



Спектр и функциональные свойства мутаций гена *ERG11* флуконазол-резистентных грибов *Candida albicans*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов

Несвижский Ю.В.^{1,2✉}, Афанасьев С.С.², Воропаев А.Д.¹, Урбан Ю.Н.², Сулейманова М.Э.³, Афанасьев М.С.¹, Буданова Е.В.¹, Воропаева Е.А.²

¹Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

²Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия;

³Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского, Москва, Россия

Аннотация

Актуальность. Низкая эффективность терапии кандидозной инфекции азоловыми препаратами, особенно у ВИЧ-инфицированных пациентов, зачастую связана с гиперэкспрессией в грибах *Candida* spp. гена *ERG11*, которая обуславливает повышение объёма синтеза эргостерола — мишени данных препаратов. Обнаружены мутации гена *ERG11*, способные модифицировать эффекты его гиперэкспрессии путём как усиления, так и снижения. Однако сведения, полученные в различных лабораториях и странах, весьма противоречивы.

Цель работы — исследовать спектр и функциональные свойства мутаций гена *ERG11* в устойчивых к флуконазолу штаммах *Candida albicans*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 10 штаммах грибов *C. albicans*, выделенных из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов и изначально устойчивых к действию флуконазола и вориконазола, из коллекции Московского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского. Штаммы были охарактеризованы по чувствительности к антимикотическим препаратам: анидулафунгину, микафунгину, каспофунгину, позаконазолу, вориконазолу, итраконазолу, флуконазолу, амфотерицину В, 5-флуцитозину. Уровень экспрессии гена *ERG11* измеряли с помощью количественной ПЦР. Мутации гена *ERG11* выявляли путём его секвенирования по Сэнгеру.

Результаты. В 7 штаммах *C. albicans* в структуре гена *ERG11* были обнаружены 5 вариантов мутаций (*E266D*, *G464S*, *I471L*, *D116E* и *V488I*), 6 штаммов оказались носителями сочетанных мутаций, которые не имели сопряжения. В 6 исследованных штаммах *C. albicans* была установлена повышенная экспрессия гена *ERG11*. Для мутации *V488I* была характерна сильная отрицательная связь с повышенной экспрессией гена *ERG11* ($r = -0,845$; $p < 0,05$). Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) штаммов — носителей мутации была на 2 порядка ниже ($p < 0,05$), чем штаммов без мутаций. У носителей мутаций МИК позаконазола и итраконазола были в среднем в 16,5 раза ниже, чем МИК вориконазола и флуконазола ($p < 0,001$). Наличие мутаций в гене *ERG11* практически не отражалось на уровне МИК тестированных антимикотиков группы эхинокандинов, полиенов и пиримидина.

Заключение. В большинстве штаммов *C. albicans*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов и устойчивых к флуконазолу и вориконазолу, выявлен ряд мутаций в гене *ERG11*. За исключением *V488I* обнаруженные мутации не имели сопряжения с повышенной экспрессией гена *ERG11* и снижали эффекты гиперэкспрессии гена *ERG11* до 100 раз, хотя полностью не отменяли исходной резистентности к триазоловым препаратам.

Ключевые слова: *Candida*, ген *ERG11*, мутации, резистентность к антимикотическим препаратам, ВИЧ-инфекция

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Комитетом по этике Южноуральского государственного медицинского университета (протокол № 4 от 25.04.2014).

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Несвижский Ю.В., Афанасьев С.С., Воропаев А.Д., Урбан Ю.Н., Сулейманова М.Э., Афанасьев М.С., Буданова Е.В., Воропаева Е.А. Спектр и функциональные свойства мутаций гена *ERG11* флуконазол-резистентных грибов *Candida albicans*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(4):285–292. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-407> EDN: <https://www.elibrary.ru/pxrovi>

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-407>

Spectrum and functional properties of *ERG11* gene mutations in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains isolated from HIV-infected patients

Yuri V. Nesvizhsky^{1,2✉}, Stanislav S. Afanasiev², Alexander D. Voropaev¹, Yulia N. Urban², Mariam E. Suleymanova³, Maxim S. Afanasiev¹, Elena V. Budanova¹, Elena A. Voropaeva²

¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia;

²G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;

³Petrovsky National Research Center of Surgery, Moscow, Russia

Abstract

Rationale. The low efficacy of azole antimycotics in treatment of *Candida* infections, especially in HIV-infected patients, is often associated with overexpression of the *ERG11* gene in *Candida* spp., which results in increased production of ergosterol – the target of the above antimycotic drugs. Researchers have found *ERG11* gene mutations that can modify its overexpression effects by increasing or decreasing it. However, the findings reported by different laboratories and countries are highly contradictory.

The **purpose** of the study is to explore the spectrum and functional properties of *ERG11* gene mutations in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains isolated from HIV-infected patients.

Materials and methods. The study was performed using 10 *C. albicans* strains inherently resistant to fluconazole and voriconazole and isolated from the oropharynx of HIV-infected patients; the strains were provided from the collection of the Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology. The strains were assessed by their sensitivity to antimycotic agents: anidulafungin, micafungin, caspofungin, posaconazole, voriconazole, itraconazole, fluconazole, amphotericin B, 5-flucytosine. Expression levels of the *ERG11* gene were measured by quantitative PCR. *ERG11* gene mutations were identified by Sanger sequencing.

Results. Five mutations (*E266D*, *G464S*, *I471L*, *D116E*, and *V488I*) were detected in the *ERG11* gene in seven *C. albicans* strains; six strains carried non-associated co-occurring mutations. Increased expression of the *ERG11* gene was found in six *C. albicans* strains. The *V488I* mutation demonstrated a strong negative association with the increased expression of the *ERG11* gene ($r = -0.845$; $p < 0.05$). The minimum inhibitory concentration (MIC) in strains carrying mutations was a hundred times as low ($p < 0.05$) as MIC in strains without mutations. In mutation carriers, posaconazole and itraconazole MICs were on average 16.5 times as low as MICs of voriconazole and fluconazole ($p < 0.001$). The presence of mutations in the *ERG11* gene had almost no effect on MICs of the tested antimycotics of the echinocandin, polyene, and pyrimidine groups.

Conclusion. Multiple mutations were detected in the *ERG11* gene in most of the *C. albicans* strains isolated from HIV-infected patients and resistant to fluconazole and voriconazole. Except for the *V488I* mutation, the detected mutations were not associated with the overexpression of the *ERG11* gene and decreased the effects of overexpression of the *ERG11* gene by up to 100 times, though they did not eliminate the inherent resistance to triazole antimycotics.

Keywords: *Candida*, *ERG11* gene, mutations, resistance to antimycotic agents, HIV infection

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the South Ural State Medical University (protocol No. 4, April 25, 2014).

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Nesvizhsky Yu.V., Afanasiev S.S., Voropaev A.D., Urban Yu.N., Suleymanova M.E., Afanasiev M.S., Budanova E.V., Voropaeva E.A. Spectrum and functional properties of *ERG11* gene mutations in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains isolated from HIV-infected patients. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(4):285–292. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-407>. EDN: <https://www.elibrary.ru/pxrovi>

Введение

Широкое применение флуконазола в профилактике и терапии кандидозной инфекции, особенно в группе иммунокомпрометированных лиц, привело к распространению устойчивости к азоловым препаратам среди грибов рода *Candida* [1, 2]. У грибов

Candida spp. часто наблюдается повышенная экспрессия генов, кодирующих синтез мишени антимикотического лекарственного препарата. В этом немаловажную роль играет ген *ERG11*, определяющий структуру ланостерол-14 α -деметилазы. Этот фермент обеспечивает конечный этап синтеза эргостеро-

ла — важного компонента клеточной стенки гриба и мишени препаратов азолового ряда. За счёт гиперэкспрессии гена *ERG11* обеспечивается синтез большого количества эргостерола, что в итоге делает грибы рода *Candida* малочувствительными к терапевтическим дозам препаратов [3]. При этом флуконазол может сам стимулировать развитие данного механизма лекарственной резистентности микроба [4], которая, в свою очередь, наиболее эффективна против короткоцепочечных азолов типа флуконазола [5].

В гене *ERG11* обнаружен ряд мутаций, способных в определённой степени модифицировать эффекты его гиперэкспрессии. При этом они ассоциировались как с повышением, так и со снижением резистентности к азолам [6–10]. Однако сведения, полученные в различных лабораториях и странах, весьма противоречивы.

Цель настоящего исследования — выявление спектра и анализ функциональных свойств мутаций гена *ERG11* в устойчивых к флуконазолу штаммах *C. albicans*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов.

Материалы и методы

Исследование выполнено на 10 штаммах грибов *C. albicans*, изначально устойчивых к действию флуконазола и вориконазола, из коллекции Московского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.

Штаммы *C. albicans* были охарактеризованы по:

- степени экспрессии и наличию мутаций в гене *ERG11*, кодирующем ланостерол-14 α -деметилазу;
- чувствительности к ряду антимикотических препаратов, относящихся к группам триазолов, эхинокандинов, полиенов и пиримидинов.

Штаммы грибов *C. albicans* были выделены из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов в возрасте 20–69 лет с клиническими проявлениями орофарингеального кандидоза, находившихся на стационарном лечении в КИБ № 2 г. Москвы. ВИЧ-инфекция у всех пациентов была диагностирована на основании клинико-эпидемиологических данных и подтверждена обнаружением специфических антител/антигенов методом иммуноферментного анализа и лизатного иммуноблоттинга к белкам вируса иммунодефицита человека («Profiblot 48 TECAN», «АвтоБлот 3000») в соответствии с клинической классификацией ВИЧ-инфекции¹. У всех обследованных было получено информированное согласие на использование данных лабораторных анализов в научных целях. Все исследования проведены с согласия Комитета по этике при Южноуральском

государственном медицинском университете (протокол № 4 от 25.04.2014) на основании требований Хельсинкской декларации Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» 1964 г.

Видовую идентификацию грибов *C. albicans* производили различными методами:

1. Ориентировочная дифференцировка грибов по цвету колоний при инкубировании на специфических хромогенных средах («Oxoid», «HiMedia») при 37°C в течение 24–48 ч, согласно инструкции производителей;

2. Определение биохимической активности при инкубировании стандартизованных суспензий клеток в лунках планшетов коммерческих биохимических тест-систем «Remel RapID YEAST PLUS» и «ErbaLachema» при 37°C в соответствии с инструкцией производителя. Учёт результатов производился визуально или полуавтоматически в каждой лунке, интерпретация — в соответствии с инструкцией производителя либо с помощью официального программного обеспечения.

3. В мультиплексной полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием набора реагентов для одновременного выявления ДНК *C. albicans*, *C. glabrata* и *C. krusei* с гибридационно-флуоресцентной детекцией «Амплиценс *C.albicans/C.glabrata/C.krusei* — МУЛЬТИПРАЙМ-FL». ДНК выделяли из чистых культур *Candida* spp. с использованием наборов реагентов «ДНК-сорб-АМ» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) в соответствии с инструкцией производителя. Использовали амплификатор «Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System».

Исследовали чувствительность к ряду эхинокандинов (анидулафунгин, микафунгин, каспофунгин), азолов (позаконазол, вориконазол, итраконазол, флуконазол), амфотерицину В и 5-флуцитозину. Анализ проводили в соответствии с рекомендациями Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам, основанными на стандартах CLSI M44 и M60 для грибов и стандартах и критериях Европейского комитета по определению чувствительности к антибиотикам для метода микроразведений и бактериальных культур².

Минимальную ингибирующую концентрацию препарата (МИК; мг/мл) определяли методом серийных микроразведений с помощью планшетов «Sensititre YeastOne10» («Trek Diagnostic System») в соответствии с инструкцией производителя. Для

¹ Российская клиническая классификация ВИЧ-инфекции. URL: <https://base.garant.ru/12145892/>

² Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам: рекомендации. 2021. URL: <https://www.antibiotic.ru/minzdrav/category/clinical-recommendations>

этого инокулят подготавливали аналогично диско-диффузионному методу, после чего вносили в модифицированную среду RPMI-1640 и распределяли по 96-луночным планшетам для серийных микроразведений с внесёнными субстанциями антимикотиков [11]. Учёт результатов производили визуально по сравнению с ростом в лунке с положительным контролем в соответствии с критериями Европейского комитета по определению чувствительности к антибиотикам [12].

Уровни экспрессии гена *ERG11* определяли с помощью количественной ПЦР и метода 2-ΔΔCt [13]. РНК выделяли из суточной чистой культуры исследуемого штамма с помощью реагента ExtractRNA («Евроген») в соответствии с инструкцией производителя. Обратная транскрипция проводилась с помощью набора «Реверта-L» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) в соответствии с инструкцией производителя: 30 мин при 37°C. В работе использовали следующие праймеры:

ERG11:

- F — aactacttttgttataatttaagatggactattga;
- R — aatgatttctgctggttcagtaggt;

PMA1:

- F — ttgaagatgaccaccaatcc;
- R — gaaacctctggaagcaaatgg;

ACT1:

- F — ttggtgatgaagcccaatcc;
- R — catatcgtcccagttggaaca.

Аmplификацию осуществляли с помощью набора реактивов для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя Sybr-Green I («Синтол») с использованием амплификатора «Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System») со следующими параметрами: 95°C 3 мин; 40 циклов 95°C 10 с, 55°C 20 с.

Гены домашнего хозяйства *ACT* и *PMA* использовали в качестве контрольных генов. Базовые значения 2-ΔΔCt для гена *ERG11* получены при исследовании чувствительных изолятов ($n = 7$). Уровень экспрессии исследуемого штамма считали достоверно повышенным в случае, если он превышал базовые средние значения для чувствительных изолятов (m) более чем на 3 стандартных отклонения (3σ).

Для секвенирования гена *ERG11* по Сэнгеру [14] использовали следующие праймеры:

ERG11-1:

- F — atggctattgttgaactgtcatt;
- R — ggatcaatcaccacgttctc;

ERG11-2:

- F — attggagacgtgatgctgctca;
- R — csaatgatttctgctggtcagt.

Аmplификацию *ERG11* для секвенирования проводили с использованием набора реактивов «Qiagen PCR Master Mix, 2x» и прибора «Applied Biosystems Veriti» по программе: 95°C 15 мин; 35 циклов 95°C 40 с, 60°C 40 с, 72°C 1,5 мин; затем 72°C 10

мин. Очистку продуктов ПЦР осуществляли с помощью набора «ExoSAP-IT» («Thermo Fisher Scientific Inc.») в соответствии с инструкцией производителя. Реакцию секвенирования проводили с помощью набора реагентов «BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit» («Applied Biosystems») со следующими параметрами: 95°C 15 мин, 35 циклов 95°C 15 с, 55°C 15 с, 72°C 30 с; 72°C 7 мин. Очистку продуктов производили с помощью набора реагентов «BigDye Xterminator Purification Kit» («Applied Biosystems»), секвенирование — на генетическом анализаторе «3500 Applied Biosystems» («Applied Biosystems»).

Для статистического анализа и визуализации данных использовали программное обеспечение «Microsoft Excel», «SciPy» [15], «Matplotlib» [16]. Значимость различий между группами оценивали по точному критерию Фишера для дискретных величин и U-критерию Манна–Уитни — для непрерывных. Критический уровень ошибки при проверке статистических гипотез принимали за общепринятую в медицине величину $p < 0,05$. Тесноту связей оценивали в корреляционном анализе Пирсона.

Результаты

В ходе исследования в 7 (70%) штаммах *C. albicans* в структуре гена *ERG11* были обнаружены 5 вариантов мутаций, идентифицированных как *E266D*, *G464S*, *I471L*, *D116E* и *V488I*. Наиболее частой была мутация *E266D*, редкой — *I471L* (табл. 1). Общее число мутаций составило 13.

Носителями сочетанных, двухкомпонентных мутаций оказались 6 (92,3%) штаммов (табл. 2). Наибольшей склонностью к формированию сочетанных мутаций обладали *E266D* и *V488I* — по 3 (30%) случая. Заметного сопряжения между мутациями не наблюдалось — коэффициент корреляции не превышал 0,410.

В 60% исследованных штаммов *C. albicans* была установлена повышенная экспрессия гена *ERG11*. При этом выявленные мутации гораздо чаще встречались в штаммах с гиперэкспрессией данного гена (табл. 3), чем без неё. Однако статистический анализ практически не выявил значимых ассоциаций между ними. Вместе с тем для мутации *V488I* была характерна сильная отрицательная связь с повышенной экспрессией гена *ERG11* ($r = -0,845$; $p < 0,05$).

Таблица 1. Мутации, выявленные в гене *ERG11*

Table 1. Mutations identified in the *ERG11* gene

Мутация Mutation	Абс. Abs.	%
<i>E266D</i>	4	40
<i>G464S</i>	2	20
<i>I471L</i>	1	10
<i>D116E</i>	3	30
<i>V488I</i>	3	30

Таблица 2. Ассоциации мутаций, выявленные в гене *ERG11*

Table 2. Associations of mutations identified in the *ERG11* gene

Мутация Mutation	Абс. Abs.	%	Коэффициент ассоциации Association coefficient
<i>E266D + G464S</i>	1	10	0,100
<i>E266D + D116E</i>	2	20	0,356
<i>E266D + V488I</i>	1	10	0,089
<i>V488I + I471L</i>	1	10	0,409
<i>V488I + D116E</i>	1	10	0,045

Результаты исследования взаимосвязи мутаций с чувствительностью к антимикотическим препаратам представлены в **табл. 4**, из которой видно, что МИК штаммов — носителей какой-либо мутации был примерно равен или существенно ниже, чем показатель штаммов без мутаций. Наиболее заметно выделялась чувствительность к препаратам азолового ряда, МИК которых была на 2 порядка ниже у носителей мутаций ($p < 0,05$) по сравнению со штаммами без мутаций.

Среди триазолов заметно выделялись позаконазол и итраконазол, МИК которых у носителей мутаций был на 2 порядка ниже ($p < 0,05$), чем у штаммов без мутаций в гене *ERG11*. Кроме того, МИК этих препаратов был в среднем в 16,5 раза ниже, чем МИК вориконазола и флуконазола ($p < 0,001$). Из выявленных мутаций обратила на себя внимание *G464S*, у носителей которой МИК триазолов снижался менее выражено, чем при других мутациях ($p < 0,05$). Корреляционный анализ не выявил зависимости между химической структурой и молекулярной массой триазолового препарата и наличием мутации.

Наличие мутаций в гене *ERG11* практически не отражалось на уровне МИК тестируемых эхинокандинов, амфотерицина В и 5-флуцитозина. Однако у носителей мутации *G464S* МИК анидулафунгина, каспофунгина и амфотерицина В незначительно смещалась в сторону резистентности ($p > 0,05$).

Таблица 3. Ассоциация мутаций в гене *ERG11* с его гиперэкспрессией

Table 3. Association of mutations in the *ERG11* gene with its hyperexpression

Мутация Mutation	Штаммы с гиперэкспрессией гена Strains with overexpression of the gene		Штаммы без гиперэкспрессии гена Strains without overexpression of the gene		Коэффициент ассоциации Association coefficient
	абс. abs.	%	абс. abs.	%	
<i>E266D</i>	3	75,0	1	25,0	0,251
<i>G464S</i>	1	50,0	1	50,0	0,457
<i>I471L</i>	1	100,0	0	0,0	–
<i>D116E</i>	2	66,7	1	33,3	0,094
<i>V488I</i>	1	33,3	2	66,7	–0,845
Всего The sum	8	61,5	5	38,5	0,089
Сочетанные Combined	4	66,7	2	33,3	0,251

Обсуждение

В ходе проведенного молекулярно-генетического исследования штаммов *C. albicans*, изначально устойчивых к флуконазолу и вориконазолу, мы обнаружили высокую частоту повышенной экспрессии гена *ERG11*, а также ряд мутаций в нем: *D116E*, *E266D*, *G464S*, *I471L* и *V488I*. Наиболее частой в нашей выборке *C. albicans* оказалась мутация *E266D*. Данные мутации были описаны ранее, однако они не имеют повсеместного распространения [17–26]. Поскольку все штаммы были жизнеспособны, мы заключили, что локализация этих мутаций не затрагивала критических областей генома и они не являются летальными.

Теоретически гиперэкспрессия гена должна создавать благоприятные условия для мутационного или рекомбинационного процесса. Однако в соответствии с полученными нами данными мутации в гене *ERG11* не связаны с его повышенной экспрессией. Более того, гиперэкспрессия гена и его мутация *V488I* чаще всего появлялись дискордантно. Можно предположить, что само возникновение мутации *V488I* блокирует возможность мультипликации гена.

Одной из особенностей обнаруженных мутаций явилось их сочетанное проявление. Данный факт в отношении мутаций *E266D* и *G464S* был ранее показан исследователями из Китая, США и ряда других стран [7, 20, 25, 27–30]. Между тем, исходя из выявленной нами низкой вероятности сцепления между отдельными мутациями, отмеченное следует рассматривать как случайное событие. Это означает, что, скорее всего, мутации не сцеплены друг с другом, т.е. они образуются независимо друг от друга, в различных участках гена, а их локализация ничем не детерминируется.

Постоянный приём азоловых препаратов в клинике ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингеальным кандидозом оказывает мощное давление на популяцию *C. albicans* — в ней накапливаются резистентные штаммы, в том числе с повышенной экспрессией гена *ERG11*. С функциональной точки зрения данный механизм лишь обеспечивает повы-

Таблица 4. Взаимосвязь мутаций в гене *ERG11* с чувствительностью *C. albicans* к антимикотическим препаратам
Table 4. Relationship of mutations in the *ERG11* gene with the sensitivity of *C. albicans* to antimycotic drugs

Мутация Mutation	n	Анидулафунгин Anidulafungin	Микафунгин Micafungin	Каспифунгин Caspofungin	Позаконазол Posaconazole	Вориконазол Voriconazole	Итраконазол Itraconazole	Флуконазол Fluconazole	Амфотерицин В Amphotericin B	5-Флуцитозин 5-Flucytosine
Все The sum	+ 12	0,03 ± 0,003	0,012 ± 0,001	0,08 ± 0,009	0,043 ± 0,019	1,083 ± 0,393	0,082 ± 0,038	33,333 ± 10,130	0,708 ± 0,074	0,065 ± 0,005
<i>E266D</i>	- 28	0,041 ± 0,003	0,013 ± 0,001	0,086 ± 0,006	3,471 ± 1,117	4,036 ± 1,067	6,941 ± 2,234	98,857 ± 20,285	0,768 ± 0,048	0,066 ± 0,004
<i>G464S</i>	+ 4	0,026 ± 0,004	0,012 ± 0,002	0,075 ± 0,015	0,023 ± 0,004	1,375 ± 0,875	0,038 ± 0,008	28,00 ± 12,000	0,75 ± 0,144	0,06 ± 0,000
<i>D116E</i>	- 6	0,045 ± 0,007	0,013 ± 0,001	0,09 ± 0,013	4,057 ± 2,716	4,333 ± 2,635	8,113 ± 5,432	113,333 ± 48,637	0,75 ± 0,112	0,07 ± 0,010
<i>V488I</i>	+ 2	0,045 ± 0,015	0,012 ± 0,004	0,12 ± 0,000	0,133 ± 0,118	2,25 ± 1,750	0,265 ± 0,235	96,00 ± 32,000	1,00 ± 0,000	0,06 ± 0,000
	- 8	0,036 ± 0,006	0,012 ± 0,001	0,075 ± 0,010	3,021 ± 2,100	3,375 ± 2,028	6,038 ± 4,201	75,00 ± 39,509	0,688 ± 0,091	0,068 ± 0,007
	+ 3	0,025 ± 0,005	0,01 ± 0,002	0,06 ± 0,000	0,03 ± 0,000	0,50 ± 0,000	0,05 ± 0,010	16,00 ± 0,000	0,667 ± 0,167	0,06 ± 0,000
	- 7	0,043 ± 0,006	0,013 ± 0,001	0,094 ± 0,012	3,477 ± 2,368	4,286 ± 2,228	6,954 ± 4,735	106,286 ± 41,705	0,786 ± 0,101	0,069 ± 0,009
	+ 3	0,03 ± 0,000	0,013 ± 0,002	0,08 ± 0,020	0,025 ± 0,005	0,50 ± 0,000	0,05 ± 0,010	16,00 ± 0,000	0,50 ± 0,000	0,08 ± 0,020
	- 7	0,041 ± 0,007	0,012 ± 0,001	0,086 ± 0,012	3,479 ± 2,367	4,286 ± 2,228	6,954 ± 4,735	106,286 ± 41,705	0,857 ± 0,092	0,06 ± 0,000

Примечание. «+» — мутация присутствует, «-» — мутация отсутствует.
Note. "+", "—" — mutation is present, "—" — mutation is absent.

шение темпа синтеза мишени азолов. В то же время несинонимичные мутации в гене *ERG11* ведут к модификации молекулы-мишени и, как следствие, изменению сродства противогрибковых препаратов к ней [21]. Это в итоге нивелирует эффекты повышенной экспрессии данного гена. Такое явление было отмечено при исследовании штаммов с мутациями *D116E*, *G464S* и *E266D* [5–7, 9, 10, 17, 22, 24, 31–36], где была показана их ассоциация с многократным повышением МИК препаратов азолового ряда. Вместе с тем мутация *V488I*, а также в ряде исследований мутации *E266D* и *D116E* были нейтральными и не влияли на величину МИК [4–6, 9, 32, 37]. Считается, что в отсутствие гиперэкспрессии *ERG11* данный механизм может не задействоваться [20].

В отличие от цитированных выше работ других исследователей, все обнаруженные нами виды мутаций ассоциировались с повышением чувствительности к препаратам триазолового ряда по сравнению со штаммами без мутаций, хотя сами тестируемые штаммы *C. albicans* были резистентными. Лишь мутация *G464S* немного отставала в проявлении таких свойств. Можно предположить, что выявленные мутации в значительной степени затрагивали структуру сайта взаимодействия молекулы мишени с триазолами, что снижало их сродство. При этом нам не удалось обнаружить ассоциации МИК мутантных штаммов с особенностями химической структуры лекарственного препарата, хотя повышенная экспрессия гена *ERG11* более эффективна против короткоцепочечных азолов [3]. Выявленные нами мутации не влияли на чувствительность тестируемых штаммов к эхинокандинам, амфотерицину В и 5-флуцитозину.

В нашем исследовании отмечена более высокая чувствительность мутантных штаммов *C. albicans* на воздействие итраконазола и позаконазола по сравнению с эффектами вориконазола и флуконазола. Вероятно, отмеченное может быть связано с редким применением первых двух препаратов в клинике ВИЧ-инфицированных пациентов и направленным отбором штаммов по устойчивости к последним.

Таким образом, у большинства исследованных штаммов *C. albicans*, устойчивых к флуконазолу и вориконазолу, выявлен ряд мутаций в гене *ERG11*: *D116E*, *E266D*, *G464S*, *I471L* и *V488I*, которые, за исключением мутации *V488I*, не имеют сопряжения с повышенной экспрессией данного гена. Обнаруженные мутации снижали эффекты гиперэкспрессии гена *ERG11* до 100 раз, хотя полностью не отменяли исходной резистентности к триазоловым препаратам и не влияли на чувствительность к эхинокандинам, амфотерицину В и 5-флуцитозину.

Следует принять во внимание, что исследованные штаммы были выделены от ВИЧ-инфицированных пациентов, постоянно проживающих в Москве.

Поэтому полученные в работе результаты следует расценивать как особенность Московского региона. Вместе с тем отсутствие однозначного суждения об эффектах мутаций гена *ERG11* требует дальнейших исследований, в том числе клинических.

Выводы

1. В структуре гена *ERG11* штаммов *C. albicans*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов, жителей Москвы, выявлены мутации *D116E*, *E266D*, *G464S*, *I471L* и *V488I*.

2. За исключением *V488I* обнаруженные мутации не имеют сопряжения с повышенной экспрессией гена *ERG11*.

3. Штаммы *C. albicans* — носители мутаций — были до 100 раз более чувствительны к триазоловым препаратам. Наличие мутаций не влияло на чувствительность к эхинокандинам, полиену и пиримидину.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Enoch D.A., Yang H., Aliyu S.H., Micallef C. The changing epidemiology of invasive fungal infections. *Methods Mol. Biol.* 2017;1508:17–65. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6515-1_2
2. Pfaller M.A., Diekema D.J., Gibbs D.L., et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J. Clin. Microbiol.* 2010;48(4):1366–77. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.02117-09>
3. Biswas C., Chen S.C., Halliday C., et al. Identification of genetic markers of resistance to echinocandins, azoles and 5-fluorocytosine in *Candida glabrata* by next-generation sequencing: a feasibility study. *Clin. Microbiol. Infect.* 2017;23(9):676.e7–e.10. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.03.014>
4. Sanguinetti M., Posteraro B., Lass-Flörl C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses.* 2015;58(Suppl. 2):2–13. DOI: <https://doi.org/10.1111/myc.12330>
5. Godinho C. P., Sá-Correia I. Physiological Genomics of Multistress Resistance in the Yeast Cell Model and Factory: Focus on MDR/MXR Transporters Progress in Molecular and Subcellular Biology. Cham; 2019:1–35.
6. Castanheira M., Deshpande L.M., Messer S.A., et al. Analysis of global antifungal surveillance results reveals predominance of Erg11 Y132F alteration among azole-resistant *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* and country-specific isolate dissemination. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2020;55(1):105799. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.09.003>
7. Cernicka J., Subik J. Resistance mechanisms in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates from vaginal candidiasis. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2006;27(5):403–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.12.005>
8. Lim H.J., Shin J.H., Kim M.N., et al. Evaluation of two commercial broth microdilution methods using different interpretive criteria for the detection of molecular mechanisms of acquired azole and echinocandin resistance in four common *Candida* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2020;64(11):e00740-20. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.00740-20>
9. Lopes W., Vainstein M.H., Schrank A. Revealing colonial characteristics of *Candida tropicalis* by high-resolution scanning electron microscopy. *Clin. Microbiol. Infect.* 2019;25(2):188–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.06.032>
10. Pappas P.G., Kauffman C.A., Andes D.R., et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the infectious diseases society of America. *Clin. Infect. Dis.* 2016;62(4):e1–50. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/civ933>
11. Bertout S., Dunyach C., Drakulovski P., et al. Comparison of the Sensititre YeastOne® dilution method with the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3 microbroth dilution reference method for determining MIC of eight antifungal agents on 102 yeast strains. *Pathol. Biol. (Paris).* 2011;59(1):48–51. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2010.07.020>
12. Sanguinetti M., Posteraro B. Susceptibility testing of fungi to antifungal drugs. *J. Fungi. (Basel).* 2018;4(3):110. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof4030110>
13. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402–8. DOI: <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
14. Men A., Wilson P., Siemerling K., Forrest S. *Sanger DNA Sequencing.* Weinheim; 2008:1–11.
15. Virtanen P., Gommers R., Oliphant T.E., et al. SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nat. Methods.* 2020;17(3):261–72. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0686-2>
16. Hunter J.D. Matplotlib: A 2D graphics environment. *Comput. Sci. Eng.* 2007;9(3):90–5. DOI: <https://doi.org/10.1109/MCSE.2007.55>
17. Xu Y., Chen L., Li C. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* species to fluconazole and detection of *Candida albicans* *ERG11* mutations. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008;61(4):798–804. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkn015>
18. Chau A.S., Mendrick C.A., Sabatelli F.J., et al. Application of real-time quantitative PCR to molecular analysis of *Candida albicans* strains exhibiting reduced susceptibility to azoles. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004;48(6):2124–31. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.48.6.2124-2131.2004>
19. Favre B., Didmon M., Ryder N.S. Multiple amino acid substitutions in lanosterol 14 α -demethylase contribute to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology (Reading).* 1999;145(Pt. 10):2715–25. DOI: <https://doi.org/10.1099/00221287-145-10-2715>
20. Flowers S.A., Colón B., Whaley S.G., et al. Contribution of clinically derived mutations in ERG11 to azole resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015;59(1):450–60. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.03470-14>
21. Goldman G.H., da Silva Ferreira M.E., dos Reis Marques E., et al. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in candida albicans clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2004;50(1):25–32. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2004.04.009>
22. Kakeya H., Miyazaki Y., Miyazaki H., et al. Genetic analysis of azole resistance in the Darlington strain of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000;44(11):2985–90. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.44.11.2985-2990.2000>
23. 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):171–5. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08792.x>
24. Perea S., López-Ribot J.L., Kirkpatrick W.R., et al. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001;45(10):2676–84. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.45.10.2676-2684.2001>
25. Sanglard D., Ischer F., Koymans L., et al. Amino acid substitutions in the cytochrome p-450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical iso-

- lates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998;42(2):241–53.
DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.42.2.241>
26. Xiang M.J., Liu J.Y., Ni P.H., et al. Erg11 mutations associated with azole resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 2013;13(4):386–93.
DOI: <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12042>
27. Franz R., Kelly S.L., Lamb D.C., et al. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998;42(12):3065–72.
DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.42.12.3065>
28. Li X., Brown N., Chau A.S., et al. Changes in susceptibility to posaconazole in clinical isolates of *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2004;53(1):74–80.
DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkh027>
29. Marichal P., Koymans L., Willemsens S., et al. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14alpha-demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology (Reading)*. 1999;145(Pt. 10):2701–13.
DOI: <https://doi.org/10.1099/00221287-145-10-2701>
30. Kelly S.L., Lamb D.C., Loeffler J., et al. The G464S amino acid substitution in *Candida albicans* sterol 14alpha-demethylase causes fluconazole resistance in the clinic through reduced affinity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999;262(1):174–9.
DOI: <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1136>
31. Favre B., Ryder N.S., Didmon M. Multiple amino acid substitutions in lanosterol 14alpha-demethylase contribute to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology (Reading)*. 1999;145(Pt. 10):2715–25.
DOI: <https://doi.org/10.1099/00221287-145-10-2715>
32. Finkina E.I., Bogdanov I.V., Ignatova A.A., et al. Antifungal activity, structural stability, and immunomodulatory effects on human immune cells of defensin from the lentil *Lens culinaris*. *Membranes (Basel)*. 2022;12(9):855.
DOI: <https://doi.org/10.3390/membranes12090855>
33. Lee Y., Puumala E., Robbins N., Cowen L.E. Antifungal drug resistance: molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond. *Chem. Rev.* 2020;121(6):3390–411.
DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00199>
34. Whaley S.G., Berkow E.L., Rybak J.M., et al. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-albicans *Candida* species. *Front. Microbiol.* 2017;7:2173.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02173>
35. White P.L., Price J.S., Cordey A., Backx M. Molecular diagnosis of yeast infections. *Curr. Fungal Infection Rep.* 2021;15(3):67–80.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s12281-021-00421-x>
36. Ruhnke M., Eigler A., Tennagen I., et al. Emergence of fluconazole-resistant strains of *Candida albicans* in patients with recurrent oropharyngeal candidosis and human immunodeficiency virus infection. *J. Clin. Microbiol.* 1994;32(9):2092–8.
DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.32.9.2092-2098.1994>
37. Gabaldón T., Fairhead C. Genomes shed light on the secret life of *Candida glabrata*: not so asexual, not so commensal. *Curr. Genet.* 2019;65(1):93–8.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00294-018-0867-z>

Информация об авторах

Несвижский Юрий Владимирович — д.м.н., профессор, профессор каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия; г.н.с. МНИИЭИМ им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия, nesviz@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0386-3883>

Афанасьев Станислав Степанович — д.м.н., профессор, г.н.с. МНИИЭИМ им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6497-1795>

Воропаев Александр Дмитриевич — аспирант кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6431-811X>

Урбан Юлия Николаевна — к.б.н., с.н.с. лаб. клинической микробиологии и биотехнологии МНИИЭИМ им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0189-3608>

Сулейманова Марьям Эмильевна — ординатор, Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9255-6481>

Афанасьев Максим Станиславович — д.м.н., проф. каф. клинической аллергологии и иммунологии ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5860-4152>

Буданова Елена Вячеславовна — к.м.н., доцент, доцент каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1864-5635>

Воропаева Елена Александровна — д.м.н., г.н.с. МНИИЭИМ им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0463-0136>

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 23.05.2023;
принята к публикации 12.07.2023;
опубликована 28.08.2023

Information about the authors

Yuri V. Nesvizhsky — D. Sci. (Med.), Professor, Department of microbiology, virology and immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia; chief researcher, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, nesviz@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0386-3883>

Stanislav S. Afanasiev — D. Sci. (Med.), Professor, main researcher, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6497-1795>

Alexander D. Voropaev — postgraduate student, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6431-811X>

Yulia N. Urban — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of clinical microbiology and biotechnology, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0189-3608>

Mariam E. Suleimanova — resident, Petrovsky National Research Center of Surgery, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9255-6481>

Maxim S. Afanasiev — D. Sci. (Med.), Professor, Chair of clinical allergology and immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5860-4152>

Elena V. Budanova — Cand. Sci. (Med.), Associated professor, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1864-5635>

Elena A. Voropaeva — D. Sci. (Biol.), G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0463-0136>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 23.05.2023;
accepted for publication 12.07.2023;
published 28.08.2023