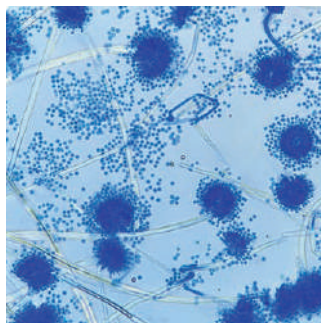




Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России

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)52-06-02

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 – 04.11.2026

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, 2026.

Содержание

Болезни и возбудители

Носов Н.Ю., Никонорова Е.Р., Соломка В.С., Плахова К.И.

- 148** Разработка схемы молекулярного типирования *Chlamydia trachomatis* на основе анализа высоковариабельных локусов генома

Андреева И.В., Андреев В.А., Довгань Е.В., Карпова Е.П., Овчинников А.Ю., Селимзянова Л.Р., Стецюк О.У.

- 171** Двухуровневые комбинированные пробиотики – новая парадигма профилактики респираторных инфекций и антибиотикоассоциированных состояний

Антимикробные препараты

Зубарева Н.А., Паршаков А.А., Попов Д.А.

- 187** Цефтобиол: новые данные о микробиологической активности, клинической эффективности и безопасности применения у разных групп пациентов (обзор литературы)

Костина А.В., Костылева М.Н., Строк А.Б., Петрайкина Е.Е., Зырянов С.К.

- 195** Применение биопенема у пациентов детского возраста: что нам известно

Горелов А.В., Козлов Р.С., Ливзан М.А., Андреева И.В., Бавыкина И.А., Байлова О.П., Бикбаева Г.Р., Бондарь Г.Н., Довгань Е.В., Дондурей Е.А., Ермаков А.М., Ермоленко К.Д., Ермоленко К.Ю., Зайцев А.В., Захаренко С.М., Зольникова О.Ю., Зорина Л.А., Зырянов С.К., Качковский М.А., Кулыгина Ю.А., Лозко Н.И., Осипенко М.Ф., Пинелис М.Л., Приворотский В.Ф., Репецкая М.Н., Рязанцев С.В., Сагитова Г.Р., Стецюк О.У., Трофименко И.Н., Усенко Д.В., Фесенко О.В., Хамитов Р.Ф., Чемисова О.С., Шабалов А.М., Шаталина С.И., Шебеко С.К., Шевяков М.А., Яковлева Л.В.

- 203** Антибиотики и пробиотики: старые вызовы и новые решения. Резолюция саммита экспертов

Антибиотикорезистентность

Кузьменков А.Ю., Гуляева Н.А., Виноградова А.Г., Мещурова С.Ю., Бабичева А.И.

- 209** Факторы риска и прогностические модели наличия бактериальных возбудителей с клинически значимыми фенотипами антимикробной резистентности: систематический обзор

Оганесян Э.Г., Гусарова К.В., Ковыршин С.В., Жук А.С., Тараскина А.Е., Любимова А.В., Васильева Н.В.

- 241** Генетические механизмы устойчивости *Candidozyma auris* к флуцитозину, индуцированной *in vitro*

Виноградова А.Г., Кузьменков А.Ю., Трушин И.В., Козлов Р.С.

- 253** Сравнительный анализ результатов определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам и используемые стандарты интерпретации в медицинских организациях Российской Федерации

Бондарева И.Б., Зырянов С.К., Ченкуров М.С., Пуцман Г.А., Савоцкая А.М.

- 264** Популяционное фармакокинетическое/фармакодинамическое моделирование линезолида в популяции взрослых пациентов, находящихся в критическом состоянии

Бонцевич Р.А.

- 279** Архитектура знаний в антимикробной терапии: от кластерной стратификации к карте корреляционных связей

Опыт работы

Божкова А.Г., Шимановский Н.Л., Мелкумян А.Р., Чистякова Д.А., Алексеев М.В., Ачкасов С.И.

- 290** Полногеномный анализ пробиотического штамма *Lactocaseibacillus* – идентификация генетических детерминант продукции бактериоцинов как основа для стандартизации моно- и поликомпонентных пробиотиков

Решетнева И.Т., Рукусуева Т.В., Перьянова О.В.

- 301** Молекулярно-генетические особенности и распространенность генов резистентности *Salmonella enterica* к тетрациклину

Козлова Е.Ю., Эйдельштейн И.А., Плескачевская Т.А., Новикова О.Б., Шалкина Л.А., Корнюшина В.М., Романов А.В., Козлов Р.С.

- 309** Мониторинг резистентности к макролидам у *Mycoplasma pneumoniae*, выделенных у детей Смоленской области в 2009–2024 гг.: исследование «DeMaRes»

Власова А.В., Горев В.В., Лукаш У.В., Смирнова Е.В., Волкова Н.Н., Горохов Д.В., Быстрова А.А., Брунова О.Ю., Валиева С.И., Теновская Т.А., Ртищев А.Ю., Сорокин Е.В., Джандарова Д.Т., Комаров А.Г.

- 320** Локальный опыт адаптации шкалы «СКАТ 2025» для стратификации риска резистентных возбудителей и выбора стартовой эмпирической антимикробной терапии в многопрофильной детской больнице

Описание клинических случаев

Веселова Е.И., Кузнецова Е.Н., Зилфова Д.И., Перегудова А.Б., Тинькова В.В., Васильева И.А.

- 330** Лечение генерализованного микобактериоза, вызванного *Mycobacterium avium*, у пациентов с ВИЧ-инфекцией с использованием бедаквилина в схеме терапии: клинические примеры

Демченкова М.В., Съемщикова Ю.П., Барзунова Т.В., Козлов Ю.А., Савинцева И.Н.

- 338** Сепсис, вызванный *Lactobacillus*: описание клинического случая

Андреев С.С., Яцков К.В., Рязанцева Е.В., Исаев Т.К., Трушкин Р.Н., Кузнецова Д.С., Желнова Е.И., Лысенко М.А.

- 344** Применение резафунгина для лечения глубокого инвазивного кандидоза, обусловленного *Candidozyma auris*: клиническое наблюдение

Генетические механизмы устойчивости *Candidozyma auris* к флуцитозину, индуцированной *in vitro*

Оганесян Э.Г.¹, Гусарова К.В.¹, Ковыршин С.В.¹, Жук А.С.^{1,2}, Тараскина А.Е.¹, Любимова А.В.¹, Васильева Н.В.¹

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

² Институт прикладных компьютерных наук, Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

Контактный адрес:

Эллина Григорьевна Оганесян
Эл. почта: ellina.oganesyan@gmail.com

Ключевые слова: *Candidozyma auris*, флуцитозин, лекарственная устойчивость, *FUR1*.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Внешнее финансирование: исследование проведено без внешнего финансирования.

Цель. Разработать модель формирования устойчивости *Candidozyma auris* к флуцитозину (5-фторцитозин, 5-ФЦ) *in vitro* и определить ассоциированный с ней мутационный профиль.

Материалы и методы. Проведено исследование по типу адаптивной лабораторной эволюции на 7 клинических штаммах *C. auris* южноазиатской клады, выделенных из различных медицинских организаций России. Штаммы подвергали ступенчатой селекции возрастающими концентрациями 5-ФЦ с молекулярной верификацией в контрольных точках. Минимальные подавляющие концентрации (МПК) определяли методом микроразведений. Кодировочные последовательности генов *FUR1*, *FCY1* и *FCY2* секвенировали по Сэнгеру и сравнивали с референсным штаммом B8441. Дополнительно оценивали «стоимость устойчивости» по площади под кривой роста (AUC) в стандартных и субингибирующих условиях.

Результаты. Во всех 7 штаммах устойчивость формировалась быстро и воспроизводимо: уже к пассажу P10 МПК 5-ФЦ повышалась до > 64 мг/л и сохранялась до P30. Замена в *FCY1* (S70R) выявлена во всех родительских штаммах и не связана с адаптивными изменениями. У резистентных вариантов обнаружены мутации в *FUR1* (G68*, L168F, E182Q) и *FCY2* (Y353*, G317*). В отдельных линиях МПК 5-ФЦ превышала 64 мг/л при отсутствии новых мутаций в указанных генах. Варианты P30 демонстрировали более низкие значения AUC по сравнению с родительскими штаммами в отсутствие препарата и более высокие – при субингибирующей концентрации 5-ФЦ.

Выводы. Экспериментальная селекция *C. auris* в присутствии 5-ФЦ приводила к быстрому и воспроизводимому формированию высокого уровня МПК > 64 мг/л. Резистентный фенотип возник независимо в нескольких линиях и был связан с различными изменениями генов метаболического пути 5-ФЦ, что указывает на генетическую вариабельность механизмов адаптации. В отсутствие препарата приобретенная устойчивость сопровождалась снижением ростовой активности, отражающим ее биологическую стоимость. Однако субингибирующая концентрация 5-ФЦ изменяла соотношение приспособленности в пользу устойчивых вариантов. Таким образом, сохраняющееся воздействие низких концентраций препарата может поддерживать отбор резистентных субпопуляций *C. auris*, несмотря на снижение их исходного ростового потенциала.

Original Article

Genetic mechanisms of *in vitro*-induced flucytosine resistance in *Candidozyma auris*

Oganesyan E.G.¹, Gusarova K.V.¹, Kovyrrshin S.V.¹, Zhuk A.S.^{1,2}, Taraskina A.E.¹, Lyubimova A.V.¹, Vasilyeva N.V.¹

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

² Institute of Applied Computer Sciences, ITMO University, Saint-Petersburg, Russia

Contacts:

Ellina G. Oganesyan
E-mail: ellina.oganesyan@gmail.com

Key words: *Candidozyma auris*, flucytosine, drug resistance, *FUR1*, fitness cost.

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

External funding source: no external funding received.

Objective. To develop an *in vitro* model for the development of *Candidozyma auris* resistance to flucytosine (5-FC) and characterize its associated mutational profile.

Materials and methods. An adaptive laboratory evolution study was performed on seven clinical *C. auris* isolates of the South Asian clade obtained from independent epidemiological foci in Russian hospitals. Isolates underwent stepwise selection with increasing 5-FC concentrations, with molecular verification at defined checkpoints. Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by broth microdilution (EUCAST). The coding sequences of *FUR1*, *FCY1* and *FCY2* were Sanger-sequenced and compared with the reference strain B8441. The fitness cost was additionally assessed as the area under the growth curve (AUC) under standard and subinhibitory conditions.

Results. In all seven isolates resistance emerged rapidly and reproducibly: by passage P10 the 5-FC MIC rose to > 64 mg/L and persisted through P30. The *FCY1* S70R substitution was present in all

parental isolates and was not considered adaptive. Resistance was associated mainly with mutations in *FUR1* (G68*, and also L168F, E182Q) and *FCY2* (Y353*, G317*); in some lineages high MICs occurred without detectable changes in these genes. Evolved variants (P30) showed reduced growth activity (lower AUC) in the absence of the drug but outgrew parental isolates at the subinhibitory 5-FC concentration.

Conclusions. Experimental selection of *C. auris* in the presence of flucytosine resulted in the rapid and reproducible emergence of high-level resistance, with MICs exceeding 64 mg/L. The resistant phenotype arose independently in several lineages and was associated with distinct alterations in genes involved in 5-FC metabolism, indicating genetic heterogeneity in the underlying adaptive mechanisms. In the absence of the drug, acquired resistance was accompanied by reduced growth, consistent with a fitness cost. However, exposure to a subinhibitory concentration of 5-FC shifted relative fitness in favor of the resistant variants. Thus, sustained exposure to low concentrations of flucytosine may promote the selection of resistant *C. auris* subpopulations despite their reduced baseline growth capacity.

Введение

Инвазивные грибковые инфекции и устойчивость к противогрибковым лекарственным средствам являются одними из наиболее недооцененных угроз для глобального здравоохранения [1, 2]. Согласно обновленной оценке бремени инвазивных микозов, ежегодно описывают около 6,5 млн инвазивных грибковых инфекций и 3,8 млн летальных исходов (из них 2,5 млн – атрибутивные). Инвазивный кандидоз (ИК) составляет 1,56 млн случаев в год при 995 тыс. смертей соответственно [3]. Устойчивость дрожжевых грибов к противогрибковым лекарственным средствам (ПГЛС) и поздняя диагностика ИК – два важных фактора в развитии инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП). Так, появление и быстрое распространение *Candidozyma auris* в стационарных условиях представляет серьезную угрозу здравоохранению из-за сочетания множественной устойчивости к противогрибковым лекарственным препаратам и дезинфектантам, способности к длительной персистенции на объектах окружающей среды и колонизации пациентов в медицинских учреждениях и трудностей идентификации традиционными методами. Не случайно в 2022 г. Всемирная организация здравоохранения включила *C. auris* в список грибковых патогенов критического приоритета, подчеркивая необходимость исследований механизмов лекарственной устойчивости и разработки стратегий инфекционного контроля [2]. *C. auris* представлена шестью генетическими кладами (I–VI), различающимися предполагаемым географическим происхождением, профилями резистентности к противогрибковым лекарственным средствам, эпидемическим потенциалом [4]. В России мультицентровое наблюдение 2017–2023 гг. (112 клинических штаммов из 18 стационаров) продемонстрировало циркуляцию южноазиатской клады и выявило повышенные минимальные подавляющие концентрации (МПК) к 5-ФЦ у 3,6% штаммов [5].

Терапевтические опции при ИК, обусловленном *C. auris*, ограничены профилем устойчивости к ПГЛС: эхинокандины остаются предпочтительной начальной терапией у взрослых и детей старше 2 мес. [6]. Устойчивость

к азолам широко распространена (80–90%), особенно среди штаммов южноазиатской клады; к амфотерицину В – вариабельна по регионам (18–60%), к 5-ФЦ составляет 3–47%, а эхинокандинорезистентность встречается всё чаще (2–12%), что усложняет лечение [7–12]. Учитывая, что число ПГЛС ограничено всего лишь 4 основными классами ПГЛС, интерес к 5-фторцитозину (5-ФЦ) повышается именно как к компоненту комбинированной терапии. При этом в отношении *C. auris* доказательная база ограничена, а 5-ФЦ в монотерапии исторически признан рискованным для *Candida* spp. из-за быстрого формирования резистентности [13].

Механизм действия и резистентность к 5-ФЦ хорошо изучены в отношении *Candida* spp. Препарат проникает в клетки через пермеазу цитозина *Fcy2*, дезаминируется *Fcy1* до 5-фторурацила и далее вовлекается в пиримидиновый обмен посредством урацил-фосфорибозилтрансферазы *Fur1* [14]. Нарушения в любом из этих звеньев (потеря функции *FCY2/FCY1/FUR1*) приводят к устойчивости. Для *C. auris* показано, что устойчивость к 5-ФЦ может формироваться очень быстро (уже после 1-2 пассажей под лекарственным давлением) и ключевым драйвером становятся нонсенс-мутации в *FUR1* [15]. Эти наблюдения объясняют, почему 5-ФЦ в отношении *C. auris* разумнее рассматривать в составе рациональных комбинаций и при строгом микробиологическом мониторинге. Клинические случаи при инфекциях центральной нервной системы (ЦНС), ассоциированных *C. auris* свидетельствуют об эффективности комбинации липосомального амфотерицина В и 5-ФЦ с контролем источника инфекции. В недавнем случае вентрикулита после удаления шунта на фоне комбинированной терапии липосомальным амфотерицином В и 5-ФЦ был получен клинико-микробиологический ответ с отрицательным посевом спинномозговой жидкости [16]. В другом шунт-ассоциированном с *C. auris* эпизоде при сохранении положительного высева осуществлен переход на каспофунгин + 5-ФЦ с интравентрикулярным введением эхинокандина, на фоне данной терапии был получен клинический ответ, подтвержденный отрицательным

результатом посева [17]. Совокупность обзора публикаций подтверждает отсутствие стандартных алгоритмов для ЦНС-локализации *C. auris* и использования комбинированных режимов с 5-ФЦ при надлежащем контроле [18]. Ни в российских, ни в международных рекомендациях не содержатся схемы лечения инфекций ЦНС, вызванных *C. auris*. На практике лечение основывается на общих принципах терапии ИК. При необходимости включения 5-ФЦ в схему терапии необходимо учитывать риск быстрого возникновения устойчивых штаммов и контролировать чувствительность возбудителя.

С научной и практической точек зрения остаются два ключевых вопроса. Во-первых, недостаточно данных о скорости и траекториях формирования устойчивости при длительном воздействии 5-ФЦ у исходно чувствительных штаммов *C. auris*. Во-вторых, недостаточно изучены биологические последствия формирования резистентности, объединяемые понятием «плата за фитнес» (fitness cost). Они проявляются снижением приспособленности устойчивых вариантов в отсутствие селективного воздействия препарата, включая уменьшение скорости роста, ослабление адаптации к стрессовым условиям и снижение способности к колонизации [19–21]. Понимание этой «платы» критично: если резистентность сопровождается минимальными потерями или легко компенсируется, резистентные клоны способны сохраняться и распространяться даже при низких (субингибирующих) концентрациях 5-ФЦ, что повышает риск распространения устойчивых штаммов в медицинской организации. Это важно, как при выборе длительных и комбинированных режимов терапии, так и для эпидемиологов при оценке вероятности персистенции резистентных вариантов *C. auris*.

Цель исследования – разработать модель формирования устойчивости *C. auris* к 5-ФЦ *in vitro* и определить ассоциированный с ней мутационный профиль.

Материалы и методы

Дизайн исследования

Формирование устойчивости *in vitro* моделировали в два этапа: (1) ступенчатая селекция 5-ФЦ при последовательном удвоении концентрации препарата и высевах на плотную среду между пассажами; (2) длительные поддерживающие суточные пассажы при высоких концентрациях. Молекулярно-генетическую верификацию и определение МПК проводили в контрольных точках, соответствующих 10, 15, 20, 25 и 30-му пассажу (P10, P15, P20, P25, P30). Исследование нерандомизированное; ослепление не применялось.

Этические аспекты

Исследование проведено на базе НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина. Одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России (протокол от 7 октября 2020 г.).

Объекты исследования

В исследование включили 7 клинических штаммов *C. auris*, выделенных из различных медицинских организаций России. Идентификация штаммов осуществляли с использованием MALDI-TOF MS и секвенирования ITS-региона рибосомальной ДНК. Все штаммы были представителями южноазиатской клады *C. auris* на основании ранее проведенного анализа коротких tandemных повторов (STR) [5].

Определение МПК

Минимальные подавляющие концентрации 5-ФЦ (мг/л) определяли методом последовательных разведений согласно референтному протоколу EUCAST E.Def 7.4. Использовали питательную среду RPMI-1640 с L-глутамином, без бикарбоната (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 2% D-глюкозы, забуференную до pH 7,0 3-(N-морфолино)пропансульфоновой кислотой (MOPS) в концентрации 0,165 М (Sigma-Aldrich, США) и субстанцию 5-ФЦ (Solarbio, Китай). Плотность инокулюма составляла 1×10^5 КОЕ/мл, которые инкубировали при 35°C 24 ч. в плоскостных 96-луночных планшетах для микроразведений. Диапазон двукратных разведений 5-ФЦ в микропланшете составил 0,03–64 мг/л. Для контроля качества (QC) использовали референтный штамм *Candida parapsilosis* ATCC 22019. Учет результатов проводили измерением оптической плотности на планшетном спектрофотометре Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific Oy, Финляндия) при OD₆₀₀. Величина МПК определялась по минимальному количеству тестируемого вещества, вызывающему ингибирование роста культуры на 50% и более, что выражалось в пропорциональном снижении оптической плотности по сравнению со значениями в контрольной лунке. Клинические критерии интерпретации EUCAST для 5-ФЦ в отношении *C. auris* отсутствуют, поэтому категории чувствительности (S/I/R) не определяли.

Ступенчатая селекция устойчивости к 5-ФЦ

Формирование устойчивости моделировали методом ступенчатой (дозонарастающей) селекции. На первом этапе родительские штаммы вносили в жидкую среду RPMI-1640, содержащую 5-ФЦ в стартовой (субингибирующей) концентрации 0,03 мг/л, и инкубировали в течение 24 ч. при 37 °C. Через сутки культуру высевали на плотную питательную среду (агар Сабуро) для получения изолированных колоний и контроля чистоты, после чего выросшую биомассу повторно вносили в жидкую среду со следующей, вдвое большей концентрацией 5-ФЦ. Концентрацию препарата последовательно удваивали на каждом шаге (0,03 → 0,06 → 0,12 → 0,25 → 0,5 → 1 → 2 → 4 → 8 → 16 мг/л и далее). После каждого суточного пассажа и посева определяли МПК 5-ФЦ методом микроразведений, описанным выше, что позволяло отслеживать динамику формирования устойчивости на каждой ступени эскалации.

После достижения фенотипа с высокой МПК штаммы переводили на длительные поддерживающие

суточные пассажи при высоких концентрациях 5-ФЦ. Определение МПК и молекулярно-генетическую верификацию (секвенирование *FUR1*, *FCY1* и *FCY2*) выполняли в контрольных точках, соответствующих 10, 15, 20, 25 и 30-му пассажирам; производные варианты обозначали суффиксом, отражающим номер пассажа (например, C1/10 ... C1/30).

Выделение ДНК

Для выделения геномной ДНК из клинических штаммов *S. auris* применяли модифицированный СТАВ-метод с последующей экстракцией смесью хлороформа и изоамилового спирта [22]. Клетки грибов ресуспендировали в 500 мкл СТАВ-буфера и подвергали механическому разрушению с помощью гомогенизатора Precellys24 (Bertin Technologies, Франция) в течение 20 сек. при 5000 об/мин. Полученный осадок последовательно промывали 70% этанолом, подсушивали при комнатной температуре и растворяли в 50 мкл деионизированной воды. ДНК хранили при +4 °С.

Анализ нуклеотидных вариантов генов *FUR1*, *FCY1* и *FCY2*

Для определения нуклеотидной последовательности генов *FUR1*, *FCY1* и *FCY2*, ассоциированных с чувствительностью к 5-ФЦ, были амплифицированы их полные кодирующие последовательности у клинических штаммов *S. auris*. Праймеры разрабатывали с использованием сервиса Primer-BLAST (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). Праймеры, использованные в исследовании, были изготовлены компанией ООО «Алкор-Био» (Санкт-Петербург, Россия).

Амплификацию генов *FUR1*, *FCY1* и *FCY2* методом ПЦР проводили в реакционной смеси общим объемом 50 мкл. В ее состав входили 5 мкл смеси dNTP (2,5 mM), 5 мкл 10× буфера (750 mM Tris-HCl, pH 8,8; 200 mM (NH₄)₂SO₄; 0,1% Tween-20), по 2 мкл прямого и обратного праймеров (5 пмоль/мкл), 5 мкл MgCl₂ (25 mM), 2,5 мкл геномной ДНК, 0,2 мкл Taq ДНК-полимеразы (5000 ЕД/мл; New England BioLabs, США) и 28,3 мкл деионизированной воды.

Параметры амплификации были следующими: после 5-минутной денатурации ДНК при 95°C выполняли 30 циклов, состоящих из денатурации при 95°C (30 сек.), отжига праймеров (45 сек.) и элонгации при 72°C (60 сек.). Температура отжига зависела от амплифицируемого гена и составляла 57,0°C для *FUR1*, 57,6°C для *FCY1* и 56,4°C для *FCY2*. После завершения циклирования образцы выдерживали при 72°C в течение 10 мин. Качество ампликонов и их соответствие ожидаемой длине проверяли электрофорезом в 6% полиакриламидном геле.

Полученные продукты ПЦР очищали с помощью набора GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, США), после чего использовали в качестве ДНК-матрицы для циклического секвенирования. Реакцию проводили с использованием набора BrilliantDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (NimaGen, Нидерланды) и

праймеров, представленных в Таблице 1. После реакции продукты очищали от неинкорпорированных флуоресцентно-меченых дидезоксинуклеотидов и солей с использованием набора iX-Pure Dye Terminator Cleanup Kit (Applied Biosystems, США). Продукты реакции циклического секвенирования разделяли методом капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Япония).

Сборка и выравнивание нуклеотидных последовательностей генов *FUR1*, *FCY1* и *FCY2*

Секвенированные ампликоны генов *FUR1*, *FCY1* и *FCY2* клинических штаммов *S. auris* были собраны и выровнены в программе SeaView с использованием референсных кодирующих последовательностей (CDS) штамма *S. auris* B8441 v.3 (GenBank, BioProject PRJNA328792). Качество сборки и выравниваний проверяли вручную, при необходимости корректируя ошибочно интерпретированные нуклеотиды. Сравнение с референсными CDS проводили для выявления однонуклеотидных замен (SNV), а также потенциальных аминокислотных изменений.

Оценка фитнес-эффекта в стандартных и стрессовых условиях

Для оценки фитнес-эффекта (влияние мутаций на ростовую активность штаммов *S. auris*) культивирование проводили в среде RPMI-1640 как в стандартных условиях, так и при добавлении 5-ФЦ в концентрации 0,03 мг/л. RPMI-1640 была выбрана как среда, широко используемая для характеристики фенотипических свойств грибов. Концентрация 5-ФЦ соответствовала субингибирующему уровню, который не полностью подавляет рост, но создает селективное давление, позволяющее выявить различия в приспособленности штаммов с различным генетическим фоном. Штаммы *S. auris* предварительно культивировали на агаре Сабуро при 37°C в течение 24 ч. Полученные колонии переносили в жидкий RPMI-1640 и инкубировали в тех же условиях до достижения экспоненциальной фазы роста. Клеточные культуры трижды отмывали фосфатно-солевым буфером (PBS, pH 7,4) при центрифугировании (3000 g) и ресуспендировали в среде RPMI-1640. Суспензию доводили до оптической плотности OD₆₀₀ = 0,1 и инокулировали в лунки 96-луночных планшетов, содержащих RPMI без добавок или с 5-ФЦ (0,03 мг/л). Ростовые кривые регистрировали при 37°C с постоянным перемешиванием, измеряя OD₆₀₀ каждые 30 мин. в течение 20 ч.

Фитнес-эффект *S. auris* оценивали на основании площади под кривой роста (AUC), рассчитанной по временным рядам оптической плотности (OD) на интервале 0–20 ч. Перед расчетами значения OD корректировали, вычитая средний сигнал контрольных лунок со средой без инокулята (medium-only controls), соответствующих той же серии эксперимента и условию. Для каждого биологического повтора предварительно усредняли три технических повтора. AUC рассчитывали численным методом трапеций. Результаты представлены как среднее ± SD по

Таблица 1. Последовательности праймеров для анализа генов *FUR1*, *FCY1* и *FCY2*

Название	Последовательность	Длина
FCY1_For	ATCGATTTCGCGCTCCATAT	20
FCY1_Rev	AAGGCCAAGTGCTCGATGA	19
Fur1_For	GCACTTCACCGATCTTCATC	20
Fur1_Rev	CTGAAAACCCCGATTGCGTT	20
FCY2_For1	GCACTTCTGCAAGTACGCGAG	20
FCY2_For2	TCCATATTGGGTGCCGCTT	20
FCY2_For3	CGTGGGAGGCCTTGTTACT	20
FCY2_For4	TCTGCTGTGGTGTGCTGGT	20
FCY2_Rev1	ACTATAGTAGGCACTATCTAC	21
FCY2_Rev2	TACCACACCTGGTTCATGCC	20
FCY2_Rev3	CACAAGAACTGGCCAAAGCC	20
FCY2_Rev4	CCAAAATCAAGCACCCAGCC	20

трем независимым биологическим повторам ($n = 3$), каждый из которых включал три технических повтора.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных выполнили в среде Python 3. За независимую статистическую единицу принимали клинический штамм *S. auris* ($n = 7$). В каждом биологическом повторе предварительно усредняли три технических повтора; затем для каждого штамма, варианта (исходный или P30) и условия культивирования рассчитывали среднее значение AUC по трем независимым биологическим повторам. AUC определяли методом трапеций и выражали в OD·ч.

Дизайн анализа был парным 2×2 : вариант штамма (исходный/P30) $\times$ условие культивирования (0 или 0,03 мг/л 5-ФЦ). Взаимодействие факторов оценивали по разности разностей на уровне штаммов (эквивалентно взаимодействию в двухфакторном дисперсионном анализе с повторными измерениями при двух уровнях каждого фактора); приводили значения F , двустороннее p и частичную η^2 . Запланированные парные сравнения исходных и P30-вариантов *S. auris* в каждом условии выполняли точным двусторонним критерием знаковых рангов Вилкоксона с поправкой Холма для двух сравнений; дополнительно приводили среднюю парную разность с 95% доверительным интервалом и геометрическое отношение AUC с 95% доверительным интервалом. Уровень статистической значимости принимали равным 0,05.

Все статистические расчеты выполняли в Microsoft Excel; визуализацию данных – в Python 3 с использованием библиотек NumPy и Matplotlib, а импорт данных и сверку средних значений и стандартных отклонений – с использованием библиотеки *orepuxl*.

Результаты

Последовательные пассажи штаммов *S. auris* в присутствии 5-ФЦ привели к быстрому и воспроизводимому

формированию устойчивости во всех семи штаммах (C1, C2, C8, C107, C222, C315 и C457). До начала пассирования МПК 5-ФЦ для всех штаммов составляла 0,06 мг/л. Уже к 10-му пассажиру регистрировали выраженное повышение МПК 5-ФЦ (до >64 мг/л), которое сохранялось на последующих этапах наблюдения (10–30 пассажи), указывая на устойчивую фиксацию адаптивного фенотипа (Таблица 2). Примечательно, что фенотип с высокой МПК формировался еще на этапе ступенчатой эскалации: при переходе к ступени 16 мг/л контрольное определение уже выявляло МПК 5-ФЦ > 64 мг/л, то есть устойчивость достигала предельно измеряемого уровня до выхода на максимальные концентрации отбора.

Анализ ключевых генов пути утилизации 5-ФЦ выявил как конвергентные, так и специфичные траектории генетических изменений. Важно отметить, что замену в *FCY1* (A208C; S70R) обнаруживали во всех штаммах, однако не рассматривали ее как результат адаптации в ходе пассажа, поскольку она присутствовала уже в исходных (родительских) штаммах всех семи линий до начала эксперимента. С учетом этого дальнейшую интерпретацию связывали преимущественно с изменениями в *FUR1* и *FCY2*, для которых наблюдались события, потенциально способные напрямую нарушать активацию/транспорт 5-ФЦ и тем самым объяснять резкое повышение МПК.

На уровне отдельных линий выявлялись различные генетические решения одной и той же селективной задачи. В ряде линий фиксировали изменения в *FUR1*, включая нонсенс-мутации, приводящие к появлению стоп-кодона, тогда как в других линиях доминировали мутации в *FCY2*, также включающие нонсенс-мутации (Таблица 2). Такая мозаика траекторий при сохранении единого фенотипического результата согласуется с существованием нескольких альтернативных генетических путей достижения устойчивости к 5-ФЦ в рамках одного и того же фона популяции. Вместе эти данные указывают на то, что отбор в присутствии 5-ФЦ приводил не к постепенному изменению чувствительности, а к сравнительно быстрому возникновению и закреплению мутаций с крупным эффектом, после чего достигнутый уровень устойчивости поддерживался на протяжении последующих пассажей. В отдельных линиях МПК 5-ФЦ превышала 64 мг/л при отсутствии аминокислотных замен в *FUR1*, *FCY1* и *FCY2* (Таблица 2), что предполагает участие других механизмов устойчивости, не исследованных в настоящей работе.

С целью оценки взаимосвязи между приобретенной лекарственной устойчивостью и ростовыми характеристиками штаммов *S. auris* был выполнен сравнительный анализ фитнес-эффекта. Сопоставлялись исходные (parent) изоляты и их производные после 30 пассажей (P30) в двух режимах культивирования: в стандартных условиях и при субингибирующей концентрации 5-ФЦ (0,03 мг/л).

При отсутствии препарата ростовые кривые пассированных штаммов (P30) на всем интервале наблюде-

Таблица 2. МПК 5-ФЦ и мутации в *FUR1*, *FCY1* и *FCY2* у производных штаммов *S. aureus* на разных этапах пассирования

Штамм/ пассаж	МПК 5-ФЦ, мг/л	<i>FUR1</i> (нуклеотид)	<i>FUR1</i> (аминокислота)	<i>FCY1</i> (нуклеотид)	<i>FCY1</i> (аминокислота)	<i>FCY2</i> (нуклеотид)	<i>FCY2</i> (аминокислота)
C1/10	> 64	G202T	G68*	A208C	S70R	–	–
C2/10	> 64	G504T	L168F	A208C	S70R	–	–
C8/10	> 64	–	–	A208C	S70R	–	–
C107/10	> 64	–	–	A208C	S70R	C1059G	Y353*
C222/10	> 64	–	–	A208C	S70R	G949T	G317*
C315/10	> 64	–	–	A208C	S70R	–	–
C457/10	> 64	–	–	A208C	S70R	–	–
C1/15	> 64	G202T	G68*	A208C	S70R	–	–
C2/15	> 64	G504T	L168F	A208C	S70R	–	–
C8/15	> 64	G202T	G68*	A208C	S70R	–	–
C107/15	> 64	–	–	A208C	S70R	–	–
C222/15	> 64	–	–	A208C	S70R	G949T	G317*
C315/15	> 64	–	–	A208C	S70R	–	–
C457/15	> 64	–	–	A208C	S70R	–	–
C1/20	> 64	G202T	G68*	A208C	S70R	–	–
C2/20	> 64	G504T	L168F	A208C	S70R	–	–
C8/20	> 64	G202T	G68*	A208C	S70R	–	–
C107/20	> 64	–	–	A208C	S70R	C1059G	Y353*
C222/20	> 64	G544C	E182Q	A208C	S70R	G949T	G317*
C315/20	> 64	–	–	A208C	S70R	–	–
C457/20	> 64	–	–	A208C	S70R	–	–
C1/25	> 64	G202T	G68*	A208C	S70R	–	–
C2/25	> 64	G504T	L168F	A208C	S70R	–	–
C8/25	> 64	G202T	G68*	A208C	S70R	–	–
C107/25	> 64	–	–	A208C	S70R	C1059G	Y353*
C222/25	> 64	–	–	A208C	S70R	G949T	G317*
C315/25	> 64	–	–	A208C	S70R	–	–
C457/25	> 64	–	–	A208C	S70R	–	–
C1/30	> 64	G202T	G68*	A208C	S70R	–	–
C2/30	> 64	G504T	L168F	A208C	S70R	–	–
C8/30	> 64	G202T	G68*	A208C	S70R	–	–
C107/30	> 64	–	–	A208C	S70R	C1059G	Y353*
C222/30	> 64	–	–	A208C	S70R	G949T	G317*
C315/30	> 64	–	–	A208C	S70R	–	–
C457/30	> 64	–	–	A208C	S70R	–	–

ния (0–20 ч.) находились ниже кривых соответствующих родительских линий (Рисунок 1А). Это выражалось в замедленном нарастании оптической плотности культуры и снижении конечных значений OD, что свидетельствует об ослаблении ростовой активности как следствии формирования устойчивости.

При культивировании в присутствии субингибирующей концентрации 5-ФЦ (0,03 мг/л) наблюдалась обратная картина. У исходных штаммов эта концентрация заметно, хотя и не полностью, замедляла рост, тогда как производные варианты (Р30) сохраняли более высокую ростовую активность и к завершающим срокам эксперимента достигали больших значений OD (Рисунок 1Б).

Для большинства исследованных линий кривые роста Р30 после 10–12 ч. инкубации пересекали кривые исходных штаммов или превышали их.

Поскольку визуальное сопоставление кривых не дает возможности количественно оценить суммарную ростовую активность за весь период наблюдения, для каждого условия культивирования была дополнительно рассчитана площадь под кривой роста (AUC) в интервале 0–20 ч. Полученные значения подтвердили результаты, установленные при анализе кривых роста: в отсутствие 5-ФЦ показатели AUC пассированных штаммов оказались ниже, чем у исходных, по всем исследованным линиям (Рисунок 2А), что указывает на снижение инте-

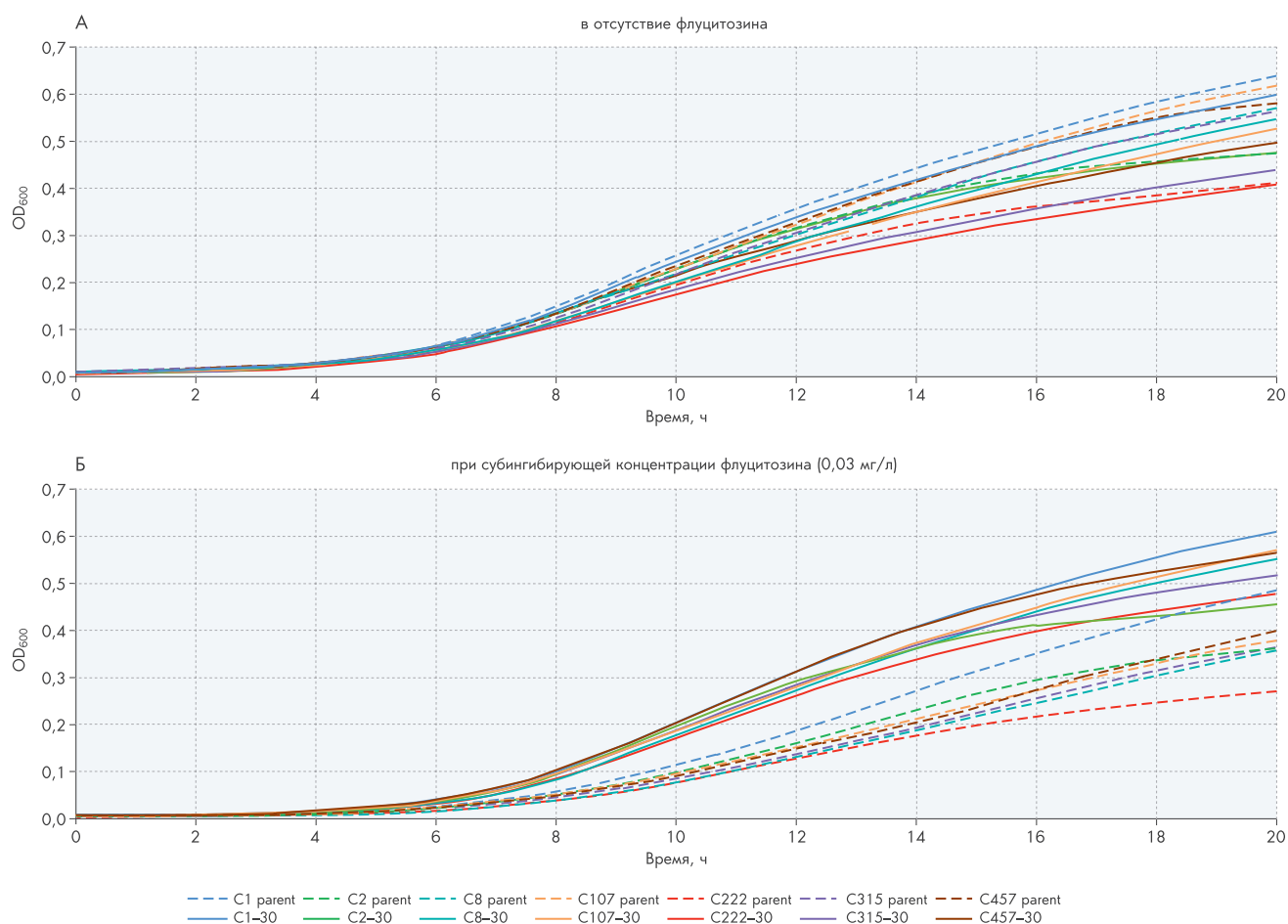


Рисунок 1. Динамика роста исходных (parent) и пассированных (–30) вариантов штаммов *C. auris* (n = 7) в отсутствие 5-ФЦ и при субингибирующей концентрации 5-ФЦ (0,03 мг/л)

гальной ростовой активности при формировании устойчивости. При воздействии 0,03 мг/л 5-ФЦ, напротив, значения AUC вариантов P30 превышали таковые у исходных штаммов (Рисунок 2Б), что свидетельствует о более высокой суммарной ростовой активности резистентных вариантов в условиях лекарственного давления.

Количественно в отсутствие 5-ФЦ среднее значение AUC у вариантов P30 было ниже, чем у исходных штаммов (4,32 против 4,79 OD·ч; средняя парная разность –0,47 OD·ч, 95% ДИ от –0,75 до –0,18; геометрическое отношение AUC 0,90, 95% ДИ 0,85–0,96, что соответствует снижению примерно на 9,8%; точный критерий Вилкоксона, $p = 0,016$; $p = 0,031$ после поправки Холма). При воздействии 0,03 мг/л 5-ФЦ соотношение менялось на противоположное: AUC вариантов P30 превышала таковую у исходных штаммов (4,37 против 2,62 OD·ч; средняя парная разность +1,75 OD·ч, 95% ДИ 1,54–1,96; геометрическое отношение AUC 1,68, 95% ДИ 1,54–1,83, прирост примерно на 67,7%; точный критерий Вилкоксона, $p = 0,016$; $p = 0,031$ после поправки Холма). Анализ разности разностей подтвердил статистически значимое взаимодействие факторов «условие культивирования × пассирование» ($F(1,6) = 146,05$;

$p < 0,001$; частичная $\eta^2 = 0,96$), что отражает разнонаправленное влияние приобретенной устойчивости на ростовую активность в зависимости от наличия препарата.

Таким образом, приобретение устойчивости *C. auris* к 5-ФЦ, ассоциированное с мутациями в генах *FUR1* и *FCY2*, сопровождалось устойчивым изменением ростовых характеристик исследуемых вариантов. В отсутствие препарата их рост был менее интенсивным по сравнению с исходными изолятами, тогда как при воздействии субингибирующих концентраций 5-ФЦ отмечалось повышение ростовой активности резистентных штаммов. Данная закономерность была подтверждена как анализом ростовых кривых, так и результатами интегральной оценки площади под кривой (AUC).

Обсуждение

5-ФЦ относится к немногим противогрибковым препаратам, потенциально активным в отношении *C. auris*. Вместе с тем быстрое формирование устойчивости делает его применение в режиме монотерапии рискованным. Эта особенность хорошо известна для дрожжевых грибов и является одной из основных причин использо-

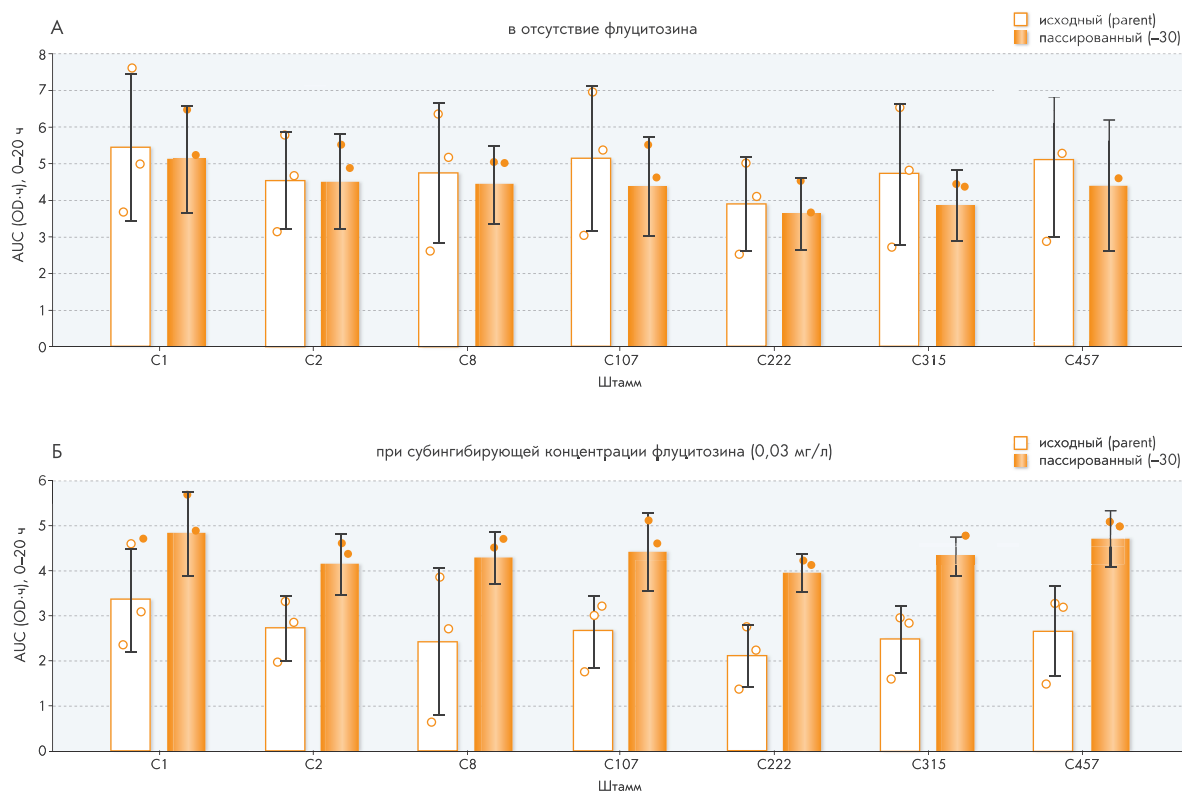


Рисунок 2. Интегральная оценка роста (AUC, 0–20 ч.) исходных (parent) и пассированных (~30) вариантов штаммов *S. auris* (n = 7) в отсутствие 5-ФЦ и при субингибирующей концентрации 5-ФЦ (0,03 мг/л). Точки – биологические повторы (n = 3)

вания 5-ФЦ преимущественно в составе комбинированной терапии [13]. В исследовании экспериментальной эволюции *S. auris* резистентные варианты появлялись уже после одного-двух пассажей в присутствии препарата; наиболее частыми генетическими событиями были инактивирующие мутации в *FUR1* [15]. В нашей работе МПК 5-ФЦ превышала 64 мг/л к десятому пассажу во всех семи независимых линиях. Воспроизводимость этого результата подтверждает низкий генетический барьер формирования устойчивости к 5-ФЦ, а различия между выявленными мутациями указывают на возможность реализации резистентного фенотипа посредством нескольких генетических механизмов.

Резкое повышение МПК у пассированных вариантов сопровождалось появлением нонсенс-мутаций в *FUR1* и *FCY2*. Эти гены неоднократно фигурируют в работах по 5-ФЦ как «короткий путь» к устойчивости, и наши данные согласуются с этим: выявленные замены ассоциированы с высоким уровнем устойчивости и, вероятно, отражают инактивацию отдельных звеньев пути конверсии 5-ФЦ, что может объяснять фенотип с высокой МПК уже на ранних пассажах. Вместе с тем причинно-следственная связь между конкретной заменой и фенотипом в настоящей работе функционально не подтверждена – аллельная замена или редактирование генома не проводились, – поэтому выявленные варианты следует рассматривать как ассоциированные с устойчивостью, а не как экспериментально доказанные.

Отдельного внимания заслуживают фитнес-издержки, сопутствующие устойчивости. В среде без 5-ФЦ все пассированные штаммы (P30) росли менее интенсивно, чем соответствующие родительские штаммы, и имели более низкие значения AUC. Такой фенотип указывает на биологическую стоимость приобретенной устойчивости: преимущество, возникающее в присутствии препарата, сопровождается снижением ростового потенциала после устранения селективного фактора. Такая зависимость описана и для клинических штаммов *S. auris*, у которых устойчивость к антимикотикам сочеталась с изменениями скорости роста и переносимости стрессовых воздействий [23]. В проведенном нами эксперименте фитнес-издержки устойчивости к 5-ФЦ проявлялись в снижении суммарной ростовой активности вариантов, полученных после серийного пассирования.

Не во всех экспериментальных линиях повышение МПК удалось связать с мутациями в исследованных генах. У части вариантов высокий уровень устойчивости сформировался без аминокислотных замен в *FUR1*, *FCY1* и *FCY2*. Сходное расхождение между генотипом и фенотипом отмечено в исследовании экспериментальной эволюции *S. auris*: одна из адаптированных линий приобрела повышенную толерантность к 5-ФЦ при отсутствии мутаций в генах его транспорта и внутриклеточного превращения [15]. В таких случаях изменения могут затрагивать другие компоненты генома, включая гены стрессового ответа и пиримидинового обмена; нельзя

исключить также изменение экспрессии генов, структурные перестройки или анеуплоидию. Установление механизмов устойчивости в этих линиях потребует полногеномного секвенирования, анализа структурных вариантов и исследования транскриптома.

Так, быстрое формирование устойчивости *S. auris* к 5-ФЦ сопровождалось снижением ростовой активности в отсутствие препарата. Однако этот недостаток проявлялся только при отсутствии селективного давления. При добавлении 0,03 мг/л 5-ФЦ пассированные варианты росли активнее родительских штаммов и получали селективное преимущество. Следовательно, биологическая стоимость устойчивости не препятствовала отбору резистентных вариантов при воздействии субингибирующей концентрации 5-ФЦ. В экспериментальной эволюции это означает, что даже слабая экспозиция может поддерживать резистентный генотип в популяции и препятствовать его вытеснению быстрорастущими чувствительными клетками. Такой результат соответствует идее минимальной селективной концентрации, при которой концентрации ниже МПК всё еще способны создавать отбор и смещать частоты. В практическом плане это делает важными сценарии неполной экспозиции – вариабельность фармакокинетики, неравномерное распределение препарата в тканях, где препарат не подавляет рост полностью, но формирует устойчивое селективное преимущество резистентных штаммов. В контексте терапии это подчеркивает двойственность 5-ФЦ: с одной стороны, препарат обладает потенциалом как компонент комбинаций, с другой – даже умеренная экспозиция может выступать фактором отбора, что усиливает значимость контроля экспозиции и микробиологического мониторинга.

Полученные результаты дополняют складывающуюся картину быстрой эволюции устойчивости к 5-ФЦ у *S. auris* и в ряде отношений выходят за ее рамки. Ранее описанная другими авторами способность вида быстро приобретать резистентность подтверждается нами на клинических штаммах южноазиатской клады, циркулирующей в медицинских организациях России. Поэтапное повышение концентрации 5-ФЦ с определением МПК на каждом этапе позволило проследить формирование устойчивости и ее сохранение при последующем пассировании. После культивирования в присутствии 16 мг/л 5-ФЦ значение МПК превышало 64 мг/л и оставалось на этом уровне до тридцатого пассажа. Сходный фенотип формировался при разных генетических изменениях. Наряду с ранее описанными мутациями в *FUR1*, нами выявлены нонсенс-мутации в *FCY2* (Y353*, G317*). В ряде линий повышение МПК не сопровождалось изменениями ни в одном из трех исследованных генов, что предполагает участие механизмов, не связанных непосредственно с каноническим путем внутриклеточного превращения 5-ФЦ.

Отдельного внимания заслуживает то, что сопоставление устойчивости с ее «стоимостью» показывает: эта цена не абсолютна, а зависит от условий – проигрывая исходным вариантам в отсутствие препарата,

устойчивые клоны получают преимущество уже при субингибирующей концентрации 5-ФЦ. Такая контекстная зависимость согласуется с концепцией минимальной селективной концентрации и напрямую значима для инфекционного контроля, поскольку даже неполная экспозиция способна поддерживать и отбирать резистентные варианты.

Несмотря на то, что 5-ФЦ в настоящее время не зарегистрирован для клинического применения в России это обстоятельство не только не снижает значимость работы, а в ряде случаев ее повышает. Штаммы, не подвергавшиеся клинической экспозиции 5-ФЦ чрезвычайно важны для изучения формирования устойчивости *de novo*. *S. auris* относится к патогенам глобального приоритета с выраженной способностью к межгосударственному распространению, поэтому сведения об эволюционном потенциале циркулирующих региональных штаммов имеют надрегиональное значение и встраиваются в глобальный мониторинг устойчивости грибковых патогенов к ПГЛС. Кроме того, результаты носят прогностическое значение: они позволяют заранее оценить риски и мутационный спектр устойчивости в случае применения препарата в комбинированных режимах, доступа к нему по индивидуальным показаниям или его возможной регистрации в будущем.

Ограничения исследования

Исследование имеет ряд ограничений. Во-первых, генетический анализ был таргетным и охватывал только кодирующие последовательности *FUR1*, *FCY1* и *FCY2*. Регуляторные области, структурные варианты и анеуплоидии не оценивались, что не позволяет объяснить фенотип высокой устойчивости в линиях без выявленных замен. Во-вторых, работа выполнена *in vitro* на штаммах одной (южноазиатской) клады, поэтому экстраполяция на другие клады и на клинические условия требует осторожности.

Заключение

Серийные пассажи чувствительных клинических штаммов *S. auris* в присутствии 5-ФЦ приводят к быстрому и воспроизводимому формированию резистентного фенотипа (МПК >64 мг/л уже к десятому пассажу), реализуемого через несколько альтернативных генетических траекторий – прежде всего инактивирующие нонсенс-мутации в *FUR1* и *FCY2*, – тогда как в части линий высокая устойчивость не объясняется изменениями в таргетно исследованных генах. Сформировавшаяся устойчивость сопряжена с «платой за фитнес»: в отсутствие препарата устойчивые варианты растут медленнее исходных, однако при субингибирующей концентрации 5-ФЦ это соотношение меняется в их пользу. Дальнейшего изучения требуют механизмы устойчивости, не связанные с *FUR1/FCY1/FCY2* (регуляторные и структурные варианты, анеуплоидия), для чего необходимы полногеномное секвенирование и транскриптом-

ный анализ. Полученные данные подчеркивают клиническую и эпидемиологическую значимость контроля экспозиции 5-ФЦ и микробиологического мониторинга: даже неполная (субингибирующая) экспозиция способна поддерживать и отбирать резистентные варианты, что важно учитывать при планировании комбинированных и длительных режимов терапии 5-ФЦ ИК, обусловленного *C. auris*.

Благодарность

Авторы выражают искреннюю благодарность Чилиной Галине Анастасьевне за поддержание коллекции клинических штаммов *Candidozyma auris*, использован-

ных в настоящем исследовании. Авторы также благодарят Смирнова Юрия Романовича за подготовку питательных сред и техническую помощь при выполнении культуральных этапов эксперимента.

Работа проведена в рамках выполнения государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации по теме «Геномная эпидемиология бактериальных и грибковых возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, обладающих множественной и экстремальной устойчивостью к антимикробным препаратам» (регистрационный номер НИОКТР 124021400014-5).

Литература

1. World Health Organization. Blueprint for strengthening responses to fungal disease and antifungal resistance: implementation guidance. Geneva: World Health Organization; 2026. Available at: www.who.int/publications/i/item/9789240122529. Accessed July 28, 2026.
2. World Health Organization. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. Geneva: World Health Organization; 2022. Available at: www.who.int/publications/i/item/9789240060241. Accessed July 28, 2026.
3. 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
4. Resong P.J., Lee J., Vazquez A., Hess D., Bronander K., Lee S.A. Genetic confirmation of clonal spread of *Candida auris* from Southern to Northern Nevada. *J Fungi (Basel)*. 2025;11(6):445. DOI: 10.3390/jof11060445
5. Oganessian E., Klimenteva V., Vybornova I., Venchakova V., Parshikova E., Kovyrshin S., et al. Population structure based on microsatellite length polymorphism, antifungal susceptibility profile, and enzymatic activity of *Candida auris* clinical isolates in Russia. *J Fungi (Basel)*. 2025;11(1):35. DOI: 10.3390/jof11010035
6. Centers for Disease Control and Prevention. Clinical treatment of *Candida auris* infections. Available at: www.cdc.gov/candida-auris/hcp/clinical-care/index.html. Accessed August 19, 2025.
7. Arendrup M.C., Guinea J., Arian-Akdagli S., Meijer E.F.J., Meis J.F., Buil J.B., et al. How to interpret MICs of amphotericin B, echinocandins and flucytosine against *Candida auris* (*Candidozyma auris*) according to the newly established European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) breakpoints. *Clin Microbiol Infect*. 2026;32(1):56-61. DOI: 10.1016/j.cmi.2025.07.002
8. Castanheira M., Deshpande L.M., Rhomberg P.R., Carvalhoes C.G. Recent increase in *Candida auris* frequency in the SENTRY surveillance program: antifungal activity and genotypic characterization. *Antimicrob Agents Chemother*. 2024;68(10):e00570-24. DOI: 10.1128/aac.00570-24
9. Chowdhary A., Anil Kumar V., Sharma C., Prakash A., Agarwal K., Babu R., et al. Multidrug-resistant endemic clonal strain of *Candida auris* in India. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33(6):919-926. DOI: 10.1007/s10096-013-2027-1
10. Gahlot P., Hallur V., Behera B., Purushotham P., Paul D., Pillai J., et al. Navigating the molecular landscape of *Candida auris* in a tertiary care setting in Eastern India. *Indian J Med Microbiol*. 2025;54:100814. DOI: 10.1016/j.ijmmb.2025.100814
11. Kiyohara M., Miyazaki T., Okamoto M., Hirayama T., Makimura K., Chibana H., et al. Evaluation of a novel FKS1 R1354H mutation associated with caspofungin resistance in *Candida auris* using the CRISPR-Cas9 system. *J Fungi (Basel)*. 2023;9(5):529. DOI: 10.3390/jof9050529
12. Osaigbovo I.I., Ekeng B.E., Davies A.A., Ebeigbe E., Bongomin F., Kanyua A., et al. *Candida auris*: a systematic review of a globally emerging fungal pathogen in Africa. *Open Forum Infect Dis*. 2024;11(6):ofad681. DOI: 10.1093/ofid/ofad681
13. Delma F.Z., Al-Hatmi A.M.S., Brüggemann R.J.M., Melchers W.J.G., de Hoog S., Verweij P.E., et al. Molecular mechanisms of 5-fluorocytosine resistance in yeasts and filamentous fungi. *J Fungi (Basel)*. 2021;7(11):909. DOI: 10.3390/jof7110909
14. Papon N., Noël T., Florent M., Gibot-Leclerc S., Jean D., Chastin C., et al. Molecular mechanism of flucytosine resistance in *Candida lusitanae*: contribution of the FCY2, FCY1, and FUR1 genes to 5-fluorouracil and fluconazole cross-resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(1):369-371. DOI: 10.1128/AAC.00824-06

15. Phan-Canh T., Nguyen-Le D.M., Luu P.L., Khunweera-phong N., Kuchler K. Rapid *in vitro* evolution of flucytosine resistance in *Candida auris*. *mSphere*. 2025;10(4): e00977-24. DOI: 10.1128/msphere.00977-24
16. Kang N., Hsu V.Y.C., Bailey C.C. Jr. Successful treatment of *Candida auris* ventriculitis with intravenous liposomal amphotericin B and oral flucytosine: a case report. *Open Forum Infect Dis*. 2025;12(1):ofae743. DOI: 10.1093/ofid/ofae743
17. Singhal T., Kumar A., Borade P., Shah S., Soman R. Successful treatment of *C. auris* shunt infection with intraventricular caspofungin. *Med Mycol Case Rep*. 2018;22:35-37. DOI: 10.1016/j.mmcr.2018.08.005
18. Halioti A., Vrettou C.S., Neromyliotis E., Gavrielatou E., Sarri A., Psaroudaki Z., et al. Cerebrospinal drain infection by *Candida auris*: a case report and review of the literature. *J Fungi (Basel)*. 2024;10(12):859. DOI: 10.3390/jof10120859
19. Andersson D.I., Levin B.R. The biological cost of antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol*. 1999;2(5):489-493. DOI: 10.1016/S1369-5274(99)00005-3
20. Carolus H., Sofras D., Boccarella G., Sephton-Clark P., Biriukov V., Cauldron N.C., et al. Acquired amphotericin B resistance leads to fitness trade-offs that can be mitigated by compensatory evolution in *Candida auris*. *Nat Microbiol*. 2024; 9(12):3304-3320. DOI: 10.1038/s41564-024-01854-z
21. Melnyk A.H., Wong A., Kassen R. The fitness costs of antibiotic resistance mutations. *Evol Appl*. 2015;8(3):273-283. DOI: 10.1111/eva.12196
22. Möller E.M., Bahnweg G., Sander mann H., Geiger H.H. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Res*. 1992;20(22):6115-6116. DOI: 10.1093/nar/20.22.6115
23. Das S., Singh S., Tawde Y., Dutta T.K., Rudramurthy S.M., Kaur H., et al. Comparative fitness trade-offs associated with azole resistance in *Candida auris* clinical isolates. *Heliyon*. 2024;10(12):e32386. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e32386