus* может происходить как при лечении пациентов, так и в окружающей среде. Это подчеркивает важность комплексного подхода к проблеме антимикробной резистентности, включая как клиническую практику, так и стратегии контроля в сельском хозяйстве и окружающей среде. Однако, необходимо более тщательное исследование для полного понимания источников и механизмов формирования антимикробной резистентности у данного гриба.

Наличие резистентных штаммов *A.fumigatus* в клинических образцах подчеркивает необходимость непрерывного мониторинга и разработки стратегий контроля распространения антимикробной резистентности. Важно отметить, что исследование предоставляет первичные данные об азол-резистентных изолятах в Азербайджане, и его результаты могут стать отправной точкой для более глубокого анализа факторов, способствующих развитию резистентности у грибов, а также для разработки эффективных стратегий противодействия этому явлению.

Результаты филогенетического анализа штаммов *Aspergillus*. Анализ был проведен при помощи пакета программ MEGA X²³. Было исследовано 8 клинических штаммов и 31 штамм из окружающей среды. Филогенетическое дерево, полученное в результате исследования, показано на рисунке 2²⁵. Оно показало родство 5 клинических штаммов 22с, 39с, 41с, 52с

²⁵ Гусейнов Р.М. Филогенетический анализ штаммов *Aspergillus fumigatus*, изолированных из клинических образцов и окружающей среды Азербайджана // *Azərbaycan Tibb Jurnalı*, - 2020, (специальный выпуск), с. 151-155.

и 55с со штаммами 54е и 128е из окружающей среды (общественных парков), 64с – со штаммами 57е, 91е и 94е и штамма 42с – со штаммами 43е и 144е (общественных парков).

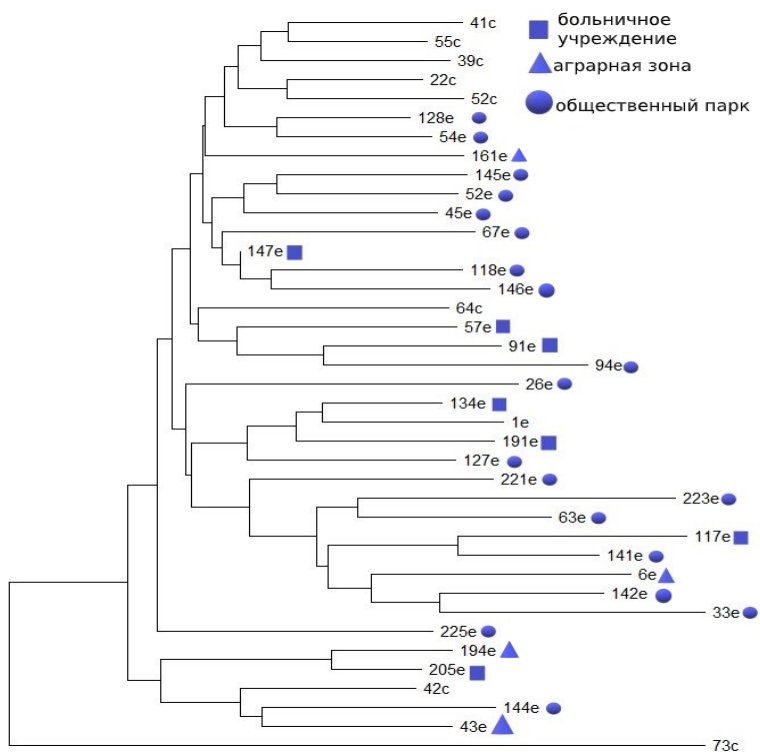


Рисунок 2. Филогенетическое дерево 39 изолятов *A.fumigatus*

Примечания: е – изоляты из окружающей среды, с – клинические изоляты.

Примечательно, что штаммы 57е и 91е были изолированы из образцов почвы больничных учреждений, что говорит о вероятности того, что больные были заражены штаммами из окружающей среды, или же, наоборот, сами были источниками штаммов.

Наше исследование установило факт существования в Азербайджане резистентных штаммов и мутации, вызывающей резистентность. Мутантный штамм показал *in vitro* резистентность ко всем тестируемым азолам (ИТР, ВОР, ПОС).

Принимая во внимание факт, что азоловые препараты являются препаратами первой линии при терапии аспергиллезов, наличие данного типа мутации представляет собой серьезную проблему при лечении данного типа патологии. Было выявлено 19 штаммов из клинических образцов, из которых 4 показали резистентность *in vitro* (21%), что является довольно высоким уровнем резистентности. Лишь у одного (5%) из 19 штаммов была выявлена мутация, ответственная за резистентность ко всем тетрациклин-резистентным азолам. Судить о распространенности мутантных штаммов на основании данных о 19 клинических штаммах не представляется возможным, так как число изолятов в выборке недостаточно для статистически значимого заключения. Однако, сам факт наличия данного типа мутации, позволяет сделать вывод, что данный тип резистентности довольно широко распространен в окружающей среде Азербайджанской Республики. Для подтверждения данного предположения необходимо проведение исследования на большем числе штаммов с привлечением большего числа пациентов. Наряду с этим считаем, что проведенное нами исследование выполнило ряд задач, поставленных в начале данной диссертационной работы, а именно: 1) изоляцию штаммов *A.fumigatus*; 2) выявление азол-резистентных штаммов *A.fumigatus*; 3) выявление мутаций, ответственных за возникновение резистентности; 4) изучение наличия взаимосвязи между штаммами из окружающей среды и клинических образцов.

Результат нашей исследовательской работы сходен с результатами работ, проведенных в ряде стран Европы, которые показали, что основным источником резистентности является селекция резистентных штаммов в окружающей среде под воздействием азоловых фунгицидов. Результатом данной селекции является распространение мутаций типа тандемный повтор-точечная мутация. Считаем, что результаты должны быть приняты во внимание во всех медицинских учреждениях страны. Становится актуальным вопрос создания референтной микологической лаборатории, целью которой будет своевременное выявление резистентных грибковых штаммов.

ВЫВОДЫ

1. В 2018 году бремя грибковых патологий в Азербайджане составило 2.3% населения или 225974 человек. Из них 7927 человек страдали тем или иными формами аспергиллеза, включая 4927 больных с аллергическим бронхолегочным аспергиллезом (АБЛА), 2307 больных с хроническим легочным аспергиллезом (ХЛА) и 36 больных с инвазивным аспергиллезом (ИА).
2. Анализ клинических образцов 1170 пациентов с легочными заболеваниями показал, что частота изоляции грибов рода *Aspergillus* у данной группы пациентов составляет 1.9%. Штаммы *Aspergillus* были выявлены у 3.9% с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), 2.0% пациентов с легочным туберкулезом (ЛТ) и 3.8% пациентов с бронхиальной астмой (БА).
3. Частота выявления резистентных штаммов среди клинических штаммов в Азербайджане сравнительно высока и составляет 21%. Было изолировано 19 клинических штаммов, из которых 4 показали резистентность к азолам (41с, 64с, 68с, 94с).
4. Распространенность резистентных штаммов в окружающей среде Азербайджана низкая и составляет 0.4% (один из 229 образцов из окружающей среды).
5. Впервые в Азербайджанской Республике выявлена мутация TR₃₄/L98H, широко распространенная в странах Европы и берущее свое начало из окружающей среды. Считается, что данная мутация типа «тандемный повтор-точечная мутация» была селектирована под воздействием азолов, применяемых в аграрной промышленности.
6. Филогенетический анализ 39 штаммов *A.fumigatus* в нашем исследовании указывает на возможность наличия эпидемиологической связи между штаммами из окружающей среды и клинических образцов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Основным методом диагностики грибковых патологий в Азербайджане является культуральный. Актуальной целью для нашей страны является улучшение диагностических возможностей, что может быть достигнуто двумя путями: i) созданием референтной микологической лаборатории; ii) оснащением крупных клинических центров необходимыми диагностическими тестами.
2. В Азербайджане основной группой риска аспергиллезов являются больные с легочными заболеваниями, такими как ХОБЛ, ЛТ, БА и др. Учитывая данный факт, важным является систематический мониторинг данных пациентов с целью диагностики *Aspergillus spp.* инфекций.
3. Распространенность резистентных штаммов в окружающей среде Азербайджанской Республики низкая (0.4%). При таком уровне резистентности рекомендовано проведение эмпирического лечения без проведения рутинного теста на антимикотическую чувствительность.
4. Обнаруженная нами мутация типа TR₃₄/L98H была изолирована из клинического образца пациента с ЛТ. Штаммы с такой мутацией не поддаются эмпирическому лечению. Следовательно, при подозрении на азоловую резистентность (отсутствии эффекта от эмпирического лечения) рекомендуется проведение теста на антимикотическую чувствительность штаммов *Aspergillus spp.*, изолированных из клинических образцов больных с легочными патологиями.
5. Наличие эпидемиологической связи между штаммами из окружающей среды и клинических образцов диктует необходимость изучения масштаба применения азоловых фунгицидов в Азербайджане.

Список статей, посвященных диссертации:

1. Гусейнов Р.М. Джавадов С.С. Морфо-биологические особенности штаммов *Aspergillus*, изолированных при отомикозах // *Təbabətin Aktual Problemləri*, Bakı, 2018, с. 260.
2. Гусейнов Р.М. Штаммы *Aspergillus spp.*, изолированные у больных с легочными заболеваниями // *Azərbaycan Cümhuriyyətinin 100 illik yubileyinə həsr olunmuş Elmi-Tədqiqat Tibbi Profilaktika İnstitutunun elmi əsərləri toplusu*, Баку, 2018, с. 201).
3. Гусейнов Р.М. Заболевания, вызываемые грибами рода Аспергиллус // *Rafiq Əsrəf oğlu Əsgərovun 85 illik yubileyinə həsr olunmuş Beynəlxalq Elmi Konfrans materiallarının toplusu* / - Баку, - 2018, с. 171.
4. Гусейнов Р.М., Джавадов С.С. Эпидемиология и механизмы азоловой резистентности штаммов *Aspergillus fumigatus* // *Sağlamlıq*, - 2018, с.22
5. Osmanov, D. Denning, R. Huseynov. The Burden of Serious Fungal Infections in Azerbaijan // *9th Trends in Medical Mycology*, - Nice, - 2019, P249. URL: https://drupal.aspergillus.co.uk/conference_abstracts/burden-serious-fungal-infections-azerbaijan
6. Гусейнов Р.М. Хронический легочный аспергиллез как осложнение легочного туберкулеза // *Azərbaycan Təbabətinin Müasir Nailiyyətləri*, - 2019, 4, с. 116-120.
7. Гусейнов Р.М., Джавадов С.С., Кадырова А.А., Аскерова Ш.М. Диагностическая значимость выделения грибов рода *Aspergillus spp.* из образцов больных легочным туберкулезом // *Материалы международного научно-практического конгресса, посвященного 90-летию*

- Азербайджанского Медицинского Университета, - Баку, - 2020, с. 289-290.
8. R. Huseynov, S. Javadov. Phylogenetic Analysis of Clinical and Environmental *Aspergillus fumigatus* Isolates in Azerbaijan // ASM Microbe Online, - 2020, 401. URL:<https://virtualmeeting.ctimeetingtech.com/asm2020/attendee/eposter/poster/2479?q=aspergillus>
 9. Huseynov R.M. Azole- and amphotericin B-resistant *Aspergillus fumigatus* strains isolated from clinical specimens and environment in Azerbaijan / Javadov S.S., Kadyrova A.A., Bozdogan B. [et al.] // 9th Advances Against Aspergillosis, - Lugano, -2020, 28. URL: https://www.aspergillus.org.uk/conference_abstracts/azole-and-amphotericin-b-resistant-aspergillus-fumigatus-strains-isolated-from-clinical-specimens-and-environment-in-azerbaijan/
 10. Huseynov R.M. Diagnostic significance of *Aspergillus* species isolated from clinical specimens / Javadov S., Kadyrova H., Karalti I. [et al.] // The Journal of Fungus, - Turkey, 2020, 11(1) p.94-100. URL: <https://dergipark.org.tr/en/pub/mantar/issue/53928/705353>
 11. Huseynov R.M. Pulmonary Aspergillosis: A Case Report of Invasive Aspergillosis Caused by *Aspergillus fumigatus* / Javadov S., Karalti I., Taqiyev B. [et al.] // The Journal of Fungus, - Turkey, 2020, 11(2) p. 101-104. URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/1023324>
 12. Huseynov R.M. The profile of *Aspergillus* species isolated from clinic specimens in Azerbaijan // 2nd conference - “Integration of Education, Science and Business in Modern Environment: Winter Debates”-International Electronic Scientific and Practical Journal “WayScience”,-2020, p. 31-32

13. Гусейнов Р.М. Аллергический бронхолегочный аспергиллез как осложнение бронхиальной астмы / Джавадов С.С., Кадырова А.А., Аскерова Ш.М. [и др.]. Медицинские новости, - 2020, 6, с. 61-63.
14. Гусейнов Р.М. Филогенетический анализ штаммов *Aspergillus fumigatus*, изолированных из клинических образцов и окружающей среды Азербайджана // *Azərbaycan Tibb Jurnalı*, - 2020, (специальный выпуск), с. 151-155.
15. Гусейнов Р.М. Азоловая-резистентность штаммов *A.fumigatus*: клинические последствия, диагноз и лечение // *Sağlamlıq*, - 2020, 15(2), с. 18-24
16. Huseyov R.M. The burden of serious fungal infections in Azerbaijan / Javadov S., Osmanov A., Khasiyev S [et al.] // *Therapeutic Advances in Infectious Disease*. January 2021. doi:10.1177/20499361211043969
17. E-test performance in determination of *Aspergillus fumigatus* susceptibility to azoles/Javadov S.S., Osmanov A., Denning D.// *10th Trends in Medical Mycology, Aberdeen*, -2021, 281-282
18. Hüseynov R.M. Göbələk infeksiyalarında molekulyar diaqnoz. Ştamların genotipləndirilməsi; nə vaxt lazımdır?// “1st international Azerbaijan Laboratory medicine congress & LAB EXPO”, Baku, 2023, p. 111-112
19. Гусейнов Р.М., Джавадлы С.С. Азол-резистентные штаммы *Aspergillus fumigatus*, изолированные из клинических материалов и образцов окружающей среды Азербайджанской Республики / *Azərbaycan Təbabətinin Müasir Nailiyyətləri*, - 2023, 3, с. 50-55.

УСЛОВНЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

1. АБЛА – аллергический бронхолегочный аспергиллез;
2. АБЛМ – аллергический бронхолегочный микоз;
3. АМВ – Амфотерицин В;
4. БА – бронхиальная астма;
5. БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж;
6. БАМС – бронхиальная астма с микогенной сенсibilизацией;
7. ВИЧ – Вирус иммунодефицита человека;
8. ВОР -вориконазол;
9. ГСК – гематопoэтическая стволовая клетка;
10. ИА – инвазивный аспергиллез;
11. ИГИ – инвазивная грибковая инфекция;
12. ИСА – исавуконазол;
13. ИТР – итраконазол;
14. КДА – картофельно-декстрозный агар;
15. КТ – компьютерная томография;
16. КЭДП – клетки эпителия дыхательных путей;
17. ЛТ – легочный туберкулез;
18. МИК – минимальная ингибирующая концентрация;
19. МЭК – минимальная эффективная концентрация;
20. НТМ – нетуберкулезный микобактериоз;
21. ОМЛ – острый миелоидный лейкоз;
22. ОИТ – отделение интенсивной терапии;
23. ПИЛА – подострый инвазивный легочный аспергиллез;
24. ПОС – посаконазол;
25. ПЦП – пневмоцистная пневмония;
26. ПЦР – полимеразная цепная реакция;
27. рВВК – рецидивирующий вульвовагинальный кандидоз;
28. РТПХ – реакция «трансплантат против хозяина»;
29. СДА – Сабуро-декстрозный агар;
30. СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита;
31. ТАГС – тяжелая астма с грибковой сенсibilизацией;
32. ХГ – хронический гранулематоз;
33. ХЛА – хронический легочный аспергиллез;

34. ХНА – хронический некротизирующий аспергиллез;
35. ХПЛА – хронический полостной легочный аспергиллез;
36. ХФЛА – хронический фиброзирующий легочный аспергиллез;
37. ФЛУ – флуконазол;
38. BLAST – Basic Local Alignment Search Tool;
39. CDC – Centers for Disease Control and Prevention;
40. CORE – Chronic Obstructive Respiratory diseases in CIS countries;
41. E-тест – эпсилонметрический градиент тест;
42. ECDC – European Centre for Disease Control;
43. ECOFF – epidemiological cut-off values;
44. EORTC/MSG -European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group;
45. ESCMID-ECMM-ERS – European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases/ European Confederation of Medical Mycology/European Respiratory Society;
46. EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing;
47. FISH – Fluorescent *in situ* hybridization;
48. GOLD – Global Initiative for Obstructive Lung Diseases;
49. IDSA – Infectious Diseases Society of America;
50. ITS – internal transcribed rDNA spacer regions;
51. RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium);
52. TR₃₄/L98H – сочетание тандемных повторов (tandem repeats) в промоторном регионе гена *Cyp51A* с точечной мутацией;
53. TRANSNET – Transplant-Associated Infection Surveillance Network

Защита диссертации состоится "22" февраля 2024 года в 16⁰⁰ на заседании Диссертационного совета ВЕД 4.19, действующего на базе Азербайджанского Медицинского Университета.

Адрес: AZ1022, Баку, А.Гасымзаде 14 (зал для конференций).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Азербайджанского Медицинского Университета.

Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте Азербайджанского Медицинского Университета.

Автореферат разослан по соответствующим адресам "25" января 2024 года.

Подписано в печать: 17.01.2024

Формат бумаги: 60x84 ¹/₁₆

Объем: 36138 знаков

Тираж: 70