

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ ТИПИРОВАНИЯ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ (ОБЗОР)

**Шаров Т.Н. (м.н.с.)\*, Гришина М.А. (зав. лаб.), Ткаченко Г.А. (с.н.с.), Шпак И.М. (м.н.с.)**

ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Россия

© Коллектив авторов, 2012

*Ныне проблема типирования патогенных микромицетов становится все более актуальной в связи с тем, что количество обнаруживаемых видов грибов и заболеваемость микозами различной этиологии возрастают. В свою очередь, развитие материально-технической базы позволяет использовать для типирования новые высокоточные и технологичные методы, которые, тем не менее, не всегда эффективны для решения конкретных задач эпидемиологии и лабораторной диагностики микозов. В данном обзоре охарактеризованы существующие методы типирования клинически значимых микромицетов.*

**Ключевые слова:** масс-спектрометрия, полимеразная цепная реакция (ПЦР), типирование патогенных грибов

## COMPARATIVE CHARACTER OF TYPING METHODS OF PATHOGENIC FUNGI (REVIEW)

**Sharov T.N. (junior scientific collaborator),  
Grishina M.A. (head of the laboratory,  
Tkachenko G.A. (senior scientific  
collaborator), Shpak I.M. (junior scientific  
collaborator)**

Volgograd Research Institute for Plaque Control, Russia

© Collective of authors, 2012

*Now the problem of pathogenic fungi typing becomes more and more important due to the fact that number of discovering species of pathogenic fungi and morbidity from mycoses of different etiology are increase. In its turn the development of material and technical resources to date, allows to use high-accuracy techniques, those, however, are not always effective for solving certain problems of epidemiology and laboratory diagnostics of mycoses. In this review current techniques of typing of clinically significant fungi are described.*

**Key words:** mass-spectrometry, polymerase chain reaction (PCR), typing of pathogenic fungi

\* Контактное лицо: Шаров Тимур Николаевич  
Тел.: (8442) 37-37-74

Типирование микроорганизмов – это группа технологических приемов, применяемых для определения внутривидовых категорий. Возможность дифференцировать популяции микроорганизмов внутри вида обусловлена их гетерогенностью по определенным признакам. С практической точки зрения, основными целями типирования являются установление источников инфекции и механизмов циркуляции возбудителя, а также создание электронных каталогов и геномных портретов штаммов микроорганизмов. Вероятность получения достоверных результатов в типировании во многом определяется использованием унифицированных методик и точным соблюдением технологического регламента. В настоящее время повсеместно возрастает число лиц с иммунной недостаточностью, расширяется спектр видов патогенных грибов, способных как вызывать вспышки заболеваний в силу естественных причин, так и быть агентами биотерроризма. Поэтому чрезвычайно актуальными направлениями микробиологии, молекулярной биологии и эпидемиологии являются совершенствование существующих методик типирования микромицетов, а также разработка новых методов типирования и оценка их эффективности в дифференциации возбудителей в случае возможных вспышек заболеваний естественного и искусственного происхождения, установление возможных источников инфекции. Кроме того, в связи с появлением и обновлением электронных баз данных, необходимы точная систематическая классификация недавно обнаруженных штаммов и уточнение таксономического положения уже существующих.

Основой для типирования является положение о том, что группы близкородственных штаммов, принадлежащих к одному виду микроорганизмов, имеют общие свойства или особенности, отличающие их от прочих. Это может быть какая-либо фенотипическая характеристика, свойственная микроорганизмам, или молекулярные маркеры, позволяющие дифференцировать микроорганизмы с целью установления эволюционных и эпидемиологических связей между штаммами различных групп.

По мере развития микробиологии и медицинской микологии, было множество попыток применения различных по своей сути и эффективности методов типирования. Культуральные методы относят к самым ранним из применяемых, в их основе лежит культивирование образцов биологического материала на диагностических питательных средах с селективными добавками. Однако проведение внутривидового типирования микроскопических грибов с помощью культуральных методов невозможно, поскольку близкородственные штаммы в пределах одного вида, как правило, не имеют фенотипических различий при росте в одинаковых условиях, поэтому в настоящее время культуральные методы используют только для идентификации видов микромицетов. Так, Erasó M. и др. провели культуральный анализ 345 коллекционных и 103 клинических штаммов

*Candida* с помощью дифференциально-диагностической среды. В результате, все штаммы были распределены по видам, в зависимости от цвета колоний, на *C. albicans* (цвет колоний – кобальтовый синий), *C. dubliniensis* (цвет колоний – бирюзово-голубой) и *C. tropicalis* (цвет колоний – розовато-голубой), однако провести типирование до штамма не удалось [1]. Кроме того, существенными недостатками культурального метода являются длительное время, необходимое для роста культуры, и необходимость применения дорогостоящих селективных питательных сред.

В основе биохимических методов типирования лежит выявление переменных особенностей метаболизма микроорганизмов. Fricker H. и др. (1996), 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 биохимических тест-систем для типирования микромицетов ограничено по причине метаболической однородности штаммов внутри одного вида. Помимо этого, к недостаткам биохимических тестов относят: длительность проведения анализа, недостаточную дискриминирующую способность, а также необходимость наличия специальных селективных питательных сред.

Большую ценность для решения задач типирования представляют серологические методы, в основе которых лежит взаимодействие антигенов и специфических антител с образованием иммунных комплексов, которые можно обнаружить в тестах *in vitro*. При использовании серологических методов для типирования микромицетов можно выделить группу штаммов с общей антигенной структурой, называемую сероваром (серотипом). Еще в 1992 году Dromer E. и др., с помощью специфических 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 указать на его положение внутри вида.

В целом, по большинству показателей вышеперечисленные

численные фенотипические методы типирования не пригодны для решения практических задач эпидемиологии. 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. В-третьих, фенотипические методы «требуют» больше времени на проведение анализа и получение результатов, чем генотипические. И, наконец, работа с живыми культурами выделенных возбудителей как условно-патогенных, так и особо опасных, может представлять угрозу для здоровья персонала лаборатории.

Особое место в типировании микроорганизмов занимают методы протеомики – области биологии, занимающейся анализом качественного и количественного белкового состава организма, а также экспрессии белков на различных физиологических этапах. Несмотря на то, что протеомные методы относят к фенотипическим методам, с появлением высокотехнологического оборудования их разрешающая способность сопоставима с разрешающей способностью генотипических методов.

К протеомным методам, используемым для внутривидового типирования, относят, 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 предположить о структуре кодирующих их генов. Pereira C. и др. (2000) провели анализ 12 изолятов *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* и *C. guilliermondii*), выделенных из клинического материала, методом мультилокусного энзим-электрофореза. На основе сравнительного анализа электрофоретической подвижности 15 ферментов была построена дендрограмма, в которой все изоляты распределили на девять родственных таксонометрических групп. По мнению авторов, метод эффективен лишь для группирования изолятов внутри одного вида и малоэффективен – при изучении изолятов нескольких видов микроорганизмов. Sandven P. и др. (1993) методом МЭЭ проанализировали 98 клинических и 4 референтных изолятов *C. albicans*. Основываясь на данных анализа полиморфизма 10 энзимных локусов, исследователи разделили изоляты на 14 электрофоретических типов. По мнению авторов, методом мультилокусного энзим-электрофореза можно проводить эпидемиологическое типирование изолятов вида *C. albicans* с приемлемой точностью. Однако существует специфическая для этого метода проблема, заключающаяся в том, что

посттрансляционные модификации белков могут внести ошибки в результаты исследования.

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. При численном анализе сходства профилей суммарных клеточных протеинов выявили, 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%. Используемый 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 выделить каждый штамм в этой совокупности.

Протеомный подход в совокупности с высокоточным методом масс-спектрометрии способен стать эффективным инструментом для решения проблем типирования 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). 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 даёт основание использовать данный метод для идентификации и внутривидовой классификации микроорганизмов.

Из всех разновидностей масс-спектрометрии наиболее эффективным, в плане типирования, является метод времяпролетной спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF – matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight). 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 [2]. В 2011 г. Hoobrook E. и др. описали опыт применения тан-

демной масс-спектрометрии в сочетании с жидкостной хроматографией для типирования *Histoplasma capsulatum* методом анализа белковых фракций, с обработкой полученных данных с помощью поисковой машины MASCOT ([http://www.matrixscience.com/search\\_form\\_select.html](http://www.matrixscience.com/search_form_select.html)). Была выявлена разница в белковом составе различных штаммов, в том числе – на разных фазах роста микроорганизма, что в перспективе создает предпосылки для типирования этого рода микросциетов [3]. В 2009 г. Marklein G. и Josten M. с помощью метода MALDI-TOF (масс-спектрометры Microflex LT и Biflex III) 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 сиквенирования последовательностей гена, кодирующего 26S РНК. Согласно полученным данным, метод MALDI-TOF был наиболее эффективен при типировании 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 выявлен вид *Candida metapsilosis*, не идентифицируемый биохимическими методами, но обнаруживаемый методом MALDI-TOF [4].

Ранее, существенное ограничение на применение масс-спектрометрии в качестве метода типирования накладывали так называемые «жесткие» методы ионизации, такие как термоионизация или искровая ионизация, поскольку они были приемлемы только для анализа неорганических соединений. С появлением тандемных масс-спектрометров (с двумя детекторами) и «мягких» методов ионизации (электроспрей – ESI, MALDI) стало возможным получать прямые масс-спектры культур микроорганизмов, т.е. без предварительного выделения, фракционирования и очистки отдельных белков. 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 проведения анализа большого количества образцов. Кроме того, применением соответствующего программного обеспечения можно автоматизировать процесс и избавиться от необходимости самостоятельно интерпретировать спектры.

Наибольшую значимость для внутривидового типирования и анализа генетического родства (клональности) штаммов микромицетов, на данный момент, имеют молекулярно-генетические методы типирования, основанные, в первую очередь, на полимеразной цепной реакции (ПЦР). 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. В зависимости от поставленной перед исследователем задачи, выделяют несколько основных методов ПЦР-типирования. Для анализа ДНК возбудителей часто используют метод амплификации специфических последовательностей ДНК с последующей их обработкой рестриктазами (так называемый полиморфизм длин рестриционных фрагментов (RFLP)). Метод RFLP основан на анализе межвидового и внутривидового полиморфизма сайтов узнавания эндонуклеаз рестрикции.

Для внутривидового типирования штаммов возбудителей кокцидиоза применяют анализ единичных нуклеотидных замен (SNP – single nucleotide polymorphism) в переменных участках ДНК этих микромицетов с помощью метода RFLP. При секвенировании нуклеотидных последовательностей локусов VL, bl, ITS и z выявили, что у штаммов *Coccidioides immitis* в локусах bl и z отсутствует полиморфный сайт рестрикции для эндонуклеазы Hinf I, а у штаммов *Coccidioides posadasii* – сайт рестрикции для эндонуклеаз в локусах VL, ITS. В 2010 году Меесе J. и др. [5] методом RFLP 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 групп, генотипы которых соответствовали регионам их распространения. 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 рестриционных ферментов можно добиться и более точного разделения штаммов. Для локальных эпидемиологических исследований штаммов микроорганизмов, выделяемых на искусственных питательных средах, используют, в основном, метод амплификации произвольных участков генома в условиях нестрогого связывания праймеров (RAPD – random amplification of polymorphic DNA). Этот метод не требует первичного знания видоспецифичной последовательности и позволяет обнаружить полиморфизм гомологичных участков штаммов близкородственных микроорганизмов [5].

В 2010 году Narasimhan B. и др., используя две пары различных олигонуклеотидных праймеров, провели RAPD-типирование пяти штаммов *Aspergillus terreus*

с целью выяснения генетической вариабельности внутри вида. При анализе штаммы были распределены по четырем группам, причем принадлежность штамма той или иной группе определялась видом используемых праймеров. Как и в случае с RFLP, по мнению исследователей, наилучшим вариантом будет сочетанное использование различных пар праймеров [6].

Для широкомасштабных эпидемиологических исследований микроорганизмов, выделяемых на искусственных питательных средах, применяют, главным образом, AFLP (amplified fragment length polymorphism). В этом методе ДНК расщепляют рестриктазами, затем лигируют получившиеся фрагменты с ДНК-адаптерами, после чего амплифицируют их с использованием комплементарных праймеров. В 2008 г. Roland J. и Koh T. 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 и Rep (interspersed repetitive extragenic palindromic DNA sequence) – ПЦР – амплификация участков генома, ограниченных консервативными повторяющимися последовательностями.

Методом AFLP разделили 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). С помощью метода ERIC-ПЦР 65 изолятов разделили на 7 групп: *F. cf. incarnatum*, *F. oxysporum* и *Melanospora fallax* составили три отдельных группы, изоляты *F. solani* разделили на 4 группы, из которых в двух было по одному изоляту, а в оставшихся двух группах – по 55 и 5 изолятов. При сравнительном анализе выявили, что метод AFLP имел наибольшую разрешающую способность при типировании изолятов *Fusarium* [7].

В 2007 Nealy M. и др. 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 исследователей, основные преимущества Rep-ПЦР среди прочих генотипических методов – относительная простота и воспроизводимость [8].

Также эффективными методами типирования микромицетов являются методы монолокусного и мультилокусного сиквенс-типирования (MLST). В 2006 году Burgess J. и др. провели монолокусное типирование штаммов *B. dermatitidis*. Сиквенс-типирование производили в промоторной области гена *BADI*, который является одним из ключевых факторов патогенности возбудителя бластомикоза. Данным методом выявили 4 гаплотипа (H1, H2, H3 и H4), не связанных с географическим распределением штаммов [9]. Также было проведено монолокусное типирование штаммов *Paracoccidioides brasiliensis*. Целевым локусом для монолокусного сиквенс-типирования является ген возбудителя паракокцидиоидомикоза *PbGPA3*, кодирующий гликопротеин. Данным методом штаммы *P. brasiliensis* разделили на 5 генотипов (A, B, C, D, E и F) [10]. С помощью мультилокусного сиквенс-типирования, предложенного по схеме Koufopanou V. и др. (2001), можно разделить штаммы возбудителя кокцидиоидоза на 2 таксона: Калифорнийский (*Coccidioides immitis*) и Не-Калифорнийский (*Coccidioides posadasii*) [11]. С использованием мультилокусного сиквенс-типирования, предложенного по схеме Kasuga T. и др. (1999), штаммы возбудителя гистоплазмоза были разделены, по крайней мере, на 8 филогенетических кладов, ассоциированных с географическими районами распространения возбудителя [12]. В работах, посвященных анализу молекулярно-генетических методов типирования *Cryptococcus* spp., с использованием ПЦР-фингерпринта с праймерами, специфичными микро- и минисателлитным последовательностям ДНК (GACA)<sub>4</sub>, а также AFLP-анализа, удалось распределить 2000 изолятов *C. neoformans* и *C. gattii* по 8 группам [13, 14]. Однако, по мнению ученых, результаты, полученные при использовании различных молекулярных методик типирования, не позволяют добиться удовлетворительного уровня воспроизводимости. В связи с этим, было решено выбрать один метод молекулярно-генетического типирования и проанализировать возможность типирования этим методом всех доступных изолятов, относящихся к двум видам возбудителя криптококкоза (*C. neoformans* и *C. gattii*). Комплексные исследования по этой теме в 2009 году провела группа исследователей под руководством Международного общества микологии человека и животных (ISHAM). В качестве стандартного метода был выбран метод MLST. Изоляты, принадлежащие разным серогруппам, типировали по двум отличающимся методикам MLST (предложенными Litvintseva et al. и Fraser et al.), задействовав в обоих случаях локусы с высокой степенью полиморфизма [15, 16]. В итоге, это позволило разработать унифицированную методику, с помощью которой можно дифференцировать друг от друга близкородственные штаммы *C. neoformans* и *C. gattii* и которая в перспективе может быть использована в качестве общепринятой [17]. В 2007 году Bain J. и др. методом MLST проанализировали 7 ген-

ных 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, обнаружили, что для типирования *Aspergillus* spp. более пригодны однонуклеотидные различия между гомологичными участками генома у представителей одного вида, а участки генов «домашнего хозяйства» не обладали достаточной внутривидовой вариабельностью (в отличие от таковых у бактерий) [18].

В 2011 году Engelthaler D. и др. 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 из биоматериала больных кокцидиоидозом, а потом подтвердить результаты с помощью SNP-анализа. Установлено, что этот метод сиквенирования 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 [19].

Отдельно стоит упомянуть методы типирования, в основе которых лежит анализ вариабельности некодирующих участков, разделяющих отдельные участки транскрипционной единицы рибосомной ДНК, т.е. так называемых ITS-регионов (ITS – internal transcribed spacer). Эти участки характеризуются более высоким полиморфизмом, по сравнению с генами рРНК, и поэтому, как и межгенные спейсеры (IGS – intergenic spacer, участки, разделяющие транскрипционные единицы рДНК), используются в качестве молекулярных маркеров. Fell J. и др. (1999) с помощью сиквенс-анализа с праймерами к ITS и IGS участкам проанализировали несколько штаммов дрожжей *Phaffia rhodozyma* и *Xanthophyllomyces dendrorhous* с целью их дифференциации. На основе анализа делеционных и инсерционных изменений в IGS участке им удалось дифференцировать и охарактеризовать штаммы *X. dendrorhous*.

Общим для большинства методов ПЦР-типирования является использование геле-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 об-

ласти типирования микроорганизмов (главным образом, возбудителей внутрибольничных инфекций). 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 по имеющимся в научной литературе данным, для пульс-электрофореза распространенным недостатком является наличие слишком большого процента недостоверных результатов [20].

Для всех методов, основанных на ПЦР, существуют собственные специфические недостатки. К ним относят, 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 или подбор новых условий проведения реакции.

Таким образом, типирование 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. Одновременно с этим, относительно недавно внедренные в эпидемиологическую практику генетические методы типирования

не только обеспечивают возможность точной и быстрой дифференцировки микроорганизма до уровня штамма, но и обладают большей «пластичностью», т.е. возможностью подстроить изначальный протокол метода под конкретные нужды эпидемиолога, без снижения точности результата. Кроме того, для методов генетического типирования можно снизить расходы на исследования как за счет отработки методики, так и в силу наблюдаемой тенденции к удешевлению расходных материалов для ПЦР, сиквенирования и т.д. Все это позволит решить прикладные и фундаментальные задачи биологии микромицетов, являвшиеся непреодолимыми трудностями в случае типирования на основе фенотипических признаков. Другая сторона вопроса заключается в том, что некоторые фенотипические методы (в частности, протеомные), обладая большим потенциалом, не могли его проявить в силу отсутствия технической базы, достаточной для конкуренции с генотипическими методами. С появлением тандемных масс-спектрометров и «мягких» методов ионизации, протеомные методы типирования, по многим 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. Основными ограничениями масс-спектрометрических методов типирования, 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.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Eraso M.D., Moragues.* Evaluation of the New Chromogenic Medium *Candida* ID 2 for Isolation and Identification of *Candida albicans* and Other Medically Important *Candida* Species // J. of Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44, № 9. – P. 3340-3345.
2. *Bizzini A., Durussel C.* Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Bacterial Strains Routinely Isolated in a Clinical Microbiology Laboratory // J. of Med. Microbiol. – 2010. – Vol. 48, №5. – P. 1549-1554.
3. *Holbrook E., Edwards J.* Definition of the Extracellular Proteome of Pathogenic-Phase *Histoplasma capsulatum* // J. Proteome Res. – 2011. – № 10. – P. 1929-1943.
4. *Marklein G., Josten M.* Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Fast and Reliable Identification of Clinical Yeast Isolates // J. of Clin. Microbiol. – 2009. – Vol. 47, №9. – P. 2912-2917.
5. *Meece J.K., Anderson J.L.* Genetic Diversity in *Blastomyces dermatitidis*: Implications for PCR Detection in Clinical and Environmental Samples // Medical Mycology. – 2010. – Vol. 48, №2. – P. 285-290.
6. *Narasimhan B., Asokan M.* Genetic variability of *Aspergillus terreus* from dried grapes using RAPD-PCR // Advances in Bioscience and Biotechnology. – 2010. – Vol. 1, №4. – P. 345-353.
7. *Roland J., Koh T.* Use of multiple methods for genotyping *Fusarium* during an outbreak of contact lens associated fungal keratitis in Singapore // BMC Infectious Diseases. – 2008. – Vol. 8. – P. 92.
8. *Wise M.G., Healy M.* Species identification and strain differentiation of clinical *Candida* isolates using the DiversiLab system of automated repetitive sequence-based PCR // J. of Med. Microbiol. – 2007. – Vol. 56. – P. 778-787.
9. *Burgess J., Schwan W.* PCR-based detection of DNA from the human pathogen *Blastomyces dermatitidis* from natural soil samples // Med Mycol. – 2006. – Vol. 4, №8. – P. 741-748.
10. *Hebeler-Barbosa F., Morais F.* Comparison of the sequences of the internal transcribed spacer regions and PbGP43 genes of *Paracoccidioides brasiliensis* from patients and armadillos (*Dasyus novemcinctus*) // J. Clin. Microbiol. – 2003. – Vol. 41, №12. – P. 5735-5737.
11. *Koufopanou V., Burt A., Szaro T.* Gene genealogies, cryptic species, and molecular evolution in the human pathogen *Coc-*

- cidiodes immitis* and relatives (Ascomycota, Onygenales) // Mol. Biol. Evol. – 2001. – Vol.18. – P. 1246-1258.
12. Kasuga T., White T.J., Koenig G. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*// Molecular. Ecology. – 2003. – Vol. 12. – P. 3383-3401.
  13. Meyer W., Mitchell T.G. PCR fingerprinting to distinguish species and strains of yeast/ In: Maresca B., Kobayashi G.S., editors. Molecular biology of pathogenic fungi: A laboratory manual. – New York: Telos Press. – 1993. – P. 293-302.
  14. Meyer W., Castaneda A. Jackson S., et al. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates// Emerg. Infect. Dis. – 2003. – Vol. 9. – P. 189-195.
  15. Litvintseva A.P., Thakur R., Vilgalys R., Mitchell T.G. Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var *grubii* (serotype A), including a unique population in Botswana// Genetics. – 2006. – Vol. 172. – P. 2223-2238.
  16. Fraser J.A., Giles S.S., Wenink E.C., et al. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak // Nature. – 2005. – Vol. 437. – P. 1360-1364.
  17. Meyer W., Aanensen D.M. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* // Med. Mycol. – 2009. – Vol. 47, №6. – P. 561-570.
  18. Bain J., Tavanti A. Multilocus Sequence Typing of the Pathogenic Fungus *Aspergillus fumigatus*// J. of Clin. Microbiol. – 2007. – Vol. 45, №5. – P. 1469-1477.
  19. Engelthaler D., Chiller T. Next-Generation Sequencing of *Coccidioides immitis* Isolated during Cluster Investigation // Emerging Infectious Diseases. – 2011. – Vol. 17, №2.
  20. Orsborn K., Shubitz L. 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 // Infect. and Immun. – 2006. – Vol. 74, №3. – P. 1865-1872.

Поступила в редакцию журнала 02.03.2012

Рецензент: С.М. Игнатъева, Ю.В. Михайлова

