



Изучение резистентности патогенных и условно-патогенных грибов к противогрибковым препаратам

А. Д. Козлова¹, С. П. Яцентюк², В. В. Соколов³, М. Г. Маноян⁴

ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»), г. Москва, Россия

¹ <https://orcid.org/0000-0002-4793-2345>, e-mail: adkozlova@vgnki.ru

² <https://orcid.org/0000-0002-4819-2131>, e-mail: pcr-lab@vgnki.ru

³ <https://orcid.org/0000-0001-6309-9093>, e-mail: v.sokolov@vgnki.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0001-6347-413X>, e-mail: mycology@vgnki.ru

РЕЗЮМЕ

Широкое применение антимикотических средств для терапии микозов у человека и животных вызывает беспокойство медицинских и ветеринарных специалистов в связи с возникновением резистентности патогенных и условно-патогенных грибов к противогрибковым препаратам. За последние годы накоплена информация о различных молекулярных механизмах, лежащих в основе данного явления, однако для успешного прогнозирования резистентности в различных группах грибов необходимо провести углубленные исследования. Для терапии и профилактики грибковых заболеваний активно применяются несколько групп препаратов, среди которых наиболее часто используют азолы и аллиламины, что приводит к накоплению резистентности патогенных и условно-патогенных грибов к этим противогрибковым средствам. В работе представлены результаты использования молекулярно-генетических методов для выявления устойчивых к азолам изолятов *Candida albicans* и устойчивых к тербинафину изолятов грибов рода *Trichophyton*. Анализ нуклеотидных последовательностей гена *ERG11* 10 изолятов *Candida albicans*, выделенных от разных видов животных, позволил разделить фенотипически устойчивые и чувствительные штаммы, однако не дал возможности дифференцировать штаммы, обладающие дозозависимой устойчивостью к азолам. Изучение однонуклеотидных полиморфизмов в гене *SQL*, ассоциированном с развитием устойчивости к тербинафину, у 12 изолятов грибов рода *Trichophyton* не позволило разделить их по резистентности, что, вероятно, связано с действием другого механизма устойчивости, который может наблюдаться у данных штаммов. Полученные результаты исследований служат основанием для использования молекулярно-генетических методов для характеристики грибов рода *Candida* и *Trichophyton*, однако, с учетом биологических особенностей патогенов разных групп, для прогнозирования резистентности целесообразно использовать несколько значимых участков генома или результаты полногеномного секвенирования, а также анализ экспрессии генов.

Ключевые слова: антимикотическая устойчивость, *Candida*, *Trichophyton*, азолы, тербинафин, полимеразная цепная реакция, секвенирование

Благодарности: Работа выполнена при поддержке Россельхознадзора в рамках научно-исследовательской работы по теме «Оценка распространенности микозов животных и рисков возникновения резистентности к антимикотическим средствам». Авторы выражают благодарность сотрудникам отделения биотехнологии Л. Э. Саканяну и А. В. Путинцевой за техническую помощь при проведении исследований.

Для цитирования: Козлова А. Д., Яцентюк С. П., Соколов В. В., Маноян М. Г. Изучение резистентности патогенных и условно-патогенных грибов к противогрибковым препаратам. *Ветеринария сегодня*. 2022; 11 (1): 20–26. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-1-20-26.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Яцентюк Светлана Петровна, кандидат биологических наук, заведующий отделом генодиагностики инфекционных болезней животных отделения биотехнологии ФГБУ «ВГНКИ», 123022, Россия, г. Москва, Звенигородское шоссе, 5, e-mail: pcr-lab@vgnki.ru.

Study of resistance of pathogenic and opportunistic fungi to antimycotics

A. D. Kozlova¹, S. P. Yatsentyuk², V. V. Sokolov³, M. G. Manoyan⁴

FSBI "The Russian State Centre for Quality and Standardization of Veterinary Drugs and Feed" (FSBI "VGNKI"), Moscow, Russia

¹ <https://orcid.org/0000-0002-4793-2345>, e-mail: adkozlova@vgnki.ru

² <https://orcid.org/0000-0002-4819-2131>, e-mail: pcr-lab@vgnki.ru

³ <https://orcid.org/0000-0001-6309-9093>, e-mail: v.sokolov@vgnki.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0001-6347-413X>, e-mail: mycology@vgnki.ru

SUMMARY

The widespread use of antimycotic agents for the treatment of mycoses in humans and animals is of concern to medical and veterinary specialists due to the emergence of resistance of pathogenic and opportunistic fungi to antifungal agents. In recent years, information has been accumulated on the various molecular mechanisms underlying this phenomenon, but in-depth studies are needed to successfully predict resistance in various groups of fungi. To treat and prevent fungal

infections several groups of antimycotics are used, where azoles and allylamines are the most frequent ones, which leads to resistance development in pathogenic and opportunistic fungi. The article presents the results of molecular methods identification of azole-resistant *Candida albicans* isolates and terbinafine-resistant *Trichophyton* isolates. The analysis of gene *ERG11* nucleotide sequences of 10 *Candida albicans* isolates, recovered from different animal species, enabled the division of phenotypically resistant and susceptible strains, but could not differentiate between the strains, which have dose-dependent resistance to azoles. Study of single nucleotide polymorphisms in gene *SOLE*, associated with the resistance development to terbinafine in 12 fungal isolates of genus *Trichophyton*, did not allow grading them by their resistance, which is likely associated with another resistance mechanism, which can be observed in these strains. The results obtained can serve as a basis for the use of molecular methods to characterize fungi of *Candida* and *Trichophyton* genera, however, taking into account the biological features of pathogens from different groups it is reasonable to use several significant genome regions or the results of the whole genome sequencing, as well as the gene expression analysis for successful forecasting of potential resistance.

Keywords: antimycotic resistance, *Candida*, *Trichophyton*, azoles, terbinafine, polymerase chain reaction, sequencing

Acknowledgements: The work was supported by the Rosselkhoznadzor as part of the research activities on the topic "Assessment of the animal mycoses spread and the risks of resistance to antimycotics". The authors express their gratitude to the staff members of the Department of Biotechnology L. E. Sakanyan and A. V. Putintseva for the technical support.

For citation: Kozlova A. D., Yatsentyuk S. P., Sokolov V. V., Manoyan M. G. Study of resistance of pathogenic and opportunistic fungi to antimycotics. *Veterinary Science Today*. 2022; 11 (1): 20–26. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-1-20-26.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Svetlana P. Yatsentyuk, Candidate of Science (Biology), Head of the Department of Genodiagnostics of Infectious Animal Diseases, Department of Biotechnology, FSBI "VGNKI", 123022, Russia, Moscow, Zvenigorodskoye shosse, 5, e-mail: pcr-lab@vgnki.ru.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы отмечается беспрецедентный рост устойчивости паразитирующих грибов, вызывающих у людей тяжелые заболевания, к антимикотическим средствам. В группе риска прежде всего люди с ослабленным иммунитетом. Международные организации призвали увеличить интенсивность работ по исследованию и борьбе с резистентностью к противогрибковым препаратам, в том числе и в ветеринарной сфере. Распространение в популяции устойчивых штаммов является серьезной проблемой, поскольку некоторые социально значимые грибковые инфекции передаются от животных к человеку и наоборот.

Применение противогрибковых препаратов для терапии микозов у животных в Российской Федерации носит стихийный характер и не контролируется. Данный факт, безусловно, вносит свой вклад в развитие резистентности патогенных и условно-патогенных грибов к антимикотикам.

Предполагается, что широкое использование противогрибковых средств является фактором, способствующим развитию лекарственной устойчивости [1, 2]. В связи с этим резистентность грибов к антимикотическим препаратам становится серьезной проблемой мирового масштаба.

Существующие в настоящее время варианты противогрибковых препаратов представлены несколькими классами веществ, отличающимися как по химическому составу, так и по механизму действия (табл. 1).

Препараты воздействуют на плазматическую мембрану, клеточную стенку, нуклеиновые кислоты и процесс деления клеток гриба. Чаще всего в медицине и ветеринарии в настоящее время применяют препараты нескольких групп – это азолы (например, флуконазол, вориконазол и позаконазол) и аллиламины (например, тербинафин), используемые для терапии и профилактики микозов, вызванных грибами родов *Candida*, *Mi-*

crosporum и *Trichophyton*. К этим препаратам, как следствие, наиболее часто и развивается устойчивость [1, 3].

Устойчивость грибов рода *Candida* к азолам формируется в основном за счет следующих механизмов: изменения мишени, на которую действует лекарственное средство, снижения межклеточной концентрации целевого фермента, изменения пути биосинтеза стерола, сверхэкспрессии мишени противогрибкового лекарственного средства, усиленного оттока лекарственного препарата из клетки. Специфической мишенью азолов является цитохром P450-зависимый фермент ланостерин-14 α -деметилаза, кодируемый геном *ERG11* у дрожжеподобных грибов. Продукт этого гена катализирует окислительное удаление 14 α -метильной группы из ланостерола. Связывание азола с фрагментом трехвалентного железа в сайте связывания гема блокирует естественный субстрат фермента – ланостерин, нарушая биосинтетический путь [4]. Аминокислотные замены в мишени, на которую действует лекарственный препарат, являются распространенным механизмом устойчивости к азолам у *Candida*. Сообщалось о более чем 140 заменах у устойчивых штаммов, многие из которых обладают аддитивным действием [5]. Наиболее часто изменения у *C. albicans* происходят в двух позициях: R467K и G464S, рядом с сайтом связывания гема [5, 6].

Согласно литературным данным, среди азолустойчивых клинических изолятов *C. albicans* обычна сверхэкспрессия *ERG11* [7–9]. Это напрямую способствует резистентности, поскольку увеличение численности мишеней требует большего количества препарата для ингибирования [8], снижая восприимчивость. О сверхэкспрессии *ERG11* также сообщалось для резистентных к азолам изолятов других видов *Candida* – *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* и *C. krusei* [10–14]. Механизм данной сверхэкспрессии и ее вклад в устойчивость к азолам у этих видов остаются в значительной степени неизвестными.

Таблица 1

Классификация основных противогрибковых препаратов (по А. К. Sahoo et al.) [3]

Table 1
Classification of major antifungals (according to A. K. Sahoo et al.) [3]

Группа	Примеры	Механизм действия
Полиены	нистатин, леворин, натамицин, амфотерицин В	Фунгистатическое и фунгицидное действие, обусловленное связыванием препарата с эргостеролом мембраны гриба, приводящим к нарушению ее целостности
Азолы: Имидазолы Триазолы	кетоназол, клотримазол, миконазол, бифоназол, эконазол, изоконазол, оксиконазол итраконазол, флуконазол, вориконазол, позаконазол, равуконазол, прамиконазол, альбаконазол	Фунгистатическое (реже – фунгицидное) действие, связанное с ингибированием 14 α -деметилазы, катализирующей превращение ланостерола в эргостерол мембраны
Аллиламины	тербинафин, бутенафин, нафтифин	Фунгицидное действие, связанное с нарушением синтеза эргостерола. В отличие от азолов аллиламины блокируют более ранние стадии биосинтеза, ингибируя фермент скваленэпоксидазу
Эхинокандины	каспофунгин, анидулафунгин, микафунгин, аминокандин	Фунгистатическое и фунгицидное действие, связанное с нарушением синтеза 1,3- β -D-глюкана клеточной стенки
Пиримидины	флуцитозин	Фунгистатическое и фунгицидное действие, связанное с нарушением синтеза нуклеиновых кислот/белка
Производные сордарина	GR135402, GM237354	
Препараты разных групп		
	гризеофульвин	Фунгистатический эффект, вызванный ингибированием митотической активности клеток в метафазе и нарушением синтеза ДНК
	аморолфин	Фунгистатическое и фунгицидное действие, обусловленное нарушением структуры клеточной мембраны грибов
	никкомицин	Фунгистатическое и фунгицидное действие, обусловленное нарушением синтеза хитина

Наиболее распространенный механизм устойчивости грибов – это активация мембранных насосов оттока, которые распознают различные химические вещества и обеспечивают множественную лекарственную устойчивость. У грибов есть несколько разных систем оттока лекарств, которые кодируются по меньшей мере десятью различными генами. Мутации в каждом из них также могут влиять на степень устойчивости патогена к лекарственному препарату. Кроме того, с устойчивостью к азолам связаны множественные геномные изменения, включая потерю гетерозиготности определенных областей генома, увеличение числа копий хромосом, а также сегментарные или хромосомные анеуплоидии [15]. Потеря гетерозиготности является обычной для областей, содержащих гены, являющиеся детерминантами устойчивости к азолам, включая *ERG11*. Анализ изолятов *C. albicans*, у которых развивалась устойчивость, показал, что мутации в генах часто возникают в гетерозиготном состоянии, которые затем переходят в гомозиготное состояние [16]. Распространенность анеуплоидий в изолятах, устойчивых к азолам, сделала актуальным вопрос о том, можно ли воздействием азолов объяснить отбор более устойчивых анеуплоидных вариантов или же это воздействие способствует образованию анеуплоидий. Было обнаружено, что воздействие азолов вызывает aberrантную регуляцию клеточного цикла у *C. albicans* с тетраплоидным промежуточным соединением, предшествующим образованию анеуплоидии [17].

Надо сказать, что в настоящее время при изучении механизмов устойчивости к азолам наиболее широко

используется анализ уровня экспрессии генов. Методика заключается в сравнении уровня экспрессии определенных генов у азолчувствительных и азолустойчивых штаммов. Однако для проведения этого анализа необходимо иметь свежие культуры *C. albicans*, выращенные на питательной среде в одинаковых условиях.

Таким образом, развитие устойчивости к азолам является сложным процессом, затрагивающим разные биохимические процессы и комбинации генов.

Другой группой препаратов, устойчивость к которым развивается наиболее часто, являются аллиламины. Среди ее представителей наиболее активно используется тербинафин, применяемый во всем мире для лечения многих заболеваний, вызываемых разными видами грибов-дерматофитов. Мишенью тербинафина является фермент скваленэпоксидаза (SQLE), который участвует в биосинтезе эргостерина, катализируя эпоксилирование сквалена до 2,3-оксидосквалена. Тербинафин подавляет активность скваленэпоксидазы, что приводит к истощению эргостерола и накоплению сквалена [18]. Мутации в гене SQLE, которые вызывают аминокислотные замены, приводят к структурным изменениям и снижению связывания тербинафина с белком, не провоцируя дисфункции в биосинтезе эргостерола [19].

Механизм устойчивости к данному аллиламину среди видов *Trichophyton* приписывают однонуклеотидным полиморфизмам (SNP) в гене SQLE. Точечные мутации в гене SQLE приводят к замене аминокислот в одном из четырех положений (Leu³⁹³, Phe³⁹⁷, Phe⁴¹⁵,

His⁴⁴⁰), что соответствует повышенным значениям минимальной ингибирующей концентрации (МИК) для тербинафина *in vitro* [20]. Напротив, новые миссен-мутации, приводящие к заменам H440Y/F484Y и I121M/V237I в гене *SQL*E, были зарегистрированы в изолятах с низким уровнем устойчивости [21].

Yamada T. et al. в своем исследовании оценили 2056 изолятов *T. rubrum* и *T. interdigitale* на предмет их чувствительности к тербинафину. Авторы установили, что только 17 из них (менее 1%) были устойчивы к данному противогрибковому средству. Анализируя последовательность гена *SQL*E, они обнаружили точечные мутации в четырех положениях, ответственных за устойчивый фенотип. Помимо L393F и F397L, было идентифицировано семь новых мутаций, включая одну в остатке L393 и две в остатке F397. Эти мутации исследовали путем экспрессии соответствующих аминокислотных замен с использованием *T. mentagrophytes* как организма-реципиента. Штаммы, несущие мутировавшие гены, были менее восприимчивы к тербинафину. При этом глобальный анализ экспрессии генов не выявил других значимых различий между мутировавшими и контрольными штаммами, это указывает на то, что повышенная устойчивость к тербинафину была вызвана мутациями [20].

Целью работы было оценить возможность выявления устойчивых к азолам штаммов *C. albicans* и резистентных к тербинафину штаммов *Trichophyton* spp. молекулярно-генетическими методами без оценки уровня экспрессии определенных генов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы 10 изолятов *C. albicans*, выделенных от крупного рогатого скота (КРС) и собак, изоляты *T. interdigitale*, *T. rubrum*, выделенные из ногтей пластин людей с признаками онихомикозов, *T. verrucosum* – из шерсти КРС и *T. mentagrophytes* – из шерсти собак с признаками дерматомикоза.

Чувствительность (МИК) *C. albicans* к флуконазолу (FLU), итраконазолу (ITR) и вориконазолу (VRC) определяли в соответствии с EUCAST E.Def 7.3.2 [22]. Интерпретацию МИК осуществляли в соответствии с Breakpoint tables for interpretation of MICs for antifungal agents, version 10.0, 2020 (FLU: МИК более 4,0 мг/л – устойчивый, от 2,0 до 4,0 мг/л – дозозависимый, менее 2,0 мг/л – чувствительный; ITR: МИК более 0,06 мг/л – устойчивый, менее 0,06 мг/л – чувствительный; VRC: МИК более 0,25 мг/л – устойчивый, от 0,06 до 0,25 мг/л – дозозависимый, менее 0,06 мг/л – чувствительный) [23].

Оценка изолята как устойчивого или чувствительного к азолам проводилась по следующей схеме: изолят, устойчивый к трем препаратам, считали устойчивым; изолят, устойчивый или показавший промежуточную устойчивость к одному или двум препаратам, считали дозозависимым; изолят, чувствительный ко всем препаратам, считали чувствительным к азолам.

Данные об изолятах *C. albicans*, их чувствительности к азоловым препаратам, интерпретация чувствительности приведены в таблице 2.

Чувствительность *Trichophyton* к тербинафину (ТБФ) определяли по методике, разработанной в отделе микологии ФГБУ «ВГНКИ» на основе EUCAST E.Def 9.3.1 [24]. Интерпретация чувствительности осуществлялась на основании диапазонов МИК для тербинафина (мг/л):

более 32 мг/л – устойчивый, от 16 до 32 мг/л – дозозависимый, менее 16 мг/л – чувствительный.

Данные об изолятах *T. verrucosum*, *T. mentagrophytes*, *T. interdigitale* и *T. rubrum*, их чувствительности к противогрибковым препаратам и интерпретация чувствительности приведены в таблице 3.

Экстракцию ДНК проводили с помощью коммерческого набора «ДНК-сорб-С-М», амплификацию – с использованием реагентов производства АмплиСенс® (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) на приборе «Терцик» (ООО «ДНК-Технология», Россия).

Для амплификации ДНК *C. albicans* использовали праймеры, описанные ранее М.-К. Lee et al. [25]. Для выявления устойчивости *Trichophyton* к тербинафину использовали праймеры для амплификации информативного участка гена *SQL*E, выбранные в данной работе: Tr-terb-F 5'-CTTAGTCCAGAGGCCGTACC-3' и Tr-terb-R 5'-AGGATGACCTGCAGGCAGT-3'. Условия полимеразной цепной реакции для изолятов *Trichophyton*: один цикл при 95 °С в течение 5 мин, затем 42 цикла при 95 °С в течение 10 сек., 60 °С в течение 10 сек., 72 °С в течение 10 сек., затем один цикл при 72 °С в течение 1 мин.

Секвенирование фрагментов амплификации по Сенгеру выполняли методом cycle sequence с набором ABI PRISM Big Dye v.1.1 (Applied Biosystems, США) согласно инструкции изготовителя с использованием капиллярного автоматического секвенатора ABI-3100 PRISM Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Анализ полученных хроматограмм проводили с помощью программного обеспечения Chromas. Нуклеотидные последовательности анализировали с помощью программы Vector NTI Advance 11.5.0.

Полученные нуклеотидные последовательности фрагментов генома *C. albicans* сравнивали с последовательностью X13296 из базы данных GenBank, которая в статье М.-К. Lee et al. [25] была признана стандартной для изолята, чувствительного к флуконазолу.

Таблица 2
Информация об изолятах *Candida albicans*, использованных в работе
Table 2
Data on *Candida albicans* isolates, used in the work

Изолят	Источник	Минимальная ингибирующая концентрация, мг/л			Интерпретация
		FLU	ITR	VRC	
<i>C. albicans</i> № 1	КРС, вымя	4,0	0,125	0,5	устойчивый
<i>C. albicans</i> № 2	КРС, вымя	4,0	0,125	0,5	устойчивый
<i>C. albicans</i> № 3	КРС, вымя	8,0	0,25	0,5	устойчивый
<i>C. albicans</i> № 4	КРС, молоко	8,0	0,125	0,5	устойчивый
<i>C. albicans</i> № 5	стоматит, собака	4,0	0,125	0,5	устойчивый
<i>C. albicans</i> № 6	стоматит, собака	1,0	0,03	0,03	чувствительный
<i>C. albicans</i> № 7	КРС, молоко	2,0	0,06	0,25	дозозависимый
<i>C. albicans</i> № 8	КРС, вымя	2,0	0,06	0,25	дозозависимый
<i>C. albicans</i> № 9	КРС, вымя	1,0	0,03	0,03	чувствительный
<i>C. albicans</i> № 10	КРС, молоко	2,0	0,06	0,125	дозозависимый

Полученные нуклеотидные последовательности фрагмента генома *Trichophyton* анализировали на наличие точечных мутаций, ответственных за аминокислотные замены Leu393Phe, Leu393Ser (нуклеотидная позиция в гене SQLE 1177), Phe397Leu, Phe397Ile, Phe397Val (нуклеотидная позиция в гене SQLE 1189), Phe415Ile, Phe415Ser, Phe415Val (нуклеотидная позиция в гене SQLE 1305), His440Tyr (нуклеотидная позиция в гене SQLE 1380) [20].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ устойчивости *C. albicans* к азолам. Нуклеотидные последовательности гена *ERG11* были получены для всех 10 изолятов *C. albicans*. Оценку устойчивости *C. albicans* к препаратам азолового ряда проводили на основе анализа как нуклеотидных, так и аминокислотных последовательностей гена *ERG11*.

Полученные результаты сравнения нуклеотидных последовательностей изолятов с референтной последовательностью представлены в таблице 4.

Замены только в 10 из 30 анализируемых нуклеотидных позиций в гене *ERG11* приводят к изменениям в аминокислотной последовательности. Среди изученных изолятов *C. albicans* у чувствительных к азолам изолятов № 6 и 9 не наблюдали аминокислотных замен в данном участке гена, у четырех из пяти замены в последовательности аминокислот наблюдались в 2 из 10 позиций. Наиболее информативными были позиции **D116E** и **E266D**.

Как видно из таблицы 4, полученные данные в целом соответствуют заявленной фенотипической

устойчивости штаммов. Интересно, что даже единичная аминокислотная замена в гене *ERG11*, выявленная у изолята № 1, оказалась ассоциирована с развитием устойчивости к препаратам азолового ряда. Однако в исследовании не смогли дифференцировать полностью устойчивые штаммы и штаммы, обладающие дозозависимой устойчивостью к азолам. В изолятах с дозозависимой устойчивостью также были выявлены 2 замены: одна в позиции **E266D**, другая, у изолятов № 8 и 10 в гетерозиготном состоянии, в позиции **Q474K**.

Marichal P. et al. в своей работе [26] идентифицировали три «горячие точки» в аминокислотной последовательности гена *ERG11* на основе компиляции мутаций *ERG11*, которые, как сообщается, связаны с устойчивостью к азолам. Эти точки включают аминокислотные области 105–165, 266–287 и 405–488. Найденные нами нуклеотидные замены попадают в данные «горячие точки», что может служить подтверждением достоверности полученных результатов.

Анализ устойчивости *Trichophyton spp.* к тербинафину. В данной работе были выбраны праймеры для амплификации и последующего секвенирования фрагмента гена SQLE длиной 440 п. н., включающего все позиции однонуклеотидных замен, приводящих к развитию устойчивости к тербинафину. Были проанализированы 12 изолятов *Trichophyton* как устойчивых, так и чувствительных к тербинафину, по данным микологических исследований.

В результате анализа полученных хроматограмм и построения множественного выравнивания с помощью программного обеспечения Vector NTI Advance 11.5.0 все изоляты были идентифицированы как тербинафинчувствительные. В двух изолятах из 12 обнаружена точечная мутация в позиции 1177 (замена ТТА на СТА), однако она не является значимой и не ведет к замене аминокислоты.

Расхождение данных по устойчивости к тербинафину, полученных молекулярно-генетическими и культуральными методами, можно объяснить дополнительными механизмами устойчивости, которые могут наблюдаться у штаммов. Эта гипотеза подтверждается многочисленными исследованиями устойчивости грибов к антимикотическим средствам. Например, резистентность к азолам клинических изолятов *C. albicans* связывают с несколькими механизмами, включая миссенс-мутации в *ERG11* и сверхэкспрессию генов, кодирующих белки-переносчики нескольких лекарственных препаратов. Комбинированные эффекты таких механизмов наблюдались в одном и том же клиническом изоляте, устойчивом к азолам [27]. Возможно, что сверхэкспрессия генов, кодирующих эффлюксные насосы, также участвует в толерантности к тербинафину у исследованных нами изолятов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Широкое применение соединений азолового и аллиламинового ряда при терапии и профилактике микозов способствует появлению штаммов и изолятов, устойчивых к этим противогрибковым препаратам. Определение устойчивости традиционно проводят культуральными методами, однако для отдельных видов грибов, имеющих значение в ветеринарии, отсутствуют стандарты и контрольные точки, по которым изоляты классифицируются как чувствительные или устойчивые, что затрудняет интерпретацию кли-

Таблица 3
Информация об изолятах дерматофитов, использованных в работе

Table 3
Data on dermatophyte isolates, used in the work

№ п/п	Изолят	Источник	Минимальная ингибирующая концентрация ТВФ, мг/л	Интерпретация
1	<i>T. verrucosum</i> № 1	шерсть КРС	16	дозозависимый
2	<i>T. verrucosum</i> № 2	шерсть КРС	16	дозозависимый
3	<i>T. verrucosum</i> № 3	шерсть КРС	16	дозозависимый
4	<i>T. verrucosum</i> № 4	шерсть КРС	16	дозозависимый
5	<i>T. mentagrophytes</i> № 1	шерсть собаки	64	устойчивый
6	<i>T. mentagrophytes</i> № 2	шерсть собаки	32	дозозависимый
7	<i>T. mentagrophytes</i> № 3	шерсть собаки	32	дозозависимый
8	<i>T. interdigitale</i> № 1	ногти человека	64	устойчивый
9	<i>T. interdigitale</i> № 2	ногти человека	64	устойчивый
10	<i>T. interdigitale</i> № 3	ногти человека	64	устойчивый
11	<i>T. interdigitale</i> № 4	ногти человека	8	чувствительный
12	<i>T. interdigitale</i> № 5	ногти человека	16	дозозависимый
13	<i>T. rubrum</i> № 1	ногти человека	64	устойчивый
14	<i>T. rubrum</i> № 2	ногти человека	64	устойчивый
15	<i>T. rubrum</i> № 3	ногти человека	64	устойчивый

Таблица 4
Аминокислотные и нуклеотидные замены в гене *ERG11* у штаммов *C. albicans*

Table 4
Amino acid and nucleotide substitutions in *ERG11* gene of *C. albicans* strains

Аминокислотная замена	Референтный нуклеотид в X13296	Изоляты <i>C. albicans</i>									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		R	R	R	R	R	S	M	M	S	M
F105F	T	C	C	C	C	C	.	C	C	.	C
D116E	T	.	A	A	A	A	.	A	.	.	.
K119K	A	.	G	G	G	G	.	G	.	.	.
K128T	A	.	.	C	.	C	.	C	.	.	.
S137S	C
K143R	A
H183H	T	C	C	C	C	C
L220L	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
E266D	A	C	C	.	C	.	.	.	C	.	C
L320L	G
V332V	T	N	C	.	C	C	C
L340L	A	.	G	.	.	G	.	G	.	.	.
K342K	A	G	G	.	G
S361S	A	G	.	.	G	.
L370L	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
F380F	T
Y401Y	T
V404I	G
P419P	T
D428D	T
V437I	G
G448G	G
F449V	T
V452V	T
V456V	T
R467K	G
Q474K	C	.	.	A	.	A	.	.	A/C	.	A/C
L480L	A	.	G	G	G	G	G/A	G	G/A	G	G/A
N490N	T	.	C	C	C	C	C/T	C	C/T	C	C/T
V509M	G

Жирным шрифтом выделены позиции, приводящие к аминокислотным заменам.

R – устойчивый к азолам; S – чувствительный к азолам; M – с дозозависимой устойчивостью.

Positions, leading to amino acid substitutions, are given in bold.

R – azole-resistant; S – azole-susceptible; M – with dose-dependent resistance.

нического воздействия минимальной ингибирующей концентрации. Актуальной задачей является поиск надежных методов выявления резистентности на основе генетического анализа. В представленной работе описаны способы выявления устойчивости *C. albicans* к азолам и дерматофитов *Trichophyton* к тербинафину с помощью анализа определенных генов. Надо отметить, что полученные на данный момент результаты свидетельствуют об ограниченной информативности ана-

лиза нуклеотидных последовательностей гена *ERG11* *C. albicans* и гена *SQL* грибов рода *Trichophyton* для прогнозирования устойчивости к антигрибковым препаратам (азолам и тербинафину соответственно). Полученную информацию о структуре данных генов можно использовать для паспортизации штаммов, однако для повышения достоверности молекулярно-генетических исследований резистентности необходимо использование в исследовании большего числа изолятов грибов,

охарактеризованных фенотипически, и включение в анализ нескольких генов, ассоциированных с антимикотической устойчивостью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Cowen L. E. The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. *Nat. Rev. Microbiol.* 2008; 6 (3): 187–198. DOI: 10.1038/nrmicro1835.
- Antonovics J., Abbate J. L., Baker C. H., Daley D., Hood M. E., Jenkins C. E., et al. Evolution by any other name: antibiotic resistance and avoidance of the E-word. *PLoS Biol.* 2007; 5 (2):e30. DOI: 10.1371/journal.pbio.0050030.
- Sahoo A. K., Mahajan R. Management of tinea corporis, tinea cruris, and tinea pedis: A comprehensive review. *Indian Dermatol. Online J.* 2016; 7 (2): 77–86. DOI: 10.4103/2229-5178.178099.
- Odds F. C., Brown A. J., Gow N. A. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* 2003; 11 (6): 272–279. DOI: 10.1016/s0966-842x(03)00117-3.
- Morio F., Loge C., Besse B., Hennequin C., Pape L. P. Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2010; 66 (4): 373–384. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.11.006.
- Casalnuovo I. A., Di Francesco P., Garaci E. Fluconazole resistance in *Candida albicans*: A review of mechanisms. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2004; 8 (2): 69–77. PMID: 15267120.
- White T. C. Increased mRNA levels of *ERG16*, *CDR1*, and *MDR1* correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997; 41 (7): 1482–1487. DOI: 10.1128/AAC.41.7.1482.
- Franz R., Kelly S. L., Lamb D. C., Kelly D. E., Ruhnke M., Morschhauser J. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998; 42 (12): 3065–3072. DOI: 10.1128/AAC.42.12.3065.
- Perea S., Lopez-Ribot J. L., Kirkpatrick W. R., McAttee R. K., Santillan R. A., Martinez M., 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): 2676–2684. DOI: 10.1128/AAC.45.10.2676-2684.2001.
- Barchiesi F., Calabrese D., Sanglard D., Falconi Di Francesco L., Caselli F., Giannini D., Giacometti A., et al. Experimental induction of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; 44 (6): 1578–1584. DOI: 10.1128/AAC.44.6.1578-1584.2000.
- Redding S. W., Kirkpatrick W. R., Coco B. J., Sadowski L., Fothergill A. W., Rinaldi M. G., et al. *Candida glabrata* oropharyngeal candidiasis in patients receiving radiation treatment for head and neck cancer. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40 (5): 1879–1881. DOI: 10.1128/JCM.40.5.1879-1881.2002.
- Vandeputte P., Larcher G., Berges T., Renier G., Chabasse D., Bouchara J. P. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49 (11): 4608–4615. DOI: 10.1128/AAC.49.11.4608-4615.2005.
- Rogers P. D., Vermitsky J. P., Edlind T. D., Hilliard G. M. Proteomic analysis of experimentally induced azole resistance in *Candida glabrata*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006; 58 (2): 434–438. DOI: 10.1093/jac/dkl221.
- Jiang C., Dong D., Yu B., Cai G., Wang X., Ji Y., Peng Y. Mechanisms of azole resistance in 52 clinical isolates of *Candida tropicalis* in China. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013; 68 (4): 778–785. DOI: 10.1093/jac/dks481.
- 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. DOI: 10.1101/cshperspect.a019752.
- Selmecki A., Forche A., Berman J. Genomic plasticity of the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell.* 2010; 9 (7): 991–1008. DOI: 10.1128/EC.00060-10.
- Harrison B. D., Hashemi J., Bibi M., Pulver R., Bavli D., Nahmias Y., et al. A tetraploid intermediate precedes aneuploid formation in yeasts exposed to fluconazole. *PLoS Biol.* 2014; 12 (3):e1001815. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001815.
- Favre B., Ryder N. S. Characterization of squalene epoxidase activity from the dermatophyte *Trichophyton rubrum* and its inhibition by terbinafine and other antimycotic agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996; 40 (2): 443–447. DOI: 10.1128/AAC.40.2.443.
- Martinez-Rossi N. M., Bitencourt T. A., Peres N. T. A., Lang E. A. S., Gomes E. V., Quaresimin N. R., et al. Dermatophyte resistance to antifungal drugs: Mechanisms and prospectus. *Front. Microbiol.* 2018; 9:1108. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01108.
- Yamada T., Maeda M., Alshahni M. M., Tanaka R., Yaguchi T., Bon-tems O., et al. Terbinafine resistance of *Trichophyton* clinical isolates caused by specific point mutations in the squalene epoxidase gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017; 61 (7):e00115-17. DOI: 10.1128/AAC.00115-17.
- Saunte D. M. L., Hare R. K., Jørgensen K. M., Jørgensen R., Deleuran M., Zachariae C. O., et al. Emerging terbinafine resistance in *Trichophyton*: Clinical characteristics, squalene epoxidase gene mutations, and a reliable EUCAST method for detection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2019; 63 (10):e01126-19. DOI: 10.1128/AAC.01126-19.
- Arendrup M. C., Meletiadis J., Mouton R. W., Lagrou K., Hamal P., et al. EUCAST Definitive Document E.Def 7.3.2: Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. 2020. Available at: <http://www.eucast.org>.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs for antifungal agents, version 10.0. 2020. Available at: <http://www.eucast.org/astoffungi/clinical-breakpointsforantifungals>.
- Manoyan M., Sokolov V., Gursheva A., Gabuzyan N., Panin A. P034. Sensitivity of isolated dermatophyte strains to antifungal drugs in the Russian Federation. In: 9th Trends in Medical Mycology Held on 11–14 October 2019, Nice, France, Organized under the Auspices of EORTC-IDG and ECMM. *J. Fungi.* 2019; 5 (4):95. DOI: 10.3390/jof5040095.
- Lee M.-K., Williams L. E., Warnock D. W., Arthington-Skaggs B. A. Drug resistance genes and trailing growth in *Candida albicans* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 2004; 53 (2): 217–224. DOI: 10.1093/jac/dkh040.
- Marichal P., Koymans L., Willemsens S., Bellens D., Verhaselt P., Luyten W., et al. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 α -demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology (Reading)*. 1999; 145 (Pt 10): 2701–2713. DOI: 10.1099/00221287-145-10-2701.
- MacCallum D. M., Coste A., Ischer F., Jacobsen M. D., Odds F. C., Sanglard D. Genetic dissection of azole resistance mechanisms in *Candida albicans* and their validation in a mouse model of disseminated infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54 (4): 1476–1483. DOI: 10.1128/AAC.01645-09.

Поступила в редакцию / Received 14.09.2021

Доработана после рецензирования / Revised 20.10.2021

Принята к публикации / Accepted 11.11.2021

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Козлова Александра Дмитриевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела генодиагностики инфекционных болезней животных отделения биотехнологии ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва, Россия.

Яцентюк Светлана Петровна, кандидат биологических наук, заведующий отделом генодиагностики инфекционных болезней животных отделения биотехнологии ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва, Россия.

Соколов Владимир Владимирович, аспирант, научный сотрудник отдела микологии ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва, Россия.

Маноян Марина Геворковна, кандидат ветеринарных наук, заведующий отделом микологии ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва, Россия.

Aleksandra D. Kozlova, Candidate of Science (Biology), Leading Researcher, Department for Genodiagnosics of Infectious Animal Diseases of VGNKI Department of Biotechnology, FSBI “VGNKI”, Moscow, Russia.

Svetlana P. Yatsentyuk, Candidate of Science (Biology), Head of the Department for Genodiagnosics of Infectious Animal Diseases of VGNKI, Department of Biotechnology, FSBI “VGNKI”, Moscow, Russia.

Vladimir V. Sokolov, Post-Graduate Student, Research, Department of Mycology, FSBI “VGNKI”, Moscow, Russia.

Marina G. Manoyan, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), Head of the Department of Mycology, FSBI “VGNKI”, Moscow, Russia.