



Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии
Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии
ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России

Учредители:

Синопальников А.И.; Пискунов Г.Г.; Козлов Р.С.; Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ)

Главный редактор:
Синопальников А.И.

Адрес редакции:

214019, Смоленская обл., г. Смоленск, ул. Кирова, д. 46А

Эл. почта: info@cmac-journal.ru

Адрес для корреспонденции:

214019, г. Смоленск, а/я 5.

Тел./факс: +7(4812)45-06-02

Издатель МАКМАХ:

214019, г. Смоленск,

ул. Кирова 46А, www.iacmac.ru

Адрес типографии:

214020, Россия, г. Смоленск,

ул. Смольянинова, д. 1

Электронная версия журнала:

https://cmac-journal.ru

Подписка на сайте издателя:

https://service.iacmac.ru

Журнал зарегистрирован

Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор).

Запись в реестре зарегистрированных СМИ: ПИ № ФС 77 – 86269 от 27.11.2023

Не распространяется через предпринятия связи
Тираж 3000 экз.

Свободная цена

Дата выхода – 24.07.2025

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук

Присланные в редакцию статьи проходят рецензирование

Мнение редакции может не совпадать с точкой зрения авторов публикуемых материалов

Ответственность за достоверность рекламных публикаций несут рекламодатели

При перепечатке ссылка на журнал обязательна

Журнал является научным изданием для врачей, в связи с чем на него не распространяются требования Федерального закона от 29.12.2010 №436-ФЗ «О защите детей от информации, причиняющей вред их здоровью и развитию»

Иллюстрация для обложки предоставлена: Ольга Николаевна Пинегина (ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России)

© Клиническая микробиология

и антимикробная химиотерапия, 2025.

Содержание

Болезни и возбудители

- 4 Козлов Р.С., Голуб А.В.
Комплексная оценка роли нитрофуранов при инфекциях нижних отделов мочевых путей
Рачина С.А., Купрюшина О.А., Стрелкова Д.А., Авдеев С.Н., Власенко А.Е., Яснева А.С., Юданова Т.А., Трофименко И.Н., Антонов В.Н., Агибалова М.Н., Мержоева З.М., Яцышина С.Б., Тихонова М.А., Елькина М.А., Ананичева Н.А., Бурмистрова Е.Н., Сухорукова М.В., Кашаканова Н.М., Федорова А.Ю., Валиулина Д.С., Семёнова Н.С., Ухорская Ю.А.
- 11 Роль соотношения прокальцитонин/ферритин в дифференциальной диагностике поражения легких вирусной и бактериальной этиологии
Свищева М.В., Колесникова Е.А.
- 18 Клиническое значение бактерий рода *Weissella*: краткий обзор
Рябенко Ю.Н., Рябенко Э.Б.
- 23 Дифтерия и ее профилактика
Ортенберг Э.А., Вешкурцева И.М.
- 27 Интракраниальные абсцессы: некоторые клинико-фармакологические аспекты мультидисциплинарного подхода

Антимикробные препараты

- 33 Струкова Е.Н., Голикова М.В.
Фармакодинамика меропенема и комбинации меропенема с авибактамом при воздействии на *Klebsiella pneumoniae* в динамической системе *in vitro*
- 42 Цефиксим (современный пероральный цефалоспорин III поколения) и его место в клинической практике. Резолюция Совета экспертов

Антибиотикорезистентность

- 51 Резолюция X Всероссийской научно-практической конференции «Стратегия контроля антибиотикорезистентности в стационаре»
Кузьменков А.Ю., Виноградова А.Г., Гуляева Н.А., Свято О.П.
- 54 Модель экономических потерь при некорректной микробиологической диагностике антимикробной резистентности и нерациональном применении антимикробных препаратов
Венчакова В.В., Оганесян Э.Г., Гусева А.О., Ковыршин С.В., Русецкая Е.В., Марочкович О.А., Долго-Сабунова Ю.В., Богомолова Т.С., Чжан Ф.-М., Мэн Ц., Васильева Н.В., Тараскина А.Е.
- 73 Молекулярно-биологические особенности штаммов *Candida albicans* – возбудителей рецидивирующего вульвовагинального кандидоза с различной чувствительностью к противогрибковым лекарственным средствам *in vitro*
Бочарова Ю.А., Кулешов К.В., Чеботарь И.В., Маянский Н.А.
- 88 Феномен изменения чувствительности *Pseudomonas aeruginosa* к азтреонаму при формировании колистинорезистентности *in vitro*

Опыт работы

- Халитова Ю.А., Жестков А.В., Мياкишева Ю.В.
- 94 Микробиологический статус пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника
Кайтуков А.О., Глушкова Е.В., Брико Н.И., Крыжановский В.Г., Салмина Т.А., Орлова О.Е., Каширина А.Ю.
- 101 Резистентность к антимикробным препаратам стрептококков различных видов в отделениях многопрофильного стационара
Федотов В.Д., Жестков А.В., Лямин А.В., Лавренюк Н.А., Добротина И.С., Фалалеева Е.А.
- 111 Особенности микробиоты у пациентов с различными клиническими фенотипами ХОБЛ и хронического бронхита профессиональной этиологии

Молекулярно-биологические особенности штаммов *Candida albicans* – возбудителей рецидивирующего вульвовагинального кандидоза с различной чувствительностью к противогрибковым лекарственным средствам *in vitro*

Венчакова В.В.¹, Оганесян Э.Г.¹, Гусева А.О.¹, Ковыршин С.В.¹, Русецкая Е.В.¹, Марочкович О.А.¹, Долго-Сабурова Ю.В.¹, Богомоллова Т.С.¹, Чжан Ф.-М.², Мэн Ц.², Васильева Н.В.¹, Тараскина А.Е.¹

¹ ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

² Харбинский медицинский университет, Харбин, Китай

Контактный адрес:

Анастасия Евгеньевна Тараскина
Эл. почта: Anastasiya.Taraskina@szgmu.ru

Ключевые слова: рецидивирующий вульвовагинальный кандидоз, *Candida albicans*, резистентность к азолам, мутации *ERG11*, экспрессия генов, биопленкообразование.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Внешнее финансирование: исследование проведено без внешнего финансирования.

Цель. Определение молекулярно-биологических характеристик штаммов *Candida albicans*, выделенных при рецидивирующем вульвовагинальном кандидозе (РВБК), ассоциированных с формированием резистентности к препаратам азолового ряда.

Материалы и методы. В исследование было включено 36 клинических изолятов *C. albicans* от больных РВБК, обратившихся в НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина за амбулаторной помощью с июля по ноябрь 2024 г. Видовую идентификацию *Candida* spp. проводили методами MALDI-TOF масс-спектрометрии и таргетного секвенирования. Чувствительность *Candida* spp. к противогрибковым лекарственным средствам (ПГЛС) определяли с помощью тест системы Fungus AST (Autobio Diagnostics Co, Китай) с интерпретацией пороговых значений МПК в соответствии с CLSI M27A, 2022. Нуклеотидную последовательность гена *ERG11* изучали методом таргетного секвенирования на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500. Уровень экспрессии генов белков-транспортеров лекарственных препаратов *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* и *FLU1* анализировали в ходе ПЦР-РВ с использованием флуоресцентного красителя EVA Green методом относительных измерений 2-ΔΔCt. Биопленкообразование штаммов *C. albicans* оценивали по общей клеточной массе (окрашивание водным раствором кристаллического фиолетового) и метаболической активности клеток (метод восстановления солей тетразолия). Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрических критериев оценки программы SPSS v.22.0.

Результаты. 11 (30,5%) штаммов были чувствительны к флуконазолу, 6 (14,0%) – отнесены к категории «чувствительный дозо-зависимый», 20 (55,5%) – резистентны к данному ПГЛС. Все штаммы были чувствительны к полиенам, эхинокандинам и 5-флуцитозину. В работе показана корреляция между нуклеотидным полиморфизмом гена *ERG11* и чувствительностью штамма к флуконазолу. Резистентные штаммы *C. albicans* (МПК >8 мг/л) отличались наименьшей вариабельностью и наличием в геномной единственной миссенс-мутации T394C (Y132H), ассоциированной с устойчивостью к азолам. Предположена возможная роль A1343G (E448G), как супрессорной внутригенной мутации, нивелирующей влияние T394C (Y132H) на конформационные изменения белка Erg11. В данном аспекте необходимы дальнейшие исследования. Для генов *ERG11* и *FLU1* показан повышенный уровень экспрессии ($p = 0,004$ и $p = 0,012$ соответственно) у нечувствительных к флуконазолу штаммов *C. albicans* по сравнению с чувствительными. Статистически значимых различий в экспрессии генов белков-транспортеров лекарственных препаратов *CDR1*, *CDR2* и *MDR1* не установлено. Все изученные штаммы *C. albicans* образовывали биопленки *in vitro*. Штаммы, резистентные к флуконазолу, обладали большей метаболической активностью и клеточной массой биопленки ($p = 0,011$ и $p = 0,012$ соответственно).

Выводы. Резистентность возбудителей РВБК в Северо-Западном регионе России ассоциирована с повышенным биопленкообразованием, аминокислотной заменой Y132H и повышенным уровнем экспрессии генов *ERG11* и *FLU1*.

Original Article

Molecular biological characteristics of *Candida albicans* strains causing recurrent vulvovaginal candidiasis with different susceptibility to antifungal drugs *in vitro*

Venchakova V.V.¹, Oganesyanyan E.G.¹, Guseva A.O.¹, Kovyrshin S.V.¹, Rusetskaya E.V.¹, Marochkovich O.A.¹, Dolgo-Saburova Yu.V.¹, Bogomolova T.S.¹, Zhang F.-M.², Meng Q.², Vasilyeva N.V.¹, Taraskina A.E.¹

¹ North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia

² Harbin Medical University, Harbin, China

Венчакова В.В. и соавт.

Contacts:

Anastasiya E. Taraskina
E-mail: Anastasiya.Taraskina@szgmu.ru

Key words: recurrent vulvovaginal candidiasis, *Candida albicans*, azoles resistance, *ERG11* mutations, gene expression, biofilm formation.

Conflicts of interest: all authors report no conflicts of interest relevant to this article.

External funding source: no external funding received.

Objective. To determine molecular biological characteristics of *Candida albicans* strains from patients with recurrent vulvovaginal candidiasis (RVVC) associated with the formation of resistance to azole drugs.

Materials and methods. The study included 36 clinical isolates of *C. albicans* from patients with RVVC who sought outpatient care at the P.N. Kashkin Research Institute of Medical Mycology from July to November 2024. Species identification of *Candida* spp. was performed using MALDI-TOF mass-spectrometry and targeted sequencing. The susceptibility of *Candida* spp. to antifungal drugs (AFDs) was determined using the Fungus AST test system (Autobio Diagnostics Co, China) with the interpretation of MIC clinical breakpoint values in accordance with CLSI M27A, 2022. The nucleotide sequence of the *ERG11* gene was studied using targeted sequencing on an ABI PRISM 3500 genetic analyzer. The expression level of genes encoding drug transporter proteins *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* and *FLU1* was analyzed by real-time PCR using the fluorescent dye EVA Green using the relative $2^{-\Delta\Delta C_t}$ measurement method. Biofilm formation of *C. albicans* strains was assessed by total cell mass (staining with an aqueous solution of crystal violet) and metabolic activity of cells (tetrazolium salt reduction method). Statistical processing of the results was carried out using nonparametric evaluation criteria of the SPSS v.22.0.

Results. 11 (30.5%) strains were susceptible to fluconazole, 6 (14.0%) classified as "susceptible dose-sensitive", 20 (55.5%) were resistant to this AFD. All strains were susceptible to polyenes, echinocandins and 5-flucytosine. The work shows a correlation between the nucleotide polymorphism of the *ERG11* gene and the sensitivity of the strain to fluconazole. Resistant strains of *C. albicans* (MIC > 8 mg/l) were characterized by the lowest variability and the presence in the genotype of a single missense mutation T394C (Y132H), associated with resistance to azoles. A possible role of A1343G (E448G) as a suppressor intragenic mutation that neutralizes the effect of T394C (Y132H) on conformational changes in the Erg11 protein has been suggested. Further research is need in this aspect. The *ERG11* and *FLU1* genes showed increased expression levels ($p = 0.004$ and $p = 0.012$, respectively) in fluconazole-resistant *C. albicans* strains compared to susceptible strains. No significant differences were found in the expression of genes encoding drug transporter proteins *CDR1*, *CDR2* and *MDR1*. All studied *C. albicans* strains formed biofilms *in vitro*. Fluconazole-resistant strains had higher metabolic activity and biofilm mass ($p = 0.011$ and $p = 0.012$, respectively).

Conclusions. Resistance of RVVC pathogens in the North-West region of Russia is associated with increased biofilm formation, amino acid substitution Y132H and increased expression of the *ERG11* and *FLU1* genes.

Введение

В последние два десятилетия во всем мире существенно возросла роль микроскопических грибов, как возбудителей поверхностных, так и инвазивных микозов [1, 2]. Особую проблему представляет вульвовагинальный кандидоз (ВВК), который является самым распространенным грибковым заболеванием среди женщин репродуктивного возраста – 75% всех женщин, по крайней мере, один раз в жизни сталкивались с ВВК [3]. Причем, у 9% заболевание приобретает тяжелую рецидивирующую форму с частотой обострений не менее четырех эпизодов в течение года и диагностируется как рецидивирующий вульвовагинальный кандидоз (РВВК). По мировым данным ежегодно от РВВК страдает примерно 138 млн женщин (преимущественно от 25 до 35 лет), что составляет 3871 случаев на 100 000 населения [2, 4]. В странах с высоким уровнем дохода экономическое бремя потери производительности от РВВК может достигать 14,39 млрд долларов США в год [2].

При этом, невзирая на распространенность РВВК во всем мире и обширные эпидемиологические исследования, заболевание имеет ограниченные возможности терапии и неопределенный патогенез; а долгосрочный прием флуконазола с целью профилактики остается доминирующей стратегией лечения. Но растущая резистентность возбудителя к препаратам азолового ряда ставит под сомнение эффективность данной тактики лечения РВВК [5–7]. По нашим данным за последнее десятилетие процент резистентных к флуконазолу штаммов возбудителей РВВК возрос от 3 до 49% [8, 9]. Отягощает данный факт проблема ограниченного числа эффективных доступных противогрибковых лекарственных средств (ПГЛС).

Несмотря на то, что частота РВВК, ассоциированного с дрожжевыми грибами не-*albicans** видов, неуклонно растет, *Candida albicans* по-прежнему остается наиболее распространенным этиологическим агентом, вызывающим от 75 до 90% случаев заболевания [11–13].

* В связи с пересмотром номенклатуры грибов рода *Candida* [10] использование термина «*Candida* не-*albicans*» вид, как это делалось исторически, ошибочно.

Резистентность к азолам *C. albicans* – многоуровневый комплексный процесс, включающий множество факторов. Были предложены различные гипотезы формирования резистентности: (1) уменьшение проницаемости клеточной мембраны, которое может снижать количество препарата, поступающего в клетку; (2) усиление способности деградации лекарственных средств; (3) миссенс-мутации гена *ERG11*, кодирующего фермент ланостерол-14альфа-деметилазу – «мишень» действия азолов, приводящие к конформационным изменениям белка, снижающим его аффинитет к молекулам ПГЛС; (4) гиперэкспрессия генов мембранных транспортеров системы эффлюкса, способствующая активному выведению ПГЛС из грибковой клетки (снижение внутриклеточной концентрации азолов); (5) образование биопленки, обеспечивающей защитную эконису для клеток гриба [14–17].

В настоящее время аминокислотные замены белка – ключевого фермента синтеза эргостерола (основного компонента клеточной мембраны грибов) – ланостерол-14альфа-деметилазы (*Erg11*) и гиперэкспрессия генов белков-транспортеров лекарственных препаратов рассматривают как две основные причины (фактора) развития резистентности дрожжевых грибов к ПГЛС азолового ряда [18–21].

Известно, что ген *ERG11* клинических изолятов *C. albicans* характеризуется высоким полиморфизмом: согласно современным данным описано более 140 уникальных полиморфных вариантов, и этот список постоянно расширяется [22], однако не все нуклеотидные замены влияют как на первичную (линейную), так и на пространственную структуру белка. Кроме того, несмотря на то, что большинство описанных аминокислотных замен независимо или в комбинации с другими механизмами связаны со снижением чувствительности дрожжевых грибов к азолам, для ряда мутаций связь с фенотипической устойчивостью не доказана.

В формировании резистентности к ПГЛС дрожжевых грибов играют роль два основных типа трансмембранных транспортеров, отвечающих за эффлюкс лекарственных средств: АТФ-связывающие кассетные транспортеры (ABC-ATF-binding cassette) и транспортеры суперсемейства основных переносчиков (фасилитаторов) (MFS – Major-Facilitator superfamily). Быстрый отток ПГЛС, который обеспечивает гиперэкспрессия *CDR1*, *CDR2* и *MDR1*, *FLU1* транспортеров, относящихся к ABC и MFS типам соответственно, не позволяет достичь летальных внутриклеточных концентраций азолов, тем самым способствуя выживанию грибкового патогена [23–27]. Однако сведения о влиянии того или иного транспортера системы клеточного эффлюкса на базовый уровень устойчивости к азолам у клинических изолятов *C. albicans* неоднозначны и зачастую носят противоречивый характер [28–36]. Следует отметить, что механизмы формирования резистентности грибковых патогенов к ПГЛС (уровень мРНК генов белков – транспортеров, нуклеотидный полиморфизм гена *ERG11*) сильно варьируют в зависимости от популяционной при-

надлежности штаммов (отличаются не только среди различных географических регионов, но и среди различных медицинских учреждений внутри одного региона) и локализации грибковой инфекции.

Независимо от описанных выше молекулярно-генетических механизмов устойчивости к ПГЛС, биопленкообразование для клинических изолятов дрожжевых грибов является дополнительным способом формирования резистентности и толерантности к лекарственной терапии, что делает лечение грибковых инфекций, ассоциированных с образованием биопленок, особенно сложным [37, 38]. Особую актуальность образование биопленок приобретает в случае рецидивирующей инфекции, такой как РВБК, способствуя адаптации клеток грибов к действию ПГЛС, персистенции и повторной манифестации заболевания.

Несмотря на актуальность проблемы неэффективности терапии РВБК и лекарственной резистентности возбудителя, в настоящее время стоит отметить ограниченность информации о молекулярно-генетических и биологических факторах ее формирования на территории России, что затрудняет внедрение эффективных диагностических, терапевтических и профилактических стратегий. Таким образом, изучение локальной эпидемиологии РВБК, определение ключевых характеристик клинических изолятов *C. albicans*, ассоциированных с РВБК, является актуальной задачей, решение которой будет способствовать совершенствованию профилактики, диагностики и терапии микотических инфекций, снижению глобального бремени микозов.

Цель исследования – определение молекулярно-биологических характеристик штаммов *C. albicans*, выделенных при РВБК, ассоциированных с формированием резистентности к препаратам азолового ряда.

Материалы и методы

Дизайн исследования

В настоящее исследование было включено 36 клинических изолятов *C. albicans* от пациенток, средний возраст 33 ± 6 лет (от 18 до 44 лет), с установленным диагнозом РВБК (медиана длительности заболевания – 24,0 (18,0÷41,0) месяца; частота рецидивов в год – 10,0 (8,0÷12,0)), обратившихся в НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина за амбулаторной помощью с июля по ноябрь 2024 г. РВБК диагностировался на основании следующих критериев: наличие у пациенток ≥ 4 эпизодов заболевания в течение года, отсутствие ответа на первоначальную противогрибковую терапию, наличие дрожжевых грибов при микроскопическом и культуральном исследовании. Критериями исключения служили: беременность; тяжелая эндокринная патология, в том числе в сочетании с выраженными нарушениями менструальной функции (синдром поликистозных яичников, другие нейроэндокринные синдромы); наличие инфекций, передающихся половым путем, на момент исследования. Пациенткам была объяснена суть исследования, и от каждой было получено письмен-

ное согласие на участие. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Минздрава России, протокол № 06 от 19.06.2024 г.

Выделение и идентификация штаммов *C. albicans*

Материал для микологического обследования брали с 16 по 23 день цикла стерильным ватным тампоном, смоченным в физиологическом растворе, с заднебокового свода влагалища. Все образцы подвергали прямому микроскопическому исследованию для идентификации грибковых элементов и культуральному исследованию на агаре Сабуро с хлорамфениколом (НИЦФ, Россия) при температуре 37°C в течение 48 ч. Видовую идентификацию дрожжевых грибов проводили с использованием автоматизированной системы MALDI-TOF MS (BactoSCREEN, НПФ «ЛИТЕХ») с дальнейшим подтверждением методом таргетного секвенирования по региону ITS рДНК (номера доступа последовательностей (accession numbers) ITS в базе данных GenBank NCBI: PQ738280-PQ738315). Выделенные штаммы *C. albicans* хранили в бульоне Сабуро (НИЦФ, Россия) при -86°C для дальнейшего анализа. Для всех экспериментов, запланированных в исследовании, использовали суточные культуры грибов *C. albicans*, субкультивированные на агаре Сабуро.

Определение чувствительности штаммов *C. albicans* к противогрибковым лекарственным средствам

Чувствительность к ПГЛС клинических изолятов *C. albicans* определяли с помощью коммерческой колориметрической тест-системы Fungus AST (Autobio Diagnostics Co, Китай). Отнесение штаммов к той или иной категории чувствительности (чувствительный, чувствительный дозозависимый или резистентный) осуществляли согласно клинически значимым пороговым значениям минимальной подавляющей концентрации (МПК) в соответствии с документом CLSI M27A, 2022 [39].

Выделение ДНК

Геномную ДНК клинических изолятов *C. albicans* выделяли с использованием модифицированного протокола СТАВ/хлороформ-изоамиловый спирт в соот-

ветствии с методом, описанным для выделения ДНК растений [40, 41], предварительно проведя гомогенизацию клеток гриба в 500 мкл экстракционного СТАВ-буфера 20 сек. при интенсивности 5000 об/мин на приборе Precellys24 (Bertin Technologies, Франция). Осадок промывали в 300 мкл этанола 70%, обезвоживали на воздухе, регидратировали в 50 мкл ddH₂O и хранили при +4°C.

Анализ нуклеотидных вариантов гена *ERG11* штаммов *C. albicans*

Для определения нуклеотидной последовательности гена *ERG11*, кодирующего ланостерол-14альфа-деметилазу, в анализ была включена полная последовательность гена *C. albicans* (1587 п.о.), амплифицированная с использованием праймеров, разработанных в ходе работы с помощью инструмента Primer-Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi), Таблица 1.

ПЦР-амплификацию гена *ERG11* осуществляли в конечном объеме реакционной смеси 50 мкл (5 мкл смеси dNTP (2,5 mM), 5 мкл 10-кратного реакционного буфера (750 mM Tris-HCl (pH 8,8), 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Tween 20), 2 мкл каждого праймера (5 пМ), 5 мкл 25 mM MgCl₂, 2,5 мкл геномной ДНК, 0,2 мкл ДНК-полимеразы Taq (5000 ЕД/мл) (New England BioLabs, США) и 28,3 мкл ddH₂O) с использованием следующей программы: 5 мин. денатурации при 95°C, затем 35 циклов: 30 сек. при 95°C, 45 сек. при 57°C и 60 сек. при 72°C, а также финальная стадия элонгации при 72°C в течение 10 мин. Качество ПЦР-продуктов и соответствие молекулярному весу анализировали с помощью электрофореза в 6% полиакриламидном геле.

Продукты ПЦР, очищенные с помощью набора GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, США), служили в качестве матрицы для циклического секвенирования, которое проводили с использованием набора BrilliantDye™ Terminator Cycle Sequencing kit v3.1 (NimaGen, Нидерланды), и праймеров (Таблица 1) с последующим удалением невключенных терминаторов и ионов солей из продуктов реакции с применением набора iX-Pure Dye Terminator Cleanup Kit (Applied Biosystems, США), с последующей оценкой сиквенса-продуктов на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, Hitachi, Япония). Затем контиги

Таблица 1. Структура праймеров, используемых для определения нуклеотидной последовательности гена *ERG11*

Название	Последовательность (5'-3')	Назначение	Размер фрагмента
CaERG11_I_F	AGACAAAGAAAGGGAATTCAATCGT	амплификация/секвенирование <i>ERG11</i>	1713 п.о.
CaERG11_III_R	TGAATCGAAAGAAAGTTGCCGT		
CaERG11_II_F	TCCAGTTTTCCGGTAAAGGGGTT	секвенирование <i>ERG11</i>	
CaERG11_II_R	GCAGAAGTATGTTGACCACCC		
CaERG11_III_F	GTGGTGATATTGATCCAAATCGTG		
CaERG11_I_R	ACATTGGCAACCCCATGAGT		

обеих цепей гена *ERG11* были собраны в консенсусную последовательность, выровненную на референсную последовательность *C. albicans* strain Iowa: 20628.078 (GenBank: KM881482.1), с помощью программы Seaview v.4.7 [42].

Выделение РНК и синтез кДНК

Выделение тотальной РНК из клеток суточных культур *C. albicans* проводили с использованием набора SKYPrep RNA Pure Plant Plus (СкайДжин, Россия) с последующей обработкой образцов ДНКазой 1 для удаления возможных примесей ДНК, согласно инструкции производителя. Чистоту выделенных образцов РНК проверяли спектрофотометрически – отношением оптических плотностей 260 нм и 280 нм. Полученные образцы РНК хранили при -80°C .

Для получения комплементарной ДНК проводили реакцию обратной транскрипции мРНК при помощи набора HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Nanjing Vazyme Biotech Co, Китай) согласно инструкции производителя. Все манипуляции с выделенной мРНК и реактивами для реакции обратной транскрипции проводились на льду. Полученные образцы кДНК хранили при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение двух недель.

Определение относительного уровня мРНК генов *ERG11*, *CDR1*, *CDR2*, *MDR1*, *FLU1* и *PMA1*

Относительный уровень экспрессии генов, потенциально ассоциированных с формированием резистентности к азолам, *C. albicans* оценивался в ходе ПЦР-РВ в системе CFX96 Touch (Bio-Rad, США) с использованием интеркалирующего флуоресцентного красителя Eva Green. Реакцию амплификации проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 5 нг кДНК в качестве матрицы, 25 mM MgCl_2 (Thermo Scientific, США), 2,5 mM каждого dNTP (Thermo Scientific, США), по 25 пМ прямого (For) и обратного (Rev) праймеров (Синтол, Россия), 1 ед акт Taq ДНК-полимеразы (New England BioLabs, США) и ПЦР-буфера с красителем Eva Green (Синтол, Россия). Условия амплификации – начальная денатурация: 3 мин. при 95°C , далее 36 циклов: плавление при 95°C – 30 сек., отжиг при 60°C – 30 сек., синтез – 72°C (30 сек.). Уровень мРНК каждого из анализируемых генов был нормализован относительно уровня экспрессии рибосомального гена 18S, взятого в качестве эндогенного контроля. Структура праймеров для анализа экспрессии генов взята из литературных источников [29, 34].

Оценку относительного уровня мРНК генов проводили с использованием метода относительных измерений 2- $\Delta\Delta\text{Ct}$. Показатели среднего значения относительного уровня мРНК генов представлены в виде медианы (Me), нижнего и верхнего квартилей ($\text{Lq} \div \text{Hq}$).

Оценка биопленкообразования штаммов *C. albicans*

Развитие биопленки оценивали по методике Ramage G. и соавт. [43]. Суточную культуру грибов *C. albicans*, полученную на агаре Сабуро, рекультивиро-

вали в дрожжевом пептонно-декстрозном бульоне (YPD) (2% пептона, 1% дрожжевого экстракта и 2% глюкозы) в течение 20 ч. на шейкере (BioSan) при 180 об/мин при 37°C . Затем клетки отмывали 10 mM фосфатным буфером с добавлением 2,7 mM KCl и 137 mM NaCl, pH = 7,4 (Sigma) и ресуспендировали в среде RPMI 1640 с L-глутамином без бикарбоната (Gibco, США), забуференной до pH 7 3-(N-морфолинопропансульфоновой кислотой (MOPS, 0,165 M). 100 мкл данной суспензии, содержащей 10^6 клеток/мл, высевали в 96-луночные плоскодонные планшеты (Eppendorf, Германия) и инкубировали в течение 13 и 23 ч. при 37°C , что соответствовало окончаниям фаз адгезии и созревания биопленки. Каждый штамм исследовался в трех повторях. Сформированные биопленки *C. albicans* оценивали по двум показателям: общая клеточная масса – с помощью метода окрашивания водным раствором кристаллического фиолетового (CV), и метаболическая активность клеток в составе биопленки – с помощью метода восстановления солей тетразолия (XTT) [44, 45]. Результаты анализировали с помощью планшетного спектрофотометра Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific Oy, Финляндия) при длине волны 590 нм и 492 нм соответственно.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программы SPSS версия 22.0 (IBM, США). Для проверки статистических гипотез о виде распределения данных использовали W-тест Шапиро-Уилка. Так как изучаемые переменные имели существенное отклонение от нормального распределения, сравнение показателей проводили при помощи непараметрических критериев: для оценки различий между независимыми выборками использовали критерий Манна-Уитни – U; для оценки корреляционных зависимостей – критерий корреляции Спирмена. Статистически значимыми различиями сравниваемых параметров считали значения $p < 0,05$.

Результаты

Чувствительность к ПГЛС штаммов *C. albicans*, выделенных от пациенток с РВБК

Результаты определения чувствительности к ПГЛС (10 препаратов) для 36 клинических изолятов *C. albicans*, ассоциированных с РВБК, представлены в Таблице 2. Среди изученных штаммов 11 (30,5%) были чувствительны к флуконазолу, 6 (14,0%) – отнесены к категории «чувствительный дозозависимый», и 20 (55,5%) – резистентны к данному ПГЛС, при МПК_{50} для всех включенных в исследование штаммов 8 мг/л. Уровень резистентности штаммов *C. albicans*, возбудителей РВБК, к вориконазолу был практически сопоставим с данными для флуконазола и составил 52,8%, исключение составил один штамм, обладающий монорезистентностью к флуконазолу, остальные 19 штаммов *C. albicans* были полирезистентны к препаратам азолового ряда. Для позаконазола в настоящее время

существуют только эпидемиологические точки отсечения, поэтому оценить резистентность к данному ПГЛС затруднительно. При этом все включенные в работу штаммы были чувствительны (или не имели высоких МПК для препаратов с неутвержденными критериями интерпретации) к полиенам, эхинокандинам и 5-флуцитозину.

Нуклеотидный полиморфизм гена *ERG11* штаммов *C. albicans* с различной чувствительностью к флуконазолу

В ходе нашего исследования получено 36 полных последовательностей гена *ERG11* (1587 п.о.) клинических изолятов *C. albicans*, вызывающих РВБК, с различной чувствительностью *in vitro* к препаратам азолового ряда. Данные представлены в Таблице 3 и на

Рисунке 1. Изученные нуклеотидные последовательности *ERG11* депонированы в базу данных GenBank NCBI, номера доступа (GenBank accession numbers) приведены в Таблице 3. Всего было обнаружено 29 различных одонуклеотидных вариантов (ОНВ), из них 18 ОНВ (62%) представляли собой синонимичные замены, не приводящие к изменению структуры белка, а 11 ОНВ (38%) – миссенс-мутации, влияющие на аминокислотную последовательность.

Прослеживалась четкая корреляция между нуклеотидным полиморфизмом гена *ERG11* и чувствительностью штамма к флуконазолу: наибольшей гетерогенностью отличались чувствительные к азолам штаммы, наименьшей – резистентные. На Рисунке 1 видна четкая кластеризация штаммов на три группы: резистентные, чувствительные дозозависимые и чувствительные с МПК

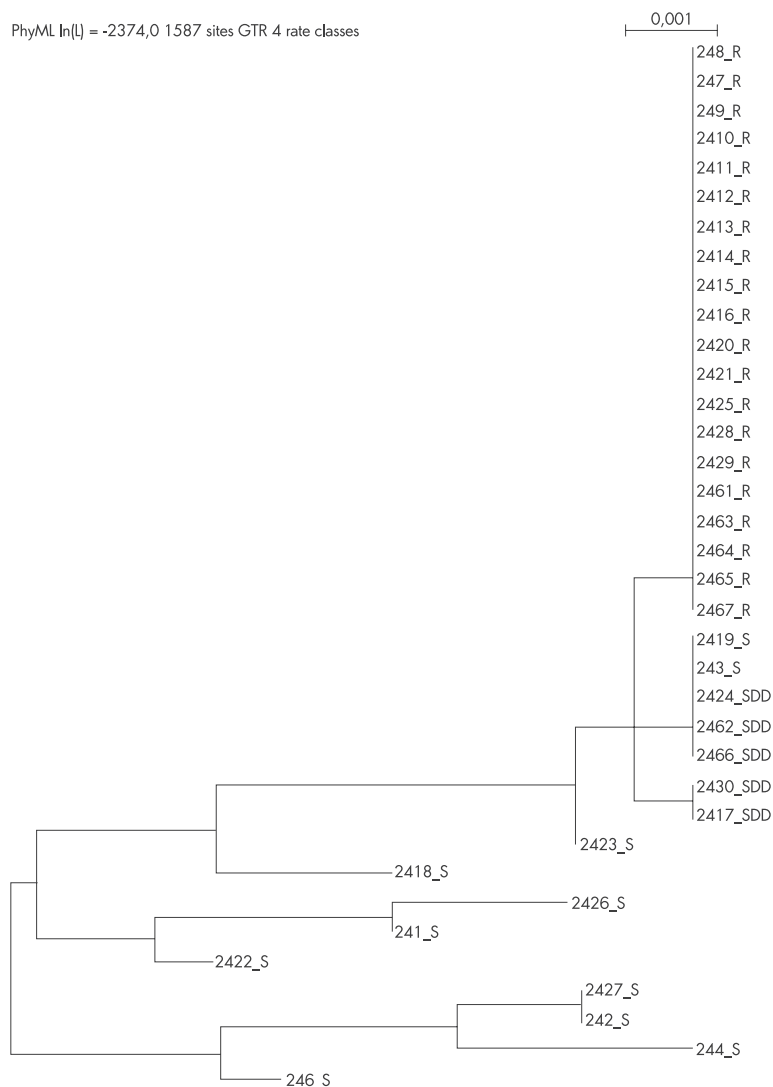


Рисунок 1. Филогенетическое дерево, созданное путем анализа максимального правдоподобия (программа Seaview v.4.7) нуклеотидных последовательностей гена *ERG11* клинических изолятов *C. albicans*, вызывающих РВБК

R – резистентный к флуконазолу штамм
SDD – чувствительный дозозависимый штамм
S – чувствительный штамм

Таблица 2. Чувствительность к противогрибковым лекарственным средствам штаммов *C. albicans*, вызывающих РВБК, на основе критериев CLSI M27A, 2022

Вид	ПГЛС	Резистент- ность, %	Диапазон МПК (мг/л)	МПК ₅₀ (мг/л)	МПК ₉₀ (мг/л)	МПК (мг/л)												
						32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015	
Candida albicans (n = 36)	Азолы																	
	FLU	55,5	0,06–32	8	16	1	4	15	5	3	2	4	1	1				
	VOR	52,8	0,015–2	1	1					3	16	3	3	3		4	4	
	POS	-	0,06–0,25	0,125	0,25								10	9	17			
	ITRA	-	0,125–1	0,5	0,5						1	18	6	11				
	Полиены																	
	AmB	-	0,5–1	0,5	1						12	24						
	NYS	-	2–4	4	4				30	6								
	Эхинокандины																	
	AND	0	0,007–0,125	0,015	0,03									1	14	4	17	
	MCF	0	0,015–0,125	0,03	0,06									1	10	22	3	
	CAS	0	0,03–0,125	0,03	0,06									2	16	18		
	Фторированные пиримидины																	
	5-flu	-	0,015–1	0,25	0,5						2	16	7	4	5	1	1	

«-» - нет утвержденных критериев интерпретации.

FLU – флуконазол; VOR – вориконазол; POS – позаконазол; ITRA – итраконазол; AmB – амфотерицин В; NYS – нистатин; AND – анидулафунгин; MCF – микафунгин; CAS – каспофунгин; 5-flu – 5-флуцитозин.

2 мг/л, и чувствительные с МПК < 1 мг/л. Последняя группа представляла на филогенетическом дереве три отдельные ветки с последующим делением, характеризовалась множественными молчащими мутациями и наличием от одной до четырех следующих миссенс-мутаций: D116E, K128T, E266D, V404I, Y447C, E448G, V488I, I483V. Уникальную группу представляли штаммы категории «чувствительный дозозависимый» *in vitro* к флуконазолу, кластеризующиеся с чувствительными штаммами с МПК 2 мг/л (верхняя граница интерпретации чувствительности). Данные изоляты имели генотип *ERG11*, представленный тремя миссенс-мутациями: две из которых были одинаковы для всех штаммов T394C (Y132H) и A1343G (E448G), а третья имела межштаммовые вариации – C368T (T123I) или G1349A (G450E). Исключение составил штамм 2426, отличающийся наибольшим нуклеотидным полиморфизмом. Интересно отметить, что все штаммы этой группы имели мутацию T394C (Y132H), для которой определенно доказана ассоциация с развитием резистентности к ПГЛС азолового ряда [46], и миссенс-мутацию A1343G (E448G), входящую в генотип всех чувствительных и чувствительных дозозависимых штаммов, изученных в данной работе. На основании полученных данных можно предположить, что миссенс-мутация A1343G (E448G) имеет протективный эффект, предотвращая развитие резистентности *in vitro* у грибов *C. albicans*, и является супрессорной внутригенной мутацией, нивелирующей влияние мутации T394C (Y132H) на конформационные изменения белка *Erg11*, снижающие его аффинитет к молекулам ПГЛС. При этом воздействие *in vivo* препаратами азолового ряда на данную категорию штаммов (при терапии РВБК) необходимо изучить дополнительно. Группа резистент-

ных к азолам штаммов *C. albicans* (МПК > 8 мг/л) отличалась наименьшей вариабельностью нуклеотидной последовательности и наличием в генотипе единственной миссенс-мутации T394C (Y132H), ассоциированной с развитием устойчивости к азолам.

Относительный уровень экспрессии *ERG11* и генов белков-транспортеров лекарственных препаратов *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* и *FLU1*

При проведении дальнейшей статистической обработки результатов клинические изоляты *C. albicans*, включенные в исследование, были поделены на две группы: чувствительные и нечувствительные к флуконазолу, во вторую группу вошли помимо резистентных штаммов, чувствительные дозозависимые. Визуализация полученных результатов представлена на Рисунке 2. Относительный уровень мРНК генов *ERG11* и *FLU1* был значимо выше для нечувствительных к флуконазолу штаммов и составил 1,52 (0,36÷7,41) vs 0,07 (0,003÷1,13), $p = 0,004$ и 0,84 (0,29÷3,02) vs 0,04 (0,006÷1,35), $p = 0,012$ соответственно. Кроме того, установлены корреляции между показателями экспрессии данных генов (*ERG11* и *FLU1*) ($r = 0,877$, $p < 0,001$). Статистически значимых различий в экспрессии генов белков-транспортеров лекарственных препаратов *CDR1*, *CDR2* и *MDR1* между изучаемыми группами не установлено.

Характеристика биопленкообразования штаммов *C. albicans*, ассоциированных с РВБК

В целом, процесс развития биопленки *C. albicans* можно разделить на четыре основные фазы: адгезия, пролиферация, созревание и рассеивание [38]. В пред-

Таблица 3. Нуклеотидный (аминокислотный) полиморфизм гена *ERG11* возбудителей РВБК, выделенных на территории России

Штамм №	GenBank accession numbers	МПК FLU (мг/л)	Генотип <i>ERG11</i>
241	PQ720363	0,06	T315C, T348A (D116E*), A357G, C411T, C658T, C1110T, A1343G (E448G), A1440G, T1470C
244	PQ720366	0,13	C216T, T315C, T348A (D116E), A357G, C411T, C658T, A798C (E266D), T996C, A1020G, A1026G, C1110T, T1203C, C1296T, T1302C, A1343G (E448G), A1440G, G1462A (V488I), T1470C
242	PQ720364	0,25	C216T, T315C, C411T, T549C, C658T, A798C (E266D), T996C, A1026G, C1110T, T1203C, C1296T, T1302C, A1343G (E448G), G1462A (V488I)
246	PQ720367	0,25	C216T, T315C, C411T, T549C, C658T, A798C (E266D), T996C, A1026G, A1083G, C1110T, T1203C, A1343G (E448G), T1368A, A1440G, T1470C
2422	PQ720383	0,25	T315C, T348A (D116E), A357G, C411T, C658T, T996C, A1083G, C1110T, T1203C, A1343G (E448G), T1368A, A1440G, T1470C
2423	PQ720384	0,25	A1343G (E448G)
2418	PQ720379	0,50	T996C, A1083G, C1110T, T1203C, G1210A (V404I), T1284C, A1343G (E448G), A1440G, A1447G (I483V), T1470C
2427	PQ720388	0,50	C216T, T315C, C411T, T549C, C658T, A798C (E266D), T996C, A1026G, C1110T, T1203C, C1296T, T1302C, A1343G (E448G), G1462A (V488I)
2426	PQ720387	2,00	T315C, T348A (D116E), A357G, A383C (K128T), T394C (Y132H), C411T, C658T, A1020G, C1110T, A1340G (Y447C), A1343G (E448G), A1440G, T1470C
243	PQ720365	2,00	C368T (T123I), T394C (Y132H), A1343G (E448G)
2419	PQ720380	2,00	C368T (T123I), T394C (Y132H), A1343G (E448G)
2424	PQ720385	4,00	C368T (T123I), T394C (Y132H), A1343G (E448G)
2462	PQ720393	4,00	C368T (T123I), T394C (Y132H), A1343G (E448G)
2466	PQ720397	4,00	C368T (T123I), T394C (Y132H), A1343G (E448G)
2417	PQ720378	4,00	T394C (Y132H), A1343G (E448G), G1349A (G450E)
2430	PQ720391	4,00	T394C (Y132H), A1343G (E448G), G1349A (G450E)
249	PQ720370	8,00	T394C (Y132H)
2410	PQ720371	8,00	T394C (Y132H)
2412	PQ720373	8,00	T394C (Y132H)
2413	PQ720374	8,00	T394C (Y132H)
2414	PQ720375	8,00	T394C (Y132H)
2415	PQ720376	8,00	T394C (Y132H)
2416	PQ720377	8,00	T394C (Y132H)
2420	PQ720381	8,00	T394C (Y132H)
2421	PQ720382	8,00	T394C (Y132H)
2425	PQ720386	8,00	T394C (Y132H)
2429	PQ720390	8,00	T394C (Y132H)
2461	PQ720392	8,00	T394C (Y132H)
2463	PQ720394	8,00	T394C (Y132H)
2464	PQ720395	8,00	T394C (Y132H)
2465	PQ720396	16,00	T394C (Y132H)
2467	PQ720398	16,00	T394C (Y132H)
247	PQ720368	16,00	T394C (Y132H)
2411	PQ720372	16,00	T394C (Y132H)
2428	PQ720389	16,00	T394C (Y132H)
248	PQ720369	32,00	T394C (Y132H)

МПК – минимальная подавляющая концентрация; FLU – флуконазол.

* Жирным шрифтом в скобках обозначены соответствующие аминокислотные замены.

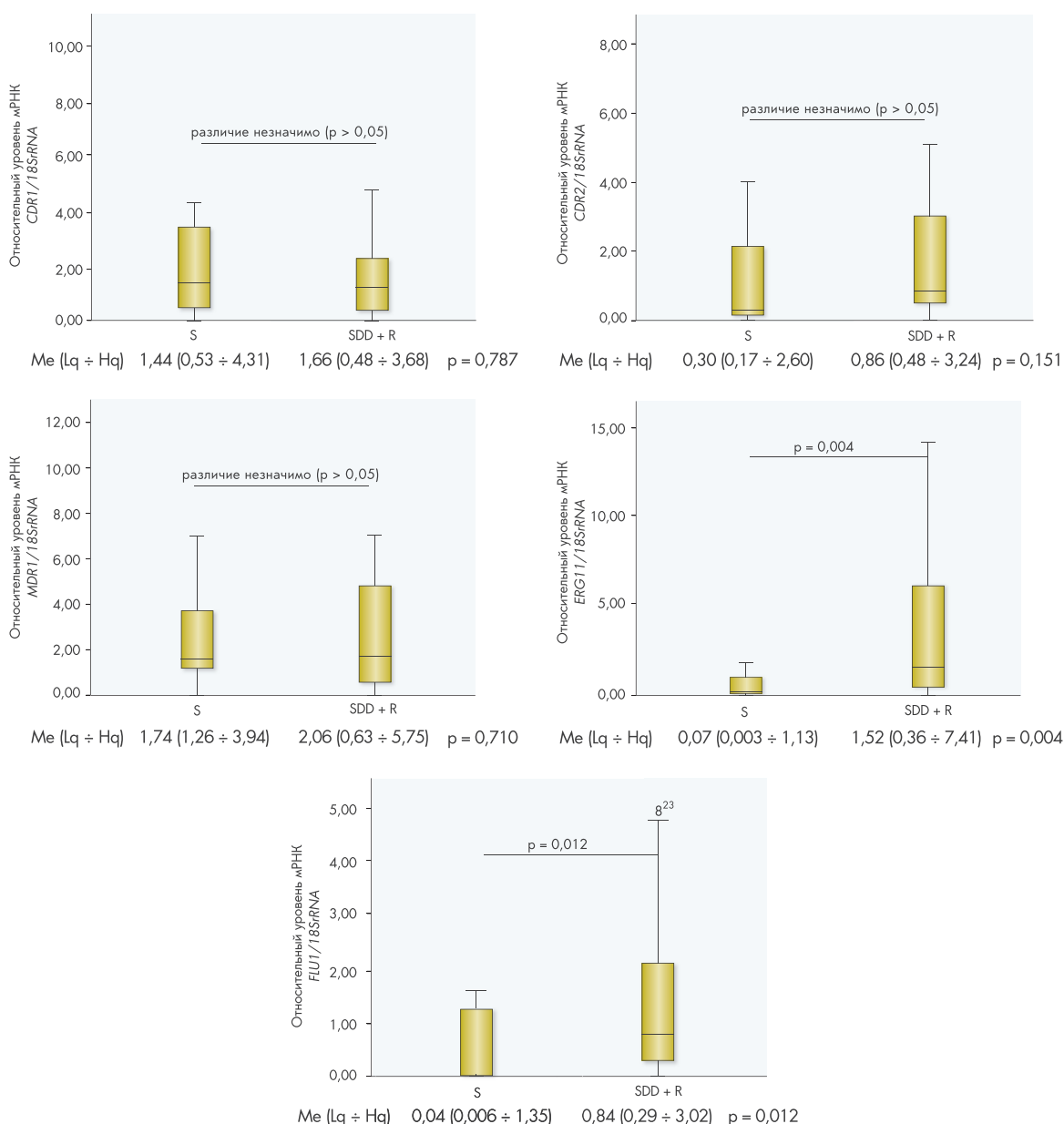


Рисунок 2. Относительный уровень мРНК гена *ERG11* клинических изолятов *C. albicans*, вызывающих РВБК, с различным уровнем чувствительности к флуконазолу

S – чувствительные к флуконазолу штаммы; SDD + R – нечувствительные к флуконазолу штаммы (чувствительные дозозависимые и резистентные)

ставляемой работе параметры биопленкообразования были проанализированы на стадии адгезии и созревания (Рисунок 3 и 4 соответственно).

Все изученные штаммы *C. albicans* образовывали биопленки *in vitro*. В конце фазы адгезии клеток к субстрату наибольшая метаболическая активность выявлена среди изолятов, резистентных к препаратам азолового ряда. Установлены статистически значимые различия ($p = 0,011$) метаболической активности нечувствительных и чувствительных штаммов. Для общей клеточной массы биопленки, выраженной в единицах опти-

ческой плотности экстрагированного кристаллического фиолетового, также получены статистически значимые различия ($p = 0,003$) между группой нечувствительных (наибольшая масса) и чувствительных к азолам изолятов *C. albicans*.

При оценке параметров биопленкообразования в фазу созревания статистически значимых различий в метаболической активности между резистентными и чувствительными к препаратам азолового ряда штаммами *C. albicans* не выявлено, но наибольший показатель получен в группе изолятов, резистентных к азолам.

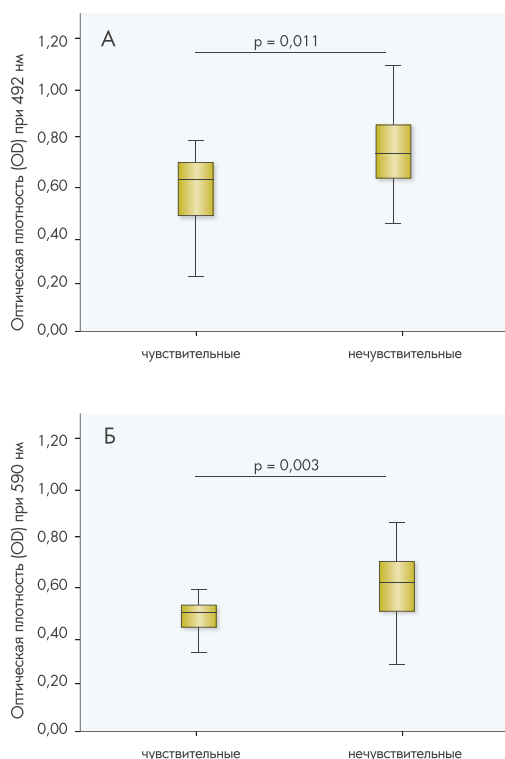


Рисунок 3. Параметры биопленкообразования клинических изолятов *C. albicans* в фазу адгезии
А – метаболическая активность биопленки
Б – общая клеточная масса биопленки

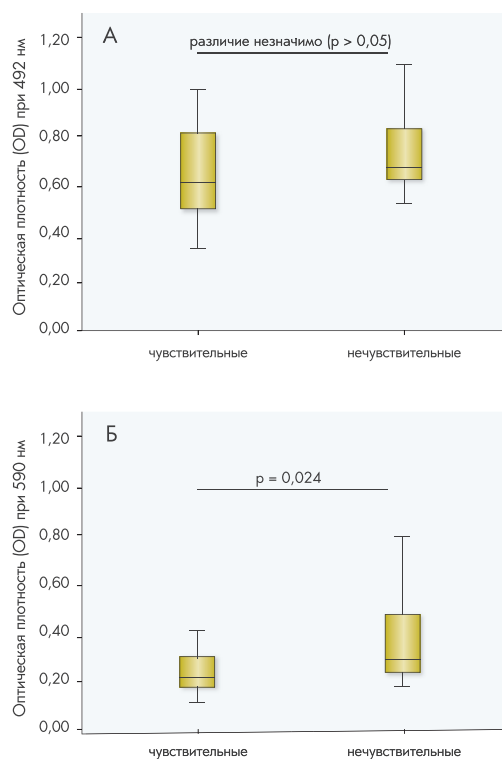


Рисунок 4. Параметры биопленкообразования клинических изолятов *C. albicans* в фазу созревания
А – метаболическая активность биопленки
Б – общая клеточная масса биопленки

По показателю общей клеточной массы все группы статистически значительно различались между собой ($p = 0,024$), наибольший ее уровень также отмечен у группы нечувствительных к азолам штаммов.

Обсуждение

Вовлечение в инфекционные процессы резистентных к противомикробной терапии микроорганизмов ограничивает терапевтические возможности, крайне негативно сказывается на здоровье пациента и представляет собой глобальную проблему для современного здравоохранения [47, 48]. Более 50% изученных в данной работе клинических изолятов *C. albicans* – возбудителей РВБК – были резистентны к препаратам азолового ряда (флуконазолу, вориконазолу), которые являются препаратами выбора при терапии ВБК, а при рецидивирующих формах используются еще и профилактически до 6 месяцев. При этом, флуконазол зачастую назначают эмпирически, без выделения возбудителя, видовой идентификации и определения чувствительности к ПГЛС, что приводит к нерациональному применению ПГЛС, персистенции резистентных форм инфекции, утяжелению течения заболевания, нарастанию глобального бремени антимикробной резистентности [49]. Доказано в ходе долгосрочного исследования, что приобретенная рези-

стентность к флуконазолу *C. albicans*, ассоциированных с РВБК, остается стабильной, даже несмотря на длительную отмену азолов [50]. Более того, зачастую штаммы возбудителей РВБК резистентные к флуконазолу развивают перекрестную полирезистентность к препаратам азолового ряда (вориконазолу, итраконазолу), что преимущественно связывают с мутационными изменениями гена *ERG11* [51–53], значительно снижая терапевтические возможности для таких пациентов. В качестве альтернативных стратегий лечения РВБК, вызванных полирезистентными к азолам возбудителями, хорошо зарекомендовала себя местная терапия Амфотерицином В, 5-флуцитозином (в составе комбинированной терапии) [54–56]. Также есть отдельные данные об успешном применении эхинокандинов, в частности анидулафунгина [57]. По результатам нашей работы эти препараты в настоящее время могут рассматриваться в качестве терапии резерва при РВБК.

В основе адаптации к воздействию антимикробных лекарственных средств лежат процессы микроэволюции, приводящие к дивергенции популяции внутри вида, позволяющей приобретать микроорганизму резистентность к применяемой антимикробной терапии. Изучение молекулярно-генетических механизмов и биологических аспектов формирования резистентности к ПГЛС оппортунистических грибов, возбудителей РВБК, будет спо-

способствовать определению биомаркеров прогноза назначаемой терапии и совершенствованию терапевтических схем лечения заболевания, а также может стать основой разработки новых фармацевтических препаратов.

Известно, что индивидуальный нуклеотидный полиморфизм *ERG11* может влиять на селективную чувствительность к азолам и варьировать между географическими популяциями и от локализации инфекционного процесса [17–20]. Впервые в работе описана нуклеотидная структура *ERG11* возбудителей РВБК в России, показана ее зависимость от чувствительности штамма *C. albicans* к азолам. Все нечувствительные к флуконазолу штаммы и чувствительные по критериям CLSI M27A с МПК 2 мг/л являлись носителями мисенс-мутации T394C (Y132H), локализованной в участке цепи, формирующем активный центр фермента, приводящей к четырехкратному возрастанию МПК флуконазола. Также в работе впервые высказано предположение о значении генетического варианта A1343G (E448G), как супрессорной внутригенной мутации, ослабляющей влияние мутации T394C (Y132H). Данное предположение требует дополнительных исследований. Подобный эффект супрессорных мутаций описан для дрожжевых грибов, как в случае подавления приобретенной азолорезистентности независимым от *Erg11* образом [58], так и в случае супрессора чувствительности клеток гриба к флуконазолу (обратный эффект) для вида с природной умеренной чувствительностью к азолам [59]. Внутригенных мутаций, обладающих супрессивным потенциалом для дрожжевых грибов, патогенов человека, описано не было.

Несмотря на то, что представленные результаты позволяют рассматривать ОНВ T394C (Y132H) гена *ERG11* как генетический маркер резистентности грибов *C. albicans*, возбудителей РВБК, к триазолам для России, в изученной выборке штаммов приобретенная резистентность к азолам была также связана с повышенным уровнем экспрессии *ERG11* и *FLU1*. Однако для данных генов в литературе имеются противоречивые сведения о вкладе их транскрипционного профиля в формирование резистентности к ПГЛС. Тогда как гены белков «эффлюксных насосов» *CDR1*, *CDR2* и *MDR1* более широко обсуждаемые в литературе в контексте гиперэкспрессии при резистентности к азолам *C. albicans* [28, 29, 34, 60, 61], по результатам нашей работы не были ассоциированы с повышением МПК возбудителей РВБК.

Образование биопленки усложняет лечение, в том числе за счет резистентных штаммов в ее составе, и способствует высоким показателям заболеваемости и смертности, а также представляет собой один из основных факторов толерантности при терапевтическом воздействии, способствующий развитию рецидивирующих форм кандидоза [62], что соотносится с результатами представляемой работы. При изменении микробиоты влагалища при РВБК увеличивается метаболическая активность дрожжевых клеток и их биомасса в составе биопленки, которые проявляются при обострении РВБК, когда происходит активное размножение дрожжевых клеток как в виде планктонной формы,

так и в виде sessile клеток в составе биопленки. Вследствие этого концентрации назначенных препаратов азолового ряда оказываются недостаточными для полной эрадикации дрожжевых грибов, что позволяет им в течение нескольких периодов обострения и назначения терапии по стандартным схемам приобрести мутации в генах *ERG*. Данные мутации оказывают опосредованное влияние на внутриклеточные процессы, связанные с синтезом компонентов клеточной стенки у дрожжей, что отражается на их метаболической активности и общей клеточной массе биопленки, а следовательно, провоцирует новые эпизоды обострения РВБК, о чем свидетельствуют статистически значимые различия между чувствительными и резистентными к азолам штаммами *C. albicans*.

Текущее исследование имеет ряд ограничений. Во-первых, исследование ограничено одним географическим регионом – г. Санкт-Петербургом, а для оценки популяционной структуры в других регионах необходим системный мониторинг чувствительности и молекулярно-генетических факторов, ассоциированных с развитием резистентности возбудителей РВБК. Во-вторых, изученные штаммы *C. albicans* имели ограниченные метаданные о проводимой ранее фармакотерапии (применении противогрибковых препаратов и продолжительности терапии). В-третьих, работа была ограничена относительно небольшой выборкой клинических изолятов *C. albicans* – возбудителей РВБК. Сложность набора пациентов данной группы объясняется часто встречающимися коморбидными формами вульвовагинита с преобладанием бактериальной биоты над грибковой, подобные пациенты были исключены из исследования. Кроме того, несмотря на то, что большинство мисенс-мутаций, определенных нами в ходе анализа нуклеотидного полиморфизма гена *ERG11*, ранее уже были описаны в литературе, функциональное значение некоторых из них не было подтверждено экспериментально. Планируется проведение дополнительных исследований в данном направлении.

Заключение

Ключевым фактором появления резистентности к ПГЛС у грибов рода *Candida* является длительное, зачастую неконтролируемое или неэффективное применение лекарственных средств в клинической практике, субтерапевтические уровни ПГЛС в местах локализации инфекции, секвестрация в матриксе биопленок. В настоящее время уже не подвергается сомнению тот факт, что формирование резистентности *C. albicans* к применяемой антимикробной терапии происходит, как за счет структурных изменений в геноме микроорганизма, так и за счет эпигенетических механизмов, усиления транскрипции определенных генов, что, в свою очередь, приводит к повышенной экспрессии белков.

В настоящем исследовании было изучено несколько молекулярно-биологических механизмов, включая мутации гена *ERG11*, экспрессию генов белков транспор-

ров лекарственных препаратов *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* и *FLU1* и параметры биопленкообразования.

Высокий уровень распространенности резистентности к азолам возбудителей РВБК указывает на необходимость определения чувствительности и генетических маркеров резистентности к ППГС до начала противогрибковой терапии или поиска альтернативных схем противогрибковой терапии этого варианта кандидозного вульвовагинита. По результатам нашей работы ключевыми генетическими детерминантами резистентности является мисенс-мутация Т394С (Y132Н) и повышенный уровень экспрессии генов *ERG11* и *FLU1*, что будет основой разработки быстрых тестов на основе ПЦР для их определения.

Благодарность

Мы выражаем искреннюю благодарность всем, кто добровольно принял участие в этом исследовании, и сотрудникам НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина за поддержку и помощь в организации экспериментов. Отдельно благодарим Жорж Оксану Николаевну и Определенову Аллу Леонидовну за сбор биологического материала и кропотливую работу с пациентами, а также Гусарову Ксению Викторовну за вклад в видовую идентификацию клинических изолятов *C. albicans* методом таргетного секвенирования.

Исследование поддержано грантом Российского научного фонда (№ гранта: 24-45-00050).

Литература

- Denning D.W. Global incidence and mortality of severe fungal disease. *Lancet Infect Dis.* 2024;24(7):e428-e438. DOI: 10.1016/S1473-3099(23)00692-8
- Denning D.W., Kneale M., Sobel J.D., Rautemaa-Richardson R. Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(11):e339-e347. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30103-8
- Nyirjesy P., Brookhart C., Lazenby G., Schwabke J., Sobel J.D. Vulvovaginal candidiasis: a review of the evidence for the 2021 centers for disease control and prevention of sexually transmitted infections treatment guidelines. *Clin Infect Dis.* 2022;74(Suppl. 2):S162-S168. DOI: 10.1093/cid/ciab1057
- Cooke G., Watson C., Deckx L., Pirotta M., Smith J., van Driel M.L. Treatment for recurrent vulvovaginal candidiasis (thrush). *Cochrane Database Syst Rev.* 2022;1(1):CD009151. DOI: 10.1002/14651858.CD009151.pub2
- Satora M., Grunwald A., Zaremba B., Frankowska K., Żak K., Tarkowski R., et al. Treatment of vulvovaginal candidiasis – an overview of guidelines and the latest treatment methods. *J Clin Med.* 2023;12(16):5376. DOI: 10.3390/jcm12165376
- Sobel J.D., Sobel R. Current treatment options for vulvovaginal candidiasis caused by azole-resistance *Candida* species. *Expert Opin Pharmacother.* 2018;19(9):971-977. DOI: 10.1080/14656566.2018.1476490
- Li L., Zhang X., Li Q., Zhong W., Zou H. The increasing trend of triazole-resistant *Candida* from vulvovaginal candidiasis. *Infect Drug Resist.* 2024;17:4301-4310. DOI: 10.2147/IDR.S474304
- Dolgo-Saburova Yu.V., Zhorzh O.N., Vybornova I.V., Shurpitskaya O.A., Bosak I.A., Bogomolova T.S., et al. Etiology and sensitivity of pathogens of chronic recurrent vulvovaginal candidiasis to fluconazole *in vitro* in St. Petersburg in 2021-2022. *Problemy meditsinskoj mikologii.* 2022;24(2):66. Russian. (Долго-Сабурова Ю.В., Жорж О.Н., Выборнова И.В., Шурпицкая О.А., Босак И.А., Богомолова Т.С., и соавт. Этиология и чувствительность возбудителей хронического рецидивирующего вульвовагинального кандидоза к флуконазолу *in vitro* в Санкт-Петербурге в 2021-2022 гг. Проблемы медицинской микологии. 2022;24(2):66.)
- Kovyreshin S.V., Venchakova V.V., Vybornova I.V., Dolgo-Saburova Yu.V., Zhorzh O.N., Guseva A.O., et al. Recurrent vulvovaginal candidiasis: focus on *Candida albicans* resistance to antifungal drugs. *Problemy meditsinskoj mikologii.* 2024;26(4):61-66. Russian. (Ковыршин С.В., Венчакова В.В., Выборнова И.В., Долго-Сабурова Ю.В., Жорж О.Н., Гусева А.О. и соавт. Рецидивирующий вульвовагинальный кандидоз: фокус на резистентность *Candida albicans* к противогрибковым лекарственным средствам. Проблемы медицинской микологии. 2024;26(4):61-66.) DOI: 10.24412/1999-6780-2024-4-61-66.
- Kidd S.E., Halliday C.L., McMullan B., Chen S.C., Elvy J. New names for fungi of medical importance: can we have our cake and eat it too? *J Clin Microbiol.* 2021;59:e02730-20. DOI: 10.1128/JCM.02730-20
- Cetin M., Ocak S., Gungoren A., Hakverdi A.U. Distribution of *Candida* species in women with vulvovaginal symptoms and their association with different ages and contraceptive methods. *Scand J Infect Dis.* 2007;39:584-588. DOI: 10.1080/00365540601148491
- Boyd Tressler A., Markwei M., Fortin C., Yao M., Procop G.W., Soper D.E., et al. Risks for recurrent vulvovaginal candidiasis caused by non-albicans *Candida* versus *Candida albicans*. *J Womens Health.* 2021;30:1588-1596. DOI: 10.1089/jwh.2020.8811
- Salama O.E., Gersteina A.C. Differential response

- of *Candida* species morphologies and isolates to fluconazole and boric acid. *Antimicrob Agents Chemother.* 2022;66(5):e0240621. DOI: 10.1128/aac.02406-21
14. Maebashi K., Kudoh M., Nishiyama Y., Makimura K., Uchida K., Mori T., Yamaguchi H. A novel mechanism of fluconazole resistance associated with fluconazole sequestration in *Candida albicans* isolates from a myelofibrosis patient. *Microbiol Immunol.* 2002;46:317-326. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2002.tb02702.x
 15. Odds F.C., Brown A.J.P., Gow N.A.R. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* 2003;11:272-279. DOI: 10.1016/S0966-842X(03)00117-3
 16. White T.C., Holleman S., Dy F., Mirels L.F., Stevens D.A. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(6):1704-1713. DOI: 10.1128/AAC.46.6.1704-1713.2002
 17. Bezhenar m.b., Plakhova K.I. Antifungal drug resistance *Candida* spp. mechanisms in recurrent genital candidiasis. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2022;38(1):15-23. Russian. (Беженар М.Б., Плахова К.И. Механизмы развития резистентности к противогрибковым препаратам грибов рода *Candida* при рецидивирующем течении урогенитального кандидоза. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2020;38(1):15-23.) DOI: 10.17116/molgen20203801115
 18. Kumar A., Nair R., Kumar M., Banerjee A., Chakrabarti A., Rudramurthy S.M., et al. Assessment of antifungal resistance and associated molecular mechanism in *Candida albicans* isolates from different cohorts of patients in North Indian state of Haryana. *Folia Microbiol (Praha).* 2020;65(4):747-754. DOI: 10.1007/s12223-020-00785-6
 19. Lee Y., Puumala E., Robbins N., Cowen L.E. Antifungal drug resistance: molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond. *Chem Rev.* 2021;121(6):3390-3411. DOI: 10.1021/acs.chemrev.0c00199
 20. Lotfali E., Erami M., Fattahi M., Nemati H., Ghasemi Z., Mahdavi E. Analysis of molecular resistance to azole and echinocandin in *Candida* species in patients with vulvovaginal candidiasis. *Curr Med Mycol.* 2022;8(2):1-7. DOI: 10.18502/cmm.8.2.10326
 21. Rogers T.R., Verweij P.E., Castanheira M., Dannaoui E., White P.L., Arendrup M.C., Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Molecular mechanisms of acquired antifungal drug resistance in principal fungal pathogens and EUCAST guidance for their laboratory detection and clinical implications. *J Antimicrob Chemother.* 2022;77:2053-2073. DOI: 10.1093/jac/dkac161
 22. Jensen R.H. Resistance in human pathogenic yeasts and filamentous fungi: prevalence, underlying molecular mechanisms and link to the use of antifungals in humans and the environment. *Dan Med J.* 2016;63(10):B5288. PMID: 27697142.
 23. Lopez-Ribot J.L., McAtee R.K., Lee L.N., Kirkpatrick W.R., White T.C., Sanglard D., et al. Distinct patterns of gene expression associated with development of fluconazole resistance in serial *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42:2932-2937. DOI: 10.1128/AAC.42.11.2932
 24. Harry J.B., Song J.L., Lyons C.N., White T.C. Transcription initiation of genes associated with azole resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol.* 2002;40(1):73-81. DOI: 10.1080/mmy.40.1.73.81
 25. Prasad R., Dewergifosse P., Goffeau A., Balzi E. Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, *CDR1*, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. *Curr Genet.* 1995;27(4):320-329. DOI: 10.1007/BF00352101
 26. White T.C. Increased mRNA levels of *ERG16*, *CDR*, and *MDR1* correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(7):1482-1487. DOI: 10.1128/AAC.41.7.1482
 27. Calabrese D., Bille J., Sanglard D. A novel multidrug efflux transporter gene of the major facilitator superfamily from *Candida albicans* (FLU1) conferring resistance to fluconazole. *Microbiology (Reading).* 2000;146(Pt. 11):2743-2754. DOI: 10.1099/00221287-146-11-2743
 28. Zhang J.-Y., Liu J.-H., Liu F.-D., Xia Y.-H., Wang J., Liu X., et al. Vulvovaginal candidiasis: species distribution, fluconazole resistance and drug efflux pump gene overexpression. *Mycoses.* 2014;57(10):584-591. DOI: 10.1111/myc.12204
 29. Xu Y., Sheng F., Zhao J., Chen L., Li C. *ERG11* mutations and expression of resistance genes in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates. *Arch Microbiol.* 2015;197:1087-1093. DOI: 10.1007/s00203-015-1146-8
 30. Wang B., Huang L.-H., Zhao J.-X., Wei M., Fang H., Wang D.-Y., et al. *ERG11* mutations associated with azole resistance in *Candida albicans* isolates from vulvovaginal candidosis patients. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2015;5(11):909-914. DOI: 10.1016/j.apjtb.2015.08.002
 31. Sadari A., Zarrinfar H., Mohammadi R. Detection of *ERG11* point mutations in Iranian fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates. *Curr Med Mycol.* 2019;5(1):7-14. DOI: 10.18502/cmm.5.1.531
 32. Esfahani A., Omran A.N., Salehi Z., Shams-Ghahfarokhi M., Ghane M., Eybpoosh S., et al. Molecular epidemiology, antifungal susceptibility, and *ERG11* gene mutation of *Candida* species isolated from vulvovaginal candidiasis: comparison between recurrent and non-recurrent infections. *Microb Pathog.* 2022;170:105696. DOI: 10.1016/j.micpath.2022.105696
 33. Odiba A.S., Durojaye O.A., Ezeonu I.M., Mgbeahurike A.C., Nwanguma B.C. A new variant of mutational and polymorphic signatures in the *ERG11* gene of fluconazole-resistant *Candida albicans*. *Infect Drug Resist.* 2022;15:3111-3133. DOI: 10.2147/IDR.S360973
 34. Maenchantrath C., Khumdee P., Samosornsuk S., Mungkornkaew N., Samosornsuk W. Investigation of fluconazole susceptibility to *Candida albicans* by

- MALDI-TOF MS and real-time PCR for *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* and *ERG11*. BMC Microbiology. 2022;22:153. DOI: 10.1186/s12866-022-02564-4
35. Lotfali E., Erami M., Fattahi M., Nemati H., Ghasemi Z., Mahdavi E. Analysis of molecular resistance to azole and echinocandin in *Candida* species in patients with vulvovaginal candidiasis. Curr Med Mycol. 2022;8(2):1-7. DOI: 10.18502/cmm.8.2.10326
 36. Esfahani A., Omran A.N., Salehi Z., Shams-Ghahfarokhi M., Ghane M., Eybpoosh S., et al. Up-regulation of *CDR1* and *MDR1* efflux pump genes and fluconazole resistance are involved in recurrence in *Candida albicans*-induced vulvovaginal candidiasis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2024;109(1):116242. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2024.116242
 37. Kaur J., Nobile C.J. Antifungal drug-resistance mechanisms in *Candida* biofilms. Curr Opin Microbiol. 2023;71:102237. DOI: 10.1016/j.mib.2022.102237
 38. David H., Solomon A.P. Molecular association of *Candida albicans* and vulvovaginal candidiasis: focusing on a solution. Front Cell Infect Microbiol. 2023;13:1245808. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1245808
 39. CLSI. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 3rd ed. CLSI supplement M27M44S. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2022.
 40. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Bull Phytochem. 1987;19:11-15.
 41. Cullings K.W. Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. Mol Ecol. 1992;1:233-240. DOI: 10.1111/j.1365-294X.1992.tb00182.x
 42. Gouy M., Guindon S., Gascuel O. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. Mol Biol Evol. 2010;27(2):221-224. DOI: 10.1093/molbev/msp259
 43. Gulati M., Lohse M.B., Ennis C.L., Gonzalez R.E., Perry A.M., Bapat P., et al. *In vitro* culturing and screening of *Candida albicans* biofilms. Curr Protoc Microbiol. 2018;50(1):e60. DOI: 10.1002/cpmc.60
 44. Pumeesat P., Muangkaew W., Ampawong S., Luplertlop N. *Candida albicans* biofilm development under increased temperature. New Microbiologica. 2017;40(4):279-283. PMID: 28825445.
 45. Kelly S.L., Lamb D.C., Kelly D.E. Y132H substitution in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase confers fluconazole resistance by preventing binding to haem. FEMS Microbiol Lett. 1999;180(2):171-175. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb08792.x
 46. Perlin D.S., Rautemaa-Richardson R., Alastruay-Izquierdo A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. Lancet Infect Dis. 2017;17(12):e383-e392. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30316-X
 47. Sanglard D. Finding the needle in a haystack: mapping antifungal drug resistance in fungal pathogen by genomic approaches. PLoS Pathog. 2019;15(1):e1007478. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007478
 48. Denning D.W., Perlin D.S., Muldoon E.G., Colombo A.L., Chakrabarti A., Richardson M.D., et al. Delivering on antimicrobial resistance agenda not possible without improving fungal diagnostic capabilities. Emerg Infect Dis. 2017;23(2):177-183. DOI: 10.3201/eid2302.152042
 49. Sobel J.D., Sebastian S., Boikov D.A. A longitudinal study on fluconazole resistance in *Candida albicans* vaginal isolates. Mycoses. 2023;66(7):563-565. DOI: 10.1111/myc.13582
 50. Bédard C., Gagnon-Arsenault I., Boisvert J., Plante S., Dubé A.K., Pageau A., et al. Most azole resistance mutations in the *Candida albicans* drug target confer cross-resistance without intrinsic fitness cost. Nat Microbiol. 2024;1(1):3025-3040. DOI: 10.1038/s41564-024-01819-2
 51. Cross E.W., Park S., Perlin D.S. Cross-Resistance of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida glabrata* to over-the-counter azoles used in the treatment of vaginitis. Microb Drug Resist. 2000;6(2):155-161. DOI: 10.1089/107662900419474
 52. Wu Y.Q., Li C., Wang Z.H., Gao J., Tang Z.H., Chen H.F., et al. Clonal spread and azole-resistant mechanisms of non-susceptible *Candida albicans* isolates from vulvovaginal candidiasis patients in three Shanghai maternity hospitals. Med Mycol. 2018;56(6):687-694. DOI: 10.1093/mmy/myx099
 53. Souza R.O., de Lima T.H., Oréfice R.L., de Freitas Araújo M.G., de Lima Moura S.A., Magalhães J.T., et al. Amphotericin B-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) nanofibers: an alternative therapy scheme for local treatment of vulvovaginal candidiasis. J Pharm Sci. 2018;107(10):2674-2685. DOI: 10.1016/j.xphs.2018.06.017
 54. Desai J.V., Urban A., Swaim D.Z., Colton B., Kibathi L.W., Ferré E.M.N., et al. Efficacy of cochrleated amphotericin B in mouse and human mucocutaneous candidiasis. Antimicrob Agents Chemother. 2022;66(7):e0030822. DOI: 10.1128/aac.00308-22
 55. Cornely O.A., Sprute R., Bassetti M., Chen S.C., Groll A.H., Kurzai O., et al. Global guideline for the diagnosis and management of candidiasis: an initiative of the ECMM in cooperation with ISHAM and ASM. Lancet Infect Dis. 2025;S1473-3099(24)00749-7. DOI: 10.1016/S1473-3099(24)00749-7
 56. Akdağ D., Pullukçu H., Yamazhan T., Metin D.Y., Sipahi O.R., Ener B., et al. Anidulafungin treatment for fluconazole-resistant *Candida albicans* vaginitis with cross-resistance to azoles: a case report. J Obstet Gynaecol. 2021;41(4):665-666. DOI: 10.1080/01443615.2020.1732893
 57. Kim S.-Y., Ko Y.-J., Jung K.-W., Strain A., Nielsen K., Bahn Y.-S. Hrk1 plays both Hog1-dependent and -independent roles in controlling stress response and antifungal drug resistance in *Cryptococcus neoformans*. PLoS One. 2011;6(4):e18769. DOI: 10.1371/journal.pone.0018769
 58. Ollinger T.L., Vu B., Murante D., Parker J.E., Simoncova L., Doorley L., et al. Loss-of-function ROX1 mutations suppress the fluconazole susceptibility of Upc2A mutation in *Candida glabrata*, implicating additional positive regulators of

- ergosterol biosynthesis. mSphere. 2021;6(6):e0083021. DOI: 10.1128/msphere.00830-21
59. Pourakbari B., Teymuri M., Mahmoudi S., Valian S.K., Movahedi Z., Eshaghi H., et al Expression of major efflux pumps in fluconazole-resistant *Candida albicans*. Infect Disord Drug Targets. 2017;17(3):178-184. DOI: 10.2174/1871526517666170531114335
60. Voropaev A.D., Yekaterinchev D.A., Urban Yu.N., Zverev V.V., Nesvizhsky Yu.V., Voropaeva E.A., et al. *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* and *ERG11* expression in azole resistance *Candida albicans* isolated from HIV-infected patients in city of Moscow. Russian journal of infection and immunity. 2022;12(5):929-937. Russian. (Воропаев А.Д., Екатеринчев Д.А., Урбан Ю.Н., Зверев В.В., Несвижский Ю.В., Воропаева Е.А. и соавт. Экспрессия *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* и *ERG11* у устойчивых к азолам штаммов *Candida albicans*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов в городе Москве. Инфекция и иммунитет. 2022;12(5):929-937.) DOI: 10.15789/2220-7619-CCM-1931
61. Boahen A., Than L.T.L., Loke Y.-L., Chew S.Y. The antibiofilm role of biotics family in vaginal fungal infections. Front Microbiol. 2022;13:787119. DOI: 10.3389/fmicb.2022.787119