

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ
ЧЕЛОВЕКА
ФКУЗ ВОЛГОГРАДСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ РОСПОТРЕБНАДЗОРА

На правах рукописи

ШАРОВ ТИМУР НИКОЛАЕВИЧ

**РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМОВ ЭКСПРЕСС-ИДЕНТИФИКАЦИИ И
БЕЛКОВОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ *COCCIDIOIDES* SPP.
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**

03.02.03 – микробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
доцент Д.В. Викторов

Волгоград – 2017

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Характеристика микромицетов рода <i>Coccidioides</i>	15
1.2 Методы идентификации, типирования и белкового возбудителей микозов	20
1.3. Применение технологии MALDI-TOF масс-спектрометрии для идентификации биомаркеров белковой природы	48
СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	52
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	52
2.1 Штаммы микроорганизмов и условия культивирования	52
2.2 Питательные среды и методы культивирования	55
2.3 Подготовка штаммов <i>Coccidioides</i> spp. для масс-спектрометрического анализа	56
2.4 2.4. Подготовка штаммов возбудителей оппортунистических микозов для масс-спектрометрического анализа	57
2.5 Регистрация масс-спектров клеток микромицетов	58
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА СХЕМЫ ПРОБОПОДГОТОВКИ КЛЕТОК COCCIDIOIDES SPP. ДЛЯ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ	60
3.1 Подбор метода пробоподготовки, обеспечивающего обеззараживание исследуемого материала	60
3.2. Оптимизация методов экстракции протеинов из клеток <i>Coccidioides</i> spp.	62
ГЛАВА 4. ПОЛУЧЕНИЕ И СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КОКЦИДИОИДОМИКОЗА	65
4.1 Получение репрезентативного набора характеристических масс-спектров коллекционных штаммов <i>Coccidioides</i>	65
4.2 Изучение влияния условий культивирования микромицетов на характеристики масс-спектров	72
4.3 Идентификация микромицетов III-IV групп патогенности на основе анализа клеточных масс-спектров	75
4.4 Идентификация родо- и видоспецифичных пиков клеточных масс-спектров	78

микромицетов рода <i>Coccidioides</i> . Разработка раздела базы данных масс-спектров SARAMIS™ для идентификации штаммов <i>Coccidioides</i> spp.	
4.5 Анализ возможности использования масс-спектрометрического профилирования штаммов <i>Coccidioides</i> spp. для внутривидового типирования возбудителей	86
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	90
ВЫВОДЫ	98
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	100
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	101

ВВЕДЕНИЕ

Кокцидиоидомикоз – одно из наиболее опасных инфекционных заболеваний микотической природы, вызываемое первичными грибными патогенами *Coccidioides immitis* и *C. posadasii*. В соответствии с действующими санитарно-эпидемиологическими правилами СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности», возбудители кокцидиоидомикоза относятся ко второй группе патогенности (опасности).

Значимость проблемы кокцидиоидомикоза за последние десятилетия возросла не только для традиционно эндемичных регионов Америки, но и для стран, где заболевание ранее не регистрировалось. Случаи заболевания кокцидиоидомикозом имели место в Австралии, Финляндии, Новой Зеландии, Великобритании, Индии, Японии, Таиланде [Brown J., 2013, Kishi K., et al., 2008]. Распространение этого микоза по всему миру связано, в первую очередь, с развитием туризма: большинство лиц, инфицированных микромицетами рода *Coccidioides*, заболели случайно при посещении тех стран, где микромицет присутствует в почве [Особо опасные микозы, 2013]. Проблема биотерроризма, обострение которой наблюдается в современном мире, требует по-новому взглянуть на возможность распространения кокцидиоидомикоза. Кроме этого, возбудители кокцидиоидомикоза попадают за пределы своего ареала с продуктами растениеводства. Также высокой опасности заражения подвергаются пациенты при пересадке органов от больных доноров [Blair J.E., 2001]. Все это указывает на существующую реальную опасность завоза в Россию этого возбудителя из эндемичных районов.

Высокая патогенность *Coccidioides* spp. для человека, отсутствие средств специфической профилактики кокцидиоидомикоза, выраженная резистентность возбудителей ко многим химиотерапевтическим препаратам требуют пристального внимания к этим микроорганизмам, прежде всего с диагностических позиций, а также с точки зрения необходимости установления источников инфекции, механизмов циркуляции возбудителей и этиологической

расшифровки возможных вспышек заболевания, т.е. совершенствования существующих методик и разработки новых эффективных методов идентификации и типирования патогенных микромицетов [Fisher M.C., 2000, Fisher M.C., et al., 2002].

Большую значимость для идентификации и внутривидовой дифференциации штаммов микромицетов на современном этапе имеют разнообразные молекулярно-генетические методы, в частности, основанные на полимеразной цепной реакции. В отличие от методов биотипирования и серотипирования, считавшихся ранее традиционными, молекулярно-генетические методы обладают большей разрешающей способностью и обеспечивают более высокий уровень воспроизводимости.

Значительным потенциалом для исследований в области белкового анализа микроорганизмов обладают протеомные методы исследования качественного и количественного белкового состава клеток, а также экспрессии белков в различных физиологических состояниях. С появлением высокотехнологического оборудования разрешающая способность некоторых протеомных методов исследования стала сопоставима с молекулярно-генетическими методами.

К протеомным методам, используемым для внутривидового типирования, относят, например, мультилокусный энзим-электрофорез (МЭЭ). На основании анализа электрофоретической подвижности аллозимов (альтернативных форм ферментов) можно сделать предположение о структуре кодирующих их генов [Brun S., Madrid H., Gerrits B., et al., 2013]. Так, Pereira et al, анализируя клинические изоляты видов *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* и *C. guilliermondii*), сделали вывод об эффективности метода для целей внутривидовой дифференциации [Pereira C., Rosa E., Rosa R., et al., 2000]. Caugant P. С соавторами, исследуя методом МЭЭ клинические изоляты *C. albicans*, показали его применимость для эпидемиологического типирования [Caugant D., 1993].

В 2008 году сотрудниками Волгоградского научно-исследовательского противочумного института была проведена работа по типированию патогенных

штаммов *Coccidioides* spp. на основе разделения их белковых фракций в SDS-полиакриламидном геле с последующим компьютерным анализом полученных протеинограмм. При нумерическом анализе сходства профилей суммарных клеточных протеинов было показано, что белковые профили исследуемых штаммов практически в каждом случае (за исключением двух штаммов) имели строго индивидуальный характер. Кроме того, по результатам UPGMA-группирования, все исследуемые штаммы были разделены на 2 группы, степень соответствия протеинограмм которых не превышала 5%, но внутри группы варьировала в диапазоне 50-75%. Использованный метод был достаточно прост в исполнении и обладал хорошей воспроизводимостью, но требовал выделения и фракционирования белкового компонента. Помимо этого, с помощью метода можно только разделить исследуемую совокупность штаммов на близкородственные группы, но невозможно отделить каждый штамм от остальных в этой совокупности на основе его индивидуальных характеристик.

Протеомный подход в сочетании с высокоточным методом масс-спектрометрии показал себя эффективным инструментом для решения проблем идентификации и внутривидовой дифференциации в эпидемиологии и молекулярной биологии. Масс-спектрометрия представляет собой метод исследования вещества путем ионизации молекул с последующей регистрацией масс-спектра (двумерного отображения количества заряженных частиц в зависимости от отношения их массы к заряду) [Navlicek V., 2013]. В настоящее время разработано специальное программное обеспечение для изучения белковых масс-спектров, созданы базы данных, содержащие информацию о референтных спектрах микроорганизмов. Возможность получения специфичных для конкретного штамма масс-спектров с последующим их анализом создаёт основу для использования данного метода для идентификации, и, потенциально, типирования микроорганизмов [Aebersold R., 2003, Domon B., 2006].

Из всех разновидностей масс-спектрометрии одним из наиболее эффективных в плане разработки схем идентификации микроорганизмов является метод времяпролетной спектрометрии с матрично-активированной лазерной

десорбцией/ ионизацией (MALDI-TOF). Ионизация лазером относится к «мягким» методам ионизации и оптимальна для работы с высокомолекулярными соединениями, например, с белками. Bizzini A. и др. показали, что методом MALDI-TOF можно идентифицировать белковые профили целого ряда микроорганизмов, включая грамположительные и грамотрицательные бактерии, а также дрожжи [Bizzini A., Durussel C., 2010]. Holbrook E. и др. описали опыт применения тандемной масс-спектрометрии в сочетании с жидкостной хроматографией для типирования *Histoplasma capsulatum* [Holbrook E., Edwards J., 2011]. Была выявлена разница в белковом составе различных штаммов, в том числе - на разных фазах роста микроорганизма. Marklein G. и Josten M. с помощью метода MALDI-TOF проанализировали большое число изолятов *Candida*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Trichosporon*, *Geotrichum*, *Pichia* и *Blastoschizomyces*. В сравнении с результатами биохимического исследования (тест-система API ID 32C) и секвенирования последовательностей гена, кодирующего 26S РНК, метод MALDI-TOF был более эффективен для идентификации и внутривидового разделения изолятов на группы; с помощью него удалось однозначно идентифицировать 247 изолятов (92,5%), кроме того, в результате был выявлен вид *Candida metapsilosis*, не идентифицируемый биохимическими методами, но обнаруживаемый методом MALDI-TOF [Marklein G., Josten M., 2009].

Несомненными преимуществами масс-спектрометрического метода типирования являются относительная дешевизна (основные расходные материалы – растворы матриц для ионизации), возможность экспресс-анализа (пробоподготовка занимает 5-10 минут на один образец, а непосредственно процедура снятия спектра – приблизительно 1-2 минуты на образец), а также возможность одновременного проведения анализа большого количества образцов. Кроме того, применением соответствующего программного обеспечения можно автоматизировать процесс и избавиться от необходимости самостоятельно интерпретировать спектры [L'Ollivier C., C. Cassagne, A. Normand et al. 2013].

Протеомные методы типирования по многим своим параметрам (разрешающая способность, чувствительность), могут не уступать генотипическим, а по некоторым (скорость анализа, стоимость расходных материалов, отсутствие влияния неспецифичной ДНК на результат) – обладать явным преимуществом [Lau A., Drake S., Calhoun L. et al., 2013]. В рамках планируемой работы предполагается оценить возможности применения технологии MALDI-TOF для идентификации и белкового профилирования возбудителей кокцидиоидомикоза.

Степень научной разработанности темы

Возбудители кокцидиоидомикоза, *Coccidioides immitis* и *Coccidioides posadasii* являются наиболее типичными представителями группы особо опасных микозов, в одних только США ежегодно регистрируются тысячи случаев заболевания [Sheff K.W., York E., Driebe E. et al., 2010]. Опыт терапии больных кокцидиоидомикозом демонстрирует значительное количество случаев развития пневмонии, образования гранул в легких и, а в случае ослабления иммунной системы, нередко и диссеминации инфекционного процесса [Fisher M.C., Koenig G., White T., et al. 2001].

Диагностика кокцидиоидомикоза включает в себя несколько возможных методов. Самый распространенный метод - это выделение чистой культуры микромицета с последующим микроскопическим анализом и получением сферульной фазы для окончательного подтверждения диморфизма. Выделение культуры *Coccidioides* spp. или гистологическая идентификация микромицета в ткани позволяют окончательно установить диагноз кокцидиоидомикоза. Однако для культурального подтверждения кокцидиоидомикоза требуется, в среднем, 1 неделя. Вместе с тем, при диагностике тяжелых форм кокцидиоидомикоза культуры удастся получить лишь в 39 % случаев при диссеминации заболевания и в 6 % - при развитии легочной формы [Johnson S., Zimmermann M., Pappagaanis D., 1996]

Иммуносерологические методы занимают достаточно важное место в диагностике кокцидиоидомикоза. Для обнаружения антигена можно использовать двухкомпонентную РНГА, РИД, определение уровня антигенов, а также так же РСК для определения уровня так называемых ТР и СР антител. Недостатками иммуноферментных методов является недостаточная специфичность и необходимость в получении высокоочищенных рекомбинантных антигенов [Hung C., Xue J., Cole G., 2007].

В последние годы для идентификации возбудителей кокцидиоидомикоза стали использовать молекулярно-биологические подходы, основанные на анализе генома. В большинстве публикаций по разработке ПЦР-систем для идентификации возбудителей микозов поиск праймеров основан на данных секвенирования генов рРНК (18S рРНК, ITS регион, 28S рРНК), широко представленных в различных генетических базах данных [Bialek R., 2005]. Преимуществом данной ДНК-мишени для ПЦР является консервативность и мультикопийность этого гена. Необходимо помнить, что генетические базы данных, касающиеся генов рРНК, неполны ни для сапробных грибов, ни для грибов, имеющих медицинское значение. Поэтому при идентификации возбудителей особо опасных микозов, основанной на детекции последовательностей рибосомальных генов, всегда имеется вероятность получения ложноположительных результатов, обусловленных наличием гомологичных фрагментов ДНК микромицетов. На основании данных литературы можно сделать заключение о необходимости секвенирования всех продуктов амплификации, если в ПЦР-тест-системе используются праймеры, разработанные на основе фрагментов рибосомальных генов возбудителей микозов. В противном случае можно столкнуться с ложноположительными результатами, в частности, при исследовании объектов внешней среды. [Anstead G.M., Graybill J., 2006].

По мнению многих исследователей, масс-спектрометрический метод идентификации патогенных микроорганизмов, является важным и полезным инструментом в клинической и исследовательской практике. [Hillenkamp F., Peter-

Katalinic J., 2013]. При этом референтные масс-спектры *Coccidioides spp.* в существующих базах данных не представлены.

Изучение масс-спектров *C. immitis* и *C. posadasii* позволяет судить о значительном разнообразии белковых компонентов мицелиальной фазы этих микромицетов. Масс-спектрометрический анализ данных масс-спектров является актуальным инструментом для более детального исследования таксономической структуры *Coccidioides spp.*, а впоследствии и остальных микромицетов II группы патогенности. Помимо этого, достаточно важным является возможность применение результатов такого рода исследования для совершенствования схем диагностики и эпидемиологического мониторинга особо опасных микозов.

Цель работы

Разработка алгоритмов экспресс-идентификации и белкового профилирования видов *Coccidioides* на основе сравнительного анализа MALDI-TOF масс-спектров клеточных белков.

Задачи

- 1) Разработать комплекс методических приемов обработки клеток *Coccidioides*, сочетающий обеззараживание и выделение белковых компонентов для исследования методом MALDI-TOF масс-спектрометрии.
- 2) Получить репрезентативный набор характеристических масс-спектров коллекционных штаммов *Coccidioides*.
- 3) Разработать раздел, дополняющий электронную базу данных SARAMIS масс-спектрами для идентификации и белкового профилирования изолятов *Coccidioides*.
- 4) Разработать дополнения к схемам идентификации возбудителей особо опасных инфекционных болезней на базе Референс-центров и Национальных центров верификации диагностической деятельности методом MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Научная новизна

В рамках диссертационной работы:

Впервые разработан комплекс методических приемов пробоподготовки, обеспечивающий необходимый уровень безопасности работ при MALDI-TOF масс-спектрометрии клеток *Coccidioides* spp.

Впервые исследована вариабельность MALDI-TOF спектров клеток штаммов *Coccidioides* spp. при различных условиях культивирования и даны рекомендации по достижению воспроизводимости получения масс-спектров исследуемых микромицетов.

Впервые сформированы референтные масс-спектры видов *Coccidioides* и разработан раздел электронной базы данных MALDI-TOF спектров SARAMIS™ для идентификации и типирования изолятов *Coccidioides* spp.

Впервые проведена паспортизация коллекционного фонда штаммов *Coccidioides* spp. на основе MALDI-TOF масс-спектрометрии клеточных белков.

Разработанные алгоритмы экспресс-идентификации и типирования видов *Coccidioides* на основе сравнительного анализа характеристических MALDI-TOF масс-спектров клеточных белков предложены в качестве дополнений к схемам молекулярного типирования возбудителей особо опасных инфекционных болезней на базе Референс-центров и Национальных центров верификации диагностической деятельности.

Теоретическая и практическая ценность работы

Материалы исследований в рамках диссертационной работы были использованы при разработке разделов МУ «Идентификация и типирование возбудителей особо опасных инфекционных болезней методом MALDI-TOF MS на базе Референс-центров и Национальных центров верификации диагностической деятельности» и проекта МУ «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики возбудителей особо опасных микозов для

лабораторий территориального, регионального и федерального уровней», проекта Методические рекомендации МР 4.2.0089-14 "Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) для индикации и идентификации возбудителей I - II групп патогенности" (утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом РФ 24 апреля 2014 г.), а также при составлении ряда нормативно-методических документов учрежденческого уровня внедрения.

Разработанные в ходе выполнения диссертационного исследования методические приемы и аналитические алгоритмы используются для паспортизации и углубленного изучения свойств штаммов патогенных микромицетов в лабораториях Волгоградского научно-исследовательского противочумного института и работе Референс-центра по мониторингу за возбудителями глубоких микозов.

Методология и методы исследования

Данное исследование основано на проведении масс-спектрического анализа клеточных экстрактов различных штаммов возбудителей кокцидиоидомикоза. При этом использовался масс-спектрометр Axima Perfomance, и инструментальный программный комплекс SARAMIS v. 3.62 для проведения анализа и обработки полученных характеристических масс-спектров. В результате был получен набор собственных референтных масс-спектров суммарных клеточных белков *Coccidioides immitis* и *Coccidioides posadasii* и протестирована эффективность его применения для идентификации коллекционных штаммов возбудителей кокцидиоидомикоза.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработанный метод пробоподготовки клеток *Coccidioides* для MALDI-TOF масс-спектрометрии, основанный на обработке клеточной массы раствором

трифторуксусной кислотой, ацетонитрилом в сочетании с интенсивным механическим воздействием на мицелий микромицетов, обеспечивает как обеззараживание, так и эффективную экстракцию белковых компонентов.

2. Культивирование клеток исследуемых видов микромицетов в течение 7 ± 2 суток при 27°C на плотной питательной среде Сабуро обеспечивает высокие воспроизводимость и качественные характеристики клеточного масс-спектра.
3. Микромицеты рода *Coccidioides* характеризуются выраженным межвидовым и внутривидовым полиморфизмом белкового состава клеток, с варьированием степени сходства масс-спектров штаммов в пределах 60 – 70 %. Области масс-спектров 6000 - 10000 m/z и 4000 - 6000 m/z являются основными по частоте встречаемости спектральных пиков, характеризуются стабильным компонентным составом и могут служить основой формирования родового и видового референтных «суперспектры» исследуемых микромицетов.
4. Сформированный раздел базы данных референтных MALDI-TOF спектров SARAMIS (род *Coccidioides*, порядок *Onygenales*, класс *Eurotiomycetes*, отдел *Ascomycota*, царство *Fungi*, домен *Eucariota*), позволяет проводить видовую идентификацию штаммов видов *Coccidioides immitis* и *Coccidioides posadasii* с необходимым уровнем достоверности.

Степень достоверности и апробация результатов

В основе диссертационной работы лежат исследования, выполненные и выполняемые соискателем в рамках 2 тем НИР по плану Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории РФ (КНС 48.00) и Отраслевой научно-исследовательской программы «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации» на 2011-2015 гг.

Основные результаты выполненного диссертационного исследования были представлены на ежегодных научно-практических конференциях специалистов ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (2013-2016 гг.), 79-ой Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Вопросы теоретической и практической медицины» (Уфа, 2014), VI Всероссийском конгрессе по медицинской микологии (Москва, 2014), Национальной конференции по микологии (УФА, 2013), Всероссийской научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии (XVIII Кашкинские чтения, Санкт-Петербург, 2015).

По материалам проведенного исследования опубликовано 9 печатных работ, в том числе 4 – в периодических научных изданиях, входящих в перечень ВАК РФ. Материалы диссертации были также использованы при подготовке коллективной монографии «Особо опасные микозы» (Волгоград, 2014).

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена в классической форме на 120 листах компьютерного текста, состоит из введения, 5 глав, содержащих обзор литературы по проблеме, методическую часть и экспериментальные разделы, заключения, выводов и списка использованной литературы. Диссертация иллюстрирована 6 таблицами и 20 рисунками. Указатель литературы включает 162 источника.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Характеристика микромицетов рода *Coccidioides*

Кокцидиоидомикоз – инфекционное заболевание, которое вызывают диморфные микромицеты *Coccidioides immitis* и *Coccidioides posadasii*, относящиеся к группе возбудителей особо опасных инфекций.

Виды *Coccidioides immitis* и *Coccidioides posadasii* относятся к роду *Coccidioides* семейства *Cymnoascaceae* класса *Ascomycetes*. Кокцидиоидомикоз также называют лихорадкой долин, болезнью Посадас-Вернике, лихорадкой Сан-Иохима, пустынным ревматизмом кокцидиоидной гранулемой. К заражению грибами рода *Coccidioides* восприимчивы как люди, так и животные, например, грызуны, собаки [Hirschmann J.V., 2007, Fraser J.A., 2005].

Кокцидиоидомикоз эндемичен для многих штатов США (например, Калифорния, Невада, Юта, Нью-Мексико, Техас, Джорджия). Кроме того, возбудитель кокцидиоидомикоза обнаружен в почвах Гондураса, Центральной и Южной Америки, Гватемалы, Венесуэлы, Аргентины, Северных областей Мексики, Парагвая [Hung C.Y., 2007, Canteros C.E., 2009, Laniado-Laborín R., 2008]. Даже в эндемичных областях микромицеты в почве находятся не повсеместно, а в определенных почвенных зонах, с благоприятными микроклиматическими условиями. По данным зарубежной литературы, определенное значение в экологии этих микромицетов имеет тип почвы, ее минеральный состав, наличие или отсутствие в почве микробных антагонистов [Petersen L., Marshall L., Barton-Dickson C., et al, 2010].

В США каждый год фиксируют от 25 тыс. до 100 тыс. случаев заболевания [Centers for Disease Control and Prevention, 2001, 2003, Sunenshine R.H, 2007]. Подсчеты говорят о том, что расходы на диагностику одного больного составляют около 250 долларов США [Litvintseva A., Marsden-Haug N., Hurst S., et al. 2015].

Отдельные эпидемические вспышки кокцидиоидомикоза фиксировались и описывались и вне эндемичных зон. Их возникновение связано с переносом

артроспор гриба на большие расстояния вместе с пыльными бурями, которые периодически возникают в эндемичных областях [Keckich D.W. Blair E., Vikram H., 2010, Laniado-Laborin R., 2007].

Описанные единичные случаи инфицирования возбудителем кокцидиоидомикоза субъектов, проживающих далеко за пределами эндемичных зон, могут быть связаны с обработкой контаминированных видов сырья (шерсть, хлопок), поступившего из эндемичных для *Coccidioides* spp. регионов [Verghese S. P., Arjundas D., Krishnakumar K. et al, 2002, Gaidici A., Saubolle M., 2009]. Также зафиксированы редкие случаи заражения людей трансплантационным путем, либо при пересадке здоровому реципиенту пораженных органов, либо в результате снижения иммунитета при использовании иммуносупрессивной терапии [Ampel N.M., 2010, Arsura E.L., Kilgore W. et al, 2000].

В связи с развитием туризма происходит расширение и территории, на которой выявляют кокцидиоидомикоз [Verghese S. P., Arjundas D., Krishnakumar K. et al, 2003]. Например в 2001 году после чемпионата мира по аэропланеризму, который проходил в штате Калифорния, в Австралии, Финляндии, Новой Зеландии, Соединенном Королевстве были зафиксированы случаи заболевания кокцидиоидомикозом [Hector R.F., Rutherford G., Tsang C. et al, 2011]. В штате Нью-Йорк за 5 лет было зафиксировано более 160 случаев кокцидиоидомикоза у людей, побывавших в эндемичных зонах [Chuang A., Thomas R., Hoffman R., 2005]. Единичные случаи кокцидиоидомикоза описаны в Индии, Японии, Таиланде, Франции [Verghese S. P., 2002, Capoor M.R., 2004, Chandesris M.O., 2008]. В нашей стране до сих пор не было официально зарегистрировано случаев заболевания.

Распространяется инфекция в основном за счет артроспор (артроконидий) – частиц величиной 5-10 мкм, находящихся внутри мицелия в виде цепочек. Мицелий гриба достаточно широкий, разделен септами и имеет однородную структуру. Артроспоры образуются вдоль мицелия при старении культуры. Последующий распад мицелия приводит к образованию на концах артроспор так называемых "усиков", являющихся характерным признаком артроспор именно

возбудителя кокцидиоидомикоза, и состоящих из остатков оболочки мицелия [DiCaudo D. J., 2006].

В почвах эндемичных регионов в теплое и дождливое время года возбудители кокцидиоидомикоза растут в виде мицелия. Повышение температуры и снижение влажности приводят к образованию внутри мицелия артроконидий, которые, высыхая окончательно, достаточно легко распыляются и распространяются по воздуху вместе с пылью. Благоприятные для артороспор условия позволяют им повторить жизненный цикл в почве [Macêdo R., Rosado A., Mota F. et al, 2011].

В случае аэрогенного заражения в организме происходит цикл развития микромицета, отличающийся по морфологии от почвенного, и называемый паразитическим или тканевым. Артроконидии увеличиваются в размере, происходит быстрое и синхронное деление ядра клетки, что приводит к образованию микромицетом сферических клеток, называемых незрелыми сферулами. В сферулах происходит сегментация прилегающих слоев клеточной стенки, в результате чего образуются отдельные многоядерные камеры. Далее происходит дифференцировка содержимого этих камер на группы небольших (3—5 мкм в диаметре) клеток - так называемых эндоспор. Зрелая эндоспорулирующая сферула достигает 30 – 80 мкм в диаметре. Оболочки зрелых сферул, наполненных эндоспорами, разрываются и эндоспоры, попадают в кровь и ткани, где из них образуются новые сферулы [Muñoz-Hernández B., Palma-Cortés, C. Cabello-Gutiérrez, M. Martínez-Rivera, 2014]. Сферулы возбудителя кокцидиоидомикоза неустойчивы к факторам внешней среды и не выдерживают конкуренцию с гнилостной микрофлорой, в связи с чем трупы погибших животных не служат источниками повторного инфицирования почвы.

У людей отсутствует естественный иммунитет к данным микромицетам, вследствие чего восприимчивость человека к ним считается всеобщей [Viriyakosol S., Singhanian A., Fierer J. et al, 2013, Brandhorst T.T., Wüthrich M., Finkel-Jimenez B., Warner T, .2001]. В эндемичных областях приблизительно у 60 % больных микоз протекает без выраженных клинических симптомов, у остальных в виде

гриппозного состояния и пневмонии. В большинстве случаев заболевание заканчивается выздоровлением и появлением выраженной резистентности к повторному заражению [Binnicker M.J. Buckwalter S., Eisberner J. et al, 2007, Sharpton T., Stajich E., Rounsley S. et al, 2009]. В некоторых случаях развивается диссеминация кокцидиоидомикоза в организме. Несмотря на то, что основной путь заражения кокцидиоидомикозом – ингаляция спор, встречаются и первичные кожные и костные поражения. В таких случаях микромицет проникает через поврежденные кожные покровы [Chowfin A., Tight R. et al, 1999].

Инкубационный период при заболевании составляет от 7 до 21 сут., но может колебаться, в зависимости от заражающей дозы. Клинические проявления заболевания в этот период не наблюдаются. Первоначально происходит фагоцитоз клеток микромицета макрофагами, причем, при высокой неспецифической иммунореактивности организма, конверсия гриба в тканевую форму и его размножение подавляется или не осуществляется. В случае ослабленного иммунного ответа развивается острый процесс [Hung, C., Yu J., Seshan K., et al. 2000, Jehangir W., Tadepalli G., Sen S., 2015].

На ранних стадиях в иммунном ответе при ингаляционном заражении участвуют альвеолярные макрофаги, которые, однако, неспособны разрушить фагоцитированные споры, т.к. их клеточная стенка обладает антифагоцитарными свойствами, приводящими к нарушению процесса фаголизосомального слияния и, как следствие, приводит к неэффективности внутриклеточного разрушения артроспор. Артроспоры, находящиеся внутриклеточно, развиваются в сферулы. После первоначального образования сферул происходит нарастающее прогрессирование процесса с развитием сливной пневмонии с нагноениями и очагами некроза [Durkin M., Estok L, Hospenthal D, et al, 2010].

При острой форме легочного кокцидиоидомикоза в ткани легких могут преобладать экссудативный или пролиферативный процессы в зависимости от состояния иммунитета, количества ингаллированных конидий и вирулентности штамма. В случае пролиферативного процесса образуются кокцидиоидные гранулемы с полиморфным клеточным составом, переходящие в некроз или

инкапсуляцию [Engelthaler D.M., Chiller T., Schupp J., et al, 2011, Arsura E.L., Bobba R., Reddy C. et al, 2009] Исход первичных поражений в легких чаще всего проявляется в обызвествлении очагов и образованием комплекса схожего с «триадой Коха» при туберкулезе. Неблагоприятное течение микоза может приводить к диссеминации возбудителя (эндоспор) током крови в легкие или другие органы и ткани, что приведет к развитию вторичного генерализованного кокцидиоидомикоза [Eulalio K.D., Macedo R., Cavalcanti M. et al, 2001].

Подострая и хроническая формы кокцидиоидомикоза характеризуются фиброзом и инкапсуляцией казеозных очагов, образованием полостей с фиброзными стенками, по типу туберкулезных каверн. Для вторичной формы характерно длительное и тяжелое течение с гранулематозными очагами, образующимися в различных тканях и органах, а также образование свищей и абсцессов. Часто исход в таком случае летальный [Fisher M.C., Koenig L., White T. et al, 2000 Baddley J., Cobbs C., Pappas P., 2004].

При поражении кокцидиоидомикоз органов желудочно-кишечного тракта, возникают колиты, катарально-язвенные процессы в различных участках ЖКТ. Кокцидиоидомикоз центральной нервной системы характеризуется менингитом, который является достаточно редким, но опасным осложнением. Также при кокцидиоидомикозе закономерны поражения костей и суставов [Hung C. , Yu J., Seshan K. et al, 2002, Batura-Gabryel H., Brajer B., 2008].

Обобщая вышеописанное, можно с уверенностью сказать, что нельзя недооценивать потенциальную опасность, которую представляют возбудители кокцидиоидомикоза, в связи с чем, разработка и совершенствование новых методов выявления и характеристики этих возбудителей является важным вопросом микробиологии и эпидемиологии.

1.2 Методы идентификации, типирования и белкового профилирования возбудителей микозов

Возможность дифференцировать друг от друга штаммы микромицетов одного вида, обусловлена их гетерогенностью по морфологическим, биохимическим, а также генотипическим признакам [Carlile M.J., . Gooday W., Watkinson S., 2001].

С практической точки зрения основными целями дифференциации штаммов возбудителей глубоких микозов, являются установление источников инфекции и механизмов циркуляции возбудителя, а также разработка и дополнение баз данных для классификации штаммов микроорганизмов. Вероятность получения достоверных результатов в типировании во многом определяется использованием унифицированных методик и точным соблюдением технологического регламента. В настоящее время повсеместно наблюдается увеличение числа лиц с иммунной недостаточностью, расширение спектра видов патогенных грибов, способных как вызвать вспышки заболеваний в силу естественных причин, так и стать агентами биотерроризма [Малеев В. В., 2013]. Поэтому чрезвычайно актуальным направлением микробиологии, молекулярной биологии и эпидемиологии является совершенствование существующих и разработка новых методов идентификации и типирования, а также оценка их эффективности в деле дифференциации возбудителей в случае возможных вспышек заболеваний естественного и искусственного происхождения, установления возможных источников инфекции. Кроме того, в связи с появлением и обновлением электронных баз данных, усиливается необходимость точной систематической классификации недавно обнаруженных штаммов, и уточнения таксономического положения уже существующих [Posteraro B., Sanguinetti M., De Carolis E., Vella A., 2013, Cannon P.F., Sutton B., 2001, Degenkolb T., Dieckmann R., Nielsen K. et al, 2008, Hong S.B., Goo S., Shin H. et al, 2005].

Белковое профилирование микроорганизмов имеет схожие задачи и используется для быстрой идентификации и внутривидовой классификации патогенных микроорганизмов [Del Chierico F., Masotti A., Onoriet M. et al, 2012].

С помощью профилирования по белковым компонентам клетки микроорганизм нельзя разделить на подвиговые категории, такие как серовары, или геномвары. Однако оно позволяет сгруппировать штаммы в пределах одного вида, что в некоторой степени является альтернативным вариантом, при отсутствии возможности проведения типирования.

Культуральные методы относятся к самым ранним из применяемых, в их основе лежит культивирование микрогрибов на диагностических питательных средах с селективными добавками. Однако проведение внутривидовой дифференциации с помощью культуральных методов невозможно, поскольку близкородственные штаммы в пределах одного вида, как правило, не имеют фенотипических различий при росте в одинаковых условиях. В связи с этим, в настоящее время культуральные методы находят применение только для идентификации микромицетов. В литературе описано проведение культурального анализ 345 коллекционных и 103 клинических штаммов *Candida* с помощью дифференциально-диагностической среды. В результате все исследованные штаммы были распределены по видам, в зависимости от цвета колоний, на *Candida albicans* (цвет колоний – кобальтовый синий), *Candida dubliniensis* (цвет колоний – бирюзово-голубой) и *Candida tropicalis* (цвет колоний – розовато-голубой), однако провести—внутривидовую дифференциацию изолятов *Candida* spp. с использованием данного метода не удалось [Eraso M.D., 2006]. Кроме того, существенным недостатком культурального метода является длительное время, необходимое для роста культуры, а в за частую и необходимость применения дорогостоящих селективных питательных сред [Gielen S., Aerts R., Seels B., 2003].

В основе биохимических методов внутривидовой дифференциации микромицетов лежит выявление переменных особенностей их метаболизма. Так, Fricker et al., на основе изучения 619 изолятов дрожжей исследовали возможность использования двух диагностических тест-систем (API Candida и ID 32C system) для типирования дрожжевых микромицетов. В основе работы этих тест-систем лежит анализ ассимиляционных свойств дрожжей (ассимиляция

углеводов, органических кислот и аминокислот), чувствительности к антибиотикам, а также способности ферментировать углеводы. Оказалось, что обе тест-системы позволяют идентифицировать микроорганизмы до уровня вида, однако использование данных биохимических тест-систем для определения внутривидовой структуры микромицетов невозможно по причине метаболической однородности штаммов внутри одного вида. Помимо этого, к недостаткам биохимических тестов относятся длительность проведения анализа и недостаточная дискриминирующая способность [Fricker-Hidalgo H., Vandapel O., Duchesne M. et al, 1996].

Серологические методы, в основе которых лежит взаимодействие антигенов и специфических антител с образованием иммунных комплексов, которые можно обнаружить в тестах *in vitro*, могут представлять достаточно большую ценность для решения задач идентификации. Использование серологических методов для типирования микромицетов даёт возможность выделить группу штаммов с общей антигенной структурой, называемую сероваром (серотипом). Хотя серовары и не являются таксономической единицей, тем не менее, позволяют систематизовать патогенные и условно-патогенные микроорганизмы, что необходимо в эпидемиологических исследованиях. В своей работе Dromer et al. с помощью специфичных моноклональных антител (E1) к полисахариду клеточной стенки *Cryptococcus neoformans* разделили 156 клинических изолятов возбудителя криптококкоза на 4 серогруппы (A, B, C и D). Однако, как и в случае с ранее описанными методами и техниками, серологический подход скорее может быть использован для идентификации микромицетов и дифференциации различных видов друг от друга, нежели для внутривидовой дифференциации штаммов, поскольку внутривидовые различия по антигенным свойствам грибов зачастую отсутствуют, или лежат ниже порога чувствительности серологических методов. Другими словами, с помощью серологических методов, можно лишь соотнести выбранный штамм или изолят с определенной серогруппой, но не определить его вид, или положение внутри вида [Dromer F., Salamero J., Contrepolis A., 1987].

В целом, по большинству показателей вышеперечисленные фенотипические методы непригодны для решения практических задач эпидемиологии, связанных с типированием [Posch A.E., Koch C., Helmelt M. et al, 2013]. Во-первых, по причине выраженной однородности фенотипических признаков среди микромицетов одного вида (а иногда и рода), во-вторых, свой вклад в ограничение применимости фенотипических методов вносит способность микроорганизмов к изменению экспрессии соответствующих генов, в ответ на влияние различных факторов окружающей среды [Litvintseva A.P., Thakur R., Vilgalys R., Mitchell T., 2006]. В-третьих, фенотипические методы требуют больше времени на проведение анализа и получение результатов, чем генотипические.

Наибольшую значимость для внутривидового типирования и анализа генетического родства штаммов микромицетов на данный момент имеют молекулярно-генетические методы, основанные, в первую очередь, на полимеразной цепной реакции (ПЦР) [Meece J., Anderson J., 2010, Wise M., Healy M., 2007, Abd-Elsalam K., Aly I., Abdel-Satar M., 2003, Bialek R., 2005]. В отличие от методов биотипирования и серотипирования, считавшихся ранее традиционными, метод ПЦР достаточно универсален, обладает большей разрешающей способностью, обеспечивает высокий уровень воспроизводимости, и, что немаловажно, дает возможность использования количественных методов для оценки идентичности штаммов [Hebeler-Barbosa F., Morais F., 2003]. В зависимости от поставленной перед исследователем задачи, выделяют несколько основных методов ПЦР-типирования.

Для внутривидового типирования штаммов возбудителей кокцидиоидомикоза используют анализ единичных нуклеотидных замен (SNP) в переменных участках ДНК этих микромицетов с помощью метода ПЦР-ПДРФ [Burgess J., Schwan W., 2006]. При секвенировании нуклеотидных последовательностей локусов VL, bl, ITS и z выявлено, что у штаммов *Coccidioides immitis* в локусах bl и z отсутствует полиморфный сайт рестрикции для эндонуклеазы Hinf I, у штаммов *Coccidioides posadasii* отсутствует сайт рестрикции для эндонуклеаз в локусах VL, ITS [Bialek R., 2006]. В 2010 году

Meese et al, используя ПДРФ-ПЦР с праймерами, фланкирующими участок от 3' конца 26S рДНК до 5' конца 18S рДНК длиной около 5.5 т.п.н., разделили штаммы *Blastomyces dermatitidis* на 5 различных генотипов, связанных с регионом распространения штаммов к участку рибосомальной ДНК. Штаммы в каждой из групп обладали отличающимся от прочих паттерном на электрофореграмме. Разрешающей способности метода, в данном случае, не хватило для идентификации каждого штамма по отдельности, однако, комбинацией использования различных рестрикционных ферментов, можно добиться и более точного разделения штаммов [Meese J.K., Anderson J., 2010].

Narasimhan et al, используя две пары различных олигонуклеотидных праймеров, провели RAPD-типирование пяти штаммов *Aspergillus terreus*, с целью выяснения генетической вариабельности внутри вида. Анализ позволил распределить штаммы по четырем группам, причем принадлежность штамма той, или иной группе, определялась видом используемых праймеров. Как и в случае с ПДРФ-ПЦР, по мнению исследователей, наилучшим вариантом будет сочетанное использование различных пар праймеров [Narasimhan B., Asokan M., 2010].

Roland и Koh методом ПЦР типировали 65 различных штаммов *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. cf. incarnatum*, *F. solani* и прочие), выделенных из биологического материала больных кератозом. Методы включали в себя ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) - ПЦР с праймерами, комплементарными энтеробактериальным межгенным последовательностям, AFLP-ПЦР и Rep (interspersed repetitive extragenic palindromic DNA sequence) - ПЦР - амплификация участков генома, ограниченных консервативными повторяющимися последовательностями.

Метод AFLP-ПЦР позволил разделить 65 изолятов *Fusarium* на 56 различных профилей, в 13 из которых было по 2 или более изолята (максимум 6 изолятов в группе), сходство генных последовательностей которых не превышало 95%. Методом Rep-ПЦР, удалось разделить 62 изолята на 33 группы, в 15 из которых было по два или более изолята (максимум 15 изолятов в группе). Методом ERIC-ПЦР, 65 изолятов разделили на 7 групп. *F.cf. incarnatum*,

F.oxysporum, и *Melanospora fallax* составили три отдельных группы, изоляты *F. solani* разделились на 4 группы, из которых в двух было по одному изоляту, а в оставшихся двух группах – по 55 и 5 изолятов. По результатам сравнительного анализа, метод AFLP-ПЦР показал наибольшую разрешающую способность при типировании изолятов *Fusarium* [Roland J., Koh T., 2008].

Healy et al. продемонстрировали эффективное использование метода амплификации участков генома, ограниченных консервативными повторяющимися последовательностями ДНК для типирования штаммов *Candida* spp. Генетическими маркерами в этом методе служили повторяющиеся нуклеотидные последовательности, встречающиеся по всему геному. После анализа 41 штамма *Candida* (*C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. tropicalis* и *C. glabrata*), удалось получить их индивидуальные профили и построить дендрограмму, отражающую внутривидовое положение каждого штамма. По мнению авторов исследования, основными преимуществами Rep-ПЦР среди прочих генотипических методов, являются относительная простота и воспроизводимость [Healy M., Wise M., 2007].

Также эффективными методами типирования микромицетов являются методы монолокусного и мультилокусного сиквенс-типирования [Balajee S.A., Borman A., Brandt M. et al, 2008]. Burgess et al. провели монолокусное типирование штаммов *Blastomyces dermatitidis*. Сиквенс-типирование производилось в промоторной области гена BAD1, который является одним из ключевых факторов патогенности возбудителя бластомикоза. Данным методом было выявлено 4 гаплотипа (H1, H2, H3 и H4), не связанных с географическим распределением штаммов. Также, было проведено монолокусное типирование штаммов *Paracoccidioides brasiliensis*. Целевым локусом для монолокусного сиквенс-типирования являлся ген возбудителя паракокцидиоидомикоза PbGP43, кодирующий гликопротеин. С использованием данного метода, штаммы *P. brasiliensis* оказалось возможным разделить на 5 генотипов (A, B, C, D, E и F) [Burgess J., Schwan W., 2006].

Мультилокусное сиквенс-типирование, схема которого была предложена Koufopanou et al. в 2001 году, позволяет разделить штаммы возбудителя кокцидиоидомикоза на 2 таксона: калифорнийский (*Coccidioides immitis*) и некалифорнийский (*Coccidioides posadasii*) [98]. Схема мультилокусного сиквенс-типирования, предложенная Kasuga et al. в 1999 г., позволяет разделить штаммы возбудителя гистоплазмоза по крайней мере на 8 филогенетических кладов, ассоциированных с географическими районами распространения возбудителя [Koufopanou V., Burt A., Szaro T., 2001].

Bain et al. методом МЛСТ проанализировали 7 генных фрагментов у 100 изолятов *Aspergillus fumigatus*, выделенных из различных источников. В результате исследования, 100 изолятов удалось разделить на 30 сиквенс-типов (ST - sequence type) с дискриминирующим индексом не более 0,93. Кроме того, было выявлено, что для типирования *Aspergillus spp.* более пригодны однонуклеотидные различия между гомологичными участками генома у представителей одного вида, а участки генов «домашнего хозяйства» не обладают достаточной внутривидовой вариабельностью (в отличие от таковых у бактерий) [Bain J., Tavanti A., 2007].

Engelthaler et al. на примере *Coccidioides spp.* описали метод полногеномного типирования WGST (whole-genome sequence typing), в качестве эффективного способа для генотипирования и эпидемиологического анализа клинически значимых микромицетов. В ходе исследования с помощью этого метода удалось четко дифференцировать три отдельных штамма *C. immitis*, выделенных от больных кокцидиоидомикозом, а потом подтвердить результаты с помощью SNP-анализа. Установлено, что метод полногеномного секвенирования обладает высокой разрешающей способностью и отличной воспроизводимостью, однако имеет и существенные недостатки. Основной причиной, препятствующей повсеместному применению WGST, как и других методов типирования, основанных на непосредственном определении последовательности генов, в эпидемиологии инфекционных болезней является стоимость оборудования, а также недостаточный уровень развития и доступности подходящих

биоинформационных ресурсов для анализа данных [Engelthaler D., Chiller T., Schupp J. et al, 2011].

Lin et al с помощью сиквенс-анализа с праймерами к ITS и IGS участкам, проанализировали несколько штаммов дрожжей *Phaffia rhodozyma* и *Xanthophyllomyces dendrorhous* с целью их дифференциации. В результате, на основе анализа делеционных и инсерционных изменений в IGS участке, удалось дифференцировать и охарактеризовать штаммы *X. dendrorhous* [Lin G., Bultman J., Johnson E., Fell J., 2012].

Общим для большинства методов ПЦР-типирования является использование гель-электрофореза для разделения фрагментов ДНК, с последующим визуальным или компьютерным анализом индивидуальных профилей каждого штамма с целью определения сходства определенных генных последовательностей. Отдельно можно упомянуть метод пульс-электрофореза, который многие исследователи считают «золотым стандартом» в области типирования микроорганизмов. Он обладает высокой разрешающей способностью, что с учетом возможности сканирования и автоматического компьютерного анализа гелевых паттернов, делает его одним из самых конкурентоспособных методов типирования геномной ДНК. Однако для пульс-электрофореза распространенным недостатком является наличие слишком большого процента недостоверных результатов [Orsborn K., Shubitz L., 2006].

Для всех методов, основанных на ПЦР, существуют собственные специфические недостатки. К ним относятся, в первую очередь, высокие требования, предъявляемые к оснащению лаборатории и качеству самих тест-систем. Несоблюдение регламента и норм может повлечь за собой контаминацию на любом этапе реакции, и, как следствие ложноположительные результаты. Во-вторых, из-за изменений в структуре амплифицируемого участка, обусловленных изменчивостью генетического аппарата микроорганизма, часто требуется разработка новых праймеров, либо подбор новых условий проведения реакции [Ninet B., Jan I., Bontems O. et al, 2005].

Особое место в типировании микроорганизмов занимают методы протеомики – области биологии, занимающейся анализом качественного и количественного белкового состава организма, а также экспрессии белков на в различных физиологических состояниях микроорганизма. Несмотря на то, что протеомные методы относят к фенотипическим методам, с появлением высокотехнологического оборудования, их разрешающая способность сопоставима с таковой у генотипических методов [Domon B., Aebersold R., 2006].

К протеомным методам, используемым для внутривидового типирования, относится, например, мультилокусный энзим-электрофорез (МЭЭ). Электрический заряд, а, следовательно, и электрофоретическая подвижность ферментов, определяются аминокислотной структурой белковой молекулы, которая, в свою очередь, детерминирована определенной последовательностью нуклеотидов. Поэтому, на основании анализа электрофоретической подвижности аллозимов (альтернативных форм ферментов) можно делать выводы о различиях в структуре кодирующих их генов. В работе Pereira et al. методом мультилокусного энзим-электрофореза проведен анализ 12 клинических изолятов различных видов *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* и *C. guilliermondii*). На основе сравнительного анализа электрофоретической подвижности 15 ферментов была построена дендрограмма, в которой все изоляты были распределены на девять родственных таксонометрических групп. По мнению авторов, использованный метод типирования эффективен лишь для группирования изолятов внутри одного вида, и малоэффективен при изучении изолятов нескольких видов микроорганизмов [Pereira C., Rosa E., Rosa R. et al, 2000]. Caugant et al. методом МЭЭ проанализировали 98 клинических и 4 референтных изолята *C. albicans*. Основываясь на данных анализа полиморфизма 10 энзимных локусов, авторы разделили исследуемые изоляты на 14 электрофоретических типов (ЕТ - electrophoresis types). Метод мультилокусного энзим-электрофореза, по мнению авторов, позволяет проводить эпидемиологическое типирование изолятов вида *C. albicans* с приемлемой точностью. Однако существует специфическая для этого метода проблема,

закрывающаяся в том, что посттрансляционные модификации белков могут снижать специфичность метода [Caugant D. A., Sandven P., 1993].

В 2008 году сотрудниками ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора была проведена работа по типированию патогенных штаммов *Coccidioides* spp., на основе разделения их белковых фракций в SDS-полиакриламидном геле с последующим компьютерным анализом полученных протеинограмм [данные не опубликованы]. Нумерический анализ сходства профилей суммарных клеточных протеинов показал, что белковые профили исследуемых штаммов практически в каждом случае (за исключением двух штаммов) имели строго индивидуальный характер. Кроме того, по результатам UPGMA-группирования (Unweighted pair group method with arithmetic mean - метод невзвешенного попарного среднего), все исследуемые штаммы были разделены на 2 группы, степень соответствия протеинограмм которых не превышала 5 %, но внутри группы варьировала в диапазоне 50 – 75 %. Хотя использованный метод был достаточно прост в исполнении, и обладал хорошей воспроизводимостью, он требовал выделения и фракционирования белкового компонента. Метод, хоть и не дает возможности типировать каждый штамм внутри вида, однако позволяет разделить исследуемую совокупность штаммов на близкородственные группы.

Протеомный подход в совокупности с высокоточным методом масс-спектрометрии является эффективным инструментом для решения проблем идентификации и хемотипирования в эпидемиологии и лабораторной микологии. [Bader O., Weig M. , Taverne-Ghadwal A. et al, 2011, Cassagne C., Ranque S., Normand A., et al.2011, Chalupová J., Sedlářová M., Helmelt M. et al, 2012]. Ранее существенное ограничение на применение масс-спектрометрии в качестве метода исследования биологических объектов накладывали так называемые «жесткие» методы ионизации, такие как термоионизация или искровая ионизация, разработанные и широко используемые для элементного анализа неорганических соединений. С появлением tandemных масс-спектрометров (с двумя детекторами) и «мягких» методов ионизации, стало возможным получать прямые масс-спектры

культур микромицетов, т.е. без предварительного выделения, фракционирования и очистки отдельных белков [Tao J., 2009, Zhang G., Z. Jiang et al. 2008, Chen H., Chen Y., 2005]. Кроме того, методы мягкой ионизации могут быть применимы к компонентам с широким разбросом молекулярных масс. Из всех, описываемых в литературе разновидностей масс-спектрометрии, наиболее эффективным в плане комплексного анализа протеомного состава микроорганизмов является метод времяпролетной спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF – matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight) [Dong H., Kemptner J., Marchetti-Deschmann M. et al, 2009, Erhard M., Hippler U., Burmester A. et al, 2008, Fenselau C., Demirev P., 2001, De Respinis S., 2013]. MALDI-TOF масс-спектрометрию применяли для идентификации токсичных и нетоксичных цианобактерий, путем анализа масс ионов вторичных метаболитов [Puddick J., Prinsep M., 2008]. В настоящее время разработано специальное программное обеспечение для изучения белковых масс-спектров, созданы базы данных, содержащие информацию о референтных спектрах микроорганизмов [Theel E., Hall L., Mandrekar J. et al, 2011]. Возможность получения специфичных для конкретного штамма масс-спектров с последующим их анализом даёт основание использовать данный метод для идентификации и внутривидовой классификации микроорганизмов [Chalupová J., Raus M., Sedlářová M., 2013, Clark E.A., Kaleta E., Arora A. et al, 2013, Alanio A., Beretti J., Dauphin B. et al, 2015].

Несомненными преимуществами масс-спектрометрического метода белкового профилирования являются относительная дешевизна (основные расходные материалы – растворы матриц для ионизации), возможность экспресс-анализа (пробоподготовка занимает 5-10 минут на один образец, а непосредственно процедура снятия спектра приблизительно 1-2 минуты на образец), а также возможность проведения одновременного анализа большого количества образцов. Для проведения исследований методом MALDI-TOF MS требуется специальное программное обеспечение, которое проведет сравнение неизвестного белка со стандартными молекулярными массами [Nenoff P., Erhard

M., Simon J. et al, 2013, Ranque S., Normand A., Cassagne C. et al, 2013]. В качестве сравнительных молекулярных масс обычно используют рибосомальные белки, поскольку они присутствуют в клетке в наибольшем количестве. В основе баз данных BioTyper и SARAMIS лежат масс-спектры множества штаммов и изолятов микроорганизмов [Lohmann C., Sabou M., Moussaoui W., Prévost G. et al, 2013]. Также, помимо коммерческих баз данных, существуют программные сборки независимых программистов и исследователей (Waters Corp., Milford, MA). Кроме того, программное обеспечение MALDI использует различные специфические и конфиденциальные развернутые алгоритмы, а также позволяет строить кластерные и филогенетические дендрограммы для более точной идентификации микроорганизмов [Normand A., Cassagne C., Ranque S. et al, 2013]. Индивидуальные профили исследуемых микроорганизмов корректируются с учетом фактора, полученного после выравнивания специфических и известных протеиновых пиков, полученных экспериментально при работе с белками определенной молекулярной массы. Итоговый спектр получается при комбинации схожих воспроизводимых единичных спектров. Также существует возможность детектировать и кластеры масс, способные вносить помехи в сигнал от образца, с помощью специального программного обеспечения, и не учитывать их при обработке масс-спектра [Amiri-Elias B., Fenselau C., 2001]. Кроме того, применение этих программных комплексов позволяет автоматизировать процесс и избавляет от необходимости самостоятельно интерпретировать спектры [Iriart X., Lavergne R., Fillaux J. et al., 2012].

Для MALDI ионизации требуется наличие особого химического вещества – матрица, взаимодействующей с анализируемыми молекулами. Существует несколько видов матриц, и выбор оптимальной для исследуемого микроорганизма очень важен. Конечный состав матриц обычно состоит из производных бензойной или коричной кислот, растворенных в органических растворителях или воде. Кроме того, в составе матрицы часто присутствует трифторуксусная кислота. Использование неподходящей матрицы снизит эффективность ионизации, что приведет к значительному усилению образования фрагментов анализируемого

белка [Murray P.R., 2010]. В одной работе, при получении масс-спектра материала конидий *A.fumigatus*, было использовано четыре разных матрицы для MALDI с целью выбора оптимальной. Все матрицы, за исключением дигидроксibenзойной кислоты (DHB), обеспечивали образование хорошего ионного профиля. Оптимальный показатель сигнал/шум, наиболее узкие и интенсивные пики, а также наименьшее подавление полезного сигнала обеспечивало использование α -циано-4-гидроксикоричной кислоты. Другие исследователи успешно использовали DHB или синапиновую кислоту (3,5-метокси-4-гидроксикоричную кислоту) для типирования конидий *Penicillium spp.*, *Scytilidium dimidiatum*, *Trychophyton rubrum*, *Saccharomyces spp.*, фиксируя ионы в диапазоне масс от 2000 до 13000 Да. При этом большая часть пиков на спектре MALDI после анализа *Saccharomyces cerevisiae* коррелировала с молекулярными массами белков, предсказанных на основе исследования его генома, что свидетельствовало о значительном потенциале метода MALDI MS в изучении микромицетов [Li T., Liu B., Chen Y., 2000].

В работе Bizzini et al. показано, что методом MALDI-TOF можно идентифицировать белковые профили целого ряда микроорганизмов, включая грамположительные и грамотрицательные бактерии, а также дрожжевые микромицеты [Bizzini A., Durussel C., 2010]. В 2011 г. Holbrook et al. описали опыт применения тандемной масс-спектрометрии в сочетании с жидкостной хроматографией для типирования *Histoplasma capsulatum*, при этом в работе была использована электронная референтная база пептидных масс-спектров MASCOT. В результате были выявлены различия в белковом составе различных штаммов *H. capsulatum*, в том числе, на разных фазах роста микроорганизма, что в перспективе создает предпосылки для создания схем типирования этого рода микромицетов методом MALDI-TOF MS [Holbrook E., Edwards J., 2011].

В 2009 г. Marklein и Josten с помощью метода MALDI-TOF (масс-спектрометры Microflex LT и Biflex III, Bruker Daltonics) проанализировали 18 коллекционных штаммов и 267 изолятов *Candida*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Trichosporon*, *Geotrichum*, *Pichia* и *Blastoschizomyces*. Результаты масс-

спектрометрического анализа сравнивали с результатами биохимического исследования (тест-система API ID 32C) и секвенирования последовательностей гена, кодирующего 26S РНК. Согласно полученным данным, метод MALDI-TOF оказался наиболее эффективен при видовой идентификации вышеуказанных штаммов, с помощью него удалось однозначно идентифицировать 247 изолятов (92,5 %). Оставшиеся 20 изолятов (в основном штаммы *Candida norvegensis*, *Candida rugosa*, *Candida dubliniensis* и *Candida ciferrii*) не удалось идентифицировать до уровня вида с первого раза, поскольку в базах данных не оказалось соответствующих референтных спектров (индекс достоверности в таком случае не превышал 1,7). Однако, после пополнения баз данных соответствующими спектрами, эти 20 изолятов также были успешно идентифицированы. Кроме того, в той же работе был обнаружен вид *Candida metapsilosis*, не идентифицируемый биохимическими методами, но обнаруживаемый методом MALDI-TOF [Marklein G., Josten M., 2010].

Проанализированные Welham et al. масс-спектры *Penicillium spp.* и *Triophyton spp.* демонстрировали значительные визуальные отличия, что, как оказалось, характерно для микромицетов. Однако эта работа была по своему характеру предварительной, так как для повышения воспроизводимости до необходимого уровня нужно было исследовать множество штаммов в пределах одной таксономической группы, а также проанализировать схожие виды для установления более детальных различий их индивидуальных масс-спектров. Высокий процент содержания углеводов в грибной клеточной стенке приводит к тому, что ионы в масс-анализе могут иметь как углеводную природу, так и белковую [Welham K., Domin M., Johnson K. et al, 2000].

На сегодняшний день одной из самых обширных и хорошо изученных групп клинически значимых микромицетов, является род *Candida* [Marinach-Patrice C., Fekkar A., Atanasova R. et al, 2010]. Spanu et al. методом MALDI TOF MS провели исследования 246 изолятов *Candida*, выделенных из проб крови больных, чья принадлежность к *Candida* была подтверждена морфологическим и биохимическим исследованием. 95% всех образцов после предварительной

пробоподготовки было идентифицировано до уровня рода [Spanu T., Posteraro B., Fiori B. et al, 2012]. Pulcrano et al. в своей работе сравнивали эффективность идентификации *Candida glabrata* и *Candida parapsilosis* методом MALDI MS и с помощью биохимического анализатора. Масс-спектрометрический метод оказался более эффективным, показав 100% результат идентификации микромицета до рода, однако не всегда был способен дифференцировать друг от друга эти два вида [Pulcrano G., Vita D., Vollaro A., 2013]. Dhiman et al. задействовали в работе 261 штамм *Candida* (включая *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa* и *C. tropicalis*) изучая оптимальную питательную среду, условия культивирования, а также методику пробоподготовки для последующего применения в рутинной практике. В качестве сравнительных методов идентификации применяли биохимический анализатор, а также морфологический метод. В результате работы, 92% всех штаммов были идентифицированы до уровня вида с высоким показателем достоверности (score ≥ 1.8). Для оставшихся неидентифицированными штаммов отсутствовали сравнительные масс-спектры в базе данных MALDI Biotyper и SARAMIS. Кроме того, Bader et al. провели сравнительный анализ двух систем для масс-спектрометрической идентификации, в качестве объекта выбрав 1192 изолята микромицетов. Микроскопический и биохимический методы, а также секвенирование ITS-региона, были выбраны в качестве сравнения и оценки эффективности. Анализ показал, что 96% всех штаммов идентифицируются корректно обеими поисковыми системами (Для SARAMIS >80% соответствия, для Biotyper показатель score ≥ 2.0). Неидентифицированные штаммы так же как и в предыдущей работе, не имели в базах данных референтных спектров [Dhiman N., Hall L., Wohlfel S. et al, 2011].

Представители рода *Penicillium* относятся к категории достаточно распространенных и клинически значимых мицелиальных микромицетов, являясь возбудителями пенициллеза, а также продуцентами микотоксина патулина (*Penicillium expansum*). Chen and Chen проанализировали материал конидий микромицетов видов *Penicillium expansum*, *Penicillium chrysogenum*,

Penicillium citrinum, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* и *Penicillium pinophilum* методом MALDI MS [Chen H., Chen Y., 2005]. Следует отметить, что процедура идентификация этих видов микрогрибов традиционными методами достаточно трудоемкая [Hettick J. Green B., Buskirk A., et al. 2008, Paterson R., Venâncio A., Lima N., 2004]. В диапазоне от 2000 до 7500 m/z наблюдались постоянные пики с высокой интенсивностью, и спектры в целом были стабильно воспроизводимы. Также в работе сравнивали масс-спектры *S. dimidiatum* и *T. rubrum* со спектрами *Penicillium* spp. В диапазоне 2000 – 8000 Да получили аналогичные по качеству спектры. На всех спектрах присутствовала группа высоких пиков в районе 3000 – 3500 m/z, хотя у *S. dimidiatum* и *T. rubrum* присутствовали дополнительные пики в участках с m/z 5156 и 7882, соответственно. На спектре, соответствующем *Penicillium* spp. присутствовала группа дополнительных пиков на участке 12 236 m/z. Исследователи отметили, что простота спектра способствовала более быстрой идентификации компонентов клеточной стенки, поскольку относительно небольшое количество характерных пиков коррелировало с их высокой интенсивностью, и при меньшем разнообразии образовавшихся ионов, повышалось их количество.

Для определения вариабельности также сравнивали различные штаммы внутри одного вида. Первые пять видов из списка выше относились к группе «*Terverticillate Penicillia*», помимо этого исследовали изоляты, часто выделяемые из злаков и фруктов, а также *P. expansum* и *P. pinophilum* [Chen H., Chen Y., 2005]. Масс-спектры получали с материала необработанных конидий, после добавления матрицы для MALDI. Характерные ионы различных видов давали картину с высокой воспроизводимостью и могли использоваться для идентификации различных видов микромицетов, как и заявляли авторы. Однако вопрос внутривидового типирования оставался спорным. Было отмечено достаточно существенное влияние возраста культуры на результат анализа, но независимо от возраста, на всех спектрах наблюдались отдельные пики с показателем m/z 2662, 2880, 3267, 4823, 5676 и 7242 m/z. Также были проанализированы несколько штаммов *P. chrysogenum*. В каждом спектре с

высоким уровнем воспроизводимости наблюдали пики с m/z в районе 3140 и 5173 m/z , что свидетельствовало в пользу возможности использования этих ионов в качестве специфических биомаркеров *P. chrysogenum*. Профили масс-спектров были схожи у разных штаммов в пределах одного вида, однако у разных видов *Penicillium* существенно различались. Предположительно, вариации спектров могут быть обусловлены различным качественным и количественным составом клеточной стенки. Большинство биомаркеров располагалось на участке до 5000 m/z , и метод обеспечивал быструю идентификацию микромицетов. На основании результатов исследования, был сделан вывод, что, вероятно, наиболее важный вид *P. expansum* был представлен лишь одним штаммом, имевшим значительные морфологические вариации, в зависимости от условий культивирования. Кроме того, как оказалось *Penicillium pinophilum* не имел принадлежности к *terverticillate*, что согласовалось с результатами исследований другими методами. Наиболее близким масс-спектром к общему для *Penicillium* spp., описанному в работе Welham et al., обладал *P. chrysogenum* в опытах Chen и Chen, причем сходство основывалось на наличии пиков 3140 и 5173 m/z [Welham K., Domin M., Johnson K., et al. 2000, Chen H., Chen Y., 2005]. Как оказалось, компьютерный анализ масс- спектра имеет большую важность, чем предполагалось, в силу того, что программа использует все поступившие необработанные данные для проведения анализа, а не только наблюдаемые визуально пики. В целом необходимо дальнейшее изучение и других микромицетов группы «*terverticillate penicillia*», число видов которых насчитывает 50, и среди которых есть очень схожие между собой. Полученные результаты подразумевают возможность проведения быстрой идентификации материала конидий, взятых непосредственно с поверхности пораженных фруктов. Однако требуются дополнительные исследования штаммов внутри некоторых видов описанных микромицетов [Hettick J. Green B., Buskirk A., et al. 2008, Chen H., Chen Y., 2005].

Методом MALDI TOF удалось получить качественные и хорошо воспроизводимые спектры *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium brevicompactum*, *P. citrinum*, *P. chrysogenum*, *P. expansum*, *Penicillium fellutanum*,

Penicillium jensenii, *Penicillium melinii*, *Penicillium purpurogenum*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium simplicissimum* и *Penicillium variabile*). Образцы каждого вида предварительно проходили пробоподготовку, заключающуюся в механической дефрагментации материала с помощью стеклянных гранул в растворителе в течение 1 минуты 3 раза. Таким образом, в данной работе присутствовал этап пробоподготовки. Масс-спектры содержали высокоинтенсивные пики в интервале 5000 – 20000 m/z, что позволяло проводить четкую дифференциацию между видами. Согласно этим исследованиям, наиболее распространенным для рода *Penicillium* биомаркером, был пик 13900 m/z. Для сравнения, масс-спектры, полученные Chen и Chen, где культура не подвергалась обработке, имели основные дискриминирующие пики в районе 2600-7378 m/z [Chen H., Chen Y., 2005]. В работах Hettick et al. была достигнута 100% точная идентификация всех видов *Pinicillium*, что говорит о возможности использования MALDI TOF с этой целью и в дальнейшем. Однако спектры Chen и Hettick отличались друг от друга достаточно существенно. В случае Chen преобладали пики в районе 3000 m/z, с меньшей интенсивностью на 5000 – 8000 m/z. Спектры Hettick демонстрировали большое количество пиков на участке 10000 – 20000 m/z [Hettick J. Green B., Buskirk A., et al. 2008].

Различия между спектрами можно объяснить влиянием нескольких факторов (оборудование, условия роста культуры, пробоподготовка, матрицы) [Pasceu A., Detandt M., Hendrickx M., 2013]. Эти различия подчеркивают важность стандартизации методологии MALDI TOF MS и MALDI TOF ICMS. При наличии широкого спектра масс-спектрометров и методов, должны существовать стандартные библиотеки масс-спектров для внутрिलाбораторных тестов.

Представители рода *Aspergillus* также относятся к клинически значимым микромицетам, и достаточно часто служат объектами исследований масс-спектрометрическим методом [Alanio A., Cazorla A., 2011, 2011, Hettick J. Green B., Buskirk A., et al. 2008]. Набор белков, присутствующих в клетках микромицетов потенциально может быть использован в целях масс-спектрометрической диагностики в медицинской микологии, однако общие и

специфические биомаркеры *Aspergillus*, выделенных именно из клинических источников, пока не найдены [Kallow W., Santos I., Erhard M. et al, 2006]. Chen et al. заявили в своей работе, что согласно результатам их исследований, масс-спектрометрические профили у штаммов рода *Aspergillus*, продуцирующих и не продуцирующих афлотоксин, различны, что подтверждает аналогичное высказывание Li et al. [Li T., Holzgreve W., Kiefer V., Hahn S. 2006, Chen H., Chen Y., 2005]. Soares et al. проанализировали материал конидий некоторых штаммов *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus parasiticus* и *Aspergillus sojae* методом MALDO TOF MS. Масс-спектр штамма *A. oryzae* ATCC 22788 отличался от трех других *A. oryzae* тем, что имел пик в районе 6106 m/z, отсутствующий у других штаммов. Штамм ATCC 11491 также отличался от других. Три не продуцирующих афлотоксин штамма *A. flavus* были проанализированы и имели явные отличия друг от друга. Также спектры афлотоксигенных штаммов были схожи друг с другом и с неафлотоксигенным штаммом ATCC 10124. Авторы заявили, что уникальным и отличительным пиком всех видов *Aspergillus* является пик 7292 m/z. Однако у штамма ATCC 13697 не было этого пика, и только один из спектров штамма *A. parasiticus* ATCC 26865 содержал этот пик в супернатанте после пробоподготовки. Естественно, что для корректной интерпретации необходимо специальное программное обеспечение, способное разрешить проблемы, возникающие при субъективном анализе спектров. В любом случае авторы пришли к заключению о явных различиях в спектрах афлотоксигенных и неафлотоксигенных штаммов *Aspergillus*. Кроме того, результаты MALDI ICMS анализа указывают на сходство неафлотоксигенных *A. flavus* и *A. parasiticus* с *A. oryzae* и *A. sojae*, соответственно [Soares C., Rodrigues S., Peterson W., 2012].

Hettick et al. получили стабильно воспроизводимые спектры 5 штаммов *A. flavus* и 12 видов *Aspergillus*, включая *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. oryzae* и *A. fumigatus*. Перед получением масс-спектра, мицелий механически разрушали с помощью гранул в растворителе (раствор ТФК в ацетонитриле) в течение 1 минуты. Основная часть пиков располагалась на интервале 5000 – 20000 m/z. По результатам исследования, 100%-ую идентификацию обеспечивали наиболее

значимые высокоинтенсивные пики с m/z 5465 m/z и 7054 m/z , а также группа пиков в районе 7724-8564 m/z . Однако для дифференцирования штаммов внутри одного вида, т.е. фингерпринта, необходимо учитывать все имеющиеся пики. Кроме того, существенно затруднять анализ могут достаточно значительные различия между спектрами штаммов одного вида. Авторы сделали заключение о необходимости иметь базу данных из примерно 180 видов *Aspergillus* для корректной идентификации неизвестных видов и штаммов [Hettick J. Green B., Buskirk A., et al. 2008].

Kallow et al. использовали метод MALDI-TOF MS для изучения *Aspergillus tubingensis* и *Aspergillus niger*. Дендрограмма, построенная на основе пиков в интервале 5000 – 20000 m/z , продемонстрировала наличие трех кластеров, среди которых были распределены исследованные штаммы. MALDI-анализ позволил дифференцировать таксоны *tubingensis* и *niger*, что до этого могло быть достигнуто только использованием ДНК-методов. Эти же исследователи смогли однозначно дифференцировать *Aspergillus ibericus* от остальных видов *Aspergillus*, а показать его родство с *Aspergillus carbonarius* на основе их масс-спектров. Следует также отметить, что клетки некоторых видов *Aspergillus*, таких как *A.niger*, содержат в своем составе низкомолекулярный пигмент, затрудняющий идентификацию методом MALDO TOF MS [Kallow W., Santos I., Erhard M. et al, 2006].

Сопоставление результатов исследования различных авторов, т.е. стандартизация масс-спектров, и их однозначная интерпретация, является, помимо всего прочего, одной из важнейших задач в данной области. Полученные данные позволили сделать заключение о том, что метод MALDI-TOF MS может быть использован для однозначной идентификации членов рода *Aspergillus* на уровне вида и штамма [Chen H., Chen Y., 2005, Hettick J. Green B., Buskirk A., et al. 2008, Kallow W., Santos I., Erhard M. et al, 2006].

Микромицеты рода *Fusarium*, в особенности продуценты микотоксинов, или вызывающие фузариоз, являются частым объектом различных исследований по идентификации, в том числе и масс-спектрометрических [Marinach-Patrice C.,

Fekkar A., Atanasova R. et al, 2010, De Carolis E., Vaccaro L. et al, 2012]. Метод MALDI-TOF MS продемонстрировал эффективность в сравнении с секвенированием ITS участков рДНК. В работе Seyfarth et al. сравнивали метод секвенирования ITS рДНК и MALDI TOF для определения видовой принадлежности возбудителя микоза, приведшего к смерти пациента с острой лимфобластной формой лейкемии. Масс-спектрометрический метод представил однозначное свидетельство того, что инфекция вызвана *Fusarium proliferatum*, идентификация которого была также основана на процедурах выделения и морфологического определения, и первоначальный диагноз аспергиллеза был изменен на фузариоз. Авторы подчеркнули, что ценность MALDI определяется наличием достаточно обширной библиотеки спектров родственных микроорганизмов [Seyfarth F., Wiegand C., Erhard M., 2012].

Позднее Marinach-Patrice et al. исследовали 62 клинических изолята *Fusarium* от больных из различных эндемичных зон, методом MALDI TOF масс-спектрометрии. Предварительный морфологический анализ микромицетов, а также данные ПЦР-анализа генной последовательности TEF1, кодирующей фактор элонгации трансляции 1 (translation elongation factor 1- α), подтвердили принадлежность всех изолятов к *Fusarium*. Результаты масс-спектрометрического анализа совпадали с результатами других методов, что подтвердило его высокую эффективность [Marinach-Patrice C., Fekkar A., Atanasova R. et al, 2010]. Аналогичную работу провели De Carolis et al., 2012, сравнивая масс-спектрометрический анализ 55 клинических изолятов *Fusarium* с секвенированием их ITS-региона. Методом MALDI MS было идентифицировано 96% всех изолятов до уровня вида, что практически полностью совпадало с результатами секвенирования. В данном случае, авторы отметили значительное влияние времени роста культуры перед пробоподготовкой на особенности масс-спектра [De Carolis E., Vaccaro L. et al, 2012]. В 2009 году Dong et al. провели обширные исследования по определению наиболее подходящей матрицы для масс-спектрометрического анализа *Fusarium* без пробоподготовки. В исследовании применяли растворы цианогидроксикоричной кислоты,

дигидроксibenзойной кислоты, муравьиной кислоты, синопиновой кислоты, тригидроксиацетофенон, а также метоксисалициловую кислоту. Оптимальной для прямого масс-спектрометрического анализа микромицетов рода *Fusarium* был признана муравьиная кислота. Помимо этого, в работе на основе результатов исследования методом MALDI TOF MS удалось разделить 22 штамма *Fusarium* на 6 подтипов в зависимости от тех мест, откуда их удалось выделить. Как отмечают многие исследователи, особенностью многих представителей рода *Fusarium*, так же, как и *Aspergillus*, затрудняющей масс-спектрометрический анализ, является наличие различных пигментов в клетках микромицетов [Dong H., Kemptner J., Marchetti-Deschmann M. et al, 2009].

С помощью метода MALDI-TOF ICMS и системы SARAMIS были проанализированы наиболее клинически значимые штаммы *Trychophyton*: *T.rubrum*, *Trychophyton interdigitale*, *Trychophyton tonsurans* и *Arthroderma benhamiae*. Результаты свидетельствовали о высоком уровне достоверности определения (99,9%) для всех штаммов, кроме *T.rubrum* (80% достоверности). Микромицеты из образцов кожи и ногтей были охарактеризованы морфологически, а также методом секвенирования ITS региона рДНК. Для повышения надежности, методом MALDI-TOF MS образцы анализировали вслепую. Вид масс-спектров варьировался в зависимости от условий роста, однако во всех случаях было значительное количество биомаркерных сигналов, и видовые суперспектры удалось определить во всех случаях. Суперспектры в данном случае представляли собой спектры, составленные из совокупности пиков, характерных для всех штаммов каждого вида. Метод MALDI-TOF MS с необходимой базой данных может быть использован для идентификации дерматофитов вне зависимости от условий культивирования, при использовании референтных штаммов. Однако в данном случае проблему может представлять контаминация образца кератинами из организма пациента [Pasceu A., Detandt M., Hendrickx M., 2013].

Neuhof et al. исследовали значительное количество штаммов 22 видов микромицетов, относящихся к родам *Hypocrea* и *Trichoderma* масс-

спектрометрическим методом с целью определения различий в продукции метаболитов и низкомолекулярных пептидов. Специфические для этих родов масс-пики находились в диапазоне 5000-10000 m/z , и представляли собой гидрофобины, низкомолекулярные (содержащие около 100 аминокислот) белки, секретируемые выделяемые на поверхность мицелия, в то время как рибосомальные белки идентифицировать не удалось. При этом паттерны гидрофобинов спорулирующего и неспорулирующего мицелия отличались, что может быть обусловлено посттрансляционным N-концевым и C-концевым процессингом [Neuhof T., . Dieckmann R., Druzhinina I. et al. 2007]. В похожей работе методом MALDI MS объектами исследования послужили 129 штаммов 25 видов *Hypocrea* и *Trichoderma*. Дендрограмма сходства их масс-спектров достаточно точно совпадала с филогенетической классификацией методом секвенирования ITS-участка [De Respinis S., Tonolla M., Pranghofer S. et al, 2010].

В одной из своих работ Qian et al исследовали применение MALDI-TOF для дифференциации видов дрожжей и мониторинга маркеров морфогенеза отдельных клеток *Candida* в гифы. Метод оказался полезен при изучении изменений, происходящих в процессе трансформации. Также, автор подчеркнул, что важным вопросом было повышение качества масс-сигнатур путем проведения предварительной пробоподготовки [Qian J., Cutler J., Cole R., Cai Y., 2008].

Несмотря на то, что MALDI-TOF MS представляет собой постоянно развивающийся метод, в области изучения микромицетов он все еще достаточно сильно отстает. Еще первоначальные исследования по идентификации и характеристике микромицетов с помощью MALDI-TOF MS, показали потенциал этого нового подхода, демонстрирующего высокую дискриминирующую способность в большинстве случаев. Более того, некоторые исследователи предложили использование данной методики для оптимизации контроля качества эффективности антимикотиков [Kostrzewa M., Sparbier K., Maier T., Schubert S. 2013, Vella A., De Carolis E., Vaccaro L. et al, 2013]. Для дифференцировки спектров и проведения мета-анализа данных, необходим комплексный подход к развитию и совершенствованию алгоритмов получения дендрограмм. Однако

добиться приемлемого уровня воспроизводимости масс-спектров сложных биохимических смесей, таких, как в случае с микромицетами, пока что достаточно проблематично [Clark E., Kaleta E., Arora A. et al, 2013].

Оценка эффективности MALDI-TOF может быть осуществлена за счет использования референтных штаммов микромицетов и стандартизованных, сверочных спектров в базах данных. Кроме того, наряду со спектрами, в базы данных можно предоставлять данные по морфологии, биохимии и молекулярной биологии. Для валидации эффективности метода MALDI-TOF MS в области идентификации и филогенетических исследований, могут потребоваться данные секвенирования последовательности региона ITS-5.8S-ITS2 рДНК.

Важным вопросом, возникшим в ходе исследования микромицетов методом MALDI MS, стало влияние экспрессии тех, или иных генов на экспрессируемые белки, и, соответственно, масс-спектрометрические профили. Таким образом, возникает необходимость устранить возможные помехи для получения качественного масс-спектра, это еще одна задача в MALDI-TOF MS анализе клинически значимых микромицетов. Некоторыми исследователями было предложено для характеристики микроорганизмов применять основанные на биоинформатике программные алгоритмы, в которых применяется сравнение молекулярных масс белков в спектре с заранее известными молекулярными массами белков из секвенированных геномов. В методе используется тот факт, что подавляющее большинство регистрируемых биомаркеров имеющих массу более 4 кДа на MALDI спектре, это белки. Однако, применение метода возможно лишь относительно тех микроорганизмов, чьи геномы были секвенированы. Преимуществами программного анализа данных является отсутствие субъективности и неверных интерпретаций [Fagerquist C., Garbus B., Miller W., et al, 2010].

Для повышения эффективности метода в отношении идентификации и типирования метода MALDI-TOF MS, требуется проведение дальнейших исследований с мицелиальными грибами в качестве объектов изучения. Необходимо также глубже изучить проблему воспроизводимости спектров

штаммов внутри одного вида. Рост микромицета на среде, приводящий к продукции вторичных метаболитов, нежелателен, следовательно, рекомендуется немедленный анализ после изоляции колонии. Существуют некоторые рекомендации по тестированию воспроизводимости в хемотаксономии, которые могут быть применимы к методу MALDI-TOF MS, однако мировых стандартов в этой области пока что нет [Hillenkamp F., Peter-Katalinic J., 2013]. Для определения структуры обнаруженных компонентов необходимо больше информации, например, возможно ли идентифицировать микромицеты на основании масс-спектров одних только белков, и т.п. Метод MALDI-TOF ICMS является быстрым, недорогим в плане усилий и расходных материалов, и надёжным по сравнению с другими биологическими методиками. Контаминация, которой необходимо избежать в ПЦР для предотвращения ложноположительных результатов, не столь критична в масс-спектрометрии клеточных культур. Также стоимость и время проведения MALDI-TOF MS анализа меньше, нежели ПЦР [Li Y., Holzgreve W., Kiefer V., Hahn S. 2006, Cobo F., 2013, Cherkaoui A., Hibbs J., Emonet S. et al, 2010].

В целом, метод MALDI-TOF MS имеет важные преимущества перед методами, основанными на ПЦР. Эта технология достаточно быстрая и более легкая в освоении, зачастую требующая только взятия небольшого количества материала с чашки с питательной средой и переноса на плашку. При этом требуется определенная аккуратность во избежание контаминации материала. Кроме того, спектральные сигналы интактных клеток могут зависеть от фенотипических особенностей гриба, включающего такие элементы базидиоспоры, монокарион, дикарион, плодовое тело, поверхностный мицелий, субстратный мицелий и т.п. Мицелий, растущий на питательной среде, характеризуется наличием различных участков, соответствующим различным стадиям развития микромицета от апикальной зоны роста с интенсивным образованием гиф и большим количеством митохондрий, до зон с пигментацией и лизиса клеток. Таким образом, вариации биомолекул в интактных клетках могут влиять на воспроизводимость спектров в повторных анализах одного и того же

изолята. Для преодоления подобных трудностей проблем, авторы многих работ предлагают привести сроки культивирования мицелия на питательной среде к единому стандарту [Clark E., Kaleta E., Arora A. et al, 2013].

Белковое профилирование микроскопических грибов осуществляется с помощью методов, основанных как на анализе различий в фенотипических свойствах микромицетов, так и на анализе генетических маркеров. С одной стороны, многие фенотипические методы, до сих пор используемые в исследовательской практике, устарели и не обеспечивают необходимой точности и чувствительности, особенно с учетом постоянного увеличения числа штаммов различных микромицетов.

Однако некоторые протеомные методы, обладая большим потенциалом, не могли его проявить, в силу отсутствия технической базы, достаточной для конкуренции с генотипическими методами. С появлением tandemных масс-спектрометров и MALDI, протеомные методы профилирования, по многим параметрам (разрешающая способность, чувствительность) могут не уступать генотипическим, а по некоторым (скорость анализа, стоимость расходных материалов, отсутствие влияния неспецифичной ДНК на результат) обладают явным преимуществом. Наличие таких преимуществ как простота и дешевизна самого анализа, привело к повышению интереса к использованию метода MALDI-TOF для быстрой и надежной идентификации клинически значимых микрогрибов. Кроме того, учитывается высокий уровень воспроизводимости метода, основанный на измерении постоянно экспрессирующихся и представленных в большом количестве белков, таких как, например, рибосомальные протеины. Наблюдаемые молекулярные массы на масс-спектрах располагаются в пределах от 2000 до 20000 Да. В этих пределах находится лишь несколько молекул клеточных метаболитов, что является преимуществом, поскольку их можно легко использовать в качестве биомаркеров [Horká M., Kubesová A., Šalplachta J. et al, 2013, Del Chierico F., Masotti A., Onoriet M. et al, 2012, Andersen B., Smedsgaard J., Frisvad J., 2008, Neuhof T., . Dieckmann R., Druzhinina I. et al. 2007].

Основными ограничениями масс-спектрометрических методов, как было упомянуто выше, являются высокая стоимость самих приборов, и отсутствие в базах данных достаточного количества референтных спектров. Однако эти трудности вполне преодолимы, особенно в свете открывающихся возможностей и перспектив использования данных методов для решения вопросов эпидемиологии и клинической практики [Aebersold R., 2003, Alanio A., Cazorla A., 2011, Andersen B., Smedsgaard J., Frisvad J., 2008].

Следует подчеркнуть, что несмотря на значительное количество методов исследования микроорганизмов, используемых в микробиологии, эпидемиологии, и клинической диагностике, на настоящий момент нет такого метода, который удовлетворял бы всем критериям оценки, и мог бы послужить универсальным инструментом для решения любых задач. Наряду с молекулярно-генетическими методами, сейчас наиболее интенсивно развиваются методы протеомного анализа, в частности масс-спектрометрия. Текущие и перспективные возможности использования MALDI-TOF масс-спектрометрии, делают этот метод особенно интересным и значимым при работе с возбудителями эндемичных или особо опасных инфекций.

Необходимо также отметить несколько особенностей *Coccidioides spp.*, послуживших обоснованием для проведения исследования именно этих микроорганизмов методом MALDI-TOF MS. Во-первых, *Coccidioides immitis* и *Coccidioides posadasii* являются типичными представителями группы возбудителей особ опасных микозов. Во-вторых, согласно описанным выше причинам, проблема кокцидиоидомикоза за последние десятилетия вышла за границы традиционно эндемичных регионов Северной Америки. Случаи заболевания кокцидиоидомикозом регистрируются на всех континентах. Развитие туризма, трансплантация органов от больных доноров, угроза биотерроризма, обострение которой наблюдается в современном мире, обостряют вероятность распространения кокцидиоидомикоза. Все это указывает на существующую реальную опасность завоза в Россию этого возбудителя из эндемичных областей. Следовательно, достаточно актуальным представляется расширение арсенала

методов диагностики и эпидемиологии кокцидиоидомикоза, в том числе за счет MALDI-TOF масс-спектрометрии. Также, именно возбудители кокцидиоидомикоза наиболее широко представлены в коллекции Волгоградского НИПЧИ (26 штаммов), следовательно, именно при работе с ними удалось получить наибольшее количество различных масс-спектров в пределах одного вида. Это важный критерий при создании родового и видового «суперспектров».

Помимо этого, одной из основных причин проведения обширной работы в этом направлении стало отсутствие в существующих базах данных масс-спектров возбудителей особо опасных микозов. Несмотря на значительное количество видов микроорганизмов в базах данных Biotyper (около 5000 видов) и SARAMIS (около 4000 видов), характеристические масс-спектры возбудителей особо опасных микозов в них отсутствуют. В связи с чем, их дополнение полученными видовыми, и родовыми масс-спектрами, представляется важной задачей. Это поспособствует дальнейшему расширению фундаментальных знаний о возбудителях особо опасных микозов, а также создаст предпосылки к решению связанных с этой областью прикладных задач.

1.3 Применение технологии MALDI-TOF масс-спектрометрии для идентификации биомаркеров белковой природы

Помимо экспресс-идентификации культур неизвестных микроорганизмов путем сопоставления всех масс-пиков одновременно, масс-спектрометрический метод с успехом применяют в качестве вспомогательного метода при идентификации отдельных компонентов белковых смесей. В таких случаях, процессу идентификации обычно предшествует процедура разделения смеси методом одномерного, или двумерного электрофореза, либо хроматографическим методом. Подобные исследования чаще всего направлены на выявление потенциальных кандидатов для разработки вакцин, изучение полиморфизма и метаболизма, или общего состава протеом микроорганизмов.

Amiri-Eliasi et al. предприняли попытку выделить специфические белки клеточной стенки некоторых клинически значимых микромицетов с целью использования их в качестве биомаркеров в дальнейших исследованиях. Объектами изучения послужили штаммы *Candida albicans*, *Epidermophyton floccosum*, а также *Saccharomyces cerevisiae*, масс-спектры которых отличались значительными визуальными отличиями друг от друга, и разнообразием в целом. Потенциально искомые пики на масс-спектрах сопоставляли с базой данных SwissProt/TrEMBL. В результате, были отобраны некоторые белки, в подавляющем большинстве случаев присутствующие на масс-спектрах в виде пиков со стабильной интенсивностью и незначительными вариациями в местоположении. Из выбранных белков, четыре принадлежали к группе рибосомальных, пять – к группе митохондриальных. Еще десять потенциальных биомаркеров, большинство из которых имеет m/z менее 4000, не удалось идентифицировать путем сравнения с базой данных, или теоретически рассчитанными данными. Предположительно, эти белки подверглись посттрансляционной модификации. Авторы подчеркнули важность дальнейшего изучения выявленных биомаркеров [Amiri-Eliasi B., Fenselau C., 2001].

D. Padliya et al. исследовали клеточный лизат таких микромицетов *Ustilago maydis*, *Phytophthora sojae*, *Fusarium graminearum*, а также *Rhizoctonia solani* методом жидкостной хроматографии с последующей масс-спектрометрией с целью найти биомаркерные белки. После процедур очистки, разделения, и лизиса белков, интересующие исследователей масс-пики анализировали с помощью поисковой машины MASCOT и базы данных NCBIInr. В результате анализа совпадений, множество белков на спектрограммах было успешно идентифицировано, особенно в случае *U. maydis* и *F. graminearum*. Авторы также показали, что при подборе оптимального метода подготовки и использовании подходящих программ, можно четко разделять белковые компоненты даже близкородственных организмов [Padliya N., Garrett W., Campbell K., Tabb D. Et al, 2007].

R. Peterson et al. применяли методы метод двумерного электрофореза, и MALDI-TOF масс-спектрометрию для идентификации белковых компонентов секретомы *Doratomyces stemonitis*. После разделения с помощью 2-D электрофореза выделенной из клеточной культуры смеси, было получено 120 индивидуальных белков. Часть из них исследовали с помощью масс-спектрометрического анализа. Семь из них удалось успешно идентифицировать как ферменты различных групп. В целом применение одномерного и двумерного электрофореза, а также энзимографии и хромато-масс-спектрометра позволило точно выделить 20 ферментов белковой природы. Метод масс-спектрометрии хоть и не являлся основным инструментом в данном исследовании, тем не менее, продемонстрировал свою эффективность при решении подобных задач [Peterson R., Grinyer J., Nevalainen H., 2011].

Matis M. et al. провели исследование штамма *Pleurotus Ostreatus* в целях изучения потенциальных биомаркеров, с помощью тандемной масс-спектрометрии. Для анализа данных использовали инструменты BLAST и FASTA. Из исследованной фракции удалось выделить и определить структуру четырех белков, играющих важную роль в метаболизме микромицета [Matis M., Zakelj-Mavric M., Peter-Katalinić J., 2005].

Lakshman D. et al. исследовали белковый состав микромицета *Rhizoctonia solani*, комбинируя двумерный электрофорез с масс-спектрометрическим анализом интересующих фракций. В результате исследования 144 белковых компонентов, удалось выявить 11 белков, включая белки теплового шока, АТФ-синтазу, актин и убиквитин. Авторы работы подчеркивали важность использования подходящего программного комплекса (в данном случае инструмент для выравнивания последовательностей BLINK, и база данных CCD в составе NCBI) [Lakshman D., Natarajan S., Lakshman S., 2008].

Kemptoner J. et al. провели масс-спектрометрическое исследование микотоксин-продуцирующих штаммов *Fusarium* с целью определить наличие специфичных для них биомаркеров. Было установлено, что наиболее интенсивные масс-пики расположены в участке 1500-15000 m/z, в частности

специфичный для исследованной группы пик в районе 8000 m/z [Kemptner J., Marchetti-Deschmann M., Mach R., et al, 2009].

Champer et al. провели обширное исследование обширной группы клинически значимых микромицетов с целью определить характерные для них белковые биомаркеры, при этом не обладающие высокой гомологией с белками человеческого организма. Среди объектов исследования преобладали представители родов *Aspergillus*, *Candida*, *Mucor*, *Cryptococcus*, и *Coccidioides*. Протеомы этих микроорганизмов анализировали масс-спектрометрическим методом (ионизация путем соударения) после процедуры лизиса трипсином. Анализ полученных масс-спектров проводили с помощью программного обеспечения IdentityE (version 2.135.2.0, Waters, Milford, MA, USA). В результате исследования было выявлено несколько сотен различных белков, сгруппированных по степени экспрессии в зависимости от используемой для культивирования питательной среды. Путем сравнения друг с другом этих групп, и выяснения степени их гомологии, удалось определить наиболее часто встречающиеся белки, экспрессирующиеся в большом количестве вне зависимости от условий роста. Одно из целей работ было получение определения возможностей создания вакцин, поэтому из итогового набора белков также отбирали те, которые имели незначительную степень гомологии с белками человеческого организма. В данном исследовании масс-спектрометрический метод показал свою эффективность при решении задач в сфере практической микробиологии [Champer J., Clemons K., Stevens D. , Kalkum M., 2016].

Ebanks R. et al. исследовали белковые компоненты клеточной стенки и псевдогиф *Candida albicans*. На первом этапе материал разделяли с помощью двумерного электрофореза, а затем вырезали из геля интересующие участки, обрабатывали трипсином или бромистым цианогеном, после чего получали их масс-спектры. В результате удалось выделить порядка 80 различных белков, семь из которых инициировали и стимулировали процесс образования псевдомицелия, и еще два – подавляли этот процесс. Помимо этого, определили 6 белков специфичных для дрожжевых клеток, 12 - для псевдо мицелия, а также 29 белков,

экспрессирующихся в обоих типах клеток. Таким образом, удалось выяснить роль белков в посттрансляционной регуляции морфогенеза *Candida albicans*. [Ebanks R., Chisholm K., Mckinnon S. et al, 2006].

В работе, посвященной поиску антигенных белков *Coccidioides posadasii*, с помощью масс-спектрометрического метода удалось идентифицировать два белка, наиболее подходящих для создания вакцины (фосфолипазу В и альфа-манозидазу) [Tarcha E.J., Basrur V., Hung C. et al, 2006].

Как можно увидеть, масс-спектрометрический метод анализа полезен и эффективен как в качестве основного инструмента исследования, так и в качестве вспомогательного, и позволяет решать различные задачи эпидемиологии и клинической микробиологии.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Штаммы микроорганизмов и условия культивирования

Объектами исследования служили штаммы I-II групп патогенности: 11 штаммов *Coccidioides immitis*, 15 штаммов *Coccidioides posadasii* (табл. 1), а также штаммы III-IV групп патогенности: 6 штаммов *Fusarium spp* (табл. 2), 4 штамма *Candida spp.* (табл. 3), и 6 штаммов *Cryptococcus neoformans* (табл. 4). Все микромицеты были предоставлены лабораторией коллекционных штаммов ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Учитывая принадлежность возбудителей кокцидиоидомикоза относятся к агентам II группы патогенности, работа с ними проводилась в соответствии СП 1-3-3118-13 Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности).

Таблица 1

Штаммы *Coccidioides immitis* и *C. posadasii*

№ п/п	Вид	Штамм
1	<i>Coccidioides immitis</i>	C-5
2	<i>Coccidioides immitis</i>	46
3	<i>Coccidioides immitis</i>	158
4	<i>Coccidioides immitis</i>	5960

5	<i>Coccidioides immitis</i>	30881
6	<i>Coccidioides immitis</i>	333
7	<i>Coccidioides immitis</i>	4 (Руденко)
8	<i>Coccidioides immitis</i>	34
9	<i>Coccidioides immitis</i>	46-P
10	<i>Coccidioides immitis</i>	46-H
11	<i>Coccidioides immitis</i>	441
12	<i>Coccidioides posadasii</i>	A-1
13	<i>Coccidioides posadasii</i>	M-11
14	<i>Coccidioides posadasii</i>	B-13
15	<i>Coccidioides posadasii</i>	22
16	<i>Coccidioides posadasii</i>	24
17	<i>Coccidioides posadasii</i>	51
18	<i>Coccidioides posadasii</i>	7/86
19	<i>Coccidioides posadasii</i>	442
20	<i>Coccidioides posadasii</i>	B-475
21	<i>Coccidioides posadasii</i>	27567
22	<i>Coccidioides posadasii</i>	37686
23	<i>Coccidioides posadasii</i>	95271
24	<i>Coccidioides posadasii</i>	30883
25	<i>Coccidioides posadasii</i>	36-S
26	<i>Coccidioides posadasii</i>	36794

Таблица 2

Штаммы *Fusarium spp.*

№ п/п	Вид	Штамм
1	<i>Fusarium moniliforme</i>	F-245
2	<i>Fusarium poae</i>	F-107
3	<i>Fusarium sambucinum</i>	3210
4	<i>Fusarium sambucinum</i>	3110
5	<i>Fusarium oxysporum</i>	135
6	<i>Fusarium graminearum</i>	12

Таблица 3

Штаммы *Candida spp.*

№ п/п	Вид	Штамм
1	<i>Candida glabrata</i>	5660
2	<i>Candida glabrata</i>	5659
3	<i>Candida kefyr</i>	1
4	<i>Candida parapsilosis</i>	BM-87

Штаммы *Cryptococcus neoformans*

№ п/п	Вид	Штамм
1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	9
2	<i>Cryptococcus neoformans</i>	P-107-A
3	<i>Cryptococcus neoformans</i>	144/45
4	<i>Cryptococcus neoformans</i>	114/21-A
5	<i>Cryptococcus neoformans</i>	22
6	<i>Cryptococcus neoformans</i>	137/56

2.2 Питательные среды и условия культивирования

Для изучения влияния условий культивирования исследуемых микромицетов на воспроизводимость масс-спектральных характеристик их клеток, штаммы *Coccidioides* spp. выращивали на агаре Сабуро (пептон — 10,0 г/л, глюкоза — 40,0 г/л, агар-агар — 15,0 г/л), картофельном агаре (картофель — 200 г., агар-агар — 20 г., вода дистиллированная — 1000 мл.), а также агаре Чапека-Докса (сахароза 30,0; нитрат натрия 3,0; сульфат магния 0,5; хлорид калия 0,5; сульфат железа (III) 0,01; фосфат калия двузамещенный 1,0; агар-агар 13,0). Для культивирования штаммов *Candida*, *Fusarium* и *Cryptococcus* использовали только агар Сабуро.

Для получения мицелиальной фазы штаммы *C. immitis* и *C. posadasii* высевали на питательный агар с последующей инкубацией при 28 °С в течение 7 суток. Штаммы *C. neoformans* и *Candida* spp., *Fusarium* spp. также выращивали на

агаре Сабуро в течение 2-3 суток. В данном случае процессы обеззараживания материала, и экстракции белков объединены в один этап.

2.3. Подготовка штаммов *Coccidioides spp.* для масс-спектрометрического анализа

Обеззараживание культур исследуемых микроорганизмов проводили в соответствии с регламентирующими документами (СП 1.3.3118-13). Для этого использовали 3 метода.

1) К культуре добавляли 0,5 % раствор мертиолата натрия в соотношении 1:10 с последующей экспозицией в течение 24 ч при комнатной температуре или в течение 2 ч при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Затем мицелий в количестве 50 мг добавляли в пробирку, и тщательно суспендировали микологической лопаткой. Затем в пробирки с препаратами добавляли по 900 мкл абсолютного этанола, тщательно перемешивали на вортексе и инкубировали при комнатной температуре в течение получаса. После экспозиции центрифугировали 2 минуты при 3000 об/мин, удаляли супернатант и тщательно высушивали на воздухе от остатков этанола. Потом в пробирки вносили по 50 мкл 70 %-го раствора муравьиной кислоты и ацетонитрила, и снова перемешивали на вортексе. Затем, суспензированный материал в объеме 0,5 мкл наносили на лунки металлической мишени (чипа). Сверху на каждую пробу наносили по 0,5 мкл матрицы для MALDI-TOF (α -циано-гидроксикоричная кислота в растворе 50 % ацетонитрила и 2,5 % ТФК). После высыхания проб при комнатной температуре, мишень с образцами помещали в камеру масс-спектрометра.

2) Мицелий в количестве 50 мг добавляли в микроцентрифужную пробирку к 100 мкл 80 % раствора трифторуксусной кислоты (Pancreas, Испания). Мицелий механически измельчали для достижения максимально гомогенизированной взвеси. Затем препараты штаммов инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. После инкубации в пробирки добавляли 150 мкл ультрачистой воды для ВЭЖХ (Pancreas, Испания), тщательно встряхивали на вортексе,

центрифугировали при 12 тыс. об/мин. Супернатант использовали для исследования.

3) Из культур *Coccidioides* готовили взвеси в 100 мкл 80 % раствора трифторуксусной кислоты (Pancreas, Испания) в микроцентрифужных пробирках. Мицелий механически измельчали для достижения максимально гомогенизированной взвеси. Затем препараты штаммов инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. После инкубации в пробирки добавляли 150 мкл ультрачистой воды для ВЭЖХ (Pancreas, Испания), тщательно встряхивали на вортексе, центрифугировали для осаждения капель, к полученной взвеси добавляли 200 мкл ацетонитрила (Sigma Aldrich, США), повторно встряхивали и центрифугировали при 12 тыс. об/мин. в течение 2 минут. Процедуру встряхивания/центрифугирования повторяли 8 раз. Суспендированный материал в объеме 0.5 мкл наносили на лунки металлической мишени (чипа).

На подготовленную взвесь добавляли по 0.5 мкл матрицы для MALDI-TOF (α -циано-гидроксикоричная кислота, CHCA), и оставляли при комнатной температуре на 2 минуты. После высыхания проб мишень с образцами помещали в камеру масс-анализатора. Насосная система в камере создает рабочее давление порядка 10^{-6} Па. Согласно инструкциям производителя программного обеспечения SARAMIS, на 2 лунки каждой мишени также наносили суспензии референтного штамма *Escherichia coli* CCUG для калибровки прибора. Калибровка проводится для каждого отдельного эксперимента.

2.4 Подготовка штаммов возбудителей оппортунистических микозов для масс-спектрометрического анализа

Из культур микромицетов III-IV групп патогенности, готовили взвеси в 300 мкл ультрачистой воды для ВЭЖХ (Pancreas, Испания) в микроцентрифужных пробирках, объемом 1,5 мл (Eppendorf, Германия). Материал в количестве 50 мг добавляли в пробирку, и тщательно суспендировали микологической лопаткой.

Затем в пробирки с препаратами добавляли по 900 мкл абсолютного этанола, тщательно перемешивали на вортексе и инкубировали при комнатной температуре в течение получаса. После экспозиции центрифугировали 2 минуты при 3000 об/мин, удаляли супернатант и тщательно высушивали на воздухе от остатков этанола. Потом в пробирки вносили по 50 мкл 70 %-го раствора муравьиной кислоты и ацетонитрила, и снова перемешивали на вортексе. Затем, суспензированный материал в объеме 0,5 мкл наносили на лунки металлической мишени (чипа). Сверху на каждую пробу наносили по 0,5 мкл матрицы для MALDI-TOF (α -циано-гидроксикоричная кислота в растворе 50 % ацетонитрила и 2,5 % ТФК). После высыхания проб при комнатной температуре, мишень с образцами помещали в камеру масс-спектрометра.

2.5 Регистрация масс-спектров клеток микромицетов

Регистрацию масс-спектров осуществляли на приборе Axima Performance (Shimadzu, Япония) с азотным лазером. Диапазон регистрации составлял 1000-15000 m/z, фиксировались только положительные ионы, суммарный спектр каждого образца составлялся на основе 100 единичных выстрелов.

Калибровка масс-спектрометра проводилась с использованием стандартного видового масс-спектра *Escherichia coli* CCUG. Стандартный калибровочный масс-спектр предназначен для работы с микроорганизмами и последующим сопоставлением с базой данных SARAMIS (Anagnostec GmbH, v 3.62). Калибровочный шаблон содержал следующие основные пики: 4365, 5096, 5381, 6241, 6255, 6311, 6411, 6856, 7158, 7274, 7872, 9742, и 12227 кДа. Таким образом, перекрывался диапазон наиболее распространенных характеристических пиков большинства микроорганизмов. Следует отметить, что согласно инструкции производителя, пик 12227 кДа не всегда присутствовал, что учитывалось при анализе спектра и не снижало точности калибровки.

Формирование пиков осуществлялось в режиме развернутых настроек.

Показатель смещения базовой линии составлял 0,1 мВ. Величина базового порога составляла 100 каналов, ниже этой величины сигналы учитывались как шум.

При анализе результатов учитывались следующие характеристики масс-спектра: количество пиков, их интенсивность и места расположения, а также общая величина шумового компонента. Сигналы, отвечавшие ионам, были представлены несколькими пиками, соответствующими статистическому распределению различных изотопов этих ионов. Поскольку генерация зарядов в случае MALDI происходит в основном за счет реакции переноса протона от протонированной формы матричного иона (MH^+) к молекуле анализируемого вещества (A) (формула 2), изотопный профиль содержал в основном моноизотопные пики.

Результирующий спектр каждого штамма экспортировали в базу данных SARAMIS™ v. 3.62 (Anagnostec GmbH) для последующего анализа. Пост-обработки спектра не проводилось, и с базой данных сверялись все масс-пики выше заданного значения.

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА СХЕМЫ ПРОБОПОДГОТОВКИ КЛЕТОК *COCCIDIOIDES* SPP. ДЛЯ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

3.1 Подбор метода пробоподготовки, обеспечивающего обеззараживание исследуемого материала

Этап отработки алгоритма пробоподготовки клеточного материала патогенных микромицетов для масс-спектрометрического анализа был наиболее длительной частью работы. При анализе большинства клинически значимых микромицетов в этап пробоподготовки входит только экстракция белков.

Первоначально проводили оценку качества и воспроизводимости масс-спектров культур *Coccidioides*, полученных с применением стандартного протокола обеззараживания 0.5 % раствором мертиолята натрия. На всех полученных спектрах отмечалась группа нечетких пиков средней и низкой интенсивности в диапазоне 3-4 kDa, образующих единую нечеткую полосу вместо отдельных сигналов (рис. 1). При этом, высокоинтенсивные и хорошо выраженные пики, необходимые для сопоставления с базой данных, отсутствуют.

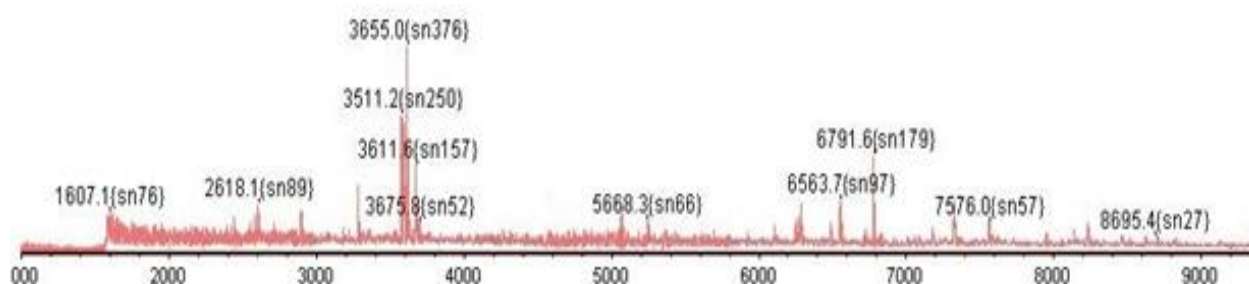


Рисунок 1. Масс-спектр *C. immitis* 441 после стандартного протокола обеззараживания 0.5 % раствором мертиолята натрия.

Предположительно это было связано с тем, что в процессе пробоподготовки не происходило полного разрушения клеток грибной культуры, вследствие чего пики на спектрах соответствуют ионам не только белковой природы, но и другим

компонентам клеточной стенки, например хитину и другим полисахаридам. С учетом полученных результатов ясно, что данный метод не пригоден для получения качественных характеристических спектров возбудителей грибковых заболеваний.

Далее, в качестве основы мы использовали один из описанных в литературе методов пробоподготовки клеток микромицетов для масс-спектрометрии, который, однако, не применялся для работы с возбудителями особо опасных микозов [Lasch P., Nattermann H., Erhard M. et al, 2008].

Метод заключался в экспозиции небольшого количества образца в 80 % растворе трифторуксусной кислоты (ТФК), и, согласно данным литературы, ранее применялся для обеззараживания возбудителя сибирской язвы и получения его масс-спектров.

Характерным признаком обработки микромицетов ТФК являлось наличие на спектрах одного или двух очень высоких пиков на фоне достаточно интенсивного шумового сигнала. Вполне вероятно, что этот реагент разрушал часть белков и способствовал образованию значительного числа многозарядных фрагментов с низкой интенсивностью. А высокие пики соответствовали белкам, изначально присутствующим в клетке в большом количестве, поэтому не столь сильно страдающим от воздействия ТФК.

В результате этого показана высокая эффективность метода при обеззараживании, однако фактического улучшения качества масс-спектра при этом отмечено не было (рис. 2). Пики масс-спектра в диапазоне 3000-4000 m/z были выражены значительно более отчетливо, однако общая интенсивность сигналов практически не возросла.

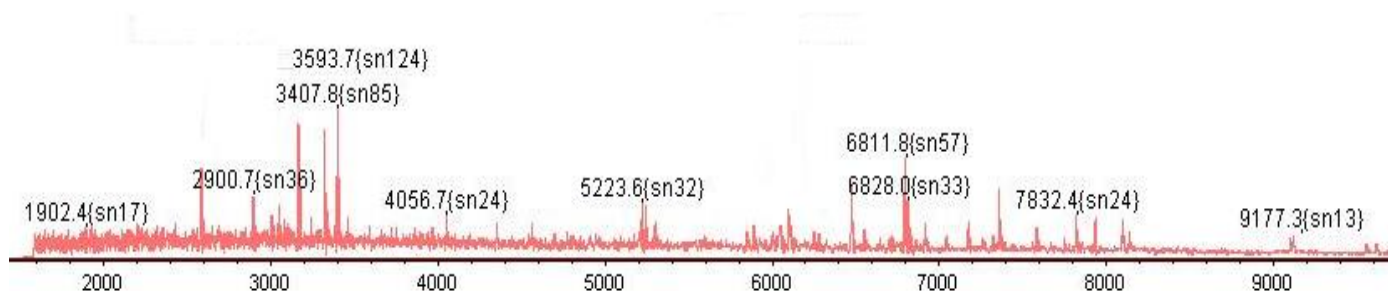


Рисунок 2. Масс-спектр *C. immitis* 441 после обеззараживания в 80 %-м растворе ТФК.

3.2 Оптимизация методов экстракции протеинов из клеток *Coccidioides* spp.

Вышеописанные методы позволяли эффективно обеззараживать образцы культуры микромицета, однако не способствовали повышению качественных характеристик масс-спектров, а также их воспроизводимости.

В связи с этим, следующим, использованным в рамках исследования методом пробоподготовки, был метод экстракции белков ацетонитрилом и муравьиной кислотой, после предварительной обработки этанолом [Kallow W., Santos I., Erhard M. et al, 2006, Coulibaly O., Marinach-Patrice C., Cassagne C. et al, 2011, Ferreira L., Sánchez-Juanes F., Porras-Guerra I. et al, 2011].

Данный метод использовался для пробоподготовки достаточно большого числа патогенных микроорганизмов, в том числе и некоторых микромицетов. В изначальном варианте этот метод использовался в исследованиях микроскопических грибов, в частности, с целью пробоподготовки *Candida* spp. и *Cryptococcus* spp. для анализа масс-спектрометрическим методом [Firacative C., Trilles L., 2012, Ferroni A., Suarez, Beretti J. et al, 2010, Dhiman N., Hall L., Wohlfel S. et al, 2011, Seng P., Drancourt M., Gouriet F. et al, 2009].

Было решено дополнить или модифицировать изначальные протоколы описанных методов целью сделать их пригодными для работы с имеющимися

микровидами II группы патогенности. В частности, для пробоподготовки *Coccidioides* spp. был использован данный метод, с заменой муравьиной кислоты на трифторуксусную.

В дополнение к ТФК, в пробирки с образцами культур добавляли стеклянные гранулы ($d = 45$ мкм) для механического воздействия на клеточную стенку, и образцы прогревали в течение 10 минут при 40°C . Результаты продемонстрировали видимое улучшение качества спектров по сравнению с первоначальным протоколом. Уровень шума был меньше, а количество и четкость пиков возросли. При этом результаты посева на стерильность материала, полученного с использованием данного метода, во всех экспериментах были отрицательными.

В итоге, после апробирования ряда литературных методов и собственных вариантов пробоподготовки клеток *Coccidioides* spp., для масс-спектрометрии оптимальным был признан дополненный метод экстракции с использованием трифторуксусной кислоты и ацетонитрила с последующим прогреванием. Данная схема пробоподготовки позволяла получить масс-спектры с более высоким качеством и воспроизводимостью по сравнению с другими методами (рисунок 3).

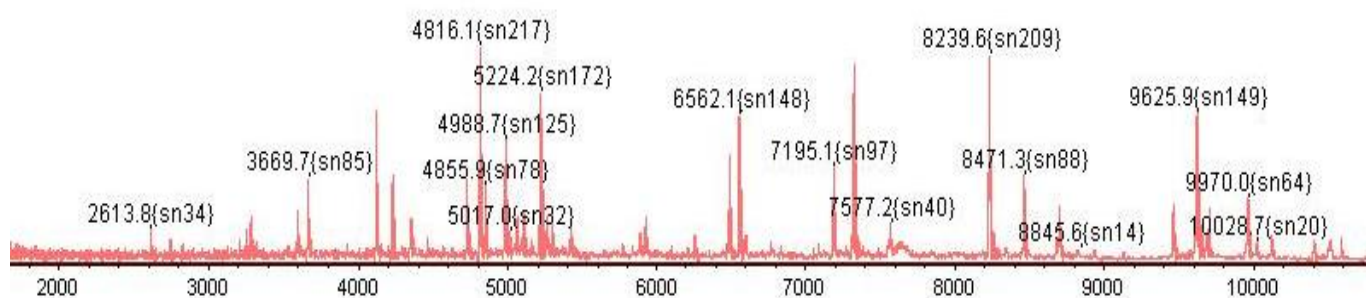


Рисунок 3. Масс-спектр *C. immitis* 441 после протокола обеззараживания в 80 % растворе ТФК с экстракцией МК и ацетонитрилом и последующим прогреванием в течение 10 минут.

Выбранный метод пробоподготовки включал в себя следующие этапы. Из мицелиальных культур микровидов, выросших на плотной питательной среде,

готовили взвеси в 100 мкл 80 % раствора трифторуксусной кислоты (Pancreas, Испания) в микроцентрифужных пробирках. Мицелий тщательно измельчали микологической лопаткой для достижения максимально гомогенизированной взвеси. Затем препараты штаммов инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин с последующим контрольным высевом на стерильность. После инкубации в пробирки добавляли 150 мкл ультрачистой воды для ВЭЖХ (Pancreas, Испания), тщательно встряхивали на вортексе, прогревали до 40 °С в течение 10 мин., центрифугировали для осаждения капель, к получившейся взвеси добавляли 200 мкл ацетонитрила, повторно встряхивали и центрифугировали при 12 тыс. об/мин. в течение 2 минут.

Суспендированный материал в объеме 0.5 мкл наносили на лунки металлической мишени (чипа). Сверху добавляли по 0.5 мкл матрицы для MALDI-TOF (α -циано-гидроксикоричная кислота, CHCA). После кристаллизации проб, мишень с образцами помещали в камеру масс-анализатора. В соответствии с инструкциями производителя SARAMIS, на 2 лунки каждой мишени также добавляли суспензии референтного штамма *Escherichia coli* CCUG для калибровки прибора.

Подготовка штаммов гетерологичных микромицетов велась с использованием наиболее распространенного и проверенного метода пробоподготовки для микроорганизмов III-IV групп патогенности. Схема пробоподготовки включала следующие этапы: в микропробирки вносили по 300 мкл деионизованной воды, две стандартные бактериологические петли материала, 900 мкл 96° этанола, встряхивали на вортексе, центрифугировали при 13 тыс. об/мин в течение 2 мин. Затем удаляли из пробирок супернатант, осадок высушивали для полного удаления остатков этанола. К осадку добавляли 50 мкл 70 % МК и 50 мкл ацетонитрила, тщательно перемешивали на вортексе, центрифугировали при 13 тыс. об/мин в течение 2 минут [Cazares L., Troyer D., Wang B. et al, 2011, Chalupová J., Raus M., Sedlářová M., 2013, De Respinis S., Tonolla M., Pranghofer S. et al, 2010]. Далее надосадочную жидкость отделяли от осадка и использовали в дальнейшей работе.

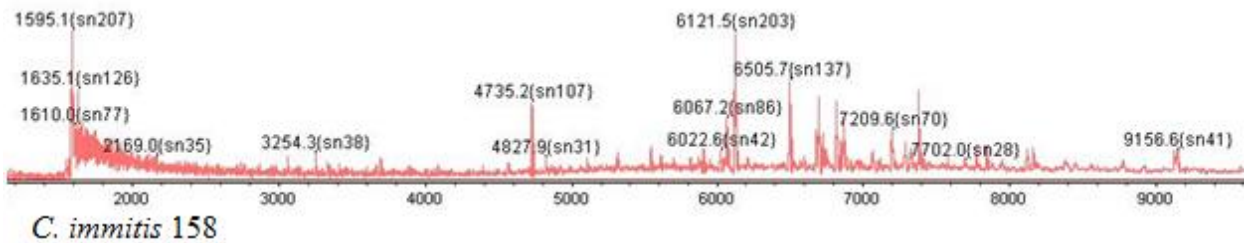
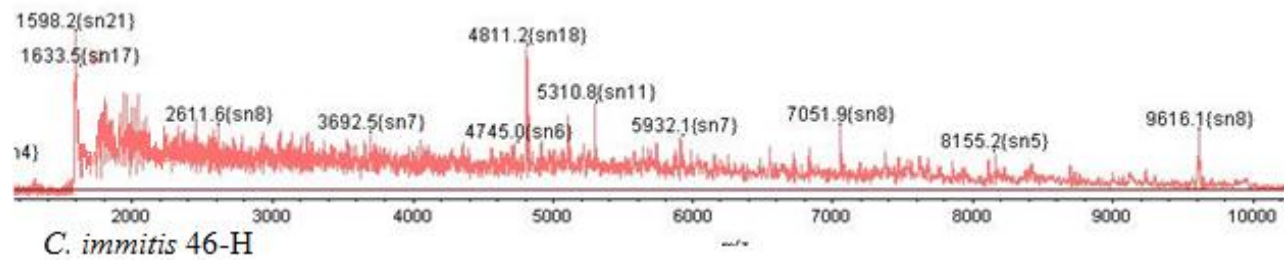
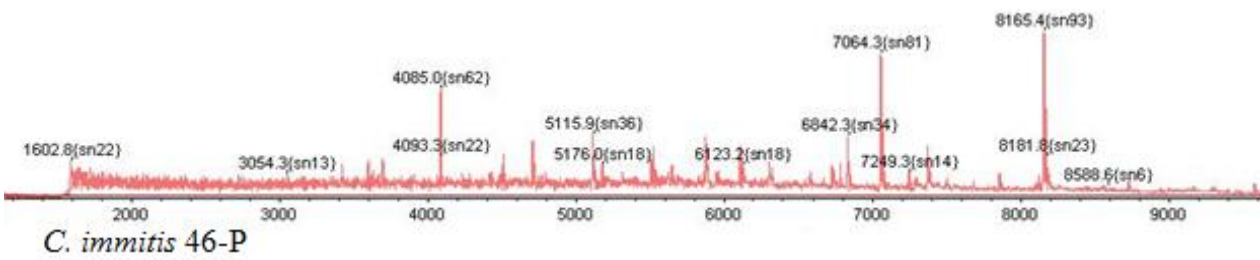
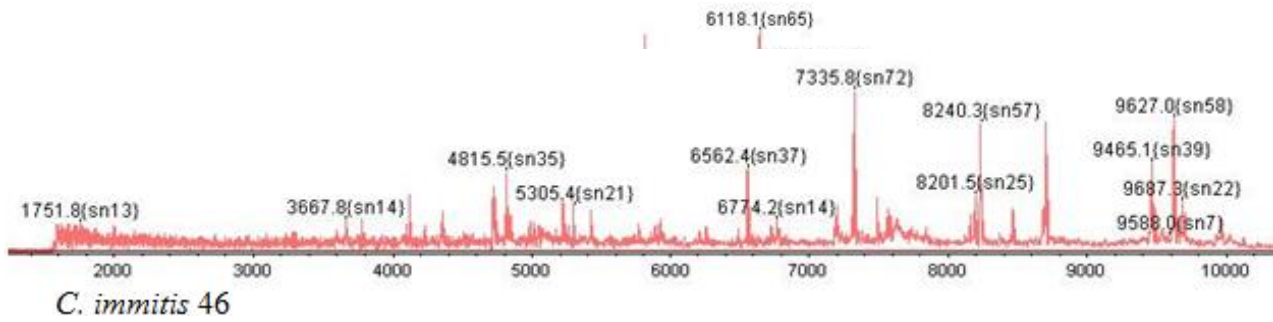
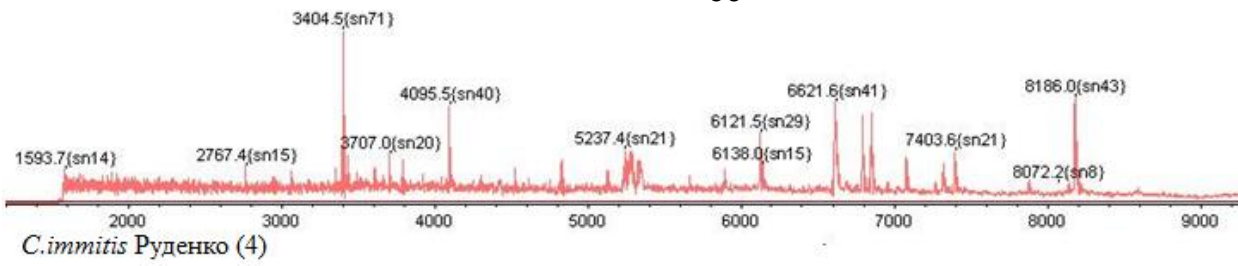
ГЛАВА 4. ПОЛУЧЕНИЕ И СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КОКЦИДИОМИКОЗА

4.1 Получение репрезентативного набора характеристических масс-спектров коллекционных штаммов *Coccidioides*

В идентификационной базе данных клеточных масс-спектров видов бактерий и микромицетов SARAMIS v. 3.62 отсутствовали референтные масс-спектры возбудителей особо опасных микозов, в том числе возбудителя кокцидиомикоза, вследствие чего сопоставить с ними полученные спектры не представлялась возможным. Поэтому одной из целей работы было создание соответствующего подраздела базы данных (на уровне семейства *Onygenaceae*) масс-спектров исследуемых микроорганизмов и формирование наборов спектров и родового суперспектра, используемых в дальнейшем в качестве референтных при идентификации и белковом профилировании штаммов микромицетов.

Для формирования соответствующих наборов клеточных масс-спектров, были использованы коллекционные штаммы *Coccidioides* (табл. 1.), обозначенных как «референтные», и которые предполагается использовать в дальнейшем для процедур автоматизированной идентификации и профилирования на основе сходства/различия масс-спектрометрических характеристик.

Как видно, для масс-спектров штаммов *Coccidioides* характерны значительные визуальные различия, что характерно для масс-спектров некоторых других микромицетов [Clark E.A., Kaleta E., Arora A. et al, 2013]. Можно выделить несколько диапазонов m/z , где чаще всего группируются наиболее интенсивные пики.



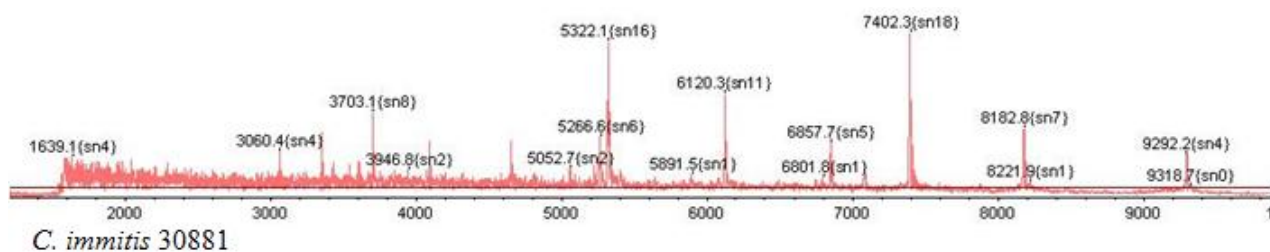
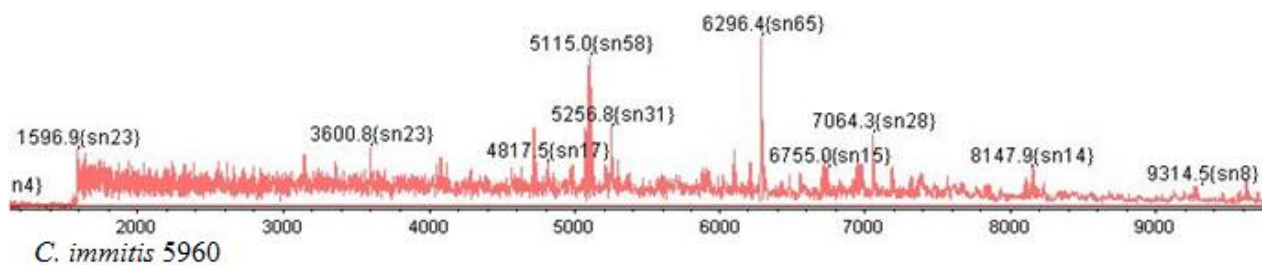
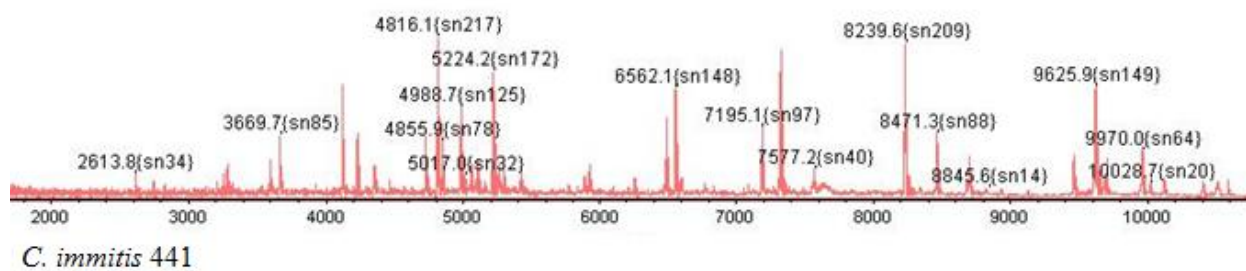
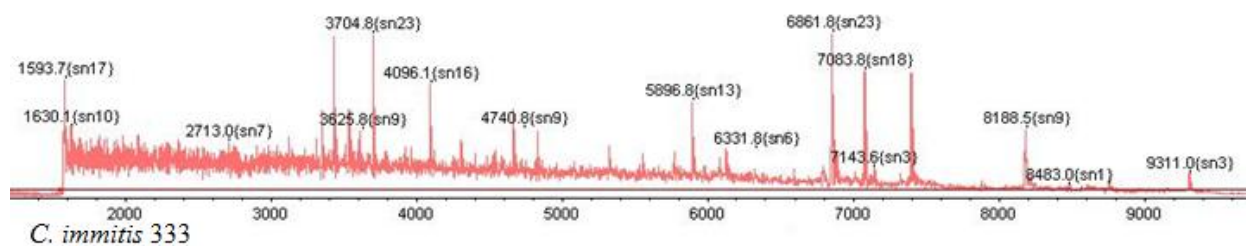
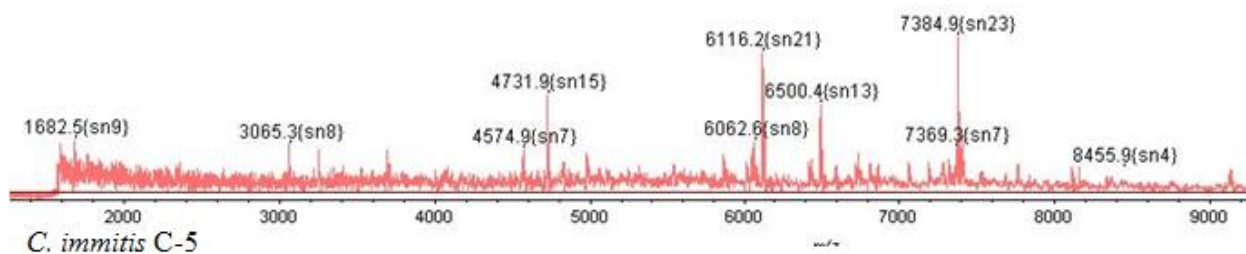
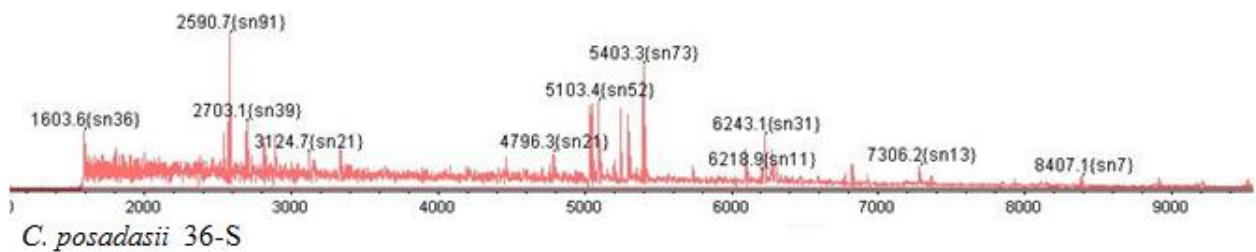
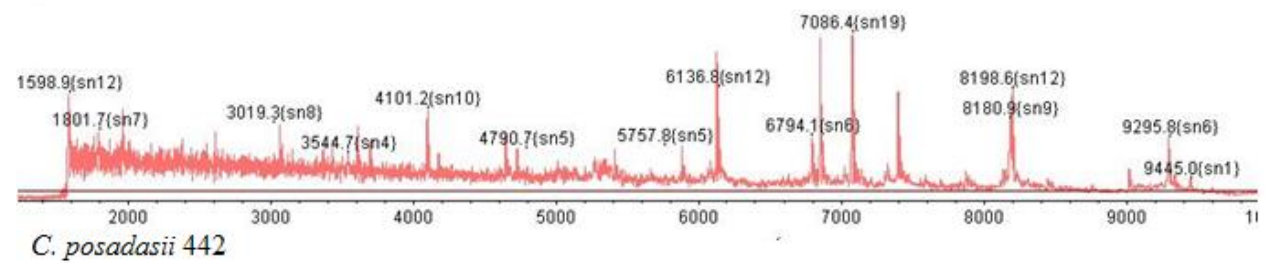
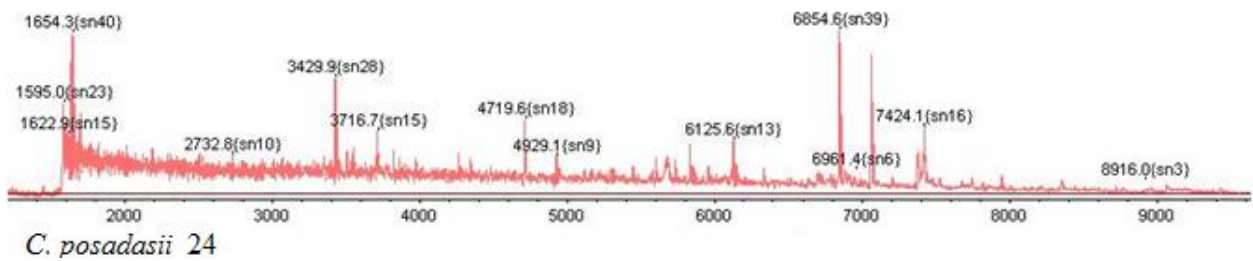
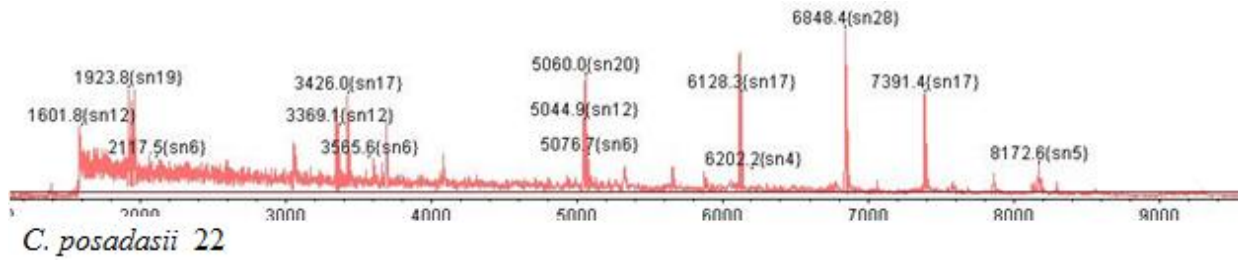
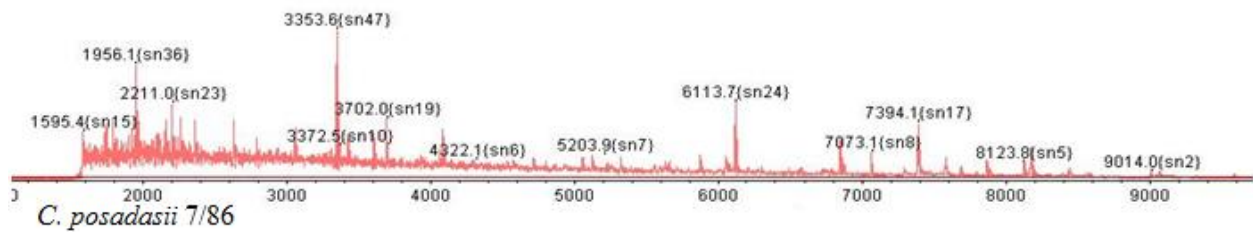
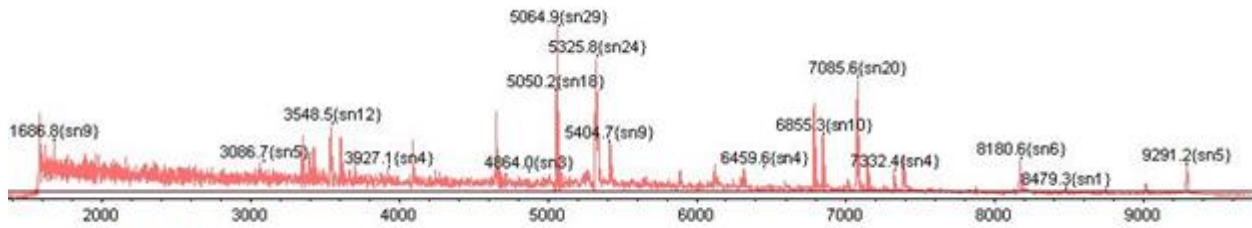
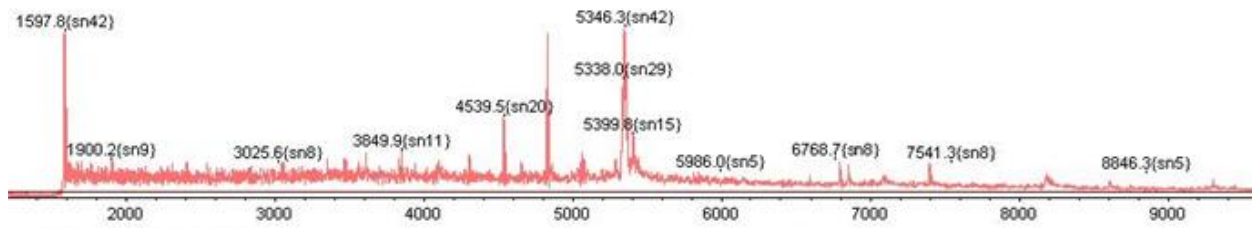
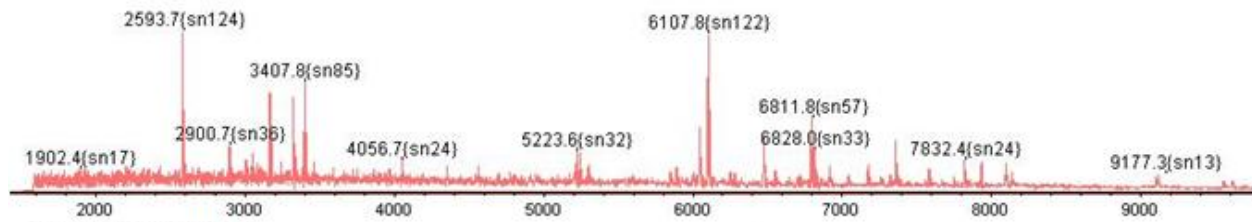
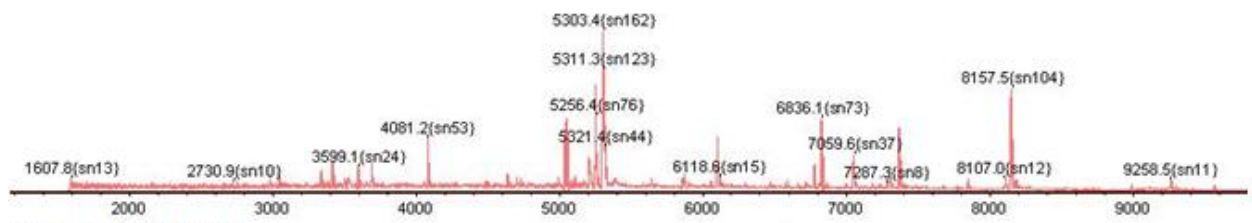
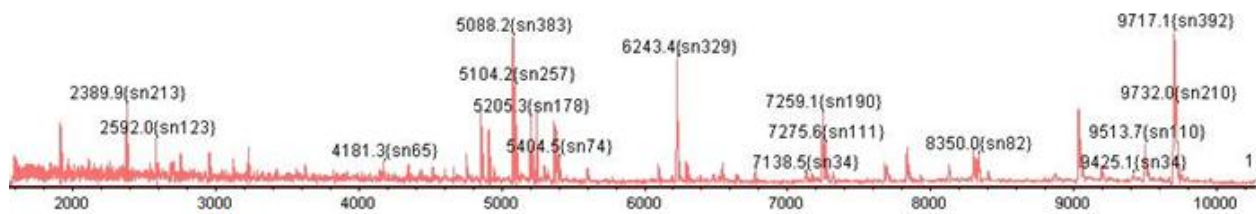
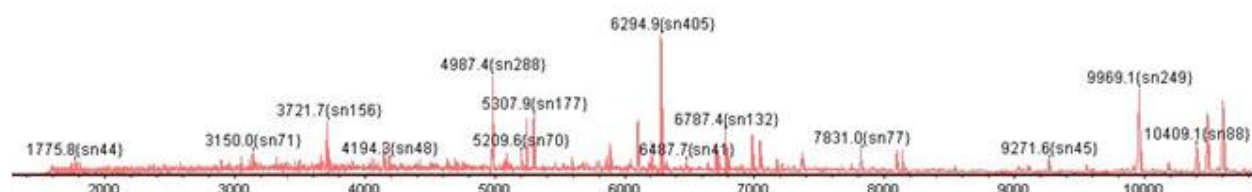


Рисунок 4. Масс-спектры штаммов *C. immitis*.





*C. posadasii* 51*C. posadasii* 27567*C. posadasii* 30883*C. posadasii* 37688*C. posadasii* 95271*C. posadasii* A-1

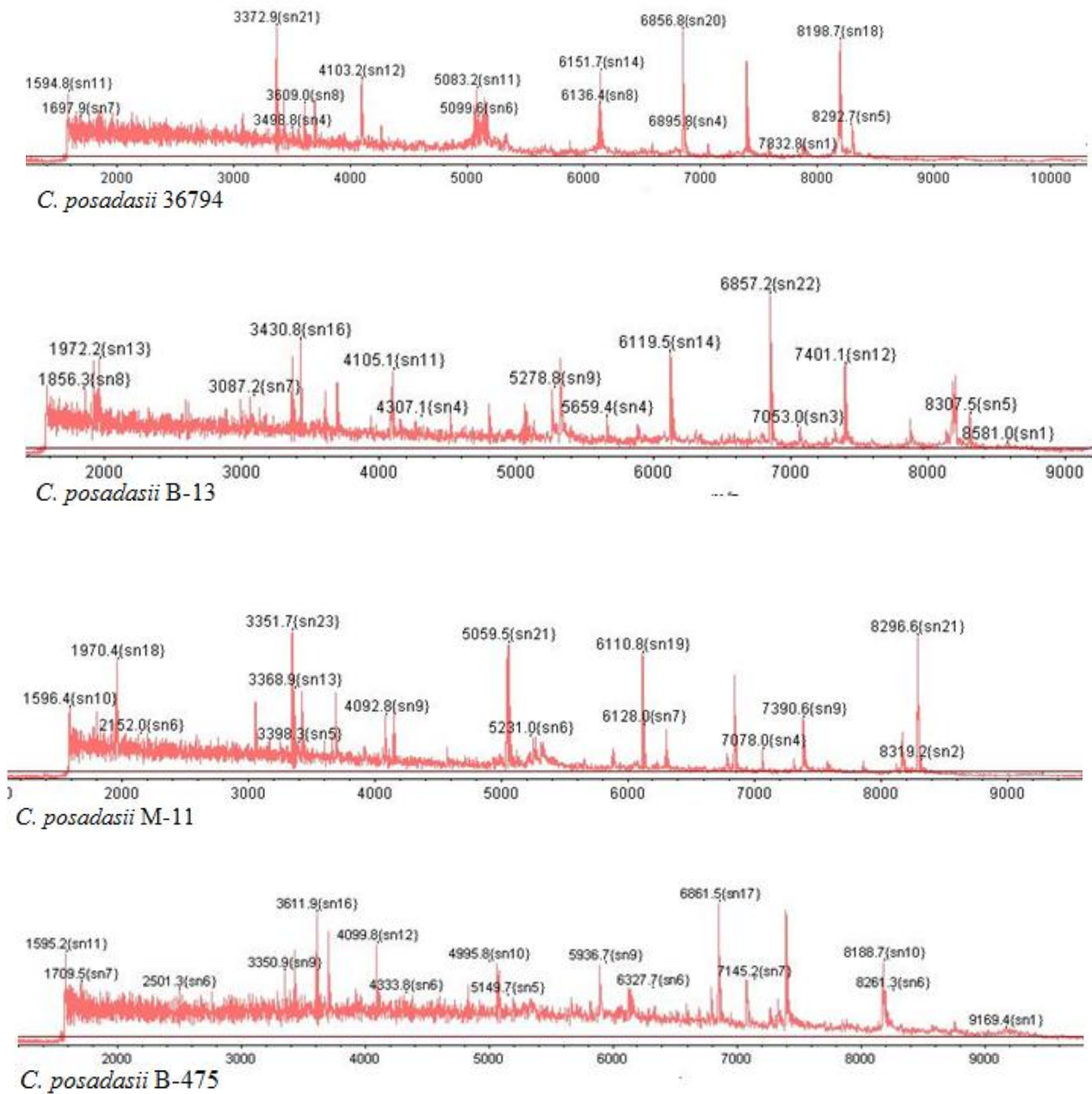


Рисунок 5. Масс-спектры штаммов *C. posadasii*.

Первой по частоте встречаемости пиков с показателем s/p выше 30 была зона масс-спектров в диапазоне от 6000 до 10000 m/z (штаммы *C. immitis* 34, 46, 46-P, 158, 5960, и C-5, а также *C. posadasii* 22, 24, 442, A-1, B-13, B-475, 36794).

Вторая зона располагается в интервале от 4000 до 6000 m/z (штаммы *C. immitis* 4 и 46-H, *C. posadasii* 7/86, 36-S, 51, 27567, 37688). Кроме того, масс-

спектры части штаммов (*C. immitis* 333, 441, 30881, а также *C. posadasii* 30883, 95271, и М-11) содержали равноценные по интенсивности пики в обоих интервалах.

Механизм подобного группирования пока неясен, однако, наиболее интенсивные пики были хорошо воспроизводимы, лишь с незначительными вариациями по местоположению и величине.

На основе индивидуальных масс-спектров всех штаммов *Coccidioides spp.*, была построена дендрограмма их сходства. Как видно из рисунка 6, программный анализ установил степень взаимного сходства масс-спектров в пределах 60 - 70 %. Подобный результаты, в сочетании со значительными визуальными отличиями в распределении пиков индивидуальных масс-спектров, свидетельствуют о наличии существенного разнообразия белковых компонентов внутри рода *Coccidioides*.

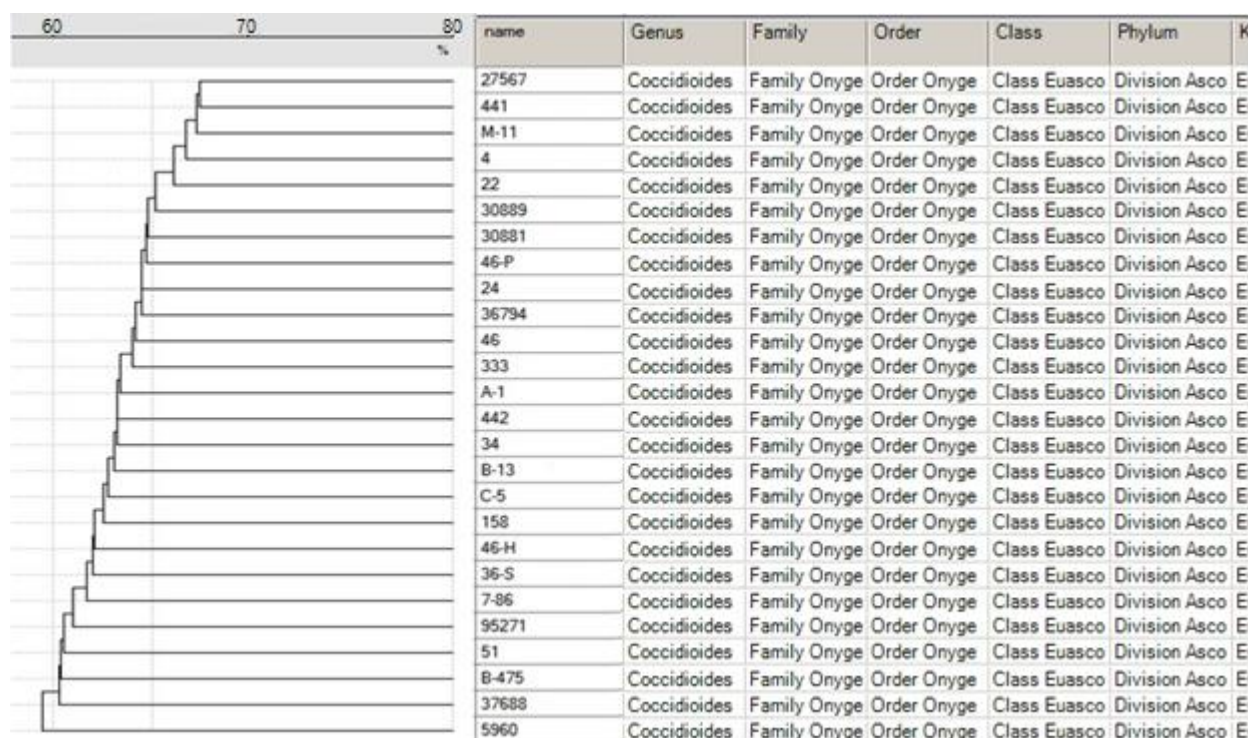


Рисунок 6. Дендрограмма сходства *C. immitis* и *C. posadasii*, построенная средствами программного комплекса SARAMIS на основе взаимного сравнения масс-спектров указанных штаммов.

4.2 Изучение влияния условий культивирования микромицетов на характеристики масс-спектров

Для изучения влияния условий культивирования исследуемых микромицетов на воспроизводимость масс-спектральных характеристик их клеток, штаммы *Coccidioides* spp. выращивали на различных плотных питательных средах. Также варьировали время культивирования на питательной среде (7, 10 и 14 суток).

Оптимальным для получения наиболее воспроизводимых масс-спектров по соотношению время роста/качество спектра был признан срок 7 суток. При культивировании в течение 10 суток, качество полученных масс-спектров либо не отличалось от 7-суточных, либо было в незначительной степени ниже.

Масс-спектры штаммов, культивируемых в течение 14 суток, демонстрировали существенное снижение качества. На рисунке 7 проиллюстрирован уровень воспроизводимости масс-спектров на примере штамма *C. posadasii* 51 после культивирования штамма микромицета на среде Чапека-Докса.

Как видно, визуальные различия масс-спектра незначительны, и общая картина величины и распределения масс-пигов сохраняется. Такая же картина наблюдается и при культивировании этого штамма на картофельном агаре (рис. 8). Временной интервал между экспериментами составлял 30 суток.

При культивировании на картофельном агаре и агаре Чапека-Докса воспроизводимость масс-спектров также оказалась достаточно высокой. Изменения местоположения наиболее интенсивных пиков находились в диапазоне $\pm 0,3$ кДа. Колебания соотношения s/n не превышали 200 единиц. Однако качество масс-спектров культур, выращенных на картофельном агаре и среде Чапека-Докса, оказалось существенно ниже, нежели при культивировании на плотной среде Сабуро.

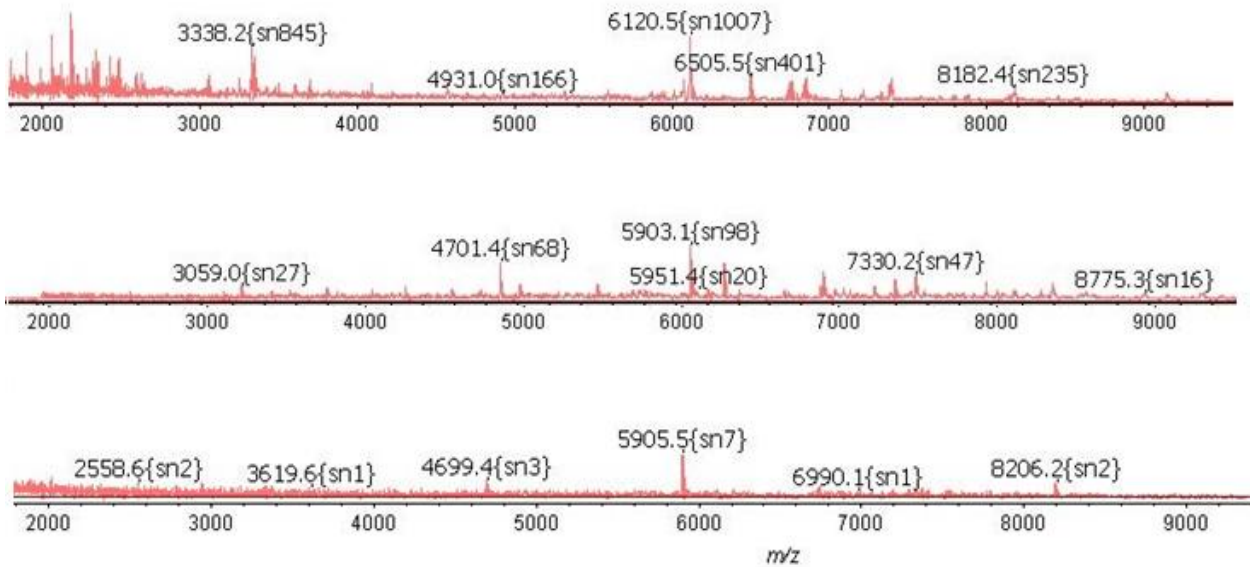


Рисунок 7. Масс-спектры штамма *C. posadasii* 51 после выращивания на среде Чапека-Докса. На масс-спектрах практически отсутствует как шумовой сигнал, так и информативные пики.

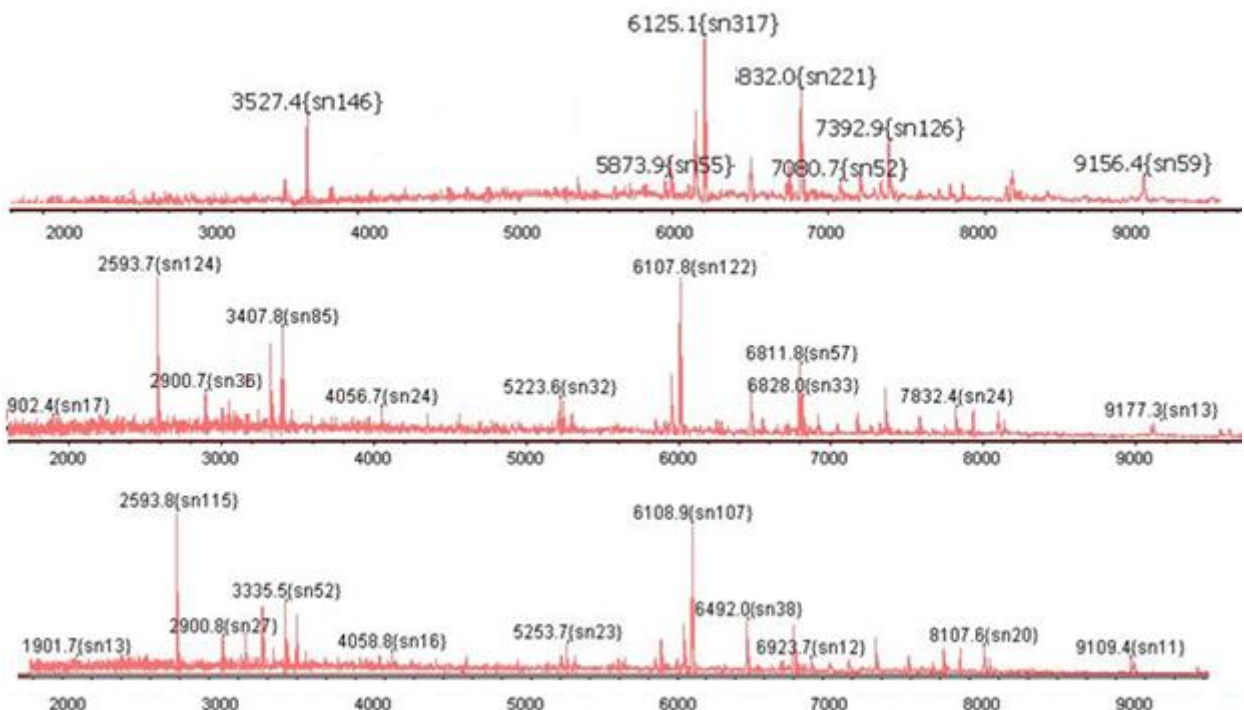


Рисунок 8. Масс-спектры штамма *C. posadasii* 51 после выращивания на картофельном агаре. Можно отметить более высокое качество спектра, по сравнению со средой Чапека-Докса.

На рисунке 9 представлены результаты сравнения масс-спектров штаммов, выращенных на трех разных средах на примере штамма *C. posadasii* M-11.

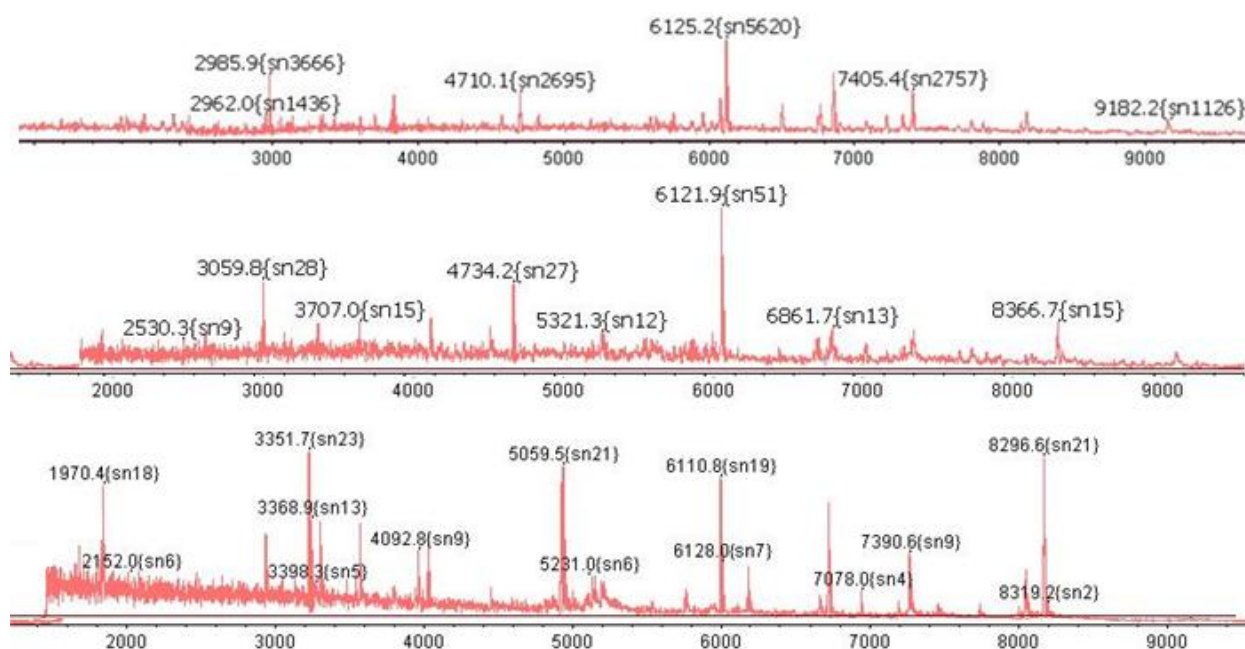


Рисунок 9. Масс-спектры штамма *C. posadasii* M-11 после культивирования на агаре Чапека-Докса, картофельном агаре и агаре Сабуро (сверху вниз). Визуальное сравнение показывает отчетливое и значительное улучшение качества масс-спектра, полученного из культуры микромицета, выращенной на агаре Сабуро.

Таким образом, на данном этапе исследования было установлено, что оптимальной питательной среда, для культивирования микромицетов рода *Coccidioides* с целью получения воспроизводимых масс-спектров (с условием наибольшей воспроизводимости распределения пиков) с хорошо выраженными интенсивными пиками и отсутствием значительного шумового сигнала, является плотный агар Сабуро. Также было показано незначительное влияние температуры культивирования на результаты масс-спектрометрического анализа, что согласуется с некоторыми литературными данными [Clark E.A., Kaleta E., Arora A. et al, 2013].

4.3 Идентификация микромицетов III-IV групп патогенности на основе анализа клеточных масс-спектров

Нами была проведена серия опытов по идентификации некоторых штаммов микромицетов III-IV групп патогенности: *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, а также *Fusarium* spp., находящихся в коллекции Волгоградского противочумного института.

Главной задачей данного раздела исследования являлась оценка точности работы приборной базы и программного комплекса SARAMIS v. 3.62 при анализе уже широко распространенных клинически значимых микромицетов. Критерием выбора объектов исследования служила их широкая распространенность в клинической и исследовательской практике, а также обширная представленность их референтных масс-спектров в различных базах данных [Lohmann C., Sabou M., Moussaoui W., Prévost G. et al, 2013].

На рисунках 10 – 12 приведены результаты родовой идентификации исследуемых микромицетов комплексом SARAMIS v. 3.62 в автоматическом режиме.

Identified Files						
	name	sample	%	genus	species	datacou
	<Untitled>_1G2[c]		86.00	Candida	sp.	306
	<Untitled>_1G1[c]		86.00	Candida	sp.	359
	<Untitled>_1I3[c]		99.90	Candida	sp.	351
	<Untitled>_1E1[c]		99.90	Candida	sp.	358
	<Untitled>_1B1[c]		99.90	Candida	sp.	323
	<Untitled>_1C1[c]		99.90	Candida	sp.	350

Рисунок 10. Результаты идентификации коллекционных штаммов *Candida* spp. Цветовая градация отражает достоверность определения микроорганизма. Желтый цвет соответствует приемлемому уровню идентификации, темно-зеленый цвет – наивысшему уровню.

Identified Files						
	name	sample	%	genus	species	datacou
	<Untitled>_77_240714		99.90	Cryptococcus	sp.	293
	<Untitled>_240714		99.90	Cryptococcus	sp.	233
	<Untitled>_1C1[c]		99.90	Cryptococcus	sp.	351
	<Untitled>_1B1[c]		99.90	Cryptococcus	sp.	358
	<Untitled>_1E3[c]		99.90	Cryptococcus	sp.	222
	<Untitled>_1E1[c]		99.90	Cryptococcus	sp.	299

Рисунок 11. Результаты идентификации коллекционных штаммов *Cryptococcus* spp.
Все исследуемые штаммы идентифицированы до рода с наивысшим уровнем достоверности.

AnagnosTec SARAMIS Premium (admin)							
File Options							
Fingerprint Status PSD							
Identified Files							
	aquisition tim	name	sample	%	genus	species	datacou
►	24 Apr 2013	<Untitled>_		90.00	Fusarium	sp.	142
	77_240713_00 F_			99.90	Fusarium	sp.	350
	506_140413_0			99.20	Fusarium	sp.	187
	423_140413_0 F_			93.00	Fusarium	sp.	201
	24 Apr 2013	<Untitled>_		90.00	Fusarium	sp.	120
	24 Apr 2013	<Untitled>_		90.20	Fusarium	sp.	301

Рисунок 12. Результаты идентификации коллекционных штаммов *Fusarium* spp.
Исследуемые штаммы идентифицированы до рода с высоким уровнем достоверности.

На рисунках 13 – 15 приведены типичные масс-спектры клеток *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans* и *Fusarium* spp., полученные в ходе проведенной серии экспериментов. Все полученные масс-спектры характеризовались высокой

воспроизводимостью и выраженностью пиков в значимом для корректной идентификации диапазоне 4000 – 10000 m/z.

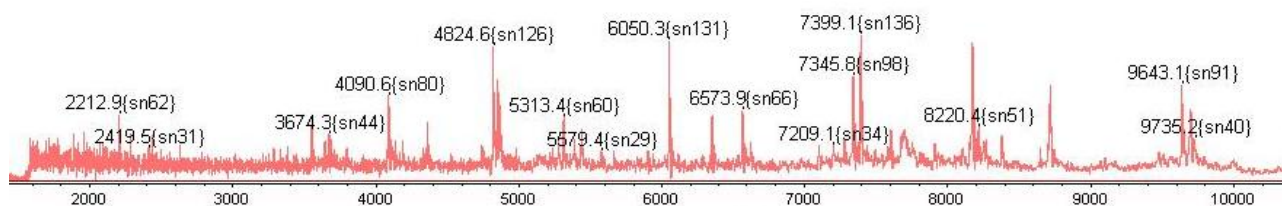


Рисунок 13. Наиболее типичный масс-спектр *Candida*. Для масс-спектров коллекционных штаммов *Candida* характерно большое количество информативных масс-пиков и относительно большое количество шумовых сигналов.

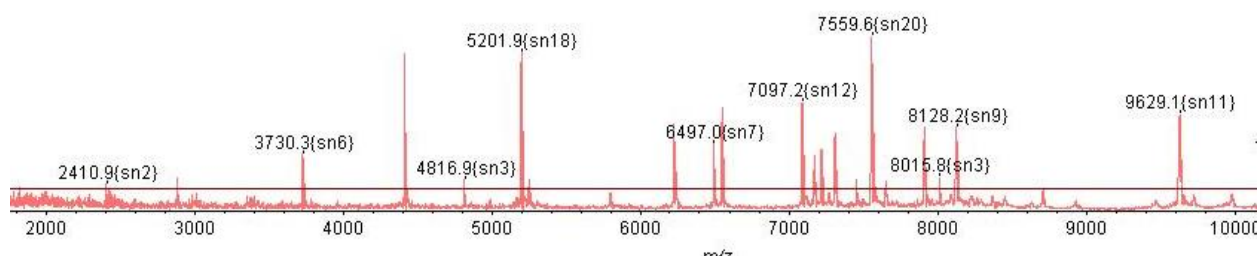


Рисунок 14. Наиболее типичный масс-спектр *Cryptococcus neoformans*. Интенсивные пики распределены по различным диапазонам m/z

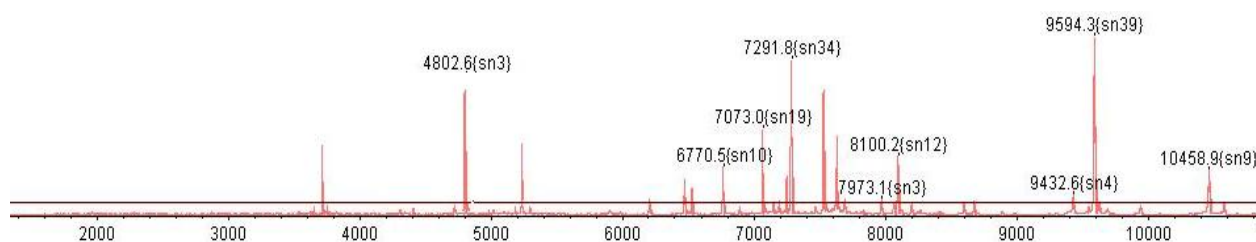


Рисунок 15. Наиболее типичный масс-спектр *Fusarium* spp. Основная масса информативных масс-пиков лежит в диапазоне >6000 m/z

Как видно из приведенных данных, все исследованные микромицеты, представители III-IV групп патогенности, успешно идентифицируются до уровня рода (достоверность идентификации 86 - 99 %). Каких-либо значительных вариаций или дополнений в протоколах пробоподготовки гетерологичных микромицетов не вносилось, использовался метод пробоподготовки, включающий экстракцию клеточных протеинов муравьиной кислотой и ацетонитрилом [Marinach-Patrice C., Fekkar A., Atanasova R. et al, 2010, Marklein G., Josten M., 2009, Nenoff P., Erhard M., Simon J. et al, 2013].

4.4 Идентификация родо- и видоспецифичных пиков клеточных масс-спектров микромицетов рода *Coccidioides*. Разработка раздела базы данных масс-спектров SARAMIS™ для идентификации штаммов *Coccidioides* spp.

На первом этапе проводился анализ полного спектра пиков всех штаммов исследуемых микромицетов. Полученные масс-спектры переводили в рабочее пространство программы SARAMIS, где и производили статистическую обработку. При этом масс-спектры в программе переводились в формат ascii-файлов.

Общий вид совокупности масс-пиков представлен на рисунке 16. Основная масса пиков, как видно, располагается в интервале 2000-7000 m/z. Интенсивность этих пиков составляла 20 - 70 s/n, то есть находилась в среднем диапазоне.

Как показал дальнейший анализ, именно в этом диапазоне находится большая часть характеристических пиков для рода *Coccidioides*. При исключении даже половины из этих пиков, процентный показатель совпадения с родовым суперспектром существенно (до 9 %) снижался. Одновременно с этим, возрастали показатели совпадения масс-спектров штаммов с видовыми суперспектрами, хотя и не столь значительно (0,3 - 5 %) (Рис. 17, 18).

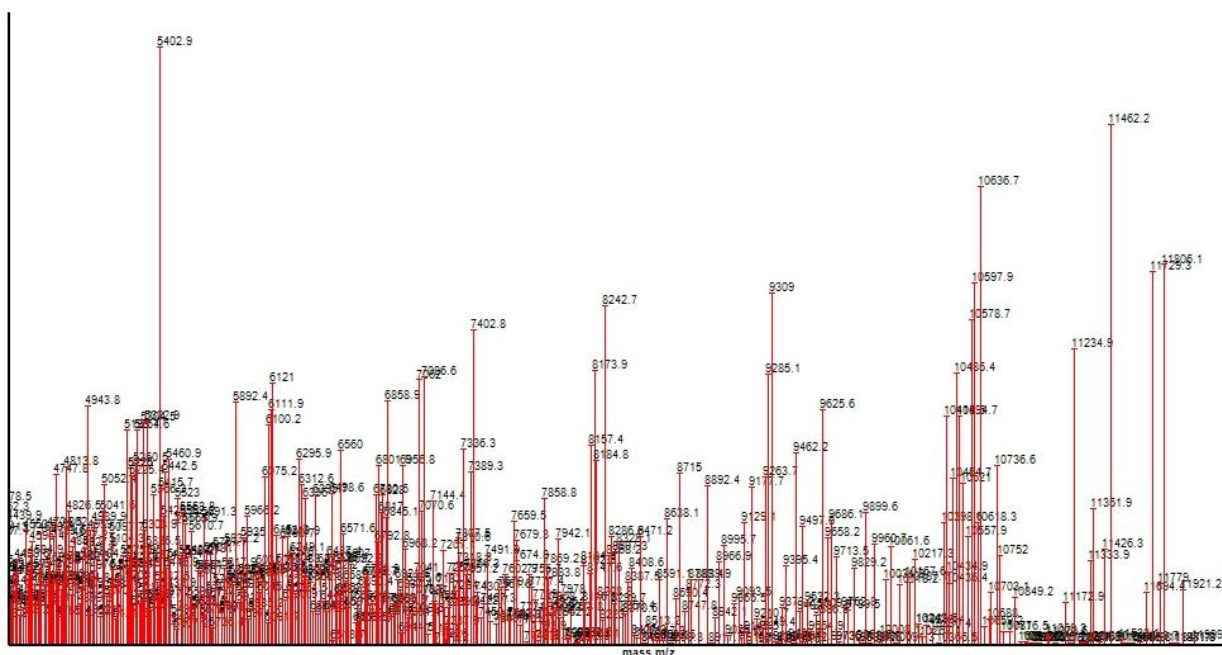


Рисунок 16. Совокупность исходных масс-пиков MALDI-TOF спектрограмм штаммов рода *Coccidioides*. Высота линий пропорциональна интенсивности масс-пиков в соответствующих точках на спектре.

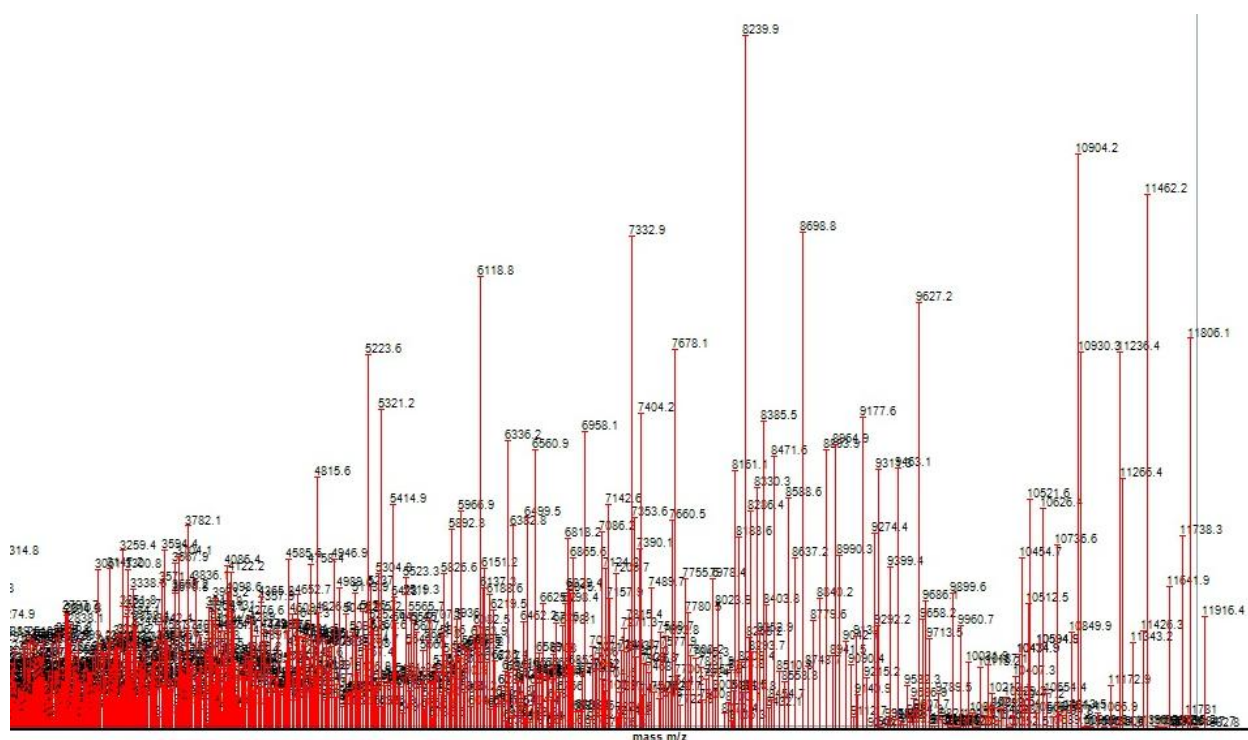


Рисунок 17. Совокупность масс-пиков штаммов вида *Coccidioides immitis*. Высота линий на рисунке пропорциональна интенсивности масс-пиков в соответствующих точках на спектре.

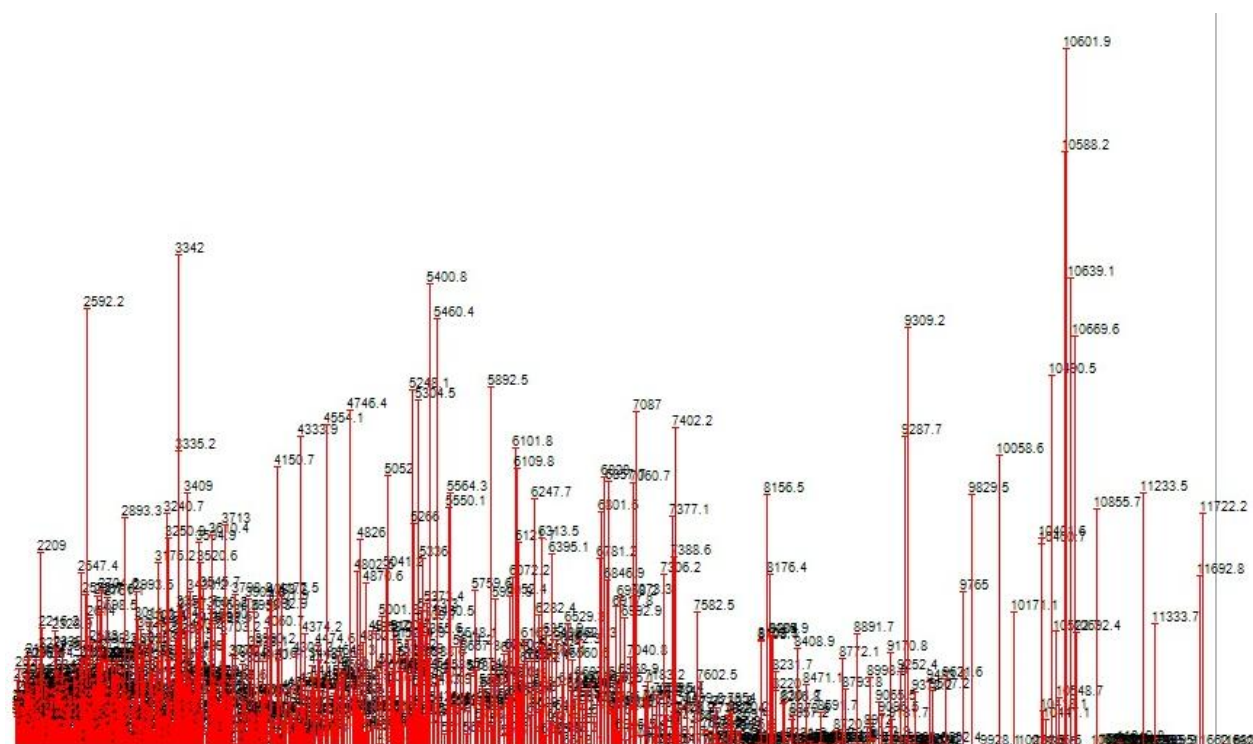


Рис. 18. Совокупность масс-пиков штаммов вида *Coccidioides posadasii*. Высота линий на рисунке пропорциональна интенсивности масс-пиков в соответствующих точках на спектре.

Одной из конечных целей проводимой работы было дополнение существующей базы данных SARAMIS характеристическими масс-спектрами микромицетов рода *Coccidioides*.

После предварительных этапов культивирования, пробоподготовки, и регистрации масс-спектров, в рабочем пространстве программы был создан их каталог, соответствующий штаммам двух видов: *Coccidioides immitis* (11 спектров) и *Coccidioides posadasii* (15 спектров). На первом этапе сбора данных в сумме было получено порядка 190 индивидуальных масс-спектров, различающихся по качеству и составу масс-пиков, часть из которых затем группировали для получения видовых, и родового масс-спектров.

Из них было отобрано 130 масс-спектров, соответствующих 26 используемым штаммам *Coccidioides*. Далее эти масс-спектры были преобразованы в общий массив, содержащий координаты всех масс-пиков всех штаммов (Рис 19). С помощью инструментов программы были отсеяны значения, встречающиеся менее чем в половине масс-спектров обоих видов. Аналогичная работа была проделана с массивами масс-пиков 15 штаммов *C. immitis* и 11 штаммов *C. posadasii*.

После пост-обработки массивов всех идентифицированных масс-пиков, на следующем этапе были рассчитаны и созданы «суперспектры» каждого вида, а также родовой «суперспектр». Для формирования каждого из видовых суперспектров объединяли по 20 индивидуальных масс-спектров. Родовой суперспектр был получен объединением 40 отдельных масс-спектров.

В результате, из полученных масс-спектров был сформирован раздел базы данных SARAMIS, позволяющий проводить идентификацию и хемотипирование возбудителей кокцидиоидомикоза. Отдельные масс-спектры штаммов, родовой и видовые суперспектры были помещены в вид *Coccidioides*, порядок *Onygenales*, класс *Eurotiomycetes*, отдел *Ascomycota*, царство *Fungi*, домен *Eucariota* (рис. 19).

Все процедуры анализа проводили с помощью собственной экспертной системы на основе базы масс-спектрограмм интактных микроорганизмов SARAMIS (Premium v.3.62), а также open source программного обеспечения Mmass v. 5.5 (<http://www.mmass.org/>). В процессе сопоставления всех полученных масс-спектров для моделирования общего для *Coccidioides* spp. суперспектра, выявлено несколько областей значений m/z , содержащих общие пики, соответствующие мажорным белкам. Следует отметить, что расчетные общие пики не всегда соответствовали пикам, наблюдаемым визуально. Вычисление пиков производили на основании данных программного комплекса SARAMIS. Формирование каталога консервативных протеинов штаммов *Coccidioides* spp. проводилось в три этапа.

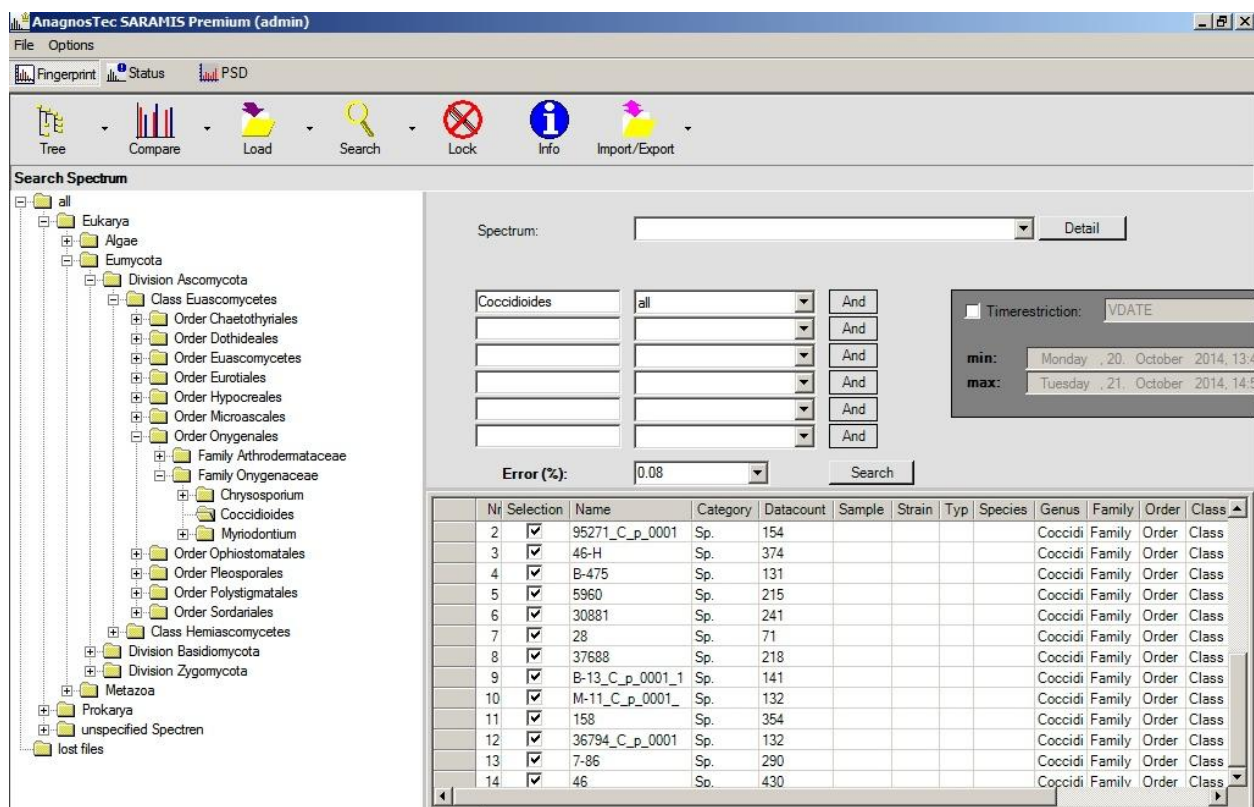


Рисунок 19. Сформированный раздел по исследуемым видам *Coccidioides* в базе данных SARAMIS™ согласно их таксономическому положению.

На первом этапе происходило накопление масс-спектров исследуемых штаммов обоих видов микромицета. Культуры выращивали на различных питательных средах, и при различных условиях роста (культивирования). Единственным обязательным во всех случаях критерием (условием), был недельный возраст культуры (± 1 сут. в отдельных случаях). Всего было получено более 190 различных масс-спектров. Из них наиболее качественные по критериям интенсивности и ширины пиков, а также величины шумовых компонентов, отбирались для следующего этапа.

Вторым этапом был статистический анализ файловых массивов выбранных штаммов. С этой целью, масс-спектры импортировались в рабочее пространство комплекса SARAMIS для предварительной обработки. В целом на втором этапе было отобрано около 30 масс-спектров (после нескольких стадий отсеивания), демонстрировавших достаточно качественную и репрезентативную картину распределения пиков. Статистическая обработка с целью поиска общих

мажорных протеинов производилась по алгоритму сравнения картины пиков всех штаммов друг с другом с последующим выводом картины распределения пиков в зависимости от частоты совпадения.

На третьем этапе, общие для большинства штаммов пики, объединяли в коллективные для видов *C. immitis*, *C. posadasii*, и рода *Coccidioides* «суперспектры». Суперспектры представляют собой статистически рассчитанные *in silico* аналоги масс-спектров, составленные из характерных для представителей той, или иной таксономической единицы пиков. Наиболее часто в базах данных встречаются суперспектры видов и родов, включающие видо-, и родоспецифичные масс-пики, соответственно.

В дальнейшем, каждый из индивидуальных масс-спектров исследуемых штаммов *Coccidioides* spp. был сопоставлен в режиме «Идентификация» с полной базой данных характеристических масс-спектров SARAMIS™ (7500 видов бактерий и микроскопических грибов). Результатом такого сопоставления была генерация ранжированного списка видов микроорганизмов, имеющих максимальные показатели соответствия (score value) между нормализованными значениями индивидуальных масс-спектральных пиков и массами ионов тестируемого спектра. Показатели 'score' при этом, несут обобщенную и выраженную логарифмически информацию о количестве совпадений в массах индивидуальных пиков спектров, степени отклонения массы индивидуального пика тестируемого спектра от усредненного значения «референтного» показателя, а также частоте встречаемости (воспроизводимости) конкретного спектрального пика в референтной группе спектров. Пороговые значения 'score' для определения принадлежности тестируемого масс-спектра к конкретному роду и виду микроорганизмов определены производителем аналитического программного обеспечения (Anagnostec GmbH) как превышающие 2.0 в большинстве случаев. В данном случае показатель 'score' выражается в процентах. Показатели достоверности идентификации коллекционных штаммов *Coccidioides* spp. с помощью сгенерированных суперспектров варьировались от 74

до 95 %. Наиболее высокий процент совпадений, как и ожидалось, был с родовым спектром (≥ 90 %) (Рис. 20).

	Name	Masses	Matches (%)	Genus	Family	Order	Class	Phylum
►	441	648	91.8	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eusaco	Division Asco
	46	430	95.4	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eusaco	Division Asco
	30889	478	91.9	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eusaco	Division Asco
	46-P	479	95.8	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eusaco	Division Asco
	36-S	408	91.6	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eusaco	Division Asco
	A-1	382	91.2	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eusaco	Division Asco
	30881	241	97.3	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eusaco	Division Asco
	158	354	90.3	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eusaco	Division Asco
	24	292	94.3	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eusaco	Division Asco
	333	281	94.9	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eusaco	Division Asco
	46-H	374	90.7	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eusaco	Division Asco
	34	308	90.4	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eusaco	Division Asco
	37688	218	90.7	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eusaco	Division Asco
	4	246	94.4	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eusaco	Division Asco
	7-86	290	95	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eusaco	Division Asco
	442	240	90.6	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eusaco	Division Asco
	5960	215	90.5	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eusaco	Division Asco
	22	362	94.7	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eusaco	Division Asco
	51	451	95.2	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eusaco	Division Asco
	B-13	341	90.5	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eusaco	Division Asco
	C-5	201	90.4	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eusaco	Division Asco
	M-11	232	94.2	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eusaco	Division Asco
	36794	232	90.5	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eusaco	Division Asco
	B-475	331	99.8	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eusaco	Division Asco
	95271	254	94.3	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eusaco	Division Asco
	28	314	92.5	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eusaco	Division Asco

Рисунок 20. Процентный показатель совпадения масс-спектров исследованных штаммов *Coccidioides* spp. с родовым суперспектром.

В таблицах 5 и 6 приведены результаты масс-спектрометрической идентификации штаммов *Coccidioides* до вида.

Из двух видов, штаммы *C. posadasii* идентифицировались с большей степенью достоверности, вероятно, из-за большей количественной доли масс-спектров этого вида во всех суперспектрах.

Таблица 5.

Процентный показатель совпадения масс-спектров *Coccidioides posadasii* с сформированным видовым суперспектром

Название штамма	Достоверность идентификации (%)
A-1	92,2
M-11	96,9
B-13	88,2
22	89,7
24	98,8
51	98,4
7/86	90,5
442	90,6
B-475	90,8
27567	96,5
37686	90,8
95271	94,8
30883	95,6
36-S	93,2
36794	94,5

Таблица 6.

Процентный показатель совпадения масс-спектров *Coccidioides immitis* с сформированным видовым суперспектром

Название штамма	Достоверность идентификации (%)
441	76,4
46	75,4

46-P	81,8
30881	81,3
158	80,9
333	75,2
46-H	78,9
34	84,4
4	77
5960	90,9
C-5	78,4

Следует отметить, что удаление из общего первичного массива масс-спектров наиболее (в районах 5000, 10000, 11000 m/z), или наименее интенсивных (в интервале 3000-5000 m/z), лишь незначительно снижало достоверность идентификации. Это может свидетельствовать о том, что доля масс-пиков со средней интенсивностью преобладает над высоко- и низкоинтенсивными пиками, и именно среднеинтенсивные пики служат основой для сравнения с базой данных, по крайней мере в случае с SARAMIS. Такие данные согласуются с результатами аналогичных исследований других микромицетов (например, *Fusarium spp.*) [Marinach-Patrice C., Fekkar A., Atanasova R. et al, 2010].

4.5 Анализ возможности использования масс-спектрометрического профилирования штаммов *Coccidioides spp.* для внутривидового типирования возбудителей

В данном разделе работы была исследована применимость MALDI-TOF масс-спектрометрии клеточных белков штаммов различных видов *Coccidioides* для внутривидового типирования изолятов микромицетов. С этой целью была

определена задача оценки межштаммовой вариабельности тех или иных регионов масс-спектров и частот встречаемости различных групп масс-пиков у анализируемых штаммов.

С помощью программы mMass (v.5.5.0) был проведен анализ наиболее типичных масс-спектров штаммов *C. immitis* и *C. posadasii*. Для этого исходные данные были переведены в формат msData, используя программное обеспечение SARAMIS. Далее, в рабочем поле mMass создавали подгруппы, включающие в себя масс-спектры видов *C. immitis*, *C. posadasii*, а также совокупные родовые масс-спектры. После чего сравнивали соответствие положения масс-пиков заданной интенсивности среди выделенных групп.

Анализ группы штаммов *C. immitis* позволил выявить 9 основных областей, в которых группировались пики средней интенсивности, с близким показателем m/z (рис. 21). Большая часть этих областей располагалась в диапазоне 1000-4000 m/z (1224, 1520, 1985, 3101, 3814), а остальные - в районе 7000-9000 m/z (7055, 7484, 7751, 8964). В этих областях масс-спектров у 8 - 11 штаммов (88-100 %) располагались пики с показателем относительной интенсивности 15-50%, и разбросом $m/z \pm 2$.

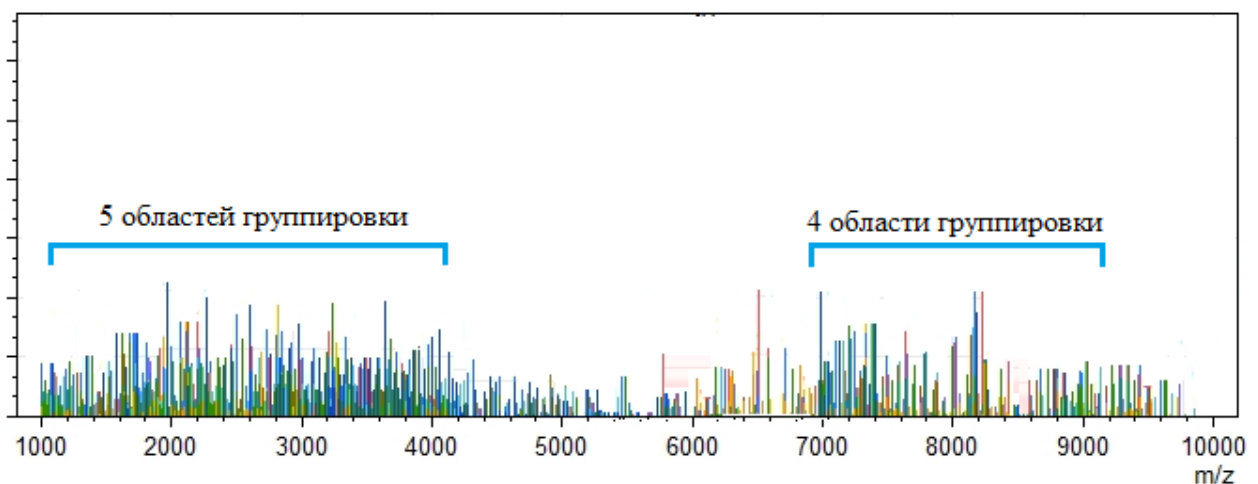


Рис. 21. Анализируемая совокупность масс-спектров штаммов *C. immitis*.

При анализе масс-спектров группы штаммов *C. posadasii* было выявлено 12 областей группирования, 8 из которых были расположены на участке от 6000 до 9000 m/z (6647, 6860, 7077, 7390, 7724, 8177, 8359, 8760), и 4 - на участке 1000-

4000 m/z (1759, 2324, 2958, 3302) (рис. 22). Находящиеся в этих зонах масс-пики обнаруживались у 10-13 штаммов (73-84 %).

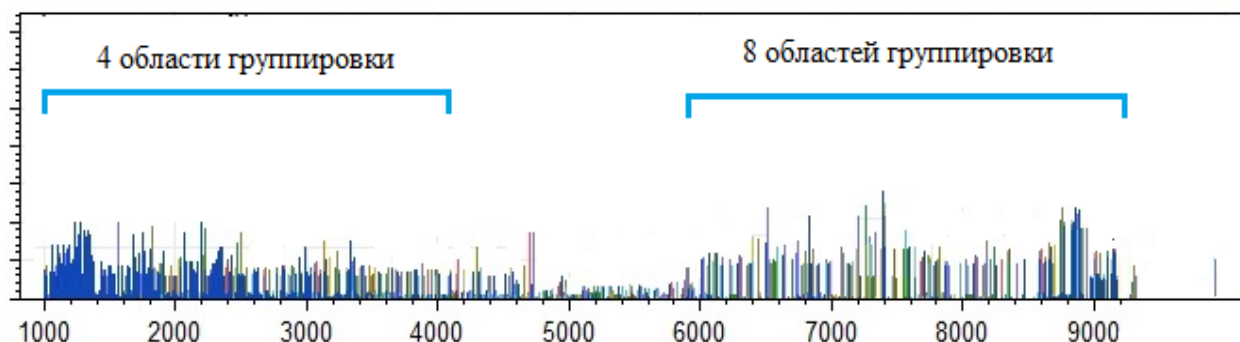


Рис. 22 Анализируемая совокупность масс-спектров *C.posadasii*

Сопоставление, таким образом, масс-спектров всех 26 штаммов демонстрирует наличие как минимум 15 областей группирования масс-пигов на всем диапазоне измерения от 1000 до 9000 m/z , с координатами, близкими к вышеперечисленным группам обоих видов. Отмечено, что при взаимном сравнении штаммов *Coccidoides* spp., количество групп схожих масс-пигов увеличивается, а число штаммов, составляющих эти группы уменьшается. На данный момент, однако, нет возможности определить, всегда ли пропорциональны эти изменения. Кроме того, были обнаружены группы масс-пигов, расположенные в определенных диапазонах m/z (выделены выше жирным шрифтом) со значительно более широкими границами, по сравнению с прочими, а также большим количеством входящих в их состав масс-пигов. Так, например, в группе 2324 m/z в выборке *C. posadasii* находится по несколько масс-пигов от 10 различных штаммов (2-4 от каждого штамма, с разбросом до 7 m/z).

Увеличение разброса m/z вело к росту областей группирования схожих масс-пигов, однако дальнейшее превышение допустимого порога погрешности не представлялось целесообразным. В целом можно сказать, что результаты анализа масс-спектров программным обеспечением mMass давали во многом сходную картину с результатами кластерного анализа, выполненного средствами SARAMIS. Основным моментом было то, что в отличие от SARAMIS, работа в

mMass проводилась не на сгенерированных «суперспектрах», а на отдельных, хотя и наиболее типичных масс-спектрах. Проведенный анализ также демонстрирует, что несмотря на наличие воспроизводимых и интенсивных масс-пиков, отмечаемых на спектрограмме визуально, низко- и среднеинтенсивные пики вносят значительный вклад в картину взаимного распределения штаммов при кластерном анализе.

В целом, по нашему мнению, полученные результаты являются достаточно убедительным подтверждением возможности использования масс-спектрометрического профилирования для оценки межштаммового сходства/различия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Кокцидиоидомикоз, гистоплазмоз, бластомикоз, и паракокцидиоидомикоз относятся к группе легочных инфекций, вызываемых двухфазными микромицетами, эндемичными для почв Северной и Южной Америки, Африки, некоторых регионов Юго-Восточной Азии и Индии. Споры, а также фрагменты мицелия, попадая в организм при ингаляции, вызывают локальную или генерализованную инфекцию, характеризующуюся, главным образом, поражениями легочной ткани, что на фоне иммунодефицита, может привести к острой форме пневмонии.

К микромицетам II группы патогенности относятся *Histoplasma capsulatum* (вызывает гистоплазмоз), *Coccidioides immitis* и *Coccidioides posadasii* (кокцидиоидомикоз), *Blastomyces dermatitidis* (бластомикоз), *Paracoccidioides brasiliensis* (паракокцидиоидомикоз). При этом их наиболее типичными и опасными представителям являются *Coccidioides immitis* и *Coccidioides posadasii*. Актуальность проблемы кокцидиоидомикоза за последние десятилетия выросла не только для традиционно эндемичных регионов Северной Америки, но и для стран, где заболевание ранее не регистрировалось. Основные причины, вызывающие обеспокоенность эпидемиологов, это развитие туризма в эндемичные области, повышение экспорта различных пищевых растительных продуктов, а также вероятность использования возбудителей кокцидиоидомикоза в качестве агентов биотерроризма. Помимо этого, для *Coccidioides* spp. характерна достаточно высокая степень резистентности к многим химиотерапевтическим препаратам.

В связи с этим, важным вопросом микробиологии и эпидемиологии кокцидиоидомикоза, становится возможность быстрой и достоверной идентификации возбудителя. В настоящее время очень эффективным и надежным средством экспресс-идентификации и белкового профилирования показал себя метод времяпролетной масс-спектрометрии, с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS). Метод хорошо зарекомендовал себя

при изучении возможностей сравнительной идентификации различных клинически значимых микромицетов, как мицелиальных, так и дрожжевых (*Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus* spp.) [Alanio A., Beretti J., Dauphin B. et al, 2015, De Carolis E., Vaccaro L. et al, , Ferroni A., Suarez S., Beretti J. et al, 2010, Erhard M., Hipler U., Burmester A. et al, 2008]. По точности и скорости этот метод сравним с молекулярно-генетическими, при этом являясь более простым и экономически выгодным.

Большое число исследований, посвященных использованию метода MALDI-TOF MS для идентификации медицински значимых микромицетов [Rosevinge F., Dzajic E., Knudsen E, et al. 2013, Sendid B., Ducoroy P., François N. et al, 2013, Sitterle E., Giraud S., Leto J. et al, 2014, Stevenson L., Drake S., Shea Y. et al, 2010, Zancopé-Oliveira R., Oliveira M., Santos C. et al, 2015] стало возможным, в том числе, и благодаря тому, что коммерчески доступные базы данных референтных масс-спектров микроорганизмов (SARAMIS™, Bruker Biotyper и др.) включают достаточно репрезентативные наборы масс-спектров консервативных протеинов различных видов микроскопических грибов. Вместе с тем, существенным недостатком коммерческих идентификационных баз является практически полное отсутствие в них масс-спектров диморфных грибов, таких как *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides* spp., *Paracoccidioides brasiliensis*, *Sporothrix* spp.

В рамках данной работы, с целью построения алгоритма экспресс-идентификации и хемотипирования видов *Coccidioides* на основе сравнительного анализа MALDI-TOF масс-спектров консервативных клеточных белков, был разработан комплекс методических приемов пробоподготовки клеток *Coccidioides* spp., сочетающий обеззараживание и выделение белковых компонентов для исследования методом MALDI-TOF масс-спектрометрии, получен репрезентативный набор характеристических масс-спектров коллекционных штаммов *Coccidioides* spp. и сформирован раздел, дополняющий электронную базу данных SARAMIS™ масс-спектрами для идентификации и белкового профилирования штаммов *Coccidioides* spp.

Этап отработки оптимальной технологии пробоподготовки клеток патогенных микромицетов для MALDI-TOF анализа являлся наиболее сложным и длительным. При масс-спектрометрическом исследовании большинства клинически значимых микромицетов этап пробоподготовки представляет собой непосредственно процедуру экстракции протеинов из нативного материала в процессе подготовки мишени для масс-спектрометра [Nenoff P., Erhard M., Simon J. et al, 2013]. Возбудители кокцидиоидомикоза относятся к агентам II группы патогенности, и, следовательно, вся работа с ними должна соответствовать требованиям СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности). Таким образом, процедура экстракции белковых компонентов из клеток требовала проведения предварительного обеззараживания исследуемой культуры микромицетов. Основной задачей данного этапа работы был выбор варианта пробоподготовки, обеспечивающего как надежное обеззараживание исследуемого материала, так и высокое качество и воспроизводимость получаемых клеточных масс-спектров *Coccidioides* spp.

Качество и воспроизводимость масс-спектров препаратов клеток *Coccidioides*, полученных с применением стандартного протокола обеззараживания 0.5 % раствором мертиолята натрия, регламентированного в отношении возбудителей особо опасных микозов действующими СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности), оказались неудовлетворительными. На всех полученных спектрах отмечалась лишь группа слабо дифференцируемых друг от друга пиков средней и низкой интенсивности в диапазоне масс 3-4 kDa. Очевидно, что использование непосредственно обрабатываемой раствором матрицы стерилизованной клеточной массы не обеспечивало необходимой степени экстракции белковых компонентов клеточной стенки микромицетов.

Использование метода пробоподготовки образцов для масс-спектрометрии, основанного на предварительной экстракции клеточных белков 80 % трифторуксусной кислотой и рекомендованного ранее для спорообразующих микроорганизмов [Lasch P., Nattermann H., Erhard M. et al, 2008], обеспечивало

высокую эффективность обеззараживания аналита, вместе с тем, масс-спектры препаратов, полученных данным образом, характеризовались лишь единичными выраженными спектральными пиками на фоне достаточно интенсивного шумового сигнала. Вполне вероятно, что 80 % ТФК вызывает деструкцию части протеинов, что приводит к образованию значительного числа многозарядных фрагментов с низкой интенсивностью; немногочисленные хорошо выраженные пики масс-спектра соответствуют «мажорным белкам» - протеинам, содержащихся в клетке в больших количествах.

Метод экстракции протеинов микромицетов ацетонитрилом и муравьиной кислотой после предварительной обработки этанолом, ранее показавший себя эффективным приемом пробоподготовки для масс-спектрометрического профилирования *Candida* spp. и *Cryptococcus* spp. [Pinto A., Halliday C., Zahra M. et al, 2011, Posteraro B., Fiori B. et al, 2012], при использовании для анализа штаммов исследуемых видов *Coccidioides* обеспечивал большее количество интенсивных изолированных спектральных пиков при меньшей интенсивности шумовых сигналов, в сравнении с вышеописанными вариантами подготовки препаратов. Однако, с использованием данного варианта пробоподготовки также не удалось добиться приемлемой воспроизводимости получения масс-спектров.

Взяв данный метод пробоподготовки за основу, в дальнейшей работе мы несколько модифицировали технологическую процедуру, заменив муравьиную кислоту на трифторуксусную и введя дополнительные этапы механической дезинтеграции клеточного материала с использованием стеклянных бус и прогреванием образцов. Применение данной модифицированной методики позволило добиться заметного улучшения качества спектров в сравнении с исходным протоколом, существенно снизив уровень шумового сигнала и увеличив количество и четкость спектральных пиков. Контроль специфической стерильности образцов, подготовленных по модифицированному протоколу, продемонстрировал их безопасность для дальнейших манипуляций.

Влияние условий культивирования исследуемых видов на воспроизводимость их клеточных масс-спектров, было оценено путем

сравнительного анализа масс-спектров препаратов белковых экстрактов, полученных из культур, выращенных на ряде рекомендованных для микромицетов питательных сред в течении различных сроков.

Оптимальным для получения воспроизводимых масс-спектров было определено культивирование клеток штаммов в течение 7-10 суток при 27°C. Что касается оптимальной плотной питательной среды выращивания культур штаммов для последующего масс-спектрометрического анализа, то наилучшие результаты были достигнуты с использованием плотной среды Сабуро – масс-спектры клеток, выращенных в данных условиях, характеризовались наиболее высокой стабильностью (девиации координат наиболее интенсивных пиков не более 0.3 кДа, колебания соотношения s/n не более 20 единиц), количеством и распределением индивидуальных спектральных пиков.

В используемой в работе идентификационной базе данных клеточных масс-спектров видов бактерий и микромицетов SARAMIS v. 3.62 (Anagnostec GmbH) не представлены референтные масс-спектры возбудителей особо опасных микозов, в том числе возбудителя кокцидиоидомикоза. Одной из задач настоящего исследования было формирование соответствующего подраздела идентификационной базы данных (на уровне семейства *Onygenaceae*), содержащего масс-спектры штаммов исследуемых микроорганизмов, а также генерация родового и видового «суперспектров», используемых в качестве референтных при идентификации и белковом профилировании штаммов микромицетов.

Для формирования соответствующих наборов клеточных масс-спектров были использованы 26 коллекционных штаммов *C. immitis* и *C. posadasii*. Полученные масс-спектры штаммов исследуемых видов *Coccidioides* характеризовались выраженной вариабельностью, что отмечалось ранее в отношении масс-спектральных характеристик и других видов микормицетов [Chen H., Chen Y., 2005, Clark E., Kaleta E., Arora A. et al, 2013]. Было обозначено несколько диапазонов m/z масс-спектров, в которых чаще всего группировались наиболее интенсивные пики. Превалирующими по частоте встречаемости

спектральных пиков со значениями $s/n > 30$ были области спектров 6000 - 10000 m/z и 4000 - 6000 m/z , при этом наблюдалась лишь незначительная девиация координат абсолютных величин (s/n) наиболее интенсивных пиков. В целом, показатель взаимного сходства полученных масс-спектров варьировал в пределах 60 – 70 %, что свидетельствовало о существенном как межвидовом, так и внутривидовом полиморфизме белковых компонентов клеток микромицетов рода *Coccidioides*.

Первично было получено порядка 190 индивидуальных масс-спектров, различающихся по качеству и составу масс-пиков, часть из которых затем группировали для получения видовых и родового масс-спектров. Отобранные 26 масс-спектров, соответствующих исследуемым штаммам *C. immitis* и *C. posadasii*, были преобразованы в общий массив, из которого с помощью программного инструментария были отсеяны значения, встречающиеся менее чем в половине масс-спектров обоих видов. Аналогичная работа была проделана с массивами масс-пиков в отдельности 15 штаммов *C. immitis* и 11 штаммов *C. posadasii*. Данная пост-обработка массивов всех идентифицированных масс-пиков позволила сформировать «суперспектры» каждого вида, а также родовой «суперспектр», при этом каждый из видовых «суперспектров» объединял по 20 индивидуальных масс-спектров, а «суперспектр» рода был получен объединением 40 отдельных масс-спектров. Результатом проведенной работы стало формирование отдельного раздела базы данных масс-спектров SARAMIS™ - виды *Coccidioides*, порядок *Onygenales*, класс *Eurotiomycetes*, отдел *Ascomycota*, царство *Fungi*, домен *Eucariota*.

Дальнейшее сопоставление в режиме «Идентификация» каждого из индивидуальных масс-спектров исследуемых штаммов *Coccidioides* spp. с полной базой данных характеристических масс-спектров SARAMIS™ v. 3.62 (7500 видов бактерий и микроскопических грибов) продемонстрировали приемлемый уровень видовой идентификации, с достоверностью в диапазоне 74 - 95 %.

Из двух исследуемых видов возбудителей кокцидиоидомикоза, видовой идентификация штаммов *C. posadasii* характеризовалась большей степенью

достоверности, что, очевидно, следует рассматривать как результат большей количественной доли масс-спектров этого вида в сгенерированных «суперспектрах». Отметим также, что элиминация из суммарного первичного массива пиков масс-спектров наиболее (в области 5000, 10000, 11000 m/z), или наименее интенсивных (в диапазоне 3000 - 5000 m/z) незначительно сказывалось на показателе достоверности идентификации. Очевидно, что доля среднеинтенсивных спектральных пиков является преобладающей, и именно среднеинтенсивные пики служат основными элементами сравнения с идентификационной базой данных.

Оценка межштаммовой вариабельности различных регионов масс-спектров и частот встречаемости групп масс-пиков у анализируемых штаммов, проведенная с использованием программы Mmass показала, что имеет место быть как минимум 15 областей группирования масс-пиков на всем диапазоне измерения от 1000 до 9000 m/z , с различной частотой встречаемости групп масс-пиков у различных штаммов. Обнаружены также группы масс-пиков, расположенные в определенных диапазонах m/z со значительно более широкими по сравнению с прочими группами границами, а также с большим количеством входящих в их состав масс-пиков. Так, в группе 2324 m/z в выборке *C. posadasii* находится по несколько масс-пиков от 10 различных штаммов (2-4 от каждого штамма, с разбросом до 7 m/z).

Отметим, что результаты анализа масс-спектров с использованием инструментария mMass давали во многом сходную картину с результатами кластерного анализа, выполненного средствами SARAMIS. С учетом того, что в отличие от SARAMIS, работа в mMass проводилась не на сгенерированных «суперспектрах», а на отдельных наиболее типичных масс-спектрах, полученные результаты можно рассматривать как достаточно убедительное подтверждение возможности применимости масс-спектрометрического профилирования для оценки межштаммового сходства/различия.

Таким образом, в результате проведенных исследований нами был предложен метод пробоподготовки клеток *Coccidioides* spp. для MALDI-TOF

масс-спектрометрии, получен воспроизводимый набор специфичных масс-спектров коллекционных штаммов *Coccidioides*, исследовано влияние условий культивирования возбудителя кокцидиоидомикоза на воспроизводимость его масс-спектрометрических характеристик. В качестве дополнения к базе данных SARAMIS, был разработан собственный раздел электронной базы данных MALDI-TOF спектров для идентификации и типирования изолятов *Coccidioides* spp., с использованием которого была показана возможность проведения видовой идентификации каждого из имеющихся штаммов видов *Coccidioides*.

Полученные в ходе выполнения работы результаты были использованы при разработке методических рекомендаций МР 4.2.0089-14 «Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) для индикации и идентификации возбудителей I - II групп патогенности» (утверждены Руководителем Роспотребнадзора 24.04.2014), проекта методических рекомендаций «Создание баз данных референсных масс-спектров возбудителей I-II групп патогенности для проведения автоматической идентификации микроорганизмов методом масс-спектрометрии» (представлены к утверждению в Роспотребнадзор), а также при формировании единой базы данных «Белковые профили масс-спектров микроорганизмов I-II групп патогенности для программы MALDI Biotyper», представленной к государственной регистрации в 2014 г. в Федеральную службу по интеллектуальной собственности.

Выявленные особенности консервативных и вариабельных областей клеточных масс-спектров штаммов *Coccidioides* spp. могут также быть использованы в качестве дополнительных маркеров при молекулярной паспортизации штаммов особо опасных микроспоридий и совершенствования на ее основе схем молекулярного типирования возбудителей особо опасных инфекционных болезней на базе Референс-центров по мониторингу за возбудителями опасных инфекционных болезней и Национальных центров верификации диагностической деятельности.

ВЫВОДЫ

1. Разработан комплекс методических приемов пробоподготовки клеток возбудителя кокцидиоидомикоза для MALDI-TOF масс-спектрометрии. Установлено, что наиболее эффективным методом пробоподготовки, обеспечивающим как обеззараживание, так и эффективную экстракцию белковых компонентов, является обработка раствором трифторуксусной кислоты и ацетонитрилом в сочетании с интенсивным механическим воздействием на мицелий микромицетов.
2. Исследовано влияние условий культивирования микромицетов на воспроизводимость масс-спектрометрических характеристик. Определено, что оптимальной схемой культивирования *Coccidioides* spp., обеспечивающей достаточный уровень воспроизводимости и высокие качественные характеристики клеточного масс-спектра (отклонения координат наиболее интенсивных пиков не более 0.3 кДа, колебания соотношения s/n не более 20 единиц) является выращивание клеток микромицетов в течение 7 ± 2 суток при 27°C на плотной питательной среде Сабуро.
3. Установлено, что диапазоны масс-спектров 6000 - 10000 m/z и 4000 - 6000 m/z являются превалирующими по частоте встречаемости спектральных пиков со значениями s/n > 30 и характеризуются стабильным компонентным составом. В целом, показатели взаимного сходства масс-спектров штаммов видов *Coccidioides* варьируют в пределах 60 – 70 %, что свидетельствует о существенном как межвидовом, так и внутривидовом полиморфизме белковых компонентов клеток микромицетов рода *Coccidioides*.
4. На основе анализа родо- видо- и штаммоспецифических компонентов масс-спектров консервативных клеточных протеинов 11 коллекционных штаммов *C. immitis* и 15 коллекционных штаммов *C. posadasii* сформированы родовой и видовые референтные «суперспектры» исследуемых микромицетов, содержащие набор наиболее характерных и стабильно воспроизводимых спектральных пиков в анализируемом диапазоне молекулярных масс.

5. Разработан собственный раздел электронной базы данных референтных MALDI-TOF спектров SARAMIS™ (вид *Coccidioides*, порядок *Onygenales*, класс *Eurotiomycetes*, отдел *Ascomycota*, царство *Fungi*, домен *Eucariota*), позволяющий проводить видовую идентификацию штаммов видов *Coccidioides* с приемлемой достоверностью в диапазоне 74 - 95 %.
6. Выявленные особенности консервативных и переменных областей клеточных масс-спектров видов *Coccidioides* spp. могут быть использованы в качестве дополнительных маркеров при паспортизации и внутривидовом типировании штаммов особо опасных микромицетов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

МС, MS – масс-спектрометрия

кДа – килодальтон

MALDI – матрично-активированная лазерная десорбция-ионизация

TOF – времяпролетный

МЭЭ – мультилокусный энзимэлектрофорез

ЕТ – электрофоретические типы

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

SNP – однонуклеотидный полиморфизм

RAPD - случайно амплифицируемая полиморфная ДНК

AFLP - полиморфизм в сайтах рестрикции

МЛСТ – мультилокусное секвенс-типирование

ТФК – трифторуксусная кислота

MSP - основные спектры

UPGMA - метод невзвешенного попарного среднего

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Особо опасные микозы / под ред. В. В. Малеева. – В.: Волга-Паблицер, 2013. – 193 с.
2. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.3118-13 Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности) // Госсанэпиднадзор России. - М., 2014. – 150 с.
3. Abd-Elsalam K.A. PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data / K. Abd-Elsalam., I. Aly, M.A. Abdel-Satar // Afr. J. Biotechnol. – 2003.- Vol.2, №82.- P.5.
4. Aebersold R. A mass spectrometric journey into protein and proteome research / R.J. Aebersold // Am. Soc. Mass. Spectrom.- 2003.- Vol.14, №685.-P.93-95.
5. Alanio A. Cryptococcus where they are not expected: Five case reports of extra-cerebral and extra-pulmonary cryptococcosis / A. Alanio, A. Cazorla // Annales de Pathologie.- 2015.- DOI: 10.1016/j.annpat.2015.10.001.
6. Alanio A. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant *Aspergillus* species / A. Alanio, J.L. Beretti, B. Dauphin et al. // Clin. Microbiol. Infect. – 2011.- Vol.17, № 750.- P.3–5.
7. Amiri-Eliasi B. Characterization of protein biomarkers desorbed by MALDI from whole fungal cells // B. Amiri-Eliasi, C. Fenselau // Anal. Chem.- 2001.- Vol.73, №52.- P.28–31.
8. Amiri-Eliasi B. Characterization of Protein Biomarkers Desorbed by MALDI from Whole Fungal Cells / B. Amiri-Eliasi, C. Fenselau // Anal. Chem.- 2001.- Vol.73, №21.- P.5228–5231
9. Ampel N.M. New Perspectives on Coccidioidomycosis / N.M. Ampel // Proc. Am. Thorac. Soc. - 2010. - Vol 7, №9. – P. 181–185.
10. Andersen B. *Penicillium expansum*: consistent production of patulin, chaetoglobosins, and other secondary metabolites in culture and their natural occurrence in fruit products

- / B. Andersen, J. Smedsgaard, J.C. Frisvad // Food. Chem.- 2004.- Vol.52, № 24.- P.21–28.
11. Andersen B. Secondary metabolite profiling of *Alternaria dauci*, *A. porri*, *A. solani*, and *A. tomatophila* / B. Andersen, A. Dongo, B.M. Pryor // Mycol. Res.- 2008.- Vol.112, № 2.- P.41–50.
 12. Anstead G.M., Graybill J.R. Coccidioidomycosis // Infect. Dis. Clin. North. Am.-2006.- Vol.20.-P.621-643
 13. Arsura E.L. Coccidioidal pericarditis: a case presentation and review of the literature / E.L. Arsura, R.K. Bobba, C.M. Reddy // Int. J. Infect. Dis. - 2009. - Vol.9,№2. - P.104-109.
 14. Arsura E.L. Miliary coccidioidomycosis in the immunocompetent patients / E.L. Arsura, W.B. Kilgore // J. Chest – 2000. - Vol.117,№2. - P.404-409.
 15. Baddley J.W. Surgical treatment of multiple skull abscesses associated with coccidioidomycosis / J.W. Baddley, C.S., Cobbs, P.G. Pappas // J. Mycoses. - 2004. - Vol.47,№1-2. - P.69-71.
 16. Bader O. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of flight mass spectrometry / O. Bader, M. L. Weig, Taverne-Ghadwal et al. // Clin. Microbiol. Infect.- 2011.- № 17.- P.1359–1365.
 17. Bain J. Multilocus Sequence Typing of the Pathogenic Fungus *Aspergillus fumigates* / J. Bain, A. Tavanti // J. of Clin. Microbiol. –2007. – Vol. 45, №5. – P. 1469-1477.
 18. Balajee S.A. Sequence-based identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Mucorales* species in the clinical mycology laboratory: where are we and where should we go from here? / S.A. Balajee, A.M. Borman, M.E. Brandt et al. // J. Clin. Microbiol.- 2009.- Vol.47, №8.- P.77–84.
 19. 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.
 20. Bialek R. Amplification of coccidioidal DNA in clinical specimens by PCR / R. Bialek // J Clin Microbiol. – 2005. – Vol.43, №3. – P.1492.

21. Bialek R. Amplification of coccidioidal DNA in clinical specimens by PCR / J Clin Microbiol. – 2005. – Vol.43, №3. – P.1492
22. 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.
23. 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.
24. Bizzini A. Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Bacterial Strains Routinely Isolated in a Clinical Microbiology Laboratory / A. Bizzini, C. Durussel // J. of Med. Microbiol. – 2010. – Vol. 48, №5. – P. 1549-1554.
25. Blair J.E. Coccidioidomycosis in solid organ transplantation / J.E. Blair, J.L. Logan // Clin. Infect. Dis. - 2001. - Vol.33,№1. - P.1536-1544.
26. 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.
27. Brown J. Coccidioidomycosis: epidemiology / J. Brown, K. Benedict, B.J. Park, G.R. Thompson // Clinical Epidemiology. – 2013. - Vol. 5. – P. 185-197.
28. Brun S. Multilocus phylogeny and MALDI-TOF analysis of the plant pathogenic species *Alternaria dauci* and relatives / S. Brun, H. Madrid, B. Gerrits et al. // Fungal Biol.- 2013.- № 117.- P.32–40.
29. Burgess J. PCR-based detection of DNA from the human pathogen *Blastomyces dermatitidis* from natural soil samples / J. Burgess, W. Schwan // Med. Mycol. – 2006. – Vol. 4, №8. – P. 741-748.
30. Cannon P.F. Microfungi on wood and plant debris / P.F. Cannon, B.C. Sutton // Elsevier Academic Press Inc.- 2004.- P. 218–238.

31. 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.
32. 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
33. Carlile M.J. *The fungi*. 2nd ed / M.J. Carlile, G.W. Gooday, S.C. Watkinson. San Diego: Academic Press Ltd.- 2001.
34. Cassagne C. Mould routine identification in the clinical laboratory by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry / C. Cassagne, S. Ranque, A.C. Normand et al. // *PLoS One*.- 2011.-Vol.6.- P.24-25.
35. Caugant D. A., Epidemiological analysis of *Candida albicans* strains by multilocus enzyme electrophoresis / D. A. Caugant P. Sandven // *J. Clin. Microbiol.*- 1993.- Vol.31, №2.- P. 215–220.
36. Cazares L.H. MALDI tissue imaging: from biomarker discovery to clinical applications / L.H. Cazares, D.A., Troyer, B. Wang et al. // *Anal. Bioanal. Chem.*- 2011.- Vol.4, № 1.- P.17–27.
37. Centers for Disease Control and Prevention. Coccidioidomycosis among persons attending the world championship of model airplane flying. *Morb. Mortal. Wkly. Rep* – 2001. –Vol.50. - P.1106–1107.
38. Centers for Disease Control and Prevention. Increase in coccidioidomycosis—Arizona, 1998–2001. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* - 2003; –Vol.52.- P.109–112.
39. Chalupová J. Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry / J. Chalupová, M. Raus, M. Sedlářová // *Biotechnol. Adv.* 2013.- doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.002
40. Chalupová J. MALDI-based intact spore mass spectrometry of downy and powdery mildews / J. Chalupová, M. Sedlářová, M. Helmelt et al. // *J. Mass. Spectrom.*- 2012.- Vol.47, №9.- P.78–86.

41. Champer J. Proteomic Analysis of Pathogenic Fungi Reveals Highly Expressed Conserved Cell Wall Proteins / J. Champer, J.I. Ito, K.V. Clemons, D. A. Stevens, M. Kalkum // *Fungi*.- 2016.- Vol.2.№1.- P.4-6
42. 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.
43. Chen H.Y. Characterization of intact *Penicillium* spores by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry / H.Y. Chen, Y.C. Chen // *Commun. Mass. Spectrom.*- 2005.- Vol.19, № 356.- P.4–8.
44. Cherkaoui A. Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Methods with Conventional Phenotypic Identification for Routine Identification of Bacteria to the Species Level / A. Cherkaoui, J. Hibbs, S. Emonet et al. // *Journal of Clinical Microbiology*.- 2010.- Vol.48, №4.- P.1169-1175.
45. Chowfin A. Female genital coccidioidomycosis (FGC), Addison's disease and sigmoid loop abscess due to *Coccidioides immitis*; case report and review of literature on FGC. / A. Chowfin, R. Tight // *Mycopathologia*. - 1999.- Vol.145, №3. - P.121-126.
46. Chuang A. Disseminated coccidioidomycosis in an immunocompetent person living in New York City / A. Chuang, R. Thomas, R.S. Hoffman // *J. Urban. Health*. - 2005. - Vol.82,№2. - P.339-345.
47. Clark E.A. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology / E.A. Clark, E.J. Kaleta, A. Arora et al. // *Clin. Microbiol. Rev.*- 2013.- Vol.26.- P.547–603.
48. Cobo F. Application of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Virology: A Review / F. Cobo // *The Open Virology Journal*.- 2013.- Vol.7.- P. 84–90.
49. Coulibaly O. *Pseudallescheria/Scedosporium* complex species identification by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // O. Coulibaly, C. Marinach-Patrice, C. Cassagne et al. // *Med. Mycol.*- 2011.-Vol.49.- P.621-626.
50. De Carolis E. Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass

- spectrometry / E. De Carolis, B. Posteraro, C. Lass-Flörl et al. // Clin. Microbiol. Infect.- 2012.- Vol.18, №4.- P.75–84.
51. De Respinis S. Identification of dermatophytes by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry / S. De Respinis, M. Tonolla, S. Pranghofer et al. // Med. Mycol.- 2013.- Vol.51.- P.514–521.
 52. De Respinis S. MALDI-TOF MS of Trichoderma: a model system for the identification of microfungi / S. De Respinis, G. Vogel, C. Benagli et al. // Mycol. Prog.- 2010.- Vol.9.- P.79–100.
 53. Degenkolb T. The Trichoderma brevicompactum clade: a separate lineage with new species, new peptaibiotics, and mycotoxins // T. Degenkolb, R. Dieckmann, K.F. Nielsen et al. // Mycol. Prog.- 2008.- Vol.7.- P.177–219.
 54. Del Chierico F. MALDI-TOF MS proteomic phenotyping of filamentous and other fungi from clinical origin / F. Del Chierico, A. Masotti, M. Onoriet al. // J. Proteomics.- 2012.- Vol. 75.- P. 3314–3330.
 55. Dhiman N. Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast / N. Dhiman, L. Hall, S.L. Wohlfiel et al. // J. Clin. Microbiol.- 2011.- Vol.49, №161.- P.4–6.
 56. Dhiman N.. Performance and cost analysis of matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast / N. Dhiman, L. Hall, S.L. Wohlfiel, S.P. Buckwalter, N.L. Wengenack //J. Clin. Microbiol.- 2011.- Vol.49.- P. 1614–1616.
 57. DiCaudo D. J. Coccidioidomycosis: a review and update / D. J. DiCaudo // J. Am. Acad. Dermatol.- 2006.- Vol.55, №6.- P.29-42
 58. Domon B. Mass spectrometry and protein analysis / B. Domon, R. Aebersold // Science.- 2006.- Vol.312, № 212.– P.7.
 59. Dong H. Development of a MALDI two-layer volume sample preparation technique for analysis of colored conidia spores of *Fusarium* by MALDI linear TOF mass spectrometry / H. Dong, J. Kemptner, M. Marchetti-Deschmann et al. //Anal. Bioanal. Chem.- 2009.-Vol.395,№13.- P.73–83.

60. Doohan F. Fungal pathogens of plants / F. Doohan // Chichester: John Wiley.- 2005.- P. 219–50.
61. Dromer F. Production, characterization, and antibody specificity of a mouse monoclonal antibody reactive with *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide / F. Dromer, J. Salamero, A. Contrepois, C. Carbon, P. Yeni. // Infect Immun.- 1987.- Vol.55, №3).- P.2-8.
62. 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.
63. Ebanks R.O. Proteomic analysis of *Candida albicans* yeast and hyphal cell wall and associated proteins / R.O. Ebanks, K. Chisholm, S. Mckinnon et al. // Proteomics.- 2006.- Vol.6.- P.2147–2156
64. 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
65. Eraso M.D. Evaluation of the New Chromogenic Medium *Candida* ID 2 for Isolation and Identification of *Candida albicans* and Other Medically Important *Candida* Species Moragues / M.D Eraso // J. of Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44, № 9. – P. 3340-3345.
66. Erhard M. Identification of dermatophyte species causing onychomycosis and tinea pedis by MALDI-TOF mass spectrometry / M. Erhard, U.C Hipler, A. Burmester et al. // Exp. Dermatol.- 2008.- Vol.17, №3.- P.56–61.
67. Eulalio K.D. *Coccidioides immitis* isolated from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the state of Piaui, northeast Brazil / K.D. Eulalio, R.L. de Macedo, M.A Cavalcanti. et al. // Mycopathologia.– 2001. - Vol.149,№2. - P.57-61.

68. Fagerquist C.K. Rapid identification of protein biomarkers of *Escherichia coli* O157:H7 by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight-time-of-flight mass spectrometry and top-down proteomics / C.K. Fagerquist, B.R. Garbus, W.G. Miller, K.E. Williams et al. 2010 // *Anal. Chem.*- Vol.8, №2.- P.2717–2725.
69. Fenselau C. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry / C. Fenselau, P.A. Demirev // *Mass. Spectrom. Rev.*- 2001.- Vol.20№ 1.- P.57–71.
70. Ferreira L. Microorganisms direct identification from blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry / L. Ferreira, F. Sánchez-Juanes, I. Porras-Guerra et al. // *Clin. Microbiol. Infect.*- 2011.- Vol.1, №7.- P.46–51.
71. Ferroni A. Real-time identification of bacteria and *Candida* species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry / A. Ferroni, S. Suarez, J. Beretti et al. // *J. Clin. Microbiol.*- 2010.- Vol.48, №15.- P.2–8.
72. Firacative C. MALDI-TOF MS enables the rapid identification of the major molecular types within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species / C. Firacative, L. Trilles // *PLoS One.*- 2012.- 7:e37566.
73. Fisher M.C. A test for concordance between the multilocus genealogies of genes and microsatellites in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis* / M. Fisher, G.L. Koenig, T.J. White et al. // *Mol. Biol. Evol.*- 2000. - Vol.17. - P.1164-1174.
74. Fisher M.C. Biogeographic range expansion into South America by *Coccidioides immitis* mirrors New World patterns of human migration / M.C. Fisher, G.L. Koenig, T.J. White et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*- 2001.- Vol.98, №8.- P.4558-4562.
75. 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.
76. 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.

77. Fraser J.A. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak / J.A. Fraser, S.S. Giles, E.C. Wenink et al. // *Nature*. – 2005. – Vol. 437. – P. 1360-1364.
78. Fricker-Hidalgo H. Comparison of the new API Candida system to the ID 32C system for identification of clinically important yeast species / H. Fricker-Hidalgo, O. Vandapel, M. A. Duchesne, M. A. Mazoyer et al. // *J. Clin. Microbiol.* – 1996. – Vol.34, №7. – P.1846–1848.
79. 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.
80. Gielen S. Development of a selective medium for the determination of the spore concentrations of *Botrytis cinerea* in the air / S. Gielen, R. Aerts, B. Seels // *Commun. Agric. Appl. Biol .Sci.* – 2003. – Vol.68, №6. – P.85–93.
81. Havlicek V. Current trends in microbial diagnostics based on mass spectrometry / V. Havlicek, K. Lemr, K.A. // *Schug. Anal. Chem.* – 2013. – Vol.85. – P.7.
82. Hebeler-Barbosa F. Comparison of the sequences of the internal transcribed spacer regions and PbGP43 genes of *Paracoccidioides brasiliensis* from patients and armadillos (*Dasypus novemcinctus*) / F. Hebeler-Barbosa, F. Morais // *J. Clin. Microbiol.* – 2003. – Vol. 41, № 12. – P. 5735-5737.
83. 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.
84. Hettick J.M. Discrimination of *Aspergillus* isolates at the species and strain level by matrix-assisted laser desorption ionization time-of flight mass spectrometry fingerprinting / J.M. Hettick, B.J. Green, A.D. Buskirk, et al. // *Anal. Biochem.* – 2008. – №380. – P.276-281.
85. Hettick J.M. Discrimination of *Penicillium* isolates at the species and strain level by matrix-assisted laser desorption ionization time-of flight mass spectrometry

- fingerprinting / J.M.Hettick, B.J. Green, A.D. Buskirk et al. // *Rapid Commun. Mass. Sp.*- 2008.-Vol.22.- P.2555-2560
86. Hillenkamp F. MALDI MS : a practical guide to instrumentation, methods, and applications / F. Hillenkamp, J. Peter-Katalinic // Wiley-Blackwell.- 2013. ISBN: 978-3-527-33331-8
 87. Hirschmann J.V. The Early History of Coccidioidomycosis: 1892–1945 / J.V. Hirschmann // *Clin. Infect. Dis.* - 2007. - Vol.44. - P.1202–1207.
 88. Holbrook E. Definition of the Extracellular Proteome of Pathogenic-Phase *Histoplasma capsulatum* / E. Holbrook, J. Edwards // *J. Proteome Res.* – 2011. – № 10. – P. 1929-1943.
 89. Hong S.B. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species / S.B Hong, S.J. Goo, H.D. Shin et al. // *Mycologia*.- 2005.- Vol.97, № 13.- P.16–29.
 90. Horká M. Capillary and gel electromigration techniques and MALDI-TOF MS — suitable tools for identification of filamentous fungi /, A. Kubesová, J. Šalplachta et al. // *Anal. Chim. Acta*.- 2012.- №1.- P.55–62.
 91. Hung C. Y. A parasitic phase-specific adhesin of *Coccidioides immitis* contributes to the virulence of this respiratory fungal pathogen / C. Y. Hung, J. J. Yu, K. R. Seshan et al. // *Infect. Immun.* - 2002. – Vol. 70, №7. - P.3443–3456.
 92. 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.
 93. Hung, C. Y. A major cell surface antigen of *Coccidioides immitis* which elicits both humoral and cellular immune responses / C. Y. Hung, N. M. Ampel, L. Christian et al. // *Infect. Immun.* - 2000. – Vol. 68, №2.- P.584–593.
 94. Iriart X. Routine identification of medical fungi by MALDI-TOF: performance of the new VITEK MS using a new time-effective strategy / X. Iriart, R.A. Lavergne, J. Fillaux et al. // *J. Clin. Microbiol.*- 2012.- Vol. 50 №2.- P.7–10.
 95. 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.

96. Johnson S.M. Use of a recombinant *Coccidioides immitis* complement fixation antigen-chitinase in conventional serological assays / Johnson S.M. C.R. Zimmermann, D. Pappagaanis // J. Clin. Microbiol. - 1996. – Vol.34, №12.-P.3160-3164
97. Kallow W. *Aspergillus ibericus*: a new species of section Nigri characterised by MALDI-TOF MS / W. Kallow, I. Santos, M. Erhard et al. // 8th International Mycological Congress, Cairns, Australia (Proceedings Book). Pianoro (BO).- 2006.- P. 189–93.
98. Kallow W. MALDI-TOFMS and microbial identification: years of experimental development to an established protocol / W. Kallow, M. Erhard, H.N. Shah et al. // Chichester, UK: Wiley.- 2010.- P. 55–76.
99. 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.
100. Kemptner J. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) preparation techniques for surface characterization of intact *Fusarium* spores by MALDI linear time-of-flight mass spectrometry / J. Kemptner, M. Marchetti-Deschmann, R. Mach, et al. // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 2009/ - Vol.23/- P/877–884
101. 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.
102. Kostrzewa M. MALDI-TOF MS: an upcoming tool for rapid detection of antibiotic resistance in microorganisms / M. Kostrzewa, K. Sparbier, T. Maier, S. Schubert // Proteomics Clin. Appl.- 2013.- Vol.7, №11.- P.67-78.
103. Koufopanou V. Gene genealogies, cryptic species, and molecular evolution in the human pathogen *Coccidioides immitis* and relatives (Ascomycota, Onygenales) / V. Koufopanou, A. Burt, T. Szaro // Mol. Biol. Evol. – 2001. – Vol.18. – P. 1246-1258.
104. L'Ollivier C. A MALDI-TOF MS procedure for clinical dermatophyte species identification in the routine laboratory / C. L'Ollivier, C. Cassagne, A. Normand et al. // Med. Mycol.- 2013.- Vol.51.- P.713–720.

105. Lakshman D.K. Optimized protein extraction methods for proteomic analysis of *Rhizoctonia solani* / D.K. Lakshman, S.S. Natarajan, S. Lakshman, W.M. Garrett, A.K. Dhar // Mycologia.- 2008.- Vol.100, №6.- P.67-75.
106. Laniado-Laborín R. Coccidioidomycosis and other endemic mycoses in Mexico / R. Laniado-Laborín // Rev Iberoam Micol. – 2007. – Vol. 24. – P. 249-258.
107. 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.
108. Lasch P. MALDI-TOF mass spectrometry compatible inactivation method for highly pathogenic microbial cells and spores / P. Lasch, H. Nattermann, M. Erhard et al. // Anal Chem.- 2008.- Vol.80, №6.- P.26-34
109. Lau A.F. Development of a clinically comprehensive database and a simple procedure for identification of moulds from solid media by matrix assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectrometry / A. Lau, S. Drake, L. Calhoun et al. // J. Clin. Microbiol.- 2013.- Vol.51.- P. 828–834.
110. Li T. Characterization of *Aspergillus* spores by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry / T. Li, B.H. Liu, Y. Chen // Rapid Commun Mass Spectrom.- 2000.- Vol.14, №2.- P.393-400.
111. Li Y. MALDI-TOF Mass Spectrometry Compared With Real-Time PCR for Detection of Fetal Cell-Free DNA in Maternal Plasma / Y. Li, W. Holzgreve, V. Kiefer S. Hahn // Clinical Chemistry.- 2006.- Vol. 52, № 12.- P.2311-2312
112. Lin G. Genetic manipulation of *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Phaffia rhodozyma* / G. Lin, J. Bultman, E.A. Johnson, J.W. Fell // Methods Mol Biol.- 2012.- Vol.8.- P.35-49.
113. Litvintseva A. Valley fever: finding new places for an old disease: *Coccidioides immitis* found in Washington State soil associated with recent human infection / A. Litvintseva, N. Marsden-Haug, S. Hurst et al. // Clin Infect Dis.- 2015.- Vol.60,№1.- P.1-3
114. Litvintseva A.P. Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var *grubii* (serotype A), including a unique population in

- Botswana / A.P. Litvintseva, R. Thakur, R. Vilgalys, T.G. Mitchell // *Genetics*. – 2006. – Vol. 172. – P. 2223-2238.
115. Lohmann C. Comparison between the Biflex III-Biotyper and the Axima-SARAMIS Systems for Yeast Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry / C. Lohmann, M. Sabou, W. Moussaoui, G. Prévost, et al. // *J. Clin. Microbiol.*- 2013.- Vol.51, №4.- P.1231–1236.
116. 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.
117. Marinach-Patrice C. Rapid species diagnosis for invasive candidiasis using mass spectrometry / C. Marinach-Patrice, A. Fekkar, R. Atanasova, J. Gomeset et al. // *PLoS ONE*.- 2010.- Vol.5.- P.1–5.
118. Marinach-Patrice C. Use of mass spectrometry to identify clinical *Fusarium* isolates / C. Marinach-Patrice, A. Lethuillier, A. Marly // *Clin. Microbiol. Infect.*.-2009.- Vol.15, №7.- P.34-42.
119. Marklein G. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Fast and Reliable Identification of Clinical Yeast Isolates / G. Marklein, M. Josten // *J. of Clin. Microbiol.* – 2009. – Vol. 47, №9. – P. 2912-2917.
120. Matis M. Mass spectrometry and database search in the analysis of proteins from the fungus *Pleurotus ostreatus* / M. Matis, M. Zakelj-Mavric, J. Peter-Katalinić // *Proteomics*.- 2005.- Vol.5, №1/- P.67-75.
121. Meece J.K. Genetic Diversity in *Blastomyces dermatitidis*: Implications for PCR Detection in Clinical and Environmental Samples / Meece J.K., J.L. Anderson // *Medical Mycology*. – 2010. – Vol. 48, №2. – P. 285-290.
122. 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.

123. Murray P.R. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology / P.R. Murray // Clin. Microbiol. Infect.- 2010.- Vol.16.- P.1626–1630.
124. Narasimhan B. Genetic variability of *Aspergillus terreus* from dried grapes using RAPD-PCR / B. Narasimhan, M. Asokan // Advances in Bioscience and Biotechnology. – 2010. – Vol. 1, №4. – P. 345-353.
125. Nenoff P. MALDI-TOF mass spectrometry — a rapid method for the identification of dermatophyte species / P. Nenoff, M. Erhard, J.C. Simon et al. // Med. Mycol.- 2013.- Vol.51.- P.17–24.
126. Neuhof T. Direct identification of hydrophobins and their processing in *Trichoderma* using intact-cell MALDI-TOF / T. Neuhof, R. Dieckmann, I.S. Druzhinina et al. // MS. FEBS J.- 2007.- Vol.27, №8.- P.41–52.
127. Neuhof T. Peptaibol production by *Sepedonium* strains parasitizing Boletales / T. Neuhof, A. Berg, H. Besl et al. // Chem Biodivers.- 2007.- Vol.4, №11.- P.3–15.
128. Ninet B. Molecular identification of *Fusarium* species in onychomycoses / B. Ninet, I. Jan, O. Bontems et al. //Dermatology.- 2005.- Vol.2.- P.1–5.
129. Normand A.C. Assessment of various parameters to improve MALDI-TOF MS reference spectra libraries constructed for the routine identification of filamentous fungi / A.C. Normand, C. Cassagne, S. Ranque et al. // BMC Microbiol.- 2013.- Vol.13, №76.
130. Orsborn K. Protein Expression Profiling of *Coccidioides posadasii* by Two-Dimensional Differential In-Gel Electrophoresis and Evaluation of a Newly Recognized Peroxisomal Matrix Protein as a Recombinant Vaccine Candidate / K. Orsborn, L. Shubitz // Infect. and Immun. – 2006. – Vol. 74, №3. – P. 1865-1872.
131. Packeu A. Identification of the Trichophyton mentagrophytes complex species using MALDI-TOF mass spectrometry / A. Packeu, Detandt M., M. Hendrickx, H. Beguin, D. Martiny, O. Vandenberg // Med. Mycol.- 2013.- Vol.51, №6.- P. 5-8.
132. Padliya N. Tandem mass spectrometry for the detection of plant pathogenic fungi and the effects of database composition on protein inferences / N. Padliya, W. Garrett, K. Campbell, D. Tabb, B.Cooper // Proteomics.- 2007.- Vol.7, №21.- P.32-42.

133. Paterson R. Solutions to *Penicillium* taxonomy crucial to mycotoxin research and health / R. Paterson, A. Venâncio, N. Lima // *Res. Microbiol.*- 2004.- Vol.15.- P.7–13.
134. Pereira C. Grouping oral *Candida* species by multilocus enzyme electrophoresis / C. Pereira, E. Rosa, R. Rosa et al. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*- 2000.- Vol. 3, №13.- P.3-9.
135. 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.
136. Peterson R. Secretome of the Coprophilous Fungus *Doratomyces stemonitis* C8, Isolated from Koala Feces / R. Peterson J. Grinyer, H. Nevalainen // *Appl. Environ. Microbiol.*- 2011.-Vol.77, №11.- 793-801.
137. Pinto A. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of flight mass spectrometry identification of yeasts is contingent on robust reference spectra / A. Pinto, C. Halliday, M. Zahra et al. // *PLoS ONE*.- 2011.- 6::e25712.
138. Posch A.E. Combining light microscopy, dielectric spectroscopy, MALDI intact cell mass spectrometry, FTIR spectromicroscopy and multivariate data mining for morphological and physiological bioprocess characterization of filamentous organism / A.E. Posch, C. Koch, M. Helmelt et al. // *Fungal Genet. Biol.*- 2013.- Vol.51.- P.1–11.
139. Posteraro B. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based method for discrimination between molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* / B. Posteraro, A. Vella, M. Cogliatti, et al. // *J. Clin. Microbiol.*- 2012.- Vol.50, №24.- P.2–6.
140. Posteraro B. MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: identification of fungi and beyond / B. Posteraro, M.Sanguinetti, E. De Carolis, A. Vella // *Expert. Rev. Proteomics*.- 2013.- Vol.10,№1.- P. 51–64.
141. Puddick J. MALDI-TOF mass spectrometry of Cyanobacteria: a global approach to the discovery of novel secondary metabolites / J. Puddick, M. Prinsep // *Chemistry in New Zealand*.- 2008.- Vol.72, №2.- P.68-71.

142. Pulcrano G. Rapid and reliable MALDI-TOF mass spectrometry identification of *Candida non-albicans* isolates from bloodstream infections / G. Pulcrano, D. Vita, A. Vollaro // *J. Microbiol.*- 2013.- Vol.94, №1.- P. 262-266
143. Qian J. MALDI-TOF mass signatures for differentiation of yeast species, strain grouping and monitoring of morphogenesis markers / J. Qian, J.E. Cutler, R.B. Cole, Y. Cai. *Anal Bioanal. Chem.*- 2008.- Vol.392, №3.- P.439-449.
144. Ranque S. MALDI-TOF mass spectrometry identification of filamentous fungi in the clinical laboratory / S. Ranque, A. Normand, C. Cassagne et al. // *Mycoses.*- 2013.- vol.57.- P. 135–140.
145. Roland J. Use of multiple methods for genotyping *Fusarium* during an outbreak of contact lens associated fungal keratitis in Singapore / J. Roland, T. Koh // *BMC Infectious Diseases.* – 2008. – Vol. 8. – P. 92.
146. Rosevinge F. Performance of matrix-assisted laser desorption-time of flight mass spectrometry for identification of clinical yeast isolates / F. Rosevinge, E. Dzajic, E. Knudsen et al. // *Mycoses.*- 2013.- Vol.56, №2.- P.29–35.
147. Sendid B. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of medically-important yeasts in the clinical laboratories of Dijon and Lille hospitals / B. Sendid, P. Ducoroy, N. François et al. // *Med. Mycol.*- 2013.- Vol.51.- P.25-32.
148. Seng P. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of flight mass spectrometry / P. Seng, M. Drancourt, F. Gouriet et al. // *Clin. Infect. Dis.*- 2009.- Vol.49.- P. 543–551.
149. Seyfarth F. Identification of yeast isolated from dermatological patients by MALDI-TOF mass spectrometry / F. Seyfarth, C. Wiegand, M. Erhard // *Mycoses.*- 2012.- Vol.55, №3.- P.76-80.
150. 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. Jordar, 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.

151. 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.
152. Sitterle E. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and accurate identification of *Pseudallescheria*/*Scedosporium* species / E. Sitterle, S. Giraud, J. Leto, J.P. Bouchara, A. Rougeron, F. Morio, et al. // *Clin. Microbiol. Infect.*- 2014.- Vol.20, №9.- P.929-935.
153. Soares C. Three new species of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from almonds and maize in Portugal / C. Soares P. Rodrigues S. W. Peterson // *Mycologia.*- 2012.- Vol.104,№ 3.- P. 682-697.
154. Spanu T. Direct MALDI-TOF Mass Spectrometry Assay of Blood Culture Broths for Rapid Identification of *Candida* Species Causing Bloodstream Infections: an Observational Study in Two Large Microbiology Laboratories / T. Spanu, Br. Posteraro, B. Fiori et al. // *J. Clin. Microbiol.*- 2012.- Vol.50.- P.176–179.
155. Stevenson L. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization time-of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species / L. Stevenson, S. Drake, Y. Shea et al. // *J. Clin. Microbiol.*- 2010.- Vol.48.- P. 3482–3486.
156. 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.
157. Tao J. Detection of pathogenic *Verticillium* spp. using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry / J. Tao, G. Zhang, Z. Jiang et al.// *Rapid Commun. Mass. Sp.*- 2009.- Vol.23.- P.3647-3654.
158. Tarcha E.J. Multivalent recombinant protein vaccine against coccidioidomycosis / E.J. Tarcha, V. Basrur, C.Y. Hung et al. // *Infect. Immun.*- 2006.- Vol.74, № 9.- P. 5802–5813

159. Theel E. Dermatophyte identification using matrix-assisted laser desorption ionization time-of flight mass spectrometry / E. Theel, L. Hall, J. Mandrekar et al. // J. Clin. Microbiol.- 2011.- Vol.49.- P. 4067–4071.
160. Vella A. Rapid antifungal susceptibility testing by matrix-assisted laser desorption ionization- time of flight mass spectrometry analysis / A. Vella, E. De Carolis, L. Vaccaro et al.// J. Clin. Microbiol.- 2013.- Vol.51, № 2964.– P.9.
161. 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.
162. 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.
163. Welham K. Characterization of fungal spores by laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry / K. Welham, M. Domin, K. Johnson et al. // Rapid Commun. Mass. Spectrom.- 2000.-Vol 14, №30.- P.7–10.
164. Wise M. Species identification and strain differentiation of clinical *Candida* isolates using the DiversiLab system of automated repetitive sequence-based PCR / M. Wise , M. Healy // J. of Med. Microbiol. – 2007. – Vol. 56. – P. 778-787.
165. Zancopé-Oliveira R. Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex / R. Zancopé-Oliveira, M. Oliveira, C. Santos et al. // Res. Microbiol.- 2015.- Vol.166, №2.- P.102-110.