На правах рукописи

ШПАК ИВАН МИХАЙЛОВИЧ

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ГИСТОПЛАЗМОЗА

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Волгоград – 2019

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора)

Научный руководитель: **Ткаченко Галина Александровна**, кандидат медицинских наук, доцент

Официальные оппоненты: **Дентовская Светлана Владимировна**, доктор медицинских наук, Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, главный научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы

Тараскина Анастасия Евгеньевна, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Научно-исследовательский институт медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, заведующий научно-исследовательской лабораторией молекулярно-генетической микробиологии

Ведущая организация: Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита диссертации состоится **«31» мая 2019 г.** в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.078.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук на базе Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте http://www.microbe.ru/disser/dissert Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Автореферат разослан «____»_____2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук Микшис Наталья Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень разработанности

Гистоплазмоз – инфекционное заболевание, возбудителями которого являются микромицеты II группы патогенности (опасности) *Histoplasma capsulatum* – диморфные сапробо-геофильные микроскопические грибы, обитающие в почве, богатой гуано птиц и летучих мышей [Menges R.W. et al., 1967]. Это наиболее распространенный микоз в мире, эндемичный в Северной и Центральной Америках, во многих странах Южной Америки, Ближнего Востока, Африки, Юго-Восточной Азии, Австралии и Европы. [Inojosa W. et al., 2011; Adenis A. et al., 2013; Antinori S., 2014; Dieng, T. et al., 2017]. Заражение происходит при ингаляции спор или микроконидий с фрагментами мицелия возбудителя гистоплазмоза. Инфекция часто протекает бессимптомно или с респираторными проявлениями, но может прогрессировать до опасного для жизни системного заболевания. Клинические синдромы не являются специфичными, поэтому диагноз «гистоплазмоз» часто не рассматривается при дифференциальной диагностике у пациентов с признаками внебольничной пневмонии, туберкулеза, гранулематозных воспалительных заболеваний, таких как саркоидоз, а так же злокачественных новообразований [Prasad N. et al., 2015]. По данным специалистов Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC, Centers for Disease Control and Prevention) гистоплазмоз отнесен к глобально распространенным микозам. В США приблизительно от 60 до 90% населения, проживающего в районах долин рек Огайо и Мисиссиппи подвергались воздействию микромицетов *H. capsulatum* [Manos N. E. et al., 1956]. Частота возникновения гистоплазмоза у лиц от 65 лет и старше в США составляет 3,4 случая на 100000 населения. При этом на Среднем Западе страны эти показатели достигают 6,1 на 100000 [Baddley J. W. et al., 2011]. Наиболее часто гистоплазмоз встречается у людей с ослабленным иммунитетом, особенно у пациентов с ВИЧ/СПИД. Летальность среди данной группы больных от этого микоза достигает 30% [Haddad N.E., et al. 2001]. Возникновение вспышек гистоплазмоза является редким событием. Они были зарегистрированы на территории США, Мексики, Бразилии и Коста-Рико. Причинами их возникновения являлись проведение строительных работ и реконструкций, посещение пещер или уборка мест гнездования птиц на эндемичных территориях [CDC, 2008; Lyon G.M. et al., 2004; Brodsky A.L. et al., 1973; Chamany S. et al. 2004]. По данным проведенных исследований общий показатель смертности от гистоплазмоза составляет 5% у детей и до 8% у взрослых. Реальные значения смертности, по всей видимости, могут быть меньше, поскольку исследования не затрагивали

пациентов со стертыми формами заболевания [Chu J.H. et al., 2006; Ledtke C. et al., 2012]. На сегодняшний день принято разделять данный вид микромицетов на три варианта: *H. capsulatum var. capsulatum, H. capsulatum var. duboisii* и *H. capsulatum var. farciminosum*. Первыми работами, где была предложена схема мультилокусного сиквенс-типирования (МЛСТ) штаммов *H. capsulatum* и охарактеризованы основные генотипы данного вида микромицетов стали работы T. Kasuga [Kasuga T. et al., 1999; Kasuga T. et al., 2003]. Благодаря исследованиям Taylor J.W. с соавторами, удалось охарактеризовать большое количество изолятов, выделенных из объектов окружающей среды и клинических образцов методом МЛСТ [Taylor J.W. et al., 2000; Taylor J.W. et al., 2006]. Однако в настоящее время для анализа используется всего четыре отдельных локуса. Одним из методов генотипирования, который позволяет различать не только внутривидовые группы, но и дифференцировать микроорганизмы на отдельные штаммы является анализ дифференцирующих регионов (DFR- Different region analysis) [Li Y. et al., 2008; Duangsonk K. et al., 2006]. На сегодняшний день использование DFR для внутривидовой дифференциации возбудителя гистоплазмоза в доступной литературе не описано. Разработка алгоритма определения генотипа возбудителя гистоплазмоза, по-прежнему, является актуальной задачей. Внедрение в практику лабораторных исследований эффективных методов генетического типирования *H. capsulatum* позволит не только детально характеризовать генетическое разнообразие представителей данного вида, но и определить источник инфекции и регион происхождения штамма возбудителя гистоплазмоза при проведении эпидемиологических расследований. Учитывая возможность появления завозных случаев гистоплазмоза в Российской Федерации у лиц, пребывающих из эндемичных регионов, отсутствие настороженности у специалистов системы здравоохранения по отношению к данному заболеванию, а также тот факт, что на территории России и других стран бывшего СССР исследований по изучению ареала распространения *H. capsulatum* не проводили, особое значение имеет возможность осуществления точной идентификации микромицета и его детальной молекулярно-генетической характеристики для обеспечения биологической безопасности специалистами Роспотребнадзора, в том числе на базе референс-центра по мониторингу за возбудителями глубоких микозов.

Цель работы - совершенствование методических подходов для изучения внутривидового разнообразия штаммов *Histoplasma capsulatum* на основе амплификации дифференцирующих регионов, случайной амплификации полиморфной ДНК, моно- и мультилокусного сиквенс-типирования.

Задачи исследования

1. Оценить дифференцирующую способность метода ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК на наборе штаммов возбудителя гистоплазмоза из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.
2. Разработать методический подход на основе амплификации дифференцирующих фрагментов ДНК для типирования штаммов возбудителя гистоплазмоза и оценить его эффективность.
3. Провести мультилокусное сиквенс-типирование коллекционных штаммов *H. casulatum*, определить регионы их происхождения и оценить эффективность метода МЛСТ для внутривидовой дифференциации возбудителя гистоплазмоза.
4. Провести секвенирование фрагмента гена *ms*8 коллекционных штаммов *H. capsulatum* и оценить возможность его применения для монолокусного сиквенс-типирования и в качестве дополнительного локуса в схеме мультилокусного сиквенс-типирования.

Научная новизна

Впервые создана библиотека дифференцирующих регионов генома микромицетов *H. capsulatum*, на основе которой сконструирован набор специфичных олигонуклеотидов для внутривидовой дифференциации штаммов *H. capsulatum* методом амплификации дифференцирующих фрагментов ДНК.

Продемонстрирована высокая вариабельность гена *ms8* (mold-specific gene) у различных штаммов *H. capsulatum*, что позволило использовать его последовательность для внутривидовой дифференциации методами моно- и мультилокусного сиквенс-типирования.

По результатам работы получены патенты на изобретение № 2650752 «Набор олигонуклеотидных праймеров для типирования штаммов возбудителя гистоплазмоза *Histoplasma capsulatum* методом амплификации дифференцирующих фрагментов ДНК (DFR)» (Приоритет установлен 09.02.17. Опубл. 17.04.2018. Бюл. № 11) и № 2631935 «Набор олигонуклеотидных праймеров для идентификации медицински значимых микромицетов методом секвенирования ДНК» (Приоритет установлен 04.08.16. Опубл. 28.09.2017. Бюл. 28).

Установлены генотипы и получены сведения о географических регионах происхождения штаммов *H. capsulatum* из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработаны методические подходы проведения внутривидового типирования микромицетов *H. capsulatum* на основе методов амплификации дифференцирующих фрагментов ДНК (DFR – Different Region), полимеразной цепной реакции со случайной амплификацией полиморфной ДНК (RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA), монолокусного и мультилокусного секвенирования. Сочетание предложенных методических подходов для генотипирования штаммов *H. capsulatum* характеризуется высокой дискриминирующей способностью (например, RAPD и сиквенс-типирование), простотой использования и высокой скоростью проведения исследования (например, DFR). Данные методические подходы используются специалистами Референс-центра по мониторингу за возбудителями глубоких микозов ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора для внутривидовой дифференциации штаммов возбудителя гистоплазмоза и паспортизации коллекционных штаммов *H. capsulatum* (акт о внедрении от 23.12.16).

Материалы исследования вошли в методические рекомендации «Алгоритм генотипирования микромицетов *Histoplasma capsulatum*» (утверждены директором института 22.12.16, протокол № 8), в проект методических указаний «Лабораторная диагностика особо опасных микозов», а также в раздел по молекулярному типированию возбудителей глубоких микозов проекта Методических указаний «Порядок молекулярного типирования возбудителей особо опасных инфекционных болезней на базе Референс-центров и Национальных центров верификации диагностической деятельности».

Материалы проведенных исследований включены в лекционный материал, предназначенный для врачей и лаборантов учреждений санитарно-эпидемиологического профиля и клинических диагностических лабораторий, при реализации основных образовательных программ послевузовского профессионального образования (аспирантура) и программ профессиональной переподготовки и повышения квалификации специалистов по лабораторной микологии (акт о внедрении от 19.12.16).

Положения, выносимые на защиту:

1. Использование разработанного набора олигонуклеотидных праймеров для типирования штаммов возбудителя гистоплазмоза методом амплификации дифференцирующих фрагментов ДНК позволяет проводить внутривидовую дифференциацию штаммов *H. capsulatum*.

2. Комбинирование *in silico* результатов ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК с использованием двух праймеров и однопраймерной RAPD дает возможность получить наибольшее число характеристических паттернов коллекционных штаммов *H. capsulatum* и увеличить разрешающую способность метода.
3. Высокая вариабельность нуклеотидной последовательности гена *ms8* является основанием для его использования в монолокусном секвенировании и для расширения схемы мультилокусного сиквенс-типировании штаммов *H. capsulatum.*
4. Штаммы возбудителя гистоплазмоза из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора принадлежат к генотипам NAm2 (11 штаммов *H. capsulatum var. capsulatum* и 1 *H. capsulatum var. farciminosum*), Africa (4 штамма *H. capsulatum var. duboisii*), LAmA (3 штамма *H. capsulatum var. capsulatum*) и H81(Panama) (1 штамм *H. capsulatum var. capsulatum*).

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов подтверждена путем анализа фактического материала, полученного постановкой экспериментов в нескольких повторах с использованием современных научных методов, на высокотехнологичном оборудовании, зарегистрированном в установленном порядке и прошедшем метрологическую поверку.

Материалы диссертации представлены и обсуждены на VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика - 2010» (Москва, 2010 год), III научно-практической школе-конференции молодых ученых и специалистов научно - исследовательских организаций Роспотребнадзора (Оболенск, 2011 год), на 69-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2011 год), на Всероссийской научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии (XVI Кашкинские чтения) с международным участием (Санкт-Петербург, 2013 г.), на VI Всероссийском конгрессе по медицинской микологии (Москва, 2014), в рамках форума «Молодые исследователи – российской медицинской микологии» доклад занял I место среди работ молодых ученых (Москва, 2014 г.) и был награжден в качестве приза грантом на участие в Девятой Международной Конференции, посвященной криптококку и криптококкозу, Королевского Тропического Института, Амстердам, Нидерланды,15-19 мая 2014; на конференции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзо-

ра (Волгоград, 2015); на рабочем совещании с участием специалистов противочумных институтов и научных организаций Роспотребнадзора «Стандартизация подходов к обеспечению коллекционной деятельности в области использования патогенных микроорганизмов и их молекулярного типирования в учреждениях Роспотребнадзора» (Саратов, 2017).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, из них 3 в периодических изданиях, входящих в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки России», является соавтором в 1 монографии. Получены два патента на изобретения.

Связь работы с научными программами и личный вклад автора в исследования. Работа выполнена на базе лаборатории генодиагностики ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора в рамках плановых научно-исследовательских тем: «Разработка молекулярно-генетических методов типирования штаммов возбудителя гистоплазмоза» в 2013-2017 гг. (шифр 078-3-13, № гос. регистрации 01201351986), в данной теме соискатель являлся ответственным исполнителем и НИР «Разработка тест-систем для молекулярно-генетической детекции возбудителей особо опасных микозов на основе ПЦР» в 2011-2015 гг. (067-6.7-11, № гос. регистрации 01201168590), выполненной в рамках отраслевой научно-исследовательской программы «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации».

Личный вклад автора заключался в планировании экспериментальной работы для решения поставленных задач, изучении полиморфизма геномов штаммов *H. capsulatum* и подборе оптимальных хромосомных локусов для генетического типирования возбудителя гистоплазмоза. В том числе автором был проведен сравнительный анализ последовательностей геномов штаммов возбудителя гистоплазмоза, опубликованных в общедоступных генетических базах данных, выбраны потенциальные мишени для внутривидового типирования штаммов *H. capsulatum*, проведено сравнение дифференцирующей способности различных произвольных праймеров и отработаны параметры ПЦР для получения высокоинформативных RAPD-паттернов, выявлены дифференцирующие последовательности геномов и создан набор олигонуклеотидных праймеров для типирования штаммов возбудителя гистоплазмоза методом DFR. Автором были оптимизированы условия проведения амплификации с разработанными праймерами, осуществлено моно- и мультилокусное сиквенс-типирование коллекци-

онных штаммов *H. capsulatum*; проведены биоинформатическая и статистическая обработка полученных данных, написаны статьи, оформлены патенты. Отдельные этапы исследования выполнены совместно с научными сотрудниками Леденевой М.Л., Абуевой А.И., Батуриным А.А, к.м.н. Савченко С.С., к.б.н. Половец Н.В.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 111 листах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, 4 глав экспериментальных исследований, заключения, выводов и списка литературы, включающего 172 источника, в том числе 6 отечественных и 166 – зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 5 таблицами и 26 рисунками, включает одно Приложение.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы. Объектами исследования служили 21 штамм *H. capsulatum* из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Работу с культурами микромицетов проводили в соответствии с требованиями СП 1.3.3118-13, постановку и учет реакций амплификации и секвенирование – согласно МУ 1.3.2569-09.

ДНК выделяли из клеток мицелиальной формы *H. capsulatum* методом гуанидин-фенольной экстракции с переосаждением ДНК изопропанолом [Вьючнова Н.В. и др., 2009]. Реакцию амплификации проводили на термоциклере «Терцик» (НПФ «ДНК-технология», Москва). Режимы амплификации варьировали в зависимости от решаемых задач. Для проведения RAPD-типирования коллекционных штаммов *H. capsulatum* использовали следующие праймеры: 1281 (5’-AACGCGCAAC-3’), 1283 (5’-GCGATCCCCA-3’), 1253 (5’-GTTTCCGCCC-3’) [Kersulyte D. et al., 1992]. Праймеры синтезированы ЗАО «Синтол» (Москва). Амплификацию ДНК осуществляли с применением «горячего старта» в объеме 25 мкл. Температуру отжига праймеров для амплификации дифференцирующих фрагментов подбирали индивидуально в зависимости от выбранного DFR-локуса *H. capsulatum*. Мультилокусное сиквенс-типирование штаммов возбудителя гистоплазмоза проводили на основе вариабельных участков четырех генов *H. capsulatum* - *h-anti, ole, tub1* и *arf* [Kasuga et al., 1999].

Присутствие специфичных продуктов амплификации, предназначенных для последующего секвенирования детектировали электрофоретическим разделением амплификационной смеси в 1,5 % агарозном геле [Маниатис Т., 1984]. Продукты RAPD-ПЦР разделяли электрофорезом в 3% агарозном геле. Время проведения электрофореза составляло 2 ч. Анализ продуктов ПЦР предназначенных для типирования

методом DFR осуществляли с помощью электрофореза в 2 % агарозном геле, сравнивая их подвижность с подвижностью полос маркеров молекулярного веса. Окрашивание гелей для визуализации в проходящем ультрафиолетовом свете проводили бромистым этидием (0,5 мкг/мл). Определение длины амплифицированного фрагмента ДНК на электрофореграмме осуществляли посредством сравнения положения полосы на геле относительно контрольных маркерных фрагментов. Результат электрофореза документировали с помощью системы «GelDoc XR» (BioRad, США).

Реакцию циклического секвенирования проводили при помощи набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Учет результатов реакции циклического секвенирования осуществляли при помощи генетического анализатора ABI Prism 3130 Genetic Analyzer.

Подбор праймеров для амплификации вариабельных участков геномов штаммов *H. capsulatum* проводили при помощи программы Oligo v.7. Размеры фрагментов определяли с помощью программы RFLPscan 3.12 из пакета программ Gene Profiler 4.03. Для обработки данных *in silico* ДНК-профили представляли в виде бинарной (двоичной) характеристики признаков, где «1» – наличие признака (ампликона определенного размера), «0» – его отсутствие. Анализ нуклеотидных последовательностей проводили при помощи программного пакета Mega 6.06 [Tamura et al., 2013]. Сравнение полученных последовательностей с последовательностями из генетической базы данных GenBank осуществили посредством алгоритма BLASTn [Altschul et al., 1990]. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили при помощи алгоритма ClustalW. Филогенетические деревья были построены на основе невзвешенного парно-группового метода с арифметическим средним (UPGMA) [Michener, Sokal, 1957].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Генотипирование штаммов *Histoplasma capsulatum* на основе амплификации ДНК

Метод ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК (RAPD) широко применяется для внутривидового типирования *H. capsulatum*. Для получения набора паттернов амплификации нами были использованы праймеры 1253, 1281 и 1283 [Kersulyte D., 1992], которые отличались друг от друга по своему GC-составу. В результате ПЦР с ДНК коллекционных штаммов *H. capsulatum* были получены стабильные, воспроизводимые, специфичные RAPD-паттерны. В ходе анализа установлено, что в результате реакции амплификации с праймером 1283 на электрофореграмме зарегистрировано максимально высокое число полос, входящих в паттерн каждого исследу-

емого штамма.

Комбинация праймеров 1253 и 1281 оказалась наиболее предпочтительной для внутривидового типирования коллекционных штаммов *H. capsulatum*. Так, на уровне дифференциации с коэффициентом генетической дистанции - 0,2, формировались 11 групп: I группа – T-3-1, DO-2; T-4; 10-X и C-15; II группа – 28, 510; III группа – 6651, 6650 и B-580; IV группа – 23; V группа – 6652; VI группа – 638; VII группа – 73002; VIII группа – 12/89; IX группа –630, B-681 и BM-87; X группа – 73004; XI группа – J-185-B, J-185-P (100% гомологии) и 1 (рис. 1).

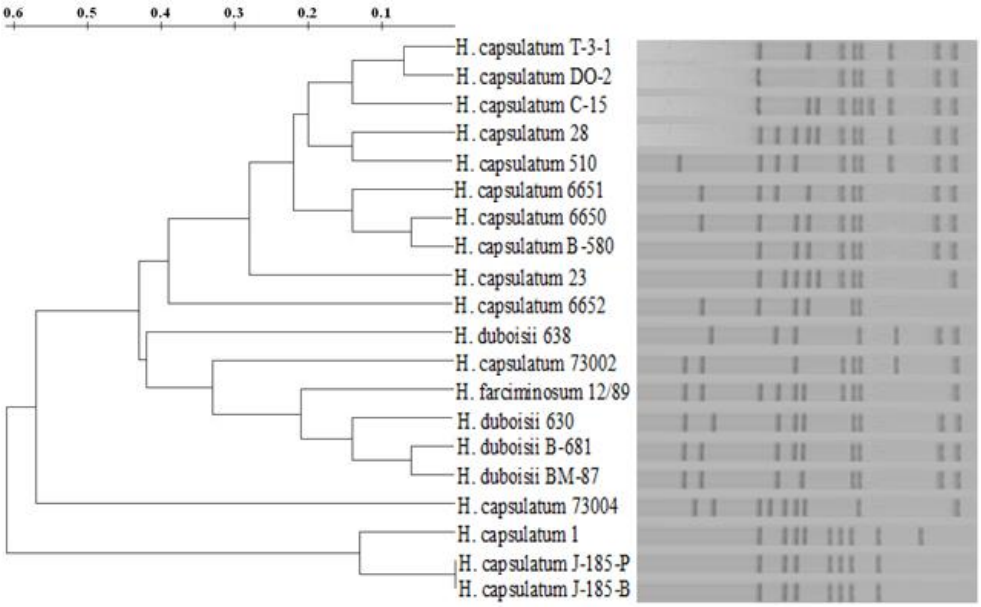


Рисунок 1. Электрофореграмма RAPD-паттернов и дендрограмма сходства штаммов возбудителя гистоплазмоза (амплификация с праймерами 1253 и 1281)

Анализ электрофоретических RAPD-профилей показал, что все коллекционные штаммы *H. capsulatum*, независимо от используемых праймеров, имели коэффициент подобия <40%, что свидетельствует о высокой степени гетерогенности изучаемых штаммов.

В зависимости от праймеров и штаммов было зарегистрировано 12-21 фрагментов ДНК, размер которых находился в пределах от 114 до 1206 п.н. При сравнении RAPD-профилей 20 штаммов возбудителя гистоплазмоза был выявлен только один общий видоспецифический ампликон, полученный при проведении реакции амплификации с комбинацией праймеров 1283 и 1253.

При использовании различных комбинаций праймеров с помощью RAPD установлено, что самой высокой дифференцирующей способностью обладает комбинация праймеров 1281 и 1253. Показано, что при анализе *in silico* объединение бинарных

матриц, полученных по результатам ПЦР с двумя праймерами (1253 и 1281) и праймером 1283, позволяет увеличить разрешающую способность метода (рис. 2). При этом анализ RAPD-паттернов дает возможность определять принадлежность к известным генотипам штаммов *H. capsulatum* при условии, что в наборе анализируемых микромицетов присутствуют охарактеризованные референсные штаммы.

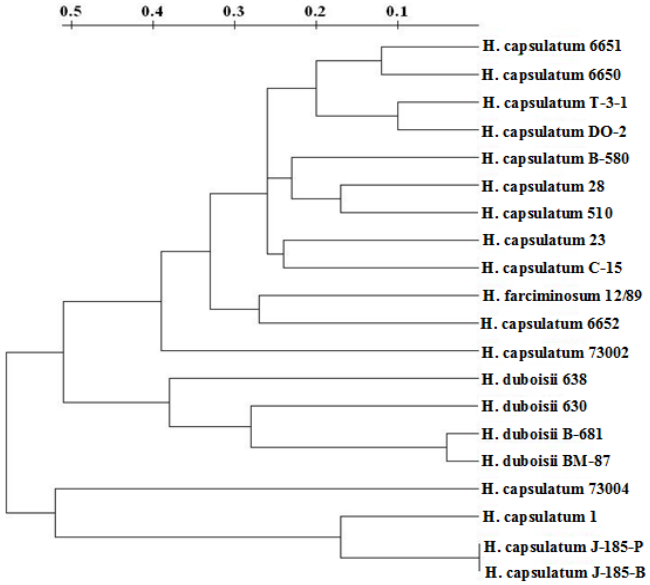


Рисунок 2. Дендрограмма сходства штаммов возбудителя гистоплазмоза, построенная на основе объединения результатов RAPD-типирования с праймером 1283 и комбинацией праймеров 1281+1253

Таким способом удалось получить уникальные паттерны для всех анализируемых штаммов, кроме пары *H. capsulatum* J-185-B и J-185-P. При коэффициенте генетической дистанции 0,4 в отдельные кластеры выделялись штаммы, принадлежащие к генотипам Africa, LAmA, а так же штамм *H. capsulatum var. capsulatum* 73004, принадлежащий к генотипу Linage H81. При коэффициенте генетической дистанции 0,35 отдельные кластеры образовывали штаммы, принадлежащие к генотипу NAm2 и *H. capsulatum var. capsulatum* 73002, чей генотип не был установлен.

Использованный нами подход для генотипирования штаммов *H. capsulatum* методом RAPD продемонстрировал высокую разрешающую способность, сравнимую с результатами МЛСТ. Кластеризация коллекционных штаммов при этом коррелировала с географическим распределением генотипов возбудителя гистоплазмоза. Однако необходимо отметить, что ключевым недостатком метода RAPD является сложность достоверного сравнения результатов, полученных в разных независимых экспериментах, поскольку амплификация фрагментов ДНК крайне чувствительна к изменениям параметров реакции (состава реакционного буфера, температуре отжига и другим).

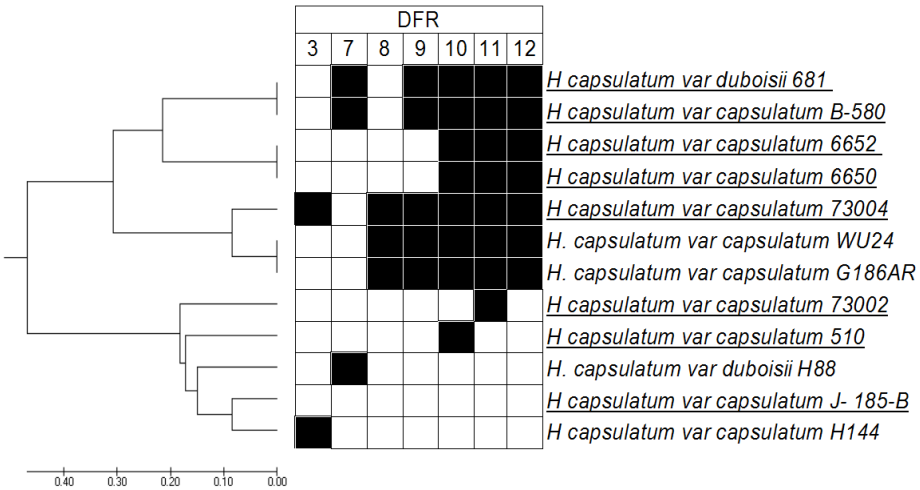
Генетическое типирование штаммов *Histoplasma capsulatum* методом амплификации дифференцирующих фрагментов ДНК (DFR)

Метод амплификации дифференцирующих фрагментов ДНК (DFR), позволяет совместить такие достоинства RAPD как низкая стоимость анализа и доступность оборудования для его проведения, но отличается высокой воспроизводимостью, а также возможностью сопоставления результатов, полученных в различных экспериментальных сериях или лабораториях. Метод DFR часто используют для генотипирования различных микроорганизмов (например, возбудителя чумы, сапа и мелиоидоза [Li Y. et al., 2008; Duangsonk K. et al., 2006], однако, для внутривидовой дифференциации микромицетов *H. capsulatum* он не применялся.

Для поиска дифференцирующих фрагментов нами было проведено сравнение геномов 4 штаммов *H. capsulatum* WU24 (генотип NAm1), *H. capsulatum* G186AR (Панамская группа), H. *capsulatum* H143 и *H. capsulatum* H88 (Африканская группа) из базы данных Broad Institute of MIT and Harvard [https://www.broadinstitute.org/fungal-genome-initiative/histoplasma-genome-project, 2013] при помощи алгоритма DotPlot. В результате были отобраны 5 крупных вариабельных участков геномов *H. capsulatum*. Размер этих областей варьировал в пределах от 1,0 до 1,5 м.п.н. Последовательности отобранных регионов делили на фрагменты длиной по 1000 нуклеотидов и в дальнейшем использовали для поиска вариабельных локусов. Для дальнейшего поиска вариабельных фрагментов генома возбудителя гистоплазмоза был использован алгоритм локального выравнивания последовательностей нуклеиновых кислот BLASTn, встроенный в структуру сайта Broad Institute of MIT and Harvard. В поле для ввода вносили последовательности референсного штамма *H. capsulatum* WU24 длиной в 1000 п.о. Критерием отбора последовательности было наличие определенной длины фрагмента (в пределах от 200 до 1000 п.н.) и степени гомологии, не превышающей 85-90%. Высоко гомологичные последовательности (> 90 %) не использовали по причине низкого содержания однонуклеотидных замен в участках цепи ДНК и, следовательно, непригодности для дифференциации штаммов *H. capsulatum*. Последовательность, которая удовлетворяла заданным требованиям, заносили в библиотеку дифференцирующих регионов для соответствующего штамма. Получаемые данные фиксировали и сохраняли в файлах формата fasta.

Для каждого штамма *H. capsulatum*, представленного в базе данных Broad Institute была построена таблица, в которой указывали предполагаемые паттерны дифференцирующих фрагментов. Наибольшее число дифференцирующих фрагментов об-

наружено для штаммов *H. capsulatum* G186AR и H. *capsulatum* H 88. Для каждого из этих штаммов было найдено по 54 вариабельных региона, длина которых варьировала в диапазоне от 235 до 640 оснований. Поиск также позволил получить 50 дифференцирующих фрагментов для штамма *H. capsulatum* H 143 и 46 фрагментов - для штамма *H. capsulatum* WU24, длина которых варьировала в пределах от 283 до 932 нуклеотидов. В результате сравнительного анализа геномных последовательностей была создана библиотека, состоящая из 204 вариабельных регионов *H. capsulatum*. Далее, для амплификации дифференцирующих фрагментов было сконструировано 32 пары олигонуклеотидных затравок, из которых для внутривидового типирования методом DFR подобран набор праймеров для амплификации 7 вариабельных локусов. Нами были отобраны 3 локуса штамма *H. capsulatum*, принадлежащих генотипу NAm2 и по одному локусу характерных для представителей генотипов LAmA, Africa, Linage H81 и штамму *H. capsulatum* 73002, для которого генотип не был определен методом МЛСТ. Для апробации метода DFR выбраны 8 коллекционных штаммов *H. capsulatum*, которые на основании секвенирования отличались по географическому происхождению. DFR-профили исследуемых штаммов были дополнены профилями, полученными при анализе *in silico* четырех штаммов *H. capsulatum* (WU24, G186AR, H88, H144), геномы которых доступны в базе данных Broad Institute of MIT and Harvard. Анализ паттернов амплификации методом DFR показал, что 8 коллекционных штаммов *H. capsulatum* образуют 6 отдельных групп. При этом две группы содержали по два штамма, 4 штамма обладали уникальными DFR-профилями, что доказывало эффективность применения метода DFR для внутривидовой дифференциации *H. capsulatum* (рис. 3) .



Закрашенные ячейки соответствуют наличию ампликона, белые – его отсутствию.
Подчеркиванием обозначены штаммы из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Рисунок 3. Дендрограмма и DFR-профили штаммов *H. capsulatum*

Таким образом, разработанный методический подход на основе DFR с использованием сконструированного набора олигонуклеотидных праймеров для амплификации 7 вариабельных локусов показал эффективность применения для внутривидовой дифференциации штаммов *H. capsulatum*.

Генетическое типирование штаммов *Histoplasma capsulatum* с использованием секвенирования

Для определения генотипов коллекционных штаммов возбудителя гистоплазмоза использовали мультилокусное сиквенс-типирование на основе четырех генов (АДФ-рибозилирующий фактор - *arf*, предшественник Н-антигена - *h-anti*, жирнокислотная десатураза - *ole1* и альфа-тубулин - *tub1*), предложенное T. Kasuga et al. (1999).

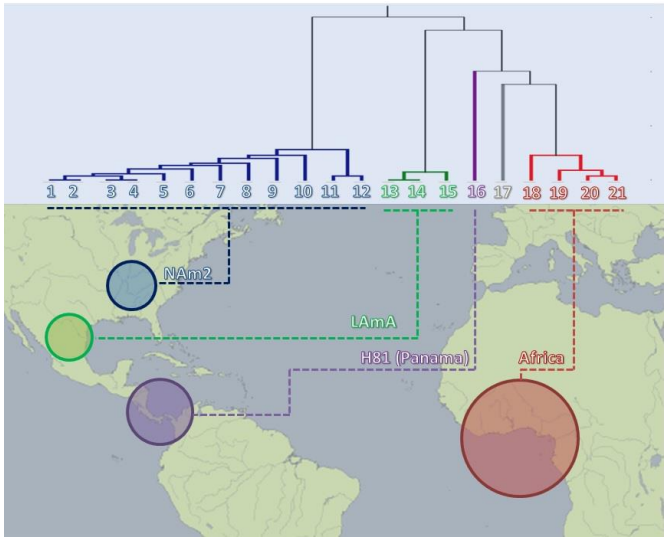
В результате секвенирования и последующего филогенетического анализа установлено, что локусом, обладающим наибольшей дифференцирующей способностью по отношению к исследуемым микромицетам *H. capsulatum,* является *arf*, позволивший разделить коллекционные штаммы на 11 групп, локус *h-anti* - 9 групп. Анализ последовательностей локусов *tub1* и *ole* позволил разделить коллекционные штаммы на 5 групп каждый. Использование любого из четырех локусов позволяло устанавливать генотипы каждого из анализируемых штаммов *H. capsulatum*, кроме *H. capsulatum var. capsulatum* 73002. При сравнительном анализе всех локусов данного штамма с последовательностями из генетической базы данных GenBank, так и не удалось отыскать референсной последовательности, которая позволила бы установить генотип и регион происхождения данного штамма. Проведенный нами филогенетический анализ показывает, что наиболее близкими к нему оказались штаммы *H. capsulatum var. duboisii*.

Филогенетический анализ объединенных нуклеотидных последовательностей четырех локусов позволил получить уникальные характеристики для всех коллекционных штаммов, кроме пар *H. capsulatum var. capsulatum* 510 и B-580, *H. capsulatum var. capsulatum* T-3-1 и DO-2, а так же *H. capsulatum var. capsulatum* J-185-P и 1.

Сравнение нуклеотидных последовательностей, полученных в результате секвенирования локусов исследованных штаммов *H. capsulatum* с последовательностями участков генов штаммов, депонированных в базе данных GenBank NCBI, выделенных в различных регионах мира, позволило установить генотипы коллекционных штаммов, а так же выявить места их происхождения (рис 4).

Проведенное МЛСТ позволило разделить коллекционные штаммы возбудителя гистоплазмоза на 18 отдельных групп. В работе было установлено, что 11 коллек-

ционных штаммов *H. capsulatum var. capsulatum* и *H. capsulatum var. farciminosum* 12/89 принадлежат к североамериканскому генотипу 2 (NAm2), 3 штамма *H. capsulatum var. capsulatum* принадлежат к латиноамериканскому генотипу А (LAmA) и один коллекционный штамм принадлежал панамскому генотипу (linage H81). Все коллекционные штаммы *H. capsulatum var duboisii* принадлежали к африканскому генотипу (Africa). Установить генотип штамма *H. capsulatum var capsulatum* 73002 не удалось. Всеми использованными методами типирования этот штамм был отнесен в отдельную группу, близкую к представителям африканского генотипа.



1. *Hcc* 510, 2. *Hcc* B-580, 3. *Hcc* T-3-1, 4. *Hcc* DO-2, 5. *Hcc* 23, 6. *Hcc* 6652, 7. *Hcc* 6651, 8. *Hcc* C-15, 9. *Hcc* 6650, 10. *Hcf* 12/89, 11. *Hcc* 28, 12. *Hcc* 22, 13. *Hcc* J-185-P, 14. *Hcc* 1, 15. *Hcc* J-185-B, 16. *Hcc*73004, 17. *Hcc* 73002, 18. *Hcd* 638, 19. *Hcd* 630, 20. *Hcd* B-681, 21. *Hcd* BM-87

Примечание: *Hcc - H. capsulatum var. capsulatum; Hcd - H. capsulatum var. duboisii, Hcf - H. capsulatum var. farciminosum*

Рисунок 4. Дендрограмма сходства объединенных нуклеотидных последовательностей фрагментов генов *arf, h-anti, ole, tub,* совмещенная с географическим регионом происхождения исследованных штаммов

Наибольшей гомологией с последовательностями коллекционных штаммов, отнесенных к генотипу NAm2, обладали изоляты из США (штаты Миссури, Индиана и Алабама); к генотипу LAmA – из Мексики и штата Техас (США), к Linage H81 – изоляты из Панамы, к генотипу Africa – штаммы *H. capsulatum var. duboisii* из Либерии и Заира.

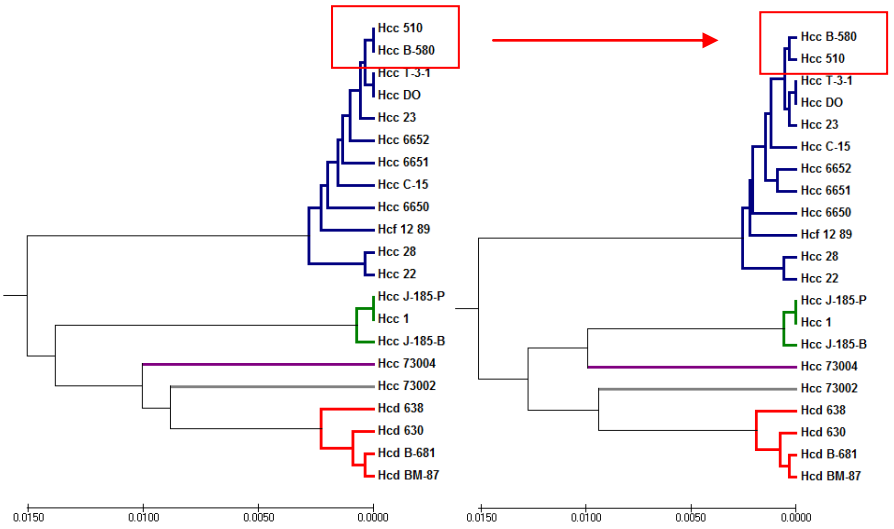
Следует отметить, что принадлежность *H. capsulatum var. farciminosum* 12/89 к генотипу NAm2 соответствует данным, представленным в литературных источниках. Так, в работе T. Kasuga с соавторами (2003) было показано, что вариант *H. capsulatum var. farciminosum* это совокупность различных генотипов *H. capsulatum*, объединенных способностью вызвать заболевание у лошадей и мулов.

Примечательно, что филогенетический анализ последовательностей каждого локуса в отдельности хоть и обладал меньшей разрешающей способностью, чем МЛСТ, но, тем не менее, позволял определять генотипы штаммов *H. capsulatum*. Несмотря на высокую разрешающую способность метода МЛСТ с использованием локусов *arf, h-anti, ole* и *tub*, нам не удалось получить уникальной характеристики для каждого коллекционного штамма *H. capsulatum*. Поэтому был проведен поиск локуса, позволяющего увеличить дифференцирующую способность МЛСТ и дополнить существующую схему данного метода.

Основным требованием к потенциальной мишени для МЛСТ является ее обязательное наличие у всех штаммов вида, в связи с чем, как правило, для типирования используют гены «домашнего хозяйства». При этом последовательность должна обладать достаточной внутривидовой вариабельностью. Перечисленным требованиям соответствовал ген *ms8*, кодирующий специфический для мицелиальной фазы белок MS8 (mold-specific MS8 protein) *H. capsulatum*, который участвует в образовании клеточной стенки гиф, придавая ей гидрофильность и гибкость. Важность белков MS8 для функционирования клеток возбудителя гистоплазмоза позволяет предположить, что кодирующий их ген представлен во всех штаммах данных микромицетов [Tian X., Shearer G., 2002].

Для амплификации и последующего секвенирования анализируемого локуса *ms8* были использованы праймеры, разработанные ранее Вьючновой с соавторами [Вьючнова Н. В. и др., 2012]. Нами была выбрана комбинация прямого *HcMs8s* и обратного *HcMs8as* праймеров, обеспечивающих амплификацию фрагмента гена *ms8* максимальной длины. Секвенирование локуса *ms*8 коллекционных штаммов *H. capsulatum* продемонстрировало его высокая внутривидовая вариабельность, которая позволила, используя монолокусное секвенирование, разделить микромицеты *H. capsulatum* на 8 отдельных групп. При этом при коэффициенте генетической дистанции равном 0,004 штаммы с установленными генотипами NAm2, Africa, а так же *H. capsulatum var. capsulatum* 73002, формировали отдельные кластеры, а при коэффициенте генетической дистанции равном 0,0015 – генотипы LAmA и Linage H81.

В работе установлено, что включение локуса *ms*8 в принятую схему МЛСТ позволило повысить разрешающую способность метода и получить уникальные характеристики для штаммов *H. capsulatum var. capsulatum* 510 и B-580, тем самым число уникальных групп, образованных коллекционными штаммами *H. capsulatum* увеличилось до 19 (рис. 5).



А Б

Цветом ветвей дендрограммы обозначена принадлежность к определенному генотипу (■ - NAm2, ■ - Africa, ■ - LAmA, ■ - генотип H81 (Panama), ■ - генотип не установлен).
Примечание: Hcc – *H. capsulatum var. capsulatum*, Hcd – *H. capsulatum var. duboisii*, Hcf – *H. capsulatum var. farciminosum*

Рисунок 5 - Дендрограмма сходства на основе объединенных нуклеотидных последовательностей фрагментов генов *arf, h-anti, ole, tub* (А) и с добавлением локуса *ms8* (Б) коллекционных штаммов *H. capsulatum*

Таким образом, в результате проведенной работы по внутривидовому типированию возбудителя гистоплазмоза установлена высокая внутривидовая вариабельность гена *ms8* у микромицетов *H. capsulatum,* что позволяет рекомендовать его для включения в схему типирования методом секвенирования и увеличить разрешающую способность метода МЛСТ. Разработан набор олигонуклеотидных праймеров для типирования штаммов возбудителя гистоплазмоза методом амплификации дифференцирующих фрагментов ДНК *H. capsulatum*. Продемонстрирована высокая дифференцирующая способность метода RAPD в случае применения предложенного нами методического подхода постановки реакций амплификации и последующего анализа данных. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей локусов, используемых в схеме МЛСТ, коллекционных штаммов с последовательностями микромицетов, представленных в генетической базе данных GenBank NCBI, позволил установить генотипы и места происхождения всех исследуемых штаммов, кроме штамма *H. capsulatum* 73002. Можно предположить, что данный штамм принадлежит к ранее не охарактеризованному генотипу возбудителя гистоплазмоза, однако учитывая отсутствие сведений о месте его выделения, необходимо продолжить выделение и изучение новых штаммов из объектов окружающей среды различных геогра-

фических регионов.

Разработанные методические подходы могут быть использованы для выявления возможных источников инфекции во время вспышек гистоплазмоза специалистами референс-центров по мониторингу за возбудителями инфекционных болезней, а также научно-исследовательских организаций эпидемиологического и микробиологического профиля.

Выводы

1. Показано, что комбинирование *in silico* результатов ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК с использованием двух праймеров и однопраймерной RAPD позволяет получить наибольшее число характеристических паттернов и увеличить дифференцирующую способность метода при типировании микромицетов *H. capsulatum.*
2. Обнаружены дифференцирующие фрагменты геномов *H. capsulatum*, для амплификации которых сконструированы 7 пар олигонуклеотидных праймеров, что позволило провести генотипирование коллекционных штаммов *H. capsulatum* методом DFR и продемонстрировать его эффективность для внутривидовой дифференциации возбудителя гистоплазмоза.
3. Проведен сравнительный анализ секвенированых последовательностей фрагмента гена *ms8* штаммов *H. capsulatum*, выявлены в его структуре 13 сайтов однонуклеотидных замен, 4 сайта вставки/делеции, что свидетельствует о высоком уровне внутривидового полиморфизма данного локуса и позволяет использовать его для сиквенс-типирования возбудителя гистоплазмоза.
4. Добавление локуса *ms8* к объединенным последовательностям фрагментов генов *arf, h-anti, ole, tub* позволяет повысить эффективность внутривидовой дифференциации микромицетов *H. capsulatum* методом МЛСТ.
5. Методом мультилокусного сиквенс - типирования установлено, что штаммы из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора принадлежат к генотипам NAm2 (11 штаммов *H. capsulatum var. capsulatum* и 1 *H. capsulatum var. farciminosum*), Africa (4 штамма *H. capsulatum var. duboisii*), LAmA (3 штамма *H. capsulatum var. capsulatum*) и H81(Panama) (1 штамм *H. capsulatum var. capsulatum*). Штамм *H. capsulatum var. capsulatum* 73002 не относится ни к одному из известных генотипов и потенциально является представителем нового, ранее не охарактеризованного генотипа.

Практические рекомендации

1. Методические подходы, разработанные в ходе выполнения данной работы, на основе RAPD, DFR и МЛСТ могут быть использованы для выявления возможных источников инфекции во время вспышек гистоплазмоза специалистами референс-центров по мониторингу за возбудителями инфекционных болезней, а также научно-исследовательских организаций эпидемиологического и микробиологического профиля.

2. Для получения уникальных характеристик штаммов *H. capsulatum* и установления генотипа можно рекомендовать сочетание разработанного подхода на основе RAPD и секвенирование локуса *arf*, обладающего наибольшей дифференцирующей способностью среди всех исследованных локусов.

Перспективы дальнейшей разработки темы

1. Добавление дополнительных вариабельных регионов к предложенной схеме DFR-типирования позволит увеличить дифференцирующую способность метода.

2. Применение высокопроизводительного секвенирования геномов *H. capsulatum* позволит разрешить накопившиеся разногласия в принятой на сегодняшний день систематике вида.

3. Использование новых подходов типирования на основе МЛСТ, таких как мультилокусное сиквенс-типирование на основе последовательностей «коровых» генов и полного набора последовательностей генов позволит наиболее точно охарактеризовать внутривидовое многообразие микромицетов *H. capsulatum.*

Список работ, опубликованных по теме диссертации

статьи

1. Шаров, Т.Н. Сравнительная характеристика методов типирования микроскопических грибов / Т.Н. Шаров, М.А. Гришина, Г.А. Ткаченко, **И.М. Шпак** // Проблемы медицинской микологии. - 2012. - Т. 14. № 2. - С. 18-24.**(журнал из Перечня ВАК)**

2. **Шпак, И.М** Разработка схемы генотипирования возбудителя гистоплазмоза методом амплификации дифференцирующих регионов / **И.М. Шпак**, М.Ш. Айгумов, Г.А. Ткаченко, В.А. Антонов // Проблемы медицинской микологии. – 2013. - Т.15, №2. – С.142. **(журнал из Перечня ВАК)**

3. Леденева, М.Л. Изучение генетического полиморфизма коллекционных штаммов *Histoplasma capsulatum* s. Darling с помощью реакции амплификации с произвольными праймерами / М.Л. Леденева, Г.А. Ткаченко, **И.М. Шпак**, Н.В. Вьючнова, М.А. Гришина, В.А. Антонов // Проблемы медицинской микологии. - 2013. - Т. 15. №3.

- С. 48-54. **(журнал из Перечня ВАК)**

4. **Шпак, И.М.** Внутривидовая дифференциация штаммов возбудителя гистоплазмоза методом мультилокусного сиквенс-типирования / **И.М. Шпак**, М.Л. Леденева, С.С. Савченко, Г.А. Ткаченко, Н.В. Вьючнова, В.А. Антонов // Успехи медицинской микологии. - 2014. - Т. 13. - С. 25-27.

5. Маркин, А.М. Идентификация возбудителей особо опасных микозов с использованием секвенирования ДНК / А.М. Маркин, Г.А. Ткаченко**, И.М. Шпак**, С.С. Савченко, Н.В. Вьючнова, Т.Н. Шаров, В.А. Антонов // Успехи медицинской микологии. - 2016. - Т. 15. - С. 76-78.

монография

6. Антонов В.А., Особо опасные микозы / В.А. Антонов, А.В. Липницкий, В.С. Лесовой, М.А. Гришина, Г.А. Ткаченко, Д.В. Викторов, Н.В. Вьючнова, **И.М. Шпак,** Т.Н. Шаров, А.М. Маркин, Е.Н. Кочубеева; под ред. В.В. Малеева. - Волгоград: Волга-Паблишер, 2013. - 193 с.

тезисы

7. **Шпак, И.М** Типирование штаммов *Histoplasma capsulatum* на основе амплификации с произвольными праймерами / **И.М. Шпак**, С.С. Савченко, Г.А. Ткаченко, В.А. Антонов, М.А. Гришина, Н.В. Вьючнова // Молекулярная диагностика – 2010: Сборник трудов VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – М., 2010. – Т. 1. – С. 456-457.

8. Леденева, М.Л. Внутривидовое типирование штаммов возбудителя гистоплазмоза методом амплификации с произвольными праймерами / М.Л. Леденева, **И.М. Шпак** // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины: Материалы 69-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием / Под ред. акад. В. И. Петрова. – Волгоград, 2011. - С. 173-174.

9. **Шпак, И.М.** Внутривидовое типирование микромицетов *Histoplasma capsulatum* с использованием секвенирования / **И. М. Шпак**, Г. А. Ткаченко, Н.В. Вьючнова, М.Л. Леденева, М.А. Гришина, В.А. Антонов // Современные технологии обеспечения биологической безопасности: Материалы III научно-практической школы-конференции молодых ученых и специалистов научно-исследовательских организаций Роспотребнадзора – Оболенск, 31 мая - 2 июня 2011 г. - С.148-150.

патенты на изобретения

1. Патент 2631935 Российская Федерация, МПК C12Q1/68 Набор

олигонуклеотидных праймеров для идентификации медицински значимых микромицетов методом секвенирования ДНК / А.М. Маркин, **И.М. Шпак**, С.С. Савченко, Г.А. Ткаченко, В.А. Антонов, заявитель и патентообладатель Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – № 2016132273; заявл. 04.08.2016; опубл. 28.09.2017, Бюл. №28.

2. Патент 2650752 Российская Федерация, МПК C12Q1/68 Набор олигонуклеотидных праймеров для типирования штаммов возбудителя гистоплазмоза *Histoplasma capsulatum* методом амплификации дифференцирующих фрагментов ДНК (DFR) / **И.М. Шпак**, Г.А. Ткаченко, М.Л. Леденева, С.С. Савченко, Н.В. Половец, В.А. Антонов, заявитель и патентообладатель Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – № 2017104384; заявл. 09.02.2017; опубл. 17.04.2018, Бюл. №11.

Список сокращений

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; МЛСТ – мультилокусное сиквенс- типирование; м.п.н. – миллионы пар нуклеотидов; п.н. – пары нуклеотидов; ПЦР – полимеразная цепная реакция; СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита; BLAST – Basic Local Alignment Searching Tool; DFR – Different region analysis (анализ дифференцирующих регионов); NCBI – National Center for Biotechnology Information, USA; RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA (амплификация ДНК с произвольными праймерами); UPGMA – Unweighted pair-group method using arithmetic averages (невзвешенный парно-групповой метод с арифметическим средним).