Формирование резистентности к азолам клинического изолята *Candida auris* – возбудителя кандидемии

Васильева Н.В.^{1, 2},
Тараскина А.Е.¹,
Богомолова Т.С.^{1, 2},
Выборнова И.В.¹,
Пчелин И.М.¹,
Рябинин И.А.¹,
Азаров Д.В.²,
Апалько С.В.³,
Романюк С.А.³,
Щербак С.Г.³,
Круглов А.Н.⁴

¹ Научно-исследовательский институт медицинской микологии им. П.Н. Кашкина Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 194291, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 191015, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

³ Санкт-Петербургское государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Городская больница № 40 Курортного района», 197706, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

⁴ Национальное агентство клинической фармакологии и фармации, 115088, г. Москва, Российская Федерация

Candida auris – новый возбудитель грибковых инфекций, который активно распространяется по всему миру и характеризуется повышенной природной устойчивостью к противогрибковым препаратам. Наличие генов-ортологов *C. albicans* в геноме *C. auris* предполагает как общее происхождение видов, так и, возможно, общие механизмы формирования резистентности к противогрибковым препаратам.

Цель исследования – определение роли однонуклеотидных замен в генах *ERG11*, *ERG3* и *FKS1* клинического изолята *C. auris* в формировании устойчивости к противогрибковым препаратам (азолам, эхинокандинам).

Материал и методы. Объект исследования – штамм *C. auris* РКПГ 1821, резистентный к флуконазолу (>256 мкг/мл), возбудитель первого случая кандидемии, зарегистрированного на территории РФ у пациентки отделения реанимации и интенсивной терапии одного из стационаров Москвы. Видовая идентификация была подтверждена MALDI-TOF масс-спектрометрией (диапазон Score Value 1.704–1.898; категория идентификации В) и с помощью секвенирования внутренней транскрибируемой спейсерной области (ITS) рДНК (GenBank MG706148) и генного локуса *TEF1α* (GenBank MG596888). Однонуклеотидный полиморфизм генов *ERG11*, *ERG3* и *FKS1* был определен в ходе полногеномного секвенирования штамма с использованием секвенатора MiSeq парноконцевыми чтениями длиной по 250 п.о. Черновая последовательность генома была депонирована в GenBank под инвентарным номером SBI000000000. Поиск однонуклеотидного полиморфизма генов выполнен в программе Harvest Parsnp.

Результаты и обсуждение. Филогеномная реконструкция на основе однонуклеотидного полиморфизма всего генома показала, что изолят *C. auris* РКПГ 1821 принадлежит к индопакистанской (южно-азиатской) кладе. Транслированные последовательности *ERG11* штамма РКПГ 1821 содержали аминокислотные замены F105L и K143R, которые ранее были ассоциированы с формированием устойчивости у *C. albicans*. Выравнивание аминокислотных последовательностей генов *ERG3* и *FKS1* *C. auris* РКПГ 1821 с последовательностями соответствующих белков *C. albicans* не выявило каких-либо мутаций, которые потенциально были бы ответственны за устойчивость к противогрибковым соединениям.

Заключение. Выявлены мутации F105L и K143R гена *ERG11*, ассоциированные с формированием резистентности к азолам у *C. auris*.

Ключевые слова:

Candida auris, резистентность к противогрибковым препаратам, полногеномное секвенирование, однонуклеотидный полиморфизм, гены *ERG11*, *ERG3*, *FKS1*

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Васильева Н.В., Тараскина А.Е., Богомолова Т.С., Выборнова И.В., Пчелин И.М., Рябинин И.А., Азаров Д.В., Апалько С.В., Романюк С.А., Щербак С.Г., Круглов А.Н. Формирование резистентности к азолам клинического изолята *Candida auris* – возбудителя кандидемии // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2020. Т. 9, № 2. С. 70–76. DOI: 10.33029/2305-3496-2020-9-2-70-76

Статья поступила в редакцию 10.09.2019. Принята в печать 12.03.2020.

The development of resistance to azoles of the clinical isolate *Candida auris* – the causative agent of candidaemia

Vasilyeva N.V.^{1,2}, Taraskina A.E.¹,
Bogomolova T.S.^{1,2}, Vybornova I.V.¹,
Pchelin I.M.¹, Ryabinin I.A.¹,
Azarov D.V.², Apalko S.V.³,
Romaniuk S.A.³, Shcherbak S.G.³,
Kruglov A.N.⁴

¹ Kashkin Research Institute of Medical Mycology,
North-Western State Medical University named after
I.I. Mechnikov, 194291, Saint Petersburg, Russian Federation

² North-Western State Medical University named after
I.I. Mechnikov, 191015, Saint Petersburg, Russian Federation

³ City Hospital No. 40 of Kurortny District, 197706, Saint
Petersburg, Russian Federation

⁴ National Agency for Clinical Pharmacology and Pharmacy,
115088, Moscow, Russian Federation

Candida auris is a new causative agent of fungal infections, which is actively spreading around the world and is featured by increased natural resistance to antifungal drugs. The presence of *C. albicans* ortholog genes in the *C. auris* genome suggests both the general origin of the species and possibly the general mechanisms of formation of resistance to antifungal drugs.

The aim is to determine the role in the formation of resistance to antifungal drugs (azoles, echinocandins) of single-nucleotide substitutions in the genes *ERG11*, *ERG3* and *FKS1* of the clinical isolate *C. auris*.

Material and methods. The object of the study is fluconazole resistant strain of *C. auris* RCPF 1821 (>256 µg/ml), the causative agent of the first case of candidaemia registered in the Russian Federation in an ICU patient, Moscow. Species identification was confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry (Score Value range 1.704–1.898; identification category B) and by sequencing of the internal transcribed spacer region (ITS) of rDNA (GenBank MG706148) and the *TEF1α* gene locus (GenBank MG596888). Single nucleotide polymorphism (SNP) of the *ERG11*, *ERG3*, and *FKS1* genes was determined during genome-wide sequencing of the strain using a MiSeq sequencer with 250 bp pair-terminal readings. The draft genome sequence was deposited at GenBank under accession number SBI000000000. The search for SNPs was performed in the Harvest Parsnp program.

Results and discussion. Phylogenomic reconstruction based on SNPs of the entire genome showed that the *C. auris* RCPF 1821 strain belongs to the Indo-Pakistani (South Asian) clade. Translated sequences of *ERG11* the studied strain RCPF 1821 contained the amino acid substitutions F105L and K143R, which were previously associated with resistance formation in *C. albicans*. Alignment of the amino acid sequences of the *C. auris* RCPF 1821 *ERG3* and *FKS1* genes with the sequences of the corresponding *C. albicans* proteins did not reveal any mutations that could potentially be responsible for antifungal resistance.

Conclusion. Observed fluconazole resistance in *C. auris* was probably due to F105L and K143R mutations in *ERG11* gene.

Funding. The study had no sponsor support.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

For citation: Vasilyeva N.V., Taraskina A.E., Bogomolova T.S., Vybornova I.V., Pchelin I.M., Ryabinin I.A., Azarov D.V., Apalko S.V., Romaniuk S.A., Shcherbak S.G., Kruglov A.N. The development of resistance to azoles of the clinical isolate *Candida auris* – the causative agent of candidaemia. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie* [Infectious Diseases: News, Opinions, Training]. 2020; 9 (2): 70–76. DOI: 10.33029/2305-3496-2020-9-2-70-76 (in Russian)

Received 10.09.2019. Accepted 12.03.2020.

Keywords:

Candida auris,
antifungal
resistance, next
generation
sequencing,
single nucleotide
polymorphism,
ERG11, *ERG3*
and *FKS1* genes

Грибы рода *Candida* в различных регионах мира – наиболее широко распространенные возбудители оппортунистических нозокомиальных микозов человека, которые в большинстве случаев протекают в тяжелых формах (кандидемии или острого диссеминированного канди-

доза). В Российской Федерации в соответствии с рекомендациями Leading International Fungal Education (LIFE), заболеваемость инвазивным кандидозом (ИК) составляет 8,3 на 100 тыс. населения [1]. Количество летальных исходов в мире от инфекций, вызванных микроскопическими

грибами, сопоставимо с таковым при туберкулезе (более 1 660 000 и 1 800 000 соответственно) [2, 3].

Одной из современных мировых тенденций, отягощающих проблему нозокомиальных инфекций, является нарастание резистентности к противомикробным препаратам, в том числе к антимикотикам. По данным многоцентрового исследования инфекций кровотока (ИК), в Российской Федерации каждый 4-й возбудитель рода *Candida* устойчив к флуконазолу, а среди грибов группы *Candida-non-albicans* количество штаммов с пониженной чувствительностью к азолам составляет около 40% [4].

Особую роль в этиологии ИК играют представители отдельных видов рода *Candida*, обладающие первичной устойчивостью к противогрибковым препаратам (антимикотикам). Среди них можно выделить *Candida auris* – новый возбудитель жизнеугрожающих нозокомиальных микозов, обладающий резистентностью к флуконазолу (за исключением восточно-азиатской клады) и вариабельной чувствительностью к другим азолам, амфотерицину В и эхинокандинам. По биохимическим свойствам (ассимиляции и ферментации сахаров) этот вид сходен с группой ряда видов *Candida* (*C. haemulonii*, *C. duobushaemulonii*, *C. pseudohaemulonii*, *C. sake*, *C. famata*, *C. catenulate*, *C. lusitanae*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*) [5], что в значительной степени создает проблемы идентификации *C. auris* на основе биохимических свойств.

Летальность, ассоциированная с колонизацией кровотока *C. auris*, достигает 30–60% [6]. Важной особенностью данного микромицета также является способность вызывать ИК высокой контагиозности, что до сих пор не было присуще видам рода *Candida* [7, 8]. Это в значительной степени затрудняет мероприятия по эпидемиологическому контролю в стационаре и создает условия для трудно ликвидируемых вспышек ИК, обусловленных *C. auris* [9].

C. auris – новый возбудитель микоза, активно распространяющийся по всему миру [9–11]. Первоначально *C. auris* был выделен в 2008 г. в Японии у пациента из слухового прохода при поверхностном микозе, имеются сообщения о случаях инфекционной патологии, связанной с данным патогеном (кандидемия и диссеминированный кандидоз) во многих странах 6 континентов [12]. В 2017 г. в Российской Федерации был зарегистрирован 1-й случай кандиде-

мии, этиологическим агентом которой признан *C. auris* [13]. Культура депонирована в Российскую коллекцию патогенных грибов (РКПГ 1821).

Сравнительный анализ геномов изолятов *C. auris* и *C. albicans* показал, что некоторые гены-ортологи, ассоциированные с противогрибковой резистентностью, присутствуют в геноме *C. auris*, включая транспортеры для лекарственных препаратов, секретируемые протеазы и маннозилтрансферазы [10]. Кроме того, было подтверждено сохранение в геноме *C. auris* генов, кодирующих белки – мишени действия различных классов противогрибковых препаратов: мишени действия азолов – ланостерол 14 α -деметилазу (*ERG11*), дельта(7)-стерол 5(6)-десатуразу (*ERG3*) и мишень действия эхинокандинов – β 1,3-глюкан-синтазу (*FKS1*) [9, 14].

Цель исследования – определение роли однонуклеотидных замен в генах *ERG11*, *ERG3* и *FKS1* клинического изолята *C. auris* в формировании устойчивости к противогрибковым препаратам (азолам, эхинокандинам).

Материал и методы

Штамм *C. auris* получен из крови пациентки 88 лет, находившейся в отделении реанимации и интенсивной терапии одного из стационаров Москвы. Основное заболевание – острое нарушение мозгового кровообращения. Факторами риска развития кандидемии были иммуносупрессия, искусственная вентиляция легких, использование антибиотиков широкого спектра действия. Несмотря на противогрибковую терапию анидулафунгином в течение 6 нед, пациентка скончалась. Видовая идентификация *C. auris* была подтверждена MALDI-TOF масс-спектрометрией в ручном режиме ионизации (диапазон Score Value 1.704–1.898; категория идентификации В), секвенированием внутренней транскрибируемой спейсерной области (ITS) рДНК (GenBank MG706148) и генного локуса TEF1 α (GenBank MG596888) [13], как было описано ранее [15].

Определяли чувствительность к антимикотикам с использованием колориметрических панелей Sensititre YeastOne Y010 (ThermoFisher Scientific, Великобритания) в соответствии с инструкциями производителя. Установлены минимальные ингибирующие концентрации, мкг/мл: анидулафунгин – 0,25, микафунгин – 0,25, каспофунгин –

<i>C. albicans</i> SC5314	1	MAIVETVIDGINYFLSLSVTQQISILLGVFPVYNLVWQYLYSLRKDRAPLVFYWIPWFGSAASYGQQPYEFFESCRQKYGDVFSFMLLGKIMTVYLGPKG	100
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	2001	..LKDCIV.VVDR.SA.P.PVKLAV.IL.I.....FV.....H.V..V...VV..M...Q...L..E.....A.VM...V.....	2300
<i>C. albicans</i> SC5314	101	HEFVFYAKLSVSDVSAEDAYKHLTPVFGKGVYDCPNRLMEQKFAKFAITTDTSFKRYVPKIREILNYFVTDESFKLKEKTHGVANVMKTQPEITIFTA	200
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	2301	...L...A...A...S.....R...T...KEA.Q....R.Q..V.D..KACQ..MN.RNN.....M..L..	2600
<i>C. albicans</i> SC5314	201	SRSLFGDEMRRIFDRSFAQLYSLDLKGFTPINFVFPNPLPHYWRDAAQKKISATYMKIKSRERGDIDPNRDLIDSLIHSTYKDGKMTDQEIANL	300
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	2601	.K..M..D..AR..A...K.....H...A..K...Q.....SL.NE..KT...V.D...MTN.....V...	2900
<i>C. albicans</i> SC5314	301	LIGILMGQQTSASTSAWFLHLGKPHLDQVYIQEVVLLKEKGGDLNDLTIEDLQKLPSVNNTIKETLRMHMPLHSIFRKVTNPLRIPETNYIVPKGH	400
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	2901	...V.....A.Q.K..EEL.N..LSV.A...S.K..A.D...M.LI.Q.....L.....M...VV.N.K.V.....	3200
<i>C. albicans</i> SC5314	401	YVLVSPGYAHTSERYFDNPFDPTRWDTAANKANSVSNSSDEVVDYGFQKVSQVSSPYLPFGGGRHRCIGEQFAVVQLGTILTTFVYNLRWTIDGYKV	500
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	3201	.M.....Q.N.KW.PRANE...H...EETS-----NIDT.A.....T.....A.Y...IK.RF...SL	3488
<i>C. albicans</i> SC5314	501	PDPDYSSMVVLPTPEAEIWEKRETCMF	528
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	3489	.PV..Q...T..M.....E.....VY	3572

Рис. 1. Выравнивание транслированных последовательностей гена *ERG11* *Candida auris* РКПГ1821 и *C. albicans* SC5314. В строках приведена аминокислотная последовательность белка, кодируемая изучаемым геном.

<i>C. albicans</i> B311	1	MDIVLEICDYLFDFKVYADVFPKDGAVHEFLKPAIQSFSQIDFPLSLNLDSTNLTIS	60
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	57195	A.SF.L..L..KAL.....AQYIANNFG.-----KN	57311
<i>C. albicans</i> B311	61	SNNFNISNVNPNATIPSYLFSKIASYQDKSEIYGLAPKFFPATDFINTSFLARSNIFRETL	120
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	57312	ATAPAQGLHM..PV-T..A.LAGKL.R.D.V..HF.Q..DFDEYT.A.L.S...LI..FV	57488
<i>C. albicans</i> B311	121	SLFIITITIFGWLLYFIVAYLSYVVFDDKKIFNHPRYLKNQMSLEIKRATTAIPVMVLLTI	180
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	57489	.I.F..A....I...S..SF..F.....V....W.....V	57668
<i>C. albicans</i> B311	181	PFFLLELNGYSFLYLDINECTGGYKAILWQIPKFIIFTDCGIYFLHRWLHWPSVYKVLHK	240
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	57669	...MA....F.K..FNVD.S...W..V.L.F.F.....I.....K...	57848
<i>C. albicans</i> B311	241	PHHKWIVCTPFASHAFHPVDGFFQSLPYHLYPLLFPLHKVLYLFLFTFVNFVTVMIHDS	300
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	57849	W.....MV.....S..L.....Q	58028
<i>C. albicans</i> B311	301	YWSNDPVVNGTACHTVHHLYFNINYGQFTTLWDRLGNSYRRPDDSLFVKDVKAEEEEKKIW	360
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	58029	.M.....R.....A.NTNQDT...V.	58208
<i>C. albicans</i> B311	361	KEQTRKMEEIRGEVEGKVDDREY	383
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	58209	N.....A....L...D.....	58277

Рис. 2. Выравнивание транслированных последовательностей гена (аминокислотных) *ERG3* *Candida auris* РКПГ 1821 и *C. albicans* B311

0,25, фторцитозин – 0,12, позаконазол – 0,25, вориконазол – 2,00, итраконазол – 0,25, флуконазол >256, амфотерицин В – 0,50 [13]. Для выделения ДНК использовали 2-дневную культуру *C. auris*. Геномную ДНК экстрагировали с использованием набора GeneJET (Thermo Scientific, Вильнюс, Литва). Концентрацию выделенной ДНК измеряли на флуориметре Qubit (Invitrogen, США).

Полногеномный анализ штамма *Candida auris* РКПГ1821 проведен секвенированием генома на базе научного подразделения ГБУЗ «Городская клиническая больница № 40» ДЗМ. Качество и количество геномной ДНК (гДНК) оценивали с использованием квантового флуорометра dsDNA (Promega, Madison, WI, США). Секвенирование ДНК всего генома включало этапы фрагментации геномной ДНК до средней длины 500 пар нуклеотидов с использованием сфокусированного ультразвука Covaris S2 (Covaris, США) в соответствии с протоколом производителя. Оценка качества полученных фрагментов гДНК проведена с использованием TapeStation 2200 (Agilent Technologies, США), захват целевых областей путем гибридизации библиотеки образцов ДНК – с помощью набора для подготовки библиотеки Кара НТР (Roche, США) и получение чтений – с использованием секвенатора MiSeq (Illumina, США) парноконцевыми чтениями длиной по 250 пар оснований.

Контроль качества чтения и сборки *de novo* был выполнен, как описано ранее [16]. Необработанные считывания (риды) были переданы в архив последовательностей ридов (Sequence Read Archive) Национального центра биотехнологической информации (NCBI) (идентификатор биопроекта PRJNA514082).

Черновая последовательность генома штамма *C. auris* РКПГ 1821 была депонирована в GenBank под инвентарным номером SBI000000000. Филогеномная реконструкция выполнена на сервере CSIPhylogeny 1.4 [17]. Геномная последовательность штамма B8441 [10] была использована в качестве эталона для определения однонуклеотидного полиморфизма (ОНП) генома *C. auris*. В качестве референтных последова-

тельных *C. albicans* были взяты последовательность штамма SC5314 (ASM1829v3 GenBank), чувствительного к антимикотикам, в том числе препаратам азолового ряда и эхинокандинам, и последовательность штамма CA_99_PD (MF411453 GenBank), резистентного к флуконазолу (MIC 300 мг/л).

Результаты и обсуждение

Полная сборка генома *C. auris* РКПГ 1821 состояла из 662 контигов общей длиной 12,5 Мб, сходных с таковыми у других видов *Candida*. Содержание GC составляло 45%, а число предсказанных генов — 5156.

В настоящее время определено известно, что глобальная популяция *C. auris* состоит из 4 географических групп (клад) – южно-азиатской (индопакистанской), южно-африканской, японской и южно-американской (венесуэльской) [5]. Клады *C. auris* обладают очень низкой генетической вариативностью внутри группы и рядом характерных различий между группами.

Доказано, что клинические изоляты *C. auris*, принадлежащие к разнымкладам, обладают различной степенью вирулентности и резистентностью к противогрибковым препаратам. Изоляты японской линии практически авирулентны и чувствительны к антифунгальной терапии, а инфицирование изолятами индо-пакистанской клады в 30–60% случаев приводило к летальному исходу [6]. Филогеномная реконструкция на основе ОНП всего генома показала, что изолят *C. auris* РКПГ 1821 принадлежит к южно-азиатской (индопакистанской) кладе, характеризующейся тотальной резистентностью к флуконазолу.

Исследуемый штамм *C. auris* РКПГ 1821 также проявлял природную устойчивость к флуконазолу. Одним из наиболее важных и хорошо изученных механизмов возникновения устойчивости микромицетов к действию противогрибковых средств является модификация генов, кодирующих мишени данных препаратов [18].

Соединения азольного ряда направленно действуют на ферменты биосинтеза эргостерола, в основном Erg11 и Erg3,

<i>C. albicans</i> SC5314	44	DYDPAQYQQQFYDMDDQYDQANQYQGPMAQYNDPEAFSDFSYGGQTPGTGVDQY	103
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	67221	N.....Q.....GA.....Q.....G.A.S.....HA.....	66946
<div> <div>QGGQPGGEY</div> <div>EMGQPVNYDQAGSYDFNQYQQQPYD</div> <div>G</div> </div>			
<i>C. albicans</i> SC5314	104	GTQYTPSQMSYGGDPRSSGASTPIYGGQGGQYDPTQFMSSNLPYFANSADQAPAKIEH	163
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	66945	Q.....A.....AN.PN.....S.....QL.....	66772
<i>C. albicans</i> SC5314	164	IEDIFIDLTKFGQFQDRSMRMFMFTLLDSRSSRMSPAQALLSHADYIGGDNANYRK	223
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	66771	K.....	66592
<i>C. albicans</i> SC5314	224	WYFSQQDLDDSLGFANMTLKGIGKARKAKSKSKARKAAEEHQDQDALANELEGDYS	283
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	66591	.F.A.....E.I.....N.....I.....N.....	66412
<i>C. albicans</i> SC5314	284	LEAAETRMKAKMNSLTPEERVRLDALYLLWGEANQVRFTPECLCYIKYSATDYINSPLC	343
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	66411	M...N.....V.....L.....L.....L.I.F.F.T.L.....Q.....	66232
<i>C. albicans</i> SC5314	344	QQRQEPVEGQYLNRLVITLYRFIRSQVVEYIDGRFVKREKDHNVIGYDDVNLQFWYPE	403
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	66231	E.....	66052
<i>C. albicans</i> SC5314	404	GISRIIFEDGTLDVDPQERFPLKLEVEWKNVFFKTYKEIRTLWHEVTFNFRNIHGT	463
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	66051	N.....YMR.....Q.I.....V.....L.....V.....	65872
<i>C. albicans</i> SC5314	464	IYMYTAYNSPTLYTKHYQVQINQGLASSWAAACIGGLASFIQILATLEFWIFVPE	523
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	65871	QD.....NR.T.....Q.S.P.M.....MI.....EVM.....V.....M.....	65692
<i>C. albicans</i> SC5314	524	WAGAQHLSRMLFLVLINLNVPPVYTFQITKLVIYSKAYAVSIVGFTAVATLVFFA	583
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	65691	LV..II..LVI..I..FA.S.YWAG.SAI.....H.....	65512
<i>C. albicans</i> SC5314	584	VMLQGLFTSYMKRSRYIASQTFYANYIKGLDMMSYLLVFLAKLVESYFFLT	643
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	65511	I.....R.....K.V.....FHS.R.....VT..A.....A.....	65332
<i>C. albicans</i> SC5314	644	LSLRDPINRLSTMTNRVCGSEWYKIDVCRNQAKIVLGLMYLVOLLFLDFTYMWIICNC	703
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	65331	N.....Q.FG.TL.KH.....E.....L.....F.....	65152
<i>C. albicans</i> SC5314	704	IFSIRGSFYGLSILTPWNRIFPLKRIYSKILATLEMEIKYKVKVLSIQNNAIVISM	763
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	65151	V.....	64972
<i>C. albicans</i> SC5314	764	YREHLAIDHVKQLLYHQVPSIEGKRLRAPTFFVSQDDNFTEFFFNSEARRISF	823
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	64971		64792
<i>C. albicans</i> SC5314	824	FAQSLATPMPEPLFVDMMPFTFTVPHYSEKILLSLREIREDQGSFVTLLEYKQLHP	883
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	64791	IL.....	64612
<i>C. albicans</i> SC5314	884	VEWDCFYKDTKILASETAYENGDSSEKSEGLSKSIDLPFYCIGKSAAPETLRTLR	943
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	64611	A.EE.R.N.....A.....	64432
<i>C. albicans</i> SC5314	944	IKASLRQTLRYTVSGFMYARAILKLYRVENPELVYQGGDEPEGLALELERNARKRF	1003
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	64431	M.....C.....	64252
<i>C. albicans</i> SC5314	1004	LVSQRLSKFQDEMEMAEFLRAYDQLIAYLDEEPALNEDEEPRVYSALDGHCEMLE	1063
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	64251	V.....L.....S.L.D.DR.N.....I.P.R.....LS..I.....V.D.....	64072
<i>C. albicans</i> SC5314	1064	NGRRPKFRVQLSGNPLGDKSKDNQNHAVIFHRGEYIQLIDANQNYLECLKRSVIA	1123
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	64071	I.....	63892
<i>C. albicans</i> SC5314	1124	EFEEMNVHVNYPANLKSSEDNKKDPVFLGAREYIFSENGVGLDVAAGKEQTFGL	1183
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	63891	L.....G..N.N.DE.PA.....I.....	63715
<i>C. albicans</i> SC5314	1184	PARTLAIGQKLIHYCHPDFLNATMLTRGVSKAQKGLHNEIYAGNMMRGKIKHC	1243
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	63714	T.....L.....R.....	63535
<i>C. albicans</i> SC5314	1244	EYQCQGRDLQFGSLINFTTKIAGGMEQMLREYFYLGTLQPLDRFLSYFGHPGPHI	1303
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	63534	M.....C.....Y.....S.....	63355
<i>C. albicans</i> SC5314	1304	NNLFIQLSLQVFLVLANLNLAEIACMSYKNDVPVTDVLPFGCYNIAPADWIRRYT	1363
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	63354	T.M.....S.L.D.DR.N.....I.P.R.....LS..I.....V.D.....	63175
<i>C. albicans</i> SC5314	1364	LSIFIVFIFSIPLVQLIERGVKAFQRFVRHFISMSPFFEFVFAQIYSSSVTDLTV	1423
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	63174	W.....L.....T.....F.....L.....M.....L.....N.....L.....	62995
<i>C. albicans</i> SC5314	1424	GGARYISTGRTATSRIPSEILYRFADSSILYMGARMLLLFTGTVSHWQAPLLFWASL	1483
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	62994	F.....A.....S.S.....S.A.....	62815
<i>C. albicans</i> SC5314	1484	SALMPSFPIPNHQFAMEDPFDLYDRFIRMLSGNTKWHNRNIGICVLAASGRIQPKRK	1543
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	62814	L.....I.....G.....IK.....V.....	62635
<i>C. albicans</i> SC5314	1544	LTGDVSEKAAGDASRAHRSNVLFADFLPTLIYTAGLYVAYTFINAQTGVTSYPYINGST	1603
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	62634	I.....S.....FM.....C.F.A.....F.....YV.....RWSVGDNR.....	62455
<i>C. albicans</i> SC5314	1604	DPQFNVSTLLVICALAPVIMDGLGVCLAMACCAAGMLGLCKCKTGAVIAGVAGVAVH	1663
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	62454	E.IK.....VV.IV.....I.....G.....	62275
<i>C. albicans</i> SC5314	1664	IVNHIFIVMVGTFNFARLMLGIATMIYVQRLLEFLLCLFLREFKNKANTAPWGT	1723
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	62274	LV.....L.....ME.....V.....L.....V.....L.....S.....	62095
<i>C. albicans</i> SC5314	1724	KWYNTGMGMMAFTQPSREFAKIIEMSEFAGDFVLAILFLCQLPFLPIVLDNRHSMML	1783
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	62094	Y..A.....A.....I.....L.....I.....I.C.....I.....T.....	61915
<i>C. albicans</i> SC5314	1784	PWLKPSRLIPFISLQKRLAKKVMRYKCYLVFAVILFIVIVIPAVASQIPVQDFA	1843
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	61914	K.....I.....T.....I.V.....A.....GRF.ADLMLG.....	61735
<i>C. albicans</i> SC5314	1844	NIGSSGSIAQGLFQPRNVNNDGNHRPKTYTWSYLSLRTFTGTTTPTSTNPF	1895
<i>C. auris</i> РКПГ 1821	61734	.MS.T---FE.....K.K.....TSDV.ITF..FTP.....SNV.T.KA.....	61579

KVSSWS

Рис. 3. Выравнивание транслированных последовательностей гена (аминокислотных) *FKS1* *Candida auris* РКПГ 1821 и *C. albicans* SC5314

инактивируя их, связываясь в активных центрах ферментов, что приводит к нарушению липидного состава клеточной мембраны клетки микроскопического гриба. Поскольку аминокислотные остатки, ответственные за формирование активного центра, консервативны у разных видов дрожжей, существует возможность по хорошо охарактеризованным мутациям, приводящим к развитию устойчивости у одного вида, судить об аналогичной роли для тех же мутаций у другого вида. Так как большинство генов *C. albicans*, связанных с устойчивостью к азолам, свойственно и *C. auris*, можно предположить, что лекарственная устойчивость *C. auris*, вероятно, включает механизмы, ранее описанные у *C. albicans* [5].

Изучаемые транслированные последовательности *ERG11* штамма РКПГ 1821 содержат аминокислотные замены F105L и K143R (рис. 1), которые ранее были ассоциированы

с формированием устойчивости у *C. albicans* [19]. Выравнивание аминокислотной последовательности гена *ERG3* *C. auris* РКПГ 1821 с последовательностями соответствующих белков *C. albicans* не выявило никаких мутаций (рис. 2), которые потенциально были бы ответственны за устойчивость к противогрибковым соединениям.

Ранее S. Lockhart и соавт. обнаружили, что замены в *ERG11* были тесно связаны с географическимикладами. В частности, индийские и пакистанские штаммы характеризовались наличием аминокислотных замен Y132F и K143R [10]. Однако мутация Y132F в изучаемом штамме *C. auris* РКПГ 1821 не была идентифицирована.

Мутация F105L локализуется в α -спиральном домене В белка Erg11, K143R – α -спиральном домене С [20]. Эти два аминокислотных остатка не входят в число тех, которые отвечают за различные взаимодействия в активном центре фермента, но гетерологичная экспрессия *ERG11* *C. auris* в гаплоидном штамме *Saccharomyces cerevisiae*, несущем мутацию, приводящую к замене K143R, повышает минимальные ингибирующие концентрации флуконазола в 4–8 раз, а вориконазола – в 2–4 раза [21].

Поскольку длительная терапия эхинокандином у пациентки не была успешной, проанализировано наличие мутаций в генах, ассоциированных с формированием устойчивости к эхинокандинам. Однако ген *FKS1* штамма РКПГ 1821 не обладал никакими известными мутациями, определяющими устойчивость к эхинокандину, из мутационного репертуара *FKS1* *C. glabrata* и *C. albicans* (рис. 3).

Современный детальный сравнительный геномный анализ, включающий новые геномные данные для близкородственных *C. auris* мультирезистентных видов, раскрыл эволюцию этой группы новых патогенов, выявил общие свойства, которые лежат в основе резистентности к противогрибковым препаратам и вирулентности [5]. Несмотря на то что *C. auris* обладает белками, отвечающими за транспорт лекарственных препаратов, общими с *C. albicans*, у *C. auris* и ее близкородственных видов (*C. haemulonii*, *C. duobushaemulonii*, *C. pseudohaemulonii*) наблюдается диверсификация (расширение набора) транспортеров [10].

Все эти 4 вида мультирезистентны к противогрибковым препаратам, и ранее описанные сайты точечных мутаций *ERG11* в геноме *C. auris* сохраняются в большинстве клинических изолятов группы *C. haemulonii*. Несмотря на то что существуют доказательства увеличения количества копий *ERG11* в изолятах *C. auris* (подобный механизм формирования резистентности описан у *C. albicans*), доказательств анеуплоидии (изменение кариотипа) не получено [5]. Другие механизмы устойчивости к противогрибковым препаратам варьируют между хорошо изученными видами *Candida* и активно эволюционирующими. Например, белки эффлюкса семейства CDR (*Candida* drug resistance), вовлеченные в формирование резистентности к противогрибковым препаратам у *C. albicans* и *C. glabrata*, не индуцировались у штаммов *C. auris* во время терапии амфотерицином В и вориконазолом. Однако наблюдали повышение экспрессии генов ряда альтернативных транспортеров, большинство из них уникальны для *C. auris* и близкородственных ей мультирезистентных видов [22].

Напротив, экспансия семейств генов, кодирующих белки клеточной стенки, ассоциированная с формированием биопленок, определенная у *C. albicans*, не найдена у *C. auris* и родственных ей мультирезистентных видов.

Гены семейства белков, обладающих амилоидными свойствами, ALS (agglutinin-like sequence) в геноме *C. auris* и родственных ей мультирезистентных видов представлены от 2 до 4 копий, тогда как в геноме *C. albicans* 8 копиями [9]. Предполагают, что более длинная история эволюции взаимодействий с организмом человека способствует диверсификации генов, кодирующих белки клеточной стенки, в более распространенных патогенных видах *Candida* [5, 9]. Несмотря на наличие общих молекулярных механизмов, в целом набор генов, белки которых участвуют в формировании резистент-

ности, между *C. albicans*/*C. glabrata* и *C. auris*/группой *C. haemulonii* несколько различен.

Заключение

Проведение дальнейших исследований с расширенным перечнем генов-кандидатов, ассоциированных с формированием резистентности, а также включение в анализ большего количества штаммов *C. auris* будет способствовать изучению механизмов формирования резистентности к противогрибковым препаратам. Кроме того, дальнейшие исследования позволят выявить биомаркеры, которые будут основой для разработки тест-систем на основе полимеразной цепной реакции для быстрого определения чувствительности микроскопического гриба к противогрибковым препаратам.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Васильева Наталья Всеволодовна (Natalya V. Vasilyeva) – доктор биологических наук, профессор, директор НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, заведующий кафедрой медицинской микробиологии ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

E-mail: Natalya.Vasileva@szgmu.ru

<https://orcid.org/0000-0003-3693-5468>

Тараскина Анастасия Евгеньевна (Anastasiya E. Taraskina) – кандидат биологических наук, заведующий научно-исследовательской лабораторией молекулярно-генетической микробиологии НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

E-mail: ataraskina@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-1725-8433>

Богомолова Татьяна Сергеевна (Tatiana S. Bogomolova) – кандидат биологических наук, заведующий научно-исследовательской лабораторией микологического мониторинга и биологии грибов НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

E-mail: tatiyana.bogomolova@szgmu.ru

<https://orcid.org/0000-0002-2450-687X>

Выборнова Ирина Владимировна (Irina V. Vybornova) – научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории микологического мониторинга и биологии грибов НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

E-mail: irine_vybornova@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-0099-4450>

Пчелин Иван Михайлович (Ivan M. Pchelin) – научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярно-генетической микробиологии НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

E-mail: arcella.oraia@gmail.com)

<https://orcid.org/0000-0003-3062-3316>

Рябинин Игорь Андреевич (Igor' A. Ryabinin) – младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярно-генетической микробиологии НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

E-mail: igorriabinin@yandex.ru

Азаров Даниил Валерьевич (Daniil V. Azarov) – кандидат биологических наук, ассистент кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

E-mail: denazarov.da@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0003-2483-5144>

Апалько Светлана Вячеславовна (Svetlana V. Apalko) – кандидат биологических наук, начальник сектора биобанкирования и трансляционной медицины СПб ГБУЗ «Городская больница № 40», Санкт-Петербург, Российская Федерация

E-mail: svetlana.apalko@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-3853-4185>

Романюк Софья Андреевна (Sofya A. Romaniuk) – биолог сектора биобанкирования и трансляционной медицины СПб ГБУЗ «Городская больница № 40», Санкт-Петербург, Российская Федерация

E-mail: sofya.romanyuk@gmail.com

Щербак Сергей Григорьевич (Sergey G. Shcherbak) – доктор медицинских наук, профессор, главный врач СПб ГБУЗ «Городская больница № 40», Санкт-Петербург, Российская Федерация

E-mail: sgsherbak@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0001-5036-1259>

Круглов Александр Николаевич (Alexander N. Kruglov) – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией микробиологии НАКФФ, Москва, Российская Федерация

E-mail: kruglov_a_n@mail.ru

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Klimko N., Kozlova Y., Khostelidi S. et al. The burden of serious fungal diseases in Russia. *Mycose*. 2015; 58 (suppl 5): 58–62.
2. GAFFI: Global Action Fund for Fungal Infections. URL: <https://www.gaffi.org/>
3. Cornely O.A., Lass-Flor C., Lagrou K., Arsic-Arsenijevic V., Hoenigl M. Improving outcome of fungal disease – guiding experts and patients towards excellence. *Mycoses*. 2017; 60: 420–5.
4. Vasilyeva N., Raush E., Bogomolova T.S., Shagdileeva E., Klimko N. Species distribution and susceptibility testing of *Candida* spp. isolated from patients with invasive candidosis in Russia. In: *Mycoses. Special Issue: 7th Trends in Medical Mycology*, 9–12 October 2015. Lisbon, Portugal. 2015; 58 (suppl S4): 149.
5. Munoz J.F., Gade L., Chow N.A., Loparev V.N., Juieng P., Farrer R.A., et al. Genomic basis of multidrug-resistance, mating, and virulence in *Candida auris* and related emerging species. *Nat Commun*. 2018; 9 (1): 5346.
6. Lu P.L., Liu W.L., Lo H.J., Wang F.D., Ko W.C., Hsueh P.R., et al. Are we ready for the global emergence of multidrug-resistant *Candida auris* in Taiwan? *J Formos Med Assoc*. 2017; 117: 462–70.
7. Jeffery-Smith A., Taori S.K., Schelenz S., et al. *Candida auris*: a review of the literature. *Clin Microbiol Rev*. 2017; 31 (1): e00029–17.
8. Riat A., Neofytos D., Coste A., et al. First case of *Candida auris* in Switzerland: discussion about preventive strategies. *Swiss Med Wkly*. 2018; 148: w14622.
9. Chowdhary A., Sharma C., Meis J.F. *Candida auris*: a rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. *PLoS Pathogens*. 2017; 13 (5): e1006290.
10. Lockhart S.R., Etienne K.A., Vallabhaneni S., Farooqi J., Chowdhary A., Govender N.P., et al. Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. *Clin Infect Dis*. 2017; 64 (2): 134–40.
11. Sekyere J.O. *Candida auris*: a systematic review and meta-analysis of current updates on an emerging multidrug-resistant pathogen. *Microbiol Open*. 2018; 7: e578.
12. Cortegiani A., Misseri G., Fasciana T., Giammanco A., Giarratano A., Chowdhary A. Epidemiology, clinical characteristics, resistance, and treatment of infections by *Candida auris*. *J Intensive Care*. 2018; 6 (69): 1–13.
13. Vasilyeva N.V., Pchelin I.M., Ryabinin I.A., Raush E.R., Chilina G.A., Bogomolova T.S., et al. The first Russian case of candidaemia due to *Candida auris*. 28th ECCMID. 2018.
14. Chatterjee S., Alampalli S.V., Nageshan R.K., Chettiar S.T., Joshi S., Tatu U.S. Draft genome of a commonly misdiagnosed multidrug resistant pathogen *Candida auris*. *BMC Genomics*. 2015; 16: 686.
15. Pchelin I.M., Zlatogursky V.V., Rudneva M.V., et al. Reconstruction of phylogenetic relationships in dermatomycete genus *Trichophyton* Malmsten 1848 based on ribosomal internal transcribed spacer region, partial 28S rRNA and beta-tubulin genes sequences. *Mycoses*. 2016; 59: 566–75.
16. Pchelin I.M., Azarov D.V., Churina M.A., Scherbak S.G., Apalko S.V., Vasilyeva N.V., et al. Species boundaries in the *Trichophyton mentagrophytes*/T. *interdigitale* species complex. *Med Mycol*. 2018; 57 (6): 781–9. DOI: 10.1093/mmy/myy115.
17. Kaas R.S., Leekitcharoenphon P., Aarestrup F.M., Lund O. Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. *PLoS One*. 2014; 9 (8): e104984.
18. Cowen L.E., Sanglard D., Howard S.J., Rogers P.D., Perlin D.S. Mechanisms of antifungal drug resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014; 5 (7): a019752.
19. Morio F., Jensen R.H., Le Pape P., Arendrup M.C. Molecular basis of antifungal drug resistance in yeasts. *Int J Antimicrob Agents*. 2017; 50 (5): 599–606.
20. Hargrove T.Y., Friggeri L., Wawrzak Z., Qi A., Hoekstra W.J., Schotzinger R.J., et al. Structural analyses of *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase complexed with azole drugs address the molecular basis of azole-mediated inhibition of fungal sterol biosynthesis. *J Biol Chem*. 2017; 292 (16): 6728–43.
21. Healey K.R., Kordalewska M., Jiménez-Ortigosa C., Singh A., Berrío I., Chowdhary A., et al. Limited ERG11 mutations identified in isolates of *Candida auris* directly contribute to reduced azole susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018; 62 (10): e01427-18.
22. Prasad R., Goffeau A. Yeast ATP-binding cassette transporters conferring multidrugresistance. *Annu Rev Microbiol*. 2012; 66: 39–63.