

И.В.Новицкая<sup>1</sup>, Е.В.Прохватилова<sup>1</sup>, А.В.Топорков<sup>1</sup>, Д.В.Викторов<sup>1</sup>, М.Я.Кулаков<sup>1</sup>, Е.В.Савина<sup>1</sup>,  
В.Г.Пушкар<sup>1</sup>, Л.И.Белицкая<sup>1</sup>, Н.А.Осина<sup>2</sup>, Ж.А.Касьян<sup>2</sup>, И.В.Шульгина<sup>2</sup>, О.А.Лобовикова<sup>2</sup>

## ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ЭРИТРОЦИТАРНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНОВОГО ДИАГНОСТИКУМА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО ОПАСНЫХ (ГЛУБОКИХ) МИКОЗОВ

<sup>1</sup>ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград; <sup>2</sup>ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

**Целью** работы является оценка и диагностической чувствительности и специфичности «Набора реагентов. Диагностикум эритроцитарный кокцидиоидомикозный и гистоплазмозный иммуноглобулиновый сухой», предназначенного для идентификации возбудителей кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза в выделенных культурах микромицетов, а также клиническом и биологическом материале с помощью РНГА. **Материалы и методы.** С использованием предложенного диагностикума проведено исследование 264 положительных проб (216 проб суспензий микромицетов, 48 проб биологического и клинического материала), содержащих возбудители гистоплазмоза, кокцидиоидомикоза в концентрации  $3,12 \cdot 10^6$  и  $1,56 \cdot 10^6$  кл/мл и 128 отрицательных проб, содержащих гетерологичные микроорганизмы в концентрации  $5 \cdot 10^7$  кл/мл. В работе использовали пробы биологического материала, искусственно контаминированные данными возбудителями особо опасных микозов, и полученные от биопробных животных с экспериментальной инфекцией. **Выводы и результаты.** Установлено, что диагностическая чувствительность набора реагентов составила не менее 99,0 %, диагностическая специфичность – не менее 98,0 %. Воспроизводимость результатов во всех случаях 100 %. Полученные результаты указывают на перспективность внедрения разработанного препарата в практику здравоохранения.

**Ключевые слова:** кокцидиоидомикоз, гистоплазмоз, РНГА, набор реагентов.

Корреспондирующий автор: Новицкая Ирина Вячеславовна, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

I.V.Novitskaya<sup>1</sup>, E.V.Prokhvatilova<sup>1</sup>, A.V.Toporkov<sup>1</sup>, D.V.Viktorov<sup>1</sup>, M.Ya.Kulakov<sup>1</sup>, E.V.Savina<sup>1</sup>, V.G.Pushkar<sup>1</sup>,  
L.I.Belitskaya<sup>1</sup>, N.A.Osina<sup>2</sup>, Zh.A.Kas'yan<sup>2</sup>, I.V.Shul'gina<sup>2</sup>, O.A.Lobovikova<sup>2</sup>

## Diagnostic Potential of the Erythrocytic Immunoglobulin Diagnosticum for Indication and Identification of the Causative Agents of Particularly Dangerous (Deep) Mycoses

<sup>1</sup>Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, Russian Federation; <sup>2</sup>Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

**Objective** of the study was to assess analytical and diagnostic sensitivity and specificity of the "Reagent kit. Erythrocytic coccidioidomycosal and histoplasmosal immunoglobulin dry diagnosticum", designed for identification of causative agents of coccidioidomycosis and histoplasmosis in isolated cultures of micromycetes, as well as in clinical and biological samples using indirect hemagglutination test. **Materials and methods.** The investigation included 264 positive samples (216 samples of micromycete suspensions, 48 samples of biological and clinical material) containing pathogens of histoplasmosis and coccidioidomycosis concentrated up to  $3,12 \cdot 10^6$  and  $1,56 \cdot 10^6$  cells/ml, respectively, and 128 negative samples containing heterologous microorganisms in concentrations equal to  $5 \cdot 10^6$  cells/ml. The study was carried out using biological samples that were artificially contaminated with stated pathogens of particularly dangerous mycoses and samples, obtained from bioassay animals with experimental infection. **Results and conclusions.** It is established that diagnostic sensitivity of the reagent kit is not less than 99,0 %. The diagnostic specificity is not less than 98,0 %. Reproducibility of the results in all cases was 100 %. The results obtained testify to the prospect of introduction of the developed kit into the health care practice.

**Key words:** coccidioidomycosis, histoplasmosis, indirect hemagglutination test, reagent kit.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Corresponding author:** Irina V. Novitskaya, e-mail: .....

**Citation:** Novitskaya I.V., Prokhvatilova E.V., Toporkov A.V., Viktorov D.V., Kulakov M.Ya., Savina E.V., Pushkar V.G., Belitskaya L.I., Osina N.A., Kas'yan Zh.A., Shul'gina I.V., Lobovikova O.A. Diagnostic Potential of the Erythrocytic Immunoglobulin Diagnosticum for Indication and Identification of the Causative Agents of Particularly Dangerous (Deep) Mycoses. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 3:75–79. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-75-79

Кокцидиоидомикоз и гистоплазмоз – инфекционные болезни, вызываемые особо опасными диморфными грибами II группы патогенности *Coccidioides sp.* и *Histoplasma sp.* Восприимчивость человека к возбудителям этих инфекций считается всеобщей. В настоящее время вследствие расширения миграционных потоков, туристических связей и дру-

гих возможностей коммуникации населения случаи заболевания кокцидиоидомикозом и гистоплазмозом регистрируют во многих странах мира. Присутствие возбудителей особо опасных микозов среди потенциальных агентов биотерроризма еще более актуализирует проведение исследований, направленных на их индикацию и идентификацию [3]. В связи с

этим конструирование и последующая регистрация в Российской Федерации диагностических наборов и тест-систем для обнаружения возбудителей кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза в пробах окружающей среды и при выявлении клинических случаев болезни является одним из приоритетных направлений отечественного здравоохранения.

В соответствии с приказом Роспотребнадзора № 88 от 17.03.2008 «О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней» (<http://vnipchi.rospotreb-nadzor.ru>) на базе ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» сформирован Референс-центр по мониторингу за возбудителями глубоких микозов. В его задачи входит изучение биологических, иммунологических, молекулярно-генетических характеристик данных возбудителей, а также разработка и совершенствование диагностических препаратов, прежде всего экспрессной направленности, для их выявления и идентификации.

Иммуноанализ с помощью РНГА позволяет получить предварительный результат через 3–4 ч от начала исследования [2], что является как своевременным в определении тактики ведения больного, так и экономически выгодным и целесообразным с точки зрения дифференциальной диагностики особо опасных микозов и бактериальных или вирусных инфекций. Специалистами Волгоградского научно-исследовательского противочумного института ранее разработан «Набор реагентов. Диагностикум эритроцитарный кокцидиоидомикозный и гистоплазмозный иммуноглобулиновый сухой», который позволяет обнаружить антигены микромицетов *Coccidioides sp.* и *Histoplasma sp.* в выделенных культурах микроскопических грибов, а также биологических пробах и пробах клинического материала (преимущественно мокроты, промывной жидкости бронхов, сыворотки крови, секционного материала) с помощью РНГА. Для внедрения данного препарата в практику необходима оценка его диагностической чувствительности и специфичности при исследовании различного вида материала, в том числе полученного от животных с экспериментальным кокцидиоидомикозом и гистоплазмозом.

### Материалы и методы

Диагностикум эритроцитарный кокцидиоидомикозный и гистоплазмозный иммуноглобулиновый сухой был получен на основе иммуноглобулинов гипериммунной кокцидиоидомикозной и гистоплазмозной агглютинирующей козьей сыворотки [1]. Лиофилизацию препарата проводили по десятиступенчатой программе при плавном подъеме вакуума в камере в течение 18–20 ч [4]. В состав среды высушивания входили реополиглоктин (15 %), сахараза (7,5 %) в воде очищенной.

Постановку РНГА и РТНГА осуществляли в

макро- и микровариантах по стандартной методике в соответствии с инструкцией к препарату [2, 3]. Диагностикум растворяли в 0,15 М растворе натрия хлорида рН (7,2±0,2), содержащем 1 % формалина до конечной концентрации 1 %, и выдерживали 4 ч при температуре (22±2) °С. Проведение РТНГА осуществляли с помощью имеющейся в наборе сыворотки кокцидиоидомикозной агглютинирующей козьей в ее разведении 1:500. Учет результатов РТНГА проводили через (2,0±0,5) ч. Результаты РНГА считали специфичными, если в РТНГА агглютинация отсутствовала или наблюдалась в меньшем (не менее чем на 3–4) числе лунок, чем это имело место в РНГА.

Для контроля чувствительности и специфичности диагностикума при проведении клинических испытаний использовали: 26 штаммов возбудителей кокцидиоидомикоза (8 – *C. posadasii*, 18 – *C. immitis*); 18 – *H. capsulatum*; 4 – *H. capsulatum var. duboisii*; 1 – *H. capsulatum var. farciminosum*; 5 – *H. capsulatum* в дрожжевой фазе роста); 29 штаммов гетерологичных микроорганизмов микотической и бактериальной природы, включая 5 условно-патогенных дрожжеподобных грибов (*Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans 4N*, *Cryptococcus neoformans 9/22*, *Rhodotorula mucilaginosa*); 17 – нитчатых грибов и дерматомицетов III–IV групп патогенности (*Absidia (Mycocladius) hyalospora*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium sambucinum*, *Gibberella zeae*, *Geotrichum candidum*, *Malbranchea manginii*, *Paecilomyces variottii*, *Penicillium citreoviridae*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium chrysogenum*, *Phialophora verrucosa*, *Rhizopus microsporus*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Trichophyton crateriforme*); а также 5 бактериальных штаммов ПБА II группы патогенности – *Brucella suis*, *Yersinia sp.* (*Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*), *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei*. Все штаммы получены из коллекций культур ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт».

Обеззараженные культуры возбудителей кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза, а также гетерологичных микроорганизмов использовали в микроварианте РНГА в концентрациях  $1 \cdot 10^8$  и  $4 \cdot 10^8$  кл/мл соответственно.

Методом сравнения являлся микологический анализ, предусматривающий выделение культур после посева штаммов до их инактивации на соответствующие плотные питательные среды из разведения  $1 \cdot 10^5$  кл/мл, с последующим доказательством диморфизма микромицетов.

Дополнительно для исследования были отобраны образцы сывороток крови и суспензии органов (легкие, печень и селезенка) белых мышей линии BALB/c с экспериментальным кокцидиоидомикозом и гистоплазмозом, а также пробы сыворотки крови человека, мокроты, промывной жидкости бронхов, искусственно контаминированных *C. posadasii*, *C. immitis*, *H. capsulatum*, гетерологичными микроорганизмами.

мами (*P. citreoviridae*, *C. neoformans*, *B. pseudomallei* и др.) до конечной концентрации  $3,12 \cdot 10^6$  кл/мл.

Статистическую достоверность полученных результатов испытаний оценивали в зависимости от числа параллельных опытов при доверительной вероятности 90 %, используя формулу биномиального распределения Бернулли в соответствии с «Методическими рекомендациями по порядку проведения экспертизы качества, эффективности и безопасности медицинских изделий» от 14.11.2013 г., приложение Е.

### Результаты и обсуждение

Возбудители кокцидиоидомикоза – грибы вида *Coccidioides immitis*, считавшегося до недавнего времени единым, но по результатам молекулярно-генетической таксономии, были четко разделены на два: калифорнийский и некалифорнийский варианты – *Coccidioides immitis* и *Coccidioides posadasii* соответственно. Фенотипически *C. immitis* и *C. posadasii* оказались практически идентичны, так как геномы этих видов отличаются преимущественно лишь некодирующими последовательностями [6].

Род *Histoplasma* включает три варианта штаммов с широкой внутривидовой вариабельностью, отличающихся географическим распространением и особенностями клинического течения вызываемых ими болезней – *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii*, *Histoplasma capsulatum* var. *farcinosum*. Различия между этими видами подтверждены секвенированием спейсерных областей их хромосомных ДНК [5].

Близкое генетическое родство возбудителей особо опасных микозов объясняет трудности их дифференциации, определяет возможность создания препаратов для их одномоментного выявления, что принципиально для подтверждения микотической природы заболевания. Основываясь на этом, проведена работа по созданию «Набора реагентов. Диагностикум эритроцитарный кокцидиоидомикозный и гистоплазмозный иммуноглобулиновый сухой», основу которого составили иммуноглобулины гипериммунной кокцидиоидомикозной и гистоплазмозной агглютинирующей козьей сыворотки.

Для получения высокоактивной агглютинирующей козьей иммунной сыворотки использовали референтные штаммы возбудителей данных особо опасных микозов из уникальной коллекции микромицетов ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», включающей культуры, полученные как из микологических лабораторий отечественных учреждений здравоохранения, так и из ведущих институтов США.

Выбор коз в качестве продуцентов обусловлен высоким уровнем белка в козьих сыворотках (до 60–70 мг%), а также возможностью их длительной (до 2 лет и больше) иммунизации. Отбор сыворотки проводили после каждого двухмесячного цикла, титр

кокцидиоидомикозных и гистоплазмозных антител определяли по результатам РИД, а также РНГА с антигенным эритроцитарным гистоплазмозным диагностикумом (экспериментальные серии). Наиболее активные сыворотки (с титром в РИД от 1:32–1:64 и выше, в РНГА от 1:25000) использовали для выделения из них иммуноглобулиновой фракции.

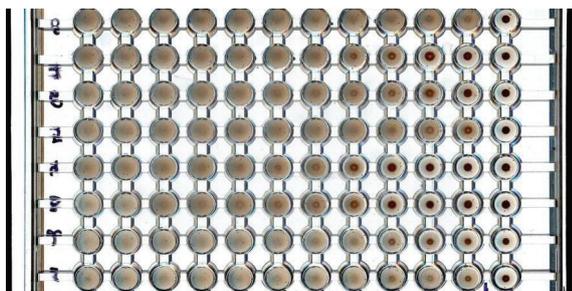
Эритроциты, как биологические носители, требуют щадящих условий обработки их поверхности, в связи с чем все этапы (формалинизация, танизация, сенсбилизация иммуноглобулинами, а также лиофильное высушивание препарата) осуществляли в течение длительного времени (до 1 сут) и с максимальной осторожностью [1, 4]. В результате после контроля сублимации титр РНГА с лиофилизированным препаратом оставался без изменений.

Стандартная чувствительность РНГА составляет  $10^5$ – $10^6$  м.т./мл, что ниже чувствительности таких иммунологических тестов, как ИФА или иммуноблоттинг. Однако, по нашему мнению, именно относительно невысокая чувствительность метода гемагглютинации позволяет избежать проблемы перекрестной реактогенности микромицетов, связанной с монотонностью полисахаридных структур (хитина, маннанов,  $\beta$ -глюканов и т.д.) поверхности их клеток [7].

Для внедрения разработанного препарата в практику необходимо оценить его функциональные свойства, эффективность, качество и безопасность при использовании для идентификации с помощью РНГА возбудителей кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза в выделенных культурах микромицетов, клиническом и биологическом материале.

С этой целью экспертами ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России проведены технические испытания «Набора реагентов. Диагностикум эритроцитарный кокцидиоидомикозный и гистоплазмозный сухой» как медицинского изделия, подтвердившие его соответствие национальным и нормативным документам в части требований безопасности и эффективности, а также нормированным техническим характеристикам (спецификации) изготовителя изделия, а затем совместно с сотрудниками ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» проведены клинические испытания предложенного диагностикума.

Для определения диагностической чувствительности препарата использовали суспензии микромицетов и бактериальных клеток представленных выше штаммов в концентрации  $3,12 \cdot 10^6$  кл/мл при выполнении микроварианта РНГА, и в концентрации  $1,56 \cdot 10^6$  кл/мл при использовании макроварианта РНГА. В связи с отсутствием на территории России клинических случаев кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза для испытания диагностикума также готовили суспензии органов от экспериментально полученных биопроб, в которых наиболее вероятно присутствие возбудителей особо опасных микозов в реальных условиях, а также искусственно контаминированного патогенами и гетерологичными микро-



Результаты РНГА с «Набором реагентов. Диагностикум эритроцитарный кокцидиоидомикозный и гистоплазмозный иммуноглобулиновый сухой» по выявлению возбудителей кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза:

В горизонтальных рядах сверху вниз: *C. posadasii* 36-S, *C. posadasii* 51, *C. immitis* 46, *C. immitis* M-11, *H. capsulatum* var. *capsulatum* 6652, *H. capsulatum* var. *capsulatum* G-185, *H. capsulatum* var. *duboisii* 638, *H. capsulatum* var. *farciminosum* 12-89 в концентрации от  $1 \cdot 10^9$  до  $1 \cdot 10^8$  кл/мл

организмами клинического материала.

Результат учитывали как положительный при формировании сенсibilизированными эритроцитами на дне лунок характерного «зонтика», в отличие от точечных скоплений эритроцитов на дне лунки при отрицательном результате и в контроле. РНГА считали специфичной, если в РТНГА при одномоментном исследовании агглютинация отсутствовала или наблюдалась в меньшем (не менее чем на 3–4), по сравнению с РНГА, числе лунок (рисунок).

В ходе клинических испытаний «Набора реагентов. Диагностикум эритроцитарный кокцидиоидомикозный и гистоплазмозный иммуноглобулиновый сухой» проведены исследования 246 проб, содержащих инактивированные штаммы *C. immitis*, *C. posadasii*, *H. capsulatum*, в том числе: 184 пробы чистых культур коллекционных штаммов *C. immitis*, *C. posadasii* и *H. capsulatum*; 44 – биологического материала, полученного от зараженных экспериментальных животных; 18 – клинического материала, контаминированного возбудителями кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза (табл. 1).

Гетерологичные микроорганизмы были представлены чистыми культурами возбудителей (58 проб); 12 проб содержали биологический материал,

полученный от экспериментальных животных; 12 проб представляли собой исследования клинического материала (табл. 2).

В единичных случаях (по 1 штамму при изучении серий 1-го и 2-го диагностикума) чувствительность микроварианта РНГА составила  $6,25 \cdot 10^6$  кл/мл, что не позволило учесть этот результат реакции как положительный.

При изучении диагностической эффективности «Набора реагентов. Диагностикум эритроцитарный кокцидиоидомикозный и гистоплазмозный иммуноглобулиновый сухой» оказалось, что его диагностическая чувствительность составила не менее 99,0 % с доверительной вероятностью 90 %; диагностическая специфичность – не менее 98,0 % с доверительной вероятностью 90 %. Внутрипостановочная, межпостановочная и межсерийная воспроизводимость для всех положительных образцов составила 100 %.

Таким образом, «Набор реагентов. Диагностикум эритроцитарный кокцидиоидомикозный и гистоплазмозный иммуноглобулиновый сухой» обеспечивает выявление в РНГА клеток возбудителей кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза в концентрациях, эквивалентных по отраслевому стандарту мутности ОСО 42-28-85 ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России  $1,56 \cdot 10^6$  кл/мл макрометодом и  $3,12 \cdot 10^6$  кл/мл микрометодом и не выявляет гетерологичные микроорганизмы в концентрациях, эквивалентных по отраслевому стандарту мутности ОСО 42-28-85 ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России  $5 \cdot 10^7$  кл/мл.

В ходе клинических испытаний «Набора реагентов. Диагностикум эритроцитарный кокцидиоидомикозный и гистоплазмозный иммуноглобулиновый сухой» установлено его соответствие назначению, а именно – идентификации возбудителей кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза в выделенных культурах микромицетов и биологическом материале методом реакции непрямой гемагглютинации, что позволяет рекомендовать данный препарат к использованию в широкой лабораторной сети.

Таблица 1

Результаты исследования в РНГА с «Набором реагентов. Диагностикум эритроцитарный кокцидиоидомикозный и гистоплазмозный иммуноглобулиновый сухой» проб, содержащих возбудителей кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза

Наименование проб	Кол-во проб	Положительный ответ в РНГА* (абсолютное число)		
		Набор реагентов. Диагностикум эритроцитарный кокцидиоидомикозный и гистоплазмозный иммуноглобулиновый сухой		Результат микологического исследования
		Серия 1	Серия 2	
Пробы, содержащие <i>C. immitis</i> , <i>C. posadasii</i> , <i>H. capsulatum</i> в концентрациях $3,12 \cdot 10^6$ и $1,56 \cdot 10^6$ кл/мл	184	98,91 % (91)	98,91 % (91)	100 % (184)
Пробы клинического материала, искусственно контаминированные <i>C. immitis</i> , <i>C. posadasii</i> , <i>H. capsulatum</i> в концентрации $3,12 \cdot 10^6$ и $1,56 \cdot 10^6$ кл/мл	18	100 % (9)	100 % (9)	100 % (18)
Пробы биологического материала от биопроб с экспериментальным кокцидиоидомикозом и гистоплазмозом	44	100 % (22)	100 % (22)	100 % (44)
<b>Всего проб/в том числе положительных</b>	<b>246/244</b>	<b>99,18 % (122)</b>	<b>99,18 % (122)</b>	<b>100 % (246)</b>

\* За положительный результат РНГА при постановке макрометодом принимали титр реакции, соответствующий концентрации клеток возбудителей кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза  $1,56 \cdot 10^6$  кл/мл, микрометодом –  $3,12 \cdot 10^6$  кл/мл.

**Результаты изучения в РНГА с «Набором реагентов. Диагностикум эритроцитарный кокцидиоидозный и гистоплазмозный иммуноглобулиновый сухой» проб, содержащих гетерологичные микроорганизмы**

Наименование проб	Число проб	Отрицательный ответ в РНГА (абсолютное число)		Результат культурального исследования
		Набор реагентов. Диагностикум эритроцитарный кокцидиоидозный и гистоплазмозный иммуноглобулиновый сухой		
		Серия 1	Серия 2	
Пробы, содержащие <i>A. (Mycocladus) hyalospora</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>F. avenaceum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. sambucinum</i> , <i>G. zeae</i> , <i>G. candidum</i> , <i>M. manginii</i> , <i>P. variotii</i> , <i>P. citreoviridae</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. verrucosa</i> , <i>R. microsporus</i> , <i>S. brevicaulis</i> , <i>T. crateriforme</i> , <i>B. suis</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , <i>Y. pseudotuberculosis</i> , <i>B. pseudomallei</i> , <i>B. mallei</i> в концентрации $5,0 \cdot 10^7$ кл/мл	58	100 % (29)*	100 % (29)	100 % (58)
Пробы биологического материала, содержащие <i>P. citreoviridae</i> в концентрации $5,0 \cdot 10^7$ кл/мл	12	100 % (6)	100 % (6)	100 % (12)
Пробы клинического материала, содержащие <i>P. citreoviridae</i> в концентрации $5,0 \cdot 10^7$ кл/мл	12	100 % (6)	100 % (6)	100 % (12)
<b>Итого</b> исследованных проб	<b>82</b>	<b>100 % (41)</b>	<b>100 % (41)</b>	<b>100 % (82)</b>

\*В скобках представлено абсолютное число отрицательных в РНГА проб.

**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Кулаков М.Я., Лесовой В.С., Новицкая И.В., Липницкий А.В., Пушкар В.Г. Способ получения эритроцитарного антигенного гистоплазмозного и кокцидиоидомикозного диагностикума. Патент на изобретение № 2422832. Оpubл. 25.01.2010 г.  
 2. Онищенко Г.Г., редактор. Специфическая индикация патогенных биологических агентов. М.: ЗАО «МП Гигиена»; 2006. 288 с.  
 3. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. М.: Медицина; 2009. 472 с.  
 4. Пушкар В.Г., Новицкая И.В., Кулаков М.Я., Павлова К.А., Степурина А.М. Способ лиофильной сушки эритроцитарного диагностикума. Патент на изобретение № 2476791. Оpubл. 27.02.2013 г.  
 5. Gómez B.L. Molecular diagnosis of endemic and invasive mycoses: Advances and challenges. *Rev. Iberoam. Micol.* 2014; 31(1):35–41. DOI: 10.1016/j.riam.2013.09.009.  
 6. Sharpton T.J., Stajich J.E., Rounsley S.D., Gardner M.J., Wortman J.R., Jordan V.S., Maiti R., Kodira C.D., Neafsey D.E., Zeng Q., Hung C.Y., McMahan C., Muszewska A., Grynberg M., Mandel M.A., Kellner E.M., Barker B.M., Galgiani J.N., Orbach M.J., Kirkland T.N., Cole G.T., Henn M.R., Birren B.W., Taylor J.W. Comparative genomic analyses of the human fungal pathogens *Coccidioides* and their relatives. *Genome Res.* 2009; 19(10):1722–31. DOI: 10.1101/gr.087551.108.  
 7. Wüthrich M., Deepe G.S.Jr., Klein B. Adaptive Immunity to Fungi. *Annu. Rev. Immunol.* 2012; 30:115–48. DOI: 10.1146/annurev-immunol-020711-074958.

**References**

1. Kulakov M.Ya., Lesovoy V.S., Novitskaya I.V., Lipnitsky A.V., Pushkar V.G. [Method for the production of erythrocytic antigen coccidioidomycosal and histoplasmosal diagnosticum]. Patent for the invention

№ 2422832. Published January 25, 2010.  
 2. Onishchenko G.G., editor. [Specific Indication of Pathogenic Biological Agents]. M.: CJSC “MP Gigena”; 2006. 288 p.  
 3. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases]. M.: “Meditsina”; 2009. 472 p.  
 4. Pushkar V.G., Novitskaya I.V., Kulakov M.Ya., Pavlova K.A., Stepurina A.M. [Method for freeze-drying of erythrocytic diagnosticum]. Patent for the invention № 2476791. Published February 27, 2013.  
 5. Gómez B.L. Molecular diagnosis of endemic and invasive mycoses: Advances and challenges. *Rev. Iberoam. Micol.* 2014; 31(1):35–41. DOI: 10.1016/j.riam.2013.09.009.  
 6. Sharpton T.J., Stajich J.E., Rounsley S.D., Gardner M.J., Wortman J.R., Jordan V.S., Maiti R., Kodira C.D., Neafsey D.E., Zeng Q., Hung C.Y., McMahan C., Muszewska A., Grynberg M., Mandel M.A., Kellner E.M., Barker B.M., Galgiani J.N., Orbach M.J., Kirkland T.N., Cole G.T., Henn M.R., Birren B.W., Taylor J.W. Comparative genomic analyses of the human fungal pathogens *Coccidioides* and their relatives. *Genome Res.* 2009; 19(10):1722–31. DOI: 10.1101/gr.087551.108.  
 7. Wüthrich M., Deepe G.S.Jr., Klein B. Adaptive Immunity to Fungi. *Annu. Rev. Immunol.* 2012; 30:115–48. DOI: 10.1146/annurev-immunol-020711-074958.

**Authors:**

Novitskaya I.V., Prokhvatilova E.V., Toporkov A.V., Viktorov D.V., Kulakov M.Ya., Savina E.V., Pushkar V.G., Belitskaya L.I. Volgograd Research Anti-Plague Institute, 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russian Federation. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.  
 Osina N.A., Kas'yan Zh.A., Shul'gina I.V., Lobovikova O.A. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

**Об авторах:**

Новицкая И.В., Прохватулова Е.В., Топорков А.В., Викторов Д.В., Кулаков М.Я., Савина Е.В., Пушкар В.Г., Белицкая Л.И. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.  
 Осина Н.А., Касьян Ж.А., Шульгина И.В., Лобовикова О.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Поступила 11.04.17.