

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ  
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ КАЗЁННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
ВОЛГОГРАДСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ПРОТИВОЧУМНЫЙ  
ИНСТИТУТ РОСПОТРЕБНАДЗОРА

*На правах рукописи*

**МАРКИН АЛЕКСАНДР МИХАЙЛОВИЧ**

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

**03.02.03 – микробиология**

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук,  
профессор Антонов В.А.

Волгоград – 2016

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ВВЕДЕНИЕ.....                                                                                                                | 5  |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ<br>ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО ОПАСНЫХ МИКОЗОВ.....                       | 13 |
| 1.1 Таксономическое положение и биология возбудителей особо опасных<br>микозов .....                                         | 13 |
| 1.2 Патогенез заболеваний и факторы вирулентности возбудителей особо<br>опасных микозов .....                                | 20 |
| 1.3 Лабораторная диагностика особо опасных микозов .....                                                                     | 23 |
| 1.4 Молекулярно-генетические методы исследования возбудителей особо<br>опасных микозов .....                                 | 28 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....                                                                                            | 36 |
| 2.1 Штаммы микроорганизмов, питательные среды, условия<br>культивирования .....                                              | 36 |
| 2.2 Проведение культурально-морфологического исследования чистых<br>культур микромицетов.....                                | 39 |
| 2.3 Использование тест-системы AUXACOLOR 2 для изучения<br>биохимической активности возбудителей особо опасных микозов ..... | 40 |
| 2.4 Подготовка биологического материала для ПЦР-анализа .....                                                                | 40 |
| 2.5 Выделение ДНК микромицетов для использования в молекулярно-<br>генетических методах анализа.....                         | 42 |
| 2.5.1 Метод гуанидинтиоцианат-фенольной экстракции с переосаждением<br>ДНК изопропанолом .....                               | 42 |
| 2.5.2 Метод гуанидинтиоцианат-фенольной экстракции с<br>нуклеосорбцией .....                                                 | 42 |
| 2.6 Полимеразная цепная реакция с электрофорезной детекцией.....                                                             | 43 |
| 2.7 Подбор праймеров и флуоресцентных зондов для ПЦР в реальном<br>времени.....                                              | 44 |
| 2.8 Реакция амплификации в режиме реального времени.....                                                                     | 45 |

|                                                                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.9 Секвенирование продуктов амплификации и анализ полученных нуклеотидных последовательностей.....                                                        | 45 |
| 2.10 Заражение лабораторных животных.....                                                                                                                  | 46 |
| 2.11 Статистическая обработка данных.....                                                                                                                  | 47 |
| ГЛАВА 3. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ                                                                                                                        |    |
| КОКЦИДИОИДОМИКОЗА, ГИСТОПЛАЗМОЗА И БЛАСТОМИКОЗА НА ОСНОВЕ КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ .....                                     | 48 |
| 3.1 Культурально-морфологические особенности возбудителей кокцидиоидомикоза, гистоплазмоза и бластомикоза .....                                            | 48 |
| 3.2 Изучение возможности идентификации возбудителей особо опасных микозов с помощью колориметрической тест-системы AUXACOLOR II .....                      | 51 |
| ГЛАВА 4. КОНСТРУИРОВАНИЕ АМПЛИФИКАЦИОННОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ С ДЕТЕКЦИЕЙ РЕЗУЛЬТАТОВ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ВОЗБУДИТЕЛЯ БЛАСТОМИКОЗА ..... | 58 |
| 4.1 Подбор и анализ праймеров и гибридизационных олигонуклеотидных зондов для детекции <i>Blastomyces dermatitidis</i> .....                               | 58 |
| 4.2 Оптимизация условий для постановки полимеразной цепной реакции в режиме реального времени на препаратах ДНК штаммов возбудителя бластомикоза.....      | 67 |
| 4.3 Анализ чувствительности и специфичности сконструированных праймеров и зондов для обнаружения возбудителя бластомикоза.....                             | 69 |
| 4.4 Использование полимеразной цепной реакции для обнаружения возбудителя бластомикоза при экспериментальной инфекции .....                                | 73 |
| ГЛАВА 5. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО ОПАСНЫХ МИКОЗОВ С ПОМОЩЬЮ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДНК.....                                                        | 79 |
| 5.1 Секвенирование нуклеотидных последовательностей музейных штаммов возбудителей особо опасных микозов с помощью видоспецифических праймеров.....         | 79 |

|                                                                                                                                                                                            |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.2 Секвенирование нуклеотидных последовательностей музейных штаммов микромицетов II-IV гр. патогенности с помощью коммерческого набора для секвенирования ДНК микромицетов D2LSU Kit..... | 81  |
| 5.3 Секвенирование гена рибосомального белка L23 возбудителей кокцидиоидомикоза, гистоплазмоза и бластомикоза .....                                                                        | 85  |
| 5.4 Секвенирование гена <i>28S rPHK</i> штаммов возбудителей глубоких микозов и анализ вариабельности нуклеотидных последовательностей .....                                               | 91  |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....                                                                                                                                                                           | 99  |
| ВЫВОДЫ.....                                                                                                                                                                                | 106 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....                                                                                                                                                                     | 108 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....                                                                                                                                                                    | 109 |

## ВВЕДЕНИЕ

Микроскопические грибы II группы патогенности являются возбудителями таких особо опасных инфекций, как кокцидиоидомикоз, гистоплазмоз, бластомикоз, паракокцидиоидомикоз. Данные микроорганизмы неэндемичны на территории РФ, их естественные ареалы распространения ограничены для рода *Coccidioides* (*Coccidioides immitis* и *Coccidioides posadasii*) Северной, Центральной и Южной Америкой; для *Histoplasma* spp. (*Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii*, *Histoplasma capsulatum* var. *farcinosum*) Северной Америкой, странами Африки и Юго-Восточной Азии; микромицеты рода *Blastomyces* (*Blastomyces dermatitidis* и *Blastomyces gilchristii*) распространены в Северной Америке и Африке. Представители *Paracoccidioides* spp. (*Paracoccidioides brasiliensis*) встречаются на территории Латинской Америки. Однако 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 экзотических для России особо опасных микозов.

На фоне активизации международной интеграции и туризма, увеличения миграции населения возрастает риск завоза этих микозов в Россию. Следует принять во внимание, что аэрогенный путь заражения, отсутствие у человека естественного иммунитета к данным грибным патогенам определяют возможность использования возбудителей особо опасных микозов, в первую очередь представителей рода *Coccidioides*, в качестве потенциальных агентов биотерроризма (Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., 2013).

С учетом выше изложенного требуется постоянная готовность учреждений здравоохранения к осуществлению своевременной лабораторной диагностики указанных заболеваний (Малеев В. В., 2013).

В соответствии с приказом Роспотребнадзора №88 от 17.03.2008 «О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней» (<http://vnipchi.rosпотребнадзор.ru>) на базе ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора функционирует Референс-центр по мониторингу за возбудителями глубоких микозов. Референс-центр был создан для оказания консультативно-методической и практической помощи по проведению лабораторных исследований органам и учреждениям Роспотребнадзора и учреждениям здравоохранения субъектов Российской Федерации. Он обладает единственной в России коллекцией микромицетов II группы патогенности. В его задачи входит изучение биологических, молекулярно-генетических характеристик, а также разработка и совершенствование диагностических препаратов для установления видовой принадлежности возбудителей микозов.

Установление этиологической роли конкретного возбудителя при глубоких микозах является непростой задачей, обусловленной определенными ограничениями стандартных методов их диагностики. В связи с этим, актуальными являются исследования, направленные на создание новых диагностических наборов и тест-систем для идентификации возбудителей глубоких особо опасных микозов.

Необходимость совершенствования системы ранней диагностики глубоких микозов также связана с распространением иммунодефицитных состояний различного генеза. Данные ретроспективных исследований в США свидетельствуют, что подавляющее большинство летальных случаев среди инфицированных возбудителями глубоких особо опасных микозов приходится на пациентов с иммуносупрессией (Adenis A.A., Aznar C., Couppié P., 2014; Jehangir W., Tadeballi G.S., Sen S., et al., 2015).

С помощью методов лабораторной диагностики, направленных на выделение чистой культуры возбудителей особо опасных микозов, возможна их видовая идентификация не ранее, чем через 2-3 недели. При этом микроскопическое исследование клинического материала позволяет лишь

предположить природу заболевания, но не определить вид возбудителя (Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В., 2008; Климко Н.Н., 2010).

Иммунологическая диагностика может обеспечить получение результатов в более короткие сроки, но обладает относительно низкой чувствительностью и недостаточной специфичностью в связи с перекрёстными реакциями антигенов различных видов грибов. Поэтому при получении положительного результата в иммунологических тестах ставят только предварительный диагноз, который требует дальнейшего подтверждения (Davies S.F., Sarosi G.A., 1987; Vyas K.S., Bariola J.R., Bradsher R.W., 2008.).

В настоящее время все большее применение в области лабораторной диагностики особо опасных микозов находят молекулярно-генетические методы, которые основаны на анализе генома микроорганизма (Springer J., Einsele H., Loeffler J., 2012). Наиболее часто в качестве мишени для ПЦР используют мультикопийные гены – *18S pPHK*, *ITS* регион или участок гена *28S pPHK* (Khot P.D., Ko D.L., Fredricks D.N., 2009). Наличие большого количества копий этих генов в геноме гарантирует высокую чувствительность ПЦР – исследования. Однако рибосомальные гены консервативны, и праймеры, нацеленные на обнаружение этих последовательностей, могут амплифицировать ДНК и многих других разновидностей грибов, родов или даже нескольких семейств. Подобное ограничение исключено при использовании видоспецифических мишеней, а также конструировании праймеров для секвенирования, позволяющего идентифицировать большие группы микромицетов.

Таким образом, можно сделать заключение, что только комплексное использование нескольких методов лабораторной диагностики, в том числе молекулярно-генетических, способно повысить достоверность анализа и сократить время постановки диагноза. Кроме того, очевидна актуальность исследований, направленных на совершенствование работы Референс-центра по мониторингу за возбудителями глубоких микозов и оптимизацию схемы лабораторной диагностики кокцидиоидомикоза, гистоплазмоза и бластомикоза.

**Цель работы** заключалась в разработке системы идентификации возбудителей особо опасных микозов, основанной на ПЦР в формате реального времени и секвенировании 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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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 rPHK* 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 гибридационно-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  $\alpha$ -1,3-глюкансинтазы *Blastomyces spp.*), а также секвенирование фрагмента гена *28S rPHK* 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.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Амплификационная тест-система, сконструированная для выявления возбудителя бластомикоза, обеспечивает специфическую детекцию фрагмента гена  $\alpha$ -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  $1 \times 10^4$  кл/мл.

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

3. Оригинальные олигонуклеотидные секвенационные праймеры **L23F/L23R** позволяют определить видовую принадлежность микромицетов II группы патогенности, а праймеры **28S1F/28S1R**, предназначенные для секвенирования фрагмента гена *28S рPHK*, идентифицировать возбудителей особо опасных микозов и микромицетов III-IV групп патогенности.

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

### **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.

По материалам исследований опубликовано 10 печатных работ, отражающих основное содержание диссертации, из них 1 монография, 4 статьи в рецензируемых периодических изданиях, рекомендованных ВАК для защиты докторских и кандидатских диссертаций.

### **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.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО ОПАСНЫХ МИКОЗОВ

### 1.1 Таксономическое положение и биология возбудителей особо опасных микозов

Особо опасные микозы – это группа инфекционных заболеваний, вызываемых микроскопическими грибами родов *Coccidioides*, *Histoplasma*, *Blastomyces*, *Paracoccidioides*. Данные микроорганизмы относят к возбудителям особо опасных инфекций II группы патогенности (опасности) (СП 1.3.3118-13).

Первые описания вышеупомянутых заболеваний относятся к рубежу XIX-XX вв. Так, первый случай кокцидиоидомикоза описал интерн госпиталя в Буэнос-Айресе в 1892 г. в Аргентине (Canteros C.E., Toranzo A., Suárez-Alvarez R., et al., 2009). При исследовании биоптата пораженного участка он обнаружил микроорганизмы, внешне напоминающие одноклеточных паразитов рода *Coccidia*. Исследователи E. Rixford и T. Gilchrist дали возбудителю имя *Coccidioides* («напоминающий кокцидий») *immitis* («беспощадный») (Rixford E., Gilchrist T.C., 1896). В настоящее время известно, что кокцидиоидомикоз – это инфекционное заболевание, вызываемое диморфными грибами рода *Coccidioides* (*Coccidioides immitis* и *Coccidioides posadasii*). Для обозначения заболевания пользуются несколькими равнозначными синонимами: болезнь Посадас-Вернике, лихорадка Сан-Иоахима, кокцидиоидная гранулема, лихорадка долин, пустынный ревматизм (Hirschmann J.V., 2007).

В 1906 году во время строительства Панамского канала американским врачом S.T. Darling был впервые описан случай заболевания гистоплазмозом. В 1908 г. он описал еще 3 случая гистоплазмоза, окончившихся летально (Darling S.T., 1906; Darling S.T., 1908). В образцах патологического материала Darling обнаружил микроорганизм, сходный, как ему показалось, с возбудителем лейшманиоза. Он был отнесен к простейшим и назван *Histoplasma capsulatum*. Видовое название отражает наличие светлых ободков вокруг грибных клеток в ткани, что напоминает слизистую капсулу. В 1912 г. da Rocha-Lima (da Rocha-

Lima H., 1912; da Rocha-Lima H., 1912-1913) выявил принадлежность этого микроорганизма к царству грибов. Само заболевание имеет ряд синонимичных обозначений: болезнь Дарлинга, цитоплазмоз Дарлинга, ретикуло-эндотелиальный цитомикоз (Rapini R.P.; Bologna J.L.; Jorizzo J.L., 2007).

Бластомикоз впервые был подробно описан в 1894 году *Thomas Caspar Gilchrist* (Gilchrist T., 1894). Через четыре года в 1898 *Stokes* определил возбудителя как представителя микромицетов (Gilchrist T.C., Stokes W.R., 1898).

*Paracoccidioides brasiliensis* был впервые обнаружен *Adolfo Lutz* в 1908 году у пациента в Бразилии. Несмотря на то, он не предложил имя для открытого им заболевания, он назвал растущие при 25 °C структуры "pseudococcidia". В 1912 году *Alfonse Splendore* предложил название *Zymonema brasiliense* и описал культуральные особенности гриба. Наконец, в 1930 году, *Floriano de Almeida* выделил возбудитель в отдельный род *Paracoccidioides* и отметил его отличия от *Coccidioides immitis* (Lacaz C.S., 1994).

Таксономическое положение представителей группы особо опасных микромицетов долгое время оставалось дискуссионным. Для его уточнения были использованы различные подходы к систематике, в том числе молекулярно-генетические методы исследования. Известно, что таксономическое положение микроскопического гриба ранее определяли по морфологическим признакам половой стадии. Однако для многих микромицетов, в частности для грибов рода *Coccidioides*, половая стадия на данный момент не обнаружена, и определить их точное систематическое положение долго не удавалось (Sigler L., Carmichael J.W., 1976). Только секвенирование последовательностей генов 18S субъединицы рибосомальной РНК позволило окончательно установить принадлежность рода *Coccidioides* к порядку *Onygenales* (De Hoog G.S., Bowman B., Graser Y., et al., 1998). Исследования 10 генов, представленных в геноме грибов рода *Coccidioides*, позволили установить наличие внутри возбудителя кокцидиоидомикоза двух генетически изолированных групп штаммов – калифорнийской (К) и некалифорнийской (НК) (Fisher M.C., Koenig G.L., White T.J., 2000; Fisher M.C., Koenig G.L., White T.J., Taylor J.W., 2002). На основе новых данных было принято

решение выделить некалифорнийскую группу штаммов, дав им новое видовое название *C. posadasii*, в честь А. Posadas, который первым описал кокцидиоидомикоз у больного. Калифорнийскому варианту оставили прежнее название *C. immitis* (Koufopanou V., Burt A., Taylor J.W., 1997; Fisher M.C., Koenig G.L., White T.J., Taylor J.W., 2002).

На сегодняшний день известны три варианта *H. capsulatum*, отличные друг от друга особенностями клинического течения вызываемых ими заболеваний и географическим распространением возбудителей. Секвенирование спейсерных областей генома подтверждает различие трех вариантов *H. capsulatum* var. *capsulatum*, *H. capsulatum* var. *duboisii* и *H. capsulatum* var. *farciminosum*. По всей видимости, *H. capsulatum* полиморфный вид, состоящий из генетически обособленных географических популяций. Подробный анализ филогенетического родства между различными группами *H. capsulatum* проведен при исследовании 92 изолятов *H. capsulatum*, выделенных в 25 странах на шести континентах. В итоге обнаружено, что вид *H. capsulatum* состоит из восьми филогенетических групп: Североамериканский класс 1, Североамериканский класс 2, Латиноамериканская группа А, Латиноамериканская группа В, Австралийская группа, Нидерландская группа, Евразийская группа и Африканская группа. Африканский вариант *H. capsulatum* var. *duboisii*, включает некоторые штаммы, которые ранее, исходя из их морфологических характеристик, исследователи относили к *H. capsulatum* var. *capsulatum* и var. *farciminosum*. Оказалось, что штаммы, идентифицированные как *H. capsulatum* var. *farciminosum*, состоят из представителей различных филогенетических групп. Считается, что этот вариант непатогенен для человека, а вызывает лимфангоит лошадей. Штаммы, принадлежащие к *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, были выявлены во всех 8 группах (Kasuga T., Taylor J.W., White T.J., 1999). В настоящее время можно говорить о трех вариантах возбудителя гистоплазмоза с широкой внутривидовой вариабельностью штаммов.

Аналогично приведенным выше данным представление о таксономическом положении микромицетов *B. dermatitidis* основано на анализе нуклеотидных последовательностей ДНК. Ранее характеристика различных штаммов

возбудителя бластомикоза основывалась на наличии или отсутствии поверхностного А-антигена. Исследователи установили, что изоляты, выделенные на территории Северной Америки, Индии и Израиля, содержат А-антиген, а в большинстве штаммов, выделенных на территории Африки, А-антиген обнаружить не удалось. Оба варианта патогенны и частоты встречаемости заболевания, вызванного какой-либо из описанных форм, совпадают (Mc Donough E.S., Mc Namara W.J., Chan D.M., et al., 1973; Kaufman L., Standard P.G., Weeks R.J., Padhye A.A., 1983).

ПДРФ-анализ штаммов *B.dermatitidis*, выделенных из пятнадцати географических регионов (США, Канада, Индия, Африка), позволил исследователям разделить данный вид на 3 клада, не связанных с географическим распространением (А, В и С). Например, все африканские штаммы принадлежали к разным группам (Mc Cullough M.J., Di Salvo A.F., Clemons K.V., et al., 2000).

При исследовании генетического полиморфизма промоторного региона гена *BAD-1*, кодирующего адгезин клеточной стенки *B.dermatitidis*, удалось разделить штаммы микромицета на группы А, В, С, D и Е. Можно предположить, что между штаммами группы А и группами В, С, D и Е отсутствовала генетическая рекомбинация уже длительное время (Meece J.K., Anderson J.L., Klein B.S., et al., 2010).

На сегодняшний день, благодаря применению мультилокусного сиквенс-типирования (MLST), проведено филогенетическое исследование 78 штаммов *B.dermatitidis*. Исследователями были использованы праймеры, нацеленные на локусы генов *chitin synthase (chs2)*, *histidine kinase (drk1)*, *fatty acid desaturase (fads)*, *orotidine 5'-phosphate decarboxylase (pyrF)*, *alpha tubulin (tub1)*, *ADP ribosylation factor 6 (arf6)*, и *internal transcribed spacer 2 (its2)*. Благодаря этому удалось разделить ранее считавшийся однородным вид *B.dermatitidis* на две группы, за одной из которых исследователи оставляют прежнее видовое название, вторая группа обозначена как *B.gilchristii* (Brown E.M., Mc Taggart L.R., Zhang S.X., et al., 2013).

Возбудителей особо опасных микозов относят к диморфным грибам. Во



внешней среде при температуре около 25-27 °C микроорганизмы находятся в мицелиальной фазе, а при температуре 37 °C трансформируются в дрожжевую (паразитическую) фазу. Таким образом, изучаемым видам микроскопических грибов свойственен истинный температурный диморфизм, представляющий основу микробиологической диагностики возбудителей особо опасных микозов (Rooney, P.J., Klein B.S., 2002; López C.E., 2006; Bastos K.P., Bailão A.M., Borges C.L., et al., 2007; Laniado-Laborin R., 2007; Hung C.Y., Xue J., Cole G.T., 2007).

Несколько отличаются от остальных микромицетов грибы рода *Coccidioides*. При попадании в организм млекопитающего они образуют уникальные клетки, специфичные для рода *Coccidioides*, сферулы. Внутри них можно наблюдать множественное деление ядер, окруженных собственной клеточной стенкой. Такие дочерние клетки носят название эндоспор. В итоге после накопления определенного количества дочерних клеток, сферула разрывается, а вышедшие из нее эндоспоры образуют новые сферулы, и цикл повторяется (Viriyakosol S., Singhanian A., Fierer J., et al., 2013; Muñoz-Hernández B., Palma-Cortés G., Cabello-Gutiérrez C., Martínez-Rivera M.A., 2014).

Изучение возбудителей особо опасных микозов затруднено сложностью выделения микроорганизма из окружающей среды, а также трудностью дифференциальной диагностики микозов, особенно вне эндемических очагов. Внутри эндемичных территорий микромицеты этой группы обитают в регионах с уникальным почвенным микроклиматом (Petersen L.R., Marshall S.L., Barton-Dickson C., et al., 2004; Reed K.D., Meece J.K., Archer J.R., Peterson A.T., 2008).

Ареал распространения *Coccidioides spp.* - пустынная и полупустынная часть Юго-запада США, включающая штаты Калифорния, Невада, Юта, Нью-Мексико, Техас, Джорджия, Аризона. За пределами США природные очаги кокцидиоидомикоза встречаются в таких странах, как Мексика, Бразилия, Венесуэла, Гватемала, Аргентина, Парагвай, Гондурас (Laniado-Laborin R., 2007; Brown J., Benedict K., Park B.J., Thompson G.R., 2013).

Часто регистрируют отдельные, не связанные с эндемическими зонами, случаи заболевания. По-видимому, они возникают в ходе пыльных бурь и

ураганов, когда споры гриба переносятся на большие расстояния (Pappagianis D., 1988; Brown J., Benedict K., Park B.J., Thompson G.R., 2013). За последнее время в эндемичных областях отмечают повышение заболеваемости кокцидиоидомикозом (Park B.J., Sigel K., Vaz V. et al., 2005; Sunenshine R.H., Anderson S., Erhart L. et al., 2007). Кроме того, случаи кокцидиоидомикоза зарегистрированы в Австралии, Финляндии (Alanko K., Kahanpää A., Pätäälä J., 1975), Чехии (Tomsíková A., 1993), Бельгии (Goegebuer T.T., Nackaerts K.K., Himpe U.U. et al., 2009), Польше (Batura-Gabryel H., Brajer B., 2008), Франции (Chandesris M.O., Hot A., Dannaoui E. et al., 2008), Новой Зеландии, Соединенном Королевстве, Индии (Verghese S., Arjundas D., Krishnakumar K. et al., 2002), Японии (Kishi K., Fujii T., Takaya H. et al., 2008), Таиланде (Panackal A.A., Hajjeh R.A., Cetron M.S., Warnock D.W., 2002; Keckich D.W., Blair J.E., Vikram H.R., 2010). Потенциальной опасностью в распространении инфекции обладают туризм и экспорт сельскохозяйственной продукции (Colombo A.L., Tobón A., Restrepo A., 2011).

Среди возбудителей особо опасных микозов гистоплазмоз находится на первом месте по распространенности на территории Земного шара. Гриб обнаружен на всех континентах, кроме Антарктиды. Эндемичные зоны выявлены на территории США, где, предположительно, около 50 миллионов человек заражены гистоплазмозом в бессимптомной форме. Наибольшая плотность очагов локализована в бассейне рек Миссисипи и Огайо (Sanyal M.; Thammya A., 1975; Kauffman C.A., 2009).

Случаи заболевания были зарегистрированы в Колумбии, Венесуэле, Французской Гвиане, Бразилии, Аргентине, Мексике, Гватемале, Панаме, Эквадоре, Коста-Рике, Никарагуа, Перу, Чили (Beatriz L.G., 2011).

Гистоплазмоз распространен в странах Африки и на острове Мадагаскар (Gugnani H.C., 2000; Muñoz C., Gómez B.L., Tobón A.A. et al., 2010). Кроме того, возбудитель обнаружен в почве Индонезии, Вьетнама, Таиланда, Пакистана, Китая, Индии, Ирана, Турции. Спорадические случаи описаны в Японии, Австралии и в ряде стран Европы (Antinori S., 2014; Kantarcioglu A.S., Sandoval-Denis M., Aygun G., et al., 2014). В эндемичных регионах *H.capsulatum* развивается

во влажной почве, обогащенной гниющим субстратом, экскрементами птиц и летучих мышей (Beatriz L.G., 2011; Antinori S., 2014).

Бластомикоз распространен в регионах США расположенных в пределах бассейна рек Миссисипи и Огайо, вдоль реки св. Лоуренса, и Великих Озер (Bradsher R.W., Chapman S.W., Pappas P.G., 2003; Baumgardner D.J., Knavel E.M., Steber D., et al., 2006; Stephens J., 2007; Smith J.A., Kauffman C.A., 2010). Возбудитель бластомикоза встречается в Африке, заболевание зарегистрировано в 18 странах, больше всего случаев в ЮАР (Baily G.G., Robertson V.J., Neill P. et al., 1991; Alvarez G.G., Burns B.F., Dasjardins M. et al., 2006).

Единичные завозные случаи бластомикоза отмечены на Гавайских островах, в некоторых странах Европы (Италия, Франция, Венгрия, Польша) (Bradsher R.W., Chapman S.W., Pappas P.G., 2003; Malcolm R.D., 2003; Arnett M.V., Fraser S.L., Grbach V.X., 2008).

Данные о распространенности особо опасных микозов ограничиваются клиническими наблюдениями и сведениями о вспышках заболевания. Литературные ссылки о выделении данных возбудителей на территории России отсутствуют. В нашу страну они могут попасть вместе с туристами, посещающими эндемичные регионы. Не исключён завоз зараженных животных – собак, лошадей или сельскохозяйственной продукции (Кашкин П.Н., Шеклаков Н.Д., 1978; Лесовой В.С., Липницкий А.В., Тихонов Н.Г., и др., 1995; Липницкий А.В., Лесовой В.С., Храпова Н.П., Тихонов Н.Г., 1998; Kauffman C.A., 2006; Сергеев А.Ю., 2008, Малеев В. В., 2013).

Высыхание субстрата-почвы с ее последующим разрушением в результате хозяйственной деятельности человека приводит к образованию аэрозоля с инфекционными частицами возбудителя, которыми являются фрагменты мицелия, конидии. Заражение происходит при вдыхании этих морфологических элементов (Teixeira M.M., Theodoro R.C., Nino-Vega G., et al., 2014; Litvintseva A.P., Marsden-Haug N., Hurst S., et al., 2015; Gauthier G.M., 2015). Общим для возбудителей особо опасных микозов является преимущественно ингаляционный путь инфицирования. Но в некоторых случаях грибы могут проникнуть через

кожу при травмах (Gaidici A., Saubolle M.A., 2009; Samaila M.O., Abdullahi K., 2011; Benedict K., Park B.J., 2014).

Кроме человека, возбудители особо опасных микозов поражают других млекопитающих. Описаны случаи заражения после укусов больных собак и порезах во время аутопсии погибших больных (возможная имплантация дрожжевой формы) (Saccante M., Woods G.L., 2010; Baig W.W., Attur R.P., Chawla A., et al., 2011). От человека к человеку заболевания не передаются, однако описано несколько редких случаев перинатальной передачи, и при сексуальном контакте (Dworkin M.S., Duckro A.N., Proia L., et al., 2005).

Наиболее полная статистика заболеваний ведется в США, где в 2012 году было зарегистрировано больше 17000 новых случаев кокцидиоидомикоза (CDC, 1998-2012; CDC, 2012). В эндемичных районах ежегодно регистрируют до 6 случаев гистоплазмоза на 100000 человек (Baddley J.W., Winthrop K.L., Patkar N.M., et al., 2011). Количество зараженных бластомикозом в эндемичных районах составляет от 1 до 2 случаев (а в некоторых регионах от 10 до 40) на 100000 населения (<http://www.cdc.gov>).

## **1.2 Патогенез заболеваний и факторы вирулентности возбудителей особо опасных микозов**

Основные механизмы развития заболеваний заключаются во взаимодействии факторов патогенности грибов с иммунной системой. Наиболее важными в этом плане являются гликопротеиновые молекулы мембран и клеточных стенок микромицетов, являющиеся патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (РАМР). Они уникальны для грибов и не встречаются в клетках млекопитающего-хозяина: хитин (полимер N- ацетилглюкозамина),  $\alpha$ - и  $\beta$ -глюканы (полимеры глюкозы), маннаны (цепи N- или O-связанных молекул маннозы). Данные структуры влияют на дифференциацию антифунгальных Т-хелперов (Th) и формирование ответных иммунных реакций (Wüthrich M., Deere G.S., Klein B., 2012). Наличие в клеточной стенке хитина позволяет грибной

клетке противостоять воздействию факторов клеточного иммунитета (Bir N., Paliwal A., Muralidhar K., 1995).

Основой патогенности грибов рода *Coccidioides* является внедрение в альвеолы, благодаря особым физическим и химическим свойствам инфекционной частицы. Например, наличие отростков на артроспорах в месте соединения с клетками-разобщителями позволяет им фиксироваться на поверхности альвеолярного эпителия. Наличие клеточной стенки, состоящей из хитина, препятствует перевариванию захваченных грибных клеток фагоцитами. Это позволяет микромицету длительно находиться в организме (Whiston E., Zhang W.H., Sharpton T.J., et al., 2012).

Следующим важным фактором реализации патогенных свойств является обладание различным набором ферментов, например, 4-гидроксилфенилпируватдиоксигеназой (4-HPPD), орнитиндекарбоксилазой (ODC),  $\alpha$ -1,3-глюкансинтазой (AGS1) 1,3-бета-глюкантрансферазой, металлопротеазой 1 (MEP1), уреазой, уреидоглюконатгидролазой, а также сериновыми протеазами, расщепляющими человеческие иммуноглобулины, гемоглобин, казеин, альбумин, кератин, эластин и ткани в месте внедрения возбудителя (Whiston E., Zhang W.H., Sharpton T.J., et al., 2012).

Важное место в развитии патогенности гриба занимает его способность выживать внутри организма хозяина. Этому способствует гликопротеин внешней стенки сферул SOWgp, который стимулирует пролиферацию CD4 Т-хелперов, цитокины которых угнетают работу клеточного звена иммунитета (Hung C.Y., Xue J., Cole G.T., 2007).

Конверсия *H.capsulatum* в паразитическую форму контролируется геном *DRK-1* (*dimorphism regulating kinase*) (Nemecek J.C., Wuthrich M., Klein B.S., 2006), а также генами *YPS* (*yeast phase-specific gene*) (Klein B.S., Tebbets B., 2007).  $\alpha$ -1,3-глюкан, содержащийся в клеточной стенке дрожжевых клеток, способен маскировать иммуностимулирующий  $\beta$ -глюкан, препятствуя его взаимодействию с рецепторами макрофагов (Edwards J.A., Alore E.A., Rappleye C.A., 2011; Viriyakosol S., Jimenez M.P., Gurney M.A., et al., 2013). Исследования *H.capsulatum*

показали связь между потерей  $\alpha$ -1,3-глюкана и снижением патогенности этого гриба (Klimpel K.R., Goldman W.E., 1988; San-Blas G., San-Blas F., 1977). У штаммов *B.dermatitidis* наблюдается сходная картина. Авирулентный штамм *B.dermatitidis* (ATCC 60916) не содержит на поверхности клеточной стенки  $\alpha$ -1,3-глюкана, а слабовирулентный штамм *B.dermatitidis* (ATCC 60915) содержит очень мало  $\alpha$ -1,3-глюкана по сравнению с диким типом ATCC 26199 (Hogan L.H., Klein B.S., 1994).

Фактором патогенности, участвующим в адгезии (адгезин) и основным антигеном, вызывающим клеточные и гуморальные реакции, является антиген BAD-1 (*Blastomyces adhesin-1*), ранее называемый WI-1 (Hogan L.H., Josvai S., Klein B.S., 1995; Brandhorst T.T., Gauthier G.M., Stein R.A., Klein B.S., 2005; Krajaejun T., Wuthrich M., Gauthier G.M. et al., 2010).

BAD-1 представляет собой 120 кДа белок, выполняющий несколько функций, включая адгезию, модуляцию провоспалительных иммунных реакций (Newman S.L., Chaturvedi S., Klein B.S., 1995; Finkel-Jimenez B., Wüthrich M., Brandhorst T., Klein B.S., 2001., Brandhorst T.T., Wüthrich M., Finkel-Jimenez B., et al., 2004). Направленное удаление BAD-1 достоверно снижает патогенность возбудителя при моделировании легочной инфекции на лабораторных мышах. BAD-1 экспрессируется в дрожжевой фазе, после температурного перехода *B.dermatitidis* из мицелиальной стадии в дрожжевую (Newman S.L., Chaturvedi S., Klein B.S., 1995; Rooney P.J., Sullivan T.D., Klein B.S., 2001). BAD-1 опосредует взаимодействие с рецепторами макрофагов CD11b / CD18 (CR3) и CD14 (Newman S.L., Chaturvedi S., Klein B.S., 1995), а также ингибирует высвобождение провоспалительных цитокинов таких, как TNF- $\alpha$  (Brandhorst T.T., Wüthrich M., Warner T., Klein B., 1999; Finkel-Jimenez B., Wüthrich M., Brandhorst T., Klein B.S., 2001; Finkel-Jimenez B., Wuthrich M., Klein B.S., 2002; Brandhorst T.T., Wüthrich M., Finkel-Jimenez B., et al., 2004). Все эти исследования показывают, что BAD-1 (WI-1) важный фактор патогенности *B.dermatitidis* (Wuthrich M., Filutowicz H.I., Allen H.L. et al., 2007).

Ещё один специфичный для дрожжевой фазы *B.dermatitidis* ген *BYS1* (*yeast-phase-specific protein 1*), детерминирующий продукцию протеина дрожжевой фазы, обнаружен при помощи тщательного анализа библиотеки кДНК. *BYS1* длиной 0,9 т.п.н., имеет высокий уровень продукции в дрожжевых клетках, но не экспрессируется в мицелиальной фазе. Для определения роли *BYS1*, использовалась флуоресцентная метка (*green fluorescent protein*), позволяющая отследить эффективность экспрессии исследуемого гена. Этот же метод применяли для определения функции генов *BAD1* и *CDC11* (*siltation initiation network scaffold*), принадлежащих *B.dermatitidis*. (Krajaejun T., Gauthier G.M., Rappleye C.A., et al., 2007; Krajaejun T., Wüthrich M., Gauthier G.M., et al., 2010).

В практических исследованиях гены, детерминирующие факторы патогенности, а также гены, отвечающие за биологические особенности жизненного цикла микромицетов, используют в качестве мишеней для разработки систем молекулярной диагностики и идентификации.

### 1.3 Лабораторная диагностика особо опасных микозов

В настоящее время лабораторная диагностика особо опасных микозов основана на проведении микроскопического исследования, выделении чистой культуры возбудителя с доказательством его двухфазности, обнаружении антигенов и антител, а также выявлении ДНК (Лесовой В.С., Липницкий А.В., Тихонов Н.Г., Храпова Н.П., 1995; Guimarães A.J., Nosanchuk J.D., Zancopé-Oliveira R.M., 2006; Алексеев В.В., 2006; Малеев В. В., 2013; Wheat L.J., Knox K.S., Hage C.A., 2014). Вначале патологический материал (мокрота, гной, СМЖ, БАЛ) подвергают микроскопическому исследованию. Этот метод самый быстрый и дешевый, однако, требует от персонала лаборатории большого опыта (Guarner J., Brandt M.E., 2011; Малеев В. В., 2013; Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., 2013).

Следующим этапом лабораторного анализа патологического материала, независимо от результатов микроскопического исследования, является получение чистой культуры предполагаемого возбудителя. Это наиболее важный шаг для определения видовой принадлежности исследуемого микроорганизма. Для

культивирования микроскопических грибов применяют специализированные среды, необходимые для формирования органов спороношения, спор, уникальных образований мицелия и т.п.

Так, культуры *C.immitis* и *C.posadasii* в мицелиальной форме на картофельном агаре (КА) при 27 °С обычно белые, могут быть желтовато-коричневыми, их поверхность гладкая или пушистая. Микроморфология гриба представлена разветвленным септированным, тонким, бесцветным мицелием, более толстые ответвления которого, дают начало одноклеточным бочонкообразным артроспорам размером (3-4×3-6 мкм) (артроконидиям), чередующимся с пустыми клетками-разобщителями (дезъюнкторами). Высвободившиеся конидии имеют остатки клеток дезъюнкторов на своих концах. При 37 °С в жидкой питательной среде Конверса при повышенном содержании СО<sub>2</sub> происходит конверсия в сферульную фазу. Сферулы представляют собой круглые дрожжеподобные клетки (30-60 мкм) с эндоспорами внутри (Саттон Д. Фотергилл А., Ринальди М., 2001; De Macêdo R.C., Rosado A.S., da Mota F.F., et al. 2011; Малеев В. В., 2013; Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., 2013).

Культуры возбудителя гистоплазмоза в мицелиальной фазе на картофельном агаре при 27 °С от белого до светло-коричневого цвета, ватообразные, их обратная сторона – от белой до желтовато-оранжевой. Растут медленно. Микроморфология представлена септированными бесцветными гифами. Имеются короткие конидиеносцы, растущие под прямыми углом. После начала споруляции *H.capsulatum* образует конидии двух типов: сферические, толстостенные макроконидии (8-12 мкм, до 25 мкм) с выростами и микроконидии (2-4 мкм) с гладкими или шероховатыми стенками. Колонии дрожжевой стадии при 37 °С на агаре с добавлением крови или сердечно-мозговой вытяжки от кремового до серого цвета, поверхность гладкая или морщинистая. Клетки дрожжевой стадии варианта *H.capsulatum* var. *capsulatum* тонкостенные, овальные, размером 2×3-4 мкм, дрожжевые клетки варианта *H.capsulatum* var. *duboisii* крупнее, имеют размер до 8-15 мкм, с более толстой клеточной стенкой



(Саттон Д. Фотергилл А., Ринальди М., 2001; Guimarães A.J., Nosanchuk J.D., Zancopé-Oliveira R.M., 2006; Kauffman C.A., 2007).

Колонии мицелиальной формы *B.dermatitidis* на КА при 27 °С белого или желто-коричневого цвета, поверхность в норме пушистая, но может быть и плоской. Микроморфология представлена септированными, бесцветными гифами. Конидии (2-10 мкм) бесцветные, от овальных до сферических или гантелевидных, одиночные и гладкие, расположенные на коротких конидиеносцах или просто по сторонам гиф. Конидиеносцы короткие, латеральные или терминальные. В старых культурах появляются хламидоконидии. Колонии дрожжевой стадии при 37 °С (агар с добавлением крови или сердечно-мозговой вытяжки) кремового цвета с зернистой поверхностью. При микроскопическом исследовании дрожжевые клетки от сферических до овальных 8—15 мкм (иногда до 30 мкм) со светопреломляющей стенкой. Почки с широким основанием. Материнские и дочерние клетки остаются соединенными до тех пор, пока дочерние не достигнут размеров материнских (Саттон Д. Фотергилл А., Ринальди М., 2001; Saccante M., Woods G.L., 2010; Sidamonidze K., Peck M.K., Perez M., et al., 2012; Kantarcioglu A.S., Sandoval-Denis M., Aygun G., et al. 2014;).

При микроскопии пораженных тканей можно обнаружить описанные формы дрожжевой (паразитической) фазы, что позволяет предположить наличие в пробе возбудителя (Саттон Д. Фотергилл А., Ринальди М., 2001; Малеев В. В., 2013; Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., 2013).

В последнее время происходит внедрение в практику бактериологических лабораторий коммерческих полуавтоматических систем для быстрой идентификации микроорганизмов, основанных на определении их характерных фенотипических признаков.

Идентификация дрожжевых грибов III-IV групп патогенности основана на определении их биохимической активности (Зверев В.В., Бойченко М.Н., 2010). Ферментативная активность дрожжевой фазы возбудителей особо опасных микозов зависит от состава питательной среды и условий культивирования. Различия в биохимической активности отмечены лишь у некоторых штаммов *H.*

*capsulatum*, ферментирующих глюкозу, маннит, мальтозу, галактозу с образованием кислоты (Лесовой В.С., Липницкий А.В., Тихонов Н.Г., Яшкулов К.Б., 1995). В одной из работ показана сходная картина ферментации глюкозы, фруктозы, галактозы, маннозы *B.dermatitidis* и *P.brasiliensis*, что не позволяет использовать данные фенотипические свойства для их идентификации (Gilardi G.L., Laffer N.C., 1962). Вариабельность ферментативных свойств штаммов *H.capsulatum* var. *capsulatum* и *H.capsulatum* var. *duboisii* также не позволила дифференцировать данные виды возбудителей (Blumer S., Kaufman L., 1968). Для мицелиальной фазы возбудителей особо опасных микозов характерна низкая биохимическая активность (Лесовой В.С., Липницкий А.В., Тихонов Н.Г., Яшкулов К.Б., 1995).

В настоящее время разработаны методы, позволяющие определять присутствие специфических антигенов и антител (IgM, IgG) в сыворотке, других биологических жидкостях и патологическом материале посредством иммунологических методов диагностики - иммунодиффузии (РИД), латекс-агглютинации, преципитации, реакции связывания комплемента, иммуноферментного анализа (ИФА) (Guimarães A.J., Nosanchuk J.D., Zancopé-Oliveira R.M., 2006; Hage C.A., Kirsch E.J., Stump T.E., et al., 2011; Малеев В. В., 2013; Richer S.M., Smedema M.L., Durkin M.M., et al., 2014; Wheat L.J., Knox K.S., Hage C.A., 2014).

Для диагностики кокцидиоидомикоза, гистоплазмоза и бластомикоза применяют несколько коммерческих иммунологических препаратов, направленных на обнаружение галактотрипана клеточной стенки грибов. В частности, используют ИФА для обнаружения антигена в крови, моче и других биологических жидкостях. Он рекомендован для выявления заболевания в тяжелой или диссеминированной форме у больных с нарушением функционирования иммунной системы. Так как у таких пациентов на ранних сроках сложно определить специфические антитела, которые могут вырабатываться с задержкой или отсутствовать (Wheat L.J., Kohler R.B., Tewari R.P., 1986; Connolly P.A., Durkin M.M., LeMonte A.M. et al., 2007; Durkin M.,

Connolly P, Kuberski T, et al., 2008; Durkin M, Estok L, Hospenthal D, et al., 2009; Swartzentruber S., Rhodes L., Kurkjian K., et al., 2009; Carlos W.G., Rose A.S., Wheat L.J., et al., 2010; Bariola J.R., Chadi A.H., Durkin M., Bensadoun E., et al., 2011; Hage C.A., Ribes J.A., Wengenack N.L., et al., 2011). Также используют иммуноферментный анализ, направленный на поиск циркулирующего полисахаридного антигена  $\beta$ -1-3-d-глюкана (BDG) в моче, сыворотке, и других жидкостях организма (Theel E.S., Doern C.D., 2013).

В Волгоградском научно-исследовательском противочумном институте получены флуоресцирующие иммуноглобулины, используемые для обнаружения артроспор возбудителей кокцидиоидомикоза. На основе полисахаридного компонента клеток *H.capsulatum* разработан эритроцитарный антигенный диагностикум для РНГА (Кулаков М.Я., Лесовой В.С., Новицкая И.В., и др., 2010).

Иммунологические методы диагностики недостаточно эффективны для идентификации микромицетов и постановки клинического диагноза, вследствие наличия сходных антигенных структур (Tarr M., Marcinak J., Mongkolrattanothai K., et al. 2007; Neal P.M., Nikolai A., 2008). В ряде работ выявлены перекрестные реакции между возбудителями кокцидиоидомикоза, гистоплазмоза, бластомикоза и даже аспергиллеза и криптококкоза. В то же время количественное определение антигена в биологических жидкостях позволяет оценить успешность терапии (Wheat L.J., Connolly P., Haddad N. et al., 2002; Wheat L.J., Connolly P., Durkin M. et al., 2004; Wheat L.J., Freifeld A.G., Kleiman M.B. et al., 2007; Hage C.A., Kirsch E.J., Stump T.E., et al., 2011; Hector R.F., Rutherford G.W., Tsang C.A., et al., 2011; Assi M., Martin S., Wheat L.J., et al., 2013; Nguyen C., Barker B.M., Hoover S., et al., 2013; Myint T., Anderson A.M., Sanchez A., et al., 2014; Wheat L.J., Knox K.S., Hage C.A., 2014).

Необходимо отметить, что отрицательные результаты в иммунологических тестах не исключают диагноз микоза, а положительные результаты требуют дополнительных культуральных исследований (Vyas K.S., Bariola J.R., Bradsher R.W., 2008). В рамках функционирования Референс-центра по мониторингу за

возбудителями глубоких микозов продолжают исследования по разработке и совершенствованию иммунодиагностических препаратов для установления таксономического положения возбудителей микозов. Однако на сегодняшний день существующие методы обнаружения патогенных микромицетов недостаточно эффективны для ускоренной диагностики, а идентификация возбудителей особо опасных микозов по-прежнему является сложной задачей.

#### **1.4 Молекулярно-генетические методы исследования возбудителей особо опасных микозов**

Поиск диагностических мишеней и конструирование молекулярно-генетических наборов и тест-систем требует изучения генома исследуемого организма. В настоящее время функционирует проект Fungal Genome Initiative (FGI) по секвенированию и анализу геномов наиболее широко распространенных патогенных грибов, имеющих значение в медицине, сельском хозяйстве и промышленности. Среди них одно из первых мест занимают возбудители особо опасных микозов. Геном *C. posadasii* C735 имеет размер 27,01 Mb, включает в себя 7255 известных генов, кодирующих 7229 белков. Геном *C. immitis* RS при размере в 28,96 Mb, имеет 10560 генов, с которых экспрессируется 10440 белков. Размер генома возбудителя гистоплазмоза *Histoplasma capsulatum* NAm1 составляет 33,03 Mb и содержит 9402 гена, являющихся матрицей для образования 9313 белковых продуктов. Геном *Blastomyces dermatitidis* SLH14081 по данным секвенирования имеет размер 75,4 Mb, состоит из 10047 генов, кодирующих 9587 белков (Magrini V., Warren W.C., Wallis J., et al., 2004; Sharpton T.J., Stajich J.E., Rounsley S.D., et al. 2009).

В настоящее время для идентификации возбудителей глубоких микозов используют молекулярно-генетические подходы (Springer J., Einsele H., Loeffler J., 2012; Beatriz L., Gómez., 2014). Наличие негомологичных участков ДНК у близкородственных видов является предпосылкой для поиска видоспецифических нуклеотидных последовательностей, на основе которых создают диагностические ДНК-зонды, позволяющие с использованием метода ДНК-ДНК гибридизации

идентифицировать различные виды микроорганизмов. В работе *Stockman L.* с соавторами для идентификации диморфных грибов разработан способ с использованием ДНК-зондов. В качестве ДНК-мишеней выбраны специфические олигонуклеотидные последовательности генов *18S* и *28S* рибосомальной РНК. В проведенных исследованиях показана их 100 % специфичность и 50 % чувствительность при использовании проб, контаминированных диморфными грибами. Недостатки первых работ по конструированию гибридизационных зондов были связаны с перекрестными реакциями, трудоемкостью и использованием радиоактивных изотопов для мечения ДНК. ДНК-зонды предложены для выявления рибосомальной РНК *C.immitis*, *H.capsulatum*, и *B. dermatitidis*. Однако эти методы были в основном направлены на идентификацию выделенных культур грибов и не рекомендовались для исследования различных клинических образцов, таких как бронхоальвеолярный лаваж, спинномозговая жидкость, биоптаты органов, кровь (*Stockman L., Clark K.A., Hunt J.M., Roberts G.D., 1993*).

Молекулярная идентификация может быть достигнута с использованием хемилюминесцентных методов исследования ДНК, направленных на мультикопийные рибосомальные гены. Показано, что данным методом можно идентифицировать штаммы *B.dermatitidis* (*Stockman L., Clark K.A., Hunt J.M., Roberts G.D., 1993*). Чувствительность анализа составила 87,4 %, а специфичность 100% при тестировании 74 целевых и 219 нецелевых грибов. Специфичные зонды, комплементарные большой субъединице рибосомы или ITS-региону, успешно используют для идентификации (*Guarner J., Brandt M.E., 2011*).

Молекулярную диагностику используют для идентификации выделенных культур грибов, поиска ДНК микромицетов в образцах тканей, предварительно исследованных с помощью гистопатологических методов, но без возможности дальнейшего посева, а также для обнаружения определенных фрагментов ДНК в образцах биологических жидкостей и биоптатах тканей (*Guarner J., Brandt M.E., 2011*).

На сегодняшний день наиболее популярным и достоверным методом генетической диагностики признан метод ПЦР, позволяющий обнаружить уникальные последовательности при определении видов, штаммов или нахождении определённых генов. В качестве мишеней для ПЦР часто используют мультикопийные гены, такие как *18S pPHK*, *ITS* – регионы или *28S pPHK*. Сотни копий этих генов в геноме гарантируют высокую чувствительность ПЦР – исследования. Однако рибосомальные гены консервативны, и праймеры, нацеленные на идентификацию этих последовательностей, амплифицируют ДНК многих разновидностей грибов, родов или даже нескольких семейств. Кроме того, методы идентификации, основанные на выявлении рибосомальных генов, не могут быть использованы для дифференциации некоторых видов микромицетов в силу их высокого филогенетического родства (Ampel N.M., 2010; Guarner J., 2012).

По этой причине многими исследователями рекомендовано секвенирование продуктов амплификации (Bialek R., 2005; Guarner J., Brandt M.E., 2011; Guarner J., 2012). В одной из работ (Millar B.C., Jiru X., Walker M.J., et al., 2003) указано, что из 435 оснований ПЦР – продукта *18S PHK C.immitis*, 434 основания были идентичны последовательности *Chrysosporium keratinophilum*. Таким образом, идентификация грибов на основе гена *18S pPHK* имеет ограничения, связанные с отсутствием последовательностей в генетических базах данных, и пока гены большинства грибов не будут секвенированы, а результаты опубликованы, остаётся вероятность перекрёстных реакций.

В связи с этим, на сегодняшний день в основу генодиагностики положен поиск видоспецифических фрагментов ДНК различных микроорганизмов, генов, детерминирующих продукцию специфических белков и различных факторов патогенности.

Так, для выявления гена видоспецифичного протеина *C.immitis* с молекулярной массой 19 кДа с активностью сериновой протеиназы, обозначенного как *Coccidioides-specific antigen* (CS-Ag), подобраны праймеры, амплифицирующие фрагмент размером 520 п.н. Данные праймеры проверены на

12 клинических изолятах, выделенных от больных кокцидиоидомикозом (Pan S., Cole G.T., 1995).

Для идентификации и дифференциации *C.immitis* и *C.posadasii* сотрудниками ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора в качестве ДНК - матрицы были выбраны участки гена *MBP-1*, детерминирующего макрофагсвязывающий белок, и гена *SOWgp82*, кодирующего иммунодоминантный гликопротеин внешней стенки сферул. Выбор был обусловлен тем, что поверхностные клеточные гликопротеины паразитической фазы, кодируемые генами *SOWgps*, функционируют как адгезины и являются факторами вирулентности возбудителя кокцидиоидомикоза (Ткаченко Г.А., Гришина М.А., Антонов В.А. и др., 2007).

Метод полимеразной цепной реакции позволяет напрямую выявлять ДНК возбудителя гистоплазмоза в биологическом материале (Burik J., Myerson D., Schreckhise R.W., Bowden R.A., 1998). Для этого в качестве ДНК-мишени необходим выбор специфического фрагмента. Такими целевыми последовательностями для *H.capsulatum* являются гены, определяющие экспрессию 100-кДа белка, М-антигена и Н-антигена (Bialek R., Feucht A., Aepinus C. et al., 2002; Bracca A., Tosello M.E., Girardini J.E. et al., 2003; Kauffman C.A., 2007).

Для идентификации возбудителя гистоплазмоза сотрудниками ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора сконструирована амплификационная тест-система, где в качестве мишеней используют последовательности генов, кодирующих белки СВР1 и MS8 (Вьючнова Н.В., Ткаченко Г.А., Гришина М.А., и др., 2012).

С целью увеличения специфичности реакции амплификации предложена двухстадийная (nested) ПЦР. Для конструирования праймеров, используемых в молекулярной диагностике кокцидиоидомикоза, выбран ген, детерминирующий продукцию поверхностного протеина сферул, богатого пролином - Ag2/PRA (Bialek R., Kern J., Herrmann T., 2004). Для идентификации *B.dermatitidis* предложены праймеры для выявления генов *18S PHK* и *BAD1* (раннее название

WI-1) (Bialek R., Cirera A., Herrmann T., et al., 2003). Однако, в случае использования тест-системы для выявления *BAD1*, возникает сложность при идентификации африканских штаммов *B.dermatitidis*, которые не экспрессируют этот антиген (Klein B.S., Aizenstein B.D., Hogan L.H., 1997). Основным недостатком применения данного формата ПЦР является высокий риск контаминации проб на втором этапе постановки реакции.

В настоящее время на переднем крае лабораторной диагностики находится ПЦР в режиме реального времени. Данный метод основан на выявлении специфических продуктов ПЦР посредством измерения уровня флуоресцентного сигнала после завершения каждого цикла амплификации. Благодаря этому методу возможно определение количества копий ДНК-мишени в пробе клинического материала (Bialek R., Kern J., Herrmann T., et al., 2004; Sheff K.W., York E.R., Driebe E.M. et al., 2010).

Высокий уровень чувствительности и специфичности (92,9% и 98,1%, соответственно) разработанного набора показан при анализе 66 образцов тканей, полученных в ходе биопсии от инфицированных больных кокцидиоидомикозом. В данной работе в качестве мишени для конструирования ПЦР тест-системы в режиме реального времени был использован ITS-2 регион (Binnicker M.J., Buckwalter S.P., Eisberner J.J., et al., 2007). Другая группа исследователей провела серию экспериментов по выявлению гена гистидинкиназы *B.dermatitidis* (*DRK-1*) и гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *H.capsulatum* (*GAPDH*). По их результатам анализ культур грибов показал 100% специфичность и 100% чувствительность при выявлении ДНК *B. dermatitidis* и 100% специфичность и 94% чувствительность при выявлении ДНК *H.capsulatum*. В исследовании 797 клинических образцов, включая биологические жидкости и биопсийный материал, с помощью ПЦР в режиме реального времени, специфичность и чувствительность для *B.dermatitidis* была на уровне 99% и 86%, а для *H.capsulatum* 100% и 73% соответственно (Babady N.E., Buckwalter S.P., Hall L., et al., 2011). Сотрудниками ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора проводится работа по созданию



амплификационных тест-систем в режиме реального времени для диагностики кокцидиоидомикоза (Ткаченко Г.А., Гришина М.А., Савченко С.С., и др., 2009).

Одной из особенностей микроскопических грибов является наличие полового процесса и связанной с ним рекомбинации в ходе кроссинговера. По мнению некоторых исследователей (Bubnick M., Smulian A.G., 2007) это может привести к возникновению новых штаммов с измененной вирулентностью. У *H.capsulatum* был обнаружен ответственный за половой процесс ген *MAT1*. Гомологичные ему последовательности были найдены у *B.dermatitidis* и *P.brasiliensis* благодаря ПЦР анализу (Teixeira M.M., Theodoro R.C., Derengowski L.S., et al., 2013).

Можно сделать заключение, что для создания новых эффективных диагностических тест-систем необходимо в качестве мишени для ПЦР-анализа использовать уникальные участки геномов микроорганизмов, а также генов, кодирующих синтез факторов патогенности или видоспецифических белков.

Наиболее активно развивающейся на сегодняшний день технологией в области идентификации микроорганизмов является метод секвенирования ДНК. Он основан на определении первичной последовательности ДНК и дальнейшем анализе полученных данных путем сравнения с секвенированными последовательностями известных микромицетов, представленными в генетических базах данных. Ярким примером использования такого подхода, является завозной случай кокцидиоидомикоза в Индии. Пациент на протяжении нескольких лет получал противотуберкулезную терапию, не имея видимых улучшений. Только сочетание культурального метода и секвенирования фрагмента гена *28S rPHK* позволило установить истинную природу возбудителя (Сапоор М.Р., Сен В., Варшнеи Р., et al., 2014). Интересное исследование проведено сотрудниками Департамента Микологии в Буэнос-Айресе. Генетическому анализу подвергнут запарафинированный образец ткани больного кокцидиоидомикозом, полученный *Alejandro Posadas* ещё в 1892 году. После выделения ДНК, использовали нестед-ПЦР гена *Ag2/PRA* (Bialek R., Kern J., Herrmann T., 2004). Продукт амплификации был секвенирован и установлена

принадлежность возбудителя к виду *C.posadasii* (Canteros C.E., Toranzo A., Suárez-Alvarez R., et al., 2009).

В 2013 году в Швейцарии появилось сообщение об обнаружении возбудителя гистоплазмоза в пораженных тканях домашнего кота. Установление видовой принадлежности в этом случае было проведено с помощью секвенирования фрагмента гена *28S pPHK* (Fischer N.M., Favrot C., Monod M., et al., 2013). Исследователи предположили связь между заболеванием животного и высокой численностью летучих мышей, представленных на окружающей территории. Это косвенно подтверждает данные Европейской Конфедерации по медицинской микологии (European Confederation of Medical Mycology, ECMM) о наличии на территории Италии, Германии и Турции природных очагов *H.capsulatum* (Ashbee H.R., Evans E.G., Viviani M.A. et al., 2008).

В одной из работ описан случай быстрой идентификации возбудителя бластомикоза. У пациента был взят материал после биопсии пораженной ткани. Гистологическое исследование позволило предположить наличие возбудителя криптококковой инфекции, однако к 10 дню госпитализации посредством анализа последовательностей гена *28S pPHK* и региона *ITS2*, была установлена принадлежность возбудителя к виду *B.dermatitidis*. Рост культуры микромицета отмечен только на 13 сутки (Morjaria S., Otto C., Moreira A., 2015).

На данный момент создана коммерческая система идентификации микроскопических грибов - MicroSeq® D2 LSUrDNA Fungal Identification System (Applied Biosystems, США). Данный набор реагентов основан на секвенировании D2 региона гена *28S pPHK*. В постоянно пополняющейся базе данных представлено более тысячи секвенированных последовательностей участка D2 генома микромицетов (Hall L., Wohlfel S., Roberts G.D., 2004; Hall L., Wohlfel S., Roberts G.D., 2003).

На сегодняшний день методы секвенирования активно развиваются и становятся более доступными и дешевыми. Появилась возможность секвенирования целого генома, а не отдельных локусов. Это позволит использовать данные о последовательности всех генов микроорганизма для

генотипирования и молекулярного эпидемиологического анализа. Так, в одной из работ полногеномное секвенирование позволило установить источник инфекции у трёх реципиентов, получивших органы от одного донора, у которого впоследствии обнаружили кокцидиоидомикоз (Engelthaler D.M., Chiller T., Schupp J.A. et al., 2011).

Основная масса исследований, базирующихся на принципе секвенирования ДНК, пока не имеет широкого практического применения и, в основном, используется в научных исследованиях. Несмотря на появление более совершенной методики, в будущем теоретически способной заменить многие методы диагностики и идентификации микроорганизмов, в настоящее время это удел высокоспециализированных лабораторий и научно-исследовательских институтов. Создание секвенационной тест-системы, направленной на идентификацию микромицетов, будет способствовать быстрой и точной диагностике особо опасных микозов.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Штаммы микроорганизмов, питательные среды, условия культивирования

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. *farcinosum* (Таблица 1). В дополнение к этому использовались также 20 штаммов возбудителей оппортунистических микозов (Таблица 2). Исследуемые штаммы микроорганизмов были предоставлены Коллекционным центром Волгоградского научно-исследовательского противочумного института.

Для получения мицелиальной стадии штаммы возбудителей особо опасных микозов культивировали на агаре Сабуро с добавлением 3 % дрожжевого экстракта (Difco, США) в течение 30 суток при 28 °С. Дрожжевые формы грибов выращивали на агаре Френсиса при 37 °С в течение 10 суток. Условия культивирования и питательные среды для гетерологичных микроорганизмов соответствовали общепринятым.

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».

Таблица 1

**Штаммы возбудителей особо опасных микозов, использованные в работе**

| № п/п | Штаммы                                             | Источник получения                              |
|-------|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| 1     | <i>Blastomyces dermatitidis</i> 2                  | ГИДУВ г. Ленинград 15.04.68 г.                  |
| 2     | <i>Blastomyces dermatitidis</i> 9                  | -"                                              |
| 3     | <i>Blastomyces dermatitidis</i> 6/85               | Ленинградский институт антибиотиков 27.03.67 г. |
| 4     | <i>H.capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i> 6650    | -"                                              |
| 5     | <i>H.capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i> 6652    | -"                                              |
| 6     | <i>H.capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i> 73002   | ВКПГ г. Ленинград 25.12.93 г.                   |
| 7     | <i>H.capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i> 73004   | -"                                              |
| 8     | <i>H.capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i> B-580   | -"                                              |
| 9     | <i>H.capsulatum</i> var. <i>duboisii</i> 630       | -"                                              |
| 10    | <i>H.capsulatum</i> var. <i>duboisii</i> BM-87     | -"                                              |
| 11    | <i>H.capsulatum</i> var. <i>duboisii</i> B-681     | ГИДУВ г. Ленинград 15.04.68 г.                  |
| 12    | <i>H.capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i> J-185-P | -"                                              |
| 13    | <i>H.capsulatum</i> var. <i>farcinosum</i> 12-89   | -"                                              |
| 14    | <i>Coccidioides immitis</i> M-11                   | -"                                              |
| 15    | <i>Coccidioides immitis</i> 333                    | -"                                              |
| 16    | <i>Coccidioides immitis</i> 34                     | -"                                              |
| 17    | <i>Coccidioides posadasii</i> 36-S                 | -"                                              |
| 18    | <i>Coccidioides immitis</i> 158                    | ГИДУВ г. Ленинград 26.10.64 г.                  |
| 19    | <i>Coccidioides immitis</i> 46-P                   | -"                                              |
| 20    | <i>Coccidioides immitis</i> 46                     | -"                                              |
| 21    | <i>Coccidioides posadasii</i> 51                   | -"                                              |

Таблица 2

**Штаммы возбудителей оппортунистических микозов, использованные в настоящем исследовании**

| № п/п | Штаммы                                    | Источник получения                                                                        |
|-------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1     | <i>Cryptococcus neoformans</i> 824/129-2H | Коллекционный центр ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский институт Роспотребнадзора |
| 2     | <i>Cryptococcus neoformans</i> 853/438-2H | -"                                                                                        |
| 3     | <i>Cryptococcus neoformans</i> 860/97-ФН  | -"                                                                                        |
| 4     | <i>Cryptococcus neoformans</i> 866/181-A  | -"                                                                                        |
| 5     | <i>Cryptococcus neoformans</i> 9/22       | -"                                                                                        |
| 6     | <i>Candida parapsilosis</i> BKM Y-58      | Всероссийская коллекция микроорганизмов, г. Пушкино                                       |
| 7     | <i>Candida glabrata</i> BKM Y-1481        | -"                                                                                        |
| 8     | <i>Candida kefyr</i> BKM Y-257            | -"                                                                                        |
| 9     | <i>Candida guilliermondii</i> BKM Y-41    | -"                                                                                        |
| 10    | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> BKM Y-339 | -"                                                                                        |

Таблица 2 (продолжение).

| №<br>п/п | Штаммы                                                            | Источник получения                                 |
|----------|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| 11       | <i>Geotrichum fermentans</i> BKM Y-813                            | Всероссийская коллекция микроорганизмов, г. Пущино |
| 12       | <i>Fusarium javanicum (solani)</i> BKM F-134                      | -"-                                                |
| 13       | <i>Absidia hyalospora (syn. Mycocladus hyalospora)</i> BKM F-1435 | -"-                                                |
| 14       | <i>Aspergillus fumigatus</i> BKM F-753                            | -"-                                                |
| 15       | <i>Rhizopus microsporia</i> var. <i>microsporus</i> BKM F-774     | -"-                                                |
| 16       | <i>Fusarium culmorum</i> BKM F-1017                               | -"-                                                |
| 17       | <i>Gymnoascus reesii</i> BKM F-1707                               | -"-                                                |
| 18       | <i>Mucor racemosus</i> var. <i>racemosus</i> BKM F-1128           | -"-                                                |
| 19       | <i>Phialophora verrucosa</i> BKM F-1990                           | -"-                                                |
| 20       | <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> BKM F-406                       | -"-                                                |

Обеззараживание культур исследуемых микроорганизмов проводили в соответствии с регламентирующими документами (СП 1.3.3118-13). Для этого использовали:

- 10% раствор формалина в соотношении 1:10 с последующей экспозицией в течение 24 ч при комнатной температуре или в течение 2 ч при температуре (37 ± 1) °С;

- мертиолята натрия в концентрации 0,001% с последующим прогреванием при температуре (56±1) °С в течение 30 мин или выдерживанием при комнатной температуре в течение 24 ч.

При заражении лабораторных животных место введения материала обрабатывали 1%-ной настойкой йода.

Для контроля инаktivации культуры каждую пробу, обработанную химическим реагентом, разводили 0,15 М раствором натрия хлорида 1:10 и 1:100 раз с целью предотвращения бактериостатического действия веществ, использованных при обеззараживании, и делали посеvy из каждого образца проб по 0,2 мл в три пробирки с агаром Сабуро и в три пробирки с бульоном Сабуро. Учет результатов проводили через 21 сутки инкубации при 28° С.

## **2.2 Проведение культурально-морфологического исследования чистых культур микромицетов**

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 гриба.

В данном исследовании производили описание колоний по следующим культуральным признакам:

1. Структура колонии (пушистая, войлочная, бархатистая, паутинистая, шерстистая, клочковатая, мучнистая и др.);
2. Поверхность (плоская, складчатая, бугристая, куполообразная, зональная и др.);
3. Пигментация колонии гриба и субстрата (различные оттенки зеленого, голубого, фиолетового, черного, серого и др.);
4. Наличие экссудата на поверхности колонии;
5. Форма спор (овальная, круглая, продолговатая и др.) и их поверхность (шероховатая, гладкая и др.);
6. Органы спороношения.

Микропрепараты культур возбудителей особо опасных микозов готовили в боксе биологической безопасности III класса. Все манипуляции проводили с соблюдением правил биологической безопасности.

Препараты просматривали под микроскопом при увеличении  $\times 400$  и  $\times 1000$ . Изучали субстратный и воздушный мицелий, отмечали наличие или отсутствие септ (перегородок), обращали внимание на характер спороношения: конидиеносцы с конидиями и спорангии со спорангиоспорами.

Формирование специфических морфологических элементов оценивали с помощью культивирования изучаемых микромицетов при 28 °С на картофельном агаре и агаре Чапека. Для обнаружения истинного температурного диморфизма проводили посев микромицетов на среду Сабуро и на среду Френсиса. Пробирки с агаром Сабуро помещали в термостат при температуре 28 °С на время от 7 до 14

дней, пробирки с агаром Френсиса находились в термостате 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<sub>2</sub>.

### **2.3 Использование тест-системы AUXACOLOR 2 для изучения биохимической активности возбудителей особо опасных микозов**

Тест-систему AUXACOLOR 2 использовали в соответствии с прилагаемым к ней руководством (AUXACOLOR 2, User manual book, 2005). В основе функционирования данного диагностического набора лежит способность микромицетов ассимилировать сахара (глюкоза, мальтоза, сахароза, галактоза, лактоза, раффиноза, инозитол, целлобиоза, трегаллоза, адонитол, мелецитоза, ксилоза, арабиноза) и проявлять некоторые виды ферментативной активности (Н-ацетилгалактозаминидазная, фенолоксидазная и пролинариламиныдазная). Учет результатов проводили согласно прилагаемой к тест-системе инструкции после 36-48 часов инкубации. Дрожжевые культуры микромицетов культивировали до изменения окраски в лунке с положительным контролем (GLU-глюкоза). Цвет меняется в соответствии со следующей зависимостью: синий – отрицательный результат, желтый – положительный результат (коричневый для фенолоксидазного теста). Оценку результатов биохимической активности микромицетов проводили с использованием таблицы кодов, прилагающейся к тест-системе (AUXACOLOR2, User manual book, 2005).

### **2.4 Подготовка биологического материала для ПЦР-анализа**

Для проведения ПЦР-анализа проводили следующие этапы пробоподготовки. Вначале исследуемые культуры грибов культивировали на плотных питательных средах. Из мицелиальных культур готовили взвеси в 3 мл 0,15 М раствора хлорида натрия в концентрации  $1 \times 10^9$  мк/мл по отраслевому



стандартному образцу мутности и доводили концентрацию клеток грибов до  $1 \times 10^1$  мк/мл. Разведения  $1 \times 10^3$  мк/мл использовали для контрольного высева. С этой целью 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».

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 контаминации использовали по 0,9 мл человеческой крови. В неё вносили суспензии клеток микромицетов, обеззараженные мертиолятом натрия в объеме 0,1 мл до конечной концентрации от  $1 \times 10^1$  до  $1 \times 10^6$  мк/мл.

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.

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  $(56 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 40 мин. По окончании процедуры обеззараживания части органов растирали в микроцентрифужных пробирках тefлоновым гомогенизатором (ООО «Хеликон», Москва) в лизирующем растворе.

## **2.5 Выделение ДНК микромицетов для использования в молекулярно-генетических методах анализа**

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

### **2.5.1 Метод гуанидинтиоцианат-фенольной экстракции с переосаждением ДНК изопропанолом**

Разрушение клеточных структур проводили с использованием лизирующего раствора следующего состава: 300 мкл 6 М гуанидинтиоцианата, 300 мкл смеси фенола и 10мМ Трис, рН 8,0 (в соотношении 1:1). Далее лизис осуществляли при 95 °С в 600 мкл смеси в течение 30 минут. После этого каждый образец центрифугировали на микроцентрифуге при 12000 об/мин в течение 10 сек для осаждения конденсированной влаги. На следующем этапе добавляли хлороформ в объёме 300 мкл, перемешивали и центрифугировали суспензию в течение 5 мин при 12000 об/мин. По окончании процедуры центрифугирования в чистую пробирку отбирали и переносили верхнюю водную фазу с добавлением 0,1 мл 3М ацетата натрия и эквивалентный объём изопропанола для осаждения ДНК. Смесь перемешивали и инкубировали при –20 °С в течение 1 ч. После осаждения ДНК пробы центрифугировали в течение 15 мин при 12000 об/мин, после чего отбирали супернатант. Осадок промывали 500 мкл буферного раствора, содержащего 10 мМ Трис, 50 мМ NaCl и 70 % этанола. Затем осадок высушивали при температуре 60 °С в течение 10 мин и растворяли в 100 мкл деионизированной воды.

### **2.5.2 Метод гуанидинтиоцианат-фенольной экстракции с нуклеосорбцией**

К пробе, содержащей биологический материал, добавляли лизирующий буфер, содержащий 300 мкл 6 М гуанидинтиоцианата натрия и 300 мкл фенола, забуференного Tris-HCl, рН 8,0±0,1. Этап клеточного лизиса проходил при

температуре  $(95 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 30 мин. Далее добавляли 60 мкл 3 М ацетата натрия и 300 мкл хлороформа, перемешивали и центрифугировали в течение 5 мин при 12000 об/мин.

Затем проводили двукратную очистку хлороформом в объеме 400 мкл. Смесь центрифугировали в течение 5 мин при 12000 об/мин. Далее водную фазу переносили в чистую пробирку, содержащую 20 мкл суспензии сорбента  $\text{SiO}_2$  (ООО Интерлабсервис). Инкубировали при температуре  $(60 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 15 мин. Центрифугировали при 10000 об/мин 30 сек, супернатант отбирали, к осадку добавляли 100 мкл 4М раствора гуанидинтиоцианата. Смесь перемешивали на вортексе 10-20 сек, центрифугировали при 10000 об/мин 30 сек, супернатант убирали. Осадок дважды промывали 500 мкл буферного раствора, содержащего 10 мМ Трис, 50 мМ NaCl и 70% этанола. Смесь перемешивали и центрифугировали при 10000 об/мин в течение 30 сек. К осадку добавляли 400 мкл ацетона, перемешивали и центрифугировали при 10000 об/мин в течение 30 сек. Супернатант сбрасывали, осадок высушивали при температуре  $(60 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 10 мин. К осадку добавляли 100 мкл ТЕ-буфера ( $\text{pH } 8,0 \pm 0,1$ ) и выдерживали при температуре  $(60 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 15 мин для растворения ДНК. В качестве отрицательных контролей при выделении ДНК использовали дистиллированную воду.

## **2.6 Полимеразная цепная реакция с электрофорезной детекцией**

Для постановки ПЦР использовали следующие ингредиенты: специфические прямые и обратные праймеры, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (дНТФ),  $\text{MgCl}_2$ , буфер, фермент Taq-полимеразу и деионизированную стерильную воду. Амплификацию 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  $\text{Mg}^{2+}$  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 рН 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.

Специфичность полосы амплифицированной ДНК подтверждалось ее положением (размером) по отношению к маркерным фрагментам (100-1000 п.н. DNA Ladder, ЦНИИ Эпидемиологии, Москва; *pUC 19*, гидролизованная эндонуклеазой рестрикции *Hpa II*). Дополнительно размеры ампликонов определяли с помощью компьютерной программы Gene Profiler 4.03.

## **2.7 Подбор праймеров и флуоресцентных зондов для ПЦР в реальном времени**

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 компьютерных программ Unipro UGENE: 1.11.1 (<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).

## **2.8 Реакция амплификации в режиме реального времени**

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,  $C_t$ ) проводили в табличной и графической форме с помощью компьютерных программ.

## **2.9 Секвенирование продуктов амплификации и анализ полученных нуклеотидных последовательностей**

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 подвергали дальнейшей очистке добавлением смеси 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 флуориметром 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 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 программного пакета 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/>).

## **2.10 Заражение лабораторных животных**

Для экспериментальной работы по моделированию blastomycosis использовали белых мышей линии BALB/c с массой тела 18 - 20 г. Заражение осуществляли путем внутрибрюшинного введения белым мышам 1 мл суспензии клеток *B. dermatitidis* в 0,15 М NaCl (pH 7,2-7,4), концентрация клеток составила -  $1 \times 10^6$  кл/мл. Вскрытие экспериментальных животных проводили на 7, 14, 21 и 28 сутки после заражения. Части внутренних органов (лёгких, печени, селезёнки) и кровь исследовали методом ПЦР. Проводили посев секционного материала на агар Сабуро с 3 % дрожжевым экстрактом и с добавлением левомецетина (0,05 мг на 1 мл среды) с целью предотвращения роста бактериальной микрофлоры.

### **2.11 Статистическая обработка данных**

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

### ГЛАВА 3. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КОКЦИДИОИДОМИКОЗА, ГИСТОПЛАЗМОЗА И БЛАСТОМИКОЗА НА ОСНОВЕ КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ

#### 3.1 Культурально-морфологические особенности возбудителей кокцидиоидомикоза, гистоплазмоза и бластомикоза

В качестве основного диагностического критерия использовали морфологические характеристики штаммов исследуемых микроорганизмов. Основной целью микроскопического исследования являлся поиск видоспецифических структур. Основные особенности морфологии, используемые для диагностики, представлены в специальных определителях (Саттон Д. Фотергилл А., Ринальди М., 2001). Каждый вид микромицетов обладает 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.

Для идентификации микромицетов изучаемую культуру высевали на дифференциальную среду. Для мицелиальных грибов использовали среду Чапека, Сабуро и картофельный агар, для дрожжевых грибов - среду Сабуро. Дрожжевые формы *Histoplasma spp.* и *Blastomyces spp.* выращивали на агаре Френсиса, а паразитическую форму *Coccidioides spp.* получали на среде Конверса.

Морфология колоний *C.posadasii* и *C.immitis* на агаре Сабуро соответствовала классическому описанию. Поверхность колонии пушистая, цвет белый, обратная сторона сероватая. В жидкой среде Конверса при температуре 37 °C в атмосфере CO<sub>2</sub> (φ=10%) рост грибов наблюдался в виде сферул.

Микроскопический анализ мицелиальной формы возбудителей кокцидиоидомикоза подтвердил наличие микроморфологической картины свойственной данной группе микромицетов. Гифы гиалиновые, септированные, разветвленные (Рисунок 1). На гифах происходило образование темных,

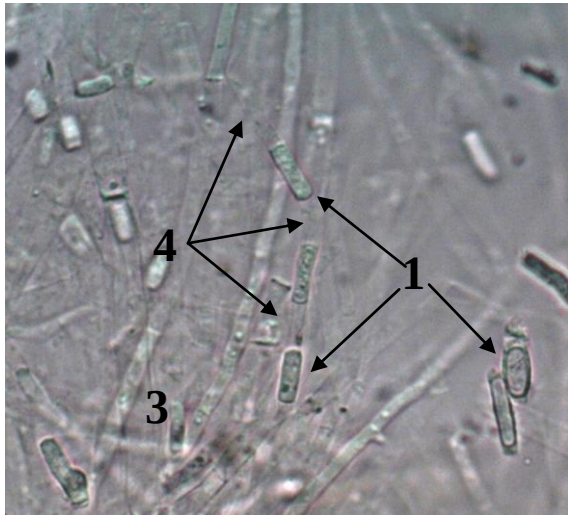


толстостенных артроконидий, разделенных тонкостенными, светлыми, клетками (клетки разобшители или дезъюнкторы).

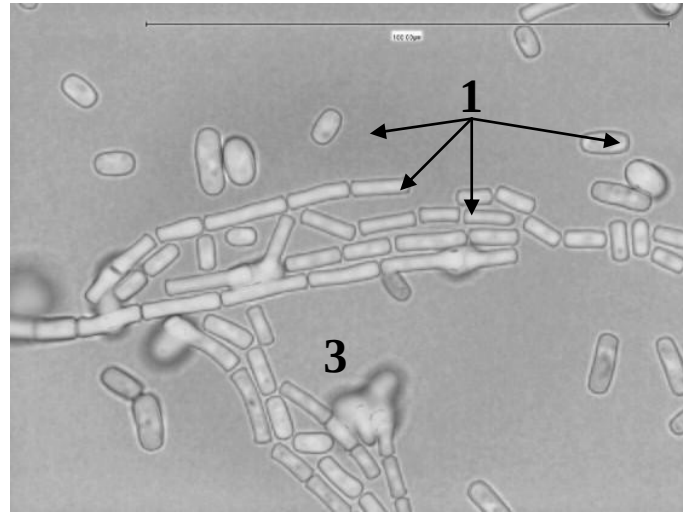
При температуре +28-30 °C на агаре Сабуро со значением pH ближе к кислому колонии штаммов *H.capsulatum* var. *duboisii* и *H.capsulatum* var. *capsulatum* имели бархатистую светло-коричневатую поверхность. Их обратная сторона - желтоватая. Однако при выращивании на средах, обогащенных белками (среда Френсиса) со значением pH, смещенным в щелочную сторону (pH = 7,6 - 7,8), и при температуре 37 °C формировались типичные дрожжеподобные колонии - белые, гладкие, кремовые.

Микроскопическое исследование мицелиальных штаммов *H.capsulatum* не выявило наличия высокой вариабельности морфологических признаков среди штаммов. Исследуемые грибы имели все классические микроскопические признаки рода *Histoplasma* (Рисунок 1). Гифы гиалиновые, септированные, конидиеносцы короткие, макроконидии крупные, круглые (8-20 мкм), толстостенные, бугорчатые, бесцветные. Микроконидии одноклеточные (2-6 мкм) бесцветные, округлые. Микроскопическое исследование мицелиальной формы не позволяло отличить *H.capsulatum* var. *duboisii* от *H.capsulatum* var. *capsulatum*, однако, отличия обнаруживались при росте в дрожжевой форме при температуре 37 °C на обогащенных питательных средах. Блостоконидии *H.capsulatum* var. *capsulatum* представлены округлыми, мелкими (2-6 мкм), почкующимися, тонкостенными дрожжевыми клетками. Для *H.capsulatum* var. *duboisii* характерно наличие крупных (8-15 мкм) дрожжевых клеток, почкующихся, в отличие от дрожжевой фазы *B.dermatitidis* на узком основании.

Мицелиальные колонии *B.dermatitidis* на агаре Сабуро формировали гладкие, слабо пушистые колонии от белого до бежевого цвета. Под микроскопом наблюдали бесцветные септированные гифы, конидии различного размера (2-10 мкм), бесцветные, грушевидные или шарообразные, одноклеточные, растущие одиночно на конидиеносцах или прямо на гифах. Конидиеносцы короткие, расположены латерально или терминально (Рисунок 1). Клетки дрожжевой формы крупные (8-14 мкм), сферические.



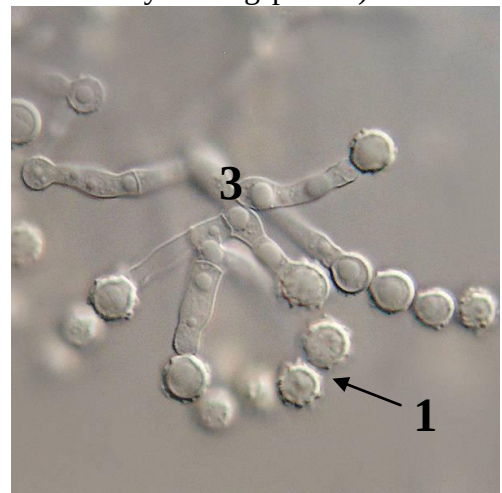
*Coccidioides posadasii* 36-S (Silveira)



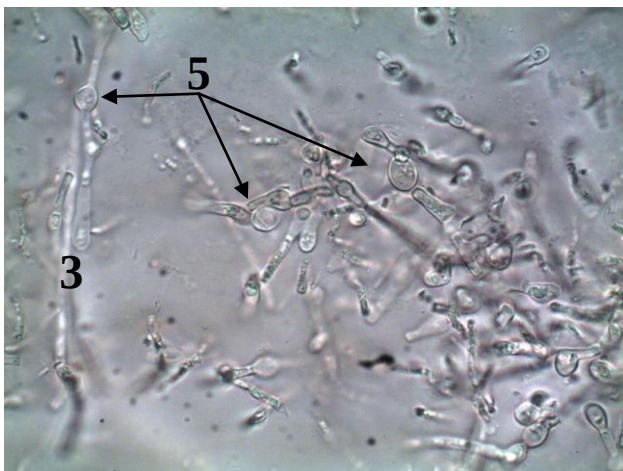
*Geotrichum* spp. (<http://thunderhouse4-yuri.blogspot.ca/>)



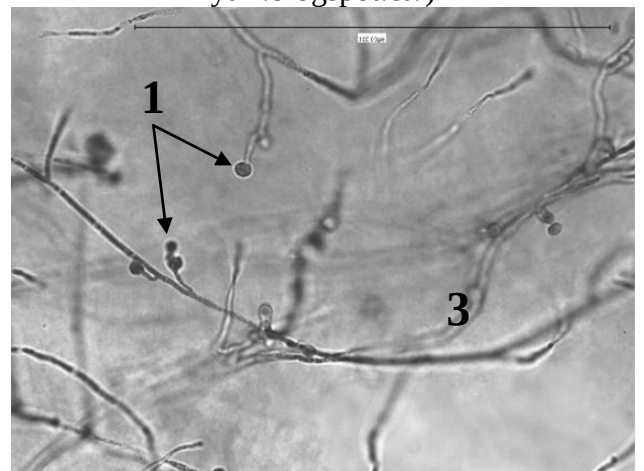
*Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* B-580



*Scopulariopsis brevicaulis* (<http://thunderhouse4-yuri.blogspot.ca/>)



*Blastomyces dermatitidis* 6/85



*Emmonsia* spp. (<http://thunderhouse4-yuri.blogspot.ca/>)

**Рисунок 1. Микроскопическое исследование морфологических структур некоторых штаммов возбудителей особо опасных микозов**

Условные обозначения морфологических элементов: 1 - конидии (для *Coccidioides* spp. - артроконидии; для *Histoplasma* spp. - макроконидии); 2 - микроконидии; 3 - гифы; 4 - клетки-дезьюнкторы; 5 - хламидоконидии

На рисунке 1 представлены результаты микроскопического исследования возбудителей особо опасных и некоторых оппортунистических микозов, на котором отчетливо видна схожесть их морфологических структур. Так, некоторые грибы, например, рода *Geotrichum* формируют однотипные с *C.posadasii* и *C.immitis* элементы. Многие грибы (например, *Scopulariopsis brevicaulis*) формируют бугристые конидии, аналогичные макроконидиям *Histoplasma capsulatum*. Следует отметить, что обнаруженные морфологические признаки *B.dermatitidis* аналогичны имеющимся у родов *Emmonsia spp.*, *Scedosporium spp.*, *Chrysosporium spp.* (Саттон Д. Фотергилл А., Ринальди М., 2001; Andreoni S., Farina C., Lombardi G., 2004).

При обнаружении схожих морфологических элементов не всегда возможно однозначно установить истинную видовую принадлежность исследуемых микромицетов на основании только микроскопического исследования, что, в конечном итоге, может привести к ошибкам диагностики.

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.

### **3.2 Изучение возможности идентификации возбудителей особо опасных микозов с помощью колориметрической тест-системы AUXACOLOR II**

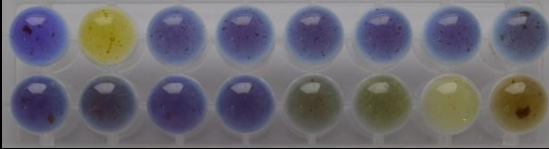
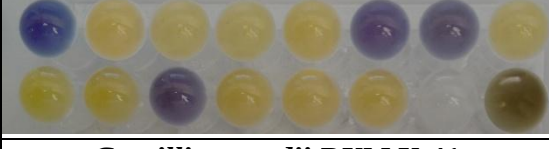
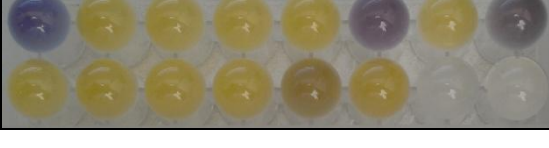
Учитывая сложности идентификации микромицетов на основе анализа макро- и микроморфологических признаков, ранее предпринимались попытки дифференциации возбудителей особо опасных микозов на основе их ферментативных свойств (Gilardi G.L., Laffer N.C., 1962; Blumer S., Kaufmanan L., 1968).

В настоящей работе для этой цели нами была использована система AUXACOLOR 2, которая позволяет определить способность дрожжевых и дрожжеподобных микромицетов ассимилировать различные сахара. Ранее данная тест-система для идентификации штаммов возбудителей особо опасных микозов не использовалась на практике.

Полученные нами результаты (Таблицы 3 и 4) в целом подтвердили указанные ранее биохимические особенности данной группы. Сахаролитическая активность представителей грибов родов *Blastomyces* и *Histoplasma* проявлялась лишь на 5-7-9 сутки в зависимости от штамма. Грибы родов *Histoplasma*, *Blastomyces*, показывают схожую друг с другом картину биохимической активности, ассимилируя глюкозу, ксилозу, арабинозу, а также проявляя ацетилгалактозаминидазную и фенолоксидазную активность.

Таблица 3

Результаты теста ассимиляции сахаров и ферментативной активности некоторых штаммов дрожжевых культур особо опасных и медицински-значимых микромицетов III-IV групп патогенности представленных в музее ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт

| Изображение результатов использования тест-системы                                  | Схематическое изображение результатов использования тест-системы |     |     |     |     |     |     |         |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------|
| <i>B.dermatitidis</i> 6/85                                                          | K-                                                               | GLU | MAL | SAC | GAL | LAC | RAF | INO     |
|    | -                                                                | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -       |
|                                                                                     | CEL                                                              | TRE | ADO | MEL | XYL | ARA | HEX | POX/PRO |
|                                                                                     | -                                                                | -   | -   | -   | +   | +   | +   | +       |
| <i>H.capsulatum</i> 6650                                                            | C.Neg                                                            | GLU | MAL | SAC | GAL | LAC | RAF | INO     |
|    | -                                                                | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -       |
|                                                                                     | CEL                                                              | TRE | ADO | MEL | XYL | ARA | HEX | POX/PRO |
|                                                                                     | +                                                                | -   | -   | -   | +   | +   | +   | +       |
| <i>Cr.neoformans</i> 866/181-A                                                      | C.Neg                                                            | GLU | MAL | SAC | GAL | LAC | RAF | INO     |
|   | -                                                                | +   | +   | +   | +   | -   | -   | +       |
|                                                                                     | CEL                                                              | TRE | ADO | MEL | XYL | ARA | HEX | POX/PRO |
|                                                                                     | +                                                                | +   | -   | +   | +   | +   | -   | +       |
| <i>C.guilliermondii</i> BKM Y-41                                                    | C.Neg                                                            | GLU | MAL | SAC | GAL | LAC | RAF | INO     |
|  | -                                                                | +   | +   | +   | +   | -   | +   | -       |
|                                                                                     | CEL                                                              | TRE | ADO | MEL | XYL | ARA | HEX | POX/PRO |
|                                                                                     | +                                                                | +   | +   | +   | +   | +   | -   | -       |

### Таблица 4

## Результаты колориметрического исследования музейных штаммов медицински-значимых микромицетов с помощью идентификационной тест-системы Auxacolor II

[illegible]

**Таблица 4 (продолжение)**

[illegible]

На основании проведенных исследований можно сделать вывод, что данная система не может быть использована для идентификации возбудителей особо опасных микозов, но может найти применение при дифференциации штаммов возбудителей различных инвазивных микозов в условиях работы Референс-центра по мониторингу за возбудителями глубоких микозов.

Особый интерес представляет фенолоксидазная активность микромицетов. Для многих медицински значимых грибов способность синтезировать меланин, посредством мембрансвязанного фермента фенолоксидазы, является важнейшим фактором патогенности. Это связано со способностью меланин-содержащих клеток противостоять воздействию активных форм кислорода (супероксид аниона и синглетного кислорода), формирующихся в процессе фагоцитоза грибных клеток макрофагами (Missall T.A., Lodge J.K., McEwen J.E., 2004). В организме млекопитающих субстанцией для синтеза меланина являются фенольные соединения, такие как L-DOPA и дофамин. Данные вещества в избытке содержатся в клетках нервной системы, что позволяет говорить о тропности фенолоксидазоположительных микромицетов к нейронам головного и спинного мозга (Casadevall A., Rosas A.L., Nosanchuk J.D., 2000). Способность к синтезу меланина обнаружена у диморфных грибов *Sporothrix schenckii*, *H.capsulatum*, *B.dermatitidis*, и *C.posadasii* (Romero-Martinez R., Wheeler M., Guerrero-Plata A., et al., 2000; Nosanchuk J.D., Gómez B.L., Youngchim S., et al., 2002; Nosanchuk J.D., van Duin D., Mandal P., et al., 2004; Nosanchuk J.D., Yu J.J., Hung C.Y., et al., 2007).

Полученные в настоящей работе данные указывают на недостатки методов идентификации микромицетов, основанных на определении фенотипических признаков. Это связано с высокой степенью вариабельности фенотипических свойств возбудителей особо опасных микозов, зависящих от различных условий культивирования, состава питательных сред, времени роста культуры.

Недостатки фенотипических методов идентификации возбудителей глубоких микозов обусловили необходимость создания принципиально новых подходов, основанных на анализе генома микромицетов. Так, для идентификации грибов родов *Coccidioides* и *Histoplasma* разработаны отечественные



амплификационные тест-системы в формате электрофоретической детекции и детекции в режиме реального времени (Ткаченко Г.А., Гришина М.А., Антонов В.А., и др., 2007; Вьючнова Н.В., Ткаченко Г.А., Гришина М.А., и др., 2012). В данной работе нами сконструирована ПЦР тест-система для обнаружения возбудителя бластомикоза и набор секвенационных праймеров, позволяющих проводить идентификацию микромицетов на основе секвенирования фрагментов их рибосомальных генов, что отражено в последующих главах работы.

## ГЛАВА 4. КОНСТРУИРОВАНИЕ АМПЛИФИКАЦИОННОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ С ДЕТЕКЦИЕЙ РЕЗУЛЬТАТОВ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ВОЗБУДИТЕЛЯ БЛАСТОМИКОЗА

### 4.1 Подбор и анализ праймеров и гибридизационных олигонуклеотидных зондов для детекции *Blastomyces dermatitidis*

Для идентификации *B. dermatitidis* в качестве ДНК - матрицы были выбраны участки гена *BYS-1*, кодирующего белок, активно экспрессирующийся в дрожжевой фазе роста *B. dermatitidis*, а также гена  $\alpha$ -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>).

При анализе гена *BYS-1 domain-containing protein* с помощью *on-line* алгоритма BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) выявлена его частичная гомология (на уровне 76 %) с последовательностью *Histoplasma capsulatum* (Рисунок 2). Аналогичное исследование гена  $\alpha$ -1,3-глюкансинтазы показало наличие гомологии (на уровне 93%) с последовательностью родственного микромицета *Emmonsia parva* (Рисунок 3). Несмотря на наличие достаточно высокой степени идентичности между выбранными последовательностями, имеющих отличий достаточно для выбора участков отжига праймеров и зонда в гетерологичных регионах.



**Рисунок 2. Гомология нуклеотидной последовательности гена *BYS-1* выявлена с помощью алгоритма BLASTn на сайте GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)**



**Рисунок 3. Гомология нуклеотидной последовательности гена  $\alpha$ -1,3-глюкансинтазы выявлена с помощью алгоритма BLASTn на сайте GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)**

Выбор, последовательностей олигонуклеотидных зондов и праймеров, осуществлен в соответствии с общими требованиями, используемыми в ПЦР. Анализ праймеров проводили совместно с сотрудниками лаборатории генодиагностики и типирования микроорганизмов Ткаченко Г.А. и Савченко С.С.

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°C, 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 5.

**Таблица 5**

**Последовательности олигонуклеотидных затравок и зондов**

| Праймеры и ДНК-зонды                       | Нуклеотидные последовательности праймеров и ДНК-зондов                                                            | Размер ампликона |
|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 1                                          | 2                                                                                                                 | 3                |
| Ген <i>BYS-1 domain-containing protein</i> |                                                                                                                   |                  |
| Bys-1F<br>Bys-2R<br>Bys-1P                 | 5'-TGTTC AAGCAGTGGGCAAAG-3'<br>5'-GGTGC GAGTTTCAGAGGATAGC-3'<br>5'-(FAM)-TGGCGGTACCTACAGTGAGCTATTTCCGCA-(RTQ1)-3' | 306 п.н.         |
| Ген $\alpha$ -1,3-глюкансинтазы            |                                                                                                                   |                  |
| BDags-1F<br>BDags-2R<br>BDags-2P           | 5'-GCGTTATTGAAGCCGATCCT-3'<br>5'-AACAGCCCGATTGTCCAAAG-3'<br>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/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/), NCBI, США). Обработка результатов компьютерного анализа проведена с помощью приложения Ugene.

С помощью данного приложения проведена визуализация участков гибридизации праймеров и зондов на выбранных последовательностях ДНК гена *BYS-1 domain-containing protein* (Рисунок 4) и гена  $\alpha$ -1,3-глюкансинтазы (Рисунок 5) и сравнение их с гомологичными регионами ДНК гетерологичных микромицетов. В результате компьютерного анализа показано, 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.

|                                            | <b>Bys-1F</b><br>→                      | <b>Bys-1P</b>                                               | <b>Bys-2R</b><br>←                          |
|--------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
|                                            | T G T T C A A G C A G T G G G C A A A G | T G G C G G T A C C T A C A G T G A G C T A T T T C G C C A | C G A T A G G A G A C T T T G A G C G T G G |
| <i>Blastomyces_dermatitidis_ATCC_26199</i> | . . . . .                               | . . . . .                                                   | . . . . .                                   |
| <i>Blastomyces_dermatitidis_SLH14081</i>   | . . . . .                               | . . . . .                                                   | . . . . .                                   |
| <i>Blastomyces_dermatitidis_ER-3</i>       | . . . . .                               | . . . . .                                                   | . . . . .                                   |
| <i>Blastomyces_dermatitidis_ATCC_18187</i> | . . . . .                               | . . . . .                                                   | . . . . .                                   |
| <i>Blastomyces_dermatitidis_ATCC_18188</i> | . . . . .                               | . . . . .                                                   | . . . . .                                   |
| <i>Coccidioides_immitis_RS</i>             | . . . . . C G G A                       | A T C . C A C G . . . . . T A . G . T G                     | . . . C G . . . . G . . . . .               |
| <i>Coccidioides_posadasii_C735</i>         | C C C . G . . . . . T                   | A T T . C T C T T G C G A G . . . . . G . A A .             | A C G . . . . . T C C . T                   |
| <i>Histoplasma_capsulatum_NAm1</i>         | A . . . . . T . . . . .                 |                                                             |                                             |
| <i>Paracoccidioides_brasiliensis_Pb18</i>  | . . C C A . . . . . T                   | G T T . . . C C G G C G A C C . . . . .                     | T T T . C . . . . . G . A                   |
| <i>Paracoccidioides_brasiliensis_Pb03</i>  |                                         |                                                             | G . . . . . C C T A A A C .                 |
| <i>Paracoccidioides_brasiliensis_Pb01</i>  | . . . . . A . T T T T                   | G T T . . . C . G G . G A C C . . . . .                     |                                             |
| <i>Trichophyton_rubrum_CBS_118892</i>      | . . . . . A . . . . . T C               | A A C G T C . . . . . G . G A . . A A . G                   | T T . . . . . A . . . . . A T A             |
| <i>Arthroderma_gypseum_CBS_118893</i>      | G T C . . . . . G G A                   | . T A . . . . . C . G . C G . . C G . .                     | . . . . . A A A . T T . G . A               |

Рисунок 4. Участки отжига праймеров Bys-1F, Bys-2R и зонда Bys-1P. Точкой «.» обозначено совпадение нуклеотидов

|                                            | <b>BDags-1F</b><br>→                    | <b>BDags-2P</b>                                 | <b>BDags-2R</b><br>←                    |
|--------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------|
|                                            | G C G T T A T T G A A G C C G A T C C T | G A G A T G C A G C G C A A T T G C A A T C C C | G A A A C C T G T T A G C C C G A C A A |
| <i>Blastomyces_dermatitidis_ATCC_26199</i> | . . . . .                               | . . . . .                                       | . . . . .                               |
| <i>Blastomyces_dermatitidis_SLH14081</i>   | . . . . .                               | . . . . .                                       | . . . . .                               |
| <i>Blastomyces_dermatitidis_ER-3</i>       | . . . . .                               | . . . . .                                       | . . . . .                               |
| <i>Blastomyces_dermatitidis_ATCC_18187</i> | . . . . .                               | . . . . .                                       | . . . . .                               |
| <i>Blastomyces_dermatitidis_ATCC_18188</i> | . . . . .                               | . . . . .                                       | . . . . .                               |
| <i>Coccidioides_immitis_RS</i>             | C T . A . T . . . . .                   | C . T T G T T T . . . . .                       | . T C . . . . . T . . . . .             |
| <i>Coccidioides_posadasii_C735</i>         | C T . A . T . . . . .                   | . G A . . A . . . . . G A                       | . T . . . . . A . . C G                 |
| <i>Histoplasma_capsulatum_NAm1</i>         | . . . . . T A C . A T .                 | . . . . . A G A A G C . G . .                   |                                         |
| <i>Paracoccidioides_brasiliensis_Pb18</i>  | . . . . . G . G G                       | A . . C G . . G . . . . . T A .                 | C T . . A G . . . . . G                 |
| <i>Paracoccidioides_brasiliensis_Pb01</i>  | . . . . . C C G T .                     |                                                 | C T . . A G . . . . . G                 |
| <i>Trichophyton_rubrum_CBS_118892</i>      | C . . . . . G A .                       | C T C C . . . . . G C A G G                     | A . . . . . A C T . . .                 |
| <i>Arthroderma_gypseum_CBS_118893</i>      | . G . G . . . . . C                     | . G A . G A G C T T . . . . . G C . G T G       | . . . . . T T T . G . G                 |

Рисунок 5. Участки отжига праймеров BDags-1F, BDags-2R и зонда BDags-2P. Точкой «.» обозначено совпадение нуклеотидов

Созданный на основе гена *BYS-1* зонд, обозначенный нами как **Bys-1P**, был гомологичен последовательности участка ДНК амплифицируемого парой праймеров **Bys-1F** и **Bys-2R**. Для обеспечения флуоресцентной детекции результатов при проведении ПЦР в реальном времени, нацеленной на последовательность гена  $\alpha$ -1,3-глюкансинтазы, сконструирован зонд **BDags-2P**, используемый с праймерами **BDags-1F/BDags-2R**. Этапы подбора зондов аналогичны описанной выше схеме подбора праймеров. Оба зонда были мечены с 5'-конца флуоресцентной меткой FAM, с 3'-конца – молекулой гасителя флуоресценции BHQ1. Специфичность зондов проверяли с использованием *on-line* приложения BLASTn и программы Ugene. Идентичные участки сконструированных флуоресцентных зондов **Bys-1P** и **BDags-2P** с нуклеотидными последовательностями гетерологичных микроорганизмов не обнаружены, что свидетельствует об их высокой специфичности.

Структура выбранных пар праймеров и зондов (образование димеров, шпилек и других вторичных структур) дополнительно проанализирована с использованием *on-line* приложения по анализу праймеров на сайте <http://eu.idtdna.com/site> (Рисунки 6 и 7).

A)

| Structure Name | Im...                                                                               | $\Delta G$ (kcal.mole <sup>-1</sup> ) | TM (°C) | $\Delta H$ (kcal.mole <sup>-1</sup> ) | $\Delta S$ (cal.K <sup>-1</sup> mole <sup>-1</sup> ) |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|---------|---------------------------------------|------------------------------------------------------|
| 1              |  | -1.4                                  | 44.9    | -22.4                                 | -70.43                                               |

B)

| Structure Name | Im...                                                                               | $\Delta G$ (kcal.mole <sup>-1</sup> ) | TM (°C) | $\Delta H$ (kcal.mole <sup>-1</sup> ) | $\Delta S$ (cal.K <sup>-1</sup> mole <sup>-1</sup> ) |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|---------|---------------------------------------|------------------------------------------------------|
| 1              |  | 0.54                                  | 17      | -19.8                                 | -68.23                                               |
| 2              |  | 0.81                                  | 10.6    | -15.9                                 | -56.04                                               |
| 3              |  | 1.03                                  | -5.4    | -9.1                                  | -33.99                                               |
| 4              |  | 1.09                                  | 5.9     | -15.9                                 | -56.98                                               |
| 5              |  | 1.28                                  | -12.1   | -9                                    | -34.47                                               |

Рисунок 6. Термодинамические характеристики образования шпилечных структур праймера *BYS-1F* (A) и праймера *BYS-2R* (B)



A)

| Structure Name | Image                                                                             | $\Delta G$ (kcal.mole <sup>-1</sup> ) | T <sub>M</sub> (°C) | $\Delta H$ (kcal.mole <sup>-1</sup> ) | $\Delta S$ (cal.K <sup>-1</sup> mole <sup>-1</sup> ) |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------|---------------------------------------|------------------------------------------------------|
| 1              |  | -0.23                                 | 28.5                | -20.3                                 | -67.3                                                |
| 2              |  | 0.54                                  | 16.1                | -17.5                                 | -60.49                                               |
| 3              |  | 0.73                                  | 14.8                | -20.7                                 | -71.89                                               |

B)

| Structure Name | Image                                                                             | $\Delta G$ (kcal.mole <sup>-1</sup> ) | T <sub>M</sub> (°C) | $\Delta H$ (kcal.mole <sup>-1</sup> ) | $\Delta S$ (cal.K <sup>-1</sup> mole <sup>-1</sup> ) |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------|---------------------------------------|------------------------------------------------------|
| 1              |  | 0.58                                  | 15.4                | -17.4                                 | -60.31                                               |
| 2              |  | 0.94                                  | 7                   | -14.6                                 | -52.11                                               |
| 3              |  | 1.07                                  | 3.1                 | -13.5                                 | -48.86                                               |
| 4              |  | 1.28                                  | 0.9                 | -14.6                                 | -53.27                                               |
| 5              |  | 1.43                                  | -5.3                | -12.6                                 | -47.05                                               |

**Рисунок 7. Термодинамические характеристики образования шпилечных структур праймера BDags-1F (A) и праймера BDags-2R (B)**

Как видно из результатов анализа, представленных на рисунках 6 и 7, образующиеся вторичные структуры не способны повлиять на протекание процесса амплификации. Об этом свидетельствуют показатели энергии Гиббса  $\Delta G$ , так как химическая реакция имеет потенциальную возможность протекания при  $\Delta G < 0$ . Температура плавления всех возможных вторичных структур не превышает температуры отжига праймеров на матрице. Только для праймера BYS1F этот термодинамический показатель меньше нулевого значения, и для формирующейся шпилечной структуры соответствует  $\Delta G = -1,4$  kcal/mole. Однако температура плавления данной шпилечной структуры 44,9 °C, что ниже расчетной температуры отжига праймеров в реакции амплификации.

Компьютерное моделирование реакции амплификации проведено на основе онлайн приложения Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>), которое подтвердило уникальность формирования специфических ампликонов *B.dermatitidis*. В результате данного анализа показано, что праймеры обозначенные нами BYS1F (прямой праймер) и BYS2R (обратный праймер) специфически

амплифицируют лишь участок гена, кодирующего белок гена *BYS-1* (Рисунок 8), а праймеры, обозначенные нами как BDags-1F и BDags-2R – фрагмент гена  $\alpha$ -1,3-глюкансинтазы (Рисунок 9).

#### Primer pair 1

|                | Sequence (5'→3')       | Length | Tm    | GC%   |
|----------------|------------------------|--------|-------|-------|
| Forward primer | TGTTCAAGCAGTGGGCAAAG   | 20     | 59.25 | 50.00 |
| Reverse primer | GGTGCGAGTTTCAGAGGATAGC | 22     | 61.06 | 54.55 |

#### Products on target templates

>[NW\\_003101678.1](#) *Ajellomyces dermatitidis* SLH14081 genomic scaffold supercont1.5

product length = 306

Features associated with this product:

[BYS1 domain-containing protein](#)

|                |         |                        |         |
|----------------|---------|------------------------|---------|
| Forward primer | 1       | TGTTCAAGCAGTGGGCAAAG   | 20      |
| Template       | 2477716 | .....                  | 2477697 |
| Reverse primer | 1       | GGTGCGAGTTTCAGAGGATAGC | 22      |
| Template       | 2477411 | .....                  | 2477432 |

Рисунок 8 Результаты компьютерного анализа праймеров с помощью on-line программы Primer-BLAST гена *BYS-1*

#### Primer pair 1

|                | Sequence (5'→3')     | Length | Tm    | GC%   |
|----------------|----------------------|--------|-------|-------|
| Forward primer | GCGTTATTGAAGCCGATCCT | 20     | 58.42 | 50.00 |
| Reverse primer | AACAGCCCGATTGTCCAAAG | 20     | 58.75 | 50.00 |

#### Products on target templates

>[NW\\_003101682.1](#) *Ajellomyces dermatitidis* SLH14081 genomic scaffold supercont1.1

product length = 178

|                |         |                      |         |
|----------------|---------|----------------------|---------|
| Forward primer | 1       | GCGTTATTGAAGCCGATCCT | 20      |
| Template       | 5520046 | .....                | 5520065 |
| Reverse primer | 1       | AACAGCCCGATTGTCCAAAG | 20      |
| Template       | 5520223 | .....                | 5520204 |

Рисунок 9. Результаты компьютерного анализа праймеров с помощью on-line программы Primer-BLAST гена  $\alpha$ -1,3-глюкансинтазы

Рисунки 8 и 9 свидетельствуют о том, что подобранные праймеры способны специфически амплифицировать лишь целевой участок *B. dermatitidis*. Эти факты

являются важным условием для использования данных праймеров в дальнейшей работе по конструированию амплификационной тест-системы для обнаружения ДНК возбудителя бластомикоза.

#### **4.2 Оптимизация условий для постановки полимеразной цепной реакции в режиме реального времени на препаратах ДНК штаммов возбудителя бластомикоза**

На первом этапе исследования проведен подбор тестового штамма, определены оптимальные концентрации ингредиентов и режимы реакции амплификации. Отработку оптимальных условий проведения ПЦР осуществляли с использованием ДНК, выделенной из проб, содержащих *B.dermatitidis* 6/85 в концентрации  $1 \times 10^7$  м.к./мл. Реакцию амплификации проводили в режиме реального времени.

Параметром, определяющим специфичность и чувствительность реакции, является температура отжига праймеров. Математический анализ этого показателя позволяет получить лишь близкие к оптимальным теоретически рассчитанные температуры. Соответственно точные значения этого параметра определяют опытным путем. Расчетный интервал температур приходится на диапазон от 55 °С до 65 °С. Эти значения получены после применения нами программ Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) и PrimerQuest (<http://eu.idtdna.com/site>). Реакцию амплификации в интервале расчетных температур проводили на аппарате «Rotor-Gene 6000» с температурным шагом в 2 °С. В результате исследований для пары праймеров **Bys-1F/Bys-2R** была выбрана в качестве оптимальной температура 60 °С. Для пары праймеров **BDags-1F/BDags-2R** оптимальная температура отжига составила 55° С.

Содержание ионов  $Mg^{2+}$  в реакционной смеси является другим определяющим эффективность ПЦР параметром. Для определения оптимальной концентрации этого компонента варьировали содержание  $MgCl_2$  от 1 мМ до 3 мМ. При этом наилучшие показатели эффективности ПЦР наблюдали при

концентрации  $MgCl_2$  2 мМ. Это количество ионов  $Mg^{2+}$  было оптимальным для всех исследуемых праймеров.

Рабочая концентрация праймеров составила 12 пМ. Конечная концентрация дезоксинуклеозидтрифосфатов для всех тестируемых пар праймеров составляла 200 мкМ дНТФ.

Эмпирически было установлено оптимальное количество циклов амплификации, которое составило 45 циклов. Первые 5 циклов проводили без детекции флуоресценции.

Итог теоретических расчетов и основные параметры реакции амплификации представлены в таблицах 6 и 7.

Таблица 6

**Оптимальная программа термоциклирования для обнаружения гена *BYS-1***

| Этап            | «Rotor-Gene 6000» |            |                   |
|-----------------|-------------------|------------|-------------------|
|                 | Температура, °C   | Время      | Количество циклов |
| Денатурация     | 95°C              | 10 сек.    | 45                |
| Отжиг/Элонгация | 60° C             | 1 мин сек. | 45                |

Таблица 7

**Оптимальная программа термоциклирования для обнаружения гена  $\alpha$ -1,3-глюкансинтазы**

| Этап        | «Rotor-Gene 6000» |         |                   |
|-------------|-------------------|---------|-------------------|
|             | Температура, °C   | Время   | Количество циклов |
| Денатурация | 95°C              | 10 сек. | 45                |
| Отжиг       | 55° C             | 20 сек. | 45                |
| Элонгация   | 72° C             | 20 сек. | 45                |

Реакционная смесь для проведения ПЦР содержала: буфер для Taq-полимеразы (НПФ «ДНК-Технология»),  $MgCl_2$  - 2 мМ; 2,5 мМ каждого из четырёх дезоксирибонуклеозидтрифосфатов; специфические прямые и обратные праймеры по 12 пМ, зонд 6 пМ, 12 ед. фермента Taq-полимеразы и 10 мкл исследуемой пробы ДНК. В качестве отрицательного контроля использовали пробу стерильной дистиллированной воды.

Условия ПЦР подбирались с учетом проведения реакции амплификации в режиме реального времени на приборе «Rotor-Gene 6000» («Corbett Research», Австралия).

#### 4.3 Анализ чувствительности и специфичности сконструированных праймеров и зондов для обнаружения возбудителя бластомикоза

При конструировании амплификационной тест-системы необходима оценка параметров аналитической специфичности и чувствительности праймеров и зондов.

С этой целью была проведена серия экспериментов с использованием чистых культур возбудителей бластомикоза. Для определения чувствительности ПЦР со сконструированными праймерами и зондами использовали кратные разведения взвесей грибов штаммов *B.dermatitidis* 6/85, *B.dermatitidis* 2, *B.dermatitidis* 9 в концентрациях от  $1 \times 10^1$  до  $1 \times 10^7$  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  $1 \times 10^4$  кл/мл. Для праймеров **Bys-1F/Bys-2R** и зонда **Bys-1P** предел обнаружения был на уровне  $1 \times 10^5$  кл/мл (Таблица 8).

Таблица 8

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    |                    |                    |                    |
|                            | <sup>2</sup><br>10 | <sup>3</sup><br>10 | <sup>4</sup><br>10 | <sup>5</sup><br>10 | <sup>2</sup><br>10 | <sup>3</sup><br>10 | <sup>4</sup><br>10 | <sup>5</sup><br>10 |
| <i>B.dermatitidis</i> 2    | -                  | -                  | -                  | +                  | -                  | -                  | +                  | +                  |
| <i>B.dermatitidis</i> 9    | -                  | -                  | +                  | +                  | -                  | +                  | +                  | +                  |
| <i>B.dermatitidis</i> 6/85 | -                  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                  |

В качестве примера на рисунках 10 и 11 представлены кривые накопления флуоресцентного сигнала при проведении real-time PCR штамма *B.dermatitidis*

6/85 с использованием разработанных наборов праймеров **BDags-1F/BDags-2R** и зонда **BDags-2P** и **Bys-1F/Bys-2R** и зонда **Bys-1P**.

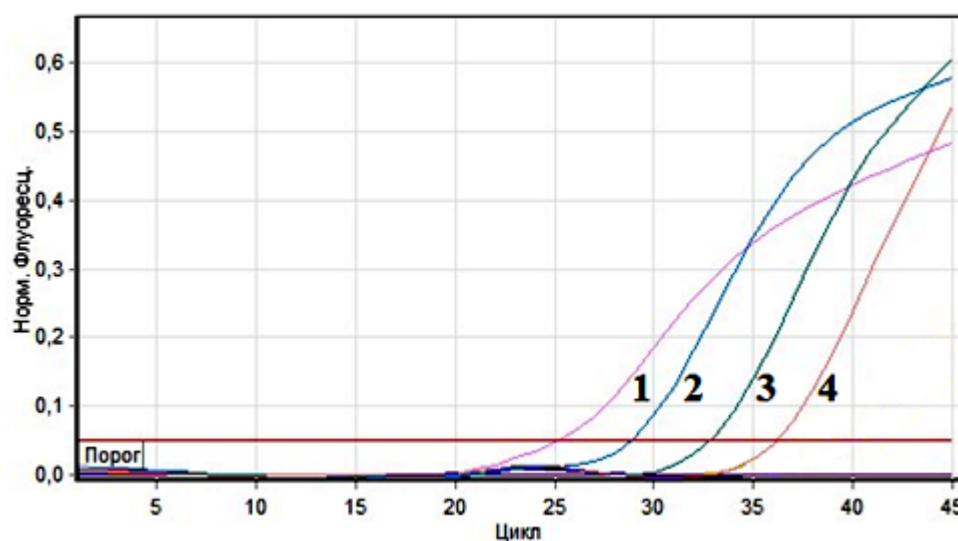


Рисунок 10. Кривые накопления продуктов амплификации с праймерами **BDags-1F** - **BDags-2R**

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

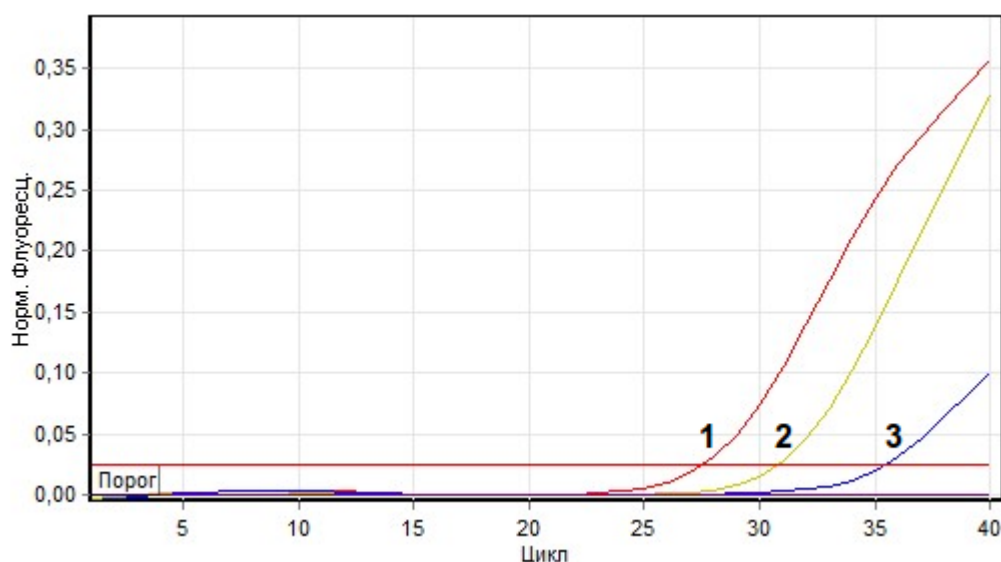


Рисунок 11. Кривые накопления продуктов амплификации с праймерами **Bys-1F/Bys-2R**

1. *B.dermatitidis* 6/85 концентрация  $1 \times 10^5$  кл/мл - пороговый цикл 27,62
2. *B.dermatitidis* 6/85 концентрация  $1 \times 10^4$  кл/мл - пороговый цикл 30,82
3. *B.dermatitidis* 6/85 концентрация  $1 \times 10^3$  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. При проведении реакции амплификации с пробами чистых культур микромицетов родов *Coccidioides spp.*, *Histoplasma spp.*, и микромицетами III-IV групп патогенности, использовали взвеси микромицетов в концентрации  $1 \times 10^7$  кл/мл. Во всех случаях были получены отрицательные результаты (Таблица 9), что являлось свидетельством высокой специфичности используемых систем олигонуклеотидов для обнаружения возбудителя бластомикоза. Это подтвердило результаты анализа *in silico* представленные в подглаве 4.1.

Таблица 9

Результаты амплификации с использованием праймеров Bys-1F/Bys-2R и BDags1F/BDags2R при анализе ДНК музейных штаммов гомологичных и гетерологичных видов микромицетов. "+" - положительный результат ПЦР, "-" - отрицательный результат ПЦР

| №<br>п/п | Штаммы                                              | Праймеры      |                 |
|----------|-----------------------------------------------------|---------------|-----------------|
|          |                                                     | Bys-1F/Bys-2R | BDags1F/BDags2R |
| 1        | <i>B. dermatitidis</i> 2                            | +             | +               |
| 2        | <i>B. dermatitidis</i> 9                            | +             | +               |
| 3        | <i>B. dermatitidis</i> 6/85                         | +             | +               |
| 4        | <i>H. capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i> 6650    | -             | -               |
| 5        | <i>H. capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i> 6652    | -             | -               |
| 6        | <i>H. capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i> J-185-P | -             | -               |
| 7        | <i>H. capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i> 73002   | -             | -               |
| 8        | <i>H. capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i> 73004   | -             | -               |
| 9        | <i>H. capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i> B-580   | -             | -               |
| 10       | <i>H. capsulatum</i> var. <i>duboisii</i> BM-87     | -             | -               |
| 11       | <i>H. capsulatum</i> var. <i>duboisii</i> B-681     | -             | -               |
| 12       | <i>H. capsulatum</i> var. <i>duboisii</i> 630       | -             | -               |
| 13       | <i>H. capsulatum</i> var. <i>farciminosum</i> 12/89 | -             | -               |
| 14       | <i>C. immitis</i> M-11                              | -             | -               |
| 15       | <i>C. immitis</i> 333                               | -             | -               |
| 16       | <i>C. immitis</i> 34                                | -             | -               |
| 17       | <i>C. immitis</i> 158                               | -             | -               |
| 18       | <i>C. immitis</i> 46-P                              | -             | -               |
| 19       | <i>C. immitis</i> 46                                | -             | -               |
| 20       | <i>C. posadasii</i> 36-S                            | -             | -               |
| 21       | <i>C. posadasii</i> 51                              | -             | -               |
| 22       | <i>Cryptococcus neoformans</i> 9/22                 | -             | -               |
| 23       | <i>Candida glabrata</i> BKM Y-1481                  | -             | -               |

Таблица 9 (продолжение)

| №<br>п/п | Штаммы                                       | Праймеры      |                 |
|----------|----------------------------------------------|---------------|-----------------|
|          |                                              | Bys-1F/Bys-2R | BDags1F/BDags2R |
| 24       | <i>Candida guilliermondii</i> BKM Y-41       | -             | -               |
| 25       | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> BKM Y-339    | -             | -               |
| 26       | <i>Geotrichum fermentans</i> BKM Y-813       | -             | -               |
| 27       | <i>Fusarium javanicum</i> (solani) BKM F-134 | -             | -               |
| 28       | <i>Absidia hyalospora</i> BKM F-1435         | -             | -               |
| 29       | <i>Aspergillus fumigatus</i> BKM F-753       | -             | -               |
| 30       | <i>Phialophora verrucosa</i> BKM F-1990      | -             | -               |
| 31       | <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> BKM F-406  | -             | -               |

Полученные результаты свидетельствуют о достаточном уровне аналитической чувствительности и специфичности сконструированных наборов реагентов для амплификации специфических регионов генов *BYS-1* и  $\alpha$ -1,3-глюкансинтазы, соответствующих общепринятым требованиям к разрабатываемым амплификационным тест-системам (Ребриков Д.В., Саматов Д.В., Трофимов Д.Ю. и др., 2009).

Обе пары праймеров и зонды к ним (**Bys-1F/Bys-2R** и **BDags1F/BDags2R**) не детектировали ДНК гетерологичных видов микромицетов. В то же время при исследовании ДНК чистых культур, чувствительность разных пар праймеров отличалась. Наименьшей аналитической чувствительностью обладала пара **Bys-1F/Bys-2R**, выявляя ДНК всех штаммов *B.dermatitidis* в минимальной концентрации  $1 \times 10^5$  кл/мл, в то время как пара праймеров **BDags1F/BDags2R** - в концентрации  $1 \times 10^4$  кл/мл. Исходя из этого, набор реагентов с системой праймеров **Bys-1F/Bys-2R** и зондом **Bys-1P**, рекомендован нами в качестве дополнительного критерия идентификации при уточнения видовой принадлежности исследуемого микромицета. Для дальнейшей работы в целях создания диагностической тест-системы использовали праймеры **BDags1F/BDags2R** и зонд **BDags-2P**.



#### 4.4 Использование полимеразной цепной реакции для обнаружения возбудителя бластомикоза при экспериментальной инфекции

Учитывая высокие показатели аналитической чувствительности и специфичности разработанных праймеров **BDags1F/BDags2R** и флуоресцентного зонда **BDags-2P** для идентификации *B. dermatitidis*, на следующем этапе работы была изучена их диагностическая информативность при моделировании бластомикоза на белых мышах.

Кроме того, в исследовании использовали человеческую кровь, контаминированную клетками *B. dermatitidis*, для оценки возможности применения праймеров в целях диагностики заболевания у человека. Для этого использовали взвесь грибных клеток *B. dermatitidis* 6/85 в дрожжевой форме с концентрацией от  $1 \times 10^5$  кл/мл до  $1 \times 10^1$  кл/мл.

В результате работы установлено, что праймеры **BDags-1F/BDags-2R** способны детектировать ДНК микромицета в крови в концентрации от  $1 \times 10^4$  кл/мл. Результаты реакции представлены на рисунке 12.

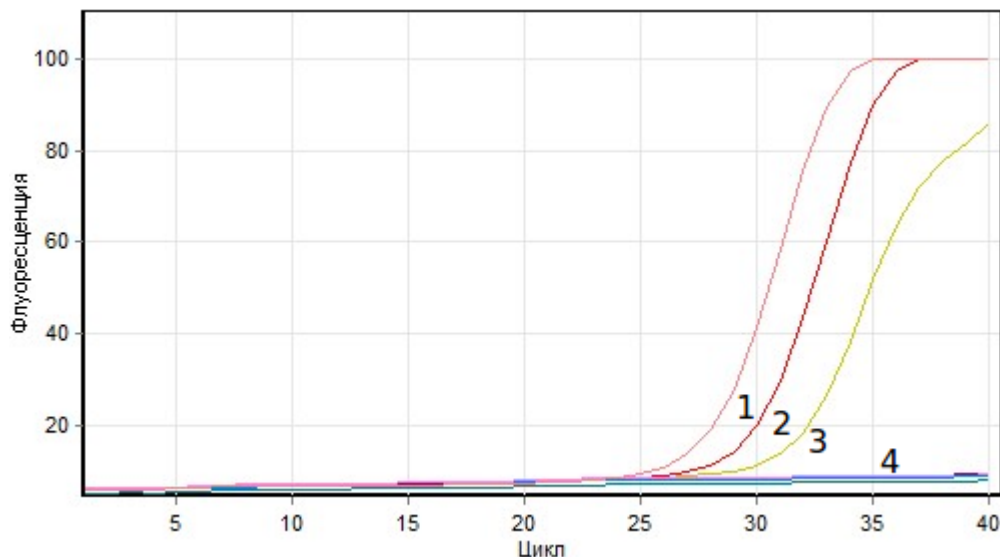


Рисунок 12. Кривые флуоресценции накопления продуктов амплификации с праймерами BDags-1F/BDags-2R

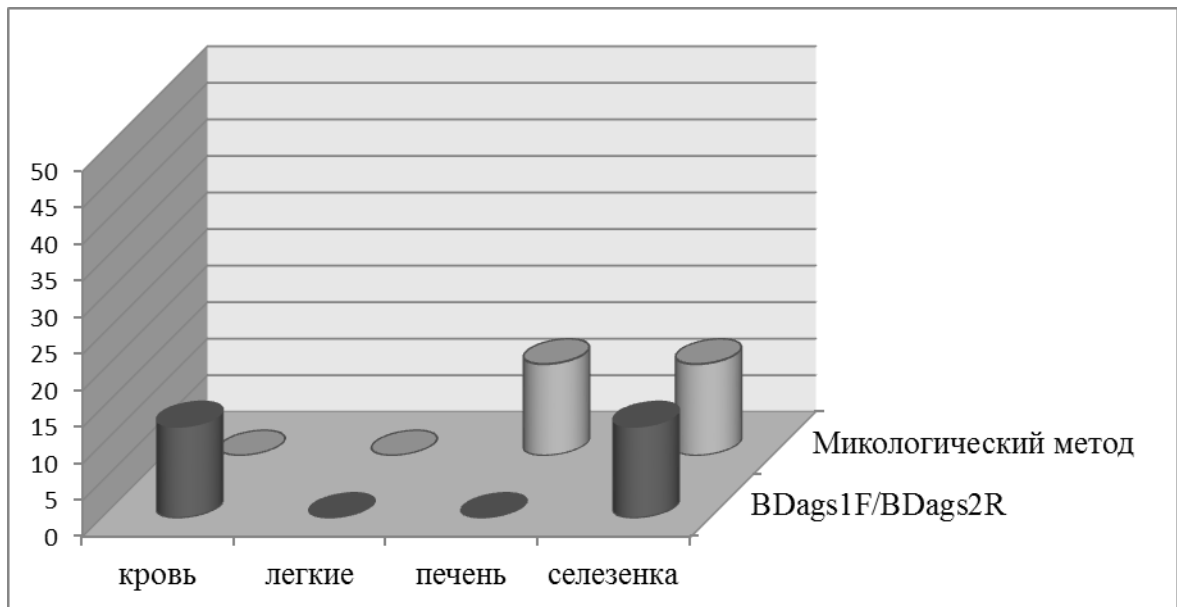
Примечание.

1. Положительный контроль K+ - пороговый цикл 22,66
2. *B. dermatitidis* 6/85 концентрация  $1 \times 10^5$  кл/мл - пороговый цикл 24,67
3. *B. dermatitidis* 6/85 концентрация  $1 \times 10^4$  кл/мл - пороговый цикл 26,29
4. *B. dermatitidis* 6/85 концентрация  $10^3 - 10^1$  кл/мл - значения ниже порогового

Для стандартизации эксперимента при моделировании инфекции использовали взвесь дрожжевой культуры с концентрацией  $1 \times 10^6$  кл/мл. Для реакции амплификации отбор секционного материала от инфицированных белых мышей осуществляли на 7, 14, 21 и 28 сутки после заражения. Исследование биологических проб с помощью ПЦР в режиме реального времени проводили параллельно с культуральным (микологическим) методом.

При внутрибрюшинном заражении у восприимчивых животных может развиваться диссеминированный бластомикоз. Вскрытие животных на 7 сутки после заражения обусловлено тем, что данный период совпадает со сроком манифестации бластомикоза.

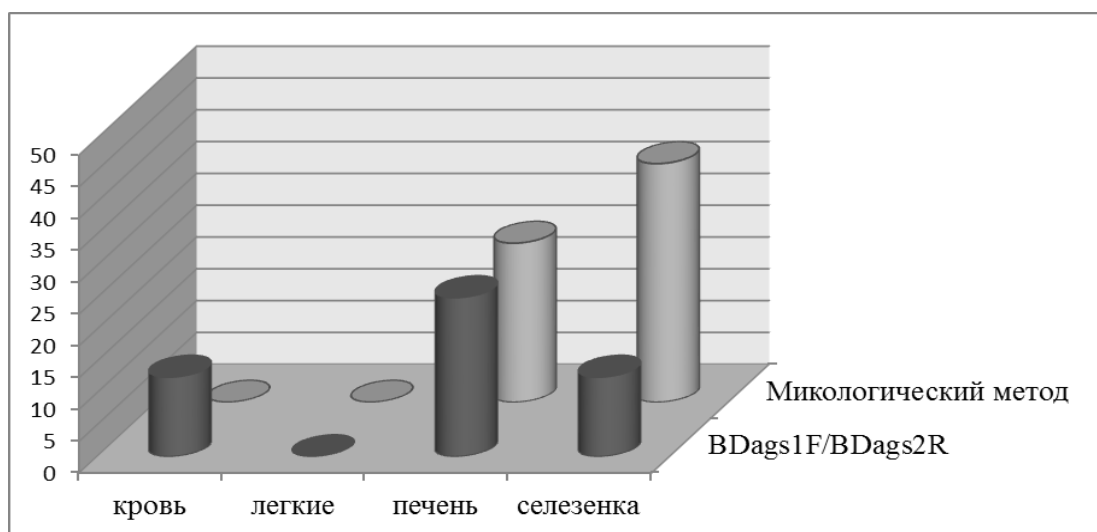
Однако при вскрытии зараженных белых мышей макроскопических изменений внутренних органов выявлено не было. ДНК *B.dermatitidis* 6/85 обнаружена методом ПЦР в 12,5 % проб селезенки и крови. При исследовании секционного материала с помощью культурального метода рост *B.dermatitidis* 6/85 выявлен в пробах печени и селезенки в 12,5 % (Рисунок 13).



**Рисунок 13. Результаты обнаружения возбудителя бластомикоза при экспериментальной инфекции на 7 сутки заболевания. Заражение мышей осуществлено клетками *B.dermatitidis* 6/85 в дрожжевой форме**

**Примечание: по оси ординат - % положительных результатов**

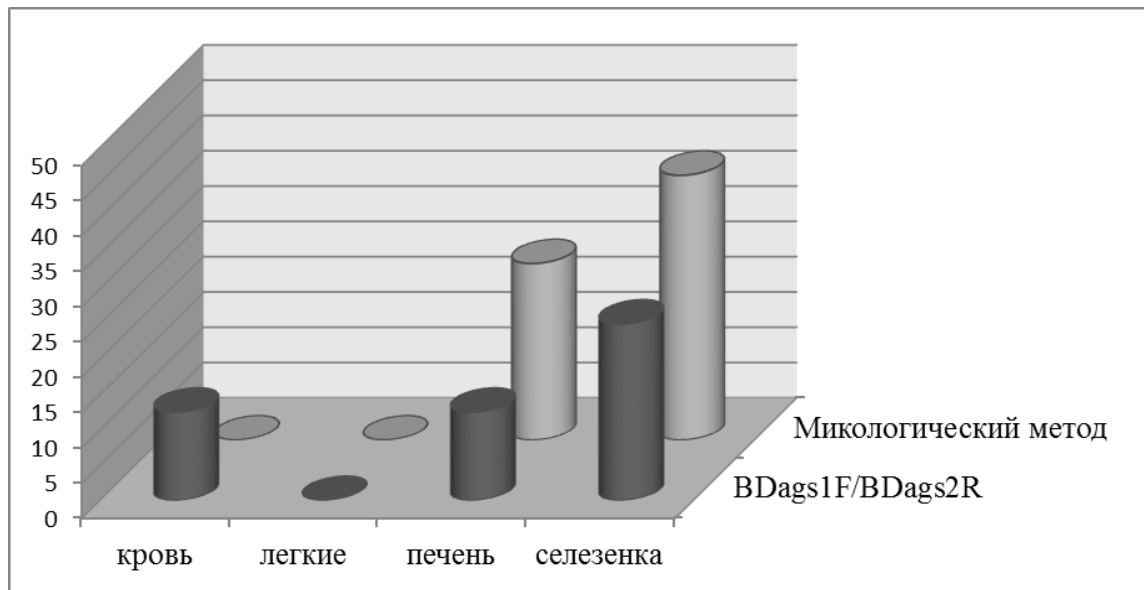
На 14 сутки после заражения, методом ПЦР ДНК *B.dermatitidis* 6/85 обнаружена в 12,5% проб крови, 25% проб печени и 12,5% проб селезенки. При использовании микологического метода рост культуры микромицета выявлен в 25% проб печени и 37,5% проб селезенки (Рисунок 14).



**Рисунок 14. Результаты обнаружения возбудителя бластомикоза при экспериментальной инфекции на 14 сутки заболевания. Заражение мышей осуществлено клетками *B.dermatitidis* 6/85 в дрожжевой форме**

**Примечание: по оси ординат - % положительных результатов**

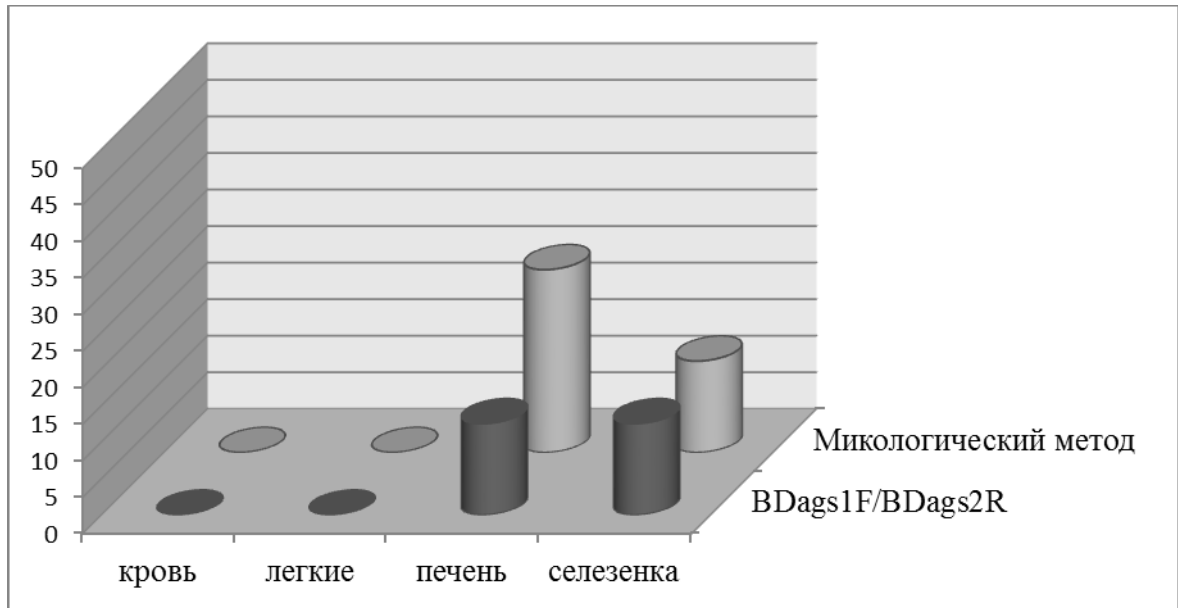
На 21 сутки возбудитель бластомикоза микологическим методом обнаруживали в 25% проб печени и 37,5% проб селезенки. При осмотре органов брюшной полости мышей при вскрытии отмечено наличие полнокровия и увеличения печени и селезенки зараженных животных. Методом ПЦР ДНК *B.dermatitidis* 6/85 выявлена в 12,5% проб печени, крови, и в 25% проб селезенки (Рисунок 15).



**Рисунок 15. Результаты обнаружения возбудителя бластомикоза при экспериментальной инфекции на 21 сутки заболевания. Заражение мышей осуществлено клетками *B.dermatitidis* 6/85 в дрожжевой форме**

**Примечание: по оси ординат - % положительных результатов**

При вскрытии зараженных животных на 28 сутки в брюшной полости некоторых мышей были обнаружены узелковые образования на брюшине, брыжейке, в некоторых случаях на печени и селезенке. Поражения носили характер уплотнения. ДНК возбудителя бластомикоза обнаружена в 12,5% проб печени и селезенки. При микологическом посеве рост культуры микроскопического гриба наблюдался в 25% проб печени и 12,5% проб селезенки (Рисунок 16).



**Рисунок 16. Результаты обнаружения возбудителя бластомикоза при экспериментальной инфекции на 28 сутки заболевания. Заражение мышей осуществлено клетками *B.dermatitidis* 6/85 в дрожжевой форме**

**Примечание: по оси ординат - % положительных результатов**

При исследовании проб секционного материала, полученного от зараженных белых мышей, результаты ПЦР и микологического метода совпали в 53% случаев. Следует отметить, что микологическим методом не удалось выявить возбудитель бластомикоза в крови зараженных животных.

При исследовании органов интактных белых мышей (контрольная группа) микологическим методом и ПЦР получены отрицательные результаты.

При моделировании экспериментальной инфекции ДНК возбудителя бластомикоза методом ПЦР была обнаружена у 10 из 32 зараженных мышей (31%) (Таблица 10). 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 наблюдался только на 10-14 сутки после взятия материала на исследование. Еще 7-10 суток потребовалось на появление морфологических признаков, с помощью которых можно было провести идентификацию выросшего микроорганизма. Также на результаты ПЦР

не влияла возможная контаминация проб посторонней микрофлорой. 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.

**Таблица 10**

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

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

Результаты представленных исследований указывают на принципиальную возможность применения полимеразной цепной реакции для обнаружения ДНК *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.

## ГЛАВА 5. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО ОПАСНЫХ МИКОЗОВ С ПОМОЩЬЮ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДНК

### 5.1 Секвенирование нуклеотидных последовательностей музейных штаммов возбудителей особо опасных микозов с помощью видоспецифических праймеров

В настоящее время, согласно большинству методических документов, реакция амплификации рекомендуется к использованию в качестве экспресс-метода индикации и идентификации возбудителей особо опасных микозов. Однако современный уровень развития молекулярно-генетических методов позволяет использовать более совершенные стратегии установления видовой принадлежности исследуемых микроорганизмов. В данном качестве возможно использование монолокусного секвенирования ДНК. Этот метод позволяет получить ответ в срок от нескольких часов до суток, в зависимости от количества проб и спецификации прибора, используемого для секвенирования. В нашей работе для секвенирования использовали праймеры, ранее разработанные сотрудниками ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт для идентификации возбудителей кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза, а также праймеры, разработанные в процессе данной научной работы.

Для обнаружения ДНК *Coccidioides immitis* и *Coccidioides posadasii* использовали праймеры **CimMBP1s/CimMBP2as**, направленные на амплификацию фрагмента гена макрофагсвязывающего белка *MBP-1* (Ткаченко Г.А., Гришина М.А., Антонов В.А. и др., 2007). Праймеры **HcCBP1s/HcCBP2as**, амплифицирующие фрагмент гена *CBP1* (calcium binding protein 1), использовали для определения ДНК *Histoplasma capsulatum* в исследуемой пробе (Вьючнова Н.В., Ткаченко Г.А., Гришина М.А., и др., 2012).

Для идентификации возбудителя бластомикоза нами предложены праймеры **BDags-1F/BDags-2R**, фланкирующие регион гена  $\alpha$ -1,3-глюкансинтазы и праймеры **BYS1F/ BYS2R**, специфически амплифицирующие участок гена *BYS-1*,

кодирующего синтез белка дрожжевой фазы микромицета (*Blastomyces yeast phase specific protein*).

Секвенирование проводили совместно с сотрудниками лаборатории генной диагностики и типирования микроорганизмов Ткаченко Г.А., Савченко С.С., Шпаком И.М. Анализ результатов секвенирования проводили с использованием программы Unipro UGENE.

По результатам множественного выравнивания секвенированных последовательностей ампликонов, полученных с помощью праймеров *CimMBP1s/CimMBP2as*, выбранный участок позволяет провести дифференциацию видов *C.immitis* и *C.posadasii* на основе единичных нуклеотидных замен (Рисунок 17).

|                                             | C | A | T | G | T | A | T | A | T | A | A | C | A | G | G | C | A | T | C | C |
|---------------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| <i>Coccidioides_posadasii_C735</i>          | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| <i>Coccidioides_posadasii_RMSCC_3700</i>    | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| <i>Coccidioides_posadasii_RMSCC_2133</i>    | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| <i>Coccidioides_posadasii_str._Silveira</i> | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| <i>Coccidioides_posadasii_CPA_0066</i>      | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| <i>Coccidioides_posadasii_CPA_0020</i>      | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| <i>Coccidioides_posadasii_RMSCC_3488</i>    | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| <i>Coccidioides_posadasii_RMSCC_1038</i>    | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| <i>Coccidioides_posadasii_CPA_0001</i>      | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| <i>Coccidioides_immitis_RMSCC_3703</i>      | . | . | . | A | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T | . | . |
| <i>Coccidioides_immitis_RMSCC_2394</i>      | . | . | . | A | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T | . | . |
| <i>Coccidioides_immitis_H538.4</i>          | . | . | . | A | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T | . | . |
| <i>Coccidioides_immitis_RS</i>              | . | . | . | A | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T | . | . |

Рисунок 17. Участок последовательности гена *MBP-1* *C.immitis* и *C.posadasii*, амплифицируемого праймерами с *CimMBP1s/CimMBP2as*

Следующей мишенью для анализа нуклеотидной последовательности стал фрагмент гена *CBP-1* (*calcium binding protein 1*) *H.capsulatum*. После проведения ПЦР и секвенирования с праймерами **HcCBP1s/HcCBP2as** полученные данные анализировали с помощью алгоритма ClustalW.

В результате секвенирования нуклеотидной последовательности фрагмента гена *CBP-1* значимых различий не обнаружено, таким образом нам не удалось



разделить генетически неоднородный вид *H.capsulatum* на его варианты: *H.capsulatum* var. *capsulatum*; var. *duboisii*; var. *farcinosum* при секвенировании данного региона возбудителя гистоплазмоза. Это требует поиска дополнительных, генетически более разнообразных мишеней.

Аналогичную картину наблюдали при секвенировании музейных штаммов *B.dermatitidis* с помощью праймеров **BDags-1F/BDags-2R** (ген  $\alpha$ -1,3-глюкансинтаза) и **Bys-1F/Bys-2R** (ген *Blastomyces yeast phase specific protein 1*). Отличий в нуклеотидных последовательностях амплифицируемых фрагментов не обнаружено, что не позволяет проводить дифференциацию штаммов возбудителя бластомикоза на основе данных праймеров.

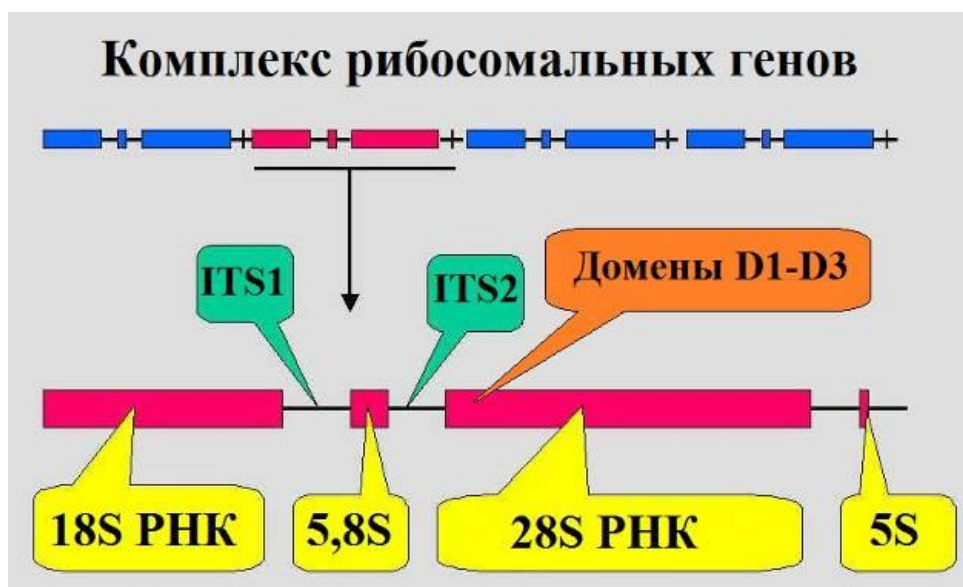
Однако использование олигонуклеотидных затравок **HcCBP1s/HcCBP2as** и **BDags-1F/BDags-2R** и **Bys-1F/Bys-2R** в качестве секвенационных праймеров позволяет применить их для видовой идентификации возбудителей гистоплазмоза и бластомикоза, соответственно, при сочетании ПЦР и секвенирования.

Учитывая огромное разнообразие видов микроскопических грибов и их потенциальную возможность инфицирования организма человека, возможность точного определения вида возбудителя может помочь в выборе правильной стратегии лечения. Сочетание амплификации ДНК и секвенирования полученного ампликона достоверно укажет на наличие в пробе возбудителей кокцидиодомикоза, гистоплазмоза и бластомикоза.

## 5.2 Секвенирование нуклеотидных последовательностей музейных штаммов микромицетов II-IV гр. патогенности с помощью коммерческого набора для секвенирования ДНК микромицетов D2LSU Kit

MicroSeq D2 LSU rDNA Fungal Identification Kit – набор реагентов, разработанный компанией Applied Biosystems для идентификации микромицетов. Данная система основана на секвенировании D2 региона большой субъединицы рибосомальной РНК (large-subunit (LSU)). На рисунке 18 показано, что регион D2 формирует участок в последовательности гена *28S рРНК*. Благодаря высокому уровню генетической вариации, данная последовательность подходит для

секвенирования ДНК с целью установления видовой принадлежности исследуемых штаммов микромицетов (Hall L., Wohlfiel S., Roberts G.D., 2004; Hall L., Wohlfiel S., Roberts G.D., 2003). Регион D2 используется в качестве мишени для секвенирования в коммерческом наборе **D2LSU Kit**.



**Рисунок 18.** Схематическое изображение комплекса рибосомальных генов эукариот. Используемый набор направлен на секвенирование региона D2, высоковарибельного участка

В нашей работе были использованы штаммы микромицетов, полученные из коллекционного центра ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Набор микроскопических грибов представлен в таблице 11.

**Таблица 11**

**Список штаммов микромицетов, использованных в работы по секвенированию ДНК с помощью набора The MicroSeq D2 LSU rDNA Fungal Identification Kit**

| № | Название штамма                             |
|---|---------------------------------------------|
| 1 | <i>Coccidioides immitis</i> 158             |
| 2 | <i>Blastomyces dermatitidis</i> 6/85        |
| 3 | <i>Histoplasma capsulatum</i> 6652          |
| 4 | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> BKM Y-339   |
| 5 | <i>Geotrichum fermentans</i> BKM Y-813      |
| 6 | <i>Cryptococcus neoformans</i> 9/22         |
| 7 | <i>Candida glabrata</i> BKM Y-1481          |
| 8 | <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> BKM F-406 |

Подготовленные препараты ДНК исследуемых культур были первоначально исследованы методом ПЦР. Этап амплификации необходим для увеличения количества копий фрагмента целевого региона, используемых далее на этапе секвенирования. Согласно инструкции данной тест-системы размер ампликона должен составлять от 300 до 500 п.н.

Детекцию продуктов амплификации проводили с помощью электрофореза в агарозном геле (Рисунок 19). На рисунке видно, что в большинстве случаев у разных грибов размер ампликонов идентичен и по этой причине невозможно определить вид микроорганизма.

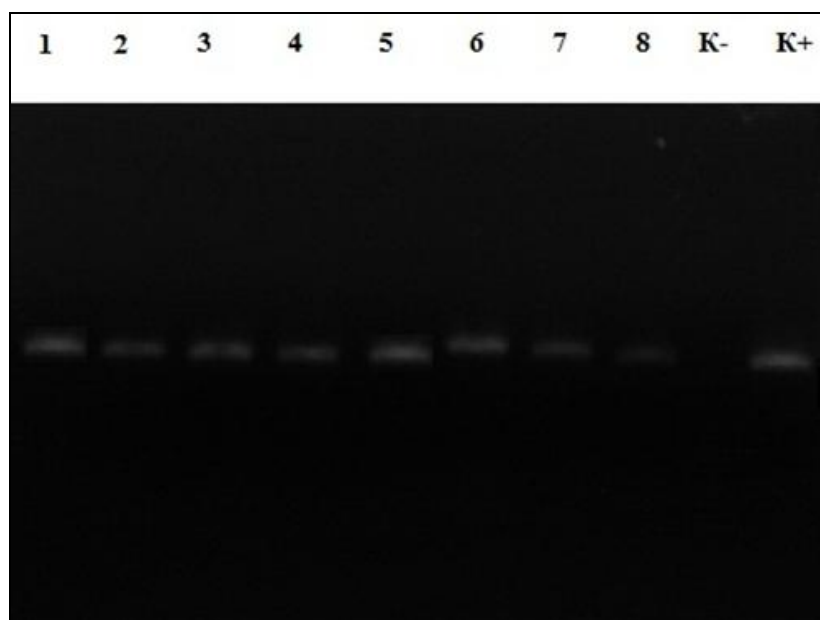
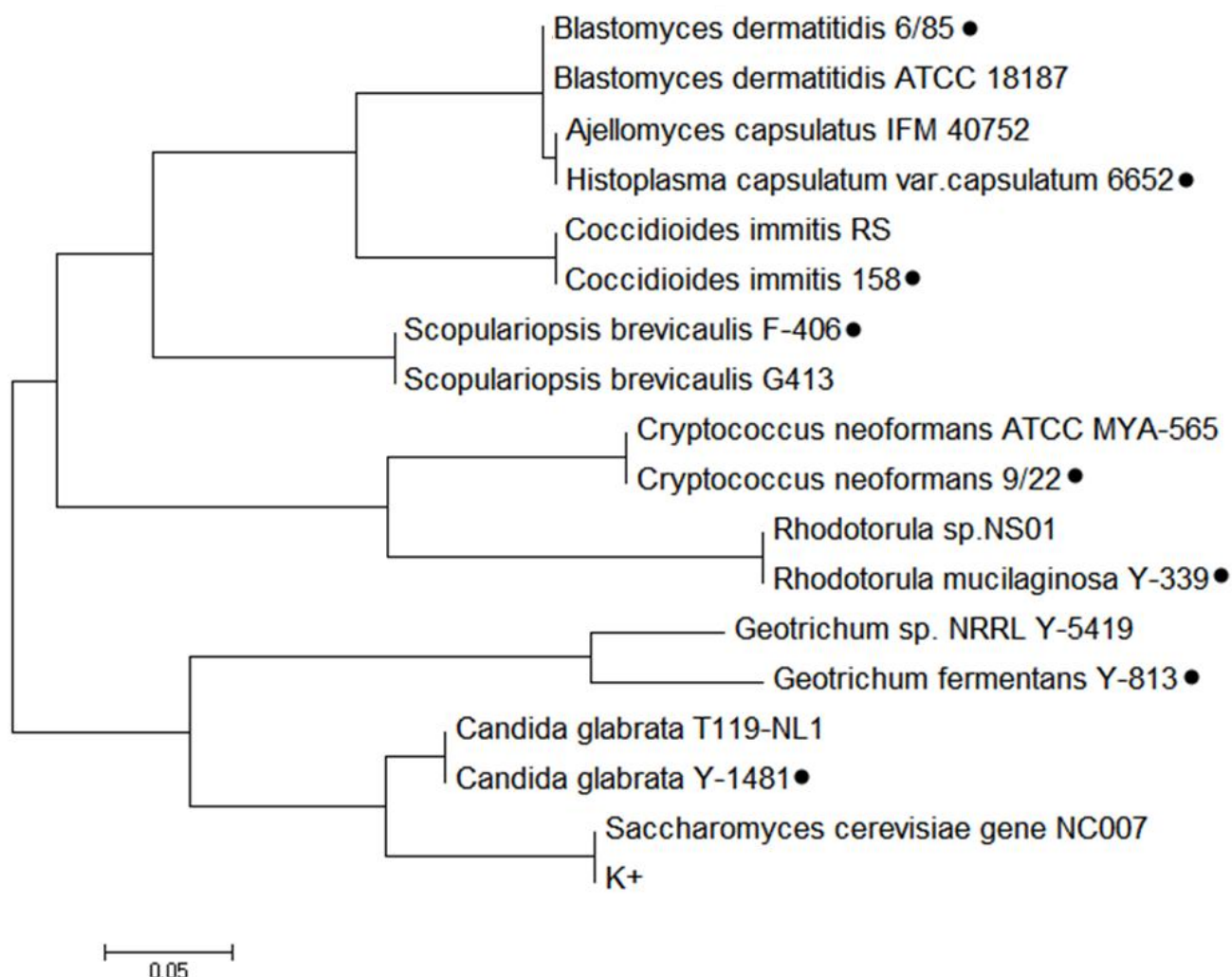


Рисунок 19. Электрофореграмма результатов реакции амплификации с использованием набора MicroSeq D2 LSU rDNA Fungal Identification PCR Kit

1. *Coccidioides immitis* 158; 2. *Blastomyces dermatitidis* 6/85; 3. *Histoplasma capsulatum* 6652; 4. *Rhodotorula mucilaginosa* BKM Y-339; 5. *Geotrichum fermentans* BKM Y-813; 6. *Cryptococcus neoformans* 9/22; 7. *Candida glabrata* BKM Y-1481; 8. *Scopulariopsis brevicaulis* BKM F-406; K- дистиллированная вода; K+ *Saccharomyces cerevisiae* (прилагается к набору)

Полученные ампликоны вырезали и после проведения процедуры очистки ДНК проводили их секвенирование. Секвенированные последовательности анализировали с помощью приложения Mega 6 и он-лайн сервиса BLASTn. Для всех использованных в работе штаммов обнаружены гомологичные последовательности из базы данных GenBank и установлена их видовая

принадлежность. В графической форме результаты представлены в виде дендрограммы на рисунке 20.



**Рисунок 20.** Филогенетическое дерево родства штаммов микромицетов в сравнении с последовательностями, представленными в базе данных GenBank. Точкой отмечены штаммы коллекции живых культур ФКУЗ Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора

В целом система MicroSeq D2 LSU rDNA Fungal Identification Kit может использоваться для идентификации возбудителей особо опасных микозов. Однако ряд ограничений, таких как необходимость высокой концентрации ДНК в пробе для процедуры амплификации, отсутствие данных о последовательностях праймеров, высокие требования к наборам для выделения ДНК и используемым амплификаторам, для которых сконструирована данная тест-система, указывает на необходимость создания отечественного аналога данного набора с известными

характеристиками для использования в условиях Референс-центра по мониторингу за возбудителями глубоких микозов.

### 5.3 Секвенирование гена рибосомального белка L23 возбудителей кокцидиомикоза, гистоплазмоза и бластомикоза

Для конструирования секвенационных праймеров, после подробного анализа имеющихся в литературе данных, нами выбран рибосомальный ген L23 (Рисунок 21), кодирующий рибосомальный белок L14p/L23e, который отнесен к семейству РНК-связывающих протеинов.



**Рисунок 21. Гомология последовательности гена L23 с геномами наиболее близких видов микроорганизмов**

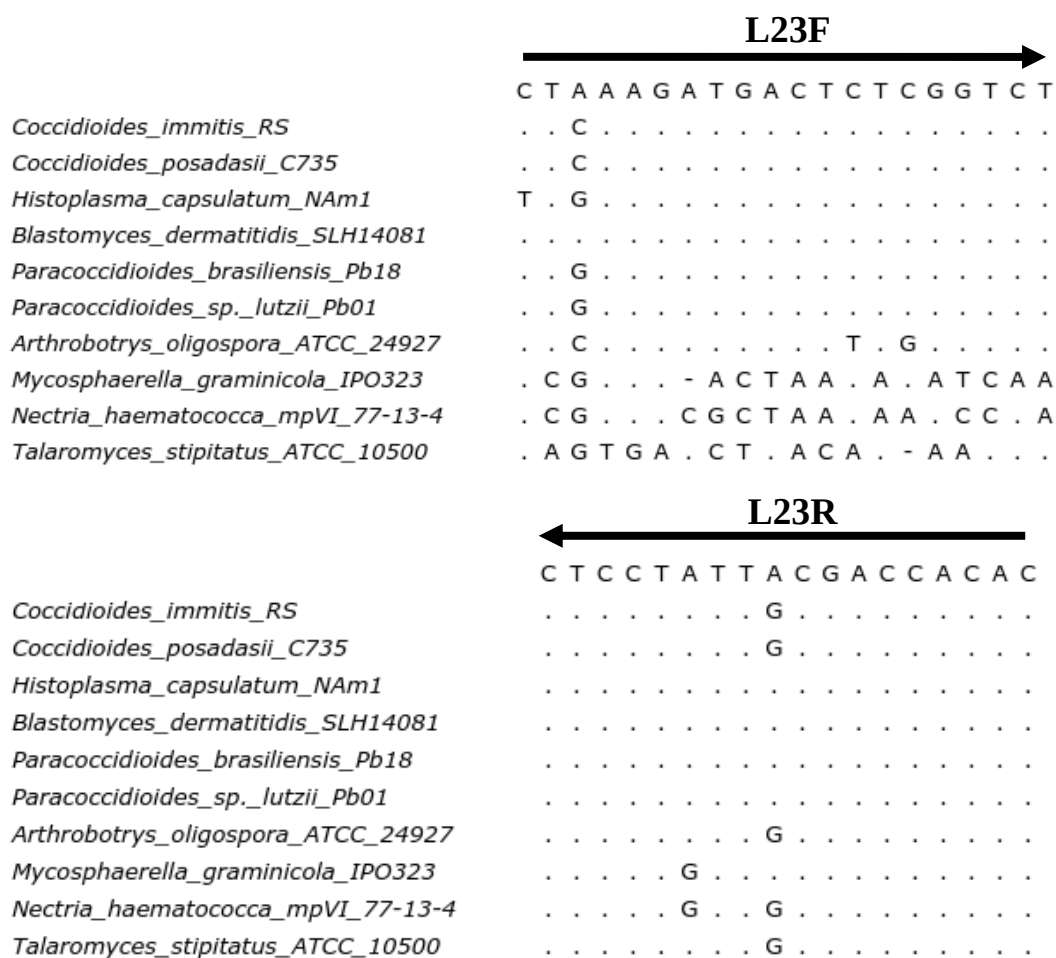
С помощью набора компьютерных программ выбрана пара праймеров для амплификации выбранных регионов (Таблица 12).

Таблица 12

**Нуклеотидные последовательности праймеров для секвенирования генов рибосомальных белков L23 НК микромицетов**

| Праймеры     | Нуклеотидные последовательности праймеров              | Размер ампликона |
|--------------|--------------------------------------------------------|------------------|
| 1            | 2                                                      | 3                |
| Ген L23      |                                                        |                  |
| L23F<br>L23R | 5'-CTAAAGATGACTCTCGGTCT-3'<br>5'-CACACCAGCATTATCCTC-3' | 466п.н.          |

Компьютерный анализ последовательности ДНК возбудителей особо опасных микозов и праймеров, фланкирующих участок гена *L23*, показал, что выбранные праймеры способны амплифицировать специфический регион гена *L23*, представленный на рисунке 22.



**Рисунок 22. Последовательности региона L23 и сконструированных праймеров L23F и L23R. Стрелки указывают направление 3'-конца праймера**

Алгоритм выбора оптимальных параметров амплификации описан в главе №4. В общем виде этапы термоциклирования представлены в таблице 13 и таблице 14.

Таблица 13

**Программа амплификации фрагмента гена L23**

| Этап        | ТП4-ПЦР-01-«Терцик» - ДНК-Технология |         |                   |
|-------------|--------------------------------------|---------|-------------------|
|             | Температура, °C                      | Время   | Количество циклов |
| Денатурация | 95°C                                 | 10 сек. | 45                |
| Отжиг       | 54° C                                | 10 сек. | 45                |
| Элонгация   | 72° C                                | 10 сек. | 45                |

Таблица 14

**Протокол термоциклирования при секвенировании нуклеотидных последовательностей исследуемых участков гена L23**

| Этап        | Applied Biosystems 2700 |         |                   |
|-------------|-------------------------|---------|-------------------|
|             | Температура, °C         | Время   | Количество циклов |
| Денатурация | 90°C                    | 10 сек. | 25                |
| Отжиг       | 50° C                   | 5 сек.  | 25                |
| Элонгация   | 60° C                   | 4 мин.  | 25                |

Для проведения эксперимента были отобраны штаммы возбудителей особо опасных микозов из коллекции живых культур ФКУЗ Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора. Данные об использованных в работе микроорганизмах, представлены в таблице 15.

Таблица 15

**Штаммы микромицетов, используемые при секвенировании ДНК с помощью пары праймеров L23F/L23R**

| № | Видовое название                                       | Штамм |
|---|--------------------------------------------------------|-------|
| 1 | <i>Blastomyces dermatitidis</i>                        | 6/85  |
| 2 | <i>Blastomyces dermatitidis</i>                        | 2     |
| 3 | <i>Blastomyces dermatitidis</i>                        | 9     |
| 4 | <i>Coccidioides immitis</i>                            | 158   |
| 5 | <i>Coccidioides immitis</i>                            | 46    |
| 6 | <i>Coccidioides posadasii</i>                          | 36-S  |
| 7 | <i>Coccidioides posadasii</i>                          | 51    |
| 8 | <i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>farciminosum</i> | 12-89 |
| 9 | <i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>duboisii</i>     | 630   |



Таблица 15 (продолжение)

| №  | Видовое название                                     | Штамм   |
|----|------------------------------------------------------|---------|
| 10 | <i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i> | 73002   |
| 11 | <i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i> | 73004   |
| 12 | <i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i> | 6650    |
| 13 | <i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i> | B-580   |
| 14 | <i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i> | J-185-P |

Результаты амплификации оценивали с помощью электрофореза в агарозном геле. Результаты электрофореза, представленные на рисунке 23, также указывают на идентичность размеров полученных фрагментов ДНК различных видов грибов. Ампликоны, полученные в ходе анализа, вырезали из геля. После их очистки проводили секвенирование.

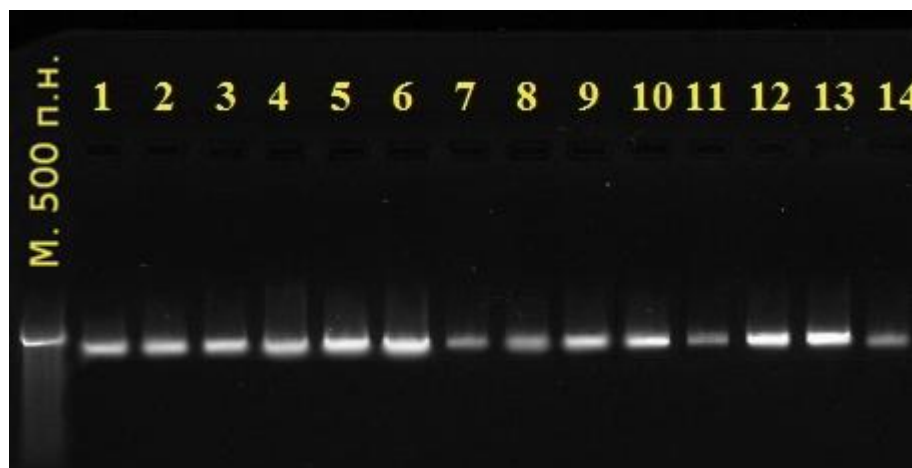


Рисунок 23. Результаты электрофоретического анализа проб ДНК микромицетов, амплифицируемых с помощью праймеров L23F/L23R

Примечание: 1. *Blastomyces dermatitidis* 6/85; 2. *Blastomyces dermatitidis* 2; 3. *Blastomyces dermatitidis* 9; 4. *Coccidioides immitis* 158; 5. *Coccidioides immitis* 46; 6. *Coccidioides posadasii* 36-S; 7. *Coccidioides posadasii* 51; 8. *Histoplasma farciminosum* 12-89; 9. *Histoplasma duboisii* 630; 10. *Histoplasma capsulatum* 73002; 11. *Histoplasma capsulatum* 73004; 12. *Histoplasma capsulatum* 6650; 13. *Histoplasma capsulatum* B-580; 14. *Histoplasma capsulatum* J-185-P; M. Маркер 500 п.н.

Реакционная смесь для секвенационных праймеров включала прямой и обратный праймеры, дНТФ, воду для ПЦР. На нижнюю часть смеси наслаивали воск, добавляли буфер и аликвоту смеси ампликонов из первой реакции.



Полученные нуклеотидные последовательности (сиквенсы) анализировали с помощью программы BLASTn на сайте <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> (Рисунок 24).

|                                           | T | G | G | T | T | A | T | G | G | C | G | A | C | C | G | T | G | A | A | G | A | A | G | G | G | A | A | G | C | C | C | G |   |
|-------------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| <i>Coccidioides_immitis_RS</i>            | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| <i>Coccidioides_posadasii_C735</i>        | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| <i>Histoplasma_capsulatum_NAm1</i>        | . | . | . | . | C | . | . | . | . | . | C | . | . | G | . | C | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T | . | A | . | . | . | . |   |
| <i>Blastomyces_dermatitidis_SLH14081</i>  | . | . | . | . | C | . | . | . | . | . | T | . | . | . | . | C | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T | . | . | . | . | . | . |   |
| <i>Paracoccidioides_sp._lutzii_Pb01</i>   | . | . | . | . | C | . | . | . | . | . | . | . | . | T | . | C | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |   |
| <i>Paracoccidioides_brasiliensis_Pb18</i> | . | . | . | . | C | . | . | . | . | . | . | . | . | T | . | C | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |   |
| <i>Talaromyces_stipitatus_ATCC_10500</i>  | . | . | . | . | C | . | . | . | . | . | C | . | . | T | . | T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |   |
| <i>Nectria_haematococca_mpVI_77-13-4</i>  | . | . | . | . | C | . | . | . | . | . | C | . | . | . | . | C | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |   |
| <i>Mycosphaerella_graminicola_IPO323</i>  | . | . | . | . | C | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | . |
| <i>Arthrobotrys_oligospora_ATCC_24927</i> | . | . | . | . | C | . | . | . | . | . | C | . | . | T | . | C | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | . |

**Рисунок 24. Фрагмент последовательности гена рибосомального белка L23, амплифицируемого праймерами L23F/L23R**

Итогом проведенной работы стало получение дендрограммы сравнения нуклеотидных последовательностей, представленных в базе данных GenBank, и штаммов коллекционного центра ФКУЗ Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора. Данные дендрограммы представлены на рисунке 25.

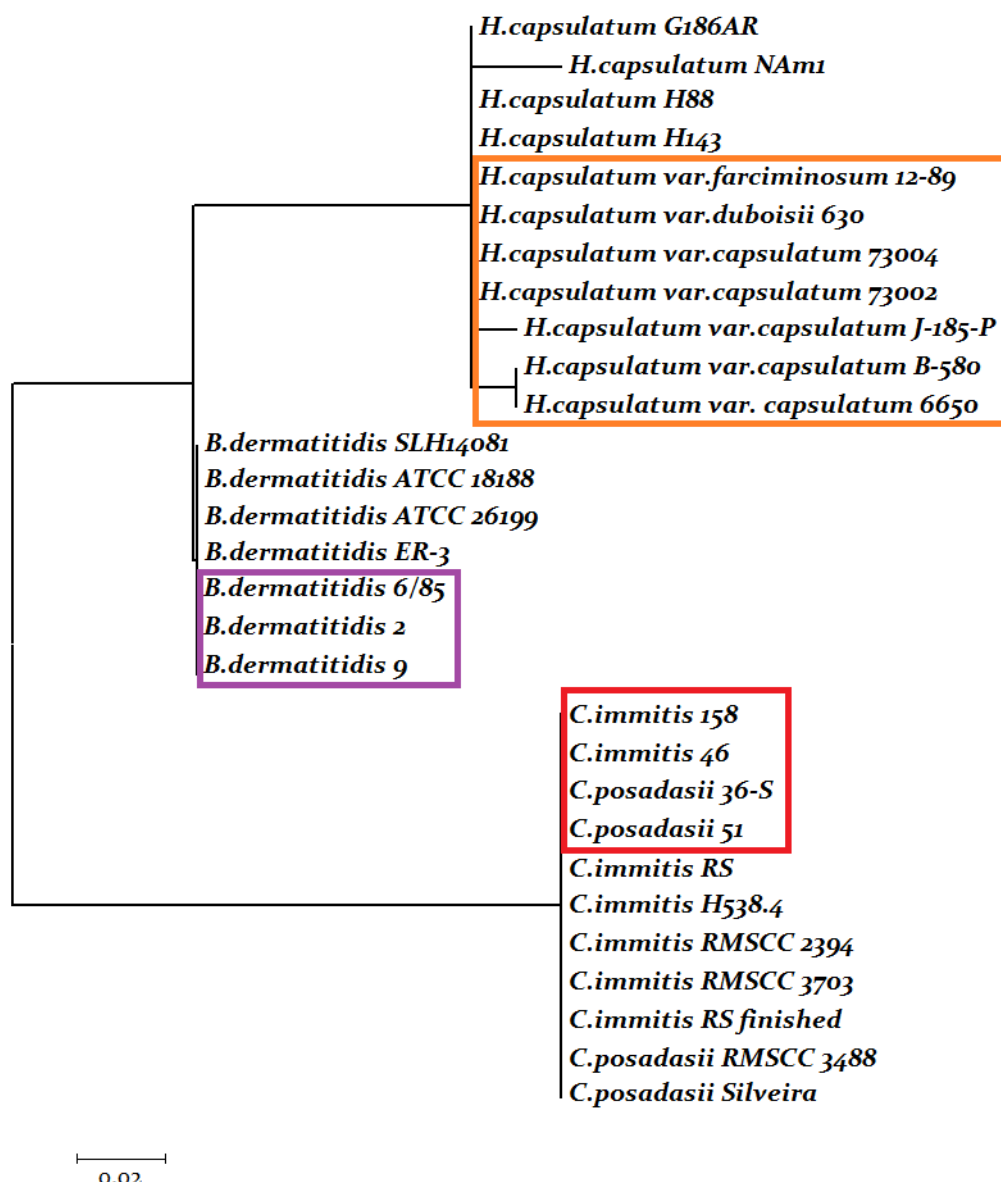


Рисунок 25. Дендрограмма сходства последовательностей гена *L23* музейных штаммов возбудителей особо опасных микозов и нуклеотидных последовательностей генетической базы данных GenBank. Последовательности музейных штаммов выделены рамкой

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*.

При выборе последовательностей праймеров **L23F** и **L23R** для секвенирования, ориентировались, в первую очередь, на представителей трех родов (*Coccidioides*, *Histoplasma* и *Blastomyces*). Несмотря на то, что для идентификации широкого спектра микромицетов данные праймеры недостаточно информативны, они могут быть использованы для дополнительного подтверждения принадлежности исследуемой культуры к группе возбудителей глубоких особо опасных микозов.

#### **5.4 Секвенирование гена *28S pPHK* штаммов возбудителей глубоких микозов и анализ варибельности нуклеотидных последовательностей**

Для идентификации возбудителей особо опасных микозов, а также широкого спектра микромицетов, в качестве ДНК - матрицы дополнительно выбран участок генов *28S pPHK* исследуемых микроорганизмов. При конструировании праймеров использованы результаты секвенирования нуклеотидных последовательностей, представленные в GenBank NCBI. С помощью компьютерного анализа было выбрано и проанализировано несколько пар праймеров.

Олигонуклеотидные затравки **28S1F/28S1R**, выбранные на основе последовательностей генов *28S pPHK*, были общими для всех возбудителей особо опасных микозов. Более того, результаты анализа *in silico* свидетельствовали о высокой консервативности выбранного региона в местах отжига праймеров, гомологичных у подавляющего большинства медицински значимых микромицетов (Рисунок 26). Последовательности подобранных праймеров представлены в таблице 16.

|                                                 | 28S1F                               | 28S1R                                         |
|-------------------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------------|
|                                                 | C A T A T C A A T A A G C G G A G G | G A T T T C G A T T T A T A A C C A G C C T C |
| <i>Absidia</i> _sp.                             | . . . . .                           | . . . . . T G C T T . .                       |
| <i>Aspergillus</i> _flavus_V5F-13               | . . . . .                           | . . . . . G . . . G . . . .                   |
| <i>Aspergillus</i> _fumigatiaffinis_CMF_ISB_194 | . . . . .                           | . . . . . G . . . G . . . .                   |
| <i>Aspergillus</i> _fumigatus_KARVS03           | . . . . .                           | . . . . . G . . . G . . . .                   |
| <i>Blastomyces</i> _dermatitidis_UAMH5438       | . . . . .                           | . . . . .                                     |
| <i>Blastomyces</i> _dermatitidis_UAMH_10245     | . . . . .                           | . . . . .                                     |
| <i>Blastomyces</i> _dermatitidis_UAMH_10246     | . . . . .                           | . . . . .                                     |
| <i>Blastomyces</i> _dermatitidis_UAMH_10251     | . . . . .                           | . . . . .                                     |
| <i>Blastomyces</i> _dermatitidis_UAMH_10592     | . . . . .                           | . . . . .                                     |
| <i>Blastomyces</i> _dermatitidis_UAMH_10594     | . . . . .                           | . . . . .                                     |
| <i>Blastomyces</i> _dermatitidis_UAMH_3538      | . . . . .                           | . . . . .                                     |
| <i>Blastomyces</i> _dermatitidis_UAMH_3604      | . . . . .                           | . . . . .                                     |
| <i>Candida</i> _guilliermondii_KAML             | . . . . .                           | . . . . . G C T . . .                         |
| <i>Candida</i> _glabrata_CBS_138                | . . . . .                           | . . . . . G T . . G C T . . .                 |
| <i>Candida</i> _kruisii_NRRLL_Y-27913           | . . . . .                           | . . . . . G C T . . .                         |
| <i>Candida</i> _rhagii_D43                      | . . . . . A . . . . .               | . . . . . G C T . . .                         |
| <i>Cladosporium</i> _cladosporioides_3683       | . . . . .                           | . . . . . G . T . . .                         |
| <i>Cladosporium</i> _sphaerospermum_3686        | . . . . .                           | . . . . . G . T . . .                         |
| <i>Coccidioides</i> _immitis_IFM_45815          | . . . . .                           | . . . . . G . . . . .                         |
| <i>Coccidioides</i> _immitis_IFM_45816          | . . . . .                           | . . . . . G . . . . .                         |
| <i>Coccidioides</i> _immitis_IFM_46868          | . . . . .                           | . . . . . G . . . . .                         |
| <i>Coccidioides</i> _immitis_IFM_50992          | . . . . .                           | . . . . . G . . . . .                         |
| <i>Coccidioides</i> _immitis_IFM_50995          | . . . . .                           | . . . . . G . . . . .                         |
| <i>Coccidioides</i> _posadasii_IFM_45809        | . . . . .                           | . . . . . G . . . . .                         |
| <i>Coccidioides</i> _posadasii_IFM_45810        | . . . . .                           | . . . . . G . . . . .                         |
| <i>Coccidioides</i> _posadasii_IFM_45811        | . . . . .                           | . . . . . G . . . . .                         |
| <i>Coccidioides</i> _posadasii_IFM_45813        | . . . . .                           | . . . . . G . . . . .                         |
| <i>Coccidioides</i> _posadasii_IFM_45817        | . . . . .                           | . . . . . G . . . . .                         |
| <i>Coccidioides</i> _posadasii_IFM_4935         | . . . . .                           | . . . . . G . . . . .                         |
| <i>Coccidioides</i> _posadasii_IFM_4945         | . . . . .                           | . . . . . G . . . . .                         |
| <i>Coccidioides</i> _posadasii_IFM_50994        | . . . . .                           | . . . . . G . . . . .                         |
| <i>Coccidioides</i> _posadasii_IFM_54196        | . . . . .                           | . . . . . G . . . . .                         |
| <i>Cryptococcus</i> _neoformans_CPC5825         | . . . . .                           | . . . . . C . T . . .                         |
| <i>Exophiala</i> _sp._NH1238                    | . . . . .                           | . . . . . G . T . . .                         |
| <i>Fusarium</i> _culmorum_E13b                  | . . . . .                           | . . . . . G G . . G . T . . .                 |
| <i>Fusarium</i> _sp._KANPR01                    | . . . . .                           | . . . . . G G . . G . T . . .                 |
| <i>Fusarium</i> _moniliforme                    | . . . . .                           | . . . . . G G . . G . T . . .                 |
| <i>Fusarium</i> _sambucinum                     | . . . . .                           | . . . . . G G . . G . T . . .                 |
| <i>Fusarium</i> _javanicum                      | . . . . .                           | . . . . . G G . . G . T . . .                 |
| <i>Gibberella</i> _zeae_CZ545-1                 | . . . . .                           | . . . . . G . . . G . T . . .                 |
| <i>Gymnoascus</i> _reesii_CBS410.72             | . . . . .                           | . . . . . G A . . . .                         |
| <i>Histoplasma</i> _capsulatum_UAMH_3536        | . . . . .                           | . . . . . G . . . . .                         |
| <i>Histoplasma</i> _capsulatum_UAMH_7141        | . . . . . G . . . . .               | . . . . . G . . . . .                         |
| <i>Histoplasma</i> _capsulatum_var.duboisii     | . . . . .                           | . . . . . G . . . . .                         |
| <i>Histoplasma</i> _capsulatum_var.farciminosum | . . . . .                           | . . . . . G . . . . .                         |
| <i>Malbranchea</i> _cinnamomea_CBS960.72        | . . . . .                           | . . . . . G . . . G C . . .                   |
| <i>Mucor</i> _racemosus_ATCC_42647              | . . . . .                           | . . . . . A . G C T . . .                     |
| <i>Paecilomyces</i> _sp._JCM_12546              | . . . . .                           | . . . . . G . . . . .                         |
| <i>Paracoccidioides</i> _brasiliensis_B-339     | . . . . .                           | . . . . . G . . . . .                         |
| <i>Paracoccidioides</i> _brasiliensis_IFM_41621 | . . . . .                           | . . . . . G . . . . .                         |
| <i>Paracoccidioides</i> _brasiliensis_IFM_41622 | . . . . .                           | . . . . . G . . . . .                         |
| <i>Paracoccidioides</i> _brasiliensis_IFM_46468 | . . . . .                           | . . . . . G . . . . .                         |
| <i>Paracoccidioides</i> _brasiliensis_IFM_46469 | . . . . .                           | . . . . . G . . . . .                         |
| <i>Paracoccidioides</i> _brasiliensis_IFM_46470 | . . . . .                           | . . . . . G . . . . .                         |
| <i>Paracoccidioides</i> _brasiliensis_IFM_54648 | . . . . .                           | . . . . . G . . . . .                         |
| <i>Penicillium</i> _chrysogenum_ATCC_10108      | . . . . .                           | . . . . . G . . . . .                         |
| <i>Penicillium</i> _citrinum_NRRLL_1841         | . . . . .                           | . . . . . G . . . . .                         |
| <i>Penicillium</i> _marneffeii                  | . . . . .                           | . . . . . G . . . G . . . .                   |
| <i>Penicillium</i> _solitum_TN02                | . . . . .                           | . . . . . G . . . G . . . .                   |
| <i>Phialophora</i> _verrucosa                   | . . . . .                           | . . . . . G . T . . .                         |
| <i>Rhizopus</i> _stolonifer_AFTOL-ID_632        | . . . . . A . . . . .               | . . . . . G C T . . T                         |
| <i>Rhodotorula</i> _mucilaginosa_AFTOL-ID_1548  | . . . . .                           | . . . . . G C T . . .                         |
| <i>Scopulariopsis</i> _brevicaulis_SC1101       | . . . . .                           | . . . . . G . . . G . T . . .                 |

Рисунок 26. Нуклеотидные последовательности региона 28S *pPHK* в местах отжига праймеров 28S1F/28S1R. Стрелки указывают в направлении 3'-конца праймера

Таблица 16

**Нуклеотидные последовательности праймеров для секвенирования  
рибосомального гена *28S pPHK* микромицетов**

| Праймеры                    | Нуклеотидные последовательности<br>праймеров             | Размер<br>ампликона |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------|---------------------|
| Регион гена <i>28S pPHK</i> |                                                          |                     |
| 28S1F<br>28S1R              | 5'-CATATCAATAAGCGGAGG-3'<br>5'-CTCCGACCAATATTAGCTTTAG-3' | 297 п.н.            |

Праймеры **28S1F/28S1R** фланкируют амплифицируемый целевой регион, а гетерологичные участки последовательности ДНК находятся между ними. На рисунке 30 представлено множественное выравнивание выбранных нуклеотидных последовательностей гена *28S pPHK* микроскопических грибов, выполненное с использованием программы Mega 6 (Рисунок 27).

Учитывая, что на этапе компьютерного анализа установлено, что данные праймеры способны амплифицировать также участки ДНК гетерологичных микромицетов, проведено секвенирование последовательностей микромицетов III-IV групп патогенности.

|                                                         |                                                                     |
|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
|                                                         | G G T C C C G A G T T G T A A T T T G G A G A G G A C A A C T T C G |
| <i>Coccidioides immitis_RS</i>                          | . . . . .                                                           |
| <i>Coccidioides posadasii_IFM_54196</i>                 | . . . . .                                                           |
| <i>Histoplasma capsulatum_var._capsulatum_UAMH_3536</i> | . . . . . T . . . . . C . . . . . T . G . . . . .                   |
| <i>Histoplasma capsulatum_var._duboisii</i>             | . . . . . T . . . . . C . . . . . T . G . . . . .                   |
| <i>Histoplasma capsulatum_var._farcinosum_UCH</i>       | . . . . . T . . . . . C . . . . . T . G . . . . .                   |
| <i>Blastomyces dermatitidis_UAMH_10245</i>              | . . . . . C . . . . . T . G . . . . .                               |
| <i>Paracoccidioides brasiliensis_IFM_54648</i>          | . . . . . T . . . . . T . G . . . . .                               |
| <i>Penicillium marneffei_IFM_41708</i>                  | . . . T . . . . . C . . . . . T . G . . . . .                       |
| <i>Cladophialophora bantiana_IFM_4807</i>               | . . . T . . . . . T . . . . . T . G T . . . .                       |
| <i>Cryptococcus neoformans_var._neoformans_JEC21</i>    | C G . T . . . . . C . A C . . . A A C - . G T . . T C               |
| <i>Cryptococcus neoformans_var._grubii_H99</i>          | C G . T . . . . . C . A C . . . A A C - . G T . . T C               |
| <i>Cryptococcus gattii_AFLP4_RV54130</i>                | C G . T . . . . . C . A C . . . A A C - . G T . . T C               |
| <i>Candida albicans_ATCC_11651</i>                      | . . . T . . . . . A . . . A . G T A T . . . T .                     |
| <i>Candida dubliniensis_HC03IC</i>                      | . . . T . . . . . A . . . A . G T A T . . . T .                     |
| <i>Candida glabrata_ATCC_90876</i>                      | . . . . . T . . . . . C . . . . . T .                               |
| <i>Candida krusei_TY11</i>                              | . . . . A . . . . . G A . . . C . . G T T G G A G T C . G .         |
| <i>Candida kefyr_D10</i>                                | . . . . . G . A . . . . T .                                         |
| <i>Candida guilliermondii_LTQB75</i>                    | . . . T . . . . . A . . . T T G T A . . C . T .                     |
| <i>Aspergillus fumigatus_F7</i>                         | . . . T . . . C . . . . . C . . . . . T . G . . . . .               |
| <i>Aspergillus nidulans_TFR_26</i>                      | . . . T . . . C . . . . . C . . . . . T . G . . . . .               |
| <i>Arthroderma fulvum_IFM_45107</i>                     | . G . T . . . . . T . . . . . T . G . . . . .                       |
| <i>Microsporum canis_ATCC_23828</i>                     | . G G T . . . . . T . . . . . T . G . . . . .                       |
| <i>Trichophyton interdigitale_RCPF_1301</i>             | . G . . . . . C . . . . . T . G . . . . .                           |
| <i>Trichosporon asahii_JYC1040</i>                      | T G . T . . . . . C . A T . . . . C - . G T . . T C                 |
| <i>Exophiala jeanselmei_IFM_54222</i>                   | . . . . . T . . . . . T . G T . . . .                               |
| <i>Malbranchea cinnamomea_CBS960.72</i>                 | . . . T . . . . . T . G . . . . .                                   |
| <i>Fusarium avenaceum_strain_FaLH27</i>                 | . . . . . T . . . . . T . . . . . T T                               |
| <i>Fusarium oxysporum_strain_UASWS_AC1</i>              | . . . . . T . . . . . T . . . . . T T                               |
| <i>Fusarium graminearum_strain_241165</i>               | . . . . . T . . . . . T . G A . . T T                               |
| <i>Basidiobolus meristosporus_B9252</i>                 | C T T G . . . . A . . . . G . . . . A . . . A . T - . G T . . T C   |
| <i>Conidiobolus incongruus_B7586</i>                    | C T T G . . . . A . . . . G . . . . A . . . A . T - . G T . . T C   |
| <i>Absidia corymbifera_008-049</i>                      | A G . T . . . G A . . . . . A C . A A . . . C G T G . A . C . A     |
| <i>Rhizopus stolonifer_B9770</i>                        | A G . A T . . . A . . . . . A C . T T . . . T C G T T G . C . A     |
| <i>Rhizopus oryzae_Type_I_NRRL</i>                      | A A . A . . . G A . . . . . G A C . . T . . . A . T G T T T . C . A |
| <i>Rhizopus delemar_RA_99-880</i>                       | A A . A . . . G A . . . . . G A C . . T . . . A . T G T T T . C . A |
| <i>Malassezia furfur_strain_CBS_7982</i>                | . . . . . G . A . . . . T .                                         |

**Рисунок 27. Нуклеотидные последовательности региона гена 28S рРНК, амплифицируемого с праймерами 28S1F/28S1R**

С этой целью для амплификации фрагмента гена *28S рРНК* разработан набор реагентов, содержащий олигонуклеотидные затравки, и подобраны температурные режимы реакции амплификации (Таблица 17).

**Таблица 17**

**Оптимальная программа амплификации региона 28S рРНК праймерами 28S1F/28S1R**

| Этап        | ТП4-ПЦР-01-«Терцик» - ДНК-Технология |         |                   |
|-------------|--------------------------------------|---------|-------------------|
|             | Температура, °С                      | Время   | Количество циклов |
| Денатурация | 95°С                                 | 10 сек. | 45                |
| Отжиг       | 60° С                                | 10 сек. | 45                |
| Элонгация   | 72° С                                | 30 сек. | 45                |

Результаты амплификации оценивали с помощью электрофореза в агарозном геле. Выявлено, что фрагмент ДНК, амплифицируемый праймерами **28S1F/28S1R**, оказался одинаковым для всех исследуемых видов, что указывало на соответствие экспериментальных и расчетных данных. Результаты ПЦР представлены на электрофореграмме (рисунок 28).

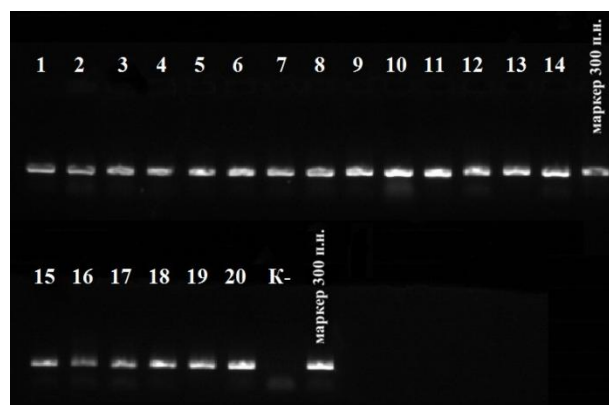


Рисунок 28. Результаты электрофоретического анализа проб ДНК микромицетов, амплифицируемых с помощью праймеров 28S1F/28S1R

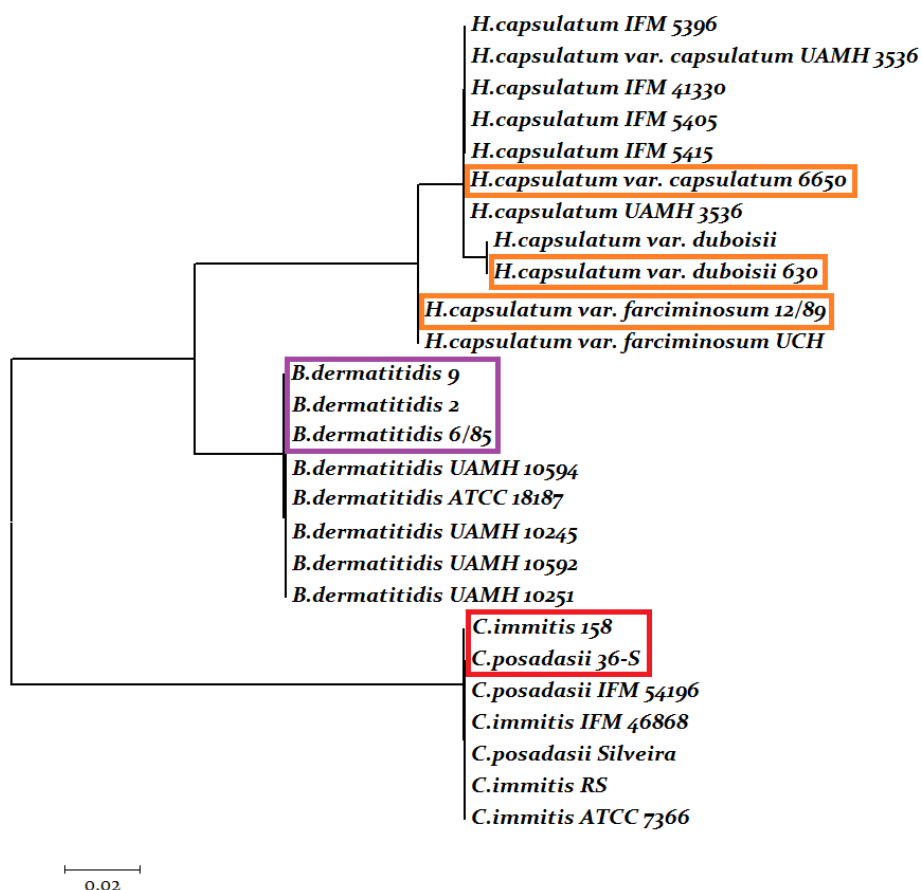
Примечание: 1. *Coccidioides posadasii* 36-S; 2. *Coccidioides immitis* 158; 3. *Histoplasma capsulatum* 6652; 4. *Blastomyces dermatitidis* 6/85; 5. *Cryptococcus neoformans* 9/22; 6. *Candida parapsilosis* BKM Y-58; 7. *Candida glabrata* BKM Y-1481; 8. *Candida kefyr* BKM Y-257; 9. *Candida guilliermondii* BKM Y-41; 10. *Rhodotorula mucilaginosa* BKM Y-339; 11. *Geotrichum fermentans* BKM Y-813; 12. *Fusarium javanicum* (solani) BKM F-134; 13. *Absidia hyalospora* BKM F-1435; 14. *Aspergillus fumigatus* BKM F-753; 15. *Rhizopus microsporia* var. *microsporus* BKM F-774; 16. *Fusarium culmorum* BKM F-1017; 17. *Gymnoascus reesii* BKM F-1707; 18. *Mucor racemosus* var. *racemosus* BKM F-1128; 19. *Phialophora verrucosa* BKM F-1990; 20. *Scopulariopsis brevicaulis* BKM F-406; 21. Отрицательный контроль, К-; 22. Маркер 300 п.н.

Ампликоны, полученные в ходе анализа, вырезали из геля и после очистки использовали для определения их нуклеотидной последовательности. В качестве секвенационных праймеров также использовали олигонуклеотидные затравки **28S1F/28S1R**.

Секвенированные последовательности ДНК анализировали с помощью различных компьютерных программ.

После процедуры множественного выравнивания, проведенной с использованием программы Mega 6, построены дендрограммы сходства на основе последовательностей микромицетов коллекции живых культур ФКУЗ

Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора и нуклеотидных последовательностей, представленных в базе данных GenBank (Рисунок 29 и рисунок 30).



**Рисунок 29.** Дендрограмма сходства последовательностей музейных штаммов возбудителей особо опасных микозов и последовательностей генетической базы данных GenBank. Последовательности музейных штаммов выделены рамкой

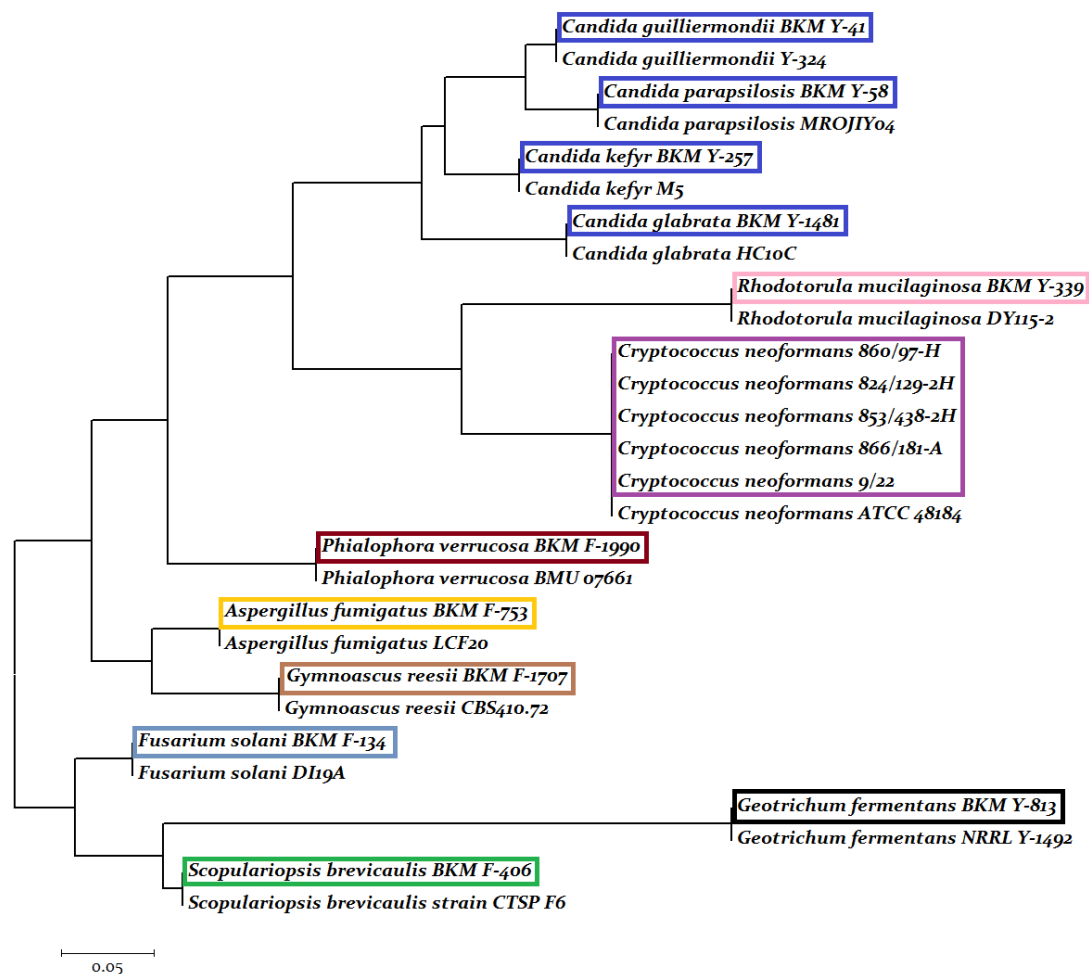
Полученные в ходе эксперимента данные с праймерами **28S1F/28S1R** для амплификации и секвенирования фрагмента гена *28S pPHK* возбудителей особо опасных микозов *B. dermatitidis* 9, *B. dermatitidis* 2, *H. capsulatum* 6650, *C. immitis* 158, *C. posadasii* 36-S, совпали с результатами эксперимента с использованием праймеров **L23F/L23R** (Рисунок 25).

На основе секвенирования фрагмента гена *28S PHK* возбудителей особо опасных микозов, исследуемые микроорганизмы удалось разделить на три группы, согласно родовой принадлежности. 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*.

Путем секвенирования фрагмента гена *28S PНК* удалось изучить переменные и консервативные последовательности фрагментов генов и подтвердить видовую принадлежность всех используемых в работе штаммов микромицетов II-IV групп патогенности.

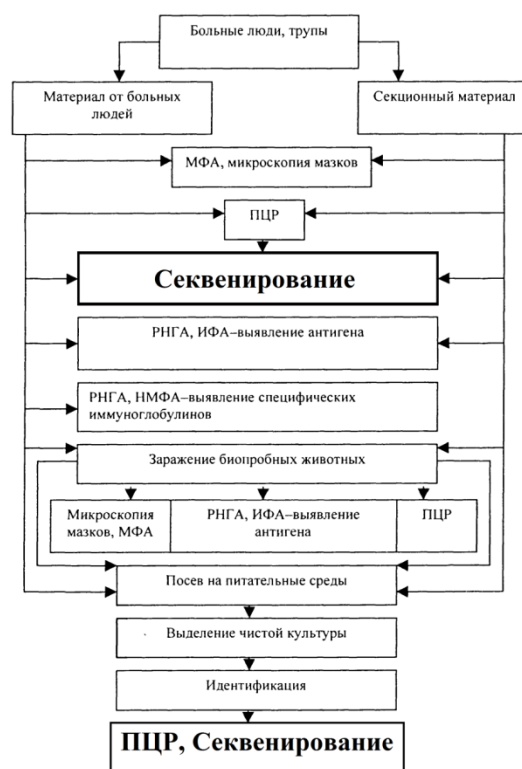


**Рисунок 30.** Дендрограмма сходства штаммов микромицетов III-IV групп патогенности Коллекционного центра в сравнении с последовательностями, представленными в базе данных GenBank. Рамкой выделены штаммы коллекции живых культур ФКУЗ Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора

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

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 31).



**Рисунок 31. Схема лабораторной диагностики глубоких микозов**

В приведенной схеме для ускоренной идентификации культур микромицетов II группы патогенности рекомендовано использование сочетания ПЦР и секвенирования видоспецифических фрагментов возбудителей особо опасных микозов наряду с анализом нуклеотидных последовательностей рибосомальных генов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Возбудители таких инфекций, как кокцидиоидомикоз, гистоплазмоз, бластомикоз относят к микроорганизмам II группы патогенности. Они распространены на территории Северной, Центральной, Южной Америки, Африки и Юго-Восточной Азии. Данные литературы свидетельствуют о ежегодной регистрации в неэндемичных странах инфицированных особо опасными микозами иммигрантов и туристов. До настоящего времени на территории Российской Федерации не было диагностировано ни одного случая заболевания, однако наблюдаемое сегодня изменение геополитической обстановки и усиление миграции увеличивает риск появления больных и завоза возбудителей особо опасных микозов на территорию нашей страны (Малеев В.В., 2013). Учитывая, что клинико-диагностические учреждения РФ не проводят лабораторных исследований по поиску возбудителей особо опасных микозов у туристов и лиц, прибывающих из эндемичных территорий, приобретает актуальность разработка отечественных тест-систем. Необходимо принять во внимание также возможность возникновения чрезвычайных ситуаций в результате террористических актов с использованием этих возбудителей, относящихся к потенциальным агентам биотерроризма (Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., 2013).

В 2008 году был создан Референс-центр по мониторингу за возбудителями глубоких микозов, территориально расположенный в ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, специалисты которого длительное время занимаются изучением биологии и разработкой тест-систем для выявления микромицетов родов *Coccidioides*, *Histoplasma*, *Blastomyces*. Ранее сотрудниками института созданы различные иммунобиологические препараты, в том числе для проведения РНГА, МФА (Липницкий А.В., Лесовой В.С., Храпова Н.П., и др., 1995; Кулаков М.Я., Лесовой В.С., Новицкая И.В., и др., 2010), а также диагностические тест-системы для обнаружения ДНК возбудителей кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза (Ткаченко

Г.А., Гришина М.А., Антонов В.А. и др., 2007; Вьючнова Н.В., Ткаченко Г.А., Гришина М.А., и др., 2012).

Основной целью настоящей работы было конструирование новых диагностических наборов, основанных на технологиях ПЦР и секвенирования ДНК, для совершенствования идентификации возбудителей особо опасных микозов.

Проведенный анализ литературных источников и выполненные в данной работе исследования свидетельствуют о сложности в использовании методов дифференциации микромицетов, основанных на их фенотипических свойствах. Учитывая, что в последние годы молекулярно-генетические подходы все активнее используются в стандартах лабораторной диагностики ООИ бактериальной природы (МУК 4.2.2870-11; МУК 4.2.2940-11; МУК 4.2.3010-12; МУК 4.2.2413-08), наши исследования были направлены на создание генодиагностических препаратов для обнаружения возбудителей особо опасных микромицетов и, в частности, возбудителя бластомикоза. После проведения компьютерного анализа различных ДНК-мишеней выбраны оптимальные комбинации пар праймеров и зондов к ним, отработаны параметры реакции амплификации и состав реакционной смеси на пробах ДНК штамма *B. dermatitidis*. В ходе компьютерного анализа сконструированы две пары перспективных последовательностей праймеров **Bys-1F/Bys-2R** и **BDags1F/BDags2R**. Первая создана на основе гена *Bys-1 (blastomyces yeast phase specific gene)* и амплифицирует фрагмент размером 306 п.н., вторая – фрагмент гена  $\alpha$ -1,3-глюкансинтазы размером 178 п.н. В ходе экспериментов на чистых культурах *B. dermatitidis* было установлено, что праймеры **BDags1F/BDags2R** обладают большей чувствительностью. С их помощью детектировали все штаммы возбудителя бластомикоза в концентрации от  $1 \times 10^4$  кл/мл, в то время как минимальная концентрация клеток *B. dermatitidis* при использовании праймеров **Bys-1F/Bys-2R** составляла  $1 \times 10^5$  кл/мл. Поэтому для создания амплификационной тест-системы выбраны праймеры **BDags1F/BDags2R** с гибридизационно-флуоресцентным зондом к целевому участку генома *B. dermatitidis*. В то же время данные литературы свидетельствуют

о том, что, в отличие от гена  $\alpha$ -1,3-глюкансинтазы, представленного в геномах подавляющего большинства видов микромицетов, ген *Bys-1* присутствует исключительно в геноме возбудителя бластомикоза. В связи с этим набор реагентов с системой праймеров **Bys-1F/Bys-2R** и зондом **Bys-1P** рекомендован нами в качестве дополнительного для уточнения видовой принадлежности исследуемого изолята.

Эффективность обнаружения ДНК *B. dermatitidis* с помощью ПЦР с использованием системы праймеров **BDags1F/BDags2R** подтверждена при исследовании препаратов человеческой крови, контаминированных клетками *B. dermatitidis* в концентрациях от  $1 \times 10^1$  до  $1 \times 10^5$  кл./мл. Чувствительность реакции составила  $1 \times 10^4$  м.к./мл. Полученные данные достоверно свидетельствуют об отсутствии перекрестных реакций с геномной ДНК человека и, соответственно, о возможности использования данного диагностического набора для исследования клинического материала в случае появления больных с подозрением на бластомикоз.

Диагностическая ценность разработанной амплификационной тест-системы установлена при экспериментальном бластомикозе. Для моделирования заболевания использованы лабораторные белые мыши линии BALB/c, которые были заражены возбудителем бластомикоза.

В результате исследования с помощью сконструированных праймеров удалось обнаружить ДНК возбудителя бластомикоза при анализе проб биологического материала 10 из 32 зараженных мышей (31%) во все сроки наблюдения (7, 14, 21 и 28 сутки после заражения). Микологический метод позволил выявить возбудитель у 12 из 32 животных (38%). В то же время показана наибольшая эффективность ПЦР при анализе крови по сравнению с микологическим методом. Представленные в работе результаты исследований указывают на целесообразность применения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени для обнаружения ДНК микромицетов *B. dermatitidis*.

Учитывая, что статистически достоверных различий между примененными методами не обнаружено, при оценке их эффективности необходимо учитывать

длительный срок роста *B.dermatitidis* (минимум 14 суток). Кроме того, существует вероятность контаминации посторонней микрофлорой (бактериальной или грибной природы), которая в большинстве случаев опережает рост микромицетов *Blastomyces spp.*, что может привести к ложноотрицательным результатам и постановке ошибочного лабораторного диагноза. Так, в одном из последних сообщений (Morjaria S., Otto C., Moreira A., 2015) лабораторный диагноз был поставлен на основании данных молекулярно-диагностического исследования без выделения культуры возбудителя, поскольку в течение длительного времени роста микромицета не наблюдалось.

Другой задачей настоящей работы было проведение экспериментов по оценке эффективности секвенирования ДНК для идентификации возбудителей особо опасных микозов. Для повышения достоверности идентификации возбудителей особо опасных микозов и их дифференциации от близкородственных видов микромицетов нами предложено применение реакции амплификации видоспецифических фрагментов ДНК возбудителей особо опасных микозов с последующим их секвенированием. Среди них участок гена макрофагсвязывающего белка MBP-1 *C.immitis* и *C.posadasii*, использованный в качестве мишени для создания ПЦР тест-системы «Амплиген Кокси» (Ткаченко Г.А., Гришина М.А., Антонов В.А. и др., 2007), фрагмент гена *CBP1* (*calcium binding protein 1*) *H.capsulatum*, являющийся целевым геном в диагностическом наборе для обнаружения ДНК возбудителя гистоплазмоза «Амплиген Гисто» (Вьючнова Н.В., Ткаченко Г.А., Гришина М.А., и др., 2012), а также участки гена *BYS-1* (*blastomyces yeast phase specific gene*) и гена  $\alpha$ -1,3-глюкансинтазы *B.dermatitidis*. На основе последнего в настоящей работе созданы праймеры **BDags1F/BDags2R** с целью выявления ДНК возбудителя бластомикоза.

Проведенное нами секвенирование участка гена *MBP-1* позволяет идентифицировать виды *C.immitis* и *C.posadasii*. Определение нуклеотидной последовательности гена *CBP1* и генов  $\alpha$ -1,3-глюкансинтазы и *BYS-1* способствует установлению видовой принадлежности возбудителей гистоплазмоза и бластомикоза соответственно.

Важным аспектом в целях разрешения спорных вопросов идентификации медицински значимых микромицетов может стать применение монолокусного секвенирования ДНК. Распространение и развитие технологий определения первичной последовательности нуклеиновых кислот с помощью одного диагностического набора позволяет осуществить идентификацию целого ряда микромицетов, возбудителей различных микотических инфекций человека, животных и растений. С этой целью были сконструированы несколько пар праймеров. Олигонуклеотиды, обозначенные **L23F** и **L23R**, являлись последовательностями гена *L23*, кодирующего белок L14p/L23e большой субъединицы рибосомы, который принимает участие в формировании ее пептидилтрансферазного центра (<http://pfam.xfam.org/>) и участвует в непосредственном связывании 28S рРНК. Для амплификации и секвенирования последовательностей гена *L23* участки отжига праймеров подбирали таким образом, чтобы основными мишенями для олигонуклеотидных затравок являлись консервативные регионы геномов возбудителей особо опасных микозов.

Второй диагностической мишенью был регион гена *28S рРНК*, используемый, согласно литературным данным, в проекте по баркодированию микроскопических грибов (Eberhardt U., 2012). Выбранные к этой мишени праймеры **28S1F/28S1R** позволили идентифицировать и другие микромицеты, патогенные для человека и животных.

При проведении настоящей работы в качестве сравнения был также использован коммерческий набор для секвенирования MicroSeq D2 LSU rDNA Fungal Identification Kit, разработанный компанией Applied Biosystems (США) для идентификации микромицетов, позволяющий секвенировать D2 регион большой субъединицы рибосомальной РНК. Однако при всех достоинствах этого набора его главным недостатком является отсутствие данных о последовательностях праймеров и их участков отжига, что, в конечном итоге, затрудняет адекватную оценку результатов секвенирования в случае спорных вопросов идентификации культур. Кроме того, данная тест-система требует использования высокой концентрации ДНК в пробе для амплификации, фирменных наборов для

выделения ДНК, а также определенных моделей лабораторного оборудования, что ограничивает возможности ее применения.

С использованием разработанных нами праймеров **28S1F/28S1R**, позволяющих амплифицировать регион гена *28S pPHK*, были идентифицированы методом секвенирования все виды возбудителей кокцидиоидомикоза, гистоплазмоза и бластомикоза, а также микромицеты III-IV групп патогенности, в том числе клинически значимые представители родов *Candida spp.* и *Cryptococcus spp.* из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Результаты, полученные с помощью коммерческой тест-системы MicroSeq D2 LSU rDNA Fungal Identification Kit, подтвердили данные об эффективности разработанных нами диагностических наборов, что позволяет говорить о возможности импортозамещения при создании молекулярно-диагностических препаратов.

Для секвенирования последовательностей ДНК возбудителей кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза с целью совершенствования алгоритма идентификации нами был использован ряд праймеров, ранее разработанные сотрудниками Референс-центра по мониторингу за возбудителями глубоких микозов (Ткаченко Г.А., Гришина М.А., Антонов В.А. и др., 2007; Вьючнова Н.В., Ткаченко Г.А., Гришина М.А., и др., 2012). Вновь созданные пары праймеров **BDags1F/BDags2R** и **Bys-1F/Bys-2R**, предназначенные для обнаружения ДНК возбудителя бластомикоза, также были применены в качестве секвенационных. В дополнение к этому в настоящей диссертационной работе представлены сконструированные генодиагностические наборы для определения нуклеотидной последовательности фрагмента гена рибосомального белка L23 и участка рибосомального гена *28S pPHK* микромицетов.

На основании полученных результатов нами рекомендовано использование секвенирования специфических регионов ДНК в качестве эффективного способа идентификации возбудителей особо опасных микозов. Проведенные исследования помогли оптимизировать процедуру идентификации неизвестной



культуры микромицета. Для этого мы предлагаем дополнить схему лабораторной диагностики глубоких микозов (Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., 2013) этапом монолокусного секвенирования ДНК выделенной культуры предполагаемого возбудителя.

Секвенирование двух локусов – фрагмента гена *L23*, кодирующего белок *L23* большой субъединицы рибосомы, и региона *28S рPHK*, позволило установить видовую принадлежность исследуемых микромицетов. При этом большую диагностическую ценность показало секвенирование гена *28S рPHK* с праймерами **28S1F/28S1R**, так как оно позволило идентифицировать преобладающее количество видов медицински значимых микроскопических грибов, относящихся к возбудителям системных микозов.

Результаты проведенных исследований могут быть использованы в работе Референс-центра по мониторингу за возбудителями глубоких микозов при анализе проб клинического материала и объектов окружающей среды, уточнении таксономического положения штаммов, поступивших для исследования, изучении молекулярно-генетических характеристик возбудителей глубоких микозов, а также создании диагностических наборов и тест-систем для ранней диагностики особо опасных микозов.

## 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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -1,3-глюкансинтазы, составляет  $1 \times 10^4$  кл/мл, а праймеров **Bys-1F/Bys-2R** и зонда **Bys-1P** -  $1 \times 10^5$  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.*, *CBP1 Histoplasma spp.*, гена  $\alpha$ -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 рPHK* 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 rPНК* как на этапе идентификации чистых культур микромицетов, так и анализа проб биологического материала.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Мб - мегабаза

дНТФ – дезоксинуклеотидтрифосфат

кДа - килодальтон

МФА – метод флуоресцирующих антител

п.н. – пары нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР - РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

т.п.н. – тысячи пар нуклеотидов

Трис – трис (гидрооксиметил) аминметан

ЭДТА - натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев В.В. Опасные инфекционные заболевания (Учебное пособие) / В.В. Алексеев. – Волгоград: НП «Здоровье и экология», 2006. – 368с.
2. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт [Электронный ресурс] // Официальный сайт. URL: <http://vnipchi.rosпотребнадзор.ru>. (дата обращения 20.12.2015).
3. Вьючнова Н.В. Конструирование олигонуклеотидных праймеров для выявления ДНК возбудителя гистоплазмоза / Н.В. Вьючнова, Г.А. Ткаченко, М.А. Гришина, С.С. Савченко, В.А. Антонов, А.В. Липницкий // Проблемы Медицинской Микологии. – 2012. – Т. 14, № 2. – С. 58-62.
4. Глубокие микозы / Липницкий А.В., Лесовой В.С., Храпова Н.П., Тихонов Н.Г. // Лабораторная диагностика возбудителей опасных инфекционных болезней. Сб. науч. тр. под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырёва. Саратов, 1998. - Т.2. - С.80-100.
5. Зверев В.В. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Под ред. В. В. Зверева, М. Н. Бойченко. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. В 2-х т. Т. 1 - 448 с.
6. Кашкин П.Н. Руководство по медицинской микологии / П.Н. Кашкин, Н.Д. Шеклаков.- М.: Медицина, 1978. - 325 с.
7. Климко Н.Н. Микозы: диагностика и лечение / Руководство для врачей. 2-е изд. перераб. и доп.- М.: Ви Джи Групп, 2008. - 336 с.
8. Кулаков М.Я. Способ получения эритроцитарного антигенного гистоплазмозного и кокцидиоидомикозного диагностикума / М.Я. Кулаков, В.С. Лесовой, И.В. Новицкая, А.В. Липницкий, В.Г. Пушкарь // Патент на изобретение RUS № 2422832, опубл. 25.01.2010.
9. Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы // Методические указания МУК 4.2.2413-08.

10. Лесовой В.С. Лабораторная диагностика, лечение и профилактика глубоких микозов. Методические рекомендации / В.С. Лесовой, А.В. Липницкий, Н.Г. Тихонов, Н.П. Храпова, К.Б. Яшкулов, И.М. Климова // Элиста: 1995. - 47 с.
11. Лесовой В.С., Липницкий А.В., Тихонов Н.Г., Яшкулов К.Б. СПИД-ассоциированные микозы / В.С. Лесовой, А.В. Липницкий, Н.Г. Тихонов, К.Б. Яшкулов // Элиста: 1995. - 173 с.
12. Липницкий А.В. Проблемы лабораторной диагностики глубоких микозов / А.В. Липницкий, В.С. Лесовой, Н.П. Храпова и др. // Мед. паразитология и паразитарные болезни. - 1995. - №4. – С.53-56.
13. Малеев В. В. Особо опасные микозы (Текст) / под ред. В. В. Малеева. – В.: Волга-Паблишер, 2013. – 193 с.
14. Онищенко Г.Г. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней (Практическое руководство) / Под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырева. – М.: ЗАО «Шико», 2013. – 560 с.
15. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики бруцеллеза для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней // Методические указания МУК 4.2.3010-12.
16. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней // Методические указания МУК 4.2.2870-11.
17. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики чумы для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней // Методические указания МУК 4.2.2940-11.
18. Программа Unipro UGENE [Электронный ресурс] // Официальный сайт. URL: <http://ugene.unipro.ru>. (дата обращения 20.04.2015).
19. Ребриков Д.В. ПЦР «в реальном времени» / Д.В. Ребриков, Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов, П.А. Семёнов, А.М. Савилова, И.А. Кофиади, Д.Д. Абрамов. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 223 с.: ил.
20. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных / О.Ю. Реброва. - М.: Медиа Сфера, 2003. – 305 с.

21. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.2.036-95 Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности // Госсанэпиднадзор России. - М., 1995. – 43 с.
22. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322-08 Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней // Госсанэпиднадзор России. - М., 2008. – 51 с.
23. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.3118-13 Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности) // Госсанэпиднадзор России. - М., 2014. – 150 с.
24. Саттон Д. Определитель патогенных и условно-патогенных грибов: Пер. с англ. / Д. Саттон, А. Фотергилл, М. Ринальди – М.: Мир, 2001. – 486 с., ил.
25. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Грибковые инфекции. Руководство для врачей. 2 изд. — М.: Издательство БИНОМ, 2008. - 480 с.: ил.
26. Ткаченко Г.А. Идентификация возбудителей кокцидиоидомикоза методом полимеразной цепной реакции / Г.А. Ткаченко, М.А. Гришина, В.А. Антонов, С.С. Савченко, В.С. Замараев, В.С. Лесовой, А.В. Липницкий // Мол. генет., микробиол., вирусол.- 2007.- №4.- С. 25-31.
27. Ткаченко Г.А. Перспективы использования ПЦР в реальном времени для диагностики кокцидиоидомикоза / Ткаченко Г.А., Гришина М.А., Савченко С.С., Вьючнова Н.В., Лесовой В.С., Антонов В.А., Липницкий А.В. // Проблемы медицинской микологии. - 2009. - Т. 11, №2. - С. 117.
28. Adenis A.A. Histoplasmosis in HIV-Infected Patients: A Review of New Developments and Remaining Gaps. / Adenis A.A., Aznar C., Couppié P. // Current Tropical Medicine Reports. – 2014. - №2. – P. 119-128.
29. Alanko K. The first two cases of coccidioidomycosis in Finland / K. Alanko, A. Kahanpää, J. Pätäälä // Acta Med Scand. – 1975. – Vol.198, №3. – P.235-240.
30. Alvarez G. Blastomycosis in a young African man presenting with a pleural effusion / G. Alvarez, B. Burns, M. Desjardins, S. Salahudeen, F. AlRashidi,

D. Cameron // Canadian Respiratory Journal : Journal of the Canadian Thoracic Society. - 2006. – Vol. 13. – P. 441–444.

31. Ampel N.M. New Perspectives on Coccidioidomycosis / N.M. Ampel // Proc. Am. Thorac. Soc. - 2010. - Vol 7, №9. – P. 181–185.

32. Andreoni S. Medical Mycology Atlas /S. Andreoni, C. Farina, G. Lombardi - Systems, 2004. - 239 p.

33. Antinori S. Histoplasma capsulatum: More Widespread than Previously Thought. / Antinori S. // The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. – 2014.- Vol 6. – P. 982-983.

34. Arnett M.V. Pulmonary blastomycosis diagnosed in Hawaii / M.V. Arnett, S.L. Fraser, V.X. Grbach // Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health. – 2008. – Vol. 39, №4. – P. 701-705.

35. Ashbee H.R. Histoplasmosis in Europe: report on an epidemiological survey from the European Confederation of Medical Mycology Working Group / H.R. Ashbee, E.G. Evans, M.A. Viviani, B. Dupont, E. Chryssanthou, I. Surmont, A. Tomsikova, P. Vachkov, B. Ener, J. Zala, K. Tintelnot // Med Mycol. – 2008. – Vol. 46. – P. 57–65.

36. Assi M. Histoplasmosis after solid organ transplant. / M. Assi, S. Martin2, L.J. Wheat, C. Hage, A. Freifeld, R. Avery, J.W. Baddley, P. Vergidis, R. Miller, D. Andes, J.H. Young, K. Hammoud, S. Huprikar, D. McKinsey, T. Myint, J. Garcia-Diaz, E. Esguerra, E.J. Kwak, M. Morris, K.M. Mullane, V. Prakash, S.D. Burdette, M. Sandid, J. Dickter, D. Ostrander, S.A. Antoun, D.R. Kaul // Clin Infect Dis. – 2013. – Vol. 57, № 11. – P. 1542–1549.

37. AUXACOLOR2. User manual book. BioRad – USA. – 2005. – 79 p.

38. Babady N.E. Detection of Blastomyces dermatitidis and Histoplasma capsulatum from Culture Isolates and Clinical Specimens by Use of Real-Time PCR / N.E. Babady, S.P. Buckwalter, L. Hall, K.M. Le Febre, M.J. Binnicker, N.L. Wengenack // Journal of Clinical Microbiology. – 2011. – Vol. 9. - P. 3204-3208.



39. Baddley J.W. Geographic distribution of endemic fungal infections among older persons / J.W. Baddley, K.L. Winthrop, N.M. Patkar, E. Delzell, T. Beukelman, F. Xie, L. Chen, J.R. Curtis. // *Emerg Infect Dis.* – 2011. – Vol. 9. – P. 1664-1669.
40. Baig W.W. Epididymal and prostatic histoplasmosis in a renal transplant recipient from southern India / W.W. Baig, R.P. Attur, A. Chawla, S. Reddy, S. Pillai, L. Rao, G. Rao, K. Ashok, P. Yegneswaran // *Transpl. Infect. Dis.* – 2011. – Vol. 13. – P. 489-491.
41. Baily, G.G. Blastomycosis in Africa: clinical features, diagnosis, and treatment / G.G. Baily, V. J. Robertson, P. Neill, P. Garrido, L. F. Levy // *Rev. Infect. Dis.* – 1991. – Vol. 13. P. 1005-1008.
42. Bariola J.R. Detection of *Blastomyces dermatitidis* antigen in patients with newly diagnosed blastomycosis / J.R. Bariola, C.A. Hage, M. Durkin, E. Bensadoun, P.O. Gubbinse, L.J. Wheat, R.W. Bradsher Jr. // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* – 2011. – Vol. 69. – P. 187–191.
43. Bastos K.P. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process / K.P. Bastos, A.M. Bailão, CL Borges, F.P. Faria, M.S. Felipe, M.G. Silva, W.S. Martins, R.B. Fiúza, M. Pereira, C.M. Soares // *BMC Microbiol.* – 2007. – Vol. 7. – P. 29.
44. Batura-Gabryel H. Coccidioidomycosis in a 38-year-old man: a case report / H. Batura-Gabryel, B. Brajer // *Pol. Arch. Med. Wewn.* – 2008. – Vol.118, № 6. – P. 387-390.
45. Baumgardner D.J. Geographic distribution of human blastomycosis cases in Milwaukee, Wisconsin, USA: association with urban watersheds / D.J. Baumgardner, E.M. Knavel, D. Steber, G.R Swain // *Mycopathologia.* – 2006. – Vol.161. – P. 275-282.
46. Beatriz L. Gómez. Histoplasmosis: Epidemiology in Latin America / Beatriz L. Gómez // *Curr Fungal Infect Rep.* – 2011. – Vol. 5. – P. 199–205.

47. Beatriz L. Gómez. Molecular diagnosis of endemic and invasive mycoses: Advances and challenges / Beatriz L. Gómez // *Rev Iberoam Micol.* – 2014. – Vol. 31. – P. 35-41.
48. Benedict K. Invasive Fungal Infections after Natural Disasters / K. Benedict, B.J. Park // *Emerging Infectious Diseases.* – 2014. – Vol. 20, №3. – P. 349-355.
49. Bialek R. Amplification of coccidioidal DNA in clinical specimens by PCR / R. Bialek // *J Clin Microbiol.* – 2005. – Vol.43, №3. – P.1492.
50. Bialek R. Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue / R. Bialek, A. Feucht, C. Aepinus, G. Just-Nübling, V.J. Robertson, J. Knobloch, R. Hohle // *J. Clin. Microbiol.* – 2002b. – Vol.40, № 5. - P.1644–1647.
51. Bialek R. Nested PCR Assays for Detection of *Blastomyces dermatitidis* DNA in Paraffin-Embedded Canine Tissue / R. Bialek, A.C. Cirera, T. Herrmann, C. Aepinus, V.I. Shearn-Bochsler, A.M. Legendre // *Journal of Clinical Microbiology.* 2003;41(1):205-208.
52. Bialek R. PCR assays for identification of *Coccidioides posadasii* based on the nucleotide sequence of the antigen 2/Proline-Rich Antigen / R. Bialek, J. Kern, T. Herrmann, R. Tijerina, L. Ceceñas, U. Reischl, G.M. González // *J. Clin. Microbiol.* – 2004. – Vol. 42. – P. 778–83.
53. Binnicker M.J. Detection of *Coccidioides* Species in Clinical Specimens by Real-Time PCR / M.J. Binnicker, S.P. Buckwalter, J.J. Eisberner, R.A. Stewart, A.E. McCullough, S.L. Wohlfiel, N.L. Wengenack // *Journal of Clinical Microbiology.* – 2007. – Vol. 45, № 1. – P. 173–178.
54. Bir N. A Rapid Method for the Isolation of Genomic DNA From *Aspergillus Fumigatus* / N. Bir, A. Paliwal, K. Muralidhar, P. Reddy, P.U. Sarma // *Preparative Biochemistry.* – 1995. – Vol. 25, №4. – P. 171-181.
55. Blumer S. Variation in enzymatic activities among strains of *Histoplasma capsulatum* and *Histoplasma duboisii* / Blumer S., Kaufman L. // *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology.* – 1968 – Vol. 6, № 3, – P. 203-206.

56. Bolognia J.L. Dermatology: 2-Volume / J.L. Bolognia, J.L. Jorizzo, R.P. Rapini. - Set. St. Louis: Mosby, 2007. – 2584 p.
57. Bracca A. Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in human clinical samples / A. Bracca, M.E. Tosello, J.E. Girardini, S.L. Amigot, C. Gomez, E. Serra // J. Clin. Microbiol. - 2003. - Vol.41. - P. 1753–1755.
58. Bradsher R.W. Blastomycosis / R.W. Bradsher, S.W. Chapman, P.G. Pappas // Infect. Dis. Clin. North. Am. – 2003. – Vol.17. – P.21-40.
59. Brandhorst T.T. Calcium binding by the essential virulence factor BAD-1 of *Blastomyces dermatitidis* / T.T. Brandhorst, G.M. Gauthier, R.A. Stein, B.S. Klein // J. Biol. Chem. – 2005. - № 280. – P. 42156–42163.
60. Brandhorst T.T. Exploiting type 3 complement receptor for TNF-alpha suppression, immune evasion, and progressive pulmonary fungal infection / T.T. Brandhorst, M. Wüthrich, B. Finkel-Jimenez, T. Warner, B.S. Klein // J Immunol. – 2004. - №. 173. – P. 7444–7453.
61. Brandhorst T.T. Targeted gene disruption reveals an adhesin indispensable for pathogenicity of *Blastomyces dermatitidis* / T.T. Brandhorst, M. Wüthrich, T. Warner, B. Klein // J.Exp. Med. - 1999. - Vol. 189. - P. 1207 - 1216.
62. Brown E.M. Phylogenetic Analysis Reveals a Cryptic Species *Blastomyces gilchristii*, spp. nov. within the Human Pathogenic Fungus *Blastomyces dermatitidis* / E.M. Brown, L.R. McTaggart, S.X. Zhang, D.E. Low, D.A. Stevens, S.E. Richardson // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8. – №. 3. - e59237.
63. Brown J. Coccidioidomycosis: epidemiology / J. Brown, K. Benedict, B.J. Park, G.R. Thompson // Clinical Epidemiology. – 2013. - Vol. 5. – P. 185-197.
64. Bubnick M. The *MAT1* Locus of *Histoplasma capsulatum* Is Responsive in a Mating Type-Specific Manner / M. Bubnick, A.G. Smulian // *Eukaryotic Cell*. – 2007. – Vol. 6. - №. 4. P. 616-621.
65. Burik J. Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens / J. Burik, D. Myerson, R.W. Schreckhise, R.A. Bowden // J.Clin.Microbiol.-1998. - Vol. 36, №5. - P.1169–1175.

66. Canteros C.E. Genetic characterization of the fungus involved in the first case of coccidioidomycosis described by Alejandro Posadas in 1892. C.E. Canteros, A. Toranzo, R. Suárez-Alvarez, G. Davel, L.R. Castañon-Olivares, J. Nápoli *Medicina (B Aires)*. – 2009. - Vol. 69. - №. 2. - P. 215-20.

67. Canteros C.E. Genetic characterization of the fungus involved in the first case of coccidioidomycosis described by Alejandro Posadas in 1892 / C.E. Canteros, A. Toranzo, R. Suárez-Alvarez, G. Davel, L.R. Castañon-Olivares, J. Nápoli // *Medicina (B Aires)*. – 2009. – Vol. 69, № 2. – P. 215-220.

68. Capoor M.R. Coccidioidomycosis masquerading as skeletal tuberculosis: an imported case and review of coccidioidomycosis in India / M.R. Capoor, B. Sen, P. Varshney, M. Verghese, M.R. Shivaprakash, A. Chakrabarti // *Trop Doct.* – 2014. – Vol. 44, № 1. – P. 25-28.

69. Carlos W.G. Blastomycosis in Indiana: digging up more cases. / W.G. Carlos, A.S. Rose, L.J. Wheat, S. Norris, G.A. Sarosi, K.S. Knox, C.A. Hage, // *Chest*. – 2010. – Vol. 138. – P. 1377–1382.

70. Casadevall A. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans* // A. Casadevall, A.L. Rosas, J.D. Nosanchuk // *Curr Opin Microbiol.* - 2000. - Vol. 3, № 4. - P. 354-358.

71. CDC. Increase in Reported Coccidioidomycosis – United States, 1998-2012, *MMWR*. - Vol. 62. - №. 12. - P. 217-221.

72. CDC. Notice to Readers: Final 2012 Reports of Nationally Notifiable Infectious Diseases, *MMWR*. - Vol. 62. - №. 33. - P. 669-682.

73. Centers for Disease Control and Prevention [Электронный ресурс] // CDC. URL: <http://www.cdc.gov>. (дата обращения 21.12.2015).

74. Chandesris M.O. Coccidioidomycosis: an imported invasive fungal disease in France / M.O. Chandesris, A. Hot, E. Dannaoui, M.E. Bougnoux, J.P. Viard, B. Dupont, O. Lortholary // *Med Mal Infect.* – 2008. – Vol.38. – P.336-342.

75. Chomczynski P. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction / P. Chomczynski, N. Sacchi // *Anal. Biochem.* - 1987. - Vol. 162, №1. - P. 156-159.

76. Colombo A.L. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America / A.L. Colombo, A. Tobón, A. Restrepo, A. Queiroz-Telles, M. Nucci // *Medical Mycology*. – 2011. - Vol. 49. - P. 785–798.
77. Connolly P.A. Detection of histoplasma antigen by a quantitative enzyme immunoassay / P.A. Connolly, M.M. Durkin, A.M. LeMonte, E.J. Hackett, L.J. Wheat // *Clin Vaccine Immunol*. – 2007. – Vol. – 14, № 12. – P. 1587–1591.
78. Darling S.T. A protozoön general infection producing pseudotubercles in the lungs and focal necroses in the liver, spleen and lymphnodes / S.T. Darling // *J. Am. Med. Ass.* – 1906. - Vol. 46. - P. 1283-1285.
79. Darling S.T. Histoplasmosis: A fatal infection disease resembling kala-azar found among natives of tropical America / S.T. Darling // *Arch. Intern. Med.* – 1908. - P. 107-123.
80. Davies S.F. Serodiagnosis of histoplasmosis and blastomycosis / S.F. Davies, G.A. Sarosi // *Am Rev Respir Dis.* – 1987. - Vol. 136. - P. 254–255.
81. Durkin M, Connolly P, Kuberski T, et al. Diagnosis of coccidioidomycosis with use of the coccidioides antigen enzyme immunoassay / M. Durkin, P. Connolly, T. Kuberskia, R. Myers, B.M. Kubak, D. Bruckner, D. Pegues, L.J. Wheat // *Clin Infect Dis.* – 2008. – Vol. 47, № 8. – P. 69–73.
82. Durkin M, Estok L, Hospenthal D, et al. Detection of coccidioides antigenemia following dissociation of immune complexes / M. Durkin, L. Estok, D. Hospenthal, N. Crum-Cianflone, S. Swartzentruber, E. Hackett, L.J. Wheat // *Clin Vaccine Immunol.* – 2009. – Vol. 16, № 10. – P. 1453–1456.
83. Dworkin M.S. The epidemiology of blastomycosis in Illinois and factors associated with death / M.S. Dworkin, A.N. Duckro, L. Proia, J.D. Semel, G. Huhn // *Clin Infect Dis.* – 2005. - Vol. 41. - P. 107–111.
84. Eberhardt U. Methods for DNA barcoding of fungi / U. Eberhardt // *Methods Mol Biol.* – 2012. – Vol. 858. P. 183-205.
85. Edwards J.A. The Yeast-Phase Virulence Requirement for  $\alpha$ -Glucan Synthase Differs among *Histoplasma capsulatum* Chemotypes / J.A. Edwards, E.A. Alore, C.A. Rappleye // *Eukaryotic Cell.* – 2011. - Vol. 10, №. 1. - P. 87-97.

86. Engelthaler D.M. Next-generation sequencing of *Coccidioides immitis* isolated during cluster investigation / D.M. Engelthaler, T. Chiller, J.A. Schupp, J. Colvin, S.M. Beckstrom-Sternberg, E.M. Driebe, T. Moses, W. Tembe, S. Sinari, J.S. Beckstrom-Sternberg, A. Christoforides, J.V. Pearson, J. Carpten, P. Keim, A. Peterson, D. Terashita, . S. Arunmozhi // *Emerg. Infect. Dis.* – 2011. - Vol. 17, №2. – P. 227–232
87. Finkel-Jimenez B. BAD1, an essential virulence factor of *Blastomyces dermatitidis*, suppresses host TNF-alpha production through TGF-beta-dependent and -independent mechanisms / B. Finkel-Jimenez, M. Wüthrich, B.S. Klein // *Journal of immunology.* – 2002. - Vol. 168. - P. 5746–5755.
88. Finkel-Jimenez B. The WI-1 adhesin blocks phagocyte TNF-alpha production, imparting pathogenicity on *Blastomyces dermatitidis* / B. Finkel-Jimenez, M. Wüthrich, T. Brandhorst, B.S. Klein // *J Immunol.* – 2001. - Vol. 166. - P. 2665–2673.
89. Fischer N.M. A case in Europe of feline histoplasmosis apparently limited to the skin / N.M. Fischer, C. Favrot, M. Monod, P. Grest, K. Rech, S. Wilhelm // *Vet Dermatol.* – 2013. Vol. 24. – P. 635–638.
90. Fisher M.C. Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* spp.nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis* / M.C. Fisher, G.L. Koenig, T.J. White, J. W. Taylor // *J. Clin. Microbiol* - 2002. - Vol. 94, № 1. - P. 73-84.
91. Fisher M.C. Pathogenic clones versus environmentally driven population increase: analysis of an epidemic of the human fungal pathogen *Coccidioides immitis* / M.C. Fisher, G.L. Koenig, T.J. White // *J. Clin. Microbiol.* - 2000. - Vol. 38, № 2. - P.807-813.
92. Fun With Microbiology [Электронный ресурс] // Short descriptions and photographs of some photogenic microorganisms. URL: <http://thunderhouse4-yuri.blogspot.ca>. (дата обращения 22.12.2015).
93. Gaidici A. Transmission of Coccidioidomycosis to a Human via a Cat Bite / A. Gaidici, M.A. Saubolle // *Journal of Clinical Microbiology.* – 2009. – Vol. 47, № 2. – P. 505-506.

94. Gauthier G.M. Dimorphism in Fungal Pathogens of Mammals, Plants, and Insects / G.M. Gauthier // *PLoS Pathogens*. – 2015. – Vol. 11, № 2. - e1004608.
95. Gilardi G.L. Nutritional studies on the yeast phase of *Blastomyces dermatitidis* and *B. brasiliensis* / G.L. Gilardi, N.C. Laffer // *Journal of Bacteriology*. – 1962. – Vol. 83, № 2. – P. 219–227.
96. Gilchrist T. Protozoan dermatitis / T.J. Gilchrist // *Cutaneous General Dis.* – 1894. – Vol. 12. – P. 496–499.
97. Gilchrist T.C. A case of pseudo-lupus vulgaris caused by a blastomyces / T.C. Gilchrist, W.R. Stokes // *The Journal of Experimental Medicine*. – 1898. – Vol. 3, № 1. – P. 53-78.
98. Gilmore S.A. *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) Triggers a Rapid, Temperature-Responsive Morphogenetic Program in Thermally Dimorphic Fungi / S.A. Gilmore, S. Naseem, J.B. Konopka, A. Sil // *PLoS Genetics*. - 2013. - Vol. 9, № 9. - e1003799.
99. Goegebuer T.T. Coccidioidomycosis: an unexpected diagnosis in a patient with persistent cough / T.T. Goegebuer, K.K. Nackaerts, U.U. Himpe, E. Verbeken, K. Lagrou // *Acta. Clin. Belg.* – 2009. - Vol.64, №3. – P.235-238.
100. Guarner J. Detection of Microorganisms in Granulomas That Have Been Formalin-Fixed: Review of the Literature Regarding Use of Molecular Methods / J. Guarner // *Scientifica*. 2012.
101. Guarner J. Histopathologic Diagnosis of Fungal Infections in the 21st Century / J. Guarner, Brandt M.E. // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2011. – Vol. 24. -№ 2. – P. 247-280.
102. Gugnani H.C. Histoplasmosis in Africa: a review / H.C. Gugnani // *Indian J Chest Dis Allied Sci.* – 2000. – Vol. 42. - № 4. – P. 271-277.
103. Guimarães A.J. Diagnosis of histoplasmosis / A.J. Guimarães, J.D. Nosanchuk, R.M. Zancopé-Oliveira // *Brazilian journal of microbiology*. – 2006. – Vol. 37, № 1. – P. 1-13.
104. Hage C.A. A multicenter evaluation of tests for diagnosis of histoplasmosis / C.A. Hage, J.A. Ribes, N.L. Wengenack, L.M. Baddour, M. Assi, D.S. McKinsey, K.

Hammoud, D. Alapat, N.E. Babady, M. Parker, D. Fuller, A. Noor, T.E. Davis, M. Rodgers, P.A. Connolly, B. El Haddad, L.J. Wheat // *Clin Infect Dis.* – 2011. – Vol. 53, № 5. – P. 448–454.

105. Hage C.A. Histoplasma antigen clearance during treatment of histoplasmosis in patients with AIDS determined by a quantitative antigen enzyme immunoassay / C.A. Hage, E.J. Kirsch, T.E. Stump, C.A. Kauffman, M. Goldman, P. Connolly, P.C. Johnson, L.J. Wheat, J.W. Baddley // *Clin Vaccine Immunol.* – 2011. – Vol. 18, № 4. – P. 661–666.

106. Hall L., Wohlfiel S., Roberts G.D. Experience with the MicroSeq D2 large-subunit ribosomal DNA sequencing kit for identification of filamentous fungi encountered in the clinical laboratory / L. Hall, S. Wohlfiel, G.D. Roberts // *J. Clin. Microbiol.* – 2004. - Vol.42, №2 - P.622-626.

107. Hall L., Wohlfiel S., Roberts G.D. Experience with the MicroSeq D2 large-subunit ribosomal DNA sequencing kit for identification of commonly encountered, clinically important yeast species / L. Hall, S. Wohlfiel, G.D. Roberts // *J. Clin. Microbiol.* – 2003. - Vol.41, №11 - P.5099–5102.

108. Hector R.F. The Public Health Impact of Coccidioidomycosis in Arizona and California / R.F. Hector, G.W. Rutherford, C.A. Tsang, L.M. Erhart, O. McCotter, S.M. Anderson, K. Komatsu, F. Tabnak, D.J. Vugia, Y. Yang, J.N. Galgiani // *International Journal of Environmental Research and Public Health.* – 2011. Vol. 8, №4. – P. 1150-1173.

109. Hirschmann J.V. The Early History of Coccidioidomycosis: 1892–1945 / J.V. Hirschmann // *Clin. Infect. Dis.* - 2007. - Vol.44. - P.1202–1207.

110. Hogan L.H. Altered expression of surface  $\alpha$ -1, 3-glucan in genetically related strains of *Blastomyces dermatitidis* that differ in virulence / L.H. Hogan, B.S. Klein // *Infect Immunol.* – 1994. – Vol. 62. – P. 3543–3546.

111. Hogan L.H. Genomic cloning, characterization, and functional analysis of the major surface adhesin WI-1 on *Blastomyces dermatitidis* yeasts / L.H. Hogan, S. Josvai, B.S. Klein // *J. Biol. Chem.* – 1995. – Vol. 270. – P. 30725–30732



112. Hoog G.S. Molecular phylogeny and taxonomy of medically important fungi / G.S. De Hoog, B. Bowman, Y. Graser, G. Haase, M. El Fari, A.H. Gerrits van den Ende, B. Melzer-Krick, W.A. Untereiner // *Medical Mycology*. – 1998. - Vol. 36. - №. - I P. 52-56.
113. Hung C.Y. Virulence mechanisms of *Coccidioides* / C.Y. Hung, J. Xue, G.T. Cole // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* - 2007. - №1111 . - P. 225-235.
114. Jehangir W. *Coccidioidomycosis and Blastomycosis: Endemic Mycotic Co-Infections in the HIV Patient* / W. Jehangir, G.S. Tadepalli, S Sen., N. Regevik, P. Sen // *Journal of Clinical Medicine Research*. – 2015. – Vol. 7. - № 3. – P. 196-198.
115. Kantarcioglu A.S. Gurel First imported coccidioidomycosis in Turkey: A potential health risk for laboratory workers outside endemic areas / A.S. Kantarcioglu, M. Sandoval-Denis, G. Aygun, N. Kiraz, C. Akman, H. Apaydin, E. Karaman, J. Guarro, G.S. de Hoog, M.S. // *Medical Mycology Case Reports*. – 2014. – Vol. – 3. – P. - 20-25.
116. Kasuga T. Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling / Kasuga T., Taylor J.W., White T.J. // *J. Clin. Microbiol.*- 1999.- Vol.37, №3.- P.653-663.
117. Kauffman C.A. Endemic mycoses: blastomycosis, histoplasmosis and sporotrichosis / C.A. Kauffman // *Infect. Dis. Clin. North Am.* - 2006. - Vol. 20, №3. - P.645-662.
118. Kauffman C.A. Histoplasmosis / C.A. Kauffman // *Clin Chest Med.* - 2009 Vol. 30. - № 2. – P. 217-225.
119. Kauffman C.A. Histoplasmosis: a Clinical and Laboratory Update / C.A. Kauffman // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2007. – Vol. 20, № 1. – P. 115-132.
120. Kaufman L. Detection of two *Blastomyces dermatitidis* serotypes by exoantigen analysis / L. Kaufman, P.G. Standard, R.J. Weeks, A.A. Padhye // *J. Clin. Microbiol.* - 1983. – Vol. 18. – P. 110-114.
121. Keckich D.W. *Coccidioides* fungemia in six patients, with a review of the literature / D.W. Keckich, J.E. Blair, H.R. Vikram // *Mycopathologia*. – 2010. – Vol. 170, № 2. – P. 107-115.

122. Khot P.D. Sequencing and Analysis of Fungal rRNA Operons for Development of Broad-Range Fungal PCR Assays / P.D. Khot, D.L. Ko, D.N. Fredricks // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2009. – Vol. 75, № 6. – P. - 1559-1565.
123. Kishi K. Pulmonary coccidioidomycosis found in healthy Japanese individuals / K. Kishi, T. Fujii, H. Takaya, A. Miyamoto, A. Kurosaki, T. Kohno, K. Yoshimura // *Respirology (Carlton, Vic.)*. – 2008. – Vol. 13, № 2. – P. 252-256.
124. Klein B.S. African strains of *Blastomyces dermatitidis* that do not express surface adhesin WI-1 / B.S. Klein, B.D. Aizenstein, L.H. Hogan // *Infection and Immunity*. – 1997. – Vol. 65, № 4. – P. - 1505-1509.
125. Klein B.S. Dimorphism and virulence in fungi / B.S. Klein, B. Tebbets // *Current opinion in microbiology*. – 2007. – Vol. 10, № 4. – P. 314-319.
126. Klimpel K.R. Cell walls from avirulent variants of *Histoplasma capsulatum* lack  $\alpha$ -1,3-glucan / K.R. Klimpel, W.E. Goldman // *Infect. Immun.* - 1988. – Vol.56. – P.2997–3000.
127. Koufopanou V. Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis* / V. Koufopanou, A. Burt, J.W. Taylor // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*- 1997.-Vol.94, №10.-P.5478-5482.
128. Krajaejun T. Development and Application of a Green Fluorescent Protein Sentinel System for Identification of RNA Interference in *Blastomyces dermatitidis* Illuminates the Role of Septin in Morphogenesis and Sporulation / T. Krajaejun, G.M. Gauthier, C.A. Rappleye, T.D. Sullivan, B.S. Klein // *Eukaryotic Cell*. 2007;6(8):1299-1309. doi:10.1128/EC.00401-06.)
129. Krajaejun T. Discordant Influence of *Blastomyces dermatitidis* Yeast-Phase-Specific Gene *BYS1* on Morphogenesis and Virulence / Krajaejun T., Wüthrich M., Gauthier G.M., Warner T.F., Sullivan T.D., Klein B.S // *Infection and Immunity*. – 2010. – Vol. 78, № 6. – P. 2522-2528.
130. Lacaz C. S. Historical evolution of the knowledge on paracoccidioidomycosis and its etiologic agent, *Paracoccidioides brasiliensis* / C. S. Lacaz, A. Restrepo-Moreno, G. Del Negro // *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. – 1994. – P. 1-11.

131. Laniado-Laborín R. Coccidioidomycosis and other endemic mycoses in Mexico / R. Laniado-Laborín // Rev Iberoam Micol. – 2007. – Vol. 24. – P. 249-258.

132. Laniado-Laborin R. Expanding understanding of epidemiology of coccidioidomycosis in the Western hemisphere / R. Laniado-Laborin // Ann. NY Acad. Sci.- 2007. - Vol. 1111. - P. 19-34.

133. Litvintseva A.P. Valley fever: finding new places for an old disease: coccidioides immitis found in Washington State soil associated with recent human infection / A.P. Litvintseva, N. Marsden-Haug, S. Hurst, H. Hill, L. Gade, E.M. Driebe, C. Ralston, C. Roe, B.M. Barker, M. Goldoft, P. Keim, R. Wohrle, G.R. Thompson, D.M. Engelthaler, M.E. Brandt, T. Chiller // Clin Infect Dis. - 2015 Vol 60. -№ 1. - P. 1-3.

134. López C.E. Dimorphism and pathogenesis of *Histoplasma capsulatum* / C.E. López // Rev. Argent.Microbiol. - 2006. - Vol. 38. - № 4. - P. 235-242.

135. Macêdo R.C. Molecular identification of *Coccidioides* spp. in soil samples from Brazil / R.C. de Macêdo, A.S. Rosado, F.F. da Mota, M.A. Cavalcante, K.D. Eulálio, A.D. Filho, L.M. Martins, M.S. Lazéra B. Wanke // BMC Microbiology. – 2011. - Vol. 11. - P. 108.

136. Magrini V. Fosmid-Based Physical Mapping of the *Histoplasma capsulatum* Genome / V. Magrini, W.C. Warren, J. Wallis, W.E. Goldman, J. Xu, E.R. Mardis, J.D. McPherson // Genome Research. - 2004. - Vol. 14, № 8. - P. 1603-1609.

137. Malcolm R.D. Fungal Infection diagnosis and management -3rd ed / R.D. Malcolm, D.W. Warnock // Blackwell Publishing, 2003. – 366c.

138. McCullough M.J. Molecular epidemiology of *Blastomyces dermatitidis* / M.J. McCullough, A.F. DiSalvo, K.V. Clemons, P. Park, D.A. Stevens // Clin. Infect. Dis. - 2000. - Vol. 30. - P. 328 - 335.

139. McDonough E.S. Geographic distribution of “+” and “-” isolates of *Blastomyces* (*Ajellomyces*) *dermatitidis* in North America / E.S. McDonough, W.J. McNamara, D.M. Chan, M.A. Wallenfang // Am J Epidemiol. - 1973. - Vol. 98. - P. 63–67.

140. Meece J.K. Genetic diversity in *Blastomyces dermatitidis*: implications for PCR detection in clinical and environmental samples / J.K. Meece, J.L. Anderson, B.S. Klein, T.D. Sullivan, S.L. Foley, D.J. Baumgardner, C.F. Brummitt, K.D. Reed // *Med. Mycol.* – 2010. – Vol. 48. – P. 285–290.
141. Millar B.C. False identification of *Coccidioides immitis*: do molecular methods always get it right? / B.C. Millar, X. Jiru, M.J. Walker, J.P. Evans, J.E. Moore // *J Clin Microbiol.* - 2003. - Vol. 41, №12. - P. 5778-5780.
142. Missall T.A. Mechanisms of Resistance to Oxidative and Nitrosative Stress: Implications for Fungal Survival in Mammalian Hosts / T.A. Missall, J.K. Lodge, J.E. McEwen // *Eukaryotic Cell.* - 2004. - Vol. 3, № 4. - P. 835-846.
143. Morjaria S. Ribosomal RNA gene sequencing for early diagnosis of *Blastomyces dermatitidis* infection / S. Morjaria, C. Otto, A. Moreira, R. Chung, V. Hatzoglou, M. Pillai, N. Banaei, Y.W. Tang, C.J. Figueroa // *Infect. Dis.* – 2015. – Vol. 37. – P. 122-124.
144. Muñoz C. Validation and clinical application of a molecular method for identification of *Histoplasma capsulatum* in human specimens in Colombia, South America / C. Muñoz, B.L. Gómez, A. Tobón, K. Arango, A. Restrepo, M.M. Correa, C. Muskus, L.E. Cano, A. González // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2010. - Vol. 17, № 1. - P. 62-67.
145. Muñoz-Hernández B. Parasitic polymorphism of *Coccidioides* spp. / B. Muñoz-Hernández, G. Palma-Cortés, C. Cabello-Gutiérrez, M.A. Martínez-Rivera // *BMC Infectious Diseases.* - 2014. - Vol. 14. - P. 213.
146. Myint T. Histoplasmosis in patients with human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome (HIV/AIDS): multicenter study of outcomes and factors associated with relapse. / T. Myint, A.M. Anderson, A. Sanchez, A. Farabi, C. Hage, J.W. Baddley, M. Jhaveri, R.N. Greenberg, D.M. Bamberger, M. Rodgers, T.N. Crawford, L.J. Wheat // *Medicine (Baltimore).* – 2014. – Vol. 93, № 1. – P 11–18.

147. Neal P.M. Systemic Blastomycosis Diagnosed by Prostate Needle Biopsy / P.M. Neal, A. Nikolai // *Clinical Medicine & Research*. - 2008. - Vol. 6, № 1. - P. 24-28.
148. Nemecek J.C. Global control of dimorphism and virulence in fungi / J.C. Nemecek, M. Wuthrich, B.S. Klein // *Science*. - 2006. - Vol. 312. - P. 583–588.
149. Newman S.L. The WI-1 antigen of *Blastomyces dermatitidis* yeasts mediates binding to human macrophage CD11b/CD18 (CR3) and CD14 / S.L. Newman, S. Chaturvedi, B.S. Klein // *J Immunol*. - 1995. - Vol. 154. - P. 753–761.
150. Nguyen C. Recent Advances in Our Understanding of the Environmental, Epidemiological, Immunological, and Clinical Dimensions of Coccidioidomycosis / C. Nguyen, B.M. Barker, S. Hoover, D.E. Nix, N.M. Ampel, J.A. Frelinger, M.J. Orbach, J.N. Galgiani // *Clinical Microbiology Reviews*. 2013. – Vol. 26, № 3. - P. - 505-525.
151. Nosanchuk J.D. *Blastomyces dermatitidis* produces melanin in vitro and during infection / J.D. Nosanchuk , D. van Duin, P. Mandal, P. Aisen, A.M. Legendre, A. Casadevall // *FEMS Microbiol Lett*. - 2004. Vol. 239, № 1. - P. 187-193.
152. Nosanchuk J.D. *Coccidioides posadasii* produces melanin in vitro and during infection / J.D. Nosanchuk, J.J. Yu, C.Y. Hung, A. Casadevall, G.T. Cole // *Fungal Genet Biol*. - 2007. - Vol. 44, № 6. - P. 517-520.
153. Nosanchuk J.D. *Histoplasma capsulatum* Synthesizes Melanin-Like Pigments In Vitro and during Mammalian Infection / J.D. Nosanchuk, B.L. Gómez, S. Youngchim, S. Díez, P. Aisen, R.M. Zancopé-Oliveira, A. Restrepo, A. Casadevall, A.J. Hamilton // *Infect Immun*. - 2002. - Vol. 70, № 9. - P. 5124–5131.
154. Panackal A.A. Fungal infections among returning travelers / A.A. Panackal, R.A. Hajjeh, M.S. Cetron, D.W. Warnock // *Clin. Infect. Dis*. - 2002. - Vol. 35. - P. 1088-1095.
155. Pappagianis D. Epidemiology of coccidioidomycosis / D. Pappagianis // *Curr. Top. Med. Mycol*. - 1988. - №2. - P. 199–238.
156. Park B.J. An epidemic of coccidioidomycosis in Arizona associated with climatic changes, 1998-2001 / B.J. Park, K. Sigel, V. Vaz, K. Komatsu, C. McRill, M.

Phelan, T. Colman, A.C. Comrie, D.W. Warnock, J.N. Galgiani, R.A. Hajjeh // *J. Infect. Dis.* - 2005. - Vol. 191. - P.1981-1987.

157. Petersen L.R. Coccidioidomycosis among Workers at an Archeological Site, Northeastern Utah / L.R. Petersen, S.L. Marshall, C. Barton-Dickson, R.A. Hajjeh, M.D. Lindsley, D.W. Warnock, A.A. Panackal, J.B. Shaffer, M.B. Haddad, F.S. Fisher, D.T. Dennis, J. Morgan // *Emerg. Infect. Dis.* - 2004. - Vol.10, № 4. - P. 637-642.

158. Reed K.D. Ecologic niche modeling of *Blastomyces dermatitidis* in Wisconsin / K.D. Reed, J.K. Meece, J.R. Archer, A.T. Peterson // *PLOS One.* - 2008. Vol. 3. - e2034.

159. Richer S.M. Development of a highly sensitive and specific blastomycosis antibody enzyme immunoassay using *Blastomyces dermatitidis* surface protein BAD-1 / S.M. Richer, M.L. Smedema, M.M. Durkin, T.T. Brandhorst, C.A. Hage, P.A. Connolly, D.S. Leland, T.E. Davis, B.S. Klein, L.J. Wheata // *Clin Vaccine Immunol.* – 2014. Vol. 21, № 2. – P. 143–146.

160. Rixford E. Two cases of protozoan (coccidioidal) infection of the skin and other organs / E. Rixford, T.C. Gilchrist // *Johns Hopkins Hospital Reports.* - 1896. - Vol. 1. - P. 209–268

161. Rocha-Lima H. Histoplasmosis und epizootic lymphangitis / H. da Rocha-Lima // *Arch. Schiffs. Tropenhyg.* – 1912. - Vol. 16. - P. 79-85.

162. Rocha-Lima, H. Beitrag zur Kenntnis der Blastomykosen - Lymphangitis epizootica und Histoplasmosis / H. da Rocha-Lima // *Zentralbl. bakteriol.* - 1912-1913. - Vol. 67. - P. 223-249.

163. Romero-Martinez R. Biosynthesis and Functions of Melanin in *Sporothrix schenckii* / R. Romero-Martinez, M. Wheeler, A. Guerrero-Plata, G. Rico, H. Torres-Guerrero // *Infect Immun.* - 2000. - Vol. 68, № 6. - P. 3696–3703.

164. Rooney P.J. Linking fungal morphogenesis with virulence / P.J. Rooney, B.S. Klein // *Cell Microbiol.* - 2002. - Vol. 4. P. 127–137.

165. Rooney P.J. Selective expression of the virulence factor BAD1 upon morphogenesis to the pathogenic yeast form of *Blastomyces dermatitidis*: evidence for

transcriptional regulation by a conserved mechanism / P.J. Rooney, T.D. Sullivan, B.S. Klein // *Mol Microbiol.* - 2001. - Vol. 39. - P. 875–889.

166. Saccente M. Clinical and Laboratory Update on Blastomycosis / M. Saccente, G.L. Woods // *Clinical Microbiology Reviews.* - 2010. - Vol. 23, № 2. P. 367-381.

167. Samaila M.O. Cutaneous manifestations of deep mycosis: an experience in a tropical pathology laboratory / M.O. Samaila, K. Abdullahi // *Indian Journal of Dermatology.* - 2011. - Vol. 56, № 3. P. 282-286.

168. San-Blas G. Paracoccidioides brasiliensis: cell wall structure and virulence / G. San-Blas, F. San-Blas // *Mycopathologia.* - 1977. - Vol. 62. - P. 77–86.

169. Sanyal M. Histoplasma capsulatum in the soil of Gangetic Plain in India / M. Sanyal, A. Thammayya // *The Indian journal of medical research.* - 1975. - Vol. 63, № 7. - 1020–1028.

170. Sharpton T.J. Comparative genomic analyses of the human fungal pathogens *Coccidioides* and their relatives / T.J. Sharpton, J.E. Stajich, S.D. Rounsley, M.J. Gardner, J.R. Wortman, V.S. Jordan, R. Maiti, C.D. Kodira, D.E. Neafsey, Q. Zeng, C.Y. Hung, C. McMahan, A. Muszewska, M. Grynberg, M.A. Mandel, E.M. Kellner, B.M. Barker, J.N. Galgiani, M.J. Orbach, T.N. Kirkland, G.T. Cole, M.R. Henn, B.W. Birren, J.W. Taylor // *Genome Research.* - 2009. - Vol. 19, № 10. - P. 1722-1731.

171. Sheff K.W. Development of a rapid, cost-effective TaqMan Real-Time PCR Assay for identification and differentiation of *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* / K.W. Sheff, E.R. York, E.M. Driebe, B.M. Barker, S.D. Rounsley, V.G. Waddell, S.M. Beckstrom-Sternberg, J.S. Beckstrom-Sternberg, P.S. Keim, D.M. Engelthaler // *Med. Mycol.* – 2010. – Vol.48, №3. – P.466-469.

172. Sidamonidze K. Real-Time PCR Assay for Identification of *Blastomyces dermatitidis* in Culture and in Tissue / K. Sidamonidze, M.K. Peck, M. Perez, D. Baumgardner G. Smith, V. Chaturvedi, S. Chaturvedi // *Journal of Clinical Microbiology.* - 2012. - Vol. 50, №5. - P. 1783-1786.

173. Sigler L. Taxonomy of *Malbranchea* and some other hyphomycetes with arthroconidia // Sigler L., Carmichael J.W. // *Mycotaxon*. - 1976. - №4. - P.349-388
174. Smith J.A. Blastomycosis / J.A. Smith, C.A. Kauffman // *Proc. Am. Thorac. Soc.* – 2010. – Vol.7, №3. – P. 173-180.
175. Springer J. Molecular techniques in the diagnosis of deep and systemic mycosis / J. Springer, H. Einsele, J. Loeffler // *Clinics in Dermatology*. – 2012. – Vol. – 30. – P. 651–656.
176. Stephens J. Cutaneous blastomycosis in the absence of active pulmonary disease / J. Stephens // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 2007. – Vol.56. – P.130.
177. Stockman L. Evaluation of commercially available acridinium ester-labeled chemiluminescent DNA probes for culture identification of *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, and *Histoplasma capsulatum* / L. Stockman, K.A. Clark, J.M. Hunt, G.D. Roberts // *Journal of Clinical Microbiology*. - 1993. - Vol. 31, № 4. - P. 845-850.
178. Sunenshine R.H. Public health surveillance for coccidioidomycosis in Arizona / R.H. Sunenshine, S. Anderson, L. Erhart, A. Vossbrink, P.C. Kelly, D. Engelthaler, K. Komatsu // *Ann. NY Acad. Sci.* –2007. – Vol.1111. – P.96–102.
179. Swartzentruber S., Rhodes L., Kurkjian K., et al. Diagnosis of acute pulmonary histoplasmosis by antigen detection / S. Swartzentruber, L. Rhodes, K. Kurkjian, M. Zahn, M. E. Brandt, P. Connolly, L. J. Wheat // *Clin Infect Dis.* – 2009. Vol -49, № 12. – P. 1878–1882.
180. Tarr M. *Blastomyces* Antigen Detection for Monitoring Progression of Blastomycosis in a Pregnant Adolescent / M. Tarr, J. Marcinak, K. Mongkolrattanothai, J.L. Burns, L.J. Wheat, M. Durkin, M. Ismail // *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. – 2007.
181. Teixeira M.M. Molecular and Morphological Data Support the Existence of a Sexual Cycle in Species of the Genus *Paracoccidioides* / M.M. Teixeira, R.C. Theodoro, L.S. Derengowski, A.M. Nicola, E. Bagagli, M.S. Felipe // *Eukaryotic Cell*. - 2013. - Vol. 12, № 3. - P. 380-389.



182. Teixeira M.M. Paracoccidioides Species Complex: Ecology, Phylogeny, Sexual Reproduction, and Virulence / M.M. Teixeira, R.C. Theodoro, G. Nino-Vega, E. Bagagli, M.S. Felipe // PLoS Pathogens. - 2014. - Vol. 10, № 10. - e1004397.
183. Theel E.S.  $\beta$ -d-Glucan Testing Is Important for Diagnosis of Invasive Fungal Infections / E.S. Theel, C.D. Doern // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2013. - Vol. 51, № 11. - P. 3478-3483.
184. Tomsíková A. A case of coccidioidomycosis in Plzen / A. Tomsíková // *Cesk. Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* – 1993. – Vol. 42, №2. – P. 83-86.
185. Verghese S. P.Coccidioidomycosis in India: report of a second imported case / S. Verghese, D. Arjundas, K.C. Krishnakumar, P. Padmaja, D. Elizabeth, A.A. Padhye, D.W. Warnock // *Med. Mycol.* - 2002. - Vol.40, №3. - P. 307-309.
186. Viriyakosol S. Dectin-1 Is Required for Resistance to Coccidioidomycosis in Mice / S. Viriyakosol, M.P. Jimenez, M.A. Gurney, M.E. Ashbaugh, J. Fierer // *mBio*. - 2013. - Vol. 4, № 1. – P. 597-612.
187. Viriyakosol S. Gene expression in human fungal pathogen Coccidioides immitis changes as arthroconidia differentiate into spherules and mature / S. Viriyakosol, A. Singhanian, J. Fierer, J. Goldberg, T.N. Kirkland, C.H. Woelk // *BMC Microbiology*. - 2013. – Vol. 13. – P. 121.
188. Vyas K.S. Advances in the serodiagnosis of blastomycosis / K.S. Vyas, J.R. Bariola, R.W. Bradsher // *Curr Fung Infect Rep.* - 2008. - Vol. 2. - P. 227–231.
189. Wheat L.J. Antigen clearance during treatment of disseminated histoplasmosis with itraconazole versus fluconazole in patients with AIDS / L.J. Wheat, P. Connolly, N. Haddad, A. Le Monte, E. Brizendine, R. Hafner // *Antimicrob. Agents Chemother.* - 2002. – Vol. 46. – P. 248–250.
190. Wheat L.J. Approach to the Diagnosis of Histoplasmosis, Blastomycosis and Coccidioidomycosis / L.J. Wheat, K.S. Knox, C.A. Hage. // *Current Treatment Options in Infectious Diseases*. – 2014. – Vol. 6. – P. 337–351.
191. Wheat L.J. Clinical practice guidelines for the management of patients with histoplasmosis: 2007 Update by the infectious diseases society of America / Wheat L.J.,

Freifeld A.G., Kleiman M.B., Baddley J.W., McKinsey D.S., Loyd J.E., Kauffman C.A. // Clin. Infect. Dis. – 2007. – Vol. 45. – P. 807–825.

192. Wheat L.J. False-positive Histoplasma antigenemia caused by antithymocyte globulin antibodies / L.J. Wheat, P. Connolly, M. Durkin, B.K. Book, A.J. Tector, J. Fridell, M.D. Pescovitz // Transpl. Infect. Dis. - 2004. – Vol. 6. – P. 23–27.

193. Wheat L.J., Kohler R.B., Tewari R.P. Diagnosis of disseminated histoplasmosis by detection of Histoplasma capsulatum antigen in serum and urine specimens / L.J. Wheat, R.B. Kohler, R.P. Tewari // N Engl J Med. – 1986. – Vol 314, № 2. – P. 83–88.

194. Whiston E. Comparative Transcriptomics of the Saprobic and Parasitic Growth Phases in *Coccidioides* spp. / E. Whiston, W.H. Zhang, T.J. Sharpton, G. Jui, G.T. Cole, J.W. Taylor // PLoS ONE. - 2012. - Vol. 7. № 7. - e41034.

195. Wüthrich M. Adaptive Immunity to Fungi / M. Wüthrich, G.S. Deepe, B. Klein // Annual review of immunology. - 2012. - Vol. 30. - P. 115-148.

196. Wuthrich M. V beta1+ J beta1.1+/V alpha2+ J alpha49+ CD4+ T cells mediate resistance against infection with *Blastomyces dermatitidis* / M. Wuthrich, H.I. Filutowicz, H.L. Allen, G.S. Deepe, B.S. Klein // Infect. Immun. - 2007. - Vol. 75. - P. 193 - 200.