На правах рукописи

МАРКИН АЛЕКСАНДР МИХАЙЛОВИЧ

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО ОПАСНЫХ МИКОЗОВ НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

ВОЛГОГРАД – 2016

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора.

Научный руководитель:
Антонов Валерий Алексеевич — доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:
Водопьянов Сергей Олегович — доктор медицинских наук, с.н.с., заведующий лабораторией биохимии микробов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Попов Юрий Алексеевич — доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом образовательных программ и подготовки специалистов ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Ведущая организация: ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора

Защита состоится «_____» _____ 2016 года в «_____» часов на заседании диссертационного совета Д 208.008.06 при ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 400131, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1. E-mail: post@volgmed.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» по адресу: 400131, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1 и с авторефератом на сайтах: www.volgmed.ru, www.vak2.ed.gov.ru.

Автореферат разослан «_____» _____ 2016 г.

Ученый секретарь
Диссертационного Совета
доктор социологических наук,
кандидат медицинских наук,
профессор Ковалева Марина Дмитриевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Микроскопические грибы II группы патогенности являются возбудителями особо опасных инфекций: кокцидиоидомикоза, гистоплазмоза, бластомикоза, паракокцидиоидомикоза. Естественные ареалы для рода *Coccidioides* (*Coccidioides immitis* и *Coccidioides posadasii*) ограничены Северной, Центральной и Южной Америкой; для *Histoplasma spp.* (*Histoplasma capsulatum var. capsulatum, Histoplasma capsulatum var. duboisii, Histoplasma capsulatum var. farciminosum*) Северной Америкой, странами Африки и Юго-Восточной Азии; микромицеты рода *Blastomyces* (*Blastomyces dermatitidis* и *Blastomyces gilchristii*) распространены в Северной Америке и Африке. Ежегодно во многих странах мира регистрируют десятки случаев инфицирования микозами у иммигрантов и туристов, посещающих эндемичные регионы. Не исключено, что отсутствие официальных данных о регистрации на территории нашей страны подобных заболеваний связано со сложностью этиологической расшифровки этих экзотических для России инфекций. В то же время на фоне активизации международной интеграции, туризма и миграции населения возрастает риск завоза этих микозов в Россию, что требует качественной и своевременной лабораторной диагностики указанных заболеваний (Малеев В. В., 2013). В связи с этим, актуальным является создание новых диагностических наборов и тест-систем для идентификации возбудителей глубоких особо опасных микозов.

Необходимость совершенствования системы ранней диагностики глубоких микозов связана с длительностью и трудоемкостью микологического метода. Микроскопическое исследование клинического материала позволяет лишь предположить природу заболевания, но не определить вид возбудителя, а иммунологическая диагностика обладает относительно низкой чувствительностью и недостаточной специфичностью в связи с перекрёстными реакциями антигенов различных видов грибов.

В настоящее время все большее применение в области лабораторной диагностики особо опасных микозов находят молекулярно-генетические методы, основанные на анализе генома микроорганизма **(**Springer J., Einsele H., Loeffler J., 2012). Наиболее часто в качестве мишени для ПЦР используют мультикопийные гены – *18S рРНК, ITS* регион или участок гена *28S рРНК* (Khot P.D., Ko D.L., Fredricks D.N., 2009). Однако рибосомальные гены консервативны, и праймеры, нацеленные на обнаружение этих последовательностей, могут амплифицировать ДНК и многих других разновидностей грибов. Подобное ограничение исчезает при использовании видоспецифических мишеней, а также конструирования праймеров для секвенирования, позволяющих идентифицировать большие группы микромицетов.

В соответствии с приказом Роспотребнадзора №88 от 17.03.2008 «О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней» (http://vnipchi.rospotrebnadzor.ru) на базе ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора функционирует Референс-центр по мониторингу за возбудителями глубоких микозов. В его задачи входит изучение биологических, молекулярно-генетических характеристик, а также разработка и совершенствование диагностических препаратов для установления видовой принадлежности возбудителей микозов.

Таким образом, очевидна актуальность исследований, направленных на оптимизацию схемы лабораторной диагностики кокцидиоидомикоза, гистоплазмоза и бластомикоза, а также работы Референс-центра по мониторингу за возбудителями глубоких микозов. Комплексное использование различных методов идентификации, в том числе молекулярно-генетических, способно повысить достоверность анализа и сократить время постановки диагноза.

Цель и задачи исследования

Цель работы заключалась в разработке системы идентификации возбудителей особо опасных микозов, основанной на ПЦР в формате реального времени и секвенирования ДНК.

Задачи

1. Провести анализ нуклеотидных последовательностей, представленных в различных генетических базах данных, с целью подбора перспективных ДНК-мишеней для генной диагностики возбудителя бластомикоза в режиме реального времени.
2. Определить специфичность и чувствительность выбранных олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентных зондов для ПЦР в режиме реального времени на широком наборе гомологичных и гетерологичных штаммов микромицетов II-IV групп патогенности и провести конструирование амплификационной тест-системы для обнаружения ДНК возбудителя бластомикоза.
3. На основании существующих нуклеотидных последовательностей различных генетических баз данных подобрать олигонуклеотидные праймеры с целью секвенирования рибосомальных генов микромицетов II группы патогенности.
4. Оценить разрешающую способность монолокусного секвенирования рибосомальных генов при идентификации возбудителей кокцидиоидомикоза, гистоплазмоза и бластомикоза.

Научная новизна

Впервые разработаны праймеры для обнаружения ДНК возбудителя бластомикоза на основе гена α-1,3-глюкансинтазы и выявлена их эффективность при идентификации культур и обнаружении ДНК гриба в пробах, искусственно контаминированных *B.dermatitidis*, а также биологическом материале от экспериментально зараженных животных.

Показано, что сочетание реакции амплификации и последующего секвенирования фрагментов гена макрофагсвязывающего белка (*MBP-1*) *C.immitis* и *C.posadasii*, участков гена *CBP-1* (*calcium binding protein 1*) *H.capsulatum*, а также фрагментов гена *BYS-1* (*blastomyces yeast phase specific gene*) и гена α-1,3-глюкансинтазы *B.dermatitidis* повышает достоверность идентификации возбудителей кокцидиоидомикоза, гистоплазмоза и бластомикоза.

В работе впервые представлены данные об эффективности идентификации возбудителей особо опасных микозов при использовании секвенирования фрагментов гена *28S рРНК* и гена рибосомального белка *L23.* На основе полученных данных схема лабораторной диагностики особо опасных микозов дополнена этапом секвенирования при идентификации чистых культур микромицетов.

Практическая ценность

В основе работы лежат следующие НИР: 054-5-10 «Выявление возбудителей особо опасных микозов методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией результатов», 067-6.7-11 «Разработка тест-систем для молекулярно-генетической детекции возбудителей особо опасных микозов на основе ПЦР».

На сегодняшний день амплификация последовательностей видоспецифических генов возбудителей особо опасных микозов (*MBP-1 Coccidioides spp., CBP-1 Histoplasma spp., BYS-1* и гена α-1,3-глюкансинтазы *Blastomyces spp.*), а также секвенирование фрагмента гена *28S рРНК* и участка гена рибосомального белка L23 рекомендованы для использования в Референс-центре по мониторингу за возбудителями глубоких микозов и в лабораториях Волгоградского научно-исследовательского противочумного института для анализа генетических особенностей коллекционных штаммов микромицетов II группы патогенности.

Материалы исследования вошли в проекты методических указаний «Лабораторная диагностика особо опасных микозов» и «Методические указания по порядку проведения лабораторной диагностики особо опасных микозов в лабораториях территориального, регионального и федерального уровней», подготовленные для утверждения в Роспотребнадзоре.

Сконструированные тест-системы на основе ПЦР в режиме реального времени могут быть использованы специалистами в диагностических лабораториях учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, учреждений Министерства здравоохранения и других ведомств для выявления возбудителей особо опасных микозов.

Материалы проведенных исследований включены в лекционный материал, предназначенный для врачей и лаборантов учреждений санитарно-эпидемиологического профиля и клинических диагностических лабораторий, при реализации основных

образовательных программ послевузовского профессионального образования (аспирантура) и дополнительных профессиональных образовательных программ (профессиональная переподготовка и повышение квалификации специалистов) по лабораторной микологии.

Апробация работы

Основные положения диссертации были представлены и обсуждены на VI Всероссийском конгрессе по медицинской микологии (Москва 2014), на Всероссийской научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии (XVII Кашкинские чтения, Санкт-Петербург 2014), на расширенном заседании специалистов Федерального казенного учреждения здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в декабре 2015 года.

Публикации

По материалам исследования опубликовано 10 печатных работ, отражающих основное содержание работы, в том числе 4 – в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, издана 1 монография.

Личный вклад автора

Автором проведён анализ отечественной и зарубежной литературы, сформулированы цель, задачи, этапы и методы исследования, научные положения, выносимые на защиту, выводы. Проведена статистическая обработка обобщенного материала.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 130 листах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, 3-х глав собственных исследований, заключения, выводов и списка использованной литературы, включающего 196 источников, в том числе 27 отечественных и 169 иностранных авторов. Работа иллюстрирована 17 таблицами и 31 рисунком.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Амплификационная тест-система, сконструированная для выявления возбудителя бластомикоза, обеспечивает специфическую детекцию фрагмента гена *α*-1,3-глюкансинтазы при исследовании методом ПЦР в формате реального времени как чистых культур, так и проб биологического материала при генодиагностике экспериментального бластомикоза с чувствительностью 1×10^4 кл/мл.

2. Метод прямого секвенирования амплифицированных фрагментов генов макрофагсвязывающего белка MBP-1 *Coccidioides spp.,* кальцийсвязывающего белка CBP-1 *Histoplasma spp., α*-1,3-глюкансинтазы и белка BYS-1 *Blastomyces spp.* повышает достоверность идентификации возбудителей кокцидиоидомикоза, гистоплазмоза и бластомикоза.

3. Оригинальные олигонуклеотидные секвенационных праймеры **L23F/L23R**

позволяют определить видовую принадлежность микромицетов II группы патогенности, а праймеры **28S1F/28S1R,** предназначенные для секвенирования фрагмента гена *28S рРНК,* идентифицировать возбудителей особо опасных микозов и микромицетов III-IV групп патогенности.

4. Включение этапов секвенирования видоспецифических ампликонов и фрагмента гена *28S рРНК* в схему лабораторной диагностики особо опасных микозов обеспечивает ускоренную идентификацию микромицетов II группы патогенности как на этапе исследования чистых культур, так и анализа проб клинического материала.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Материалы и методы. Объектами исследования служили: 3 штамма *B.dermatitidis,* 6 штаммов *C.immitis,* 2 штамма *C.posadasii,* 8 штаммов *H.capsulatum var. capsulatum*, 3 штамма *H.capsulatum var. duboisii* и 1 штамм *H.capsulatum var. farciminosum*, а также 20 штаммов возбудителей оппортунистических микозов. Исследуемые микроорганизмы были предоставлены Коллекционным центром ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Работу с перечисленными микроорганизмами проводили в соответствии с требованиями СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)», СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности», СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Выделение культуры и определение её морфологических признаков является основным методом идентификации микромицетов. В этот комплекс входит оценка характера роста культуры гриба на агаровых средах и микроскопическое исследование. Культивировали изучаемые микромицеты при 28 °С на картофельном агаре и агаре Чапека. Для обнаружения истинного температурного диморфизма проводили посев микромицетов на среду Сабуро и культивировали в термостате при температуре 28 °С на время от 7 до 14 дней, а также на среду с агаром Френсиса, и термостатировали при температуре 37 °С от 3 до 7 дней. Посев на пробирки с агаром Френсиса проводили для подтверждения способности к температурной конверсии мицелиальной формы гриба в дрожжевую (паразитическую) форму. Сферулы *Coccidioides spp.* получали путём культивирования взвеси артроспор в жидкой среде Конверса при 37 °С в атмосфере, содержащей 10% CO_2.

Для проведения ПЦР-анализа из мицелиальных культур готовили взвеси в 3 мл 0,15 М раствора хлорида натрия в концентрации 1×10^9 мк/мл по отраслевому стандартному образцу мутности и доводили концентрацию клеток грибов до 1×10^1 мк/мл. Разведения 1×10^3 мк/мл

использовали для контрольного высева: по 0,1 мл взвеси каждого исследуемого микроорганизма засевали на чашки Петри с агаром Сабуро для определения количества КОЕ. Дрожжевые культуры готовили в 3 мл 0,15 М раствора хлорида натрия, подсчет количества клеток проводили в камере Горяева. Подготовку проб и их обеззараживание проводили с соблюдением требований, предусмотренных МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности». После обеззараживания по 1 мл из всех разведений полученных взвесей переносили в микропробирки объемом 1,5 мл и центрифугировали при 8000g в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали в 100 мкл стерильной деионизированной воды.

Для моделирования бластомикоза использовали белых мышей линии BALB/c с массой тела 18 - 20 г. Заражение осуществляли путем внутрибрюшинного введения белым мышам 1 мл суспензии дрожжевых клеток *B.dermatitidis* в 0,15 М NaCl (pH 7,2-7,4) с концентрацией 1×10^6 кл/мл.

Вскрытие экспериментальных животных проводили на 7, 14, 21 и 28 сутки после заражения. Части внутренних органов (лёгких, печени, селезёнки) и кровь исследовали с помощью микологического метода и ПЦР. При посеве секционного материала на агар Сабуро с 3 % дрожжевым экстрактом добавляли левомицетин (0,05 мг на 1 мл среды) с целью предотвращения роста бактериальной микрофлоры.

Для определения диагностической чувствительности ПЦР части органов массой 30-50 мг от экспериментально заражённых животных (печень, селезёнка, лёгкие) смешивали с 300 мкл 0,1 % раствора мертиолята натрия и прогревали при температуре (56±1) °С в течение 40 минут. По окончании процедуры обеззараживания части органов растирали в микроцентрифужных пробирках тефлоновым гомогенизатором (ООО «Хеликон», Москва) в лизирующем растворе.

Для исследования крови зараженных лабораторных животных во взятый объём 0,5-1 мл для предотвращения свёртывания добавляли 25-50 мкл 6 % раствора ЭДТА. Обеззараживание проб крови проводили раствором мертиолята натрия (1:1000) в течение 24 ч при комнатной температуре. Для анализа отбирали по 0,1-0,2 мл крови.

Выделение ДНК осуществляли с использованием общепринятых рекомендаций (Chomczynski P., Sacchi N., 1987) с незначительными модификациями.

Для постановки ПЦР использовали следующие ингредиенты: специфические прямые и обратные праймеры, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (дНТФ), $MgCl_2$, буфер, фермент Taq-полимеразу и деионизированную стерильную воду. Амплификацию с электрофорезной детекцией проводили с использованием «горячего старта» в объеме 25 мкл в микроцентрифужных пробирках на мультициклере «Терцик» (НПФ «ДНК-технология»,

Москва). «Горячий старт» обеспечивали разделением реакционной смеси воском на два слоя (верхний и нижний). Нижний слой формировали вода для ПЦР, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты и праймеры, верхний слой содержал ДНК-матрицу и буферный раствор с ионами Mg^{2+} и Taq-полимеразой. Плавление воска и перемешивание реакционных компонентов происходило на этапе предварительной денатурации ДНК при 95 °С. Сверху наслаивали по 30 мкл минерального масла для предотвращения испарения смеси.

Присутствие специфического ПЦР-продукта детектировали электрофоретическим разделением амплификационной смеси в 1,5 % агарозном геле, приготовленном на трис-боратном буфере (0,089М трис-борат, 0,089М борная кислота, 0,002М ЭДТА pH 8,0), при градиенте напряжения 5 В/см. Время проведения электрофореза составляло 30 мин. Окрашивание гелей для визуализации в проходящем ультрафиолетовом свете (трансиллюминатор фирмы «LKB», Швеция) производили бромистым этидием (0,5 мкг/мл). Результаты оценивали по наличию или отсутствию в геле ампликонов необходимого размера.

При создании праймеров и зондов опирались на известные секвенированные нуклеотидные последовательности, находящиеся в общедоступных электронных базах данных Broad Institute (http://www.broadinstitute.org) и GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Анализ молекулярной структуры праймеров и зондов проводили с использованием компьютерной программы Unipro UGENE (http://ugene.unipro.ru/). Последовательности проверяли на образование димеров, шпилек и других вторичных структур (http://eu.idtdna.com/site). Олигонуклеотидные праймеры были синтезированы в ЗАО «Синтол» (Россия).

Реакцию амплификации и анализ продуктов ПЦР осуществляли в режиме реального времени на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» («Corbett Research», Австралия). В состав реакционных смесей входили комплементарные специфическому фрагменту олигонуклеотидные прямые и обратные праймеры, флуоресцентные зонды, меченые флуорофором FAM (карбоксифлуоресцеин) и гасителем флуоресценции (RTQ1), дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (дНТФ), $MgCl_2$, буфер, фермент Taq-полимераза и деионизированная стерильная вода. Для отрицательного контроля в пробирку вместо образца вносили такой же объем дистиллированной воды.

Положительные пробы определяли по наличию фазы логарифмического роста кривой флуоресценции. Регистрацию результатов в режиме реального времени (значение порогового цикла, Ct) проводили в табличной и графической форме с помощью компьютерных программ.

Секвенирование проводили на базе ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. После проведения ПЦР производили очистку амплифицированных фрагментов методом гель-электрофореза в 1,5 % агарозном геле с

окраской интеркалирующим красителем этидиум бромидом и визуализацией в УФ-свете. Специфичность полос подтверждали их положением по отношению к контрольным маркерным фрагментам (ladder 100-1000 п.н. ДНК, ООО «Интерлабсервис», Москва). Разделение фрагментов в электрическом поле проводили при напряжении 150 В в течение 25 минут, после чего бэнды вырезали и переносили в спин-колонки, где образцы центрифугировали при 8000 об/мин 8 мин. Элюент высушивали на концентраторе Concentrator plus (Eppendorf, ФРГ) при температуре рабочей камеры 60 °С. Высушенные продукты амплификации обрабатывали смесью ферментов - экзонуклеазы и щелочной фосфатазы (ExoI/SAP) (Thermo Scientific, США). На одну пробу брали 4 мкл х5 ПЦР-буфера, 0,5 мкл экзонуклеазы, 1 мкл щелочной фосфатазы и 14,5 мкл деионизированной воды, после чего выдерживали при 37 °С 30 мин и при 85 °С – 15 мин. Концентрацию амплифицированных продуктов вновь определяли на флуориметре Qubit® 2.0, используя набор Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies, США).

Реакцию секвенирования проводили с использованием BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA). Термоциклирование проводили в соответствии со стандартной программой. Далее добавляли в каждую пробирку по 1 мкл 2,2 % SDS (додецилсульфат натрия) и повторно термоциклировали (95 °С 5 минут; 25 °С 10 минут). Определение нуклеотидной последовательности проводили на приборе ABI 3130 (Applied Biosystems, США).

Выравнивание прямой и обратной последовательности проводили при помощи программ MEGA6 и Unipro UGENE. Определение степени гомологии нуклеотидных последовательностей проводили в режиме «on-line» с помощью программы BLASTn на сервере (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

Полученные в ходе экспериментальных исследований данные подвергали статистической обработке. При сравнительном анализе эффективности ПЦР и культурального методов использовали критерий χ^2 с учетом поправки Йэйтса (Реброва О.Ю., 2003). Для проведения статистической обработки результатов использовали пакет прикладных программ STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Культурально-морфологические особенности возбудителей кокцидиоидомикоза, гистоплазмоза и бластомикоза. В качестве основного диагностического критерия использовали морфологические характеристики штаммов исследуемых микроорганизмов (Саттон Д. Фотергилл А., Ринальди М., 2001). Каждая таксономическая группа или вид микромицетов обладают определенным набором специфических признаков, по которым возможно провести идентификацию. В нашем исследовании на начальном этапе

микробиологической диагностики проводили посев возбудителей особо опасных микозов с целью обнаружения характерных для них морфологических структур.

Макро- и микроскопическая картина исследованных колоний микроорганизмов соответствовала классическому описанию. Однако некоторые микромицеты формируют сходные морфологические элементы, и при их обнаружении не всегда возможно однозначно установить истинную видовую принадлежность исследуемых грибов на основании только микроскопического исследования, что, в конечном итоге, может привести к ошибкам диагностики. Также важно отметить, что явление конверсии из мицелиальной в дрожжевую форму (двухфазность грибов) при изменении температурных условий культивирования свойственно не только микромицетам II группы патогенности, но и некоторым другим патогенным и условно-патогенным микромицетам, как например, *Penicillium marneffei, Sporothrix schenckii, Cokeromyces recurvatus* (Саттон Д. Фотергилл А., Ринальди М., 2001). Таким образом, для уточнения таксономического положения исследуемых микромицетов необходимо применение дополнительных методов идентификации.

Конструирование амплификационной тест-системы с детекцией результатов в режиме реального времени для выявления ДНК возбудителя бластомикоза. В качестве ДНК - матрицы для идентификации *B.dermatitidis* были выбраны участки гена *BYS-1,* кодирующего белок, активно экспрессирующийся в дрожжевой фазе роста *B.dermatitidis*, а также гена α-1,3-глюкансинтазы, ответственного за формирование клеточной стенки микромицетов.

Выбор данных генов проведен на основе анализа соответствующей литературы и целенаправленного поиска секвенированных нуклеотидных последовательностей геномов, представленных в базах данных Broad Institute (http://www.broadinstitute.org/scientific-community/data) и GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Подбор последовательностей олигонуклеотидных зондов и праймеров, осуществлен в соответствии с общими требованиями, используемыми в ПЦР. При анализе *in silico* были заданы следующие параметры: размер амплифицируемого продукта должен входить в интервал от 50 до 300 п.н., температура плавления 55-65°С, длина праймера 20-30 п.н., GC состав ~40-60%, праймеры не должны образовывать вторичных структур и димеров. Нуклеотидные последовательности праймеров, зондов и предполагаемый размер ампликонов представлены в таблице 1.

Таблица 1

Последовательности олигонуклеотидных затравок и зондов

Праймеры и ДНК-зонды	**Нуклеотидные последовательности праймеров и ДНК-зондов**	**Размер ампликона**
1	**2**	**3**
Ген *BYS-1*		
Bys-1F Bys-2R Bys-1P	5'-TGTTCAAGCAGTGGGCAAAG-3' 5'-GGTGCGAGTTTCAGAGGATAGC-3' 5'-(FAM)-TGGCGGTACCTACAGTGAGCTATTTCGCCA-(RTQ1)-3'	306 п.н.
Ген α-1,3-глюкансинтазы		
BDags-1F BDags-2R BDags-2P	5'-GCGTTATTGAAGCCGATCCT-3' 5'-AACAGCCCGATTGTCCAAAG-3' 5'-(FAM)-GAGATGCAGCGCAATTGCAATCCC-(RTQ1)-3'	178 п.н.

Поиск гомологии для выбранных праймеров и зондов осуществляли посредством поисковой системы BLASTn на веб-сайте (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/, NCBI, США).

Обработка результатов компьютерного анализа проведена с помощью программы Unipro UGENE. С ее помощью визуализировали участки гибридизации праймеров и зондов на выбранных последовательностях ДНК гена *BYS-1* (Рисунок 1) и гена α-1,3-глюкансинтазы (Рисунок 2) и сравнили их с гомологичными регионами ДНК гетерологичных микромицетов. В результате данного анализа удалость установить, что среди нуклеотидных последовательностей микромицетов, не относящихся к виду *B.dermatitidis*, представленных в генетических базах данных, либо отсутствуют участки, гомологичные подобранным праймерам и зондам, либо имеющаяся степень гомологии недостаточна для специфической амплификации.

Компьютерное моделирование реакции амплификации, с использованием онлайн приложения Primer-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast), подтвердило уникальность формирования специфических ампликонов *B.dermatitidis.* Показано, что праймеры обозначеные нами **Bys1F** (прямой праймер) и **Bys2R** (обратный праймер) специфически амплифицируют лишь участок гена, кодирующего белок BYS-1, а праймеры, обозначенные нами как **BDags-1F** и **BDags-2R** – фрагмент гена α-1,3-глюкансинтазы. Эти факты являются важным условием для использования данных праймеров в дальнейшей работе по конструированию амплификационной тест-системы направленной на обнаружение ДНК возбудителя бластомикоза.

При конструировании амплификационной тест-системы для оценки аналитической специфичности и чувствительности праймеров и зондов проведена серия экспериментов с использованием чистых культур возбудителя бластомикоза. Для определения чувствительности ПЦР со сконструированными праймерами и зондами использовали кратные

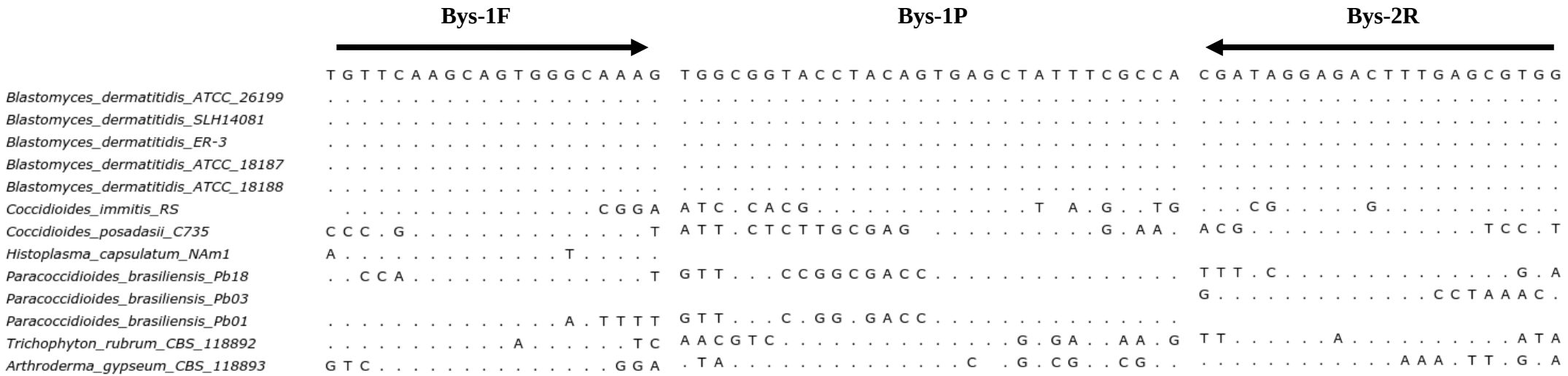


Рисунок 1. Участки отжига праймеров Bys-1F, Bys-2R и зонда Bys-1P. Точкой «.» обозначено совпадение нуклеотидов

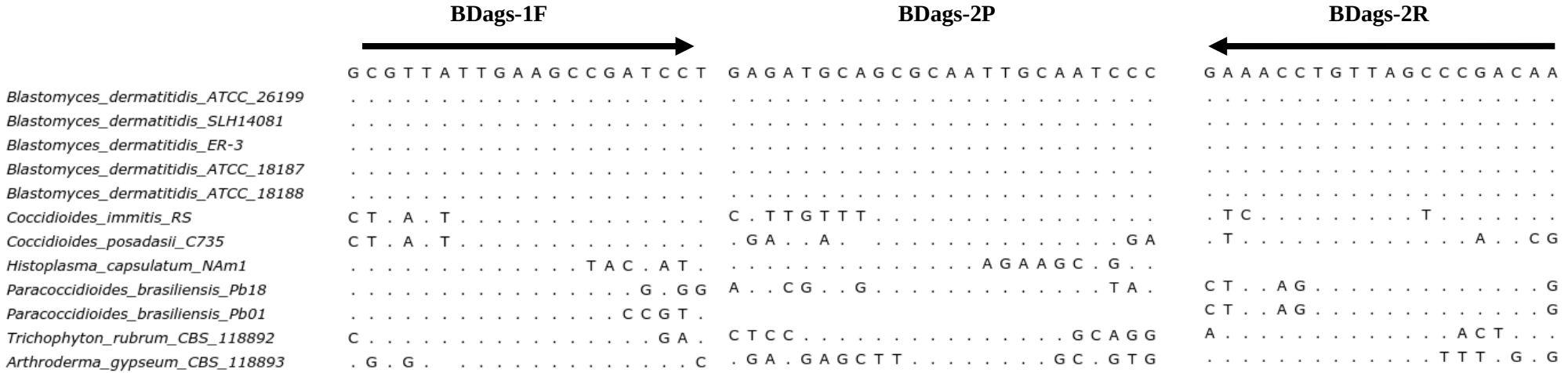


Рисунок 2. Участки отжига праймеров BDags-1F, BDags-2R и зонда BDags-2P. Точкой «.» обозначено совпадение нуклеотидов

разведения взвесей грибов штаммов *B.dermatitidis* 6/85, *B.dermatitidis* 2, *B.dermatitidis* 9 в концентрациях от 1×10^1 до 1×10^7 м.к./мл. В результате проведенных экспериментов минимальный порог чувствительности реакции амплификации, при котором происходила детекция всех штаммов *B.dermatitidis* с помощью праймеров **BDags-1F/BDags-2R** и зонда **BDags-2P**, составил $1x10^4$ кл/мл. Для праймеров **Bys-1F/Bys-2R** и зонда **Bys-1P** предел обнаружения был на уровне $1x10^5$ кл/мл (Таблица 2).

Таблица 2

Сравнение чувствительности пар праймеров Bys-1F/Bys-2R и BDags1F/BDags2R при детекции ДНК штаммов *B.dermatitidis* в пробах с различным разведением (кл/мл)

Штаммы	**Праймеры**							
	Bys-1F/Bys-2R				**BDags1F/BDags2R**			
	10^2	10^3	10^4	10^5	10^2	10^3	10^4	10^5
B.dermatitidis 2	-	-	-	+	-	-	+	+
B.dermatitidis 9	-	-	+	+	-	+	+	+
B.dermatitidis 6/85	-	+	+	+	+	+	+	+

В качестве примера на рисунках 3 и 4 представлено графическое изображение результатов ПЦР в формате реального времени в виде кривых накопления флуоресцентного сигнала с использованием разработанных наборов праймеров **BDags-1F/BDags-2R** и зонда **BDags-2P** и **Bys-1F/Bys-2R** и зонда **Bys-1P**.

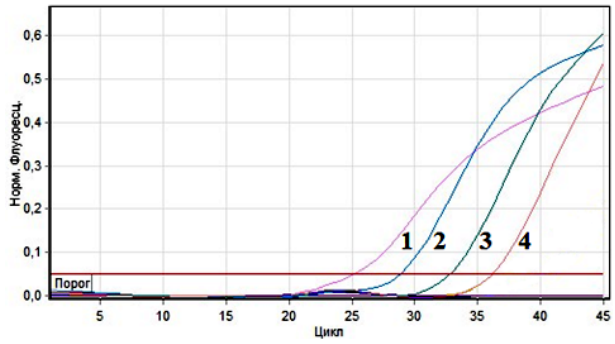


Рисунок 3. Кривые накопления продуктов амплификации с праймерами BDags-1F/BDags-2R

1. *B.dermatitidis* 6/85 концентрация 1×10^5 кл/мл - пороговый цикл 25,24
2. *B.dermatitidis* 6/85 концентрация 1×10^4 кл/мл - пороговый цикл 28,89
3. *B.dermatitidis* 6/85 концентрация 1×10^3 кл/мл - пороговый цикл 32,80
4. *B.dermatitidis* 6/85 концентрация 1×10^2 кл/мл - пороговый цикл 36,19

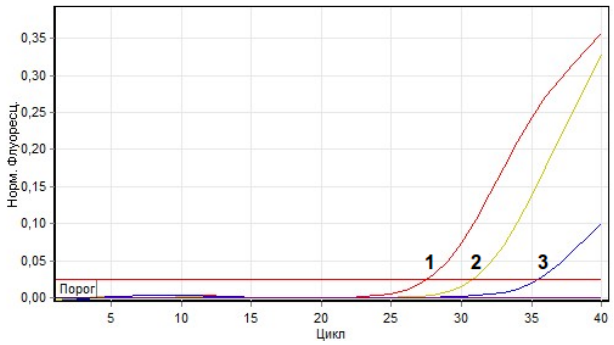


Рисунок 4. Кривые накопления продуктов амплификации с праймерами Bys-1F/Bys-2R

1. *B.dermatitidis* 6/85 концентрация 1×10^5 кл/мл - пороговый цикл 27,62
2. *B.dermatitidis* 6/85 концентрация 1×10^4 кл/мл - пороговый цикл 30,82
3. *B.dermatitidis* 6/85 концентрация 1×10^3 кл/мл - пороговый цикл 35,55

После определения чувствительности ПЦР на чистых препаратах ДНК *B.dermatitidis*, проведена оценка специфичности праймеров и зондов с ДНК гетерологичных видов

микроорганизмов. Для этого использовали взвеси чистых культур микромицетов *Coccidioides spp., Histoplasma spp.,* III-IV групп патогенности в концентрации 1×10^7 кл/мл. Во всех случаях были получены отрицательные результаты, что являлось свидетельством высокой специфичности используемых систем олигонуклеотидов для обнаружения возбудителя бластомикоза. Полученные данные свидетельствовали о достаточном уровне аналитической чувствительности и специфичности сконструированных наборов реагентов для амплификации регионов генов *BYS-1* и α-1,3-глюкансинтазы, соответствующих общепринятым требованиям к разрабатываемым амплификационным тест-системам (Ребриков Д.В., Саматов Д.В., Трофимов Д.Ю. и др., 2009). Учитывая более высокие показатели чувствительности и специфичности праймеров **BDags1F/BDags2R** и флуоресцентного зонда **BDags-2P** для идентификации *B.dermatitidis,* на следующем этапе была изучена их диагностическая информативность при моделировании бластомикоза на белых мышах.

Исследование биологических проб с помощью ПЦР в режиме реального времени проводили параллельно с культуральным (микологическим) методом. При экспериментальной инфекции ДНК возбудителя бластомикоза методом ПЦР была обнаружена у 10 из 32 зараженных мышей (31%) (Таблица 3). С помощью микологического метода удалось выявить возбудитель в 38% (т.е. у 12 из 32 мышей).

Математический анализ результатов показал отсутствие статистической значимости различий в эффективности используемых методов при $p<0,05$. Однако микологический метод потребовал значительно больше времени для исследования. Видимый рост микромицета на питательной среде наблюдался только на 10-14 сутки. Еще 7-10 суток требовалось на появление морфологических признаков, с помощью которых можно было провести идентификацию выросшего микроорганизма. Также при анализе проб биологического материала микологическим методом на питательной среде вероятен одновременный рост посторонней микрофлоры (бактериальной или грибной природы). В подавляющем большинстве случаев она опережает микромицеты *Blastomyces spp.* по скорости роста, а в некоторых случаях и подавляет рост возбудителя бластомикоза, что может привести к постановке ошибочного лабораторного диагноза. В то же время возможная контаминация проб посторонней микрофлорой не влияла на результаты ПЦР.

Таблица 3

Сопоставление результатов ПЦР и микологического метода при исследовании биологического материала от животных экспериментально зараженных *B.dermatitidis* 6/85

Результаты микологического метода	**Результаты ПЦР**	
	положительные	**отрицательные**
Положительные (12)	7	5
Отрицательные (20)	3	17
Всего 32	10	22

Для оценки возможности применения праймеров в целях диагностики заболевания у человека использовали человеческую кровь, контаминированную взвесью грибных клеток *B.dermatitidis* 6/85 в дрожжевой форме с концентрацией от 1×10^5 кл/мл до 1×10^1 кл/мл. В результате работы установлено, что праймеры **BDags-1F/BDags-2R** способны детектировать ДНК микромицета в крови в концентрации от 1×10^4 кл/мл.

Результаты представленных исследований указывают на принципиальную возможность применения полимеразной цепной реакции для обнаружения ДНК грибов *B.dermatitidis*. Показана более высокая информативность ПЦР при анализе образцов крови, в сравнении с микологическим методом, что в реальных условиях может позволить обнаружить возбудитель в ранние сроки заболевания. Предлагаемая амплификационная тест-система может быть использована для установления диагноза при исследовании клинических образцов биологических жидкостей и биоптатов органов.

Идентификация штаммов возбудителей особо опасных микозов с помощью секвенирования ДНК.

Для монолокусного секвенирования использовали праймеры, ранее разработанные сотрудниками ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт с целью обнаружения ДНК возбудителей кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза, а также праймеры, разработанные в процессе данной научной работы.

Для секвенирования использовали группоспецифические праймеры **CimMBP1s/CimMBP2as**, направленные на амплификацию фрагмента гена макрофагсвязывающего белка МВР-1 возбудителей кокцидиоидомикоза (Ткаченко Г.А., Гришина М.А., Антонов В.А. и др., 2007). По результатам множественного выравнивания секвенированных последовательностей ампликонов, полученных с помощью праймеров **CimMBP1s/CimMBP2as**, на основе единичных нуклеотидных замен удалось провести не только идентификацию возбудителей кокцидиоидомикоза рода *Coccidioides*, но и дифференциацию видов *C.immitis* и *C.posadasii.*

Для анализа нуклеотидной последовательности гена *CBP-1* (calcium binding protein 1) *H.capsulatum* в качестве праймеров для секвенирования использовали видоспецифические затравки **HcCBP1s/HcCBP2as** (Вьючнова Н.В., Ткаченко Г.А., Гришина М.А., и др., 2012). В результате секвенирования данного участка гена *CBP-1* был достоверно идентифицирован возбудитель гистоплазмоза, однако разделить генетически неоднородный вид *H.capsulatum* на его варианты: *H.capsulatum var. capsulatum; var. duboisii; var. farciminosum* не удалось.

Секвенирование специфических регионов ДНК музейных штаммов *B.dermatitidis* с помощью праймеров **BDags-1F/BDags-2R** (ген α-1,3-глюкансинтазы) и **Bys-1F/Bys-2R** (ген *BYS-1*) также позволило точно идентифицировать возбудитель бластомикоза.

Для конструирования секвенационных праймеров, направленных на анализ широкого спектра медицински значимых микромицетов, после подробного анализа литературных источников и генетических баз данных, были выбраны две мишени - рибосомальный ген *L23*, кодирующий рибосомальный белок L14p/L23e, отнесенный к семейству РНК-связывающих протеинов (Рисунок 5), и участок гена *28S pPHK* (Рисунок 6). В эксперименте были использованы штаммы возбудителей особо опасных микозов из коллекции живых культур ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

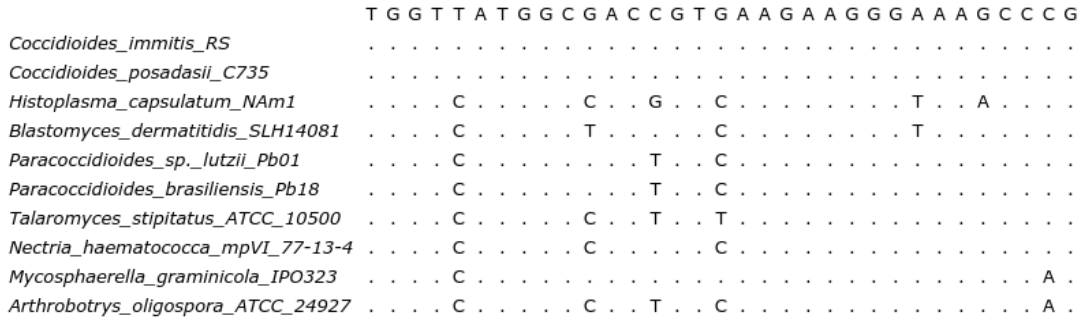


Рисунок 5. Фрагмент последовательности гена рибосомального белка L23, амплифицируемого праймерами L23F/L23R

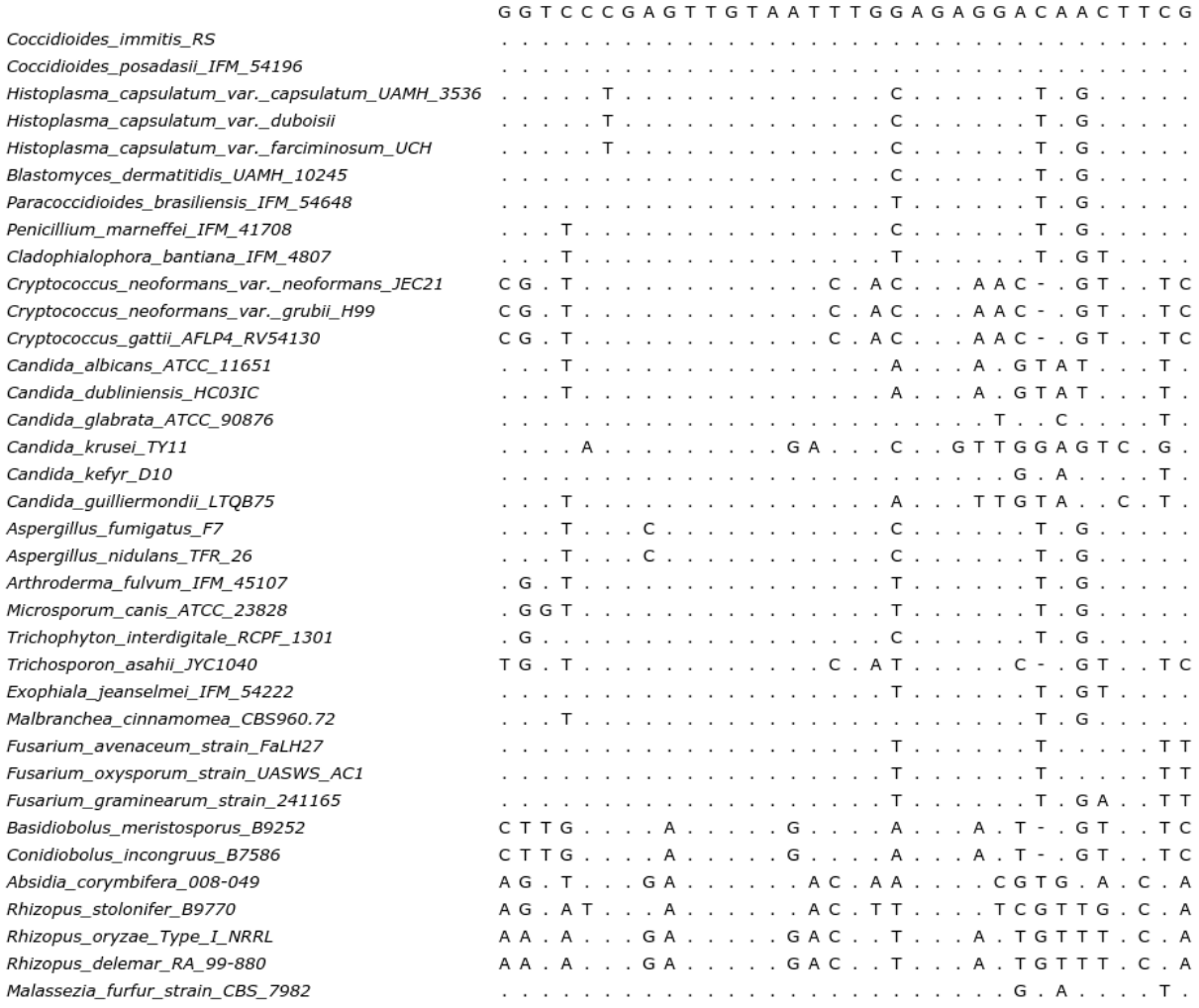


Рисунок 6. Нуклеотидные последовательности региона гена *28S pPHK*, амплифицируемого с праймерами 28S1F/28S1R

Оригинальные последовательности праймеров, подобранные для секвенирования ДНК микромицетов, представлены в таблице 4.

Таблица 4.
Нуклеотидные последовательности праймеров использованных для секвенирования ДНК микромицетов

Праймеры	Нуклеотидные последовательности праймеров	Размер ампликона
1	**2**	**3**
Ген *L23*		
L23F L23R	5'-CTAAAGATGACTCTCGGTCT-3' 5'-CACACCAGCATTATCCTC-3'	~466п.н.
Регион гена *28S pPHK*		
28S1F 28S1R	5'-CATATCAATAAGCGGAGG-3' 5'-CTCCGACCAATATTTAGCTTTAG-3'	~297 п.н.

Полученные нуклеотидные последовательности (сиквенсы) анализировали с помощью программы BLASTn на сайте http://blast.ncbi.nlm.nih.gov. Итогом проведенной работы стало получение дендрограммы сравнения нуклеотидных последовательностей, представленных в базе данных GenBank, и штаммов коллекционного центра ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Результаты секвенирования фрагмента гена L23 представлены на рисунке 7, а участка последовательности гена *28S pPHK* на рисунке 8.

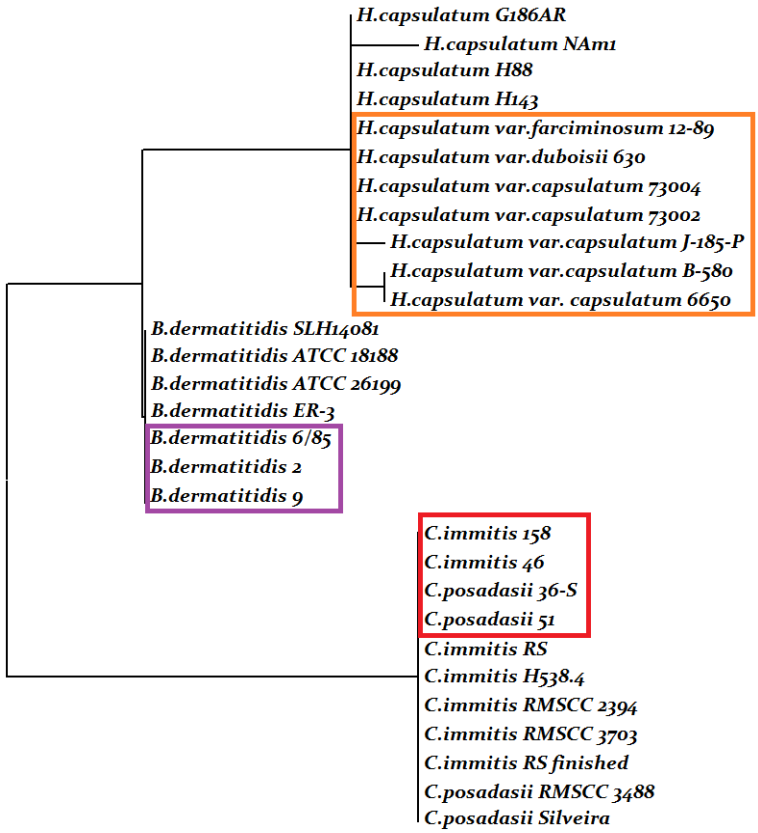


Рисунок 7. Дендрограмма сходства последовательностей гена *L23* музейных штаммов возбудителей особо опасных микозов и нуклеотидных последовательностей генетической базы данных GenBank. Последовательности музейных штаммов выделены рамкой

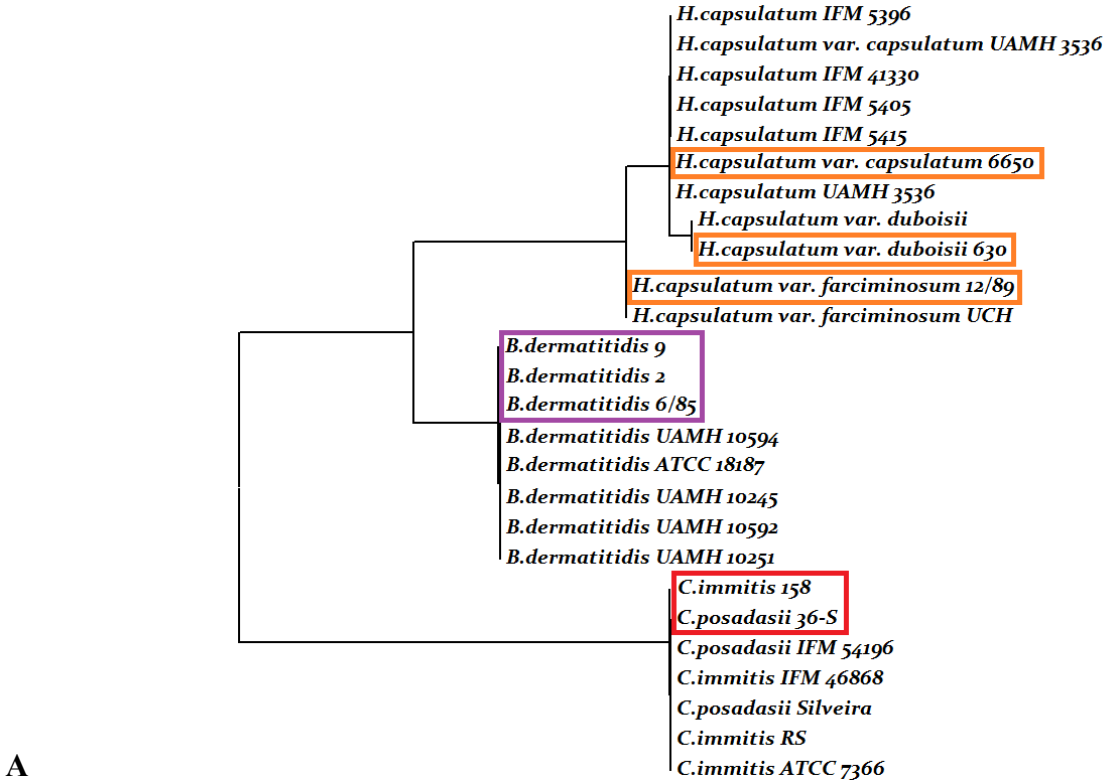
С помощью секвенирования рибосомального гена *L23* все исследуемые штаммы возбудителей особо опасных микозов разделены на 3 кластерные группы, соответствующие изучаемым видам особо опасных микромицетов. Результаты исследования демонстрируют эффективность видовой идентификации возбудителей особо опасных микозов, однако секвенирование данного локуса не позволило разделить варианты *Histoplasma capsulatum var. capsulatum, Histoplasma capsulatum var. duboisii* и *Histoplasma capsulatum var. farciminosum.*

По результатам анализа, секвенированных с помощью праймеров **28S1F/28S1R** фрагментов ДНК, основанном на процедуре множественного выравнивания, построены дендрограммы сходства последовательностей микромицетов коллекции живых культур ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт и нуклеотидных последовательностей, представленных в базе данных GenBank. Исследуемые микроорганизмы удалось разделить на три группы, согласно родовой принадлежности. Кроме того, путем секвенирования фрагмента гена *28S РНК* удалось определить видовую принадлежность всех используемых в работе штаммов микромицетов II-IV групп патогенности (Рисунок 8).

Полученные в ходе эксперимента данные с праймерами **28S1F/28S1R** для амплификации и секвенирования фрагмента гена *28S рРНК* возбудителей особо опасных микозов *B.dermatitidis* 9, *B.dermatitidis* 2, *B.dermatitidis* 6/85, *H.capsulatum* 6650, *H.capsulatum* 630, *H.capsulatum* 12-89, *C.immitis* 158, *C.posadasii* 36-S, совпали с результатами эксперимента с использованием праймеров **L23F/L23R** (Рисунок 7).

Необходимо отметить, что с помощью праймеров **28S1F/28S1R** методом секвенирования возможно разделение вариантов *Histoplasma capsulatum var. farciminosum, Histoplasma capsulatum var. duboisii* и *Histoplasma capsulatum var. capsulatum.*

Полученные данные свидетельствуют о целесообразности применения праймеров **28S1F/28S1R**, детектирующих регион гена *28S РНК*, для идентификации патогенных, в том числе возбудителей глубоких микозов, и условно патогенных микромицетов с помощью технологии секвенирования ДНК.



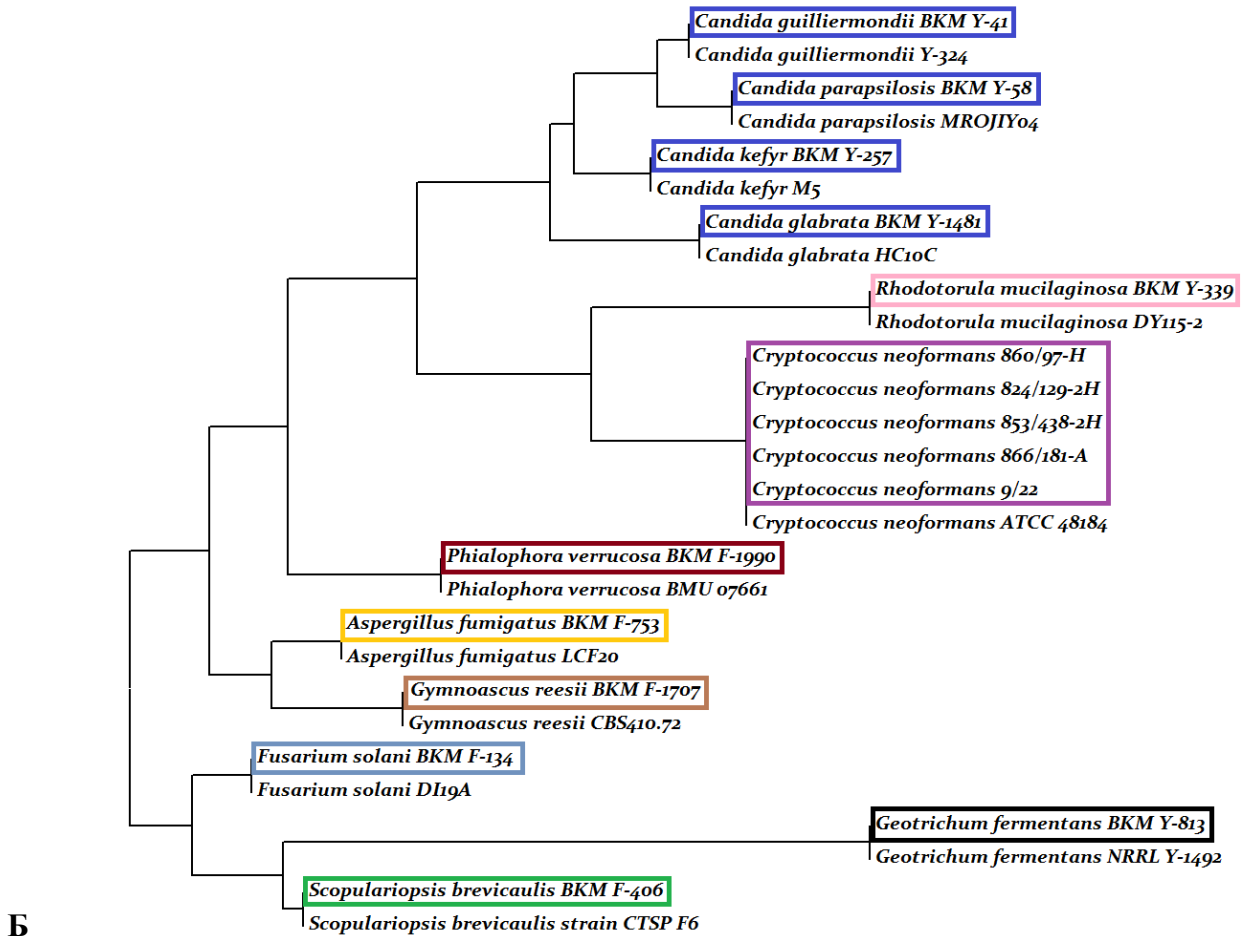


Рисунок 8. Дендрограмма сходства секвенированных последовательностей гена *28S РНК* музейных штаммов возбудителей особо опасных микозов (А), штаммов микромицетов III-IV групп патогенности (Б) в сравнении с гомологичными последовательностями базы данных GenBank. Последовательности музейных штаммов выделены рамкой.

Конструирование секвенационной тест-системы на основе данных праймеров позволит повысить возможности диагностических центров и, в первую очередь, Референс-центра по мониторингу за возбудителями глубоких микозов, при идентификации возбудителей различных микотических инфекций человека, животных и растений.

На основе проведенной работы показана целесообразность дополнения схемы лабораторной диагностики особо опасных микозов этапом секвенирования (Рисунок 9).

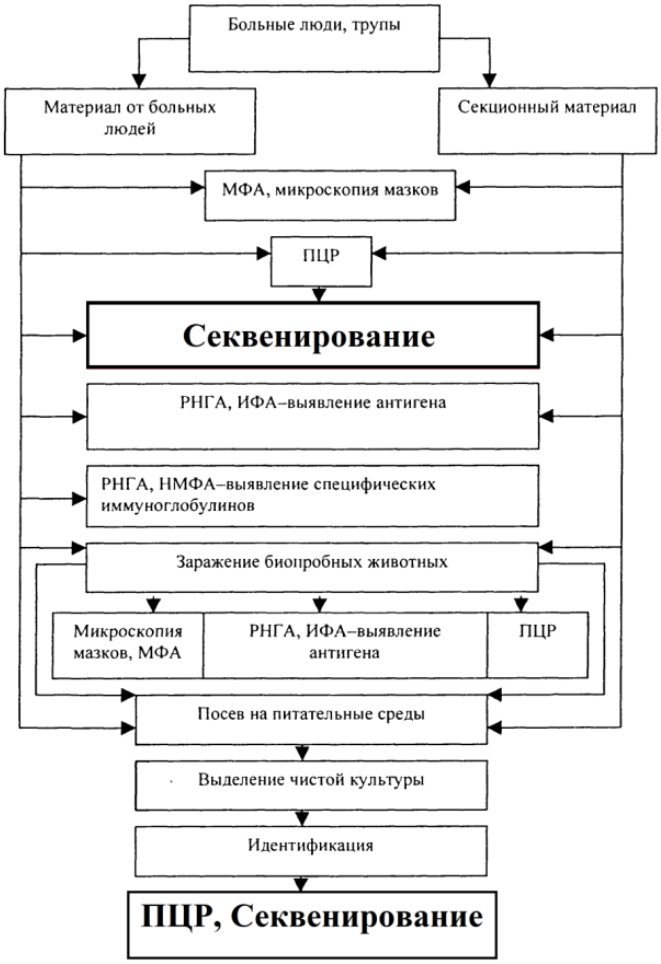


Рисунок 9. Схема лабораторной диагностики глубоких микозов.

В приведенной схеме для ускоренной идентификации культур микромицетов II группы патогенности в условиях Референс-центра по мониторингу за возбудителями глубоких микозов рекомендовано использование сочетания ПЦР и секвенирования видоспецифических фрагментов возбудителей особо опасных микозов наряду с анализом нуклеотидных последовательностей рибосомальных генов.

ВЫВОДЫ

1. Осуществлен анализ нуклеотидных последовательностей, представленных в различных генетических базах данных, и подобраны перспективные ДНК-мишени для генной диагностики *B.dermatitidis* и генетической дифференциации возбудителей особо опасных микозов в различных вариантах ПЦР-анализа, моно- и мультилокусного секвенирования.

2. Проведена сравнительная оценка двух наборов реагентов, сконструированных для обнаружения генов *BYS-1* и α-1,3-глюкансинтазы возбудителя бластомикоза. Показано, что при исследовании чистых культур *B.dermatitidis* чувствительность генодиагностических систем, включающих праймеры **BDags1F/BDags2R** и зонд **BDags-2P,** являющихся фрагментами гена α-1,3-глюкансинтазы, составляет 1×10^4 кл/мл, а праймеров **Bys-1F/Bys-2R** и зонда **Bys-1P** - 1×10^5 кл/мл.

3. На основе оригинальных олигонуклеотидных праймеров **BDags1F/BDags2R** и флуоресцентного зонда **BDags-2P,** создана амплификационная тест-система с детекцией результатов в режиме реального времени для выявления ДНК *B.dermatitidis* и показана ее эффективность при исследовании культур микромицетов и проб биологического материала от экспериментально заражённых животных.

4. Показано, что сочетание реакции амплификации с секвенированием фрагментов гена *MBP-1 Coccidioides spp., CBP-1 Histoplasma spp.*, гена α-1,3-глюкансинтазы и гена *BYS-1 Blastomyces spp.* повышает достоверность ПЦР-диагностики и обеспечивает быструю идентификацию возбудителей кокцидиоидомикоза, гистоплазмоза и бластомикоза.

5. Подобраны олигонуклеотидные затравки **L23F/L23R** для секвенирования фрагмента гена рибосомального белка L23, также праймеры **28S1F/28S1R,** используемые для определения нуклеотидной последовательности региона гена *28S рРНК* с целью идентификации широкого спектра микромицетов II-IV групп патогенности. Показано, что использование двух ДНК мишеней для секвенирования повышает достоверность дифференциации возбудителей глубоких микозов.

6. Предложена схема лабораторной диагностики особо опасных микозов с включением секвенирования видоспецифических ампликонов и фрагмента гена *28S рРНК* как на этапе идентификации чистых культур микромицетов, так и анализа проб биологического материала.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. **Маркин А.М.** Разработка диагностического набора для индикации возбудителя бластомикоза с помощью ПЦР в режиме реального времени / **А.М. Маркин**, Г.А. Ткаченко,

Н.В. Половец, С.С. Савченко, Т.Н. Шаров, В.А. Антонов, А.В. Топорков // Проблемы медицинской микологии. - 2015. - Т. 17, № 3. - С. 3-6 (журнал из перечня ВАК).

2. Вьючнова Н.В. Активность некоторых дезинфектантов в отношении возбудителя кокцидиоидоза / Н.В. Вьючнова, В.А. Спиридонов, М.А. Гришина, **А.М. Маркин**, Т.Н. Шаров, В.А. Антонов // Проблемы медицинской микологии. - 2014. - Т. 16, № 1. - С. 36-39 (журнал из перечня ВАК).

3. Липницкий А.В. Новое в таксономии возбудителей эндемических микозов (обзор) / А.В. Липницкий, В.А. Антонов, **А.М. Маркин** // Проблемы медицинской микологии. -2014. - Т. 16, № 4. - С. 3-7 (журнал из перечня ВАК).

4. **Маркин А.М.** Эпидемиология бластомикоза и паракокцидиоидомикоза / **А.М. Маркин**, М.А. Гришина, Е.Н. Кочубеева // Проблемы особо опасных инфекций. - 2014. - № 3, С. 34-37 (журнал из перечня ВАК).

5. **Маркин А.М.** Молекулярно-генетические методы лабораторной диагностики особо опасных микозов / **А.М. Маркин**, Г.А. Ткаченко, Н.В. Вьючнова, В.А. Антонов // Успехи медицинской микологии. - 2014. - Т. 13. - С. 10-12.

6. Шаров Т.Н. Стандартизация протоколов пробоподготовки для исследования особо опасных микромицетов методом MALDI-TOF масс-спектрометрии / Т.Н. Шаров, Н.В. Вьючнова, **А.М. Маркин**, Д.В. Викторов // Успехи медицинской микологии. - 2014. - Т. 13. - С. 22-24.

7. Липницкий А.В. О таксономии возбудителей эндемичных микозов / А.В. Липницкий, **А.М. Маркин**, В.А. Антонов // Успехи медицинской микологии. - 2014. - Т. 12. - С. 46-48.

8. Малеев В. В. Особо опасные микозы (Текст) / под ред. В. В. Малеева. Авторы: В.А. Антонов, А.В. Липницкий, В.С. Лесовой, М.А. Гришина, Г.А. Ткаченко, Д.В. Викторов, Н.В. Вьючнова, И.М. Шпак, Т.Н. Шаров, **А.М. Маркин**, Е.Н. Кочубеева. – В.: Волга-Паблишер, 2013. – 193 с.

9. **Маркин А.М.** Моделирование процесса конверсии Coccidioides posadasii in vitro и применение данного подхода для идентификации возбудителя кокцидиоидомикоза / **А.М. Маркин**, Н.В. Вьючнова, Т.Н. Шаров // Успехи медицинской микологии. - 2013. - Т. 11. - С. 35-37.

10. Шаров Т.Н. Сравнительный анализ различных методов пробоподготовки микромицетов 2-й группы патогенности для их последующей идентификации методом времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) / Т.Н. Шаров, М.А. Гришина, **А.М. Маркин** // Успехи медицинской микологии. - 2013. - Т. 11. - С. 57-59.

МАРКИН АЛЕКСАНДР МИХАЙЛОВИЧ

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО ОПАСНЫХ МИКОЗОВ НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук