

М.А.Гришина, Е.Н.Кочубеева, Н.В.Вьючнова, В.А.Антонов, Г.А.Ткаченко, В.В.Алексеев, А.В.Липницкий

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА КОКЦИДИОИДОМИКОЗА

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград

Кокцидиоидомикоз – системное заболевание, вызываемое диморфными грибами *Coccidioides immitis* и *C. posadasii*. Возбудители кокцидиоидомикоза – первичные патогены – эндемичны для стран американского континента, однако завозные случаи этого заболевания регистрируются и в других регионах мира. В настоящей работе обобщены данные зарубежной литературы и результаты собственных исследований по проблеме диагностики кокцидиоидомикоза. Рассмотрены проблемы и перспективы развития диагностических препаратов, предназначенных для обнаружения и идентификации *Coccidioides spp.*

Ключевые слова: кокцидиоидомикоз, *Coccidioides immitis*, *Coccidioides posadasii*, артроспоры, сферулы.

M.A.Grishina, E.N.Kochubeeva, N.V.V'yuchnova, V.A.Antonov, G.A.Tkachenko, V.V.Alekseev, A.V.Lipnitsky

Laboratory Diagnostics of Coccidioidomycosis

Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd

Coccidioidomycosis is a systemic disease induced by dimorphic fungi *Coccidioides* and *C. posadasii*. Its causative agents – primary pathogens – are endemic for American states. However introduced cases of the disease can be traced in some other world regions too. This paper contains summarized foreign literature data on the issue. Presented are the results of our own investigations on the problem of Coccidioidomycosis diagnostics. Discussed are also problems and prospective of the development of a diagnostic preparations designed to detect and identify *Coccidioides spp.*

Key words: coccidioidomycosis, *Coccidioides immitis*, *Coccidioides posadasii*, arthrospores, spherules.

Кокцидиоидомикоз – особо опасное инфекционное заболевание, вызываемое патогенными грибами *Coccidioides immitis* и *C. posadasii*. В соответствии с действующими санитарно-эпидемиологическими правилами возбудители кокцидиоидомикоза относятся ко второй группе патогенности (опасности) [6].

Coccidioides spp. – диморфные микромицеты: во внешней среде они существуют в виде мицелиальной (сапробной) формы, а в организме человека

и животных из мицелиальных элементов образуются тканевые (паразитические) формы гриба [9, 21, 26, 36, 43, 46, 51].

Значимость проблемы кокцидиоидомикоза за последние десятилетия возросла не только для традиционно эндемичных регионов Америки, но и для стран, где заболевание ранее не регистрировалось. Случаи заболевания кокцидиоидомикозом имели место в Австралии, Финляндии, Новой Зеландии, Великобритании, Индии, Японии, Таиланде. Распространение этого микоза по всему миру связано, в первую очередь, с развитием туризма: большинство лиц, инфицированных грибами рода *Coccidioides*, заболели случайно при посещении тех стран, где гриб присутствует в почве [18, 20, 34, 52]. Кроме того, возбудители кокцидиоидомикоза попадают за пределы своего ареала с продуктами растениеводства [23]. Особенно высокой опасности заражения подвергаются пациенты при пересадке органов от больных доноров [15]. И наконец, проблема биотерроризма, обострение которой наблюдается в современном мире, требует по-новому взглянуть на возможность распространения кокцидиоидомикоза [21]. Все это указывает на существующую реальную опасность завоза в Россию этого возбудителя из эндемичных районов.

Отсутствие средств специфической профилактики кокцидиоидомикоза, а также выраженная ре-

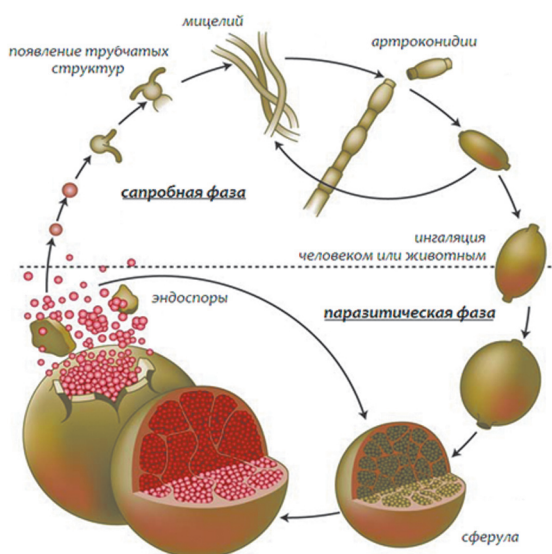


Схема жизненного цикла *Coccidioides spp.*

зистентность *Coccidioides spp.* ко многим химиотерапевтическим препаратам требуют пристального внимания к этим микроорганизмам, прежде всего с диагностических позиций.

Лабораторная диагностика кокцидиоидомикоза требует проведения следующих этапов: обнаружение элементов гриба в патологическом материале; выделение культур возбудителей особо опасных микозов в двух фазах (дрожжевой и мицелиальной); изучение ответных реакций организма и обнаружение антигенов иммуносерологическими методами; выявление и идентификация ДНК грибных патогенов молекулярно-генетическими методами.

Первым этапом лабораторной диагностики кокцидиоидомикоза является микроскопическое исследование патологического материала. Данный метод имеет большое значение, поскольку гриб из-за больших размеров своей тканевой формы может быть легко обнаружен при достаточной обсемененности исследуемых образцов.

Прямоу микроскопическому исследованию подлежат мокрота, суставная жидкость, гной, осадок центрифугата спинно-мозговой жидкости, бронхоальвеолярный лаваж [31, 36, 43]. При исследовании мокроты и гноя, в которых в большом количестве содержатся посторонние примеси (лейкоциты, гибнущие тучные клетки, пыльца растений и т.д.), необходимо так называемое «просветление» патологического материала. Для этого используются 10 % раствор гидроксида калия или натрия в смеси с равным количеством патологического материала с последующей экспозицией в течение 10–15 мин. Микроскопия с КОН – самый распространенный, быстрый и доступный метод, но требует хорошей подготовки персонала для идентификации микроорганизмов. Гораздо большей чувствительностью и специфичностью обладает метод окраски с калькофлюоровым белым. Это преимущество обусловлено способностью красителя связываться с хитином и целлюлозой клеточной стенки грибов, однако возможно неспецифичное связывание с растительным материалом, а также жирными кислотами. Окраска метенамином серебра по Грокотту – наиболее чувствительный метод исследования гистологических препаратов, но, возможно, избыточное окрашивание препаратов, вследствие чего маскируются некоторые внутриклеточные структуры, такие, например, как эндоспоры внутри сферул. При гистологическом исследовании клинического материала применяются также такие виды окраски, как PAS-реакция и окраска гематоксилин-эозином. Иногда используют метод Гимза, Папаниколау и окраску муцикармином, но чувствительность этих методов значительно уступает вышеописанным [54]. Окраска по Граму не используется.

Зрелые сферулы легко распознаются в нативном препарате и без окраски по их толстой преломляющей свет оболочке и наличию эндоспор. Хорошие результаты получены при обработке патологического

материала глицерином. Сферулы более рельефно выделяются на фоне лейкоцитов, которые, мацерируясь в глицерине, становятся более светлыми, в то время как оболочка сферул, как бы уплотняясь, выступает более отчетливо. Исследование в воде или физиологическом растворе также дает вполне удовлетворительные результаты, но при этом быстрее происходит подсыхание препарата [1, 2, 3, 4].

Для обнаружения сферул в пробах клинического материала можно использовать также метод флуоресцирующих антител, обеспечивающий получение предварительного ответа в течение 1–2 ч от момента поступления проб на исследование. Видоспецифические флуоресцирующие иммуноглобулины интенсивно окрашивают толстую оболочку сферул и слабо – содержащиеся внутри них эндоспоры [4].

Сферулы, обнаруженные на трофоцитарной стадии развития, необходимо дифференцировать от возбудителей криптококкоза, бластомикоза и др. Следует также отметить, что сходные по морфологии сферулы образуют *Rhinosporidium seeberi*, *Emmonsia parva* и *Emmonsia crescens* [45]. Кроме того, незрелые сферулы с тонкими стенками и недифференцированной протоплазмой трудно отличить от пылевых клеток, зернистых лейкоцитов, капель жира и других клеточных образований.

Единственно надежным критерием для подтверждения кокцидиоидной природы сферул является их прорастание в мицелий. Наилучшие условия для быстрого прорастания сферул (в первые 24 ч) создаются при инкубации раздавленных на предметном стекле и запарафинированных по краю покровного стекла препаратов с добавлением пенициллина и стрептомицина [1].

Наряду со сферулами в патологическом материале иногда удается обнаружить мицелий в виде коротких и длинных нитей. Такие находки выявляются при исследовании смыва из каверн [4].

Выделение чистой культуры *Coccidioides spp.* из клинического материала является наиболее важным методом диагностики и позволяет окончательно установить диагноз кокцидиоидомикоза.

Исследования, проводившиеся внутри эндемичных зон, показали, что чаще всего положительные результаты регистрируются при культуральном исследовании образцов, полученных из дыхательных путей. При этом *Coccidioides spp.* наиболее часто выделяются из бронхоальвеолярного лаважа (53 %). Культуры из мокроты выделяются только в 20 % случаев [11, 48].

Грибы *Coccidioides spp.* могут расти на различных селективных и неселективных средах [36, 48, 49]. Для выращивания мицелиальной формы гриба обычно применяют агар Сабуро с добавлением антибактериальных антибиотиков широкого спектра действия, чаще левомицетина (хлорамфеникола), который подавляет рост посторонних грибов, но не влияет на рост *Coccidioides spp.* [6]. Гриб может расти также на

мясопептонном агаре с добавлением дрожжевого экстракта, мясопептонном бульоне с глюкозой, сердечно-мозговом агаре. Гриб развивается медленно, первые колонии появляются обычно через 3–4 дня, а конидиогенез наблюдается спустя 14 дней после посева. Однако интенсивность развития грибов рода *Coccidioides* на питательных средах различна, и для некоторых штаммов начало роста наступает на 10–16-й день [20], или даже через 1–2 месяца.

По характеру роста культуры *C. immitis* и *C. posadasii* мало чем отличаются от ряда других мицелиальных грибов: рыхлый, местами редкий, бесцветный или серовато-беловатый мицелий с мучнистым налетом при споруляции [1, 3, 53]. С возрастом колонии приобретают коричневатый или желто-коричневый оттенок. Это ориентировочные признаки для отбора колоний подозрительных культур.

На жидких средах рост возбудителей кокцидиоидомикоза происходит несколько быстрее. При посевах на жидкие среды удается обогатить культуру, что облегчает развитие грибов на плотных средах.

При микроскопическом исследовании культур *Coccidioides spp.* обнаруживается разветвленный септированный мицелий примерно 2 мм в диаметре с бочкообразными артроспорами, которые чередуются с зонами просветления, образуемыми клетками-разобшителями (дизъюнкторами). По мере созревания мицелий распадается, и на концах артроспор остаются фрагменты оболочки (стенки) мицелиальных клеток, образуя так называемые «усики» или орнамент, которые являются характерным признаком именно возбудителя кокцидиоидомикоза.

Выросшие колонии *Coccidioides spp.* необходимо дифференцировать от других мицелиальных грибов, продуцирующих артроспоры. Для этого используют экзоантигенный тест на основе специфических антител, который позволяет выявлять в фильтрате мицелиальной культуры экзоантиген CSA (*Coccidioides*-specific antigen), а также молекулярные методы [21]. Иммунологические и молекулярно-генетические методы исследования позволяют, кроме того, решить проблему идентификации атипичных культур, утративших способность к артроспорообразованию.

Для окончательной идентификации *Coccidioides spp.* требуется подтверждение диморфизма выделенного гриба. Для этого необходимо добиться прорастания мицелиальной формы *Coccidioides spp.* в сферулы *in vitro* или *in vivo*. Сферульную форму *in vitro* получают при посеве клинического материала на жидкую модифицированную среду Конверса, с последующей инкубацией в атмосфере углекислого газа (10–20 %), *in vivo* – заражением биопробных животных (белые мыши, морские свинки) мицелиальной формой патогена.

Выделение культуры *Coccidioides spp.* или гистологическая идентификация микромицета в ткани позволяют окончательно установить диагноз кокцидиоидомикоза. Однако серологические методы также занимают важное место в диагностике.

При тяжелых формах диссеминированного кокцидиоидомикоза используют методы обнаружения антигенов в пробах клинического материала (гной, мокрота, кровь, спинно-мозговая жидкость, смывы с бронхов, экссудаты из плевральной полости, пунктат костного мозга, биопсированные кусочки тканей из очагов поражения, реже – моча, испражнения) [38, 41, 42].

В зависимости от характера исследуемого материала проводят выбор диагностических средств для той или иной серологической реакции.

Серологические реакции с эритроцитарными диагностикумами (иммуноглобулиновым или антигенным) применяют на всех этапах лабораторной диагностики микоза. Для обнаружения антигена используют двухкомпонентную РНГА с иммуноглобулиновым эритроцитарным препаратом или трехкомпонентную реакцию нейтрализации антител (РНAt) с антигенным диагностикумом. Поиск специфических антител в сыворотках больных людей осуществляется с помощью двухкомпонентной РНГА с антигенным эритроцитарным препаратом или трехкомпонентной реакции нейтрализации антигена (РНAg) с иммуноглобулиновым эритроцитарным диагностикумом [1, 4].

При поиске специфических антител исследуют сыворотки больных людей, реже – спинно-мозговую жидкость, полученные в различные сроки от момента клинических проявлений заболевания.

В настоящее время наибольшую прогностическую и диагностическую ценность имеет определение антител к двум антигенам *Coccidioides spp.* – ТР (tube precipitin) и CF (complement fixation). Появление ТР антител, относящихся, главным образом, к классу IgM, связано с развитием первичного острого кокцидиоидомикоза, в течение первой недели ТР антитела можно зарегистрировать у 50 % больных, а на третьей неделе – у 90 %. CF антитела принадлежат классу IgG, нарастание их титра происходит на стадии хронической диссеминации заболевания [36, 37, 41, 42, 48].

Серодиагностическая значимость определения IgM преципитиновых антител была определена еще в начале XX века Smith *et al.* с помощью теста пробирочной преципитации [29]. Huppert *et al.* [29] позже разработали иммунодиффузионный метод, который не потерял своей актуальности и до настоящего времени. Основное преимущество реакции иммунодиффузии (РИД) состоит в том, что по характеру линий преципитата можно выявить специфические системы антиген-антитело [42], однако чувствительность метода невысока и для его проведения требуется несколько суток [41, 42, 48]. Подобных недостатков лишены такие методы, как реакция латекс-агглютинации (РЛА) и иммуноферментный анализ (ИФА), причем ИФА, получивший широкое распространение в последние годы, является наиболее чувствительным способом детекции антител [21]. Тем не менее, при проведении РЛА или ИФА возможны

ложноположительные результаты, поэтому всегда требуется подтверждение иммунодиффузионным методом.

С помощью РИД можно определять также и наличие в сыворотке IgG. Детектируемые титры CF антител развиваются со второй недели заболевания и могут сохраняться в течение всего периода развития болезни.

Для количественного анализа уровня CF антител используется реакция связывания комплемента (РСК), которая позволяет, во-первых, оценить эффективность лечения, а также обеспечивает важной прогностической информацией. Титр РСК 1:2 или 1:4 указывает на благоприятный исход болезни, титр 1:16 или более свидетельствует о развитии диссеминированной формы заболевания. Чаще всего РСК используется при диагностике кокцидиоидного менингита [41, 42, 55].

Важным преимуществом РСК, по сравнению с РИД, является большая чувствительность, однако известен высокий уровень перекрестных реакций с сыворотками больных гистоплазмозом и бластомикозом [48, 55], напротив, РИД на агарозном геле высокоспецифична, но имеет меньшую чувствительность и требует концентрирования исследуемых образцов [41, 55].

При тяжелой иммуносупрессии могут отмечаться низкие титры CF антител или их отсутствие [14, 19, 33].

В настоящее время наиболее чувствительным является ИФА (83–87 %), однако при его использовании возможны ложноположительные результаты.

В качестве альтернативных способов выявления и идентификации грибных патогенов, в том числе и возбудителя кокцидиоидомикоза, в последнее время все более активно используются молекулярно-генетические методы, основанные на анализе генома [9, 10, 15, 22, 36, 47].

Одним из первых методов генодиагностики стал метод ДНК-ДНК гибридизации. В настоящее время для идентификации микромицетов используют меченные акридином ДНК-зонды на основе генов рибосомальной РНК. Для обнаружения возбудителя кокцидиоидомикоза применяют коммерческий препарат AssuProbe, США. Данный метод оказался достаточно чувствительным (10^4 – 10^5 клеток), специфичным и быстрым в исполнении [9, 28].

Однако методы ДНК-ДНК гибридизации имеют ряд недостатков и ограничений, связанных с перекрестной гибридизацией, трудоемкостью исследования и скорее направлены на идентификацию выделенных культур микроорганизмов, а не для исследования клинических образцов, таких как бронхоальвеолярный лаваж, спинно-мозговая жидкость, биоптаты органов, кровь [8].

Среди новых средств диагностики микозов следует выделить методы, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР), которая позволяет выявлять патогены при отсутствии этапа культивирования

микроорганизмов. При разработке ПЦР-систем для идентификации возбудителей микозов в качестве ДНК-мишени часто использовались последовательности рибосомальных генов (*18S pPHK*, *5,8S pPHK*, а также *ITS1* и *ITS2* регионов). Преимуществом данных матриц для ПЦР является их консервативность и мультикопийность [39].

M.Lindsley *et al.* [35] для выявления медицински значимых грибов разработали ПЦР-тест-систему на основе панфунгальных последовательностей спейсерных областей ITS1–ITS4 региона. Последующая идентификация грибов проводилась видоспецифическими ДНК-зондами, полученными на основе ITS2 регионов [35]. В качестве метки использовали дигоксигенин или биотин. ПЦР ампликоны выявляли колориметрически с помощью иммуноферментного анализа. Чувствительность метода составляла 1,2 pg ДНК. Однако, вследствие необходимости проведения двух этапов идентификации ампликонов, повышается риск контаминации, а также удлиняются сроки получения результатов. Кроме того, наблюдались перекрестные реакции ДНК-зонда для выявления *Blastomyces dermatitidis* с ДНК возбудителей кокцидиоидомикоза и у зонда для обнаружения *Histoplasma capsulatum* – с ДНК *Candida albicans*.

D.R.Green *et al.* [27] сконструировали видоспецифичные праймеры на основе ITS последовательностей рибосомальной ДНК, обозначенные ITS C1A и ITSC2. Данные праймеры они использовали для детекции кокцидиоидной ДНК в пробах почвы эндемичных регионов. В последующем, S.Johnson *et al.* [32] с использованием этих же праймеров обнаруживали ДНК гриба в сыворотках крови экспериментально зараженных мышей и больных кокцидиоидомикозом людей. Чувствительность праймеров была высокой и составляла 10–100 fg ДНК (323–3230 геномных копий, в перерасчете на известный размер генома в 28,2 Mb) при окраске геля Vistra Green и 1 pg ДНК при окраске геля этидиум бромидом. Однако при исследовании 90 сероположительных проб сывороток больных людей положительный результат в ПЦР наблюдался лишь в 6 случаях [32].

В то же время при использовании праймеров, сконструированных на основе рибосомальных генов, существует вероятность получения ложноположительных результатов в реакции амплификации. Так, при сравнении нуклеотидных последовательностей генов *18S pPHK* и *5,8S pPHK*, а также ITS1 и ITS2 регионов выявлена высокая степень гомологии *Chrysosporium keratinophilum* с *C. immitis*.

Анализ данной литературы указывает на необходимость проведения секвенирования всех продуктов амплификации, если в ПЦР-тест-системе используются праймеры, разработанные на основе фрагментов рибосомальных генов возбудителей кокцидиоидомикоза.

В настоящее время существует коммерческая система идентификации микроскопических грибов – MicroSeq® D2 LSU rDNA Fungal Identification System

(Applied Biosystems, США). Данная система основана на секвенировании D2 региона гена LSU 26S рибосомальной РНК, присутствующего у всех микромицетов. Нуклеотидный состав данной области генома, зависит от таксономической принадлежности гриба. В рабочей базе данных, которая ежегодно пополняется, представлено более 1000 секвенированных последовательностей мицелиальных грибов, что позволяет расширить возможности диагностического поиска.

Для диагностики кокцидиоидомикоза в качестве ДНК-мишени, наряду с рибосомальными генами, использовались и гены, кодирующие видоспецифические белки. S.Pan и G.Cole на основе последовательности гена, кодирующего 19 кДа специфичный белок (cag), сконструировали праймеры для идентификации *C. immitis* и рекомендовали их для разработки амплификационной тест-системы [25, 40]. Эти праймеры отличались высокой специфичностью и чувствительностью. Нижний предел чувствительности реакции составлял 1 pg ДНК *C. immitis*. Однако данные олигонуклеотидные затравки не были протестированы для выявления возбудителя кокцидиоидомикоза при исследовании проб биологического материала и объектов окружающей среды. [24]. В наших исследованиях проведен анализ нуклеотидных последовательностей гена, кодирующего этот белок, обозначенный *Coccidioides-specific antigen* (CSA), обоих возбудителей кокцидиоидомикоза. Как оказалось, данный антиген с молекулярной массой 19 кДа (cag) (Genbank AAB00101), кодируется геном *C. posadasii* (Genbank L36551, AY158466). При сравнении нуклеотидных последовательностей и, следовательно, специфичности выбранных олигонуклеотидных затравок с помощью программы BLASTn на веб-сайте (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) Национального Центра Биотехнологической Информации в режиме on-line выявлена 100 % гомология как данного гена, так и предложенной пары праймеров ДНК *C. posadasii* с ДНК *C. immitis* RS (Genbank, AEC03000001), т.е. данные праймеры оказались родоспецифичными для *Coccidioides spp.*

Разделение двух видов возбудителей кокцидиоидомикоза на *C. immitis* и *C. posadasii* стимулировало работы по поиску ДНК-мишеней, на основе которых возможна дифференциация этих возбудителей. Так, R.Bialek *et al.* сконструировали праймеры на ген, кодирующий пролин – богатый иммунодоминантный белок клеточной стенки Ag2/PRA [12]. На его основе удалось разработать гнездную ПЦР для идентификации *C. posadasii*. Несмотря на то, что в геноме возбудителя кокцидиоидомикоза содержится только одна копия данного гена, чувствительность этой реакции при использовании гнездной ПЦР составила единичные клетки, а специфичность – 100 % [30, 44]. Однако данная тест-система была апробирована только при исследовании биопсийных образцов тканей легкого, пораженных *C. posadasii*. Данные о возможности детекции *C. immitis* с помощью этой тест-

системы авторами не представлены. Позднее было выяснено, что данный ген консервативен как среди калифорнийской (*C. immitis*), так и не калифорнийской популяции (*C. posadasii*) [30].

Из флуоресцентных методов детекции для обнаружения возбудителей кокцидиоидомикоза применяются методики с использованием 2 зондов с резонансным переносом энергии (LightCycler assay). В качестве ДНК-мишеней для выявления возбудителей кокцидиоидомикоза были выбраны спейсерные области рибосомальных генов, а для обнаружения микромицетов вида *C. posadasii* – участок гена, кодирующего антиген, обогащенный пролином (Ag2/PRA) [12, 13].

K.W.Sheff *et al.* [50] для дифференциации *C. immitis* и *C. posadasii* предложена технология TaqMan-ПЦР в формате реального времени. Данный методический прием с амплификацией фрагментов 4 ДНК-мишеней, обозначенных авторами пролин 157, пролин 174, гексокиназа 149 и глюкозо-синтаза 192, в которых детектировались единичные нуклеотидные замены (SNP), для дифференциации двух микромицетов рода *Coccidioides* был использован и при анализе штаммов, выделенных от больных кокцидиоидомикозом Мексики [17].

Для идентификации и дифференциации грибов рода *Coccidioides* нами разработаны амплификационные тест-системы, предназначенные для выявления нуклеотидных последовательностей гена *MBP-1* (macrophage binding protein), детерминирующего макрофагсвязанный белок и *SOWgp82* гена (spherule outer wall glycoprotein), кодирующего иммунодоминантный гликопротеин внешней стенки сферул данных микромицетов. В этих тест-системах олигонуклеотидные праймеры CimMBP1s-CimMBP2as обеспечивали специфическую амплификацию фрагментов ДНК обоих возбудителей кокцидиоидомикоза, а праймеры CpSOW82s-CpSOW82as – только *C. posadasii* [8].

Фенотипических признаков, с помощью которых можно было бы дифференцировать *C. immitis* и *C. posadasii*, до настоящего времени не установлено. Лишь на основании генотипирования удалось разделить все исследуемые штаммы на 2 большие генетические группы – калифорнийскую и не калифорнийскую (в последующем на *C. immitis* и *C. posadasii*, соответственно) [16, 24, 25]. В работе M.C.Fisher *et al.* для внутривидового типирования штаммов возбудителей кокцидиоидомикоза использовали ДНК-маркеры, основанные на выявлении единичных нуклеотидных замен (SNPs) в переменных участках ДНК [25]. Поэтому, используя молекулярно-генетические методы, нами была проведена работа по генетическому типированию и определению видовой принадлежности штаммов *Coccidioides spp.* из коллекции ВолгоградНИПЧИ Роспотребнадзора. В работе M.C.Fisher *et al.* [25] было показано, что при секвенировании локуса bl у штаммов *C. immitis* в результате замены нуклео-

тида в этом локусе отсутствует полиморфный сайт рестрикции. Мы использовали амплификацию локусов *bl*, *VI*, *z* с последующим гидролизом полученных ампликонов эндонуклеазой рестрикции *Hinf* I. Детекцию аллельных вариантов SNPs проводили с помощью метода ПЦР-SSCP-анализа однонитевого конформационного полиморфизма ДНК, ПЦР-ПДРФ и секвенирования.

Полученные результаты генотипирования свидетельствовали о генетическом разнообразии штаммов возбудителей кокцидиоидомикоза, находящихся в коллекции ВолгоградНИПЧИ. В одну кластерную группу вошли 15 штаммов, которые соответствовали генотипу некалифорнийской группы (*C. posadasii*). В ДНК остальных одиннадцати штаммов методами ПЦР-ПДРФ, ПЦР-SSCP и секвенирования были выявлены полиморфные нуклеотидные замены, характерные для генотипа калифорнийской группы, что позволило идентифицировать их как вид *C. immitis*. Следует отметить, что результаты генотипирования полностью совпадали с результатами ПЦР с использованием сконструированных праймеров *CimMBP1s*-*CimMBP2as* и *CpSOW82s*-*CpSOW82as* и подтверждали их специфичность.

Работа выполнена по государственному контракту № 54-Д/3 от 20.08.2010 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 гг.).»

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лесовой В.С., Липницкий А.В., Тихонов Н.Г., Яшкульов К.Б. СПИД-ассоциированные микозы. Элиста; 1995. 173 с.
2. Липницкий А.В., Лесовой В.С., Храпова Н.П. Проблемы лабораторной диагностики глубоких микозов. Мед. паразитол. и паразитарн. бол. 1995; 4:53–6.
3. Липницкий А.В., Лесовой В.С., Храпова Н.П., Тихонов Н.Г. Глубокие микозы. В кн.: Лабораторная диагностика возбудителей опасных инфекционных болезней. Саратов, 1998. Т. 2. С. 80–100.
4. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: Медицина; 2009. 472 с.
5. Практическое пособие для подготовки врачей-бактериологов и эпидемиологов по вопросам противодействия биотерроризму. Волгоград; 2004. 256 с.
6. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.1285-03. Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности). М.: Госсанэпиднадзор России; 2003. 103 с.
7. Ткаченко Г.А., Гришина М.А., Антонов В.А., Савченко С.С., Замараев В.С., Лесовой В.С. и др. Идентификация возбудителей кокцидиоидомикоза методом полимеразной цепной реакции. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2007; 4:25–31.
8. Херрингтон С., Макги Дж., редакторы. Молекулярная клиническая диагностика. Методы. М.: Мир; 1999. 558 с.
9. Anstead G.M., Graybill J.R. Coccidioidomycosis. Infect. Dis. Clin. North. Am. 2006; 20:621–43.
10. Assi M.A., Binnicker M.J., Wengenack N.L., Deziel P.J., Badley A.D. Disseminated coccidioidomycosis in a liver transplant recipient with negative serology: Use of polymerase chain reaction. Liver Transpl. 2006; 12:1290–2.
11. Barenfanger J., Lawhorn J., Drake C. Nonvalue of culturing cerebrospinal fluid for fungi. J. Clin. Microbiol. 2004; 42:236–8.
12. Bialek R., Kern J., Herrmann T., Tijerina R., Cecenas L., Reischl U. et al. PCR assays for identification of *Coccidioides posadasii* based on the nucleotide sequence of the antigen 2/Proline-Rich Antigen. J. Clin. Microbiol. 2004; 42:778–83.
13. Binnicker M.J., Buckwalter S.P., Eisberner J.J., Stewart R.A., McCullough A.E., Wohlfiel S.L. et al. Detection of *Coccidioides* species in clinical specimen by real-time PCR. J. Clin. Microbiol. 2007; 45:173–78.
14. Blair J. E., Coakley B., Santelli Ana C., Hentz J.G.,

- Wengenack N.L. Serologic testing for symptomatic coccidioidomycosis in immunocompetent and immunosuppressed hosts. Mycopathologia. 2006; 162:317–24.
15. Blair J.E., Logan J.L. Coccidioidomycosis in solid organ transplantation. Clin. Infect. Dis. 2001; 33:1536–44.
16. Burt A., Dechairo B.M., Koenig G.L., Carter D.A., White T.J., Taylor J.W. Molecular markers reveal differentiation among isolates of *Coccidioides immitis* from California, Arizona and Texas. Mol. Ecol. 1997; 6:781–6.
17. Castanon-Olivares L.R., Guarena-Elizalde D., Gonzalez-Martinez M.R., Licea-Navarro A.F., Gonzalez-Gonzalez G.M., Aroch-Calderon A. Molecular identification of *Coccidioides* isolates from Mexican patients. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2007; 1111:326–35.
18. Chandesris M.O., Hot A., Dannaoui E., Bougnoux M.E., Viard J.P., Dupont B. et al. Coccidioidomycosis: an imported invasive fungal disease in France. Med. Mal. Infect. 2008; 38:336–42.
19. Chang D.C., Anderson S., Wannemuehler K., Engelthaler D.M., Erhart L., Sunenshine R.H. et al. Testing for coccidioidomycosis among patients with community-acquired pneumonia. Emerg. Infect. Dis. 2008; 14:1053–59.
20. Cox R.A., Magee M.D. Coccidioidomycosis: host response and vaccine development. Clin. Microbiol. Reviews. 2004; 17:804–39.
21. DiCaudo D.J. Coccidioidomycosis: a review and update. J. Am. Acad. Dermatol. 2006; 55:929–42.
22. de Aguiar C.R., Nogueira Brilhante R.S., Gadelha Rocha M.F., Araujo Moura F.E., Pires D.C., Costa Sidrim J.J. Rapid diagnosis of coccidioidomycosis by nested PCR assay of sputum. Clin. Microbiol. Infect. 2007; 13(4):449–51.
23. Desai S.A., Minai O.A., Gordon S.M., O'Neil B., Wiedemann H.P., Arroliga A.C. Coccidioidomycosis in non-endemic areas: a case series. Respir. Med. 2001; 95(4):305–9.
24. Fisher M.C., Koenig G.L., White T.J., Taylor J.W. Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. 2002; 94(1):73–84.
25. Fisher M.C., Koenig G.L., White T.J., Taylor J.W. A test for concordance between the multilocus genealogies of genes and microsatellites in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. Mol. Biol. Evol. 2000; 17:1164–74.
26. Galgiani J.N., Ampel N.M., Blair J.E., Catanzaro A., Johnson R.H., Stevens D.A. et al. Coccidioidomycosis. Clin. Infect. Dis. 2005; 41:1217–23.
27. Greene D.R., Koenig G., Fisher M.C., Taylor J.W. Soil isolation and molecular identification of *Coccidioides immitis*. Mycologia. 2000; 92:406–10.
28. Gromadzki S.G., Chaturvedi V. Limitation of the AccuProbe *Coccidioides immitis* culture identification test: false-negative results with formaldehyde-killed cultures. J. Clin. Microbiol. 2000; 38:2427–8.
29. Hirschmann J.V. The Early History of Coccidioidomycosis: 1892–1945. Clin. Infect. Dis. 2007; 44:1202–7.
30. Johannesson H., Vidal P., Guarro J., Herr R. A., Cole G.T., Taylor J.W. Positive directional selection in the proline-rich antigen (PRA) gene among the human pathogenic fungi *Coccidioides immitis*, *C. posadasii* and their closest relatives. Mol. Biol. Evol. 2004; 21:1134–45.
31. Johnson R.H., Einstein H.E. Coccidioidal meningitis. Clin. Infect. Dis. 2006; 42:103–7.
32. Johnson S.M., Simmons K.A., Pappagianis D. Amplification of Coccidioidal DNA in clinical specimens by PCR. J. Clin. Microbiol. 2004; 42:1982–85.
33. Keckich D.W., Blair J.E., Vikram H.R. *Coccidioides* fungemia in six patients, with a review of the literature. Mycopathologia. 2010; 170(2):107–15.
34. Kishi K., Fujii T., Takaya H., Miyamoto A., Kurosaki A., Kohno T. et al. Pulmonary coccidioidomycosis found in healthy Japanese individuals. Respirology. 2008; 13:252–6.
35. Lindsley M.D., Hurst S.F., Iqbal N.J., Morrison C.J. Rapid identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific DNA probes. J. Clin. Microbiol. 2001; 39:3505–11.
36. Murthy M.H., Blair J.E. Coccidioidomycosis. Curr. Fungal Infect. Rep. 2009; 3:7–14.
37. Richardson M.D., Warnock D. W. Fungal Infection. Diagnosis and management. 3rd ed. Blackwell Publishing; 2003. 366 с.
38. Durkin M., Connolly P., Kuberski T., Myers R., Kubak B.M., Bruckner D. et al. Diagnosis of coccidioidomycosis with use of the *Coccidioides* antigen enzyme immunoassay. Clin. Infect. Dis. 2008; 47(8):69–73.
39. Millar B.C., Jiru X., Walker M.J., Evans J.P., Moore J.E. False identification of *Coccidioides immitis*: do molecular methods always get it right? J. Clin. Microbiol. 2003; 41(12):5778–80.
40. Pan S., Cole G.T. Molecular and biochemical characterization of a *Coccidioides immitis*-specific antigen. Infect. Immun. 1995; 63(10):3994–4002.
41. Pappagianis D. Current status of serologic studies in coccidioidomycosis. Curr. Fungal Infect. Rep. 2007; 1:129–34.

42. Pappagianis D. Serologic studies in coccidioidomycosis. *Semin. Respir. Infect.* 2001; 16:242–50.
43. Parish J.M., Blair J.E. Coccidioidomycosis. *Mayo. Clin. Proc.* 2008; 83(3):343–8.
44. Peng T., Orsborn K.I., Orbach M.J., Galgiani J.N. Proline-rich vaccine candidate antigen of *Coccidioides immitis*: conservation among isolates and differential expression with spherule maturation. *J. Infect. Dis.* 1999; 179:518–21.
45. Pfaller M.A., Diekema D.J. Unusual fungal and pseudofungal infections of humans. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(4):1495–504.
46. Saubolle M.A. Life cycle and epidemiology of *Coccidioides immitis*. In: Einstein H.E., Catanzaro A., editors. *Coccidioidomycosis. Proceedings of the 5th International Conference on Coccidioidomycosis.* Stanford University, 24–27 August, 1994. Washington: National Foundation for Infectious Diseases; 1996. P. 1–8.
47. Sandhu G.S., Kline B.C., Stockman L., Roberts G.D. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33:2913–19.
48. Saubolle M.A. Laboratory aspects in the diagnosis of coccidioidomycosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007; 1111:301–14.
49. Saubolle M.A., McKellar P.P., Sussland D. Epidemiologic, clinical and diagnostic aspects of coccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45:26–30.
50. Sheff K.W., York E.R., Driebe E.M., Barker B.M., Rounsley S.D., Waddell V.G. et al. Development of a rapid, cost-effective TaqMan Real-Time PCR Assay for identification and differentiation of *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii*. *Med. Mycol.* 2010; 48(3):466–9.
51. Spinello I.M., Munoz A., Johnson R.H. Pulmonary coccidioidomycosis. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2008; 29:166–73.
52. Standaert S.M., Schaffner W., Galgiani J.N., Pinner R.W., Kaufman L., Durry E. et al. Coccidioidomycosis among visitors to a *Coccidioides immitis* – endemic area: an outbreak in a military reserve unit. *J. Infect. Dis.* 1995; 171:1672–5.
53. Sutton D.A. Diagnosis of coccidioidomycosis by culture: safety considerations, traditional methods, and susceptibility testing. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007; 1111:315–25.
54. Wieden M.A., Saubolle M.A. The histopathology of coccidioidomycosis. In: Einstein H.E., Catanzaro A., editors. *Coccidioidomycosis. Proceedings of the 5th International Conference on Coccidioidomycosis.* Stanford University, 24–27 August, 1994. Washington: National Foundation for Infectious Diseases; 1996. P. 12–7.
55. Yang M.C., Magee D.M., Kaufman L. Recombinant *Coccidioides immitis* complement-fixation antigen: detection of an epitope shared by *C. immitis*, *Histoplasma capsulatum*, and *Blastomyces dermatitidis*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1997; 4:19–22.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Lesovoy V.S., Lipnitsky A.V., Tikhonov N.G., Yashkulov K.B. [AIDS-Related Mycoses]. Elista; 1995. 173 p.
2. Lipnitsky A.V., Lesovoy V.S., Khrapova N.P. [Problems of laboratory diagnostics of deep fungal diseases]. *Med. Parazitol. Parazitarn. Bol.* 1995; 4:53–6.
3. Lipnitsky A.V., Lesovoy V.S., Khrapova N.P., Tikhonov N.G. [Deep fungal diseases]. In: [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases]. Saratov; 1998. Vol. 2. P. 80–100.
4. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases. Practical Guidelines]. M.: Meditsina; 2009. 472 p.
5. [Practical Guide for Bacteriologists and Epidemiologists on the Matters of Bioterrorism Response]. Volgograd; 2004. 256 p.
6. Sanitary-and-Epidemiological Regulations SR 1.3.1285-03 [Safety of Work with Microorganisms of I–II Pathogenicity Groups]. M.: Gossanepidnadzor; 2003. 103 p.
7. Tkachenko G.A., Grishina M.A., Antonov V.A., Savchenko S.S., Zamaraev V.S., Lesovoy V.C. et al. [Identification of Coccidioidomycosis causative agent by means of polymerase chain reaction]. *Mol. Genet. Microbiol. Virusol.* 2007; 4:25–31.
8. Herrington S., McGee G., editors. [Molecular Clinical Diagnostics. Methods]. M.: Mir; 1999. 558 p.

Authors:

Grishina M.A., Kochubeeva E.N., Vyuchnova N.V., Antonov V.A., Tkachenko G.A., Alekseev V.V., Lipnitsky A.V. Volgograd Research Anti-Plague Institute. Golubinskaya St., 7, Volgograd, 400131, Russia. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Об авторах:

Гришина М.А., Кочубеева Е.Н., Вьючнова Н.В., Антонов В.А., Ткаченко Г.А., Алексеев В.В., Липницкий А.В. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Поступила 18.01.12.