



Министерство здравоохранения Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский
университет имени И.И. Мечникова Министерства здравоохранения
Российской Федерации»
(ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России)

На правах рукописи

Рябинин Игорь Андреевич

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ АСПЕРГИЛЛЕЗА

1.5.11. Микробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель: заслуженный
деятель науки Российской Федерации,
доктор биологических наук, профессор
Васильева Наталья Всеволодовна

Санкт-Петербург — 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Актуальность темы исследования.....	5
Степень разработанности темы исследования.....	7
Цель исследования.....	8
Задачи исследования.....	8
Научная новизна.....	8
Теоретическая и практическая значимость работы.....	9
Методология и методы исследования.....	12
Штаммы <i>Aspergillus</i> spp.....	12
Культурально-морфологическое исследование <i>Aspergillus</i> spp.....	14
MALDI-TOF-масс-спектрометрия белкового экстракта аспергиллов.....	16
Молекулярно-генетическая идентификация штаммов <i>Aspergillus</i> spp.....	16
Биоинформационный анализ масс-спектров избранных штаммов <i>Aspergillus</i> spp.....	16
Определение чувствительности <i>Aspergillus</i> spp. к противогрибковым препаратам.....	16
Биоинформационное исследование структуры ланостерол-14- α -деметилазы (CYP51) аспергиллов.....	17
Математические и статистические методы исследования.....	20
Личное участие автора в получении результатов.....	23
Основные положения диссертации, выносимые на защиту.....	24
Степень достоверности и апробация результатов исследования.....	25
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	27
1.1 Характеристика рода <i>Aspergillus</i>	27
1.1.1 Макроморфология и питательные потребности.....	27
1.1.2 Микроморфология, характеристика полового и бесполого размножения.....	27

1.1.3 Особенности химической организации клетки <i>Aspergillus</i> spp.....	32
1.1.4 Особенности физиологии и экологии <i>Aspergillus</i> spp.....	32
1.2 Грибы рода <i>Aspergillus</i> , как объекты профессионального риска.....	33
1.3 Роль в патологии животных и человека.....	33
1.4 Видовое разнообразие грибов рода <i>Aspergillus</i> – возбудителей инфекций человека.....	37
1.5 Системы внутриродовой таксономии аспергиллов.....	44
1.6 Методы видовой идентификации грибов рода <i>Aspergillus</i>	47
1.7 Методы внутривидового типирования грибов рода <i>Aspergillus</i>	54
1.8 Факторы вирулентности и аллергенности грибов рода <i>Aspergillus</i>	56
1.9 Лабораторные аспекты антифунгальной терапии аспергиллеза.....	57
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	66
ГЛАВА 2. МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ВИДОВ <i>ASPERGILLUS</i> SPP.....	66
2.1 Особенности морфологии колоний <i>Aspergillus</i> spp.....	66
2.2 Особенности микроморфологии <i>Aspergillus</i> spp.....	84
2.3 Краткое обсуждение (обобщение) проведенного морфологического исследования <i>Aspergillus</i> spp.....	91
2.4 Разработанные ключи для видовой идентификации <i>Aspergillus</i> spp.....	94
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ MALDI-TOF-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ КЛЕТОЧНЫХ ЭКСТРАКТОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ АСПЕРГИЛЛЕЗА.....	103
3.1 Характеристика масс-спектра клеточного экстракта <i>Aspergillus</i> spp. Расчетный химический состав спектрообразующих белков и пептидов.....	103
3.2 Особенности показателей видовой идентификации среди представителей различных видов <i>Aspergillus</i> spp.....	116
3.3 Сопоставление результатов видовой идентификации аспергиллов, полученных при использовании MALDI-TOF-масс-спектрометрии, таргетного ДНК-секвенирования, а также морфологического исследования <i>Aspergillus</i> spp.....	117
3.4 Аналитическая основа MALDI-TOF-масс-спектрометрии клеточного экстракта, как метода видовой идентификации и дифференцировки <i>Aspergillus</i> spp.....	124

3.5 Разработка и испытание оригинальной базы (библиотеки) масс-спектро- профилей <i>Aspergillus</i> spp.....	130
3.6 Антимикробная чувствительность возбудителей аспергиллеза. Масс- спектрометрические особенности резистентных и чувствительных штаммов	133
ГЛАВА 4. БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ МИШЕНИ ДЕЙСТВИЯ АЗОЛЬНЫХ АНТИМИКОТИКОВ – ЛАНОСТЕРОЛ-14А-ДЕМЕТИЛАЗЫ <i>ASPERGILLUS</i> SPP.	139
4.1 Аминокислотный полиморфизм CYP51A у <i>Aspergillus</i> spp.....	139
4.2 Свойства ланостерол-14α-деметиلاзы CYP51A <i>Aspergillus flavus</i>	143
ГЛАВА 5. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОЛОГИИ ИССЛЕДОВАНИЯ <i>ASPERGILLUS</i> SPP.....	153
5.1 Модификация агара Чапека с дрожжевым экстрактом.....	153
5.2 Особенности масс-спектрометрического исследования экстракта из клеток <i>Aspergillus</i> spp.....	156
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	166
ВЫВОДЫ.....	187
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	188
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	189
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	190
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	191
БЛАГОДАРНОСТИ.....	226

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Микотические инфекции являются глобальной проблемой современного здравоохранения. Свыше 1 миллиарда человек на Земле (по данным международного проекта LIFE – Leading International Fungal Education) страдают поверхностными и инвазивными микозами. Особую группу микотических инфекций составляют инвазивные микозы. Большинство нозоформ в этой группе вызывают условно-патогенные микроскопические грибы, среди которых – представители нормобиоты тела человека (например, *Candida* spp.) или микробиоты объектов окружающей среды (например, представители родов *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Fusarium* и других). Инвазивные микозы отличаются тяжелым течением, высокой летальностью, а проблема терапии этих заболеваний связана с поздней диагностикой, а также ограниченным набором эффективных противогрибковых препаратов, высокой стоимостью антимикотиков последнего поколения, а также с нарастанием резистентности грибковых патогенов к антимикотикам [58, 124, 252].

Микозы, обусловленные условно-патогенными гифомицетами, возникают у людей с иммуносупрессией и тяжелыми соматическими патологиями [13, 47, 195, 293].

Среди возбудителей инвазивных микозов, вызванных мицелиальными грибами, ведущими по частоте инфицирования человека являются представители рода *Aspergillus*. Эти грибы отличаются высокими адаптивными возможностями: способны расти в широком диапазоне температур (+10° – +52°C), использовать разнообразные источники макро- и микроэлементов, колонизировать абиотические поверхности, образовывать большое количество спор, длительно находящихся в воздухе во взвешенном состоянии. Аспергиллы оказывают многофакторное влияние на здоровье человека: вызывают инвазивные и поверхностные микозы, могут явиться инициаторами аллергических заболеваний, как в группах профессионального риска на биотехнологическом производстве, так и у «непрофессиональных» контингентов; продуцируют микотоксины, являются агентами биодеструкции зданий и сооружений [2, 360]. Алгоритм диагностики аспергиллеза включает: клинические, радиологические, микробиологические, патогистологические, иммунологические и молекулярно-генетические исследования. Наиболее доступным, и, в то же время, информативным приемом лабораторной диагностики аспергиллеза, является микробиологический анализ, включающий микроскопию нативного материала, культуральное исследование, в том числе определение чувствительности к противогрибковым агентам [157, 229]. Существует проблема «криптических видов», в изучении которых возможности диагностического микробиологического анализа существенно ограничены [164, 247, 262].

В аспекте лабораторной работы аспергиллы являются своеобразными «антиподами» дрожжевых грибов: определение видовой принадлежности этих грибов проводят прежде всего по их микро- и макроморфологическим признакам, а протоколы определения чувствительности к антимикотикам, соответствующие международному стандарту, еще не достаточно внедрены в поточную практику отечественных лабораторий. Морфологическая идентификация *Aspergillus* spp. требует применения определителей, снабженных актуальной информацией по таксономии и систематике рода, ключами к видам, типовыми описаниями видов и данными о морфологической изменчивости представителей. Несмотря на неоднократные издания отечественных [2, 15] и зарубежных монографических работ [194, 284, 303, 332] и журнальных обзоров, до сих пор не существует труда, отвечающего всем указанным критериям в полном объеме. Проблема морфологической идентификации аспергиллов приобрела новый аспект, когда для изучения систематики этих грибов внедрили молекулярно-генетические методы, в частности – таргетное ДНК-секвенирование, совмещенное с математическим анализом. Результатом комбинации этих двух составляющих явились классификационные деревья, отражающие филогенетические связи изолятов. При их рассмотрении выяснили, что иногда морфологически сходные изоляты можно разделить по особенностям одного или нескольких локусов генома на обособленные филогенетические ветви, соответствующие, очевидно, самостоятельным видам (геномовидам). Встречается и обратная ситуация, когда в той или иной степени морфологически различимые виды, например пара «*A. flavus* и *A. oryzae*», по некоторым генетическим признакам почти идентичны. Указанные особенности в значительной степени обусловлены морфологическим полиморфизмом аспергиллов, который выходит за искусственно установленные человеком пределы проявления того или иного признака, свойственного конкретному виду.

В составе рода *Aspergillus* выявлены так называемые «криптические виды», в изучении которых возможности традиционного микологического исследования резко ограничены. При работе с изолятами «криптических» видов без привлечения молекулярно-генетических методов исследования миколог сможет определить принадлежность изолята к секции рода *Aspergillus*, но возможность его дифференцировки внутри секции будет резко затруднена. Изучение распространения «криптических» видов как в России, так и за рубежом, пока имеет отрывочный, случайный характер: в диагностическую практику не внедрены приемы скрининга изолятов для выявления таких аспергиллов. Разработка данных приемов, несомненно, изменит представления об эпидемиологии аспергиллеза, что повлияет на стратегию подбора этиотропной терапии.

Многие виды из группы «криптических» обладают природной резистентностью к противогрибковым препаратам, которая их отличает от «классических» возбудителей [164, 247,

262, 314, 363]. Поэтому быстрая и точная видовая идентификация *Aspergillus* spp. позволит на более раннем этапе выбрать адекватную антимикотическую терапию, что увеличит возможности для выживания больных инвазивным аспергиллезом.

Следует заметить, что не только определение последовательности отдельных локусов ДНК позволяет изучать видовое разнообразие аспергиллов (и других микромицетов) с большой дискриминационной силой. Для этой цели используют ставшую уже традиционным приемом сканирующую электронную микроскопию [304], а также более современные физико-химические методы — газовую хроматографию - масс-спектрометрию низкомолекулярных метаболитов [303], а также MALDI-TOF-масс-спектрометрию полипептидов клеточного экстракта [96, 283, 297].

Однако внедрение молекулярно-генетических и физико-химических методов в диагностическую работу микробиологов требует не только более пристального изучения выявляемых ими признаков у «классических» и «криптических» возбудителей аспергиллезной инфекции, но и понимания, как признаки, выявляемые этими относительно новыми методами, сочетаются с морфологическими свойствами изолятов.

Решению некоторых из перечисленных проблемных вопросов, не освещенных или недостаточно освещенных в доступной литературе, посвящена данная работа.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время перечень представителей рода *Aspergillus*, ассоциированных с патологией человека, постоянно дополняется в связи с ростом в популяции иммунокомпрометированных пациентов с одной стороны, и внедрения молекулярно-генетических методов исследования с другой.

Несмотря на то, что в достаточном объеме накоплены сведения о морфологических свойствах «типовых» штаммов *Aspergillus* spp. на различных питательных средах, которые подробно изложены в отечественных [2, 5, 7, 15] и зарубежных изданиях [107, 250, 302, 345], спонтанная изменчивость аспергиллов изучена фрагментарно. В доступной литературе можно найти описания роста *Aspergillus* spp. на агаре Чапека, агаре Чапека с дрожжевым экстрактом, солодовом агаре, овсяном агаре (для некоторых видов), реже на других средах [161, 194, 284, 299, 340, 343]. Для первичного выделения аспергиллов из патологического материала применяют агар Сабуро, однако, в определителях нет описаний о росте аспергиллов на этой среде, который внешне не схож с ростом на агаре Чапека и его модификациях.

Многие авторы в качестве альтернативного метода видовой идентификации аспергиллов и других медицински значимых грибов разрабатывают применение физико-химических технологий, в частности — MALDI-TOF-масс-спектрометрии. Данный метод в перспективе развития должен сочетать в себе точность, не уступающую генетическим подходам (например,

парциальному ДНК-секвенированию), а также скорость и экономичность. Большинство работ, посвященных применению MALDI-TOF-MS неразделенного белкового экстракта у грибов, освещают только вопрос точности видовой идентификации, а особенностям масс-спектров и их дополнительному анализу уделено мало внимания. Между тем, средства математического распределения масс-спектров, полученных путем MALDI-TOF-MS, в микробиологии начинают разрабатывать, как альтернативу генетическим методам установления родства изолятов или для внутривидового типирования [67, 76], а для *Aspergillus* spp. такой подход еще не применяли.

В ряде регионов мира отмечают рост резистентности среди клинических изолятов *Aspergillus* spp. к антимикотикам [247, 317, 347]; в РФ данные о чувствительности аспергиллов к антифунгальным средствам с использованием фенотипических технологий ограничены, а с помощью молекулярно-генетических и физико-химических методов — практически отсутствуют, равно как и сведения об исследованиях механизмов устойчивости к противогрибковым препаратам.

Цель исследования — охарактеризовать фенотипические и масс-спектрометрические свойства возбудителей аспергиллеза, в том числе с различной чувствительностью к противогрибковым лекарственным средствам, для оптимизации лабораторной диагностики аспергиллеза.

Задачи исследования:

1. Исследовать макро- и микроморфологическую изменчивость условно-патогенных *Aspergillus* spp. на различных питательных средах;
2. Получить и аннотировать MALDI-масс-спектры белково-пептидных фракций клеток возбудителей аспергиллеза и разработать на их основе библиотеку типовых масс-спектро-профилей для совершенствования видовой идентификации этих грибов;
3. Исследовать масс-спектрометрические особенности возбудителей аспергиллеза с различной чувствительностью к противогрибковым лекарственным средствам;
4. Провести сравнительный анализ первичной структуры ланостерол-14- α -деметилазы (CYP51A) — мишени действия триазольных противогрибковых средств у различных представителей рода *Aspergillus*.

Научная новизна

Получены новые данные о полиморфизме штаммов основных возбудителей аспергиллеза, включая характеристики роста на питательных средах для выделения *Aspergillus* spp. из биоматериалов человека и объектов внешней среды, а также атипичные варианты макро- и микроморфологии аспергиллов *in vitro*.

Разработаны оригинальные ключи (дихотомический и синоптический) для морфологической идентификации возбудителей аспергиллеза, выделенных из биоматериала и

объектов внешней среды на питательных средах различного состава.

На модели мицелиальных грибов рода *Aspergillus* впервые предложен алгоритм биоинформационного анализа MALDI-масс-спектра неразделенного белкового экстракта, который позволяет определить полипептиды, образующие масс-спектр – маркеры видовой принадлежности. Поскольку такие белки и пептиды находятся в культуре в количествах, достаточных для масс-спектрометрической детекции и конкурентно превосходят по показателю интенсивности ионного тока другие белки и пептиды близких молекулярных масс, они связаны с процессами, критически значимыми для адаптации молодых культур *Aspergillus* spp. *in vitro*, возможно и *in vivo*.

Предложен оптимальный способ иерархической кластеризации масс-спектров клеточного экстракта, позволяющий получать распределение, согласующееся с особенностями филогенетических связей *Aspergillus* spp. для расширения возможностей MALDI-TOF-масс-спектрометрии при идентификации видов, которые еще не внесены в типовые базы масс-спектро-профилей.

Впервые для *A. niger*, *A. awamori*, *A. flavus*, *A. oryzae* показано, что данные MALDI-масс-спектров ассоциированы с фенотипом лекарственной чувствительности, и эта ассоциация прослеживается вне действия противогрибкового лекарственного препарата. То есть ряд механизмов резистентности к антимикотикам полиенового и триазольного ряда у *Aspergillus* spp. сопряжены с конститутивными изменениями в протеомах этих микромицетов. Определено, что построение групповых матриц коэффициента корреляции позволяет выявлять различия MALDI-масс-спектров аспергиллов секций *Flavi* и *Nigri* с различной противогрибковой чувствительностью.

Теоретическая и практическая значимость работы

В результате культурально-морфологической части исследования разработана классификация типов роста *Aspergillus fumigatus* – ведущего по частоте возбудителя инвазивного аспергиллеза – на среде Чапека с дрожжевым экстрактом. Данную классификацию в дальнейшем целесообразно использовать при паспортизации коллекционных штаммов *A. fumigatus*, а также ввести формы этого микромицета (как таксон рангом ниже вида, используемый в микологии). Установлено, что картофельно-глюкозно-дрожжевой агар является питательной средой, эквивалентной по своим ростовым и дифференциальным качествам для условно-патогенных *Aspergillus* spp. классической питательной среде – агару Чапека с дрожжевым экстрактом. В опыте с модификацией состава агара Чапека с дрожжевым экстрактом также доказана равноценность сахарозы и лактозы в качестве энергетических источников для *Aspergillus* spp., данное обстоятельство значимо при разработке новых питательных сред для аспергиллов.

С учетом видового разнообразия условно-патогенных *Aspergillus* spp., характерных для Северо-Западного федерального округа России, разработаны морфологические ключи для идентификации аспергиллов – возбудителей инфекций человека.

Предложен способ субкультивирования аспергиллов для выделения белкового экстракта на этапе подготовки к масс-спектрометрическому исследованию, который отличается получением «пленчатой» колонии на поверхности жидкой питательной среды и проведением субкультивирования и экстракции в одной микропробирке.

На основе реализованного в исследовании опыта работы с биоинформационными редакторами и базами определен комплекс необходимых функций, инструментов, программных возможностей, необходимых для аннотирования MALDI-масс-спектров клеток и клеточных экстрактов, а также создания характеристик отдельных спектрообразующих белков. Данный комплекс решений позволит аннотировать не только MALDI-масс-спектры *Aspergillus* spp., но и других культивируемых микроорганизмов, таким образом, расширит возможности экспериментальной микробиологии.

Созданы подробные аннотации MALDI-масс-спектров пула пептидов и низкомолекулярных белков для *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. oryzae*, *A. clavatus*, *A. nidulans*. Установлено, что в композиции «спектрообразующих» белков *Aspergillus* spp., выявляемых при анализе MALDI-масс-спектров, среди представителей разных видов повторяются субъединицы Tim-Tom комплекса (митохондриальная транслоказа), легкая цепь динеина, глутаредоксин, субъединицы АТФ-синтазы, гистон H2B, Zn-связывающие белки митохондрий, белки с доменом DUF543, эукариотический фактор инициации и различные протеинкиназы. Следовательно, данные белки непосредственно, либо группы белков, взаимодействующие с ними, являются перспективными мишенями для разработки новых противогрибковых препаратов в отношении возбудителей инвазивного аспергиллеза, поскольку таким образом будет возможно заблокировать метаболические процессы, критически важные на инициальной стадии роста колонии. Выполненные аннотации масс-спектров являются иллюстрациями применения метода MALDI-TOF-масс-спектрометрии экстракта мицелия не только, как приема видовой идентификации, но и в качестве самостоятельного протеомного исследования.

Установлено наличие масс-спектрометрических маркеров аспергиллов из секций *Flavi* и *Nigri*, наличие которых сочетается с определенными значениями минимальных подавляющих концентраций (МПК) ПГЛС. Этот феномен позволит в дальнейшем разработать алгоритмы для быстрого определения чувствительности к ПГЛС с использованием MALDI-TOF-масс-спектрометрии.

Создана база (библиотека) масс-спектро-профилей «AMPSL» (*Aspergillosis Main Pathogens Spectral Library*) для совершенствования видовой идентификации *Aspergillus* spp.

методом линейной MALDI-TOF-масс-спектрометрии клеточного экстракта.

Доказано, что в первичной структуре ланостерол-14 α -деметираз изоформы А (CYP51A) *Aspergillus* spp. отображаются не только аминокислотные замены, ассоциированные с противогрибковой устойчивостью, но и сочетания аминокислотных остатков, специфичные для представителей конкретных видов.

Выполнена структурная реконструкция фермента CYP51A у *Aspergillus flavus* – одного из трех (наряду с *A. fumigatus* и *A. niger*) ведущих по частоте выделения возбудителей инвазивного аспергиллеза, который превосходит виды доминирующей «триады» по величинам минимальных ингибирующих концентраций триазоловых препаратов.

На основании проведенного расширенного фенотипического и биоинформационного исследования *Aspergillus* spp. получены видео-, аудио- и иллюстративные обучающие материалы: электронное пособие «Определение противогрибковой чувствительности нитчатых микромицетов: чем и как» (<https://sdo.szgmu.ru/mod/book/view.php?id=107508&chapterid=2651>); презентация «Лабораторная диагностика инфекций, вызываемых *Aspergillus* spp.» (<https://sdo.szgmu.ru/mod/resource/view.php?id=107517>); видеозанятия «Аспергиллез и аспергиллы. Часть 1», «Аспергиллез и аспергиллы. Часть 2» (<https://sdo.szgmu.ru/mod/url/view.php?id=137056> и (<https://sdo.szgmu.ru/mod/url/view.php?id=137057>); видеозанятие «Противогрибковые препараты» (<https://sdo.szgmu.ru/mod/url/view.php?id=137059>); электронный образовательный модуль «Масс-спектрометрия в видовой идентификации возбудителей бактериальных и грибковых инфекций» (<https://www.rosmedlib.ru/book/1MECH-0006.html>); электронный образовательный модуль «MALDI-TOF-масс-спектрометрия в бактериологии и микологии: практические аспекты» (<https://www.rosmedlib.ru/book/1MECH-0007.html>).

Результаты работы внедрены в учебный процесс кафедры медицинской микробиологии (акт внедрения от 28.04.2022), диагностическую работу микробиологической лаборатории микологической клиники (акт внедрения от 28.04.2022), научно-исследовательскую работу Российской коллекции патогенных грибов НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина (акт внедрения от 06.06.2022) Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова Минздрава России. Материалы диссертационного исследования включены в электронные учебные модули «Масс-спектрометрия в видовой идентификации возбудителей бактериальных и грибковых инфекций» и «MALDI-TOF-масс-спектрометрия в бактериологии и микологии: практические аспекты», аккредитованные в системе Непрерывного Медицинского Образования, а также в различные обучающие инструменты электронной образовательной среды «Русский Moodle 3KL». Созданная база (библиотека) типовых масс-спектро-профилей «AMPSL» внедрена в программное обеспечение VastoSCREEN (ООО НПФ «Литех», Россия)

MALDI-TOF-масс-спектрометра LaserToF LT2Plus (акт внедрения от 14.04.2022).

Полученные в ходе реализации работы результаты послужили основой для написания методических рекомендаций «Микологические культуральные исследования», учебно-методических пособий «Основы видовой идентификации микроорганизмов с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии» и «Организационная модель справочника возбудителей инфекций для формирования обучающих модулей с использованием информационно-симуляционных технологий».

Методология и методы исследования

Методология, использованная в работе, спланирована исходя из поставленной цели и задач исследования. Предметом исследования явились штаммы *Aspergillus* spp. и аминокислотные последовательности фермента ланостерол-14 α -деметилаза изоформы А (CYP51). В работе использованы традиционные микробиологические методы (экспериментальное культивирование, световая микроскопия); фотосъемка и цифровая обработка фотографий; масс-спектрометрия; молекулярно-генетическое, биоинформационное исследование; математические и статистические методы обработки данных.

Штаммы *Aspergillus* spp.

В исследовании использовали 244 штамма 12 видов *Aspergillus* spp. (в исходной трактовке видового состава), из них 236 клинического происхождения (96,7%); 8 штаммов из объектов внешней среды (3,3%). Штаммы предоставлены Российской коллекцией патогенных грибов (НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия; Таблица 1), а также НИЛ микологического мониторинга и биологии грибов и отделением лабораторной диагностики микологической клиники. Исходный видовой состав выборки был следующий: *A. fumigatus* – 94 (38,5%); *A. niger* – 70 (28,7%); *A. flavus* – 48 (19,7%); *A. terreus* – 6 (2,5%); *A. ustus* – 6 (2,5%); *A. versicolor* – 5 (2%); *A. nidulans* – 4 (1,6%), *A. ochraceus*, *A. glaucus* *A. candidus* – по 2 штамма (0,8%) каждого, *A. clavatus*, *A. wentii* – по 1 штамму (по 0,4%) каждого; *Aspergillus* sp. (неуточненного вида) – 3 (1,3%).

Таблица 1 - Штаммы *Aspergillus* spp. из Российской коллекции патогенных грибов, использованные в исследовании

Вид	Наименования штаммов по каталогу коллекции			Источник поступления (указаны современные названия учреждений)
<i>A. fumigatus</i>	РКПГ F-1108 РКПГ F-1114 РКПГ F-1172 РКПГ F-1248 РКПГ F-1266	РКПГ F-1267 РКПГ F-1268 РКПГ F-1277 РКПГ F-1279 РКПГ F-1325	РКПГ F-1327 РКПГ F-1377 РКПГ F-1384 РКПГ F-1437	Собственные поступления: НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина (Санкт-Петербург, Россия)

Продолжение таблицы 1

Вид	Наименования штаммов по каталогу коллекции			Источник поступления (указаны современные названия учреждений)
<i>A. niger</i>	РКПГ F-1109 РКПГ F-1249 РКПГ F-1281 РКПГ F-1284 РКПГ F-1322 РКПГ F-1329	РКПГ F-1330 РКПГ F-1338 РКПГ F-1343 РКПГ F-1345 РКПГ F-1376 РКПГ F-1438	РКПГ F-1442 РКПГ F-1444 РКПГ F-1445 РКПГ F-1446 РКПГ F-1447 РКПГ F-1448	Собственные поступления: НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина (Санкт-Петербург, Россия)
<i>A. flavus</i>	РКПГ F-1247 РКПГ F-1328 РКПГ F-1340 РКПГ F-1342	РКПГ F-1344 РКПГ F-1375 РКПГ F-1382 РКПГ F-1388	РКПГ F-1498 РКПГ F-1511 РКПГ F-1324	
<i>A. terreus</i>	РКПГ F-1275	РКПГ F-1381		
<i>A. versicolor</i>	РКПГ F-1115	РКПГ F-1241	РКПГ F-1287	
<i>A. sydowii</i>	РКПГ F-1510			
<i>A. ochraceus</i>	РКПГ F-1081			
<i>A. glaucus</i>	РКПГ F-1250			
<i>A. candidus</i>	РКПГ F-1494			
<i>A. nidulans</i>	РКПГ F-1336			
<i>Aspergillus spp.</i>	РКПГ F-64	РКПГ F-1123	РКПГ F-1295	
<i>A. candidus</i>	РКПГ F-123			Всероссийская коллекция микроорганизмов (Москва, Россия)
<i>A. wentii</i>	РКПГ F-6			
<i>A. ustus</i>	РКПГ F-11			
<i>A. clavatus</i>	РКПГ F-12			
<i>A. terreus</i>	РКПГ F-109			Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского РАН (Москва, Россия)
<i>A. oryzae</i>	РКПГ F-20			Кафедра микробиологии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета (Санкт-Петербург, Россия)
<i>A. fumigatus</i>	РКПГ F-1331 РКПГ F-1332 РКПГ F-1333	РКПГ F-1334 РКПГ F-1335		Институт биологического разнообразия грибов им. И. Вестердейк (Утрехт, Нидерланды)
<i>A. flavus</i>	РКПГ F-68			Микологическая лаборатория клиники Эрфуртской медицинской академии (Эрфурт, ФРГ)

Примакультуры клинических изолятов получены из различных биоматериалов человека, в том числе: образцы из нижних дыхательных путей (БАЛ, бронхосмыв, мокрота, биоптаты –

88; 37,6%); образцы из придаточных пазух носа и носоглотки (промывные воды, мазок со слизистой, биоптаты, операционный материал – 10; 4,3%); отделяемое наружного слухового прохода (23; 9,8%); других видов биоматериала (пунктат подкожного абсцесса, отделяемое операционной раны, кровь, ликвор, соскоб роговицы, измельченные ногтевые пластины, аутопсийный материал – 11; 4,7%); коллекционные клинические изоляты без точных сведений и примакультуре – 102 (43,6%).

Культуры *Aspergillus* spp. выделили от пациентов с различными патологиями, включая (данные о структуре приведены для сегмента выборки из 80 изолятов): доказанный и вероятный инвазивный аспергиллез легких, диссеминированный аспергиллез – 40% (32); предполагаемый (возможный) инвазивный аспергиллез легких [у пациентов с онкогематологическими заболеваниями, солидными новообразованиями, системным васкулитом, ВИЧ-инфекцией] – 12,5% (10); хронический аспергиллез легких – 1,25% (1); двусторонний диффузный неспецифический пневмосклероз (в качестве колонизаторов) – 3,75% (3); муковисцидоз – 2,25% (2); микотический синусит – 3,75% (3); отомироз – 27,5% (22); онихомироз – 2,5% (2), микотический кератит – 6,25% (5).

На протяжении исследования живые культуры штаммов сохраняли на картофельно-морковном агаре, овсяном агаре, а также на среде Чапека с дрожжевым экстрактом при комнатной температуре с пересевом через 4-6 месяцев. Перед очередным пересевом штаммы кратковременно пассировали на жидкой среде Сабуро по Ч. Эммонсу.

Культурально-морфологическое исследование *Aspergillus* spp.

Для изучения морфологии колоний *Aspergillus* spp. использовали 14 стандартных плотных питательных сред, применили 6 режимов инкубации, как указано в таблице 2. Среды непромышленного производства готовили согласно типовым прописям [55].

Таблица 2 - Стандартные питательные среды и режимы инкубации, использованные в культуральном исследовании

Питательная среда	Режимы инкубации посевов					
	30°C 7-10 суток	30°C 3-5 суток	30°C 14 суток	37°C 7 суток	50°C 4 суток	25°C 25 суток
агар Сабуро по Ч. Эммонсу	+			+		
агар YPD (среда с дрожжевым экстрактом, пептоном и глюкозой)			+			
сусло-агар (НИЦФ, Россия)	+					
картофельно-морковный агар (КМА)	+					
солодовый агар (HiMedia, Индия)	+	+				

Продолжение таблицы 2

Питательная среда	Режимы инкубации посевов					
	30°C 7-10 суток	30°C 3-5 суток	30°C 14 суток	37°C 7 суток	50°C 4 суток	25°C 25 суток
картофельно-глюкозно-дрожжевой агар (КГДА)	+					
агар Чапека	+					
агар Чапека с дрожжевым экстрактом	+					
агар Чапека с дрожжевым экстрактом и 20% сахарозы						+
модифицированный агар Чапека-Докса (HiMedia, Индия)	+			+	+	
микологический агар Киммига (HiMedia, Индия)		+				
<i>Aspergillus flavus/parasiticus</i> -агар (AFPA, в оригинальном каталоге – «питательная среда для дифференциации аспергиллов», HiMedia, Индия)	+					
среда с бенгальским розовым (HiMedia, Индия)	+	+				

Помимо указанных в таблице 2, также для хранения живых культур *Aspergillus* spp. использовали овсяный агар [55].

Питательные среды, у которых не указан производитель, изготавливали из компонентов. Ко всем питательным средам для подавления роста бактерий перед розливом добавляли гентамицина сульфат (ОАО «Синтез», Россия) из расчета 80 мг/л. Среды стерилизовали автоклавированием в соответствии с инструкциями производителя, среды собственного изготовления – при 121°C (1 атм) 15 мин (кроме среды Чапека с 20% сахарозы, которую стерилизовали текущим паром при 111°C 15 мин).

На разлитые в чашки Петри и пробирки питательные среды проводили однотоочный и трехточечный посев исследуемых штаммов. Для посева готовили инокулюм следующим образом. В пробирки Эппендорф объемом 1,5 мл наливали 0,7 мл стерильного изотонического раствора NaCl с добавлением твина 20 до 0,5%. В указанном растворе суспендировали споры музейной культуры (у штаммов с выраженным спорообразованием) в объеме 1 бактериологической петли №2, если же штамм проявлял слабое спорообразование, то в пробирку с помощью микологической лопатки помещали небольшой фрагмент культуры (около 5x5 мм) и растирали его лопаткой у края пробирки. Полученную суспензию с помощью

автоматического дозатора в объеме 10 мкл точно наносили на поверхность агар.

На КГДА и среде Чапека с дрожжевым экстрактом также исследовали культуральные свойства аспергиллов при выращивании посевов в колбах. Для этого применяли инокулюм из спор и режимы инкубации с теми же характеристиками, как указано выше.

По окончании срока инкубации проводили фотосъемку выросших колоний с помощью камеры Presto T55 (Rekam, Италия). Для посевов на ряд сред съемку проводили также на промежуточных сроках (2 и 3 суток). Микроморфологию изучали (выборочно) по препаратам типа «раздавленная капля», монтированных в смеси этанола и глицерина 1:1, с помощью микроскопа DM LB2 (Leica, Германия). Этим же инструментом производили микрофотосъемку. Цифровую обработку фотографий для представления в печать производили с использованием графических редакторов XnView и GIMP.

MALDI-TOF-масс-спектрометрия белкового экстракта аспергиллов

Раздел исследования выполнен с использованием MALDI-TOF-масс-спектрометров Autoflex speed TOF/TOF с пакетами программного обеспечения flexControl 3.4, MALDI Biotyper и flexAnalysis (Bruker Daltonik GmbH, Германия) и LaserToF LT2Plus (SAI, Великобритания) с пакетом программного обеспечения VastoSCREEN-ID (ООО «НПФ Литех», Россия). Применили расходные компоненты и рабочие протоколы, рекомендованные производителями оборудования.

Молекулярно-генетическая идентификация штаммов *Aspergillus* spp.

Часть выборки штаммов идентифицировали методом таргетного ДНК-секвенирования локусов β -тубулина (*benA/tubB*), а также внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS) в регионе, кодирующем рибосомальную РНК, согласно протоколу CLSI MM18-A [269] Данные о результатах молекулярно-генетической идентификации любезно предоставлены сотрудниками НИЛ молекулярно-генетической микробиологии.

Биоинформационный анализ масс-спектров избранных штаммов *Aspergillus* spp.

Обработку данных полученных MALDI-масс-спектров выполнили в редакторах TagIdent, UniProt и Protein-BLAST с использованием баз данных UniProtKB/Swiss-Prot, UniProtKB/TrEMBL и Protein Data Bank.

Определение чувствительности *Aspergillus* spp. к противогрибковым препаратам

Определение чувствительности проводили по международному протоколу EUCAST E.DEF 9.3 [126]. Использовали реактивы и расходные средства от отечественных производителей - ОАО «Синтез» и ОАО «Татхимфармпрепараты», а также от зарубежных – JetBiofil и Sigma-Aldrich.

Полученные значения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) сопоставляли с экспертными правилами интерпретации EUCAST (версия 2.0 от 24.09.2020), которые

определяют пороговые значения МИК наиболее распространенных антимикотиков у некоторых видов аспергиллов (*A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. nidulans*; Таблица 3) [288].

Таблица 3 - Экспертные критерии интерпретации результатов определения чувствительности *Aspergillus* spp. к антимикотикам по протоколу EUCAST E.DEF 9.3 (извлечение)

Вид	Противогрибковый препарат	Пограничные концентрации, мг/л		«Экологическая точка отсечения», ECOFF, мг/л
		Чувствительный, S $\leq$	Устойчивый, R $>$	
<i>A. flavus</i>	Амфотерицин В			4
	Итраконазол*	1	1	1
	Вориконазол			2
<i>A. fumigatus</i>	Амфотерицин В	1	1	1
	Итраконазол*	1	1	1
	Вориконазол*	1	1	1
<i>A. nidulans</i>	Амфотерицин В			4
	Итраконазол*	1	1	1
	Вориконазол*	1	1	1
<i>A. niger</i>	Амфотерицин В	1	1	0,5
	Итраконазол			4
	Вориконазол			2
<i>A. terreus</i>	Амфотерицин В			8
	Итраконазол*	1	1	0,5
	Вориконазол			2

Примечание: «*» - для данного антимикотика при определении чувствительности у конкретного вида принята «концентрация технической неопределенности» 2 мг/л, при достижении которой по результатам теста руководствуются специальными правилами применения препарата

Биоинформационное исследование структуры ланостерол-14- α -деметилазы (CYP51) аспергиллов

Для биоинформационного анализа использовали аминокислотные последовательности ланостерол-14- α -деметилазы, депонированные в открытых источниках. Поиск последовательностей выполнили в биоинформационной базе BLAST, в раздел Protein BLAST (pBLAST). Для поиска аналогов использовали структуру CYP51A из *A. fumigatus* Af293, включенную в базу KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg/>), которая первично была установлена при полногеномном секвенировании ДНК данного штамма и последующей аннотации генома Nierman W.C. и соавторами [248]. Гомологичные последовательности искали среди представителей родов *Aspergillus* и *Neosartorya*. Среди найденных в BLAST гомологичных последовательностей для дальнейшего анализа отобрали только те, для которых указана функциональная принадлежность «ланостерол-14 α -деметилаза», «[цитохром P450] стерол-14 α -деметилаза» или «CYP51A», а

также перекрытие последовательности не менее 98% (для штаммов *A. fumigatus*), а для видов комплекса «*Aspergillus non-fumigatus*» — 77%. Для каждой последовательности выкопировали идентификационный номер, данные об определивших ее авторах и ссылку на литературный источник (если данная последовательность была использована в публичной работе), а также наименование штамма. Также из публичных источников выкопировали данные о чувствительности штаммов к антимикотикам и наличия известных аминокислотных замен, которые ведут к развитию резистентности к триазолам.

Распределение найденных последовательностей выполнили в Blast Tree View методом «ближайших соседей» с использованием алгоритма Гришина Н.В. [146] с максимальным значением показателя различия 0,85, а результат построения отображали в форме ректангулярного древа (с отображением реальной дистанции) и наклонного древа (без отображения дистанции). Полученное распределение сопоставляли с принадлежностью штаммов к определенным видам и секциям рода *Aspergillus*, а также с данными о чувствительности изолята к триазолам. Чувствительность к антимикотикам штаммов секции *Fumigati*, последовательности которых использовали в анализе, приведены в таблице 4 (по данным авторов, исследовавших соответствующие последовательности CYP51A). Такие данные имеются в основном для *A. fumigatus*.

Сопоставление найденных аминокислотных структур провели с помощью встроенного программного алгоритма COBALT (Constrait-based Multiple Alignment Tool, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re_cobalt.cgi) в расширенном формате с маркированием идентичных участков.

Таблица 4 - Чувствительность к антимикотикам штаммов, последовательности CYP51A у которых использованы в данном исследовании [138, 151, 188, 194, 217, 238, 324]

Штамм	Результаты определения чувствительности (МИК к антимикотикам, мкг/мл). Мутация в CYP51 (если известна).
<i>A. fumigatus</i> Af293	Itz – 0,25 мкг/мл (S), Vrz – 0,0625 мкг/мл (S), Poz – 0,0313 мкг/мл (S).
<i>A. fumigatus</i> CM 2733	Штамм чувствителен к Itz, Vrz, Poz, Rav.
<i>A. fumigatus</i> CM 3248	Штамм чувствителен к Itz, Vrz, Poz, Rav.
<i>A. fumigatus</i> F16867	Itz – >8 мкг/мл (R), Vrz – 2 мкг/мл (I), Poz – 0,125 мкг/мл (S). В CYP51A – мутация E427G.
<i>A. fumigatus</i> PSL13110842	Itz – 0,5 мкг/мл (S), Vrz – 2 мкг/мл (I), Poz – 0,12 мкг/мл (S). В CYP51A мутация TR ₄₆ /Y121F/T289A.
<i>A. fumigatus</i> s9 (Shjt9)	Itz – 0,5 мкг/мл (S), Vrz – 0,5 мкг/мл (S). В CYP51A мутация D343N.
<i>A. fumigatus</i> h18 (Shhs18)	Itz – 4 мкг/мл (R), Vrz – 2 мкг/мл (R), Poz – 0,5 мкг/мл (R). В CYP51A мутация G432A.

Продолжение таблицы 4

Штамм	Результаты определения чувствительности (МИК к антимикотикам, мкг/мл). Мутация в CYP51 (если известна).
<i>A. fumigatus</i> F15122	Itz – >8 мкг/мл (R), Vtz – >8 мкг/мл (R), Poz – 1 мкг/мл (R). В CYP51A – мутация G448S.
<i>A. fumigatus</i> CM 4593	Itz – >8 мкг/мл (R), Vtz – 1,0 мкг/мл (S), Poz – 0,5-1,0 мкг/мл (R), Rav – 2,0-4,0 мкг/мл. В CYP51A мутация M220I.
<i>A. fumigatus</i> CM 1245	Itz – 4,0 мкг/мл (R); Vtz – 2,0 (R): приведены величины МИК ₉₀ . В CYP51A мутация M220V.
<i>A. fumigatus</i> CM 2164	Itz – >8 мкг/мл (R), Vtz – 0,5-1,0 мкг/мл (R), Poz – 0,25-0,5 мкг/мл (R), Rav – 1,0-2,0 мкг/мл. В CYP51A мутация M220T.
<i>A. fumigatus</i> CM 1244	Itz – 5,2 мкг/мл (R); Vtz – 2,0 (S): приведены величины МИК ₉₀ . Чувствителен к Rav. В CYP51A мутация G54E.
<i>A. fumigatus</i> CM 2627	Itz – >8 мкг/мл, Vtz – 8,0 мкг/мл, Poz – 0,50 мкг/мл. В CYP51A мутация TR34/L98H.
<i>A. fumigatus</i> CM 2159	Itz – >8 мкг/мл (R), Vtz – 1,0-2,0 мкг/мл (R), Poz – 2,0 мкг/мл (R), Rav – 1,0-2,0 мкг/мл. В CYP51A мутация M220K.
<i>A. fumigatus</i> F11628	Itz – >8 мкг/мл (R), Vtz – >8 мкг/мл (R), Poz – >8 мкг/мл (R). В CYP51A – мутация G138C.
<i>A. fumigatus</i> CM 796	Itz – 16 мкг/мл (R), Vtz – 1 мкг/мл (S), Rav – 0,5-1,0 мкг/мл. В CYP51A мутация G54V.
<i>A. fumigatus</i> F15861	Itz – >8 мкг/мл (R), Vtz – 1 мкг/мл (S), Poz – 1 мкг/мл (R). В CYP51A – мутация P216L.
<i>A. fumigatus</i> CM 2097	Штамм резистентен к Itz, чувствителен к Vtz и Rav. В CYP51A мутация G54R.
<i>A. fumigatus</i> CM 3500	Штамм резистентен к Itz, чувствителен к Vtz и Rav. В CYP51A мутация G54W.
<i>A. fumigatus</i> F13619	Itz – >8 мкг/мл (R), Vtz – >8 мкг/мл (R), Poz – 0,5 мкг/мл (R). В CYP51A – мутация H147Y и G448S.
<i>A. fumigatus</i> s42b (Shjt42b)	Itz – 16 мкг/мл (R), Vtz – 2 мкг/мл (R), Poz – 0,5 мкг/мл (R). В CYP51A – мутация TR ₃₄ /L98H/S297T/F495I.
<i>A. lentulus</i> IFI05.0046	Itz – 0,5 мкг/мл, Vtz – 2 мкг/мл, Poz – 0,25 мкг/мл.
<i>A. oerlinghausenensis</i> CBS 139183	Штамм не чувствителен к Itz.

Примечания: Itz – итраконазол; Vtz – вориконазол; Rav – равуконазол; Poz – позаконазол; S – чувствительный; R – устойчивый. Для всех штаммов чувствительность определили по протоколу EUCAST E.DEF 9.1, кроме *A. lentulus* IFI05.0046 (CLSI M38A) и *A. oerlinghausenensis* CBS 139183 (Посев на плотную среду с Itz).

Математические и статистические методы исследования

Изучение различий в результативности идентификации у представителей различных групп изолятов *Aspergillus spp.* выполнили по следующему алгоритму:

- Разделение полученного банка масс-спектров на 4 группы: (1) *A. fumigatus*, (2) представители секции *Nigri*, (3) представители секции *Flavi*, (4) представители других секций;
- Разделение масс-спектров внутри выделенных групп по успешности идентификации на основании порогового значения показателя score value равного 1,700;
- Построение таблицы сопряженности и расчет критерия χ^2 ($f=3$, $p<0,01$, критическое табличное значение — 11,345).

Изучение различий между таксономическими группами изолятов по показателю «score value». Выборку масс-спектров разделили по таксономическому признаку на группы: *A. fumigatus*, представители секции *Nigri*, представители секции *Flavi*, представители других секций. Выявление различий выполняли в 2 этапа, сначала — путем расчета критерия Краскелла-Уоллиса, затем (в случае выявления статистически достоверного неравенства медиан признака хотя бы в одной из сопоставляемых пар) — по критерию χ^2 ($f=1$, $p<0,05$, критическое табличное значение — 3,841) и V-критерию Крамера. В последнем случае выделенные группы сравнивали попарно (6 сопоставлений), а для интерпретации значения критерия Крамера использовали шкалу Реа-Паркера.

Сравнение различных методов видовой идентификации *Aspergillus spp.* Для сравнения методов видовой идентификации *Aspergillus spp.*, включая морфологическое исследование, таргетное ДНК-секвенирование локусов ITS и β -тубулина, MALDI-TOF-масс-спектрометрию клеточного экстракта, результаты видовой идентификации для каждого штамма отразили в балльной оценке. Критерии оценки следующие: «1» - отнесение к роду *Aspergillus*; «2» - определение до уровня секции рода; «3» - определение до уровня группы видов внутри секции; «4» - определение до уровня видового комплекса; «5» - определение до уровня вида. Использовали общепринятую классификацию секций рода, видовые комплексы обозначали дробными латинскими видовыми именами, а в отношении групп видов внутри секций использовали следующую оригинальную систему (латинскими цифрами указан условный номер группы):

I. **Секция *Fumigati*.** Сильно выраженное спороношение, колонии преимущественно темных оттенков зеленого, штаммы гетероталлические: *A. fumigatus*, *A. duricaulis*, *A. turcosus*, *A. udagawae*;

II. **Секция *Fumigati*.** Слабо или умеренно выраженное спороношение, колонии белые с зеленоватыми (зеленовато-серыми, зеленовато-бурыми) областями [оттенками] ($\pm$), штаммы гете-

роталлические: *A. brevistipitatus*, *A. conversis*, *A. felis*, *A. fennelliae*, *A. fumigatiaffinis*, *A. fumisyn-nematus*, *A. lentulus*, *A. novofumigatus*, *A. oerlinghausenensis*, *A. parafelis*, *A. pseudofelis*, *A. pseudoviridinutans*, *A. spathulatus*, *A. viridinutans*, *A. wyomingensis*;

III. **Секция *Fumigati***. Колонии кремовые, бело-кремовые, иногда с зеленоватым или серым оттенками, штаммы гомоталлические (*Neosartorya* spp.): *N. assulata*, *N. australiensis*, *N. coreana*, *N. denticulata*, *N. ferencii*, *N. fischeri*, *N. glabra*, *N. hiratsukae*, *N. papuensis*, *N. pseudofischeri*, *N. quadricincta*, *N. spinosa*, *N. tatenoi*, *N. warcupii*;

IV. **Секция *Fumigati***. Колонии желтоватые, бело-желтые, золотистые, штаммы гомоталлические (*Neosartorya* spp.): *N. aurata*, *N. aureola*, *N. laciniosa*, *N. multiplicata*, *N. stramenia*;

V. **Секция *Fumigati***. Колонии розовые до пурпурно-красных: *A. brevipes*;

VI. **Секция *Fumigati***. Колонии зеленоватые, при микроскопии видны необычно маленькие для представителей секции конидиальные головки: *A. unilateralis*;

VII. **Секция *Fumigati***. Колонии зеленые до желто-зеленых, штаммы образуют разветвляющиеся конидиеносцы: *Aspergillus beijingensi*, *A. qizutongii*, *A. wangduanlii*;

VIII. **Секция *Nigri***. Конидиальные головки с двумя рядами стеригм: *A. acidus*, *A. awamori*, *A. brasiliensis*, *A. carbonarius*, *A. costaricaensis*, *A. ellipticus*, *A. eucalypticola*, *A. foetidus*, *A. heteromorphus*, *A. homomorphus*, *A. ibericus*, *A. lacticoffeatus*, *A. neoniger*, *A. niger*, *A. piperis*, *A. sclerotiicarbonarius*, *A. sclerotioniger*, *A. tubingensis*, *A. vadensis*.

IX. **Секция *Nigri***. Конидиальные головки с одним рядом стеригм: *A. aculeatus*, *A. aculeatinus*, *A. brunneoviolaceus*, *A. indologenus*, *A. japonicus*, *A. labruscus*, *A. saccharolyticus*, *A. uvarum*, *A. violaceofuscus*, *A. floridensis*, *A. pulverulentus*, *A. helicothrix*, *A. trinidadensis*.

X. **Секция *Flavi***. Колонии светло-(травянисто)-зеленые, желто-зеленые, жёлтые или белые с областями такого цвета: *A. arachidicola*, *A. caelatus*, *A. neoalliaceus*, *A. flavus*, *A. minisclerotigenes*, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *A. parvisclerotigenus*, *A. pseudocaelatus*, *A. sojae*, *A. mottae*, *A. transmontanensis*, *A. sergii*, *A. luteovirescens*, *A. togoensis*, *A. aflatoxiformans*, *A. aspearensis*, *A. austwickii*, *A. cerealis*, *A. neoalliaceus*, *A. pipericola*, *A. subflavus*, *A. vandermerwei*.

XI. **Секция *Flavi***. Колонии светло-коричневые (иногда с зелёным оттенком), оранжево-коричневые или белые с областями такого цвета: *A. albertensis*, *A. alliaceus*, *A. avenaceus*, *A. bombycus*, *A. lanosus*, *A. leporis*, *A. nomius*, *A. pseudonomius*, *A. pseudotamarii*, *A. terricola*, *A. betholletius*, *A. coremiiformis*, *A. tamarii*.

XII. **Секция *Terrei***. Колонии коричневатые, цвета керамики (теракоотовые), ярко-коричневые, оранжево-желтые, жёлтые, темно-кремовые, либо белые с одним из указанных оттенков: *A. terreus*, *A. hortai*, *A. neoaficanus*, *A. pseudoterreus*, *A. alabamensis*, *A. floccosum*, *A. aureoterreus*, *A. allahabadii*, *A. carneus*, *A. niveus*, *A. ambiguus*, *A. neoniveus*.

XIII. **Секция *Terrei***. Колонии беловато-зеленые: *A. microcysticus*, *A. neoindicus*.

XIV. Секция *Candidi*. Виды с бело-кремовыми колониями: *A. candidus*, *A. tritici*, *A. pragensis*.

XV. Секция *Candidi*. Виды с желтыми колониями: *A. campestris*.

Секцию *Aspergillus* (одноименную с родом) для более удачного отображения обозначали по телеоморфному имени представителей *Eurotium*. Уровни точности идентификации с использованием таргетного ДНК-секвенирования считали предельными. В тех случаях, когда идентификация до любого уровня оказывалась ошибочной, результат исследования конкретным методом оценивали в «0» баллов. Для сравнения полученных совокупностей балльных оценок рассчитывали значение критериев Фридмана (для всех совокупностей), а также критерия Уилкоксона с «двусторонней» альтернативной гипотезой (для попарного сравнения выборок с целью выявления направленности изменений).

Помимо этого рассчитывали доли (%) совпадения результатов морфологического и физико-химического исследования с данными ДНК-секвенирования, а также – величинам показателей диагностической чувствительности, диагностической специфичности, прогностичности положительного результата и прогностичности отрицательного результата. В последнем случае для расчета использовали следующие промежуточные и результирующие показатели:

- а – число изолятов данного вида, правильно классифицированные с помощью анализируемого метода (истинно положительные);
- b – число изолятов других видов, неверно отнесенные анализируемым методом к конкретному виду (ложно положительные);
- с – число изолятов данного вида, неверно классифицированные с помощью анализируемого метода (ложно отрицательные);
- d – число изолятов других видов, правильно классифицированные с помощью анализируемого метода (истинно отрицательные).
- Диагностическая чувствительность $ДЧ = a * 100\% / (a + c)$;
- Диагностическая специфичность $ДС = d * 100\% / (b + d)$;
- Прогностичность положительного результата $ППР = a * 100\% / (a + b)$;
- Прогностичность отрицательного результата $ПОР = d * 100\% / (c + d)$.

Распределение масс-спектро-профилей протеомов *Aspergillus spp.* В качестве принципа математического распределения масс-спектро-профилей избрана иерархическая кластеризация с максимальным числом кластеров 5. Использовали 8 различных способов расчета дистанции между масс-спектро-профилями (корреляционный метод, по евклидовой метрике, по квадратичной евклидовой метрике, по прямоугольной метрике, по П.Ч. Махаланобису, по Г. Минковскому, косинусный коэффициент, по П.Л. Чебышеву) и 7 способов объединения МСП (метод одиночной связи, метод полной связи, невзвешенный и взвешенный метод средней связи,

невзвешенный и медианный центроидный метод, метод Уорда). В целях подбора комбинации способа расчета дистанции и объединения для получения групп МСП, имеющих таксономический смысл, из генеральной совокупности МСП извлекли модельную выборку. Применили следующий принцип комплектации модельной выборки: включили произвольно по 5 масс-спектров из *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* со «score value» не менее 2,000; из *A. nidulans*, *A. awamori* и *A. niger/awamori*-complex – по 5 масс-спектров с наивысшим значением «score value»; из других видов – все масс-спектры со «score value» не менее 1,700. Таким образом, удалось сформировать модельную выборку из 52 масс-спектров: *A. fumigatus* – 1; *A. flavus* – 5; *A. oryzae* – 4; *A. tamaris* – 3; *A. terreus* – 5; *A. niger* – 5; *A. awamori* – 5; *A. niger/awamori* – 5; *A. tubingensis* – 2; *A. nidulans* – 5; *A. sydowii/versicolor* – 2; *A. clavatus* – 1; *A. ochraceus* – 1; *A. ustus* – 2; *A. calidoustus* – 1; *A. candidus* – 1; *E. amstelodami* – 1. В определении видовой принадлежности штаммов, из масс-спектров которых собрали модельную выборку, положен комплексный подход – результаты морфологического исследования, MALDI-TOF-масс-спектрометрии и парциального ДНК-секвенирования локуса *benA* (*tubB*).

С использованием комбинаций различных способов расчета дистанции и объединения МСП получили 56 дендрограмм. Полученные распределения МСП в дендрограммах оценивали по следующим признакам: (1) группировка МСП одного вида *Aspergillus* spp. в одной кладе; (2) сходство распределения с делением рода *Aspergillus* на группы (подроды, секции) в соответствии с различными вариантами классификации.

Создание распределений выполнили в MALDI Biotyper OC 3.1 (преобразование масс-спектров в МСП производилось автоматически). В этой же программе выполнили построение кластера анализа главных компонент для всей совокупности масс-спектров.

Выявление масс-спектрометрических отличий в группах штаммов *Aspergillus* spp. с различной чувствительностью к итраконазолу и амфотерицину В выполнили путем построения матрицы сложного коэффициента корреляции (в оригинале англ. — Composite Correlation Index, CCI-матрица) в MALDI Biotyper OC 3.1. Для реализации данного раздела исследования выборку штаммов с определенной чувствительностью к антимикотикам по EUCAST, в которой штаммы и их масс-спектры делили на 3 категории для итраконазола и амфотерицина В: *A. fumigatus*, *Aspergillus* spp. секции *Flavi* и *Aspergillus* spp. секции *Nigri*. Масс-спектры анализировали по сегменту детектируемого диапазона m/z (Mr) 3000-12000 Da, разрешение 4, интервал 8, применили коррекцию функции автокорреляции.

Личное участие автора в получении результатов

Автор запланировал настоящее исследование, разработав его дизайн. Личный вклад автора был осуществлен на всех этапах проведения исследования, сформированы и обоснованы цели, задачи, методы исследования, произведен набор экспериментального материала.

Автор настоящей работы самостоятельно выполнил морфологическую и физико-химическую идентификацию штаммов *Aspergillus* spp.; изучил особенности морфологии аспергиллов на различных питательных средах; определил чувствительность штаммов *Aspergillus* spp. к противогрибковым препаратам (антимикотикам); провел MALDI-TOF-масс-спектрометрию белкового экстракта из культур исследуемых штаммов с целью видовой идентификации; составил базу типовых масс-спектро-профилей, выполнил математическое распределение масс-спектров протеомов *Aspergillus* spp. и дал его интерпретацию; провел анализ биоинформационных данных. На этапах проведения исследования автор самостоятельно поддерживал живые культуры *Aspergillus* spp.

Анализ отечественной и зарубежной литературы произведен лично автором, как и обработка полученных результатов.

Штаммы *Aspergillus* spp. для исследования любезно предоставлены сотрудниками кафедры медицинской микробиологии СЗГМУ им. И.И. Мечникова доц. к.м.н. Богомоловой Т.С. и асс. Пинегиной О.Н., сотрудниками отделения лабораторной диагностики микологической клиники СЗГМУ им. И.И. Мечникова Шурпицкой О.А. и к.м.н. Сухановой Ю.А., заведующей Российской коллекцией патогенных грибов Чилиной Г.А. Штаммы бактерий, использованные при апробации «библиотеки» масс-спектро-профилей «AMPSL», предоставили сотрудники отделения лабораторной диагностики микологической клиники СЗГМУ им. И.И. Мечникова Ремнева Н.П., Кашуба В.М. и Цветкова Г.В.

Клиническую характеристику групп пациентов предоставили доцент кафедры клинической микологии, аллергологии и иммунологии СЗГМУ им. И.И. Мечникова к.м.н. Шадринова О.В. и сотрудники микологической клиники СЗГМУ им. И.И. Мечникова к.м.н. Борзова Ю.В. (зав. клиникой) и Десятик Е.А. (врач-аллерголог).

Данные о результатах молекулярно-генетической идентификация *Aspergillus* spp. предоставлены сотрудниками НИЛ молекулярно-генетической микробиологии НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина к.б.н. Михайловой Ю.В. и Рудневой М.В.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Основные возбудители аспергиллезной инфекции (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*) проявляют выраженный морфологический штаммовый полиморфизм *in vitro*;
2. Маркеры видовой принадлежности в MALDI-масс-спектрах *Aspergillus* spp. представлены уникальными комплексами белков и пептидов, отличающихся политопной клеточной локализацией и различной функциональной принадлежностью;
3. Возбудители аспергиллеза из секций *Flavi* (*A. flavus*, *A. oryzae*, *A. tamarii*) и *Nigri* (*A. niger*, *A. awamori* и *A. niger/awamori*) с различной чувствительностью к итраконазолу и амфотерицину В отличаются по масс-спектрометрическим свойствам культур;

4. Определение нуклеотидной последовательности генов типа *cyp51A* у *Aspergillus* spp. позволяет устанавливать видовую принадлежность этих грибов, а также детерминанты резистентности к триазольным препаратам.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность полученных результатов обеспечивается адекватным объемом наблюдений над объектами исследования (244 штаммов *Aspergillus* spp.; 445 культуральных исследований; >700 масс-спектрометрических съемок) и оптимально подобранными методами статистической обработки полученных данных. В работе использованы современные микробиологические, физико-химические, молекулярно-генетические и биоинформационные методы, а также стационарное и сетевое программное обеспечение для математического и статистического анализа, цифровой обработки изображений.

Работа выполнена в соответствии с темами НИР Государственных заданий Минздрава России «Изучение молекулярной эпидемиологии, микробиологический мониторинг внутрибольничных грибковых инфекций, актуальных госпитальных штаммов возбудителей внутрибольничных инфекций. Изучение генома и протеома возбудителей микозов» (2011 – 2015 гг.); «Изучение молекулярных маркеров риска развития микозов и резистентности микромицетов к противогрибковым препаратам на уровне генома и протеома» (2016 – 2018 гг.); «Молекулярные предикторы развития микозов и микоаллергозов различного генеза на основе иммунопатогенеза» (2016 – 2018 гг.); «Разработка быстрых методов диагностики микозов и молекулярных маркеров резистентности клинически значимых микромицетов к противогрибковым препаратам» (2018 – 2020 гг.), исполняемых НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова.

Диссертация апробирована на заседании заседания научной проблемной комиссии ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России №10 «Эпидемиология, профилактика, диагностика и лечение инфекционных (бактериальных, вирусных, микотических, паразитарных и связанных с оказанием медицинской помощи) и некоторых неинфекционных заболеваний» (протокол №2 от «20» апреля 2022 г.).

Результаты работы по диссертации доложены и представлены на 37 научных мероприятиях: Научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов «Трансляционная медицина: от теории к практике» (Санкт-Петербург, 2013, 2014, 2017, 2018, 2021, 2022 гг.); Всероссийский (и Российско-Китайский) конгресс по медицинской микробиологии, эпидемиологии, клинической микологии и иммунологии «Кашкинские чтения» (Санкт-Петербург, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022 гг.); Научно-практической конференции «Профилактическая медицина — 2013» и конкурсе научно-исследовательских проектов молодых ученых (Санкт-Петербург, 2013); 6-ом, 8-ом и 9-ом

международных Конгрессах «Успехи в борьбе с аспергиллезом» (Advances Against Aspergillosis, Испания, Мадрид, 2014; Португалия, Лиссабон, 2018; Лугано, Швейцария, 2020); Отчетных сессиях научных подразделений СЗГМУ им. И.И. Мечникова «Фундаментальные исследования в современной медицине: достижения и перспективы» (Санкт-Петербург, 2014, 2015, 2016, 2018, 2019 гг.); 25-ом и 29-ом Европейских конгрессах по клинической микробиологии и инфекционным заболеваниям («ECCMID», Дания, Копенгаген, 2015; Нидерланды, Амстердам, 2019); 7-ом и 8-ом Конгрессе «Тенденции в медицинской микологии» («TIMM», Португалия, Лиссабон, 2015; Сербия, Белград, 2017); 19-ом Конгрессе международного общества по микологии человека и животных (ISHAM, Австралия, Мельбурн, 2015); XX Санкт-Петербургской Ассамблее молодых ученых и специалистов (Санкт-Петербург, 2015); 3-ей Китайско-Российской международной конференции по микробиологии, иммунологии и связанным с ними заболеваниям (Wu Lien-Teh Forum, CRICMID, Китай, Харбин, Пекин, 2016); Практико-ориентированный семинар: «Актуальные вопросы микробиологической диагностики» (Санкт-Петербург, 2016); IV Всероссийской с международным участием заочной научно-практической конференции «Здоровье населения и качество жизни» (Санкт-Петербург, 2017); Научно-практической конференции «Биоразрушение строительных конструкций» (Санкт-Петербург, 2017); 5-й Юбилейный Российский конгресс лабораторной медицины (Россия, Москва, 2019); Международный форум «Вузовская наука. Инновации» (2021).

Различные фрагменты работы выполнены при поддержке премии имени профессора В.М. Лещенко (Национальная академия микологии, оргкомитет 6-го Конгресса «Успехи в борьбе с аспергиллезом» {6th Advances Against Aspergillosis}), гранта имени профессора Э.Э. Эйхвальда (ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова), гранта «УМНИК» Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (договор №4161ГУ1/2014), гранта Правительства Санкт-Петербурга для аспирантов ВУЗов.

Работа отмечена дипломом 1-ой степени конкурса «Эстафета вузовской науки – 2021» в номинации «Клинические исследования в микробиологии», юбилейной медалью к двадцатилетию основания Национальной Академии Микологии.

ГЛАВА 1. Обзор литературы

1.1 Характеристика рода *Aspergillus*

Род мицелиальных аскомицетов *Aspergillus* P. Micheli ex Haller, 1768 имеет следующее систематическое положение: царство *Fungi*; подцарство *Dikarya*; отдел *Ascomycota*; класс *Eurotiomycetes*; порядок *Eurotiales*; семейство *Trichocomaceae*. Типовой вид рода — *Aspergillus niger* v. Tiegh. Для удобства род подразделен на подроды и секции.

В микологии род *Aspergillus* является одним из самых крупных по количеству видов. Абсолютную численность настоящих видов этого рода на данный момент трудно назвать в связи с регулярно появляющимися публикациями об открытии новых видов и пересмотре ранее описанных. Род включает более 330 видов [217, 300, 301], в то же время в авторитетных таксономических сетевых ресурсах MycoBank и Index Fungorum по состоянию на 04.04.2022 имеется соответственно 1295 и 1082 видовых названий аспергиллов, многие из которых, очевидно, являются синонимами.

1.1.1 Макроморфология и питательные потребности

Представители рода, как правило, неприхотливы к составу питательных сред. В качестве источника углерода могут использовать различные углеводы, а также иные органические соединения природного и синтетического происхождения. Источники азота для них могут быть органическими или минеральными. Некоторые аспергиллы способны фиксировать атмосферный азот. На питательных средах эти микромицеты формируют бархатистые колонии, которые часто приобретают яркую окраску: зеленую, желтую, коричневую, серую, белую, черную, редко красную. Цвет колонии определяется преимущественно окраской спор. Колонии обычно равномерной высоты, иногда имеют складчатый рельеф. Для некоторых видов характерно образование пигментов с оборотной стороны колонии, которые часто диффундируют в питательную среду. На поверхности колоний могут формироваться капли экссудата, иногда невооруженным глазом можно увидеть некоторые особые образования — клейстотеции, склероции, коремии (см. ниже). Рост на питательных средах может быть неограниченным или ограниченным [2, 193].

1.1.2 Микроморфология, характеристика полового и бесполого размножения

Колонии аспергиллов состоят из воздушного и субстратного мицелия (Рисунок 1). Гифы снабжены регулярными септами, типичными для аскомицетов. Родовую принадлежность устанавливают по характерной морфологии процесса бесполого спорообразования. На гифах субстратного или воздушного мицелия отдельные клетки обособливаются и дают начало высоким гифам — конидиеносцам, устремляющимся прочь от поверхности питательной среды в воздушное пространство. На вершине конидиеносца формируется терминальное расширение,

которое может быть сферическим, грушевидным (колбовидным), булавовидным или лопатовидным. Терминальное расширение венчают клетки, образующие конидии — стеригмы. Стеригмы могут формироваться в один или в два ряда (один ряд из другого). В последнем случае различают стеригмы I и II порядка, а в зарубежной литературе их называют метулы и фиалиды [254]. Стеригмы могут покрывать терминальное расширение полностью, или только в дистальной части ($\frac{1}{2}$ или $\frac{1}{3}$). Для свободной от стеригм проксимальной части терминального расширения Н.П. Елинов предложил название *анофизис* [8].

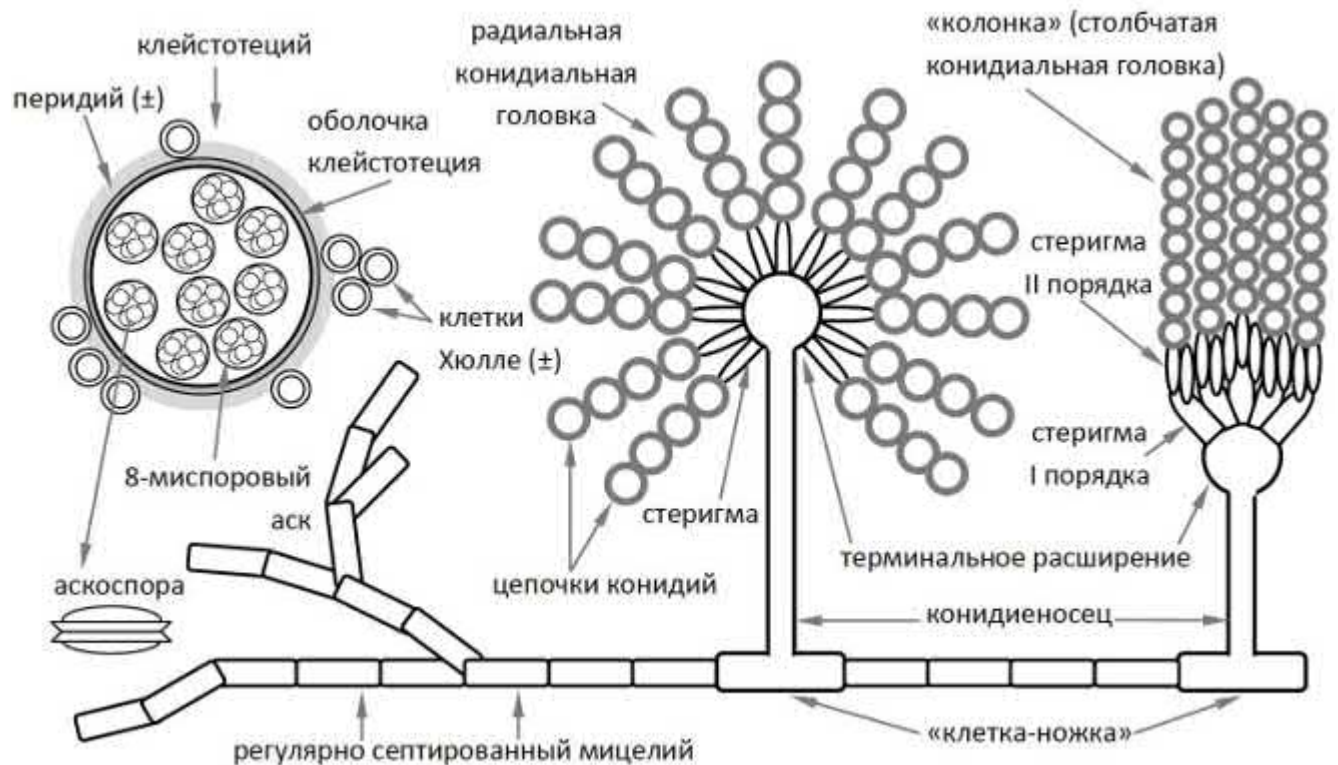


Рисунок 1 – Светооптическое строение грибов рода *Aspergillus*. Схема автора

Стеригмы второго (или единственного) ряда образуют конидии в цепочках. Конидии могут быть сферической, эллиптической или цилиндрической формы; иметь гладкую, шиповатую или бугристую поверхность. Конидии содержат большую часть образующихся в колонии пигментов и определяют ее окраску. Комплекс терминального расширения, стеригм и цепочек конидий называют конидиальной головкой. В зависимости от расположения цепочек конидий различают головки радиальные и столбчатые. Радиальные головки со временем могут расщепляться на колонки [2, 15]. Столбчатые головки в зависимости от расположения цепочек конидий подразделяют на свободно-столбчатые и плотно-столбчатые. Варианты строения конидиальных головок на примере различных видов аспергиллов показаны на рисунке 2. Один конидиеносец обычно образует не более одной головки, но у некоторых видов аспергиллов

конидиеносцы ветвятся [163, 193]. У аспергиллов ранее выделяемого подрода *Stilbothamnium*, а также у близкого аспергиллам телеоморфного рода *Penicilliopsis*, конидиеносцы (или сходные с ними структуры) образуются на тяжах из сплетенных гиф — синнемах. У недавно рассматриваемого в роду *Aspergillus* *P. coremiaeformis* синнемы крупные, преобразуются в коремии.

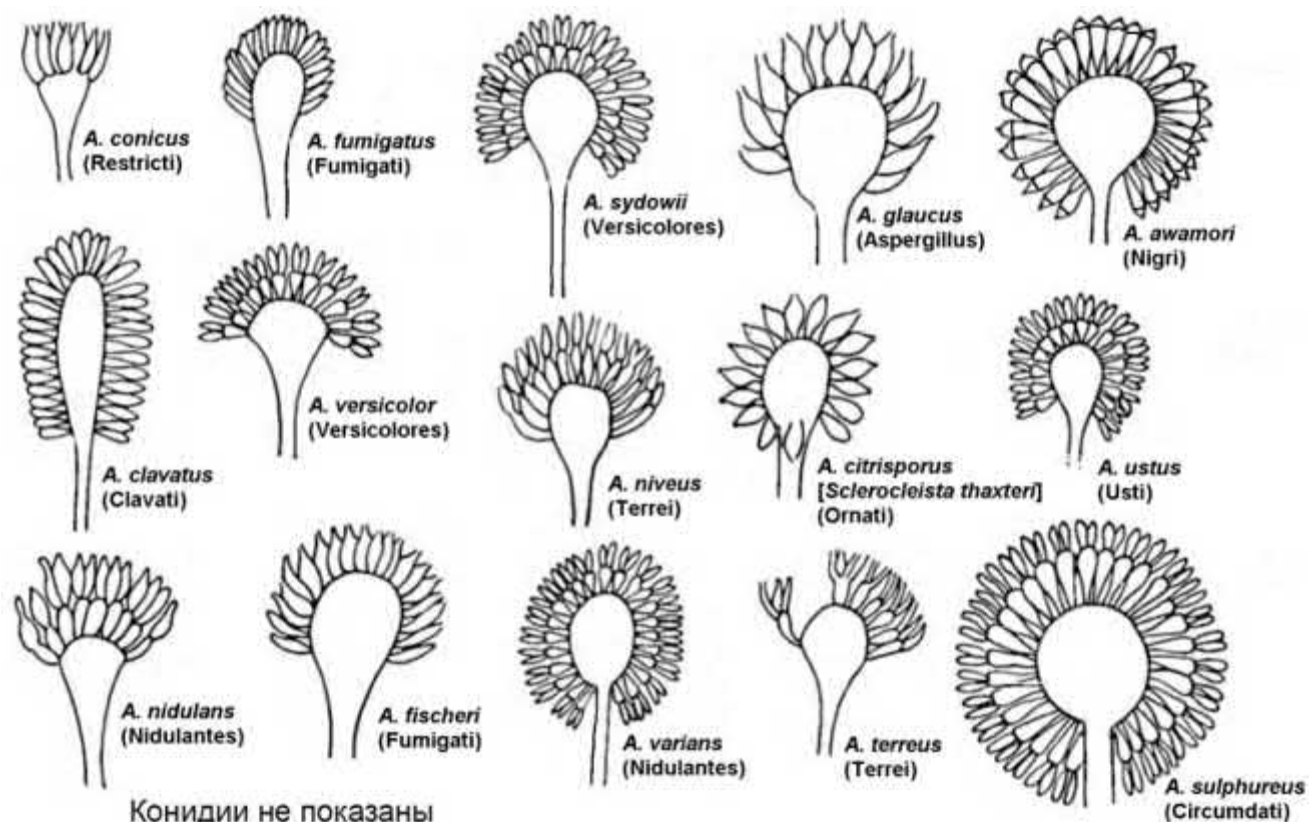


Рисунок 2 – Конидиальные головки различных аспергиллов по Литвинову М.А. [21]

Половой процесс у аспергиллов типичен для аскомицетов [333]. Встречаются как гетероталлические, так и гомоталлические виды. На ветвях воздушного мицелия формируются спирально закрученные аскогенные гифы, к этим спиральям приближаются гифы противоположного типа спаривания. Встречающиеся гифы оплетают друг друга, делая несколько завитков, после чего между ними происходит половой процесс, оканчивающийся формированием асков с аскоспорами. Аскогенные гифы оплетает тонкая сеть мицелия. Таким образом формируется замкнутое плодовое тело (аскома) типа клейстотетий (клеистокарпий). Клейстотетий окружен сетью гиф, называемой перидием, и выстлан оболочкой из уплощенных клеток. Внутри клейстотетия формируются аски с аскоспорами [284, 319]. Аски у аспергиллов 8-споровые. Образование клейстотетиев у представителей некоторых секций рода (*Nidulantes*, *Flavipedes*) сопровождается образованием особых покровных клеток (клеток Хюлле), которые рассматривают, как защитное окружение клейстотетиев. Эти клетки формируются, как короткие

выросты гиф с сильно утолщенной клеточной стенкой, которые при созревании отпадают. Они могут иметь округлую, листовидную, овальную или изогнутую форму. У некоторых аспергиллов клетки Хюлле могут формироваться в отсутствии клейстотециев (секции *Candidi*, *Usti*). При созревании аскоспор оболочка асков лизируется, стенка клейстотеция прорывается и аскоспоры высвобождаются наружу. Аскоспоры аспергиллов имеют линзовидную форму, состоят из двух выпуклых частей, соединенных экваториальной бороздой, которая окаймлена 2-4 экваториальными гребешками [163].

Аскоспоры обычно несколько больше конидий и имеют иную пигментацию. Рельеф аскоспор, выявляемый посредством сканирующей электронной микроскопии, специфичен для вида (Рисунок 3).

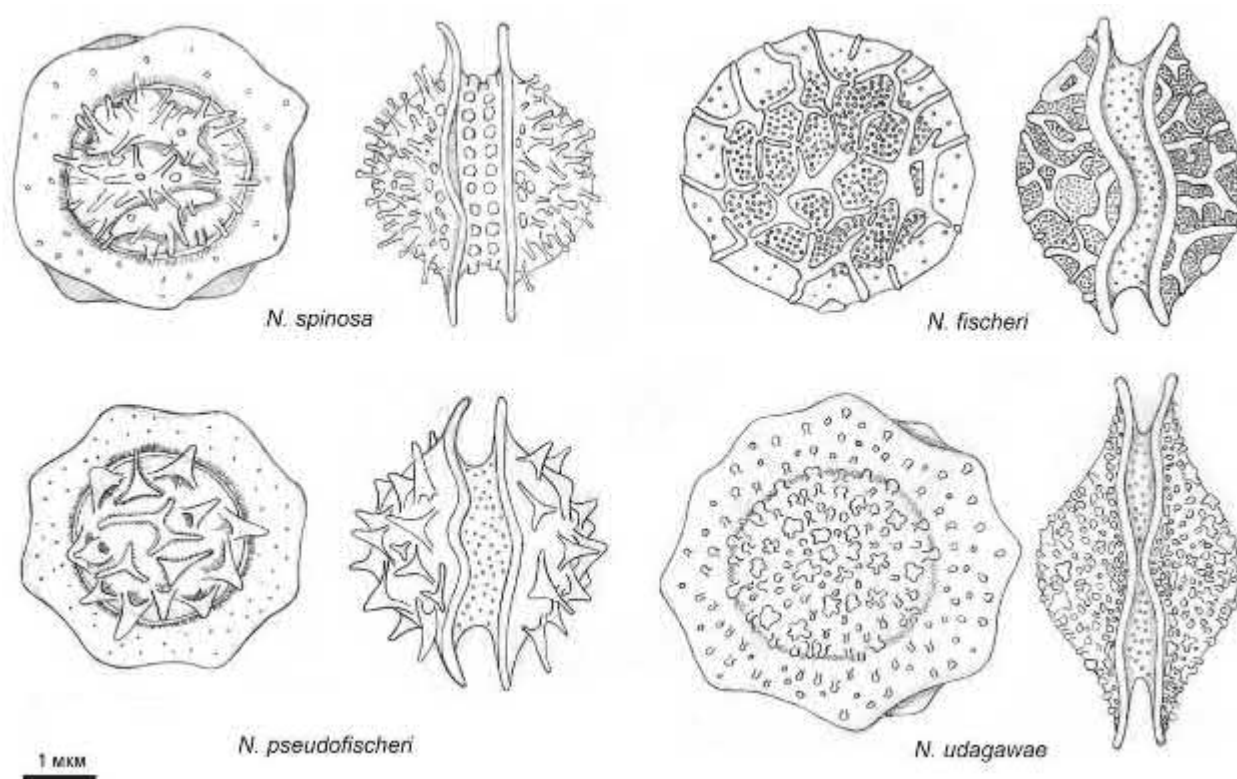


Рисунок 3 – Аскоспоры избранных представителей *Neosartorya* spp.

Примечание: *Neosartorya* – телеоморфное родовое имя аспергиллов секции *Fumigati*. Рисунок автора по микрофотографиям, полученным методом сканирующей электронной микроскопии [304], показан вид со стороны полусферической части и вид сбоку

Телеоморфные стадии аспергиллов, у которых одновременно осуществляется как половое, так и бесполое спорообразование анаморфы, имеют иные родовые названия, которые различаются у представителей разных секций (Таблица 5). Притом половой процесс занимает гораздо более длительный период времени, чем бесполое спорообразование. Телеоморфные стадии известны не у всех видов. У некоторых аспергиллов (из секций *Flavi*, *Circumdati*,

Candidi, Nigri, Flavipedes) формируются склероции — крупные округлые сплетения гиф. Склероции видны невооруженным глазом, их цвет иногда отличается от окраски колонии. Иногда из склероциев вырастают конидиеносцы.

Функцию склероциев еще не установили, однако, известно что в них аспергиллы депонируют микотоксины [36]. Horn B.W. и соавторы недавно сообщили о продукции внутри склероциев фитопатогенных штаммов *A. flavus* аскокарпов с аскоспорами. В этом эксперименте склероции получили на пораженной кукурузе, а затем инкубировали в нестерильной почве [158].

Таблица 5 – Телеоморфные стадии у различных секций рода *Aspergillus* [298]

Подрод	Секция	Род телеоморф	Подрод	Секция	Род телеоморф
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Eurotium</i>	<i>Terrei</i>	<i>Terrei</i>	<i>Fennellia</i> (?)
	<i>Restricti</i>	<i>Eurotium</i>		<i>Flavipedes</i>	<i>Fennellia</i>
<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati</i>	<i>Neosartorya</i>	<i>Nidulantes</i>	<i>Nidulantes</i>	<i>Emericella</i>
	<i>Clavati</i>	<i>Neocarpenteles</i> ,		<i>Usti</i>	<i>Emericella</i>
		<i>Dichotomomyces</i>		<i>Sparsi</i>	—
	<i>Cervini</i>	—		<i>Raperi</i>	—
<i>Circumdati</i>	<i>Circumdati</i>	<i>Neopetromyces</i>		<i>Silvati</i>	—
	<i>Flavi</i>	<i>Petromyces</i>		<i>Ochraceorosei</i>	—
	<i>Cremeri</i>	<i>Chaetosartorya</i>		<i>Bispori</i>	—
	<i>Nigri</i>	—	<i>Candidi</i>	<i>Candidi</i>	—
<i>Warcupi</i>	<i>Warcupi</i>	<i>Warcupiella</i>	<i>Ornati</i>	<i>Ornati</i>	<i>Sclerocleista</i> *
	<i>Zonati</i>	<i>Penicillliopsis</i>	* предлагается к исключению из рода.		

Ультраструктура клеток *Aspergillus* spp. довольно подробно изучена разными авторами; приведены описательные и графические сведения о тонком строении конидий *A. fumigatus*, *A. oryzae*, *A. ochraceus*, *A. candidus* и других видов [93, 119, 201, 330]. Строение конидиеносца и продукция конидий у *A. nidulans* с помощью просвечивающей электронной микроскопии изучено Oliver P. [254], а Sohn K.T. и Yoon K.S. у этого же вида описали тонкую морфологию полового процесса: их статья богато иллюстрирована микрофотографиями клейстотеция [319]. Строение поверхности гифы *A. nidulans* с помощью атомно-силовой микроскопии исследовали Ма Н. и соавторы (2005) [216]. Многие новые данные об организации клеток аспергиллов в культуре получили Степанова А.А. и Синицкая И.А. Этими авторами изучена ультраструктура вегетативных гиф и конидиального аппарата *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. sydowii*, *A. terreus*; предложена оригинальная морфологическая концепция развития и старения *Aspergillus* spp.; описаны особенности строения прорастающих конидий *A. fumigatus* [26-33].

1.1.3 Особенности химической организации клетки *Aspergillus* spp.

Важнейшими в прикладном аспекте компонентами клетки аспергиллов являются клеточная стенка и цитоплазматическая мембрана (Рисунок 4). Как и у других грибов, цитоплазматическая мембрана *Aspergillus* spp. богата эргостеролом. Собственно клеточную стенку составляют полисахариды: $\beta(1\rightarrow3)$ -глюкан, $\beta(1\rightarrow6)$ -глюкан, $\beta(1\rightarrow3/1\rightarrow4)$ -глюкан, $\alpha(1\rightarrow3)$ -глюкан, $\beta(1\rightarrow5)$ -галактофураноза и хитин; также в клеточной стенке депонированы пигменты. Полисахарид, специфичный для *Aspergillus* spp. — галактоманнан — находится в клеточной стенке, а также высвобождается при росте гиф. Его определяют в биоматериале, как антигенный маркер аспергиллов при диагностике микозов. Помимо базовых компонентов, в состав покрова конидий некоторых аспергиллов, включая *A. fumigatus*, входит меланин и гидрофобины (rodlets). Белки-гидрофобины составляют наиболее поверхностный слой оболочки конидий, этот слой устойчив ко многим видам физического и химического воздействия и подвергается деградации только при действии сильных минеральных кислот [35].

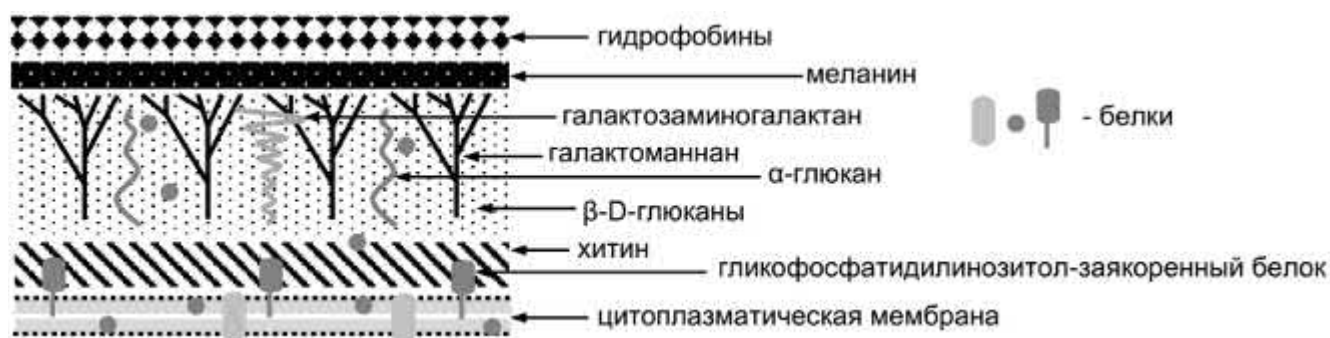


Рисунок 4 – Схема строения клеточной стенки *Aspergillus* spp. по Abad A. [35] с изменениями

1.1.4 Особенности физиологии и экологии *Aspergillus* spp.

Для аспергиллов характерен метаболизм дыхательного типа, они способны к выделению большого количества органических кислот, но не за счет брожения, а как избыточных продуктов отдельных стадий цикла Кребса. Способны расщеплять и усваивать многие органические соединения за счет продукции ферментов протеолитического, сахаролитического (в том числе — целлюлолитического) и липолитического действия. Некоторые аспергиллы могут разлагать лигнины и суберины. У этих грибов описали множество низкомолекулярных метаболитов, обладающих антимикробным, цитостатическим и токсическим действием (микотоксинов). Содержание некоторых микотоксинов нормируется в продовольственном сырье, пищевых продуктах и кормах для животных. Наиболее подробное исследование малых метаболитов у *A. fumigatus* выполнено Frisvad J.C. и соавторами [132]. Исследование продукции клавиновых и дикетопиперазиновых индольных алкалоидов, а также α -циклопиазоновой кислоты у свободноживущих штаммов *Aspergillus* spp., выделенных из почв России и Украины, выполнено Хмельницкой И.И. [34].

Аспергиллы — преимущественно почвенные грибы, могут поражать растения, часто колонизируют жилище человека и различные постройки (агенты биодеструкции). Аспергиллы также находят в соленых водоемах [89].

1.2 Грибы рода *Aspergillus*, как объекты профессионального риска

Многие штаммы аспергиллов используют в производстве различных соединений, где при нарушении промышленной гигиены возможны случаи аллергизации, а иногда – инфицирования работников. *Aspergillus niger* – первый микроскопический гриб, который стали использовать в биотехнологическом производстве для получения лимонной кислоты. *A. oryzae* применяют для ферментации соевых бобов на производстве соевой пасты и соевого соуса, для брожения рисового сусла при производстве саке. Из культуральной жидкости *A. awamori* получают фермент глюкоамилазу. *A. terreus* является продуцентом препарата ловастатина, применяемого при лечении гиперхолестеринемии. *A. flavus* и *A. oryzae* продуцируют коевую кислоту — природный блокатор тирозиназы в меланоцитах. Крем, содержащий коевую кислоту, применяют для осветления кожи. Из культур *A. fumigatus* и *Neosartorya* spp. можно получить фумагиллин — вещество, обладающее антипротозойным действием. Фумагиллин активен в отношении возбудителей амебной дизентерии, трипаносомоза, лейшманиоза, малярии и микроспориоза [51]; однако, из-за токсического действия этот препарат в данное время не используют в медицине. Фумагиллин применяют в пчеловодстве против микроспориоза *Nosema apis*.

1.3 Роль в патологии животных и человека

Аспергиллы являются возбудителями оппортунистических заболеваний человека, а также других млекопитающих, птиц и рептилий. Первично поражаются преимущественно органы дыхания. Помимо этого, у жвачных животных описан аспергиллезный мастит и плацентит, приводящий к выкидышу. У лошадей описана особая форма аспергиллеза органов дыхания — гуттуромикоз (поражение мешков гортани). У собак и кошек аспергиллез регистрируют преимущественно в форме поражения носовой полости, околоносовых пазух, орбиты. При этом у собак аспергиллез встречается значительно чаще. У некоторых рептилий (подвязочных змей, маисового полоза, бородатой агамы, зеленой игуаны) описан аспергиллез кожи и подкожной локализации, вызванный *A. fumigatus* и *A. niger* [142]. Описаны также поражения беспозвоночных животных, вызванные аспергиллами. Известны эпизоотические вспышки среди кораллов-горгонарий, вызванные *A. sydowii*, отличающиеся высокой летальностью и потерей репродуктивной способности у кораллов. В бассейне Карибского моря эти эпизоотии регистрируют с семилетней цикличностью [87]. Описано бессимптомное носительство этого патогена у губки *Spongia obscura* [122].

У человека грибы рода *Aspergillus* могут быть причиной широкого круга патологических процессов, для которых пока не создано совершенной классификации. У иммунокомпетентных

пациентов статусом аспергиллы могут участвовать в развитии отомикоза и онихомикоза, а также вызывать инфекцию глаза (ассоциированную с травмой глаза, ношением контактных линз, синдромом «сухого глаза»); перитонит, связанный с контаминацией перитонеального катетера [65, 66, 200, 226, 328, 362]. При иммуносупрессии, сопровождающейся выраженной нейтропенией (а также при наличии фоновой патологии дыхательной системы), *Aspergillus* spp. выступают в качестве возбудителей инвазивного аспергиллеза органов дыхания (легких или параназальных синусов) [56, 176, 191], реже первичное поражение возникает в других локализациях [137, 305]. При отсутствии специфической терапии или ее неэффективности возможна диссеминация возбудителя в отдаленные органы [355]. Помимо этого аспергиллы могут оказывать болезнетворное действие на человека «дистантно», индуцируя своими метаболитами микоаллергозы (исключая аллергический бронхолегочный аспергиллез, где прорастание спор аспергиллов происходит прямо в бронхах) [39, 281], а также микотоксикозы.

Зависимость возникновения микозов и микоаллергозов, связанных с аспергиллами, с состоянием иммунореактивности восприимчивого организма показана на рисунке 5.

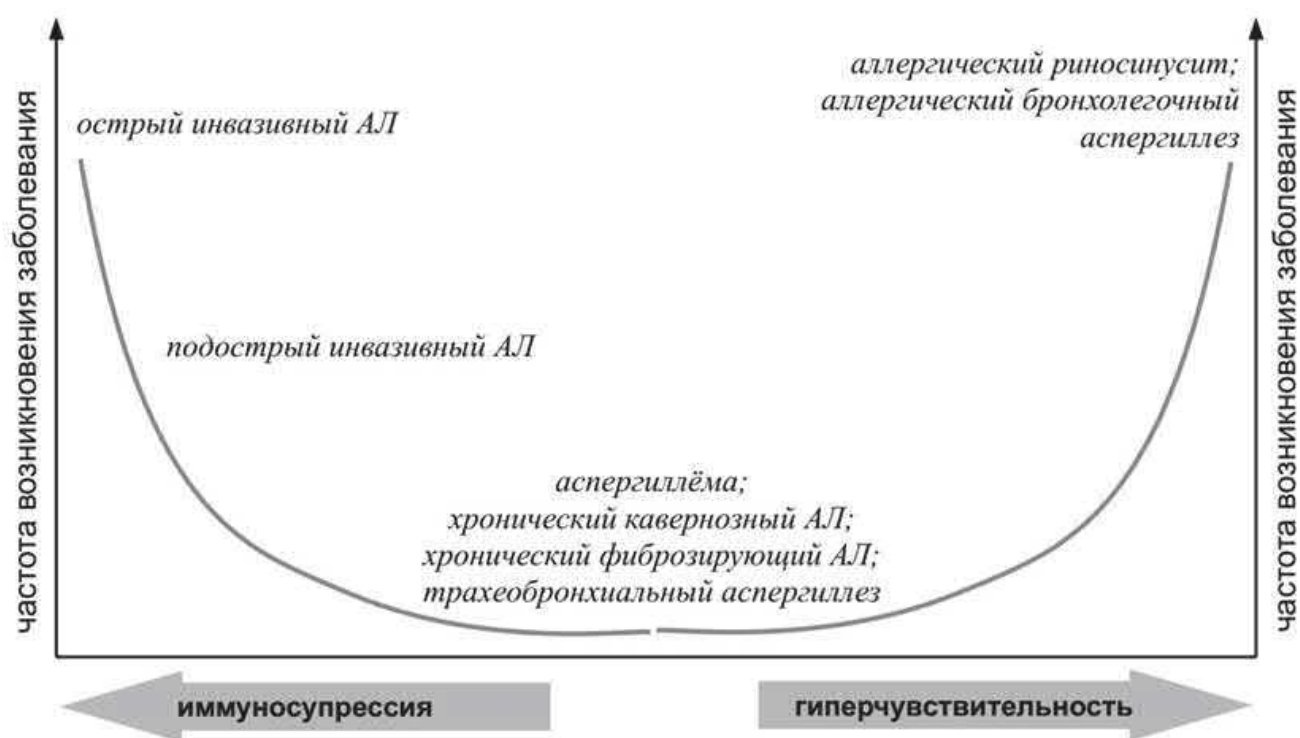


Рисунок 5 – Связь различных патологий, ассоциированных с грибами рода *Aspergillus*, с иммунным статусом. Из доклада Denning D.W. на конференции 6th Advances Against Aspergillosis, перерисовано со слайда с дополнениями

Примечание: АЛ — аспергиллез легких

Как видно из рисунка 5, аспергиллы могут фигурировать, как болезнетворные агенты, у пациентов с совершенно полярными вариантами иммунного статуса. Так, аллергический риносинусит, бронхиальная астма с сенсибилизацией к грибковым аллергенам, аллергический бронхолегочный аспергиллез ассоциированы с гиперпродукцией специфических IgE, IgG₄; к той же группе патологий можно отнести профессиональное заболевание – гиперсенситивный пневмонит (экзогенный аллергический альвеолит) [114, 291], развивающийся, как реакция гиперчувствительности замедленного типа в ответ на компоненты клеток микромицетов (в том числе – *Aspergillus* spp.) в смеси с аэрозолем из пылевых частиц природного (растительного) происхождения. Большинство форм хронического аспергиллеза легких – простая аспергиллема, хронический фиброзирующий аспергиллез легких, хронический кавернозный аспергиллез легких, узелковый аспергиллез – возникают у пациентов с предрасполагающими хроническими заболеваниями легких, сопровождающимися нарушением эвакуаторной функции бронхов (туберкулез легких, бронхиальная астма, муковисцидоз, саркоидоз, бронхоэктатическая болезнь и др.) [82, 166]. Один из вариантов поражения легких, формально отнесенный к хроническому аспергиллезу, – подострый инвазивный аспергиллез легких, является как-бы промежуточным типом заболевания между классическим хроническим аспергиллезом и инвазивным аспергиллезом, он возникает у пациентов с умеренной иммуносупрессией. Глубокой иммуносупрессией отличаются пациенты с наиболее тяжелым типом заболевания – инвазивным аспергиллезом легких [124, 257].

На рисунке 5 на данный момент сложно однозначно отразить положение особых форм инвазивного аспергиллеза – COVID-19-ассоциированного и грипп-ассоциированного, их возникновение связано не столько с иммуносупрессией, сколько с функциональными дефектами иммунного ответа [70, 353].

Глобальные эпидемиологические данные по некоторым представленным патологиям (по материалам проекта LIFE – Leading International Fungal Education) отображены в таблице 6.

Таблица 6 – Ориентировочные показатели встречаемости патологий человека, вызванных или ассоциированных с грибами рода *Aspergillus* по данным проекта LIFE [www.life-worldwide.org]

Патология	Связь исключительно с грибами рода <i>Aspergillus</i> (да/нет)	Показатели
Инвазивный аспергиллез	да	Свыше 300000 новых случаев ежегодно; Свыше 30 млн. человек находятся в группе риска (из них свыше 125 тысяч – пациенты с хронической обструктивной болезнью легких).

Продолжение таблицы 6

Патология	Связь исключительно с грибами рода <i>Aspergillus</i> (да/нет)	Показатели
Хронический аспергиллез легких	да	По ориентировочной оценке этой патологией страдают свыше 3 млн. человек, из них примерно 1,2 млн. — больные туберкулезом.
Аллергический бронхолегочный аспергиллез (АБЛА)	да	Популяцию взрослых пациентов, у которых АБЛА осложнил бронхиальную астму, оценивают >10 млн. человек; Среди больных муковисцидозом АБЛА страдают 12 — 15% пациентов.
Аллергический риносинусит с сенсibilизацией к грибковым аллергенам	нет	К настоящему моменту выявлено около 12 млн. случаев.
Тяжелая бронхиальная астма с сенсibilизацией к грибковым аллергенам	нет	Популяцию больных оценивают в 6 млн. человек.

Клинико-лабораторные особенности различных форм аспергиллезной инфекции, а также подходы к их терапии и диагностике отражены в работе Елинова Н.П., Митрофанова В.С. и Чернопятовой Р.М. [5].

В классификацию внелегочных форм аспергиллеза по IDSA (Infectious Diseases Society of America) положен принцип анатомической локализации процесса [355], при этом в одной форме-локализации авторы руководства сочетают процессы, возникающие в результате гематогенной диссеминации, прямого инфицирования после случайной травмы или хирургического вмешательства. Такой подход нельзя назвать удачным, поскольку 3 вышеуказанных способа инфицирования органов имеют принципиально отличную причинность и эпидемиологию.

Классификация микотоксикозов человека до сих пор недостаточно проработана. Грибы рода *Aspergillus* продуцируют сотни микотоксинов, однако, для большинства из них токсическое действие показано лишь в эксперименте [78, 360], а связь с определенным губительным действием на организм человека в реальных клинических случаях не установлена. Поскольку штаммы различных видов рода *Aspergillus* обычно выделяют не единственную токсичную субстанцию, а их комплекс, то на практике, вероятно, чаще встречаются отравления смесью

МИКОТОКСИНОВ.

1.4 Видовое разнообразие грибов рода *Aspergillus* – возбудителей инфекций человека

Основные возбудители аспергиллеза человека принадлежат к видам *Aspergillus fumigatus* (вызывает до 60% случаев инвазивного аспергиллеза легких), *A. niger*, *A. flavus* и *A. terreus*, которые распространены повсеместно. Реже встречаются в лабораторной практике *A. nidulans*, *A. candidus*, *A. clavatus*, *A. sydowii*, *A. versicolor*. Эти виды характеризуются контрастными морфологическими отличиями, за исключением схожих между собой *A. sydowii* (более вирулентного) и *A. versicolor* (менее вирулентного). В классической медицинской микологии принято считать, что способность гриба вызывать инфекции у человека неразрывно связана с его способностью к росту при 37°C *in vitro*. Но диагностическая практика показала наличие исключений из этого правила, как среди аспергиллов, так и среди других условно-патогенных грибов, что отразилось на современном понимании видового разнообразия медицински значимых *Aspergillus* spp. Особенно такие исключения характерны для онихомикоза, обусловленного инфицированием *Aspergillus* spp. [85, 134, 361, 365].

Со второй половины XX века и до настоящего времени в изучении разнообразия аспергиллов, представляющих медицинское значение, можно условно выделить 2 тенденции: (1) выявление патогенной роли у ранее известных видов, считавшимися сапрофитами; (2) выделение из клинического материала новых видов (с использованием молекулярно-генетических методов), по морфологическим чертам сходных с основными возбудителями. Последнюю нетаксономическую группу видов называют «криптическими», о ней уже упоминали выше [164, 247, 262].

В результате проведенного в рамках данного исследования литературного поиска установили, что в этиологии микотических инфекций человека фигурируют 96 видов рода *Aspergillus* (см. ниже), хотя еще 6 лет назад на патогенные свойства указывали для немногим более 20 видов [7]. Роль в патологии вышеназванных «классических» видов возбудителей представлена в ряде монографических работ по проблемам медицинской микологии [13, 164, 230]. Однако в настоящее время представляет интерес медицинское значение редких и «криптических» видов аспергиллов: локализация поражений, особенности клиники, ответ на примененную этиотропную терапию. Этот вопрос частично освещен в известном неоднократно переизданном руководстве «Atlas of clinical fungi» под редакцией de Hoog G.S. et al., и в последнем его электронном издании дают краткие описания и связь с патологией только 53 видов [107]. В связи с этим обстоятельством в настоящем диссертационном исследовании работе приведены описания случаев или упоминания о выделении из биоматериала различных редких и критических *Aspergillus* spp. в той степени подробности, с которой они изложены в оригинальных источниках (Таблица 7). Для удобства виды сгруппированы по секциям.

Некоторые аспергиллы в литературе именуют по родовому названию телеоморфы: *Neosartorya*, *Emericella*, *Eurotium*, *Fennellia*, *Petromyces* и др.

Таблица 7 – Случаи аспергиллезной инфекции, вызванные редкими и криптическими видами возбудителей

Секция	Вид	Биоматериал	Формы микоза	Ссылка
<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i> var. <i>ellipticus</i>	—	—	[356]
<i>Fumigati</i>	<i>A. lentulus</i>	соскоб роговицы	кератит	[199]
<i>Fumigati</i>	<i>A. lentulus</i>	мокрота	ИАЛ	[150]
<i>Fumigati</i>	<i>A. lentulus</i>	БАЛ, мокрота	—	[233]
<i>Fumigati</i>	<i>A. lentulus</i> + <i>A. fumigatus</i>	БАЛ	ИАЛ	[241]
<i>Fumigati</i>	<i>A. lentulus</i> + <i>A. fumigatus</i>	БАЛ	ИАЛ	[46]
<i>Fumigati</i>	<i>A. lentulus</i>	Нет данных	ИАЛ	[363]
<i>Fumigati</i>	<i>A. lentulus</i> + <i>A. fumigatus</i>	Респираторный субстрат (не уточнен)	колонизация	[327]
<i>Fumigati</i>	<i>A. viridinutans</i>	Биоптат легкого, плевральная жидкость.	ХАЛ	[351]
<i>Fumigati</i>	<i>A. viridinutans</i>	биоптат лимфоузла, операционный материал	абсцесс легкого, ДА	[351]
<i>Fumigati</i>	<i>A. viridinutans</i>	БАЛ, трансторакальный биоптат	Абсцесс легкого	[191]
<i>Fumigati</i>	<i>A. viridinutans</i>	Трансторакальный биоптат, БАЛ	ХАЛ	[103]
<i>Fumigati</i>	<i>A. viridinutans</i>	Соскоб роговицы	Кератит	[314]
<i>Fumigati</i>	<i>A. novofumigatus</i> + <i>A. viridinutans</i>	БАЛ	ИАЛ	[263]
<i>Fumigati</i>	<i>A. felis</i>	Мокрота	ХАЛ, дисс. асп.	[68]
<i>Fumigati</i>	<i>N. fischeri</i>	Удаленный глаз.	Кератит, эндофтальмит	[104]
<i>Fumigati</i>	<i>N. fischeri</i>	БАЛ	ИАЛ (?)	[200]
<i>Fumigati</i>	<i>N. fischeri</i>	БАЛ, аутопсические образцы легкого и мозга	ДА	[145]
<i>Fumigati</i>	<i>N. pseudofischeri</i>	Биоптат	Остеомиелит позвоночника	[61]
<i>Fumigati</i>	<i>N. pseudofischeri</i>	Отделяемое уха	отомикоз	[61]
<i>Fumigati</i>	<i>N. pseudofischeri</i>	Кровь	ИАЛ	[175]
<i>Fumigati</i>	<i>N. pseudofischeri</i>	Диализная жидкость	Диализный перитонит	[226]
<i>Fumigati</i>	<i>N. pseudofischeri</i>	Диализная жидкость, перитонеальный катетер	Диализный перитонит	[140]

Продолжение таблицы 7

Секция	Вид	Биоматериал	Формы микоза	Ссылка
<i>Fumigati</i>	<i>N. pseudofischeri</i>	биоптат подкожного очага, аутопсийный материал	ДА	[213]
<i>Fumigati</i>	<i>N. pseudofischeri</i>	Респираторные образцы	колонизация при муковисцидозе	[61, 327]
<i>Fumigati</i>	<i>N. hiratsukae</i>	Диализная жидкость	Диализный перитонит	[196]
<i>Fumigati</i>	<i>N. hiratsukae</i>	Некротизированная ткань мозга	Аспергиллез мозга	[147]
<i>Fumigati</i>	<i>N. spinosa</i>	мокрота	ИАЛ	[139]
<i>Fumigati</i>	<i>N. spinosa</i>	вегетация клапана сердца	эндокардит	[324]
<i>Fumigati</i>	<i>N. udagawae</i>	БАЛ, биоптат легкого	ДА	[351]
<i>Fumigati</i>	<i>N. udagawae</i>	Биоптат легкого	ДА	[351]
<i>Fumigati</i>	<i>N. udagawae</i>	Биоптат легкого	ИАЛ	[351]
<i>Fumigati</i>	<i>N. udagawae</i>	БАЛ	ИАЛ	[351]
<i>Fumigati</i>	<i>N. udagawae</i>	Соскоб роговицы	Кератит, эндофтальмит	[276]
<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatiaffinis</i>	БАЛ, мокрота	—	[43]
<i>Fumigati</i>	<i>A. fumisynnematus</i>	БАЛ	—	[43]
<i>Fumigati</i>	<i>A. viridinutans</i>	из глаза	кератит	[314]
<i>Fumigati</i>	<i>A. felis</i>	Респираторные образцы	—	[68]
<i>Fumigati</i>	<i>A. felis</i>	ногтевая пластина	онихомикоз	[68]
<i>Fumigati</i>	<i>A. parafelis</i> , <i>A.</i> <i>pseudofelis</i> , <i>A.</i> <i>pseudoviridinutans</i>	Респираторные образцы, ткани лимфатического узла, ногтевая пластина	—	[323]
<i>Fumigati</i>	<i>A. beijingensis</i> , <i>A.</i> <i>qizutongii</i> , <i>A.</i> <i>wangduanlii</i>	Материал из верхнечелюстных пазух	микотический синусит	[208]
<i>Flavi</i>	<i>A. alliaceus</i>	БАЛ	ИАЛ	[63]
<i>Flavi</i>	<i>A. nomius</i>	мокрота	ИАЛ	[91]
<i>Flavi</i>	<i>A. nomius</i>	Соскоб роговицы	кератит	[220]
<i>Flavi</i>	<i>A. nomius</i>	Ногтевая пластина	Онихомикоз 1 пальца стопы	[365]
<i>Flavi</i>	<i>A. tamaraii</i>	Ногтевая пластина	Онихомикоз 1 пальца стопы	[200]
<i>Flavi</i>	<i>A. tamaraii</i>	Не уточнен	синусит	[257]
<i>Flavi</i>	<i>A. tamaraii</i>	Соскоб роговицы	кератит	[197]
<i>Flavi</i>	<i>A. tamaraii</i>	Из глаза	микотическая язва века	[110]
<i>Flavi</i>	<i>A. tamaraii</i>	Биоптаты кожи	Первичный аспергиллез кожи	[313]
<i>Flavi</i>	<i>A. oryzae</i>	Перитонеальная жидкость	Микотический перитонит	[307]
<i>Flavi</i>	<i>A. oryzae</i>	БАЛ, мокрота	АБЛА	[42, 202]
<i>Flavi</i>	<i>A. pseudotamaraii</i>	Соскоб роговицы	Кератит, гипопион	[66]

Продолжение таблицы 7

Секция	Вид	Биоматериал	Формы микоза	Ссылка
Flavi	<i>A. arachidicola</i>	Биоптат из органов дыхания	—	[247]
Flavi	<i>A. novoparasiticus</i>	Мокрота	Поражение легких при онкогематологической патологии	[143]
Flavi	<i>A. avenaceus</i>	Материал из параназального синуса	Микотический синусит	[107]
Flavi	<i>A. alliaceus</i>	отделяемое из уха	отомикоз	[255,
Flavi	<i>A. alliaceus</i>	Респираторные образцы	ИАЛ	228]
Flavi	<i>A. minisclerotigenes</i>	мокрота, трахеальный аспирата	—	[101, 111]
Flavi	<i>A. minisclerotigenes</i>	Материал из параназальных синусов	микотический синусит	
Flavi	<i>A. parasiticus</i>	—	—	[144]
Flavi	<i>A. terricola</i>	Ногтевые пластины	Онихомикоз	[218]
Flavi	<i>A. pseudocaelatus</i>	Отделяемое из уха	Отомикоз	[172]
Flavi	<i>A. transmontanensis</i>	Биоптаты из органов дыхания	—	[247]
Nigri	<i>A. brasiliensis</i>	Некротизированная ткань глаза	Кератит (абсцесс роговицы), иридоциклит.	[314]
Nigri	<i>A. brasiliensis</i>	Материал из язвы	Язва роговицы	[219]
Nigri	<i>A. tubingensis</i>	Из раны альвеолярного отростка	Синусит, остеомиелит верхней челюсти	[71]
Nigri	<i>A. tubingensis</i>	Соскоб роговицы	кератит	[198]
Nigri	<i>A. tubingensis</i>	Аутопсийный материал	Ятрогенный аспергиллез мозга	[99]
Nigri	<i>A. fijiensis</i>	БАЛ	ИАЛ	[266]
Nigri	<i>A. aculeatinus</i>	из глаза	микотический дакриоцистит	[265]
Nigri	<i>A. foetidus</i>	Респираторные образцы	—	[44, 247]
Nigri	<i>A. acidus</i>	—	—	[164]
Nigri	<i>A. uvarum</i>	ногтевые пластины	онихомикоз	[362]
Nigri	<i>A. neoniger</i>	из глаза	кератит	[65]
Nigri	<i>A. awamori</i> (<i>A. welwitschiae</i>)	мокрота, БАЛ, ногтевые пластины, биоптаты кожи, отделяемое наружного слухового прохода	—	[172, 247, 328]
Nigri	<i>A. japonicus</i>	—	аспергиллема	[225]
Nigri	<i>A. japonicus</i>	отделяемое из уха	отомикоз	[225]
Terrei	<i>A. niveus</i>	БАЛ	ИАЛ	[56]

Продолжение таблицы 7

Секция	Вид	Биоматериал	Формы микоза	Ссылка
<i>Terrei</i>	<i>A. alabamensis</i>	трахеальный аспират, мокрота, БАЛ, раневое отделяемое, ткань стопы, отделяемое уха	—	[60]
<i>Terrei</i>	<i>A. carneus</i>	—	ИАЛ	[275]
<i>Terrei</i>	<i>A. carneus</i>	—	аспергиллема	[275]
<i>Terrei</i>	<i>A. hortai</i>	материал из уха	—	[302]
<i>Terrei</i>	<i>A. citrinoterreus</i>	Респираторные образцы	ИАЛ	[149]
<i>Terrei</i>	<i>A. citrinoterreus</i>		колонизация органов дыхания	[149]
<i>Versicolores</i>	<i>A. tennesseensis</i>	биоптат кожи,	—	[247]
<i>Versicolores</i>	<i>A. tennesseensis</i>	респираторный образец	—	[247]
<i>Versicolores</i>	<i>A. tabacinus</i>	ногтевые пластины	онихомикоз	[169]
<i>Versicolores</i>	<i>A. tabacinus</i>	респираторный образец	—	[247]
<i>Versicolores</i>	<i>A. creber</i>	респираторный образец	—	[247]
<i>Versicolores</i>	<i>A. austroafricanus</i>	ногтевые пластины	онихомикоз	[172]
<i>Versicolores</i>	<i>A. protuberus</i>	мазок из влагалища	персистирующий вагинит	[83]
<i>Nidulantes</i>	<i>A. tetrazonus</i>	Биоптат синуса	Синусит, распространение в орбиту	[274]
<i>Nidulantes</i>	<i>A. tetrazonus</i>	ногтевые пластины	онихомикоз	[148,
<i>Nidulantes</i>	<i>A. tetrazonus</i>	—	ИАЛ	176, 312]
<i>Nidulantes</i>	<i>A. rugulosus</i>	Иссеченная ткань	Остеомиелит бедра	[348]
<i>Nidulantes</i>	<i>A. rugulosus</i>	аутопсийный материал	ДА	[169]
<i>Nidulantes</i>	<i>E. unguis</i>	ногтевые пластины	онихомикоз	[49, 169]
<i>Nidulantes</i>	<i>E. variegator</i>	ногтевые пластины	онихомикоз	
<i>Clavati</i>	<i>A. clavatus</i>	ногтевые пластины	онихомикоз	[25]
<i>Clavati</i>	<i>A. clavatonanicus</i>	ногтевые пластины	онихомикоз	[72]
<i>Candidi</i>	<i>A. pragensis</i>	ногтевые пластины	онихомикоз	[168]
<i>Candidi</i>	<i>A. tritici</i>	ногтевые пластины	онихомикоз	[169, 344 364]
<i>Candidi</i>	<i>A. campestris</i>	ногтевые пластины	онихомикоз	[169]
<i>Aspergillus</i>	<i>Eurotium</i> <i>amstelodami</i> (<i>A.</i> <i>hollandicus</i>)	—	гиперсенситивный пневмонит, отит, мицетом, поражение кожи, абсцесс мозга, онихомикоз, кератит, ИАЛ.	[107, 291]
<i>Aspergillus</i>	<i>E. chevalieri</i>	биоптаты кожи	аспергиллез кожи	[138]
<i>Aspergillus</i>	<i>E. repens</i> (<i>A. reptans</i>)	материал из параназального синуса	синусит	[57, 182]

Продолжение таблицы 7

Секция	Вид	Биоматериал	Формы микоза	Ссылка
<i>Aspergillus</i>	<i>E. herbariorum</i> (<i>A. glaucus</i>)	—	отомироз, ИАЛ, онихомикоз, микоз лицевой области, мозг, диссеминированные поражения.	[47, 98, 203]
<i>Aspergillus</i>	<i>E. costiforme</i> / <i>cristatum</i>	ногтевые пластины	онихомикоз	[169, 218]
<i>Aspergillus</i>	<i>E. rubrum</i>	ногтевые пластины	онихомикоз	
<i>Aspergillus</i>	<i>A. proliferans</i>	ногтевые пластины	онихомикоз	
<i>Usti</i>	<i>A. calidoustus</i>	респираторные образцы	ИАЛ	[121, 152, 188, 262, 305, 341]
<i>Usti</i>	<i>A. calidoustus</i>	биоптаты кожи	первичный аспергиллез кожи	
<i>Usti</i>	<i>A. ustus</i>	ногтевые пластины	онихомикоз	[24]
<i>Usti</i>	<i>A. ustus</i>	респираторные образцы	ИАЛ	[137, 258, 261, 349]
<i>Usti</i>	<i>A. ustus</i>	—	поражение клапанов сердца, ДА, микоз ожоговой поверхности, эрозивное посттравматическое поражение	
<i>Usti</i>	<i>A. granulosis</i>	Биоптаты мягких тканей конечностей	ДА	[129]
<i>Usti</i>	<i>A. granulosis</i>	Секционный материал (ткань мозга)	ДА, аспергиллез мозга	[325]
<i>Restricti</i>	<i>A. caesiellus</i>	—	аспергиллема	[107]
<i>Restricti</i>	<i>A. conicus</i>	из глаза	эндофтальмит	[317, 350]
<i>Restricti</i>	<i>A. restrictus</i>	операционный материал из легкого	колонизация туберкулезной каверны	[18]
<i>Restricti</i>	<i>A. restrictus</i>	—	клапанный эндокардит аспергиллема	[107]
<i>Restricti</i>	<i>A. restrictus</i>	ногтевая пластина	онихомикоз	[107]
<i>Restricti</i>	<i>A. penicillioides</i>	—	поражение кожи, аспергиллема	[84]
<i>Flavipedes</i>	<i>A. flavipes</i> (<i>Fennellia flavipes</i>)	респираторные образцы	некротический аспергиллез легких	[53, 135, 185, 290]
<i>Flavipedes</i>	<i>A. flavipes</i>	ногтевая пластина	онихомикоз	
<i>Flavipedes</i>	<i>A. flavipes</i>	биоптат	остеомиелит позвоночника	

Продолжение таблицы 7

Секция	Вид	Биоматериал	Формы микоза	Ссылка
<i>Flavipedes</i>	<i>A. frequens</i>	ногтевая пластина	онихомикоз	[168]
<i>Flavipedes</i> (<i>Jani</i>)	<i>A. janus</i>	соскоб роговицы	кератит	[107]
<i>Cremeri</i>	<i>A. wentii</i>	материал из уха	отомикоз	[153,
<i>Cremeri</i>	<i>A. wentii</i>	ногтевая пластина	онихомикоз	215, 218]
<i>Cremeri</i>	<i>A. stromatoides</i>	Биопатат из ткани орбиты	Микоз орбиты, менингит	[296]
<i>Cervinin</i>	<i>A. parvulus</i> (?)	ногтевая пластина	онихомикоз	[169]
<i>Circumdati</i>	<i>A. ochraceus</i>	БАЛ	ИАЛ	[359]
<i>Circumdati</i>	<i>A. sclerotiorum</i>	Ногтевая пластина	онихомикоз	[134, 364]
<i>Circumdati</i>	<i>A. persii</i>	Ногтевая пластина	Онихомикоз 1 пальца стопы	[8]
<i>Circumdati</i>	<i>A. tanneri</i>	БАЛ, биоптаты внутренних органов.	ДА	[8]
<i>Circumdati</i>	<i>A. tanneri</i>	БАЛ	ИАЛ	[8]
<i>Circumdati</i>	<i>A. westerdijkiae</i>	Ногтевая пластина	Онихомикоз 1 пальца стопы	[169]
<i>Circumdati</i>	<i>A. insulicola</i>	Ногтевая пластина	Онихомикоз 1 пальца стопы	[169]
<i>Circumdati</i>	<i>A. ochraceo- petaliformis</i>	Ногтевая пластина	Онихомикоз 1 пальца стопы	[85]
<i>Circumdati</i>	<i>A. ochraceus</i>	материал из параназального синуса	синусит	[364, 251]
<i>Circumdati</i>	<i>A. ochraceus</i>	Ногтевая пластина	онихомикоз	[251,
<i>Circumdati</i>	<i>A. ochraceus</i>	респираторные образцы	АБЛА	364]
<i>Circumdati</i>	<i>A. fresenii</i>	материал из уха	отомикоз	[169]
<i>Circumdati</i>	<i>A. melleus</i>	—	поверхностное поражение	[169, 364]
<i>Circumdati</i>	<i>A. melleus</i>	Ногтевая пластина	онихомикоз	

Примечания: БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж, ИАЛ – инвазивный аспергиллез легких, ХАЛ – хронический аспергиллез легких; ДА – диссеминированный аспергиллез; АБЛА – аллергический бронхолегочный аспергиллез

Из приведенного списка по возрасту литературных источников видно, что наиболее интенсивное изучение видового разнообразия аспергиллов, как возбудителей микозов, пришлось на начало XXI. Несомненно, что основной фактор, способствовавший этому — внедрение в лабораторную микологию молекулярно-генетических методов видовой идентификации. Постоянно пополняющийся перечень видов — возбудителей заболеваний

человека отражен в словах известного современного исследователя аспергиллов Maren A. Klich: «Виды, вызывающие *аспергиллезы* не ограничены лишь несколькими таксономическими секциями рода. Эти факты указывают, что *аспергиллезы* являются истинно оппортунистическими инфекциями, и практически любые виды аспергиллов могут вызвать заболевание при наличии предрасполагающих условий. Любая система, используемая для общей идентификации грибов клинического происхождения, должна быть с достаточно большим охватом и включать в себя виды, о которых еще не было сообщено, как об этиологических агентах» [236].

Следует заметить, что отечественные микологические коллекции располагают лишь небольшой частью видов — возбудителей: всего 43 вида, но из них штаммы клинического происхождения собраны только по 18 видам. Поэтому вопросы изучения роли различных грибов рода *Aspergillus*, как этиологических агентов микотических заболеваний, инвазивных и поверхностных, требует пристального внимания.

1.5 Системы внутриродовой таксономии аспергиллов

По причине большой численности видов грибов рода *Aspergillus* для удобства описания и идентификации разные авторы вводили в систематику рода промежуточные таксономические и нетаксономические группы. Идея подразделения рода на группы принадлежит выдающемуся микологу XX века Чарльзу Тому (1872-1956), этот подход был осуществлен Ch. Thom и M. Church в монографии 1925 г. «*The Aspergilli*». Первоначально род подразделяли на группы, названные по виду типового представителя, иногда в группах выделяли серии. Последние не получили развития и в более поздних системах таксономии отсутствовали. Группы видов выделяли по принципу морфологического сходства; такое деление оказалось удобным, поскольку облегчало процедуру видовой идентификации, разбивая ее условно на 2 этапа. Морфологический принцип таксономии существовал длительное время и поддерживался в монографиях-определителях Thom Ch. и Raper K.B. «*A Manual of the Aspergilli*» (1945), Raper K.B. и Fennell D. «*The Genus Aspergillus*» (1965), Билай В.И. и Коваль Э.З. «Аспергиллы» (1988) [2, 284, 332, 333]. С конца 1990-х годов для подразделения рода начинают использовать молекулярно-генетический подход. В основу этого подхода положено ДНК-секвенирование генов рибосомальной РНК (D1-D2 региона большой субъединицы, внутреннего транскрибируемого спейсера ITS1-ITS2), а также генов кальмодулина (*cmdA*) и β -тубулина (*tubB*), реже других локусов [297, 300]. В новых системах таксономии группы почти эквивалентно заменили секциями, появилась также новая градация — подрод, объединяющая несколько секций. Состав подродов неоднократно пересматривали, их количество составляло от 3 до 8 (в наиболее поздней системе), также пересматривали состав входящих в подроды секций. Развитие систем внутриродовой таксономии систематизировано и представлено на рисунке 6.

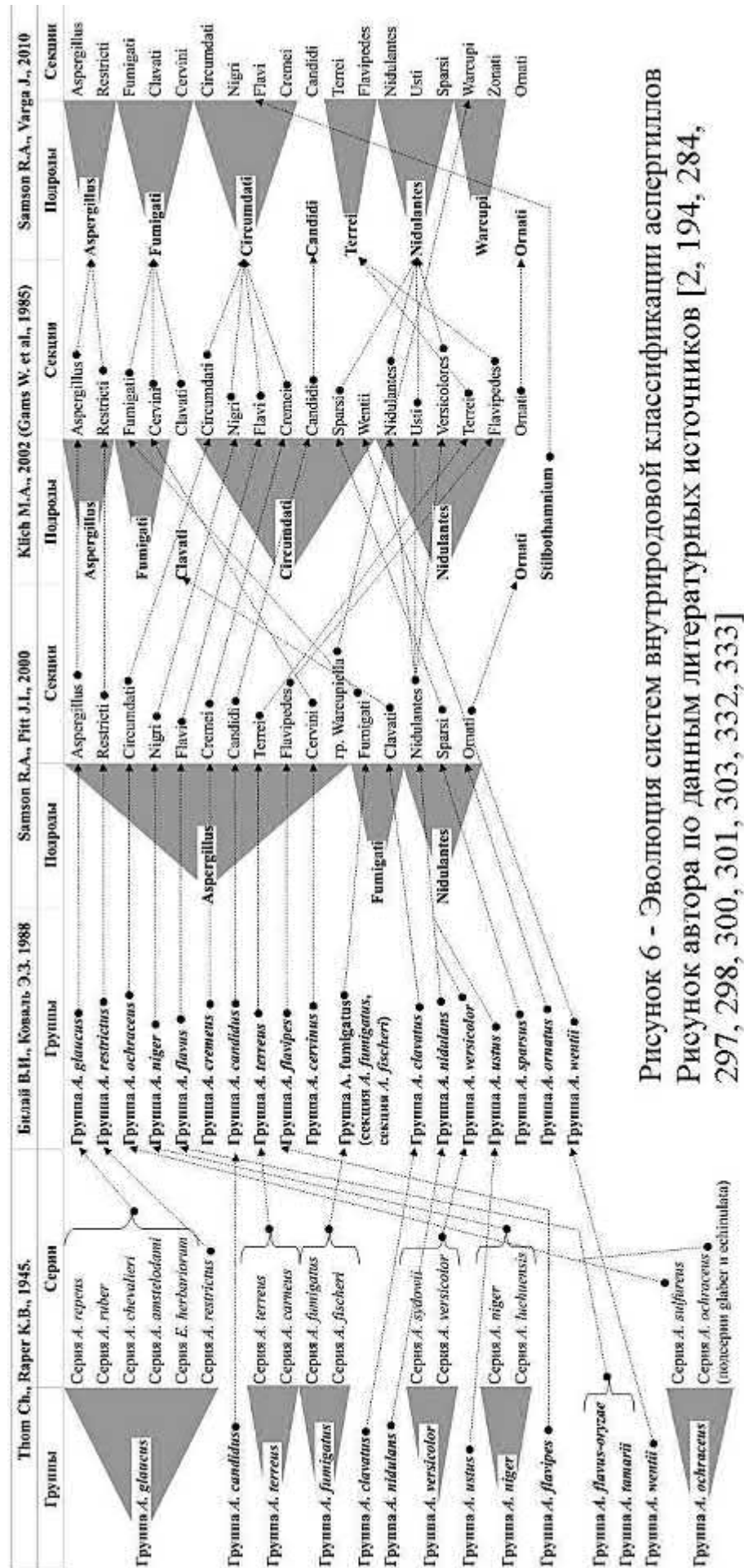


Рисунок 6 - Эволюция систем внутривидовой классификации аспергиллов
 Рисунок автора по данным литературных источников [2, 194, 284, 297, 298, 300, 301, 303, 332, 333]

Примерами отдельных изменений в системе таксономии может служить *Aspergillus wentii* Wehmer, 1896. Секция *Wentii* (группа *A. wentii* – редкого возбудителя ото- и отомикозов) неоднократно то появлялась, то исчезала; в последней редакции ряд представителей этой секции перенесли в секцию *Cremeri*. Подвергали пересмотру состав секции *Nidulantes*, включающей виды со сложными профилями антимикотической устойчивости: в нее включали представителей родственных секций *Versicolores* и *Usti*, хотя виды данных секций заметно отличаются по морфологическим свойствам (даже по морфологии колоний). В результате одного из пересмотров секцию *Versicolores* упразднили, но в данной работе она оставлена с целью сохранения морфологического подхода к объединению видов.

В одной из вышеназванных работ Samson R.A. и Pitt J.I. [300] авторы выделили парадоксальное объединение видов — группу *Warcupiella*, в которую они включили *A. zonatus*, *A. clavatoflavus*, *Warcupiella spinulosa* (анаморфа — *A. spinulosus*), *Penicillioptis clavariaeformis* (*clavariiformis*) и *Penicillium megalosporum*. *Penicillioptis clavariaeformis* Solms-Laubach – телеоморфная форма непатогенного аскомицета *Sarophorum palmicola* Seifert & Samson, для которого характерно образование крупных синнем. Конидиогенез у этого гриба представляет нечто среднее между формированием спор у *Aspergillus* и *Penicillium*. Наиболее необычная черта группы *Warcupiella* – наличие в ней типичного пеницилла *P. megalosporum*. В более поздней работе данную группу трансформировали в подрод *Warcupi* с двумя секциями. Секция *Zonati* объединила *A. zonatus*, *A. clavatoflavus* и *Penicillioptis clavariaeformis* (первые 2 вида ранее относили к группе *A. flavus*), для *W. spinulosa* предложили отдельную секцию *Warcupi* [217].

В качестве подрода среди аспергиллов также выделяли *Stilbothamnium*. Этот подрод, который первоначально предложили, как самостоятельный род, включал тропические виды, не связанные с патологией человека: *A. erythrocephalus*, *A. dybowski*, *A. vitellinus*, *A. amazonensis*, *A. togoensis* [78, 297]. Общее свойство этих видов — образование синнем, на которых формируются конидиеносцы; некоторые из них образуют афлатоксины. Уже на период включения в род *Aspergillus* Samson R.A. указал на сходство некоторых представителей *Stilbothamnium* с видами секций *Flavi* и *Circumdati*. *A. togoensis* и сходный с ним *A. coremiiformis* теперь относят к секции *Flavi* [346]; хотя статус других видов давно не пересматривали, подрод *Stilbothamnium* ныне в таксономии аспергиллов не упоминают.

В литературе упоминают о некоторых секциях неясного положения: *Assiuti* в подрode *Circumdati* для вида *A. assiutensis* [243]; *Bispori* для *A. bisporus*; *Silvati* для *A. silvaticus*; *Raperi* для *A. raperi* и *A. ivoriensis*; *Ochraceorosei* для *A. ochraceoroseus*; секция «*Penicillium*» для *A. crystallinus*, *A. malodoratus* и *Hemicarpaceles paradoxus* [298]; *Jani* для *A. janus* (редкий возбудитель) и *A. brevijanensis* [170].

Из секции *Nidulantes* предлагали выделить секцию *Aenei* для следующих видов: *A.*

aeneus (типовой вид), *A. eburneocremeus*, *A. crustosus*, *A. heyangensis*, *A. karnatakaensis*, *Emericella discophora*, *E. bicolor*, *E. spectabilis*, *E. foeniculicola* [340].

Генетический подход к классификации аспергиллов придал группам, введенным между родом и видами, таксономический смысл, поскольку открывает филогенетические связи видов. Однако такое разделение рода несколько мешает при морфологической идентификации изолятов. Целесообразно пересмотреть классификацию аспергиллов на компромиссной основе. Негативной тенденцией является использование телеоморфных наименований родов, особенно в медицинских изданиях (*Emericella*, *Eurotium*, *Sclerocleista*, *Dichotomomyces*, *Neocarpenteles*, *Neopetromyces*, *Petromyces*, *Chaetosartorya*, *Neosartorya*, *Fennellia*, *Warcupiella*, *Penicilliopsis*). Во-первых, инвазивной для человека и животных являются споры анаморфной стадии, во-вторых множество наименований родов телеоморф лишено филогенетического принципа и создает трудности в интерпретации печатных работ по проблеме аспергиллеза. Наиболее приемлемо употреблять родовое имя *Aspergillus* для обозначения видов, как в анаморфном, так и в телеоморфном состоянии.

1.6 Методы видовой идентификации грибов рода *Aspergillus*

В настоящее время для видовой идентификации аспергиллов применяют следующие подходы: культурально-морфологический, молекулярно-генетический, физико-химический (подходы перечислены в порядке их исторического проявления).

Морфологические приемы видовой идентификации аспергиллов на протяжении большей части истории изучения этого рода являлись базовыми, как для описания новых видов, так и для рутинных работ. Несмотря на то, что род *Aspergillus* описали немногим менее 300 лет назад, полноценные морфологические определители видов появились только в начале XX века. Ими оказались вышеназванные работы Тома и его коллег [284, 332].

Грибы рода *Aspergillus* не отличаются прихотливыми питательными потребностями и способны использовать для питания широкий круг источников макро- и микроэлементов. Для получения воспроизводимых результатов культивирования необходимы среды стандартного состава. В качестве таких предлагали синтетические минимальные среды Чапека, Понтекорво, Ролена и других авторов [284]. Именно агар Чапека с сахарозой стал первой стандартной питательной средой для морфологической идентификации, поскольку оказался простым и доступным в приготовлении и обладал хорошими дифференцирующими свойствами. Большинство классических морфологических определителей аспергиллов приводят описания видов именно на среде Чапека. Позднее появилось множество ее модификаций: среда Чапека-Докса; с пептоном, с добавлением аминокислот, с экстрактом зерен кукурузы и т. д. Определение вида строится обычно либо на использовании дихотомических ключей, либо синоптических ключей (последние в работе менее удобны). Для определения необходимо

выявить свойства колонии, а также признаки микроморфологии:

1. Цвет, диаметр и характер рельефа колонии;
2. Наличие экссудата;
3. Образование клейстотециев и склероциев;
4. Длина, цвет и толщина стенки, характер поверхности конидиеносца;
5. Форма и размер терминального расширения;
6. Особенности расположения и число рядов стеригм;
7. Форма, цвет и характер поверхности конидий;
8. Форма и размер конидиальной головки.

В этом перечне приведены признаки, доступные для наблюдения в световой микроскоп, однако, для уточненной видовой идентификации и особенно для описания кандидатов в новые виды может применяться также сканирующая и просвечивающая электронная микроскопия. Одним из важнейших электрооптических признаков, представляющих ценность для видовой идентификации, является строение аскоспор (если в лабораторных условиях удастся получить телеоморфную фазу гриба).

При изготовлении из культур микропрепаратов для светового микроскопа в зарубежной практике применяют краситель «хлопковый голубой» (cotton blue B). Это не совсем удачный прием, поскольку естественные цвета конидиальных головок, конидий и стенки конидиеносцев важны для идентификации.

В конце XX – начале XXI веков научные коллективы, возглавляемые Samson R.A. и Klich M.A. [193, 194, 298, 302, 345], в своих работах рекомендуют использовать иные стандартные питательные среды: среду Чапека с дрожжевым экстрактом и солодовый агар. «Голодную» среду Чапека перестают рекомендовать к широкому использованию, поскольку рост аспергиллов на ней достаточно медленный и многие виды слабо проявляют спорообразование и пигментацию. Внесение дрожжевого экстракта, который является более стабильным по составу источником азота, чем пептоны, заметно улучшило ростовые качества среды Чапека. Данная модификация доступна и в отечественном производстве.

Однако, ни классическая среда Чапека, ни ее модификация с дрожжевым экстрактом, не подходят для посева первичного материала, поскольку они адаптированы для аспергиллов и пенициллов, но не для других грибов. Солодовый агар (malt-агар, агар с мальц-экстрактом), напротив, подходит для широкого круга грибов, он поддерживает рост большинства медицински значимых дрожжей, аспергиллов, гиалогифомицетов и опако(фео)гифомицетов [55]. Для последних двух групп эта среда также является типовой [107]. Солодовый агар предложен Реддишом (Reddish) еще в 1919 г., эту среду также использовали Thom Ch. и Church M., однако, широкое использование и промышленное производство данной среды начало

развиваться не столь давно. Проблема в применении солодового агара заключается в том, что различные фирмы-производители под названием «malt agar» предлагают среды разного состава (Таблица 8). Из таблицы видно, что состав сред достаточно разнится. Помимо солодового экстракта, различные модификации malt-агара могут включать пептоны, глюкозу или мальтозу. Особое внимание вызывает рецепт VII, который не содержит природного дрожжевого экстракта, а является синтетической средой. Таким образом, для использования солодового агара в качестве типовой среды для идентификации аспергиллов и других грибов, необходима стандартизация его состава.

Таблица 8 – Различные промышленные варианты солодового агара (указаны фирмы-производители, каталожные номера, если известны, и состав сред на 1л)

I	II		III
Acumedia (7456), Interlab, Becton Dickinson, ATCC (323), Biokar Diagnostics	Sigma-Aldrich (70145) и Oxoid (CM0059), HiMedia (M137), Formedium, Applichem (A5789)		HARDY Diagnostics (H57)
Malt экстракт — 30,0 Агар-агар — 15,0	Malt-экстракт — 30,0 Микологический пептон — 5,0 Агар-агар — 15,0		Malt-экстракт — 20,0 Глюкоза — 20,0 Пептон — 6,0 Агар-агар — 15,0
IV	V	VI	VII
ATCC (324)	BAM Media (M182), рекомендовано FDA	Merck (344)	Conda/Pronadisa (1038), Melford (M2150), Remel, Difco
Malt-экстракт — 20,0 Пептон — 5,0 Агар-агар — 15,0	Malt-экстракт — 20,0 Глюкоза — 20,0 Пептон — 1,0 Агар-агар — 20,0	Malt-экстракт — 30,0 Пептон соевый — 3,0 Агар-агар — 15,0	Мальтоза — 12,75 Декстрин — 2,75 Глицерин — 2,35 Пептон — 0,78 Агар-агар — 15,0

Примечание: рецептуры сред приведены по данным официальных сайтов производителей

Следует заметить, что солодовое сусло не является эквивалентной заменой солодовому экстракту. В отечественном производстве питательных сред солодовых агаров пока не выпускают.

Биохимический подход к идентификации аспергиллов мало разработан, ввиду того, что эти грибы трудно различить с применением углеводных сред, традиционно используемых для бактерий и дрожжей. Билай В.И. и Коваль Э.З. приводят данные об отношении различных аспергиллов к углеводородам природного и синтетического происхождения: нефтяным углеводородам, соляровому дистилляту, парафиновому гачу, тяжелому парафиновому маслу,

дизельному топливу, широкой парафиновой фракции, твердым парафинам, жидким парафинам, гептатриаконтановому спирту, бензину, легкому газойлю, толуолу и других. При использовании таких субстанций удастся различить представителей секций *Flavi*, *Clavati*, *Aspergillus*, *Ornati*, *Fumigati*, *Nigri*, *Versicolores* и некоторых других [2].

В качестве дифференциальной среды для аспергиллов Samson R.A. и соавторы предложили креатин-сахарозный агар, который они применили для дифференцировки представителей секций *Nigri* и *Circumdati* (представители разных видов отличаются по интенсивности роста и продукции кислоты). Определяли различие представителей секции *Nigri* по реакции Эрлиха, отношению к различным углеводам [328, 343].

Несмотря на найденные биохимические различия видов рода *Aspergillus*, данных о биохимической активности явно недостаточно для надежной видовой идентификации, рекомендации по внедрению в практику для этих методов пока не созданы, поэтому они могут использоваться только в сочетании с морфологическим исследованием.

Молекулярно-генетический подход к определению видов аспергиллов многими авторами позиционируется, как типовой метод видовой идентификации этих грибов в XXI веке. Для идентификации наиболее частых возбудителей инвазивного аспергиллеза (*A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*) предложена тест-система, основанная на «гнездной» ПЦР с использованием видоспецифичных праймеров для внутреннего транскрибируемого спейсера, региона ITS1 [321]. Mirhendi H. и соавторы использовали для идентификации аспергиллов ПЦР с праймерами для ITS2, а затем провели электрофоретический анализ полиморфизма одноцепочной ДНК. Благодаря такому подходу удалось идентифицировать 11 видов среди штаммов госпитального и клинического происхождения [362].

Для идентификации *Aspergillus* spp. с успехом применяют таргетное ДНК-секвенирование ITS1-ITS2 [156], гена β -тубулина [136], кальмодулина и большой субъединицы РНК-полимеразы II [303]; анализ этих последовательностей позволяет изучать филогенетические связи аспергиллов [267, 268]. Serrano R. и соавторы применили комбинацию мультиплексной ПЦР и ДНК-секвенирование генов β -тубулина (*tubB/benA*) и гидрофобина А (*rodA*) для идентификации представителей секции *Fumigati*. Полиморфизм в полученных последовательностях выявили в относительно небольших участках — 153 и 103 пары оснований соответственно. Уже по электрофоретическому профилю ампликонов удалось разделить выборку на *A. fumigatus*, *N. udagawae* и штаммы других видов, а с использованием секвенирования гена *tubB* стало возможным идентифицировать 13 различных видов [310].

Наряду с этим Palencia E.R. и соавторы для идентификации аспергиллов секции *Nigri* применили технику rep-PCR (repetitive element palindromic PCR, ПЦР с праймерами для коротких повторяющихся некодирующих последовательностей); оказалось, что этот метод

обладает большей дискриминационной силой, чем ДНК-секвенирование внутреннего транскрибируемого спейсера и гена кальмодулина [256].

Есть сведения о том, что для идентификации сравнительно редких возбудителей аспергиллеза — *A. nidulans*, *A. tetrazonus*, *A. chevalieri* – подходит метод RAPD (анализ случайно амплифицированных полиморфных последовательностей ДНК) [38].

Таким образом, развитие молекулярно-генетических приемов видовой идентификации аспергиллов — это приоритетное направление совершенствования лабораторной диагностики аспергиллеза, особенно в тех случаях, когда традиционный морфологический подход не решает проблему видовой идентификации возбудителя, однако, его применение в поточной лабораторной практике ограничено.

В XXI веке в идентификации и изучении свойств возбудителей аспергиллеза стали применять комплексный подход, сочетающий молекулярно-генетические и физико-химические методы.

Физико-химический подход. Для идентификации *Aspergillus* spp. используют следующие физико-химические методы анализа: FTIRS (инфракрасная спектроскопия с преобразованиями Фурье); MALDI-TOF-MS (матрично-активированная лазерная десорбционно-ионизационная времяпролетная масс-спектрометрия), PCR/ESI-TOF-MS (полимеразная цепная реакция/электросперей-ионизационная масс-спектрометрия).

Инфракрасная спектроскопия с преобразованиями Фурье — исследование оптических свойств клеточной стенки микроорганизмов путем просвечивания клеток из бульонной культуры в оптической системе инфракрасного лазера. Получаемая оптическая характеристика — спектр клеточной стенки оригинального штамма — сопоставляют с базой типовых видоспецифичных спектров.

Этот метод пока не приобрел популярность в медицинской микологии. Tralamazza S.M. и соавторы применили FTIRS для идентификации *A. niger* и различения схожих по морфологическим признакам представителей секции *Circumdati* — *A. ochraceus* и *A. westerdijkiae* [336]. Последние 2 вида удалось разделить в 86,6% сопоставлений.

Известно несколько работ по идентификации аспергиллов в культурах и в биоматериале благодаря использованию «гибридной» технологии полимеразной цепной реакции и электросперей-ионизационной масс-спектрометрии. Для ПЦР с целью идентификации грибов в этой методике используют консервативные праймеры, преимущественно комплементарные некоторым последовательностям генов рибосомальной РНК. С помощью ESI-TOF-MS получают масс-спектр ампликона, по которому благодаря специальному математическому алгоритму можно определить количественный состав отдельных азотистых оснований ДНК в ампликоне. На основании определения такой характеристики с помощью сетевой базы данных

производится видовая идентификация. Данную технику с успехом применили для индикации и идентификации *Aspergillus* spp. при исследовании бронхоальвеолярного лаважа [315].

MALDI-TOF-масс-спектрометрия — метод физико-химического исследования, на основе которого создали системы быстрой видовой идентификации микроорганизмов, прежде всего — в сфере медицинской микробиологии [76, 97, 159]. Принцип работы таких систем состоит в следующем. Белковый экстракт из свежей культуры микромицета наносят на специальную подложку («мишень»), высушивают под тягой, покрывают раствором вещества, чувствительного к действию ультрафиолетового излучения («матрицей») и вновь высушивают. Подготовленный таким способом образец на мишени через вакуумный шлюз помещают в масс-спектрометр. Образец ионизирует ультрафиолетовый лазер (азотный или на основе алюмоиттриевого граната, легированного неодимом Nd:YAG). При ионизации наибольшую долю энергии лазера принимает на себя матрица (чаще всего — ароматическая кислота), которая протонирует молекулы исследуемых веществ. В зависимости от используемого вещества матрицы, ее растворителя и пробоподготовки образца, можно относительно избирательно ионизировать вещества определенного класса. Для видовой идентификации ионизируют пептиды и легкие белки с применением в качестве матрицы α -циано-4-гидроксициннамовой кислоты в сложном растворителе (ацетонитрил : вода : трифторуксусная кислота). Образовавшиеся ионы белков ($\text{Prot-N}^+\text{H}_3$) испаряются из образца, при действии сильного электромагнитного поля они летят в направлении детектора. На некотором промежутке полета ионы проходят пространство, к которому не приложено электромагнитное поле: этот так называемый времяпролетный промежуток (time of flight, TOF), в котором происходит естественное изменение скорости полета ионов за счет разницы их молекулярных масс. Минув времяпролетный промежуток ионы регистрируются на детекторе частиц, при снятии показаний с которого с помощью усилителя и преобразователей формируется характеристика исследуемой белковой смеси — масс-спектр (графическая зависимость двух величин — m/z ионов и количества ионов с конкретным значением этого показателя). Масс-спектр является непрерывной характеристикой, а для видовой идентификации используют произведенный от нее набор дискретных показателей для отдельных пиков — масс-спектро-профиль (МСП; англ. main spectra profiles, MSP). Масс-спектро-профиль оригинального изолята с помощью специального математического алгоритма сравнивают с МСП типовых коллекционных штаммов. В результате такого сравнения оригинальному изоляту присваивают то видовое имя, которое соответствует МСП известного типового штамма. Достоверность полученного результата отображают показатели, характеризующие силу сходства этих двух МСП (у разных производителей масс-спектрометров с этой целью разработаны различные переменные). Кроме того, в современных программных пакетах для MALDI-TOF-масс-спектрометров, как правило,

предусмотрены математические алгоритмы сравнения масс-спектров и масс-спектро-профилей [97, 295].

Важнейшим критическим элементом, определяющим успешность видовой идентификации микромицетов, является база данных типовых МСП. На этапе становления MALDI-TOF-MS для идентификации грибов чаще применяли оригинальные авторские базы, а на настоящем этапе имеются коммерческие базы МСП: «Fungi Library» (Bruker Daltonics), «SARAMIS» (AnagnosTec), «Andromas» (одноименного производителя). Первая из указанных баз (библиотек) является специализированной — содержит исключительно МСП мицелиальных грибов (в лабораториях ее используют в комбинации с основной базой Bruker Daltonics — Biotyper), тогда как две другие — многоцелевые базы.

Оригинальную базу для видовой идентификации мицелиальных грибов создал коллектив итальянских микологов [105]. В этой базе аспергиллы представлены 33 видами из 9 секций (*Fumigati*, *Flavi*, *Terrei*, *Nigri*, *Nidulantes*, *Usti*, *Circumdati*, *Aspergillus* и *Candidi*). Авторам удалось достичь в идентификации аспергиллов совпадения с результатами ДНК-секвенирования по генам кальмодулина и β -тубулина в 96,8% случаев. Менее удачной оказалась база МСП, созданная Ranque S., Cassagne C. и соавторами. Они включили в свою базу 143 изолята, однако, видовой состав базы авторы в своих публикациях не приводят. Благодаря использованию такой базы удалось идентифицировать только изоляты видов, наиболее часто встречающихся в лабораторной практике (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *E. amstelodami*, *E. nidulans*, *E. chevalieri*, *A. versicolor*, *A. sydowii*), а с изолятами более редких видов (*A. alliaceus*, *A. melleus*, *A. oryzae*, *A. sclerotiorum*) авторы потерпели фиаско [96, 283]. Труд Cassagne C. и соавторов [96] интересен в другом аспекте — это единственная работа, в которой проведен обстоятельный анализ различных методик подготовки культуры для получения белкового экстракта и масс-спектрометрического исследования. Авторы пришли к выводу, что для идентификации на основе MALDI-TOF-MS мицелиальные грибы следует субкультивировать на агаре Сабуро, хотя этот вывод вызывает сомнение даже при анализе опубликованных ими данных.

Известна также база МСП для идентификации мицелиальных грибов «NIH mold database» (Национальные институты здравоохранения США), включающая 37 видов аспергиллов (63 изолята), однако, некоторые изоляты помечены, как «*Aspergillus sp.*», наряду с медицински значимыми в базу включены виды, для которых не установлена роль в патологии человека (*N. aureola*, *A. brevipes*, *A. duricaulis*, *A. sojae*, *A. unilateralis*) [204].

Некоторые аспекты становления MALDI-TOF-масс-спектрометрии для видовой идентификации мицелиальных грибов, включая *Aspergillus spp.*, представлены в обзорной работе Chalupova J. и соавторов [97].

Существенным ограничением для внедрения MALDI-TOF-масс-спектрометрии в диагностику микозов в лабораториях России, безусловно, является ограниченное количество оригинальных баз (библиотек) масс-спектро-профилей отечественной разработки. Данный «методический пробел» необходимо заполнить в ближайший период.

1.7 Методы внутривидового типирования грибов рода *Aspergillus*

Большинство мицелиальных грибов практически не поддается биотипированию. Однако есть сведения о том, что был разработан оригинальный подход к различению штаммов возбудителей микозов на основе обнаружения антагонистического действия на них штаммов дрожжей, принадлежащих к родам *Saccharomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Williopsis*, *Ustilago*, *Phaffia*, *Hanseniaspora*, *Zygosaccharomyces*, *Cryptococcus* и некоторым другим. Такие штаммы получили красноречивое название «killer yeasts»; механизм действия некоторых токсических субстанций, которые они продуцируют, расшифрован: увеличение проницаемости цитоплазматической мембраны, подавление синтеза ДНК, деградация хитина, остановка клеточного цикла в фазе G1, подавление синтеза β -(1,3)-глюкана [221, 232]. Этот подход к типированию 32 штаммов *A. fumigatus*, выделенных в одном стационаре, применила группа итальянских исследователей [130]. Им удалось выявить 15 биотипов в исследуемой выборке.

Несмотря на дешевизну и доступность, типирование с помощью «киллерных дрожжей» широкого распространения не получило, а для *Aspergillus* spp. наиболее употребляемыми стали молекулярно-генетические методы (Таблица 9).

Таблица 9 – Опыт применения различных методов типирования штаммов *Aspergillus* spp.

Метод	Виды, для которых применен данный метод	Авторы и год публикации (примеры работ)
RFLP (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов)	<i>A. fumigatus</i>	Birch M. et al., 1995
	<i>A. fumigatus</i>	Semighini C.P. et al., 2001
	<i>A. niger</i>	Bau M. et al., 2006
	<i>A. flavus</i>	Mohankumar M. et al., 2010
	<i>A. oryzae</i>	Wicklowsky D.T. et al., 2007
RFLP митохондриальной ДНК	<i>A. tubingensis</i>	Juhasz A. et al., 2007
AFLP (полиморфизм длин амплифицированных фрагментов)	<i>A. fumigatus</i>	Duarte-Escalante E. et al., 2009
	<i>A. flavus</i>	Rudramurthy S.M. et al., 2011
	<i>A. ochraceus</i>	Schmidt H. et al., 2003
MLST (типирование путем ДНК-сиквенирования)	<i>A. fumigatus</i>	Bain J.M. et al., 2007
	<i>A. flavus</i>	Thungapathra M. et al., 2009

Продолжение таблицы 9

Метод	Виды, для которых применен данный метод	Авторы и год публикации (примеры работ)
MLP (полиморфизм длин микросателлитов — коротких tandemных повторов) и близкие методы	<i>A. fumigatus</i>	Bart-Delabesse E. et al., 1998
	<i>A. fumigatus</i>	Araujo R. et al., 2009
	<i>A. flavus</i>	Houshyarfard M. et al., 2015
	<i>A. flavus</i>	Hadrich I. et al., 2010
	<i>A. niger, A. carbonarius</i>	Esteban A. et al., 2008
	<i>A. terreus</i>	Kathuria S. et al., 2015
RAPD (анализ случайно амплифицированных полиморфных последовательностей ДНК)	<i>A. fumigatus, A. niger</i>	Raclavsky V. et al., 2006
	<i>A. niger</i>	Abed K.F., 2008
RAPD (анализ случайно амплифицированных полиморфных последовательностей ДНК)	<i>A. fumigatus</i>	Mirhendi H., 2009
	<i>A. niger</i>	Mirhendi H., 2009
	<i>A. fumigatus</i>	Loudon K.W. et al., 1995
	<i>A. terreus</i>	Symoens F. et al., 2000

Примечание: для *A. flavus*, *A. oryzae* и *A. niger* метод RFLP апробирован только на штаммах, выделенных из растений и растительных продуктов; проведенная работа по RFLP митохондриальной ДНК является пилотной, эпидемиологическое применение этой методики еще не развито; RAPD выполняли с различными праймерами и с разным их количеством

Опыт применения различных техник генотипирования аспергиллов приведен в обзорных работах Klaassen C. и Osharov N. [192], а также Varga J. [342]. Как видно из таблицы 9, различные методы типирования уже апробовали для основных видов-возбудителей аспергиллеза.

Сравнительные исследования методик типирования аспергиллов относительно немногочисленны. В одной из ранних работ Lin D. и соавторы типировали 35 штаммов *A. fumigatus*, выделенных из различных источников, с помощью трех методов: RAPD, рестрикционного анализа и анализа изоферментов (щелочной фосфатазы, эстеразы, каталазы). Примененные методы обладали различной дискриминационной силой: анализ изоферментов позволил разделить штаммы в выборке на 9 типов, тогда как RAPD с пятью праймерами и RFLP с использованием трех рестриктаз разделили выборку 22 и 28 типов соответственно [210].

В более современной работе Vanhee L. и соавторы [339] исследовали выборку из 52 изолятов *A. fumigatus* от больных инвазивным аспергиллезом, применили для типирования штаммов 6 различных методов. Были получены следующие результаты (метод и количество молекулярных типов): анализ коротких tandemных повторов - 30; типирование путем мультилокусного секвенирования (MLST) - 16; RAPD - 8; анализ полиморфизма микросателлитов - 14; анализ сиквенса-специфичного полиморфизма ДНК - 9; мультилокусный

электрофорез ферментов - 8.

Оптимальный метод и протокол для генотипирования (внутривидового типирования) аспергиллов еще не избран; очевидно, может возникнуть необходимость применения методов с различной дискриминационной силой: с более выраженной для локальных эпидемиологических исследований и более слабой — для исследования глобальной эпидемиологии в объеме стран и континентов, составления молекулярно-эпидемиологического атласа.

1.8 Факторы вирулентности и аллергенности грибов рода *Aspergillus*

Молекулярные факторы, связанные с проникновением в ткани хозяина и развитием в них аспергиллов, подробно изучены преимущественно у клинических изолятов *A. fumigatus*, но для других видов имеются лишь фрагментарные данные. Роль различных факторов в патогенезе аспергиллеза доказывают путем получения мутантных штаммов, у которых тем или иным способом блокирован ген, кодирующий «фактор-кандидат». В лабораторной модели *in vivo* сравнивают вирулентность «дикого» (полноценного) и мутантного (нокаутированного) штамма. Такой подход используют многие исследователи [275], хотя он обладает серьезным недостатком — блокада определенного гена может ухудшать базовые, неспецифические, процессы жизнедеятельности, что отражается на всех физиологических актах гриба. Инвазия в ткани хозяина — акт специфический, наибольший интерес представляют те молекулярные механизмы и факторы, которые задействованы исключительно в этом процессе.

Факторы вирулентности аспергиллов можно условно разделить на 2 группы: (1) «пассивные» — свойства и факторы, обеспечивающие адаптацию клетки гриба к условиям жизни в тканях человека и защиту от процессов неспецифической резистентности и иммунитета без непосредственного воздействия на них; (2) «активные» — факторы, связанные с повреждением тканей и клеток хозяина грибом.

Вопреки распространенному ранее мнению, до настоящего момента не удалось доказать, что при 37°C у *A. fumigatus* усиливается экспрессия каких-либо генов, связанных с вирулентностью [35].

Термофильные свойства проявляют не все аспергиллы, связанные с возникновением инвазивных поражений человека, но, тем не менее, этот фактор персистенции гриба в тканях считают одним из решающих. Ферменты антиоксидантной системы защищают клетки гриба от действия свободных радикалов, образующихся при реализации кислородзависимых механизмов фагоцитоза (для глутатионтрансфераз роль в патогенезе еще не доказана). Для работы этих ферментов аспергиллы нуждаются в поступлении ионов Mn^{+2} ; Cu^{+2} , Zn^{+2} . Марганец-зависимая супероксиддисмутаза является одним из важнейших аллергенов *A. fumigatus*. Гидрофобины и DHN-меланин являются компонентами клеточной стенки конидий *A. fumigatus*, проявляют разноплановую протективную функцию [102, 248]. Гидрофобины (rodlets) — поверхностные

белки конидий, которые удается растворить только в сильных минеральных кислотах. Как и меланин, гидрофобины препятствуют фагоцитозу конидий (на этапах адгезии и переваривания), защищают их от действия свободных радикалов, блокируют активацию комплемента, скрывают другие поверхностные антигены конидий. Если же поверхностные структуры конидий фагоцитам все-же удастся распознать, то этот процесс происходит через TLR2, благодаря чему после презентации антигена процесс дифференцировки лимфоцита идет по пути Th2 и реализации гуморального иммунного ответа, непротективного при микозах [183]. В конидиях *A. fumigatus* накапливаются некоторые микотоксины, для которых не установлена возможность синтеза *in vivo*, но они могут играть роль в инвазии, освобождаясь при прорастании конидий. Наиболее изученные факторы вирулентности аспергиллов представлены в таблице 10 [35, 183, 102], а их место в патогенеза инвазивного аспергиллеза приведено на рисунке 7.

Таблица 10 – Факторы вирулентности аспергиллов на примере *A. fumigatus* [35, 183, 102]

«Пассивные» факторы	«Активные» факторы
Способность к росту при 37° – 40° С и более. Факторы термостабильности, связанные с вирулентностью: α -1,2-маннозилтрансфераза (участвует в синтезе клеточной стенки); ядерный фактор <i>sgtA</i> , связанный с образованием рибосом; белки теплового шока.	Ферменты
	Сериновая щелочная протеаза
	Металлопротеазы
	Аспартил-протеазы (аспергиллопепсины)
	Фосфолипазы А – D
	Гемолизин <i>aspHS</i>
Ферменты антиоксидантной системы: каталазы, супероксиддисмутаза, глутатионтрансферазы (?).	28S-сайт-специфичные рибонуклеазы (митогиллин, рестриктоцин, α -сарцин)
	Микотоксины
Системы захвата ионов Cu^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2}	Глиотоксин
DHN-меланин и система его синтеза.	Токсины, запасенные в конидиях: трипацидин, квестин, триптоквивалин F, фумиквиназолин C, монометилсулохрин.
Гидрофобины конидий и система их синтеза.	Группа нейротропных микотоксинов: фестуклавин, фумигаклавины А – С; фумитреморгены А – С; триптоквивалин А.
Изменение регуляции синтеза простагландинов и сходных соединений.	

Среди субстанций, к которым происходит сенсibilизация при развитии микоаллергозов, инициированных *Aspergillus* spp., доминируют различные ферменты: марганецзависимая супероксиддисмутаза, рибонуклеаза, металлопротеаза, аспартил-протеаза, пептидилпролилизомераза, сериновая протеаза, белки теплового шока, рибосомальный белок Р2 и другие [64].

1.9 Лабораторные аспекты антифунгальной терапии аспергиллеза

Антимикотики, активные против *Aspergillus* spp., мишени их действия и механизмы резистентности к ним. Против медицински значимых *Aspergillus* spp. В терапевтических целях применяют, главным образом, 3 группы антимикотиков: полиены, триазолы и эхинокандины.

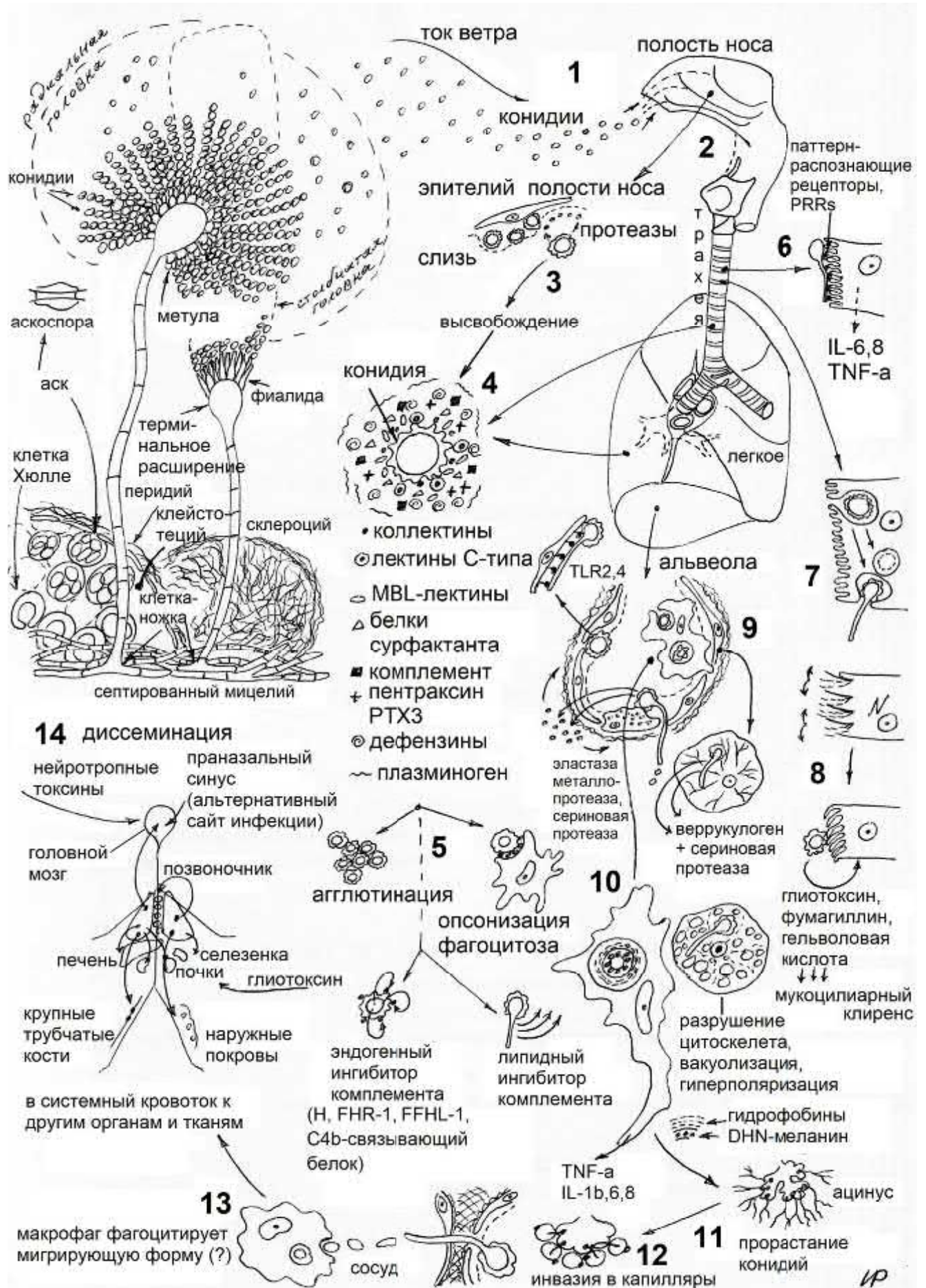


Рисунок 7 – Патогенез инвазивного аспергиллеза (рисунок автора)

Примечание: цифрами обозначены условные стадии

Полиеновые антимикотики явились первой в историческом аспекте группой противогрибковых препаратов, эффективной против аспергиллов. Главный (первый) представитель данной группы — амфотерицин В — продукт актиномицета *Streptomyces nodosus*. Имеет несколько форм выпуска: лиофилизат для инфузий (наиболее дешевая и наиболее токсичная форма), комплекс с N-метилглюкамином, амфотерицина В дезоксихолат, липидный комплекс, липосомальный амфотерицин В. Этот препарат обладает широким спектром активности, как в отношении аспергиллов, так и других возбудителей микозов человека. Амфотерицин В, однако, не применяют в качестве препарата первого выбора ввиду выраженной нефро- и гепатотоксичности. Комплексы с липидами менее токсичны. Помимо амфотерицина В в отношении *Aspergillus* spp. в опытах *in vitro* и *in vivo* активен также хамицин (продукт *Streptomyces pimprina*), но пока не получено достоверных данных, имеет ли хамицин преимущества перед амфотерицином В [41, 242, 281].

Молекулы полиеновых антимикотиков встраиваются в цитоплазматическую мембрану клетки грибов, нековалентно связываясь с эргостеролом, благодаря этому формируются неселективные ионные каналы, нарушается нормальный градиент ионов мембраны. Среди аспергиллов встречается как видовая, так и приобретенная резистентность к полиеновым антимикотикам. *A. terreus*, *A. nidulans* и некоторые «криптические» представители секции *Fumigati* обладают видовой резистентностью к амфотерицину В. Есть также сообщения о амфотерицин-резистентных штаммах других видов *Aspergillus* spp., однако, молекулярный механизм этой устойчивости еще не выяснен.

Основной группой антимикотиков, применяемых против аспергиллов, как в лечебных целях, так и для профилактики у контингентов высокого риска, являются производные триазола. В терапевтических целях из препаратов этой группы используют итраконазол (1-е поколение триазолов), вориконазол, изавуконазол и позаконазол (триазолы 2-го поколения). Некоторые препараты этой группы находятся на клинических испытаниях.

Мишень действия азольных антимикотиков — ланостерол-14- α -деметилаза (ЕС: 1.14.13.70) фермент из семейства цитохрома P450 (ее обычно обозначают как CYP51), катализирует реакцию, показанную на рисунке 8. Как и все родственные белки типа CYP450, это железозависимый фермент; не обладает строгой субстратной специфичностью. Стерол-14- α -деметилазы являются базовыми ферментами биосинтеза стероидов, широко распространены среди живых организмов от архей и бактерий до человека. Фермент включает 2 домена: трансмембранный, благодаря которому он фиксируется на мембране гладкого эндоплазматического ретикулума, и каталитический. У *A. fumigatus* и, по-видимому, у других аспергиллов существует 2 изоформы ланостерол-14 α -деметилазы – CYP51A и CYP51B (у *A. fumigatus* их первичные структуры сходны на 59%). По данным, представленным в NCBI

(National Center of Biotechnology Information), ген *cyp51A* расположен у *A. fumigatus* на 4-ой хромосоме и включает 2 экзона, тогда как *cyp51B* – на 7-ой хромосоме; он включает 4 экзона.

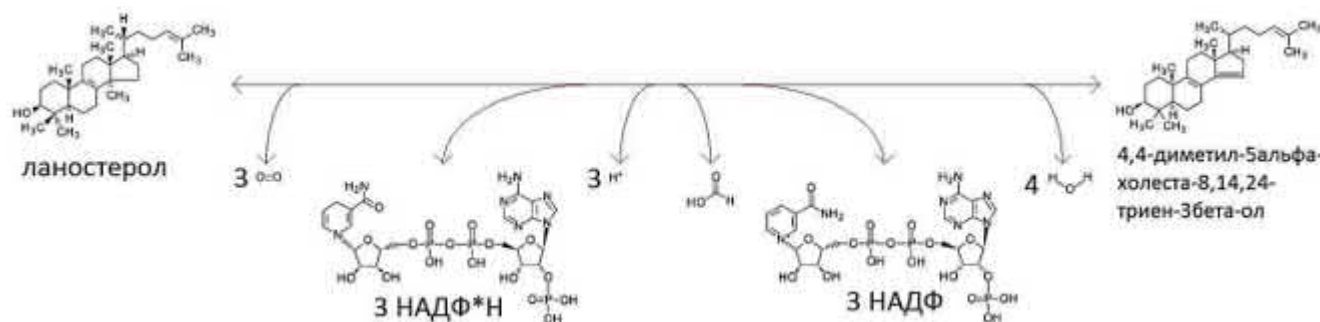


Рисунок 8 – Реакция, катализируемая ланостерол-14α-деметилазой по данным «KEGG» – Киотской энциклопедии генов и геномов [<https://www.genome.jp/entry/R05640>]

Изоформа А является индуцибельной, а изоформа В экспрессируется в клетках постоянно [155]. Биологическая интерпретация их различия еще не найдена, однако, известно, что резистентность к триазолам связана именно с мутациями в гене изоформы А [125].

Связь аминокислотных замен CYP51A у *A. fumigatus* с резистентностью к азольным антимикотикам представлена в международном открытом интернет-ресурсе AspGD (*Aspergillus* Genome Database). Наиболее известны аминокислотные замены по положениям G54, M220, G448 и G138 (здесь и далее аминокислоты указаны в коде FASTA). Мутации, обуславливающие замены в позиции G54 (G54E, G54V, G54R, G54W), ведут к развитию резистентности к итраконазолу, высоким значениям МИК к позаконазолу, но не связаны с утратой чувствительности к вориконазолу и равуконазолу. Замены в положении M220 (M220K, M220V, M220T, M220I) связаны с резистентностью к итраконазолу, а также высокими показателями МИК к позаконазолу, вориконазолу и равуконазолу, однако, эти свойства выражены по-разному при наличии каждой конкретной замены. Мутация M220K ведет к появлению наиболее высоких значений МИК к итраконазолу и позаконазолу [43]. Замену G448S нашли у изолятов *A. fumigatus*, которые выделили от пациентов, длительно принимавших триазолы, она связана с резистентностью к вориконазолу [263, 276].

В 2000 г. группа исследователей из Университета Токио опубликовала сообщение о новом механизме резистентности мицелиальных грибов к азольным фунгицидам, который они обнаружили у *Penicillium digitatum*. Среди изолятов с одинаковой последовательностью структурного гена CYP51 нашли как чувствительные, так и резистентные штаммы. Удалось установить, что резистентность обусловлена пятикратным повторением короткого tandemного повтора (минисателлита) в промоторной области, которая привела к увеличению экспрессии фермента примерно в 100 раз [154]. У *A. fumigatus* обнаружили сходный механизм,

проявляющийся в увеличении числа копий короткого tandemного повтора из 34 пар оснований в промоторном регионе *sup51A* в сочетании с заменой L98H (TR₃₄/L98H). Такая комбинация связана с резистентностью к итраконазолу и вориконазолу; она может быть единственным изменением структуры *sup51A*, а также сочетаться с другими аминокислотными заменами. Мутацию TR₃₄/L98H выявляют не только у клинических, но и свободноживущих штаммов [40]. Более редкая сходная по механизму мутация TR₄₆/Y121F/T289A обуславливает перекрестную резистентность к триазолам, которая проявляется очень высоким показателем МИК вориконазола (>16 мкг/мл), а МИК к итраконазолу и вориконазолу оказываются ниже. Первоначально эту сочетанную мутацию *sup51A* у клинических изолятов *A. fumigatus* выявляли в Нидерландах и Бельгии, вскоре ее отметили у штаммов из Дании, Германии, Индии и Танзании [205, 347].

У *A. nidulans* резистентность к итраконазолу определяется наличием дополнительных копий гена ланостерол-14 α -деметиلاзы – *pmdA* [212], позднее установили, что у *A. fumigatus* резистентность к триазолам может быть связана с гиперэкспрессией *sup51B*, которую можно индуцировать итраконазолом.

Закономерные изменения в первичной структуре фермента CYP51 и кодирующего гена у других аспергиллов в связи с различиями в чувствительности к триазольным антимикотикам практически не изучены.

Первая отечественная работа по изучению структуры гена ланостерол-14 α -деметилазы А у *Aspergillus* spp. опубликована Латыповой Е.М. и Тараскиной А.Е. Авторы исследовали особенности *sup51A* у клинических штаммов *A. flavus*, *A. terreus* и *A. calidoustus*, резистентных к итраконазолу и вориконазолу. У представителя вида *A. calidoustus* такие данные получены впервые в мире [17].

Другой путь утраты чувствительности к азолам определяется работой мембранных эффлюксов типа АТФаз или котранспортеров, это механизм также может сочетаться со значимыми мутациями в *sup51A* [282]. Данный механизм резистентности является индуцибельным.

Альтернативным классом антимикотиков являются эхинокандины (или просто кандины), которые представляют собой циклические липопептиды. Природные соединения данного класса выделяют некоторые микромицеты, притом среди них есть даже представители рода *Aspergillus*: *A. rugulovalvus* (эхинокандин В), *A. aculeatus* (акулеацин А). Для терапевтических целей используют полусинтетические соединения – каспофунгин, микафунгин и анидулафунгин. Мишенью действия этих препаратов является фермент β -D(1 $\rightarrow$ 3)-глюкансинтаза (ЕС 2.4.1.34) – белок, обладающий четвертичной структурой (имеет по меньшей мере 2 субъединицы: FKS1 – каталитическую и Rho1 – регуляторную, ГТФазную); при ее ингибировании нарушается

нормальное формирование клеточной стенки аспергиллов [112]. Кандины обладают только фунгистатической активностью, поэтому в лечении аспергиллеза их обычно комбинируют с препаратами триазольной группы. Потеря чувствительности к эхинокандинам у аспергиллов определяется мутациями в гене *fks1*, которая проявляется у *A. fumigatus* аминокислотной заменой S678P. У *Candida* spp. известен также компенсаторный механизм резистентности к эхинокандинам, проявляющийся гиперпродукцией хитина, однако, у аспергиллов он еще не описан [287, 354]. Для *A. fumigatus*, как и для *Candida* spp., при действии на них кандидами *in vitro* и *in vivo* (в модельной инфекции) описан «эффект орла», проявляющейся тем, что при возрастании концентрации кандидина до определенного критического значения подавляется рост гриба или улучшается состояние инфицированного животного, но после достижения критической концентрации с возрастанием дозы рост гриба может даже увеличиваться, а терапевтический ответ снижается. Причины этого феномена еще не раскрыты.

Описано несколько перспективных разрабатываемых классов антимикотиков, эффективных против *Aspergillus* spp. *in vitro* – сордарины [223], парнафунгины [341], инкрустопорины [88], оксаборолы и др. Представители этих групп препаратов проходят доклинические испытания.

Способы определения чувствительности аспергиллов к антимикотикам. Для определения у представителей рода *Aspergillus* чувствительности к антимикотикам разработаны следующие методы: (1) классический метод серийных разведений в жидкой питательной среде и его модификации: с использованием MALDI-TOF-MS, солей таразолия, флуоресцентной окраски; (2) метод пограничных концентраций в плотной питательной среде; (3) Е-тест; (4) диско-диффузионный метод. Возможен также генетический подход в изучении чувствительности аспергиллов к антимикотикам который включает, в частности, таргетное ДНК-секвенирование генов *cyp51A* и *fks1* (или аналогичных локусов у *Aspergillus-non-fumigatus*) [49, 106, 125, 144, 184, 187, 209]. Однако в его диагностическом применении сегодня есть ряд препятствий:

- Не удается учесть развитие адаптивных механизмов устойчивости (эффлюксы, гиперэкспрессия CYP51);
- Не вполне точно определена корреляция наличия аминокислотных замен в ферментах-мишенях с примерными значениями МИК соответствующих антимикотиков.

Среди фенотипических приемов метод серийных разведений принят в качестве эталонного. Для его практической реализации двумя крупными объединениями лабораторных специалистов разработаны протоколы EUCAST e.def 9.3 (более ранние 9.1 и 9.2 [128, 288]) и CLSI M38-A2 [224]. Оба протокола имеют много общих принципиальных положений, в том числе: (1) использование жидкой синтетической питательной среды RPMI 1640 (в модификации с глутамином, без бикарбоната натрия); (2) суспендирование спор аспергиллов в изотоническом

растворе NaCl с добавлением твина 20 в качестве детергента; (3) диапазон финальных разведений антимикотика 16 – 0,0313 мкг/мл. Принципиальные методологические отличия протокола, разработанного EUCAST, состоят в том, что в среду RPMI 1640 дополнительно добавляют глюкозу до 2%, используют более концентрированный инокулюм спор, концентрацию инокулюма выверяют с помощью гемоцитометра, а не кюветного спектрофотометра, как предложили специалисты CLSI. Кроме того, протокол EUCAST подкреплён экспертными правилами интерпретации результатов определения чувствительности, позволяющими интерпретировать МИК антимикотиков для штаммов важнейших возбудителей аспергиллеза (*A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. nidulans*), а также находится в свободном доступе на сайте разработчика. В отличие от него протокол CLSI не имеет экспертных правил интерпретации, доступен только на коммерческой основе, что делает его менее пригодным для внедрения в диагностическую практику.

Представляют определенный интерес методики с использованием плотных и полужидких питательных сред, поскольку готовые разведения антимикотика в среде в данном варианте постановки более удобны для хранения (разведения в жидкой среде RPMI 1640 требуют низкотемпературную камеру). Группа индийских авторов предложила оригинальный протокол метода серийных разведений для дрожжевых и мицелиальных грибов, включая *Aspergillus* spp., в котором они использовали полужидкий сердечно-мозговой агар. Наблюдали достоверную корреляцию между результатами определения МИК антимикотиков по оригинальному протоколу и с использованием протокола CLSI M38-A (более ранняя версия) [187]. В многоцентровом исследовании SCARE Study, посвященном изучению эпидемиологии резистентности к триазолам, проводили скрининг чувствительности изолятов *Aspergillus* spp. с последующим отбором подозрительных штаммов для генетического исследования [337]. Для скрининга использовали посев изолятов в специальный пластиковый планшет с 4-мя секциями, заполненными плотной питательной средой. В трех секциях в агаре были разведения антимикотиков (итраконазол 4 мг/мл, вориконазол 1 мг/мл, позаконазол 0,5 мг/мл), четвертую секцию применяли для контроля роста культуры. Такая простая система может быть применена для скрининга устойчивых изолятов.

Е-тест для *Aspergillus* spp. отработан для всех основных терапевтических антимикотиков: амфотерицина В, итраконазола, вориконазола, позаконазола, каспофунгина и анидулафунгина. В качестве питательной среды для определения чувствительности разные авторы использовали агаризованную RPMI 1620. Неоднократно проводили работы по сравнению результатов определения чувствительности к антимикотикам с помощью Е-теста и методом серийных разведения по стандартному протоколу. Одна из ранних работ такого типа, выполненная для триазолов и амфотерицина В опубликована в 2002 г. Espinel-Ingroff A. и Rezusta A. на выборке

из 107 штаммов *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* и *A. nidulans*. Авторы использовали проектный вариант протокола CLSI M38-P. Интересно, что совпадение тестов для отдельных антимикотиков и видов различалось в зависимости от срока инкубации. Так для итраконазола высокую долю совпадений (90,3%) наблюдали только при инкубации 24 ч, а спустя еще сутки расхождения заметно увеличивались (только 74,2% совпадений). При определении чувствительности к амфотерицину В штаммов *A. flavus* и *A. fumigatus* наилучшую долю совпадений также удалось зарегистрировать спустя 24 ч. На следующие сутки для *A. flavus* результаты определений двумя способами уже сильно расходились (всего 26,7% совпадений). Среди прочих видов в целом наименее удовлетворительные показатели совпадения для всех антимикотиков наблюдали у *A. nidulans* (60 – 80%) [70].

Значительно большие расхождения наблюдали Mirchevska G. и Bosshard P. в исследовании на небольшой выборке из 33 штаммов мицелиальных грибов, включающей аспергиллы (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. versicolor*, *A. sclerotiorum*, *A. glaucus*), а также представителей родов *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Scopulariopsis* и *Scedosporium*. Для 3 антимикотиков авторы получили следующие доли совпадения между результатами Е-теста и метода серийных разведений по протоколу CLSI M38-A: для амфотерицина В – 47,1%; для итраконазола – 58,3%; для вориконазола – 64,7% (в пределах ± 1 разведение) [235]. Хотя приведенные данные авторы получили на малой выборке, они заставляют усомниться в возможности полноценной замены метода серийных разведений Е-тестом.

Одно из наиболее крупных исследований по сопоставлению протокола M38-A (CLSI) Е-теста для выборки из 376 штаммов 9 видов аспергиллов провели Pfaller J.B. и соавторы [270].

Группа испанских исследователей изучала сопоставимость результатов Е-теста и протокола CLSI M38-A2 для трех основных эхинокандиновых препаратов, используя выборку из 67 штаммов аспергиллов, принадлежащих к 5 видам (*A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. glaucus*). Как оказалось, результаты оценки полностью совпали для микафунгина и анидулафунгина при инкубации до 24 ч, тогда как для каспофунгина совпадение оказалось неполным: 83,5% спустя 24 ч и 79% спустя 48 ч. Наибольшую долю расхождений наблюдали для 4 штаммов *A. glaucus*; спустя 24 ч результаты тестов совпадали на 75%, спустя 48 ч – только на 50% [224].

Диско-диффузионный тест для определения чувствительности к антимикотикам аспергиллов и других спорообразующих мицелиальных грибов (кроме дерматомицетов) стандартизирован протоколом CLSI M51-A, а также приложением M51-S1, описывающим контроль качества исследования и эпидемиологические «точки отсечения» (epidemiological cut-off, ECOFF) между значениями МИК устойчивых и чувствительных штаммов, однако, последний показатель разработан пока только для вориконазола. Данный тест проводится с

использованием модифицированного агара Мюллера-Хинтон, в который вносят дополнительно глюкозу и раствор метиленового синего.

Один из ранних опытов определения чувствительности отечественных клинических изолятов *Aspergillus* spp. к амфотерицину В приведен в сообщении Михайловой М.А. [22]. При использовании метода серийных разведений на бульоне Сабуро для 12 штаммов *Aspergillus* spp. клинического происхождения (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. versicolor*) выявлен диапазон МИК равный 12,5 – 100 мкг/мл, что, по мнению автора сообщения, свидетельствует о резистентности выделенных культур к исследуемому антимикотику.

В 2009 – 2010 гг. сотрудники НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина в рамках проекта SCARE Study определили чувствительность к триазольным антимикотикам (итраконазолу, вориконазолу, позаконазолу) у 38 клинических изолятов, принадлежащих к видам *A. fumigatus*, *A. flavus* и *A. niger*. В результате опыта удалось выявить штамм *A. flavus*, нечувствительный к вориконазолу, а также штамм *A. niger*, нечувствительный к итраконазолу [4, 6]. В продолжении этого исследования до 2011 г. выборка штаммов, у которых определена чувствительность к триазолам, увеличена до 92; обнаружен еще один штамм *A. niger*, резистентный к итраконазолу. Данные о 60 штаммах, выделенных от 67 пациентов из России представлены авторами в статье по этому международному проекту [337].

Резюме. Приведенный выше свод информации является свидетельством исключительно высокого интереса к грибам рода *Aspergillus* среди специалистов из различных областей микробиологии, микологии, фундаментальной биологии, лабораторной и клинической медицины. Этот интерес обусловлен многофакторным, в том числе болезнетворным, воздействие аспергиллов на человека. Разработка практических мер борьбы с инфекциями, вызываемыми *Aspergillus* spp., в том числе быстрых и точных методов идентификации, особенно «криптических» видов, разработка критериев оценки их этиологической роли в развитии микозов и экспресс-методов определения чувствительности к противогрибковым препаратам, а также нивелирование последствий таких заболеваний требуют дополнения современных представлений о биологии и прикладных свойствах микромицетов.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 2. Морфологические свойства клинически значимых видов *Aspergillus* spp.

2.1 Особенности морфологии колоний *Aspergillus* spp.

Характеристики экспериментального культурально-морфологического исследования в зависимости от питательной среды, изученных видов, количества штаммов и посевов представлены в таблице 11. Дополнительно для штаммов осмофильных видов аспергиллов (*Eurotium rubrum*, *Eurotium* sp., *E. amstelodami*, *E. repens*) предприняли субкультивирование на среде Чапека с дрожжевым экстрактом и 20% сахарозы. Для штамма *A. wentii* в связи с отличием его трофических потребностей от ряда других изученных видов среда Чапека с дрожжевым экстрактом использована в 4-х модификациях (с сахарозой, лактозой, маннитом и мальтозой), а среда Сабуро – в 2-х модификациях (в стандартной прописи и с добавлением 5 г/л NaCl). В результате проведенного культурально-морфологического исследования установлено, что штаммы изученных видов обладают следующими характеристиками.

A. fumigatus. Среди изолятов *A. fumigatus* встречаются штаммы с сильно- или умеренно выраженным спорообразованием и пигментацией, типичными для вида, а также атипичные штаммы, отличающиеся слабо выраженной пигментацией колонии и спорообразование, которые морфологически схожи с некоторыми другими представителями секции *Fumigati*.

Культуральные особенности представителей данного вида принципиально близки при выращивании на большинстве богатых сред (агар Сабуро по Эммонсу, среда Чапека с дрожжевым экстрактом, солодовый агар, сусло-агар, КГДА). Типичные штаммы отличаются быстрым ростом: в молодых колониях конидиеносцы формируются спустя 24 - 48 ч инкубации при 30° - 35°C, а на 3 - 4 сутки колонии занимают уже всю поверхность чашки. Цвет колоний темно-зеленый (контрастно отличается от травянисто-зеленого у *A. flavus*) с синеватым или буроватым оттенком (из-за продукции меланина). У некоторых штаммов центр колонии может быть буро-коричневый или светло-коричневый без зеленого оттенка, у других — напротив, имеет более сильно выраженную зеленую пигментацию. У некоторых штаммов с нормально развитым спорообразованием может появляться вторичный белый воздушный мицелий. Обратная сторона колоний не окрашена.

На среде Сабуро и сусло-агаре колонии преимущественно плоские, ровные, складчатый рельеф не характерен. Плеоморфные изоляты на этих средах образуют белые колонии с высоким воздушным мицелием.

Таблица 11 - Характеристика экспериментального культурально-морфологического исследования

Питательные среды				Посевы для получения гигантских колоний на плотной питательной среде (в чашках Петри на поверхности агаровых «скосов» в пробирках)															Характеристики вида изучены в X посевов гигантских колоний
				Посевы для хранения штаммов в форме живых культур			среда Чанка с дрожжевым экстрактом	среда Чанка с дрожжевым экстрактом	среда Сагро	КТЛА	среда Чанка с дрожжевым экстрактом и лактозой	YPD-агар	агар с розентаг	среда Чанк	среда Чанка-Дорса	КМА	Сусло-агар	солодовый агар	
Виды, кратность выполнения (осмотра) посевов	КТЛА / КТЛА	освежий агар	экстракт	93	29	25	5	1	5	3	4	3	3	2	3	3	3	3	89
				45	15	28	12	1	5	3	7	3	5	4	3	3	3	92	
				69	11	22	5		5	3	6	6	5	5	3	3	3	77	
				6	9	10	5	1	1	4	4		1	1				36	
				4	6	3	7	1	1	3	1	1	1					24	
				5	5	7	14	1	2	1	1	1	3	1				35	
				6	12	3	3	1						1				20	
				3	6	5		1	2			1						15	
				1	1	1	1						1					4	
				2	1	1	3	1	1	1	1	1						8	
				1	1		1	1		1								4	
				2	4	2		1	1									8	
				1	6	2	2			1								11	
				4	6	3	4	1	2									16	
				1	1	1	1											3	
			1	2						1							3		
Характеристики питательной среды изучены в X посевов гигантских колоний				[всего 244 штамма]	115	113	63	11	25	19	25	18	17	12	9	9	9	445	
Кратность наблюдений				Пересев через 4 – 6 мес. со смесью среды	Однократно														

Примечание: ячейки серого цвета – исследования не проводились

При культивировании на микологическом агаре Киммига, сходным по составу со средой Сабуро, колонии отличаются более выраженными буро-коричневыми оттенками. Очевидно, на этой среде лучше происходит биосинтез меланина. На среде YPD рост быстрый, спороношение заметно отстает от развития субстратного мицелия. Цвет зрелых колоний с развитым конидиогенезом — серый.

На агаре Чапека с дрожжевым экстрактом (типовой среде для описания аспергиллов) формирование рельефа и развитие пигментации переменны, условно можно выделить 6 вариантов роста на этой среде (Рисунок 9):

- Бархатистые колонии с ровным рельефом и сильно выраженным конидиогенезом. Центр колонии слегка приподнят, иногда выделяется кольцевидной бороздой, включает рыхлый воздушный мицелий. Контур колонии ровные (Рисунок 9.I; Рисунок 10);
- Колонии 2-го типа напоминают предыдущий, но отличаются более широким поясом белого воздушного мицелия по периферии (Рисунок 9.II);
- Колонии с выраженным спороношением, более или менее отчетливо выделяющейся центральной зоной, неравномерно пигментированные. Контур колоний лучистый (Рисунок 9.III);
- Умеренно-быстро растущие колонии с четко очерченными ровными контурами и глубокими радиальными бороздами; центральная часть колонии более темная, периферическая — светлее (Рисунок 9.IV);
- Беспигментные колонии с редуцированным конидиогенезом и нерегулярно расположенными радиальными бороздами. Небольшие секторные участки с более выраженным спороношением и типичным темно-зеленым пигментом могут появляться только по периферии колоний, но у некоторых плеоморфных штаммов спороношение может вовсе отсутствовать (Рисунок 9.V);
- Колонии лишены пигментации на большом протяжении, она сохраняется только в центральной зоне, которая отделена глубокой кольцевидной бороздой (Рисунок 9.VI).

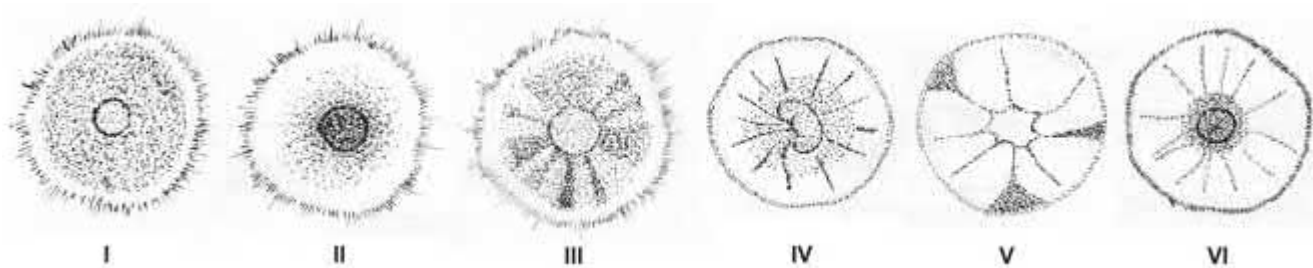


Рисунок 9 – Типология колоний *A. fumigatus* на среде Чапека с дрожжевым экстрактом

Примечание: римскими цифрами обозначены типы колоний

При сравнении морфологии штаммов *A. fumigatus* с различными вариантами роста установлено, что изученные штаммы не проявляют морфологического сходства с *A. fumisynnematus*, *A. pseudofelis* и *A. viridinutans*. Штаммы, формирующие колонии 5-го варианта (V) напоминают *A. felis*, *A. novofumigatus*, *A. parafelis* и *A. pseudoviridinutans*, а изоляты с колониями 6-го варианта (VI) схожи с *A. lentulus*, *A. fumigatiaffinis* и *A. udagawae*.

На средах с растительными углеводами (КМА, КГДА) колонии отличаются исключительно интенсивным спорообразованием; благодаря использованию этих сред иногда можно вызвать спорообразование у плеоморфных коллекционных штаммов. На среде КГДА рост быстрый, центр колонии формируется уплотненным темно-зеленым, а периферия — с синеватым оттенком и сетчатым выступающим над колонией воздушным мицелием. На картофельно-морковном агаре колонии отличаются менее плотным чем на других средах расположением конидиеносцев и, из-за этого, более «рыхлым» рисунком: плотность конидиеносцев и интенсивность окраски убывает от центра к периферии. На среде КМА в колониях возможно появление прозрачного экссудата в мелких каплях.

При росте на солодовом агаре колонии *A. fumigatus* зеленые с коричневым оттенком, у некоторых штаммов до светло бурых (из-за обильной продукции меланина). На агаре с бенгальским розовым рост умеренно быстрый, колонии с более выраженным зеленым оттенком, чем на солодовом агаре. Культуры на среде AFPA растут сравнительно медленнее, чем на других средах и на 7-е сутки распространяются ограничено. Молодые колонии зеленые с изумрудным оттенком с более интенсивной пигментацией в центре, на 7-е сутки более выражено проявляется вариации: у некоторых штаммов формируется белый фестончатый край, изрезанный радиальными бороздами, у других он образован стелющимся покровным мицелием, возможно формирование сетчатого рисунка из-за развития субстратного мицелия.

На классической среде Чапека колонии имеют рыжевато-дымчатый цвет, у некоторых штаммов — зеленоватый, на среде Чапека-Докса на лицевой стороне колоний проступает белый субстратный мицелий, спорообразование умеренное, проявляется появлением зеленой окраски равномерно по всей колонии или секторами. На всех средах обратная сторона колоний не имеет специфической окраски, только центр зрелых колоний у некоторых штаммов может быть слегка желтоватым или коричневатым. При длительном хранении штаммов в форме живой культуры в пробирке на картофельно-морковном агаре иногда появляется чернильно-синее окрашивание среды.

По классическим представлениям штаммы *A. fumigatus* не способны расти при +10°C, но растут при +50°C, однако, в работе удалось обнаружить штамм, способный к росту при обоих температурах (видовая принадлежность подтверждена путем ДНК-секвенирования локусов ITS и β -тубулина). Этот штамм выделили в посевах БАЛ от больного инвазивным аспергиллезом

легких наряду с типичным штаммом *A. fumigatus*. Штаммы в первичном посеве проявляли выраженное спорообразование, но несколько отличались пигментацией, а в пересеве атипичный штамм образовал белые колонии с зеленым центром. При определении чувствительности этих изолятов к амфотерицину В атипичный штамм оказался резистентным к этому препарату (МИК=4 мкг/мл), а второй штамм (с типичными для вида характеристиками) — чувствительным (МИК=1 мкг/мл). Атипичный штамм отличался медленным ростом на сусло-агаре. В повторных посевах от того же пациента получили еще 2 изолята, чувствительных к амфотерицину В. Родство полученных штаммов изучили методом иерархической кластеризации масс-спектров протеомов, снятых с помощью MALDI-TOF-MS, с расчетом дистанции по корреляционному методу и объединению по методу взвешенной средней связи. В результате оказалось, что амфотерицинчувствительные изоляты близкородственны и, вероятно, являются потомками одного штамма, а резистентный атипичный изолят, напротив, в полученном древе не близок с ними.

***Neosartorya hiratsukae*.** Культуру данного телеоморфного представителя секции *Fumigati* исследовали на картофельно-глюкозно-дрожжевом агаре, среде Чапека с дрожжевым экстрактом (Рисунок 10), среде Чапека-Докса, среде Сабуро в модификации Ч. Эммонса. На всех питательных средах исследованный штамм образовывал однотипные колонии: рост происходил умеренно быстро, колонии отличались белой окраской, при длительном хранении приобретали легкий кремово-желтоватый оттенок. Рельеф колоний образован глубокими радиальными бороздами, поверхность бархатистая, слой воздушного мицелия тонкий, реверзум не окрашен. Иногда замечен прозрачный экссудат в мелких и средних каплях.

***A. terreus*.** На обогащенных питательных средах колонии формируются умеренно быстро: достаточно дифференцированные по макро- и микроморфологическим свойствам колонии формируются на сроке инкубации не менее 5(4)-7 суток (при 30°-35° С), а наиболее яркая морфология колоний проявляется на 10-е – 12-е сутки. Наиболее интенсивное спорообразование и пигментация колоний у штаммов этого вида проявляется на среде Сабуро и сусло-агаре. На среде Сабуро типичные штаммы формируют колонии терракотового или кремово-коричневого цвета с ободком белого субстратного мицелия и ровными очертаниями. Рельеф колоний сформирован регулярными радиальными бороздами, центр чаще всего ограничен кольцевидной бороздой, иногда он кратеровидной формы. У некоторых штаммов колонии двуцветные: в центральной зоне спорообразование идет интенсивнее, чем в периферической или наоборот. Центральная часть может иметь звездчатую форму. Вблизи центра колонии могут формироваться мозговидные складки. Имеются штаммы с белыми колониями, схожими с *A. alabamensis* и *A. carneus*, но значительно превосходят их по скорости роста. У некоторых атипичных изолятов колонии могут быть желто-оранжевыми.

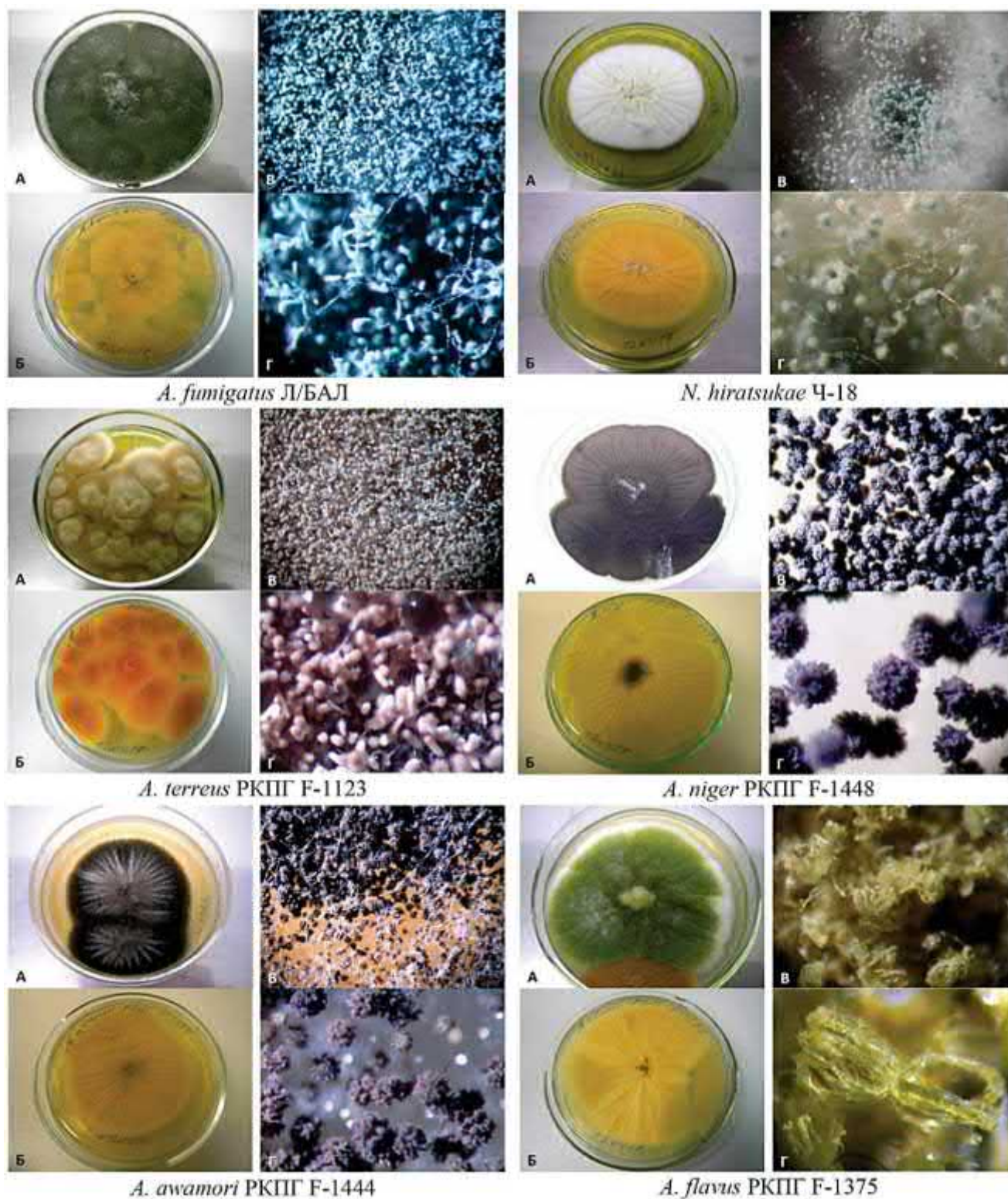


Рисунок 10 – Культуры *Aspergillus* spp. на среде Чапека с дрожжевым экстрактом

Примечание: инкубация при 30°C 4 суток; А - лицевая сторона; Б – обратная сторона; В, Г – стереомикроснимки поверхности колонии на среде КГДА (инкубация при 30°C 7 суток, стереомикроскоп Stemi 2000-C, Carl Zeiss Jena; увеличение: В – 10х, Г – х80)

Характерно образование темного диффундирующего пигмента, который окрашивает колонию под средой в темно-коричневый цвет. При продлении инкубации до 10 — 12 суток он окрашивает среду за пределами колонии. На поздних сроках инкубации наблюдается образование коричневого экссудата в мелких каплях.

На сусло-агаре образуются ровные бархатистые колонии с рыже-коричневыми и светлыми секторами. На среде YPD рост медленный, колонии белые, исчерчены радиальными бороздами, интенсивно образуется темно-коричневый диффундирующий пигмент.

При культивировании на агаре Чапека с дрожжевым экстрактом колонии интенсивно спороносящих изолятов приобретают более светлый, чем на среде Сабуро, оттенок коричневого (Рисунок 10). Рельеф колоний может быть сложным, образованным волнистыми складками, расположенными преимущественно в радиальном направлении, также образуется немного светло-коричневого экссудата. Продукция диффундирующего пигмента не выражена. Рост на средах с растительными углеводами (КМА, КГДА) сопровождается образованием бархатистых ровных колоний рыже-коричневого до темно-каштанового цвета и несколько напоминает картину роста на сусло-агаре. Центр колоний за счет воздушного мицелия несколько возвышен и имеет неправильную крестообразную или звездчатую форму. На этих двух средах также возможна «двойная» окраска колоний, которую можно наблюдать на среде Сабуро. На обоих средах также выражено образование диффундирующего коричневого пигмента.

На среде Чапека без добавок колонии растут медленно, рост ограниченный, спороношение развивается слабо. Колонии белые с неправильными очертаниями, экссудат формируется только в центре в виде немногочисленных почти прозрачных капель. Обратная сторона колоний имеет темно-кирпично-красный цвет, диффундирующий коричневый пигмент проявляется не у всех штаммов и возникает довольно поздно (15-е сутки инкубации).

A. niger, *A. tubingensis* и *A. awamori*. Штаммы этих видов из секции Nigri морфологически весьма сходны при культивировании на подавляющем большинстве питательных сред. Растут также быстро, как и *A. fumigatus*. На обогащенных средах типичные колонии растут неограниченно, состоят из субстратного мицелия, который окрашен в сочетание белых и лимонно-желтых оттенков, и воздушного мицелия, который у типичных штаммов представлен исключительно конидиеносцами, несущими с крупные радиальные головки. Из-за обилия конидиальных головок поверхность головок приобретает зернистую структуру. Рельеф колонии плоский или образован радиальными (редко концентрическими) бороздами (Рисунок 10). Сочетание концентрических и радиальных борозд на среде Чапека с дрожжевым экстрактом придает колонии вид «мишени». Чаще всего спороношение происходит очень быстро, придавая колониям угольно-черный цвет, но у некоторых штаммов в зрелых колониях может проступать бело-желтый субстратный мицелий, благодаря чему образуются многоцветные колонии.

Появление экссудата для данных видов не характерно: в работе его удалось только при культивировании *A. niger* на среде Чапека с дрожжевым экстрактом в колбе при комнатной температуре в течении нескольких недель (из культуры по всей поверхности выступили мелкие прозрачные капли). Также обнаружили необычный изолят *A. niger*, который образовал на среде Сабуро в примакультуре крупные капли мазутно-черного экссудата, однако, при последующих пересевах он утратил это свойство. Формирование такого же экссудата мы наблюдали у *A. tubingensis*, но это свойство в культурах проявляется эпизодически.

На среде YPD субстратный мицелий формируется рано, а спорообразование сильно запаздывает: конидиеносцы появляются только при продлении инкубации до 7-10 суток при комнатной температуре. На солодовом агаре колонии имеют золотистый оттенок. На солодовом агаре колонии имеют некоторый золотистый оттенок. На среде КМА и агаре Чапека и Чапека-Докса субстратный мицелий довольно рыхлый, конидиеносцы располагаются более разреженно, чем на средах с включением источников аминоксилот. На среде Чапека-Докса может проявляться зональность колоний. У *A. awamori* на среде Чапека колонии отличаются шоколадно-коричневыми конидиальными головками, но это свойственно не всем штаммам, некоторые образуют такие же колонии, как *A. niger*. Обратная сторона колоний у данных видов не окрашена. У коллекционных изолятов на среде Сабуро, КГДА и сусло-агаре в центре колонии появляется белый или светло-серый воздушный мицелий, обволакивающий конидиеносцы. Это свойство проявляется у *A. niger*, *A. awamori* и условного геновида *A. niger/awamori*.

Своеобразные колонии образуются у данных видов на среде с бенгальским розовым — они резко отличаются от колоний на всех остальных средах. Типичные штаммы растут медленно — на 3-и сутки колонии достигают не более 1,5-2 см в диаметре. Колонии бархатистые с интенсивным спороношением. Центр колоний зеленый, а периферическая часть — желтая. Обнаружен также атипичный штамм геновида *A. niger/awamori* (РКПГ F-1446), который при посеве на среду с бенгальским розовым проявляет длительный период покоя (5-7 суток), а затем образует белые куполообразные колонии с высоким воздушным мицелием, которые затем формируют уплощенные кольца по периферии. Спорношение у данного изолята наблюдается менее чем на половине окружности колонии. Ни у одного из исследованных штаммов не обнаружили продукции склероциев. В целом, морфологические свойства этих трех видов не позволяют надежно различать их между собой.

***A. flavus* и *A. oryzae*.** Быстрорастущие виды, на богатых средах годные для идентификации колонии обычно формируются на 2-3 сутки при 30°-35°С. Рост неограниченный. Виды отличаются обильным спороношением, стерильные изоляты в данной работе обнаружить не удалось. Типичные колонии имеют ровную бархатистую поверхность. Окраска колоний травянисто-зеленая (агар Сабуро, сусло-агар, КГДА, КМА, среда Чапека с

дрожжевым экстрактом, агар Чапека-Докса; Рисунок 10) или желтая (солодовый агар, агар с бенгальским розовым, среда Чапека). Возможна комбинация этих двух окрасок у некоторых штаммов на среде Сабуро. На агаре Киммига наблюдается наиболее темное окрашивание. Субстратный мицелий на большинстве сред белый.

По-разному проявляется у изолятов *A. flavus* формирование воздушного мицелия, в обильно спороносящих колониях на богатых средах он может быть зеленым или белым с очень характерным «изъеденным» рисунком. У большинства «классических» штаммов в примакультуре воздушный мицелий представлен преимущественно конидиеносцами. При пересеве музейных культур на среде Сабуро может образовываться высокий белый воздушный мицелий, придавая колонии приподнятый вид. Колония может быть окружена ободком белого воздушного или субстратного мицелия.

A. oryzae при росте на сусло-агаре отличается образованием колоний войлочной консистенции, колонии этого вида на среде Сабуро не имеют специфических черт, а на КМА отличаются более яркой пигментацией, чем у *A. flavus*. Колонии штаммов *A. oryzae* показаны на рисунке 11.

Как правило, спороношение происходит синхронно с распространением колонии, но иногда субстратный мицелий вырастает быстрее, а затем пигментация и конидиогенез распространяется из центра и с края колонии (на бедных средах — агаре Чапека, Чапека-Докса, КМА — только из центра). На среде Чапека-Докса интенсивное спороношение видно только в центральной зоне, а в периферийной части колонии конидиеносцы сильно разрежены. Обратная сторона колоний на большинстве сред не окрашена, рельеф образован радиальными бороздами, центр может быть выделен кольцевой бороздой. На среде Чапека с дрожжевым экстрактом рельеф образован также повторяющимися концентрическими бороздами. На сусло-агаре, КМА, агаре Чапека и Чапека-Докса радиальных борозд нет. На картофельно-морковном агаре, КГДА и иногда на среде Чапека с дрожжевым экстрактом в колониях может проявляться зональность.

Некоторые штаммы *A. flavus* и *A. oryzae* на среде Сабуро, КГДА и среде Чапека с дрожжевым экстрактом образуют черные склеротии очень высокой плотности. Как правило, вокруг склеротиев просматривается белый субстратный мицелий. Этот признак не стоек, спонтанно появляется и исчезает без определенной закономерности. Экссудат представители данных видов не образуют. На среде АФРА морфология колоний довольно своеобразна и контрастно отличается от картины роста на других средах. Рельеф колонии складчатый, но спорообразование отсутствует. На обратной стороне колоний происходит цветная реакция — реверзум становится ярко-оранжевым. На 7-е сутки инкубации цветное окрашивание распространяется за пределы колонии.

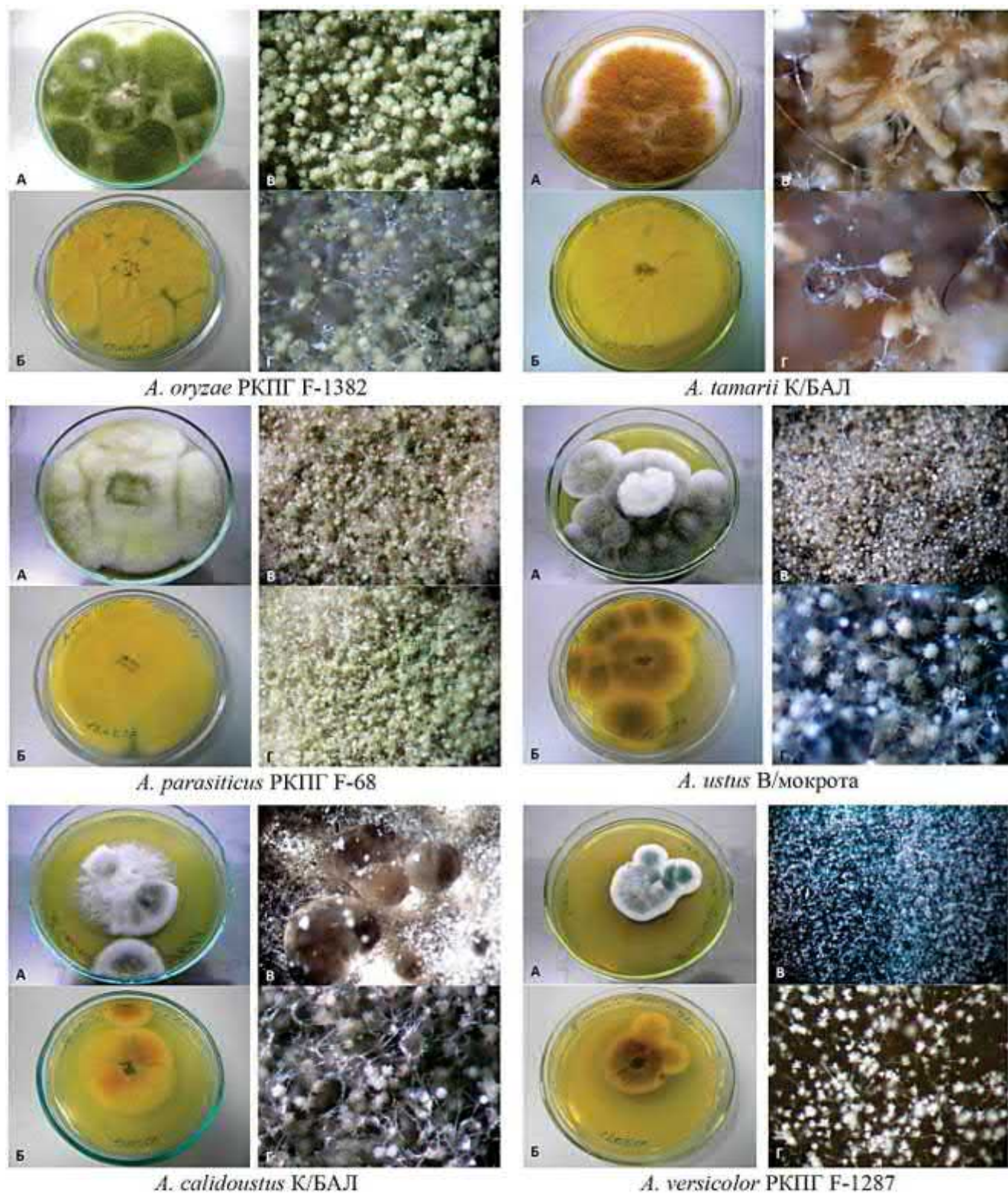


Рисунок 11 – Культуры *Aspergillus* spp. на среде Чапека с дрожжевым экстрактом

Примечание: инкубация при 30°C 4 суток; А - лицевая сторона; Б – оборотная сторона; В, Г – стереомикроснимки поверхности колонии на среде КГДА (инкубация при 30°C 7 суток, стереомикроскоп Stemi 2000-C, Carl Zeiss Jena; увеличение: В – 10х, Г – х80)

A. tamarii. Ростовые характеристики этого вида аналогичны *A. flavus* и *A. oryzae*, но пигментация колоний отличается — она оранжево-коричневая до чайно-коричневой (Рисунок 11). На среде Сабура, агаре Чапека с дрожжевым экстрактом, КГДА колонии бархатистые, плоские, окруженные узким белым ободком. Спорообразование интенсивное. Высокого воздушного мицелия у обследованных штаммов не наблюдали, но у большинства штаммов проявляется хлопьевидный, «изъеденный» рисунок.

Не вполне понятна видовая принадлежность штамма «*A. flavus*» РКПГ F-1511 (по данным ДНК-секвенирования локуса β -тубулина) — его колонии отличаются более светлой, чем у *A. tamarii* коричневатой окраской на тех же средах. На среде Сабура в одном из пересевов он образовал высокий воздушный мицелий в центральной зоне и по краю колонии, как у некоторых штаммов *A. flavus*. По-видимому, этот штамм представляет собой переходный вариант между *A. flavus* и *A. tamarii*.

A. parasiticus. Единственный штамм, поступивший для изучения, оказался подверженным плеоморфным изменениям, на большинстве сред довольно быстро образовывал складчатый субстратный мицелий либо высокий пушистый воздушный мицелий (Рисунок 11), который в некоторых областях колонии покрывали очень редкие зеленоватые конидиеносцы. Наиболее интенсивное спороношение происходит на среде КГДА.

A. ustus и *A. calidoustus*. Колонии представителей данных видов, полученные на среде Чапека с дрожжевым экстрактом, показаны на рисунке 11. Штаммы растут умеренно-быстро, зрелые колонии формируются на 5-7 сутки при 30°-35°С, но спорообразование развивается с разной интенсивностью у разных штаммов и может проявляться слабо. В примаккультуре на среде Сабура колонии *A. ustus* грязно-серого цвета с темно-зеленым и коричневым оттенком, приподнятые, войлочной консистенции, выделяют коричневый диффундирующий пигмент. У *A. calidiustus* колонии напротив, белые, слегка приподнятые в центре, образуют зеленовато-желтый диффундирующий пигмент и, иногда, единичные капли желтоватого экссудата. При субкультивировании музейных культур на той же среде или КГДА характерные особенности колоний исчезают: оба вида формируют плоские распространенные колонии с серой окраской, окруженные поясом белого мицелия. Рельеф образован сочетанием радиальных и концентрических борозд. Образование диффундирующего пигмента может быть не отчетливым вплоть до полного отсутствия пигментации реверзума. Возможно образованием плеоморфных колоний с приподнятой белой центральной частью и плоской пленчатой периферией.

При пересеве примаккультур двух видов на среду Чапека с дрожжевым экстрактом различия видов проявляются ярко. *A. ustus* вначале образует распространенные радиально-складчатые колонии лимонно-желтого цвета, в которых появляются многочисленные крупные капли светло-желтого экссудата. В центре колоний формируется сложный сетчатый рисунок. С

периферии колония затем становится бархатистой, темно-серо-коричневой (из-за развития спор). Экссудат подсыхает, на месте крупных капель образуются округлые скопления вторичного воздушного мицелия. Реверзум окрашивается темно-коричневым диффундирующим пигментом. Исключительно интенсивная продукция экссудата происходит при культивировании на той же питательной среде в колбе. При этом колонию образуют концентрические пояса белосероватого воздушного мицелия, только после подсыхания экссудата на 17-20 сутки развивается спорообразование и колония приобретает серый цвет. На месте высохшего экссудата образуются округлые выемки, так, что колония приобретает «ноздреватую» текстуру.

A. calidiustus на среде Чапека с дрожжевым экстрактом образует бархатистые колонии с ровной поверхностью и светло-серой окраской, преимущественно в центральной части образуются разновеликие капли янтарно-оранжевого экссудата, колонии также продуцируют желтовато-зеленоватый диффундирующий пигмент. На КМА этот вид образует плоские бархатистые колонии темно-зеленого цвета с нечеткими очертаниями, спорообразование у них развито преимущественно в центральной зоне.

Штаммы обоих видов теряют специфичные свойства при музейном хранении, быстрее всего исчезает продукция экссудата. Слабый и медленный пленчатый рост штаммов обоих видов происходит на среде YPD, после пассажа на этой среде морфология восстанавливается только через 2-3 пересева.

A. sydowii и *A. versicolor*. Среди прочих перечисленных видов у данного рост сравнительно медленный, годные для идентификации колонии на богатых средах формируются на при 30°C 7-10 сутки. Молодые колонии представителей этих видов показаны на рисунках 11 и 12. Колонии бархатистые, плоские, зелено-сине-бирюзовые, окруженные ободком белого мицелия. Пигментация колоний на среде Сабуро, сусло-агаре, КГДА и КМА сходная (на последней среде рост ограниченный). Рельеф образован радиальными складками, край колонии ровный или немного фестончатый.

Для музейных штаммов характерным свойством является то, что на агаре Сабуро наиболее интенсивно окраска проявляется в поясе на периферии, а центральная часть окрашена более светло. При длительной инкубации колонии могут приобретать бурый оттенок. Образуется диффундирующий красно-коричневый пигмент, наиболее интенсивно окрашивающий агар под колонией в центральной части. На среде Чапека пигмент темно-красного цвета, колонии растут ограниченно и слабо окрашиваются, могут покрываться каплями желтоватого экссудата.

На среде YPD колонии бархатистые, кремово-коричневые немногочисленными каплями экссудата кофейного цвета, продуцируют темно-коричневый диффундирующий пигмент, но встречаются штаммы с плоскими стерильными белыми колониями.

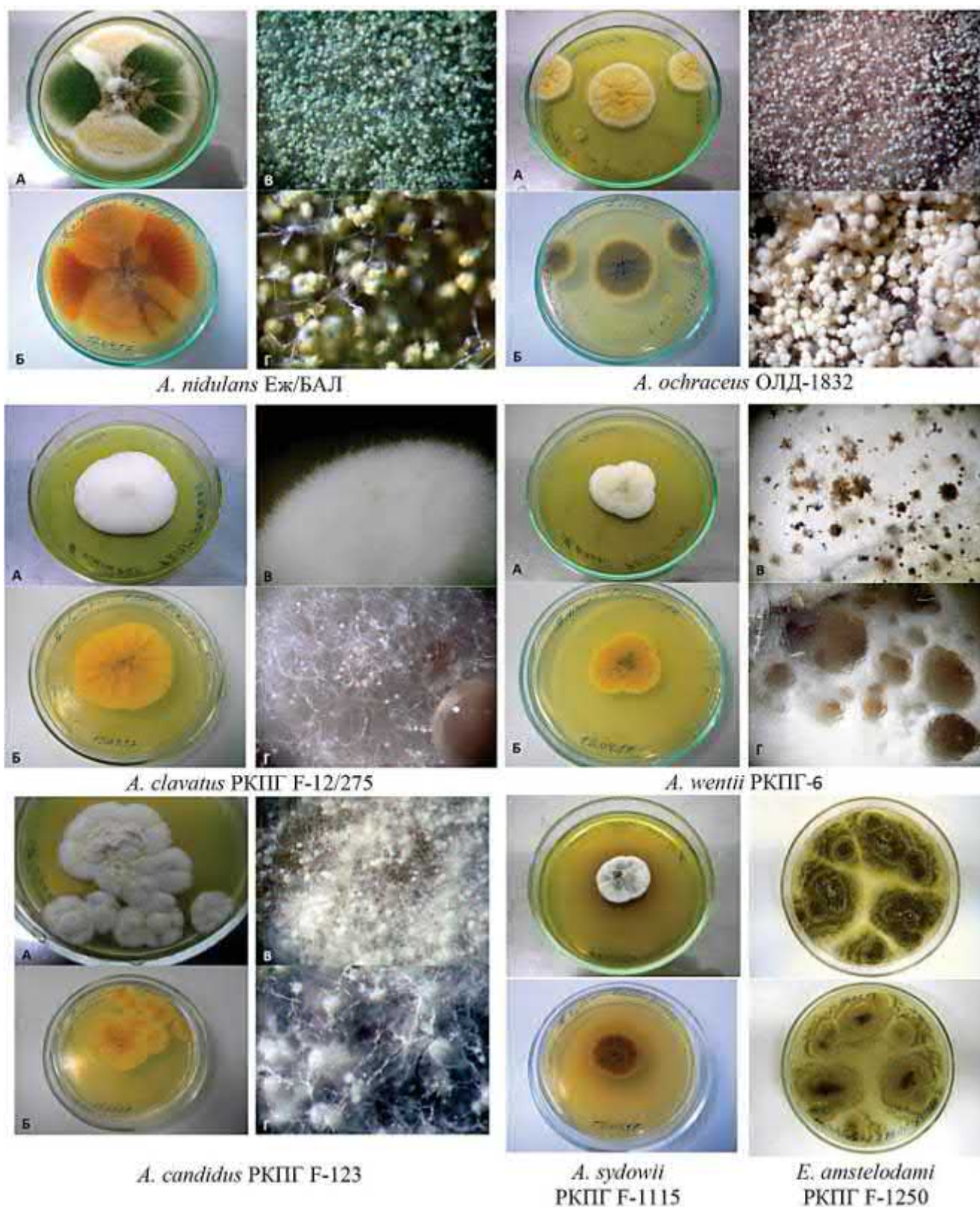


Рисунок 12 – Культуры *Aspergillus* spp. на среде Чапека с дрожжевым экстрактом (для *E. amstelodami* – среда Чапека-Докса)

Примечание: инкубация при 30°C 4 суток; А - лицевая сторона; Б – оборотная сторона; В, Г – стереомикроснимки поверхности колонии на среде КГДА (инкубация при 30°C 7 суток, стереомикроскоп Stemi 2000-C, Carl Zeiss Jena; увеличение: В – 10х, Г - х80)

Наиболее интенсивную окраску, спорообразование и продукцию диффундирующего пигмента можно наблюдать на КГДА; на этой среде рост и развитие типичных признаков происходит быстрее, чем на агаре Сабуро.

***A. nidulans*.** Скорость роста и развития типичных для вида признаков на богатых средах различаются в зависимости от состава среды. Рост умеренно-быстрый. На среде Сабуро колонии бархатистые, кремовые, иногда с зеленоватыми оттенками, их рельеф образован несколько извилистыми радиальными бороздами, центр в месте посева может быть приподнятым или вдавленным, реверзум окрашен диффундирующим коричневым пигментом. Крупные колонии, занимающие всю поверхность агара, при посеве трехточечным методом и инкубации при 30°C вырастают на 10-12 сутки. Сходные колонии образуются на среде YPD.

Признаки, свойственные виду, наиболее отчетливо развиваются на среде Чапека с дрожжевым экстрактом (Рисунок 12) или КГДА.

Колонии формируются бархатистыми, ограниченными с сероватым оттенком. В центре воздушный мицелий приподнят, на вершине характерно возникновение белого «хохолка», от которого вторичный воздушный мицелий при продлении инкубации распространяется на другие участки колонии. Со временем за счет спорообразования колонии приобретают яркий малахитово-зеленый цвет и желтые точечные вкрапления, формирующие концентрические пояса (продукция клейстотециев). При неоднократных пассажах на средах с дрожжевым экстрактом бесполое спороношение может почти редуцироваться, превалирует продукция клейстотециев. В таких колониях поверхность имеет светло-желтый цвет. Колонии на данных средах также имеют темно-коричневый реверзум. Если на среде Чапека с дрожжевым экстрактом или картофельном агаре *A. nidulans* выращивать в колбе, то можно получить экссудат коричневатого-красного цвета, образующийся в центральной части в разновеликих каплях.

На рисунке 12 обращает на себя внимание различие текстуры и пигментации отдельных секторов колонии, обусловленное секторальной изменчивости. Центральная зона колонии тускло-красноватым оттенком отличается интенсивным образованием клейстотециев. На классической среде Чапека *A. nidulans* образует белые бархатистые ровные колонии, при длительной инкубации продуцирующие тускло-красный диффундирующий пигмент.

***A. ochraceus*.** Штаммы этого вида растут умеренно-быстро, зрелые колонии при 30°C формируются на 5-7 сутки (Рисунок 12). Типичные колонии на среде Сабуро, агаре Киммига, солодовом агаре, КГДА, среде Чапека с дрожжевым экстрактом имеют бархатисто-зернистую поверхность из-за крупных конидиальных головок, цвет колоний охристо-желтый. Обратная сторона светло-желтоватая, рельеф образован многочисленными радиальными бороздами. В колониях музейных штаммов, подвергнутых длительному хранению, спорообразование

происходит преимущественно в центральной зоне. При культивировании в пробирке конидиеносцы быстрее появляются на высоте скоса. На среде YPD колонии белые, складчатые, конидиеносцы удается найти редко.

A. clavatus. Изучен плеоморфный штамм, образующий на большинстве сред распространенные белые бархатистые колонии, которые могут быть куполообразно приподнятыми (например, на среде Сабуро), плоскими (на овсяном агаре) или складчатыми из-за глубоких радиальных борозд, с возвышением в центре (на среде Чапека с дрожжевым экстрактом – Рисунок 12). Единичные конидиеносцы с темно-серыми головками образуются только при длительной инкубации в пробирке на высоте подсыхающего скоса агара.

A. candidus. Колонии схожи на различных питательных средах, ограниченно растущие, формируются на 7-10 сутки инкубации при 30°C (диаметром до 2-2,5 см). Даже при нормальном спорообразовании колонии белого цвета, со временем приобретают едва заметный золотистый оттенок, форма варьирует от ровной куполообразно-приподнятой до неправильной с рыхлым воздушным мицелием, у некоторых штаммов поверхность колонии слегка зернистая – при развитии крупных конидиальных головок (Рисунок 12).

A. wentii. Единственный изолят данного вида, поступивший в рабочую коллекцию, в силу длительного музейного хранения проявляет в основном атипичные свойства. В результате длительных пассажей в течение 2 лет на среде Сабуро, приготовленной на основе панкреатического гидролизата каспийской кильки с добавлением поваренной соли, удалось получить рост с хорошо выраженным спороношением (Рисунок 13.Б). По-видимому, данная реакция штамма оказалась обусловленной ранее известными галофильными свойствами вида *A. wentii*. На других питательных средах колонии, напротив, оказались белыми, ровными, складчатыми (Рисунок 12). При культивировании в пробирке на среде Сабуро, солодовом агаре, среде Чапека с дрожжевым экстрактом, КГДА колонии приподнятые, белые, образуют крупные капли прозрачного экссудата. На подсыхающей вершине скоса агара формируется масса рыхлого ватообразного белого воздушного мицелия, внутри которого появляются светло-коричневые вкрапления конидиальных головок. Спорообразование (если проявляется) возникает на 12-15 сутки инкубации при 20°-25° С. Поддерживает спорообразование и пигментацию сахароза, мальтоза и маннит, а в присутствии лактозы конидиогенез происходит очень слабо.

A. hollandicus, A. glaucus, A. reptans. *A. hollandicus* (*E. amstelodami*) в молодых культурах колонии формируются ограниченно и на 5-7 сутки инкубации при 30°C не превышают 2,5 см. Если инкубацию продлить до 20-25 суток, можно получить гигантские колонии, занимающие всю поверхность чашки. На среде Сабуро, КГДА, среде Чапека с дрожжевым экстрактом колонии темно-зеленые с коричнево-зелеными оттенками, уплощенные, но из-за образования

клеистотециев в кластерах поверхность приобретает бородавчатую текстуру, особенно по краям колонии. На периферии возможно формирование валика из белого воздушного мицелия. Очертания колоний неровные, внутренний рельеф образован радиальными складками. На среде YPD рост происходит медленнее, колонии отличаются более высоким валиком воздушного мицелия по краю, коричневой окраской и образованием очень крупных желтых зернистых кластеров клеистотециев на периферии, некоторые кластеры могут подниматься до крышки чашки.

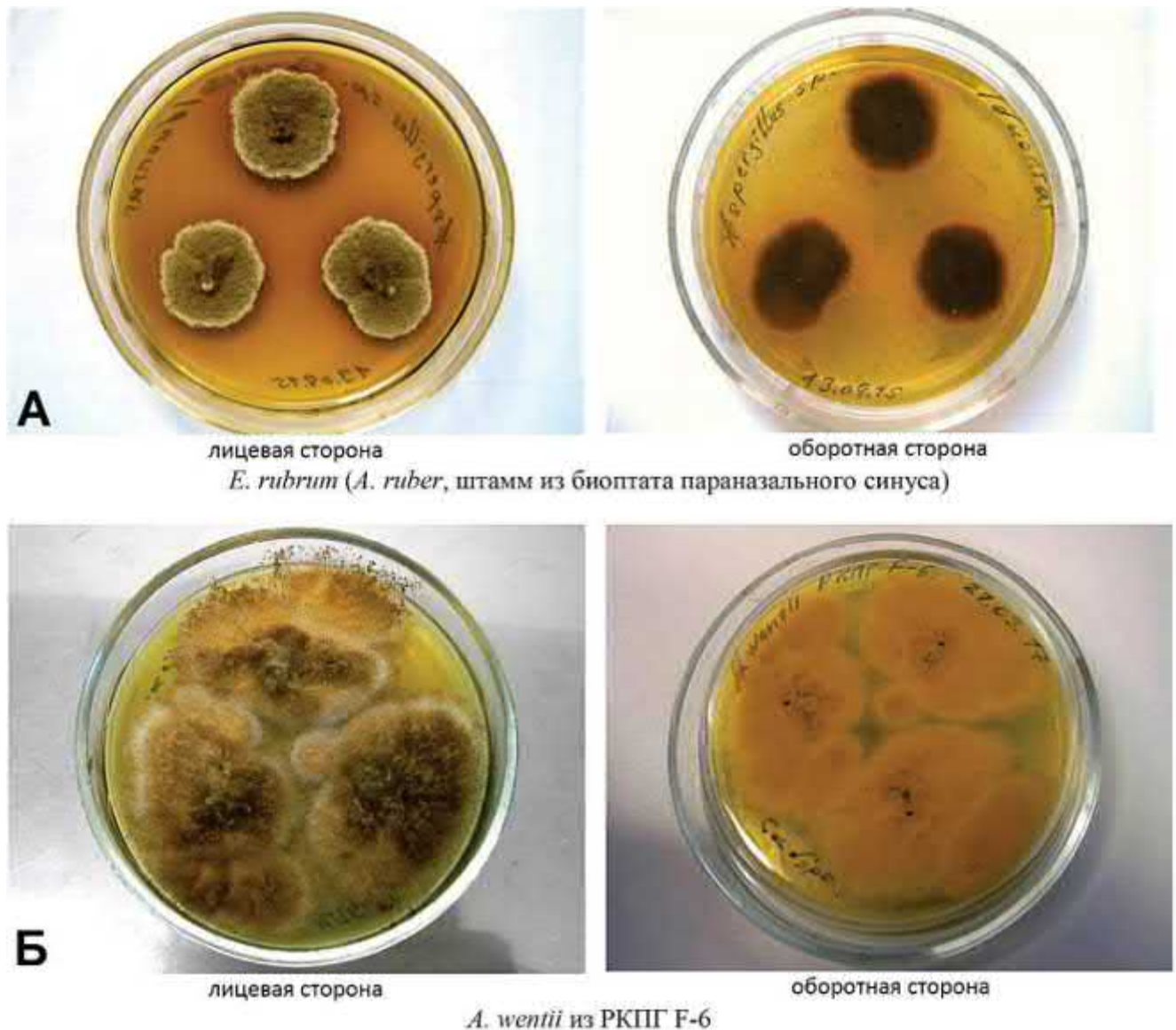


Рисунок 13 – Культуры редких в медицинской практике *Aspergillus* spp. на среде Сабуро

Примечание: А – штамм *E. rubrum* инкубировали при 25°C 30 суток; Б – штамм *A. wentii* (на модифицированной среде) инкубировали при 25°C 15 суток

На среде Чапека-Докса колонии мелкие, до 1-1,3 см, коричнево-зеленые, возвышенные, бородавчатые. Обратная сторона колоний на среде Сабуро и агаре Чапека с дрожжевым

экстрактом светло-коричневая, на среде YPD – темно коричневая, на среде Чапека-Докса — бесцветная (Рисунок 12). *A. glaucus* (*E. herbariorum*) на среде Сабуро образовывал приподнятые колонии 1,5 см в диаметре, притом, у обследуемого изолята они подразделялись на 2 типа: (1) округлые с темно-зеленым краем и серо-белым неровным воздушным мицелием в центре и (2) округлые с бело-зеленой окраской, беловатым округлым приподнятым центром и желтым краем (продукция клейстотециев). При попытке выделить селективно 2 этих колониальных варианта оказалось, что во вторичных культурах они вновь диссоциируют.

A. reptans (*E. repens*) отличается от вышеназванных видов исключительно медленным ростом: годные для изучения колонии формируются только спустя 20 суток инкубации при 25°C, при 30°C изученный изолят не рос. На агаре Сабуро колонии тускло-зеленые, диаметром 1,5-2 см, с неровно очерченными краями, бархатистые, плоские. На КГДА и среде Чапека с дрожжевым экстрактом колонии отличались более светлым оттенком зеленого в окраске и радиальной складчатостью.

A. ruber (*E. rubrum*) – другой медленно растущий психрофильный вид данной секции. Изученный штамм оказался неспособным к росту ни при 37°, ни при 30° С. На питательных средах с нормальным содержанием углеводов его рост при комнатной температуре происходит исключительно медленно с образованием бугристых коричнево-бурых колоний, пример таких колоний показан на рисунке 13А.

В-целом для всех представителей данной секции оптимальной средой является модифицированный агар Чапека с дрожжевым экстрактом и 20% сахарозы. Колонии у изученных штаммов формируются на этой среде распространенными, у большинства представителей имеют различные оттенки зеленого (у *A. hollandicus* – малахитово-зеленый, у *A. reptans* – светло зеленый), а у *A. ruber* приобретают багрово-красный оттенок.

Заключение о культуральных свойствах изученных штаммов *Aspergillus* spp. Проведено развернутое культурально-морфологическое исследование, позволившее актуализировать данные о свойствах колоний условно-патогенных *Aspergillus* spp. (Таблица 11). В результате исследования выявили следующие типы рельефа колоний: равномерный (54,3%); со множественными радиальными складками (22,1%); с немногочисленными радиальными складками (15,2%); мишеневидный (8,4%). Тип рельефа не оказался специфичным видовым признаком, однако, мишеневидные колонии с радиальными и кольцевыми складками чаще наблюдали у *A. niger*. Текстура колонии аспергиллов обычно была бархатистой (81%), реже пушисто-войлочной (6,6%), гранулярной (4,3%, у видов с крупными конидиальными головками – *A. niger*, *A. awamori*, *A. ochraceus*, *A. oryzae*), также смешанного характера (6,6%), наиболее редко видели пленчатые колонии (1,5% - дегенеративные варианты *A. ustus* и *A. calidoustus*). Край колонии чаще ровный (90,5%), иногда нерегулярно-фестончатый (9,5%). У некоторых

штаммов наблюдали образование плеоморфного мицелия (8,6%) и секторальную изменчивость колоний (5,2%).

Выявили следующие необычные пигменты у отдельных видов аспергиллов. *A. fumigatus*: коричневый реверзум на AFPA, чернильно-синий диффундирующий пигмент на КМА (в пробирке). *A. niger* и *A. awamori*: зеленый на среде с бенгальским розовым, черный экссудат на агаре Сабуро в присутствии других микромицетов. *A. nidulans*: коричневый на YPD, белый на агаре с бенгальским розовым. *A. calidoustus*: белый на агаре Сабуро, тускло-зеленый на КМА, тускло-желтый на КГДА. *A. versicolor*: кремово-коричневый на YPD. *E. amstelodami*: коричнево-желто-белый на YPD. *A. terreus*: желто-оранжевый пигмент на различных средах. *A. ochraceus*: темно-красный диффундирующий пигмент (на разных средах). *A. candidus*: кремово-коричневый на КГДА при длительной инкубации.

В целом, характеризуя пригодность различных питательных сред для культивирования *Aspergillus* spp. – основных возбудителей инфекций человека, следует заметить, что данные грибы хорошо адаптируются при обычных концентрациях сахаров, кроме представителей секции *Aspergillus* – телеоморфного рода *Eurotium*, для которых наиболее пригодны гиперосмотические среды – среда Чапека с дрожжевым экстрактом и 20% сахарозы и агар YPD, примененный нами для данных грибов впервые.

Для прочих представителей рода, включая редкие и криптические виды возбудителей, можно заключить, что наиболее типичные для идентификации свойства, включая продукцию пигментов, проявляются на среде Чапека с дрожжевым экстрактом, солодовом агаре и среде КГДА. Последняя среда является продуктом внутрилабораторного изготовления и не отличается стандартностью композиции, солодовый агар поставлен на промышленное производство, однако, существует множество коммерческих марок этой среды, различающихся по составу. Последнее обстоятельство затрудняет получение воспроизводимых результатов между лабораториями. В противоположность первым двум среда Чапека с дрожжевым экстрактом отличается стандартным составом, который легко воспроизводится как при кустарном (внутрилабораторной), так и при промышленном изготовлении. Тем не менее, для демонстрации культуральных свойств аспергиллов в учебных целях возможен дифференциальный выбор питательных сред, представленный нами в разделе «практические рекомендации». Наряду с обобщающими характеристиками, подробно изложенными в данном разделе, у *Aspergillus* spp. наблюдали штаммовые вариации в макроскопическом строении колонии, которые проявлялись, главным образом, в различиях пространственного распределения зон, в которых сосредоточены конидиеносцы, а также в интенсивности спорообразования.

2.2 Особенности микроморфологии *Aspergillus spp.*

Результаты светового микроскопического исследования культур изученных штаммов *Aspergillus spp.* представлены на рисунках 14, 15 и 16.

A. fumigatus (Рисунок 14). Конидиеносцы не окрашены, с гладкими стенками, как правило, несколько увеличиваются в диаметре в направлении терминального расширения. Клетка-ножка имеет крупные отростки, но, как правило, в препаратах ее не удастся наблюдать из-за плотной связи с субстратным мицелием колонии. Конидиеносцы венчает колбовидное (грушевидное) терминальное расширение, покрытое одним рядом стеригм на протяжении проксимальных 2/3 поверхности. Стеригмы обращены вверх, обычно окрашены в темно-зеленый, серо-зеленый, сине-зеленый или бурый цвет.

При определенной фокусировке можно увидеть места их прикрепления на терминальном расширении в форме ячеистого рисунка. На стеригмах образуются цепочки гладких сферических зеленых конидий, более темных в завершении головки. Головка столбчатая, короче, чем у *A. terreus*, имеет вид очень широкой кисти. На агаре Чапека и Чапека-Докса конидиеносцы отличаются сравнительно меньшими размерами, стеригмы не окрашены, пигментация конидий не отчетливо заметна. Встречаются конидиеносцы с малыми конидиальными головками, которые тем не менее способны к спороношению (Рисунок 15: 1). Место перехода конидиеносца в терминальное расширение может иметь разную крутизну контура; возможны различия в общем контуре колонки, создаваемом цепочками конидий. Встречаются головки с недоразвитыми стеригмами, без спороношения, Клетка-ножка может иметь причудливые контуры, нитевидные придаточные отростки.

N. hiratsukae. Данный вид образует конидиеносцы, сходные по строению с *A. fumigatus*, но отличающиеся более широким переходом конидиеносца в терминальное расширение и более короткими стеригмами. В культуре, особенно на среде Сабуро, среде Чапека с дрожжевым экстрактом, конидиеносцы формируются значительно более разреженно, чем у *A. fumigatus*. При пересевах на указанных средах конидиальное спорообразование быстро редуцируется, но обильно формируются клейстотеции. Клейстотеции у этого вида не покрыты клетками Хюлле, полупрозрачные. Все элементы строения не окрашены, только клейстотеции имеют легкий светло-коричневый оттенок (Рисунок 14). Конидиальное спороношение лучше проявляется на средах с растительными компонентами, например - картофельно-глюкозно-дрожжевом агаре.

A. niger, A. tubingensis, A. awamori. Данные виды образуют сходные по строению органы бесполого размножения. Конидиеносцы сравнительно длинные, могут достигать иногда 3-4 мм на среде Сабуро, сусло-агаре, КГДА, на средах сравнительно бедного состава обычно короче (КМА, агар Чапека).

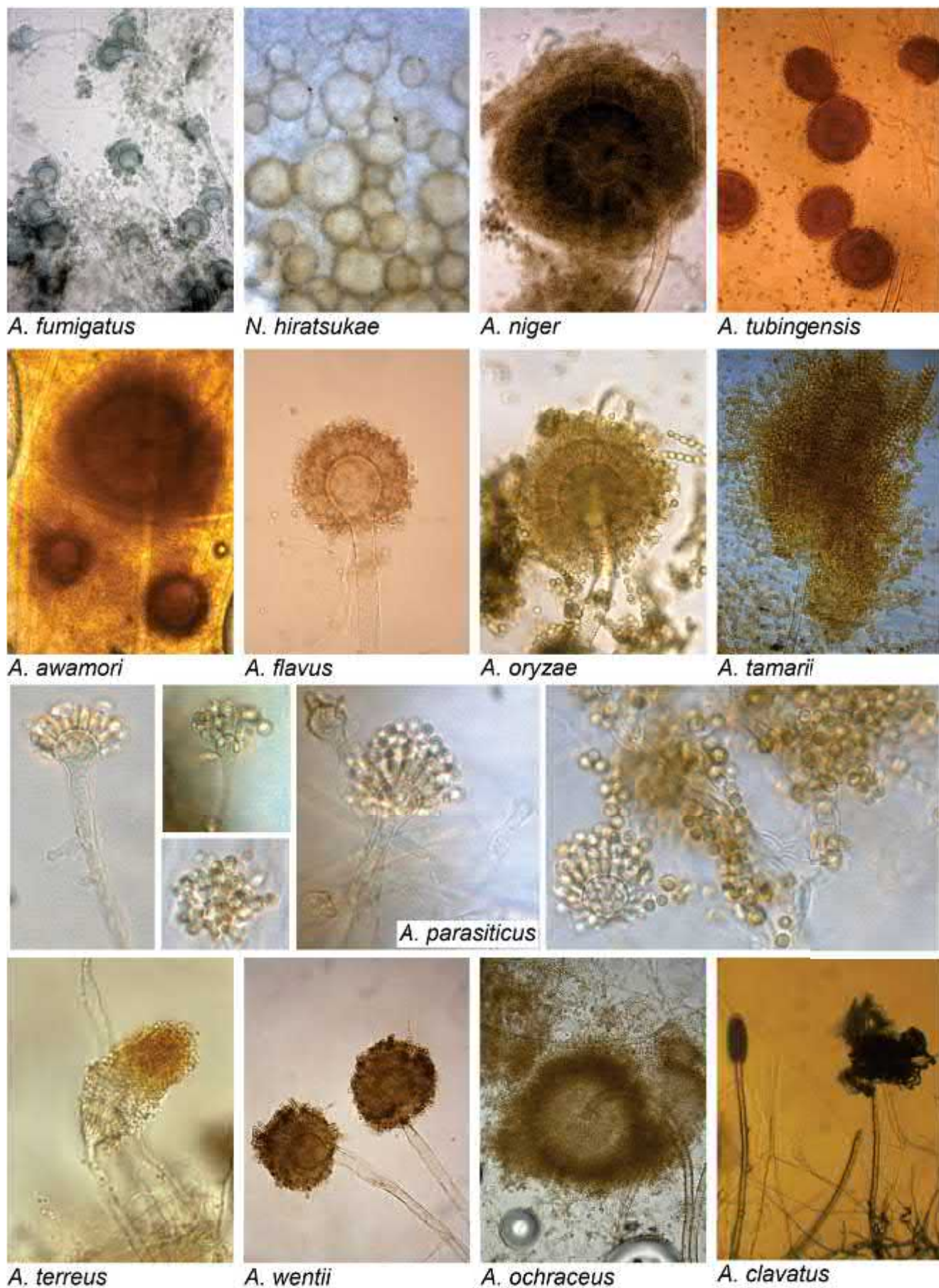


Рисунок 14 — Конидиеносцы условно-патогенных *Aspergillus* spp. (микроскоп Leica DM LB2, диапазон увеличений: 200х - 400х)

Клетка-ножка может иметь 2 близких по длине отростка или быть ассиметричной (в форме стопы), часто сохраняет связь с образовавшим ее субстратным мицелием.

Конидиеносцы прямые, с неокрашенными гладкими стенками, часто не имеют септ. Конидиеносец оканчивается сферическим терминальным расширением, которое очень плотно покрыто стеригмами в 2 ряда (на подобие фасеточного глаза насекомого). В зрелых головках границу между рядами стеригм проследить сложно. На среде Сабуро, сусло-агаре, КГДА, КМА внутреннюю структуру головок можно увидеть только в молодых культурах (2-3 суток). В более зрелых головках на данных средах терминальное расширение и стеригмы не видны – головка плотно покрыта конидиями. В таких культурах детали строения головки удавалось различить только в препаратах колонии, сделанные с помощью липкой ленты под давлением. На среде Чапека, Чапек-Докса, Чапека с дрожжевым экстрактом, агаре с бенгальским розовым строение головок можно увидеть даже в зрелых культурах (5-7 суток). Головки радиального типа, с возрастом на агаровых блоках расщепляются на колонки. Терминальное расширение, стеригмы и молодые конидии темно-коричнево-черного оттенка. Конидии сферические, бугристые. Некоторые изоляты *A. awamori* отличались от *A. niger* и *A. tubingensis* (Рисунок 14) более светлой и равномерной окраской головок.

На КМА в культурах *A. niger* возможно выделение щавелевой кислоты, которая видна в микропрепаратах в форме кристаллических оксалатов.

A. flavus, *A. oryzae*, *A. tamarii*, *A. parasiticus*. При микроскопии культур этих видов обращает внимание развитый, ветвистый и извилистый субстратный мицелий, часто вакуолизированный в стареющих культурах. Конидиеносцы с толстыми мелкошиповатыми стенками, не окрашены, имеют множество септ. Клетка-ножка не прослеживается. Терминальное расширение близко по форме к сферическому, оно покрыто у стеригмами по всей поверхности, но несколько открывая конидиеносец у *A. flavus* и *A. tamari* (у *A. oryzae*, *A. niger* и *A. ochraceus* стеригмы и цепочки конидий плотно прилегают к конидиеносцу). Стеригмы образуются у *A. oryzae* и *A. tamarii* в два ряда, у *A. flavus* в различных типах головок в один или два ряда, у *A. parasiticus* – только в один ряд (Рисунок 14). Стеригмы первого ряда сравнительно крупные, у *A. flavus* и *A. tamari* округлые, а у *A. oryzae* – характерно вытянутые, крупные, плотно прилегающие. Стеригмы второго ряда у всех видов имеют форму кувшина. Конидии сферические, гладкие. Исследованные штаммы чаще образовывали головки радиального типа, но у штаммов *A. flavus* на КМА и агаризванной среде RPMI 1640 формируются свободно-столбчатые головки (*A. flavus* var. *columnaris*; Рисунок 15: 10). У *A. flavus* стеригмы желтоватые, терминальное расширение не окрашено, конидии зеленовато-желтые, у *A. tamari* те же структуры имеют коричневатую пигментацию, штаммы *A. oryzae* отличаются изумрудно-зеленой пигментацией головки, притом терминальное расширение на среде Сабуро и сусло-

агаре иногда окрашено в темно-зеленый цвет (оно темнее стеригм).

У изученных штаммов *A. tamaritii* наблюдали конидиальные головки преимущественно столбчатого типа (Рисунок 14), хотя у представителей этого вида возможно образование и столбчатых, и радиальных головок.

В культурах *A. flavus* отмечено образование разнообразных малых конидиеносцев, несущих немногочисленные крупные стеригмы, расположенные в один ряд (Рисунок 15: 2, 11, 14, 15, 20, 25), иногда такие конидиеносцы имеют видоизмененные стеригмы, которые не производят конидий (Рисунок 15: 2, 14, 18, 21, 22, 23). В развитых конидиальных головках встречаются вариации в величине площади, которую занимают стеригмы на терминальном расширении (Рисунок 15: 6, 7, 8, 9). Изредка на субстратном мицелии обнаруживали единичные фиалиды вне головок. В вегетативном мицелии на средах с растительными углеводами появляются светопреломляющие включения, на среде «AFPA» в мицелии появляются очень мелкие гранулы оранжевого пигмента, которые выходят наружу при разрыве стено ги́ф (Рисунок 15: 26). В воздушном мицелии можно заметить образование очень тонких перепутанных ги́ф (Рисунок 16: 5). В старых культурах встречаются клетки, напоминающие хламидоспоры (Рисунок 15: 17, 19). Склероции черные, реже беловатые, плотной консистенции, иногда из них прорастали конидиеносцы. Образование склероциев в культуре *A. flavus* – процесс не постоянный, они могут случайно появляться при высеве культуры после длительного периода хранения.

В стареющих культурах *A. flavus* и *A. tamaritii* бывает прорастание конидий прямо на конидиальной головке, когда ги́фа либо устремляется в воздушную часть культуры, либо внутрь опустевшего конидиеносца.

У *A. oryzae* в ряду метулей встречаются непропорционально длинные клетки, выступающие за пределы ряда и выносящие свои стеригмы (фиалиды; Рисунок 15: 4).

***A. terreus*.** Конидиеносцы длинные, совершают по ходу неярко выраженные зигзагообразные изгибы, стенка не окрашенная, гладкая. Конидиеносец венчает сферическое терминальное расширение, покрытое по всей поверхности двумя рядами стеригм (Рисунок 14). Граница между рядами стеригм четко определяется, стеригмы узкие, не окрашены. Молодые конидии, образующиеся на них, сферические, также не окрашены. Отчетливая рыже-коричневая пигментация заметна только у зрелых конидий в дистальной части головки. Головки столбчатые, но в микропрепаратах колонка часто разрушается, она прослеживается на поверхности интактной колонии при стереомикроскопии: поверхность «усыпана палочками». На среде Чапека спорообразование редуцировано, конидиеносцы в препаратах встречаются редко, образуют стеригмы только на вершине терминального расширения, конидий мало, они не окрашены.

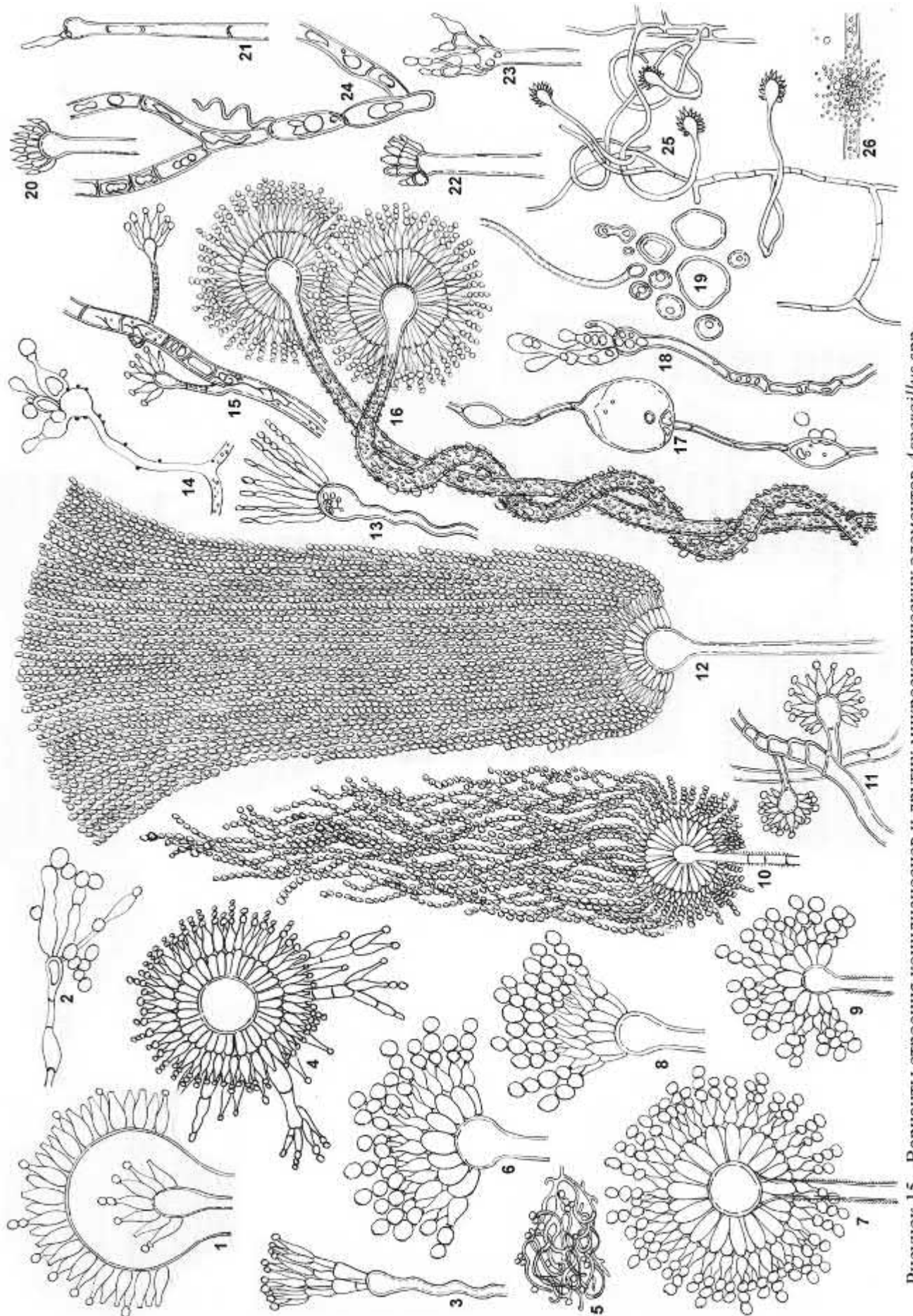


Рисунок 15 - Варианты строения конидиеносцев и других микроскопических элементов *Aspergillus* spp.

Среди атипичных вариантов строения наблюдали конидиальные головки с гипертрофированным спороношением (Рисунок 15: 12). Встречали вариации в строении стеригм: образование стеригм не в два, а в три ряда (Рисунок 15: 3); плавный переход без септ стериг первого ряда во второй (Рисунок 15: 13); необычно плотное расположение стеригм. На средах с растительными углеводами в вегетативном мицелии могут образовываться округлые светопреломляющие гранулы (Рисунок 15: 24).

***A. ochraceus*.** Конидиеносцы длинные с мягкой клеточной стенкой, в микропрепаратах часто извиваются и переплетаются (Рисунок 14, Рисунок 15: 16). Клеточная стенка буроватая, имеет бугристо-бородавчатую поверхность, характерный контур поверхности проявляется при продлении инкубации. Терминальное расширение сферическое, покрыто двумя рядами узких плотно уложенных стеригм (на среде Киммига, в отличие от среды Сабуро и YPD, стеригмы значительно шире). Конидиальные головки типично радиальные. Конидии сферические, мелкие. Охристо-рыжую окраску приобретают только зрелые конидии. Склероциев у изученных изолятов не обнаружили.

***A. wentii*.** Конидиеносцы возникают на ватообразном воздушном мицелии, очень длинные, извитые, не окрашены. Несут радиальные конидиальные головки, состоящие из сферического терминального расширения и двух рядов стеригм (Рисунок 14). Головки крупные, коричневого цвета.

***A. clavatus*.** У изученного штамма конидиальное спороношение происходит редко, единичные конидиеносцы появляются на подсыхающем скосе агаризованной среды в пробирке (непостоянно, Рисунок 14). Конидиеносцы не окрашены, прямые, их венчает булавоваидное терминальное расширение, покрытое стеригмами в 1 ряд. Конидии эллиптические, гладкие. Конидиальная головка радиального типа, темно-серого цвета.

***A. ustus* и *A. calidoustus*.** Микроморфология двух видов сходна. Конидиеносцы с темно окрашенными стенками и относительно крупной клеткой – ножкой, могут дихотомически разветвляться. Терминальное расширение сферическое, покрыто относительно короткими стеригмами в два ряда, конидии сравнительно крупные, серо-буро-зеленоватые, с шиповатой поверхностью. Головки имеют вид широкой кисти, за счет того, что цепочки конидий обращены вверх (Рисунок 16). Изученные в данном исследовании штаммы *A. ustus* и *A. calidoustus* не образовывали клеток Хюлле, которые считаются характерными для этих видов согласно определителям.

***A. sydowii* и *A. versicolor*.** На различных питательных средах конидиеносцы этих видов устроены однотипно (Рисунок 16). Конидиеносцы мелкие, прямые до слегка волнисто изогнутых, не окрашены, терминальное расширение округлое или овальное, относительно маленькое в сравнении со стеригмами.

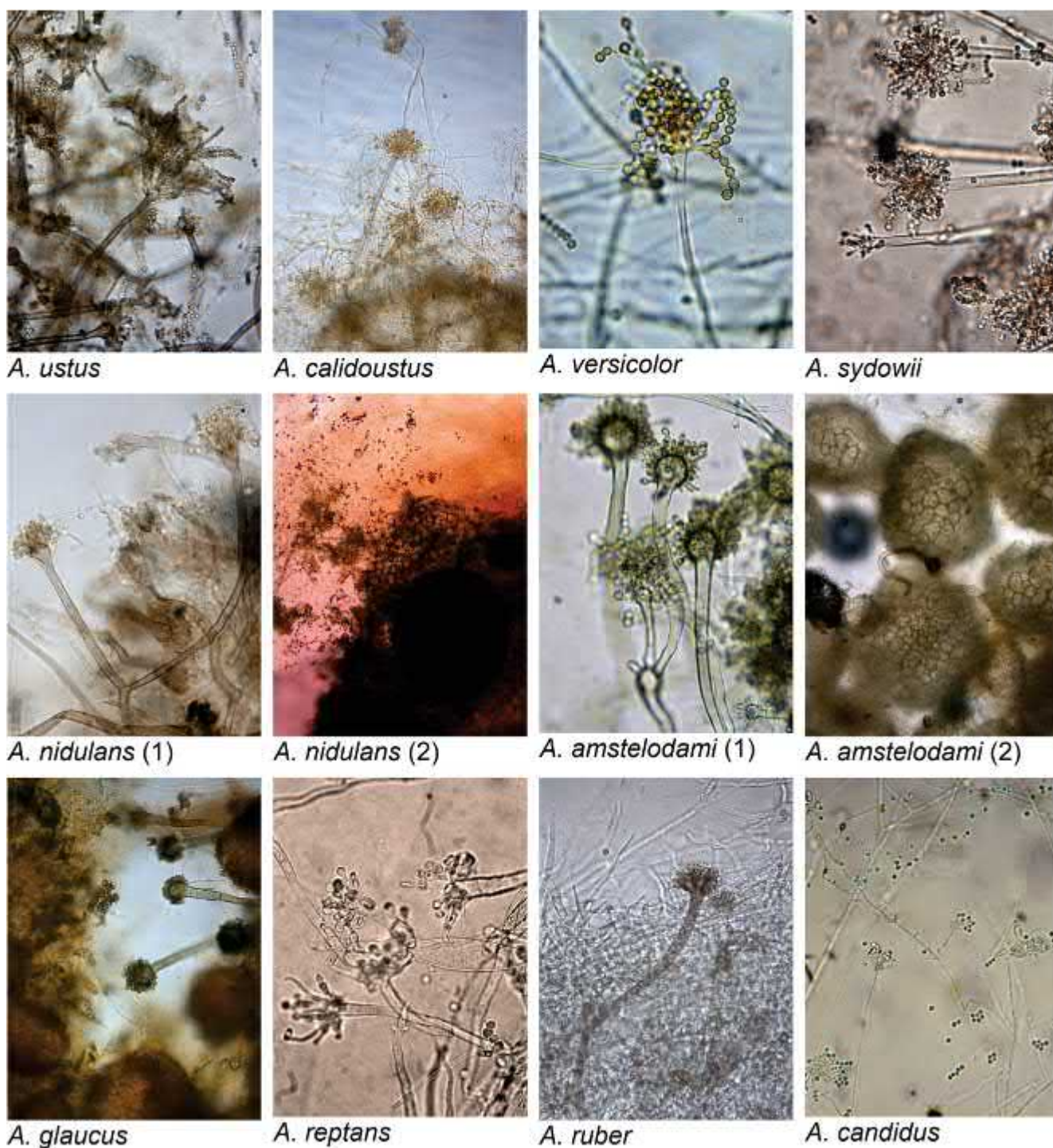


Рисунок 16 — Конидиеносцы условно-патогенных *Aspergillus* spp. (микроскоп Leica DM LB2, диапазон увеличений: 200x - 400x)

Стеригмы расположены в 2 ряда в форме веера, конидии сферические, мелкошиповатые. Головки радиальные. Конидиальный аппарат почти не окрашен, кроме зрелых конидий, которые имеют зеленоватый или золотисто-зеленоватый цвет.

A. nidulans. Конидиеносцы относительно мелкие, с темно окрашенной гладкой клеточной стенкой и сравнительно крупной клеткой-ножкой. Терминальное расширение по

форме приближается к сферическому. Покрыто стеригмами в два ряда, что внешне напоминает «веер» (Рисунок 16). Конидии малахитово-зеленые, сферические, гладкие.

На среде Чапека и Чапека-Докса, а также агаре Сабуро клейстотеции образуются слабо, поздно, могут отсутствовать. На среде Чапека с дрожжевым экстрактом или КГДА клейстотеции образуются отчетливо. 5-7-суточных культурах они крупные, округлые, окружены перидием и множеством клеток Хюлле сферической формы. Внутри клейстотеция видны формирующиеся аски. При созревании аскоспор (15-20 сутки, Рисунок 16) клейстотеции совершенно непрозрачные, темные, при надавливании на покровное стекло микропрепарата из них выходят лимонovidные винно-красные аскоспоры, которые примерно в 1,5 раза крупнее бесполой спор.

A. hollandicus, *A. glaucus*, *A. reptans*, *A. ruber*. Виды имеют общие особенности в строении конидиеносцев, которые не окрашены, либо пигментированы (коричневатые, зеленоватые, буро-красноватые), могут иметь различную длину, гладкостенные, прямые. Терминальное расширение сферическое, покрыто в один ряд стеригмами, которые разведены в стороны, а по форме напоминают кеглю. Конидиеносцы и конидиальные головки могут иметь необычные варианты строения: пролиферация конидиеносцев - появление нескольких ветвей из конидиеносной гифы, каждая из которых несет собственную конидиальную головку (Рисунок 16, видно у *A. amstelodami*, *A. reptans*), образование вторичных конидиальных головок - на терминальном расширении образуются еще несколько обособленных расширений, каждое из которых образует стеригмы и конидии (Рисунок 16, видно у *A. ruber*). Нередко в препаратах видны спиральные гифы. Клейстотеции многочисленные, светло-желтые до буроватых, сферические или неправильной мешковидной формы, «голые» (не покрыты перидием и клетками Хюлле), образуются в кластерах ближе к краю колонии. Оболочка клейстотециев представлена крупными полигональными клетками неправильной формы. Аскоскопы выделяются позднее, чем у *A. nidulans*, при надавливании покровным стеклом на клейстотеции из разрывов выделяются аски и крупные аскоспоры. Аскоспоры не окрашены.

A. candidus. Конидиеносцы формируются на воздушном мицелии, возможно образование головок двух типов: (1) с крупным сферическим терминальным расширением и относительно широкими и низкими стеригмами, (2) с мельчайшим терминальным расширением и крупными высокими стеригмами, покрывающими его по всей поверхности, из-за чего головка кажется ветвистой (Рисунок 16). Стеригмы расположены в два ряда. Конидиеносные структуры не окрашены, имеют тонкие клеточные стенки. Зрелые конидии слегка золотистые.

2.3 Краткое обсуждение (обобщение) проведенного морфологического исследования *Aspergillus* spp.

В целом элементы структуры *Aspergillus* spp., ответственные за бесполое размножение этих грибов, обладают свойствами, позволившими адаптировать конидиогенез для

распространения спор аспергиллов с током воздуха. В числе таких свойств можно отметить следующие. Наличие гифы-конидиеносца, а не «сидячее» (на мицелии) положение конидиальных головок указывает на механическое перемещение места высвобождения спор в хорошо аэрируемое пространство, туда, где имеются воздушные потоки. Следует заметить, что при развитии аспергиллов в тканях человека конидиогенез происходит, как правило, при распространении процесса в хорошо аэрируемую область (полость распада, каверну, бронх, параназальный синус), а при росте в альвеолах легких и тканях паренхиматозных органов чаще видны только вегетативные гифы. С этой точки зрения оправдано формирование конидий в конидиальных головках, поскольку при действии воздушного потока такие сравнительно крупные структуры обладают большей «парусностью» и, таким образом, на цепочки конидий оказывается более сильное дезинтегрирующее действие ветра, чем, если бы фиалиды были диффузно рассредоточены на мицелии, как у *Phialosimplex* spp. (данные грибы, как полагают, близки к вероятным предкам аспергиллов). В определении значения образования конидиальных головок по столбчатому или радиальному типу мы полагаем особенности локализации терминального расширения и стеригм относительно субстрата. Так, если аспергилл образует головки радиального типа, для наиболее эффективного распространения конидий в этом случае головка должна полностью выходить из дисперсного субстрата (почвы, разлагающейся древесины), а центральные части головки здесь более интенсивно подвергаются действию солнечного излучения. Напротив, у представителей со столбчатыми головками в свободное пространство вне субстрата могут выходить только дистальные части цепочек конидий, а сам конидиогенный аппарат может быть частично или полностью погружен в дисперсный субстрат, где растет гриб. Наконец, максимальная концентрация пигментов, задерживающих солнечный ультрафиолет, в клетках конидий, и их гидрофобность, препятствующая погружению в толщу воды, в совокупности с вышеуказанными особенностями окончательно подтверждают аэрогенный механизм распространения спор аспергиллов, как основу пространственной экспансии этих грибов в природе и, вероятно, в объектах жилой и госпитальной среды.

Обобщенное представление об органах размножения *Aspergillus* spp. на основании проведенного микроскопического исследования, показано на рисунке 17.

По-видимому, высшей формой конидиомы у аспергиллов является формирование конидиеносцев на крупных синнемах, что характерно для некоторых апатогенных представителей секции *Flavi*, ранее относимых к подроду *Stilbothamnium*. Хотя для рода *Aspergillus* в целом такой тип строения не является характерным. Он получил более выраженное развитие у родственных трихокомовых аскомицетов из рода *Penicillioptis*.

Половое размножение аспергиллов, напротив, по совокупности особенностей не приспособлено к передаче аскоспор на большое расстояние.

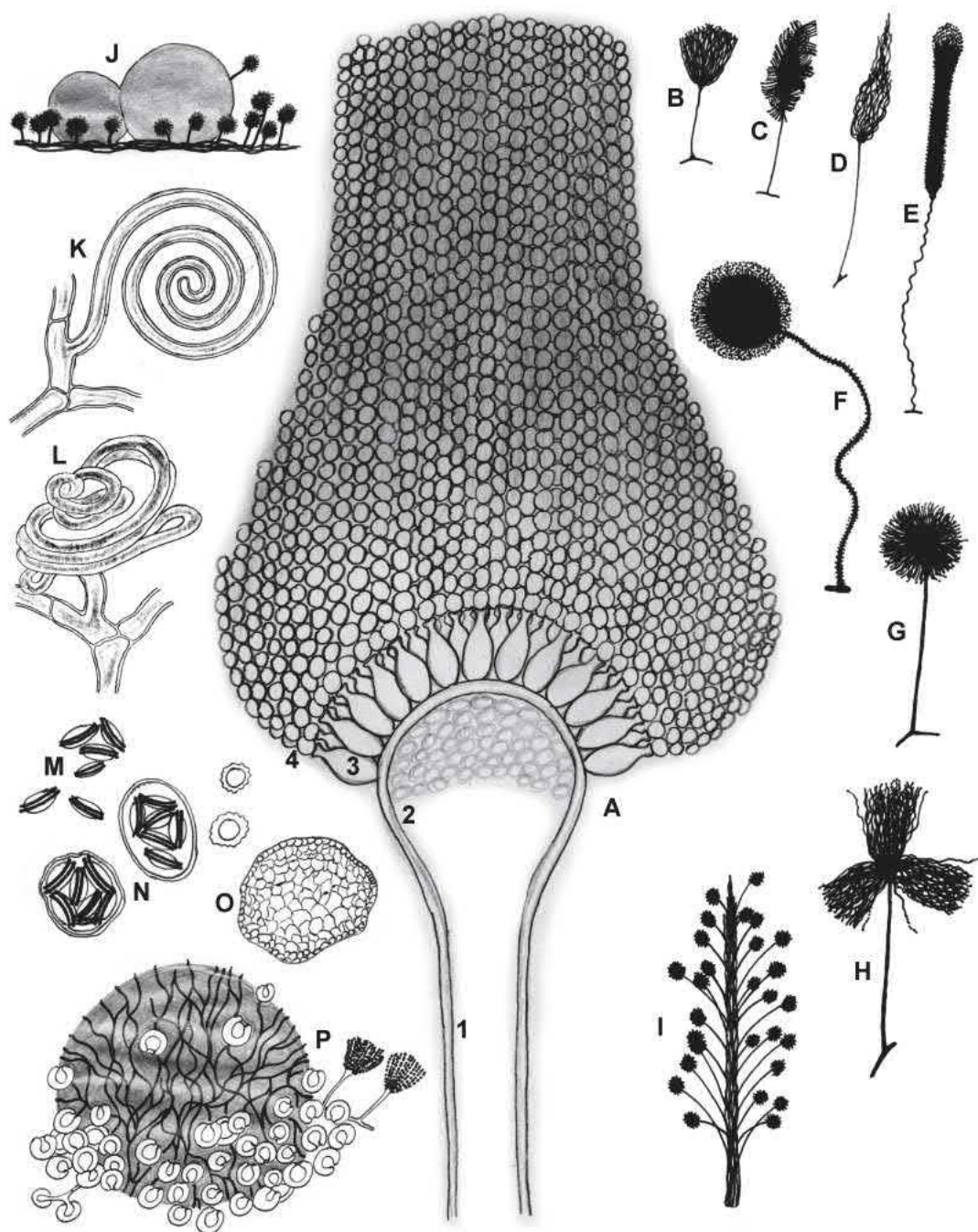


Рисунок 17 — Элементы строения грибов рода *Aspergillus* (обобщение)

Примечание: **А** — конидиальная головка *A. fumigatus* (**1** — конидиеносец; **2** — терминальное расширение; **3** — стеригма / фиалида; **4** — цепочки конидии); **В** — конидиеносец *A. nidulans*; **С** — конидиеносец *A. clavatus*; **Д** — конидиеносец *A. flavus* var. *columnaris*; **Е** — конидиеносец *A. terreus* со столбчатой головкой; **Ф** — конидиеносец *A. ochraceus*; **Г** — конидиеносец *A. niger* с радиальной головкой; **Н** — конидиеносец *A. niger* с головкой, расщепившейся на колонки; **И** — синнема *A. togoensis* с конидиеносцами (по литературным данным); **Ж** — склеротии *A. flavus*; **К**, **Л** — аскогенные гифы (как у *N. hiratsukae* и *E. amstelodami*); **М** — аскоспоры; **Н** — аски; **О** — клейстотеций *Eurotium* sp.; **Р** — клейстотеций *Emericella nidulans*, в нижней части видны скопления клеток Хюлле, справа — два конидиеносца

Как у эуротиевых грибов в целом оно идет с образованием плодовых тел замкнутого типа – клейстотециев, а не открытого типа, как апотеции дискомицетов или перитеции сордариомицетов. Это явление, с нашей позиции, также имеет определенное адаптивное значение для аспергиллов. В случае гетероталлического полового процесса (а именно такой его вариант сопровождается эффективной генетической рекомбинацией) он происходит со штаммом-партнером, который уже успешно адаптировался в данном биотопе (локусе). Тем более что половой процесс у изученных аспергиллов возникает тогда, когда уже сформирована значительная биомасса мицелия и состоялся конидиогенез.

В этом случае с более высокой вероятностью в результате генетической рекомбинации и при включении механизмов эпигенетики у потомства будут сформированы генотипы с набором детерминант, позволяющим более успешно противостоять неблагоприятным факторам внешней среды. В качестве примера обратного можно привести род *Trichosoma* – другого представителя семейства трихокомовых, у которых в силу формирования крупной кистевидной аскомы – капеллиция аскоспоры рассеиваются и переносятся с током воздуха. Сходно устроен аппарат размножения у рода *Dendrosphaera*. Оба рода грибов, в противоположность аспергиллам, представлены малым числом видов (всего 3-мя) и имеют ограниченные ареалы распространения. Аспергиллы, таким образом, наиболее эффективно используют сочетание прогрессивных свойств, эволюционно «накопленных» представителями семейства *Trichocomaceae*.

2.4 Разработанные ключи для видовой идентификации *Aspergillus* spp.

На основании проведенного культурально-морфологического исследования для совершенствования фенотипической идентификации *Aspergillus* spp. в ходе поточной диагностической работы микробиологических лабораторий разработаны краткие ключи-определители 2 типов: дихотомический и синоптический. Исходя из особенностей происхождения включенной в исследования выборки тест-штаммов данные ключи рекомендуем использовать для возбудителей, выделенных в Северо-Западном Федеральном Округе России. Помимо видов, в ключи внесены более крупные объединения, дифференцировка которых в диагностических лабораториях не-референс-типа затруднительна:

- ***Neosartorya* spp.** - условно-патогенные гомоталлические представители секции *Fumigati* с типичной для секции организацией бесполого спороношения, формирующие клейстотеции, обладающие кремово-белым оттенком колоний: *N. fischeri*, *N. pseudofischeri*, *N. spinosa*, *N. hiratsukae*;
- **Группа *A. nidulans*** включает очень похожие виды секции *Nidulantes* *A. nidulans* (телеоморфа – *Emericella nidulans*) и *A. tetrazonus* (телеоморфа – *Emericella quadrilineata*);

- **Группа *A. ochraceus*** – виды секции *Circumdati*, кроме *A. tanneri* (отличается сильно ограниченным ростом на питательных средах и слабо выраженным спорообразованием);
- **Группа *A. glaucus*** – некоторые представители секции *Aspergillus*, включая собственно *A. glaucus* (телеоморфа – *Eurotium herbariorum*) и *A. amstelodami* s. *hollandicus* (телеоморфа – *E. amstelodami*);
- ***A. niger*-complex**: *A. niger* и *A. tubingensis*, в синоптический ключ в этот комплекс также включен *A. awamori*;
- При составлении синоптического ключа также ввели «группу *A. versicolor*», объединяющую сходные виды секции *Versicolores*;
- В дихотомический ключ помещена «группа *A. restrictus*» (*Aspergillus* spp. секции *Restricti*). Хотя эти виды не вошли в изученную выборку, имеются данные об их выделении из биоматериала человека на европейской части России [10]. Поскольку экспериментальные исследования с ними не проводили, эта группа отсутствует в синоптическом ключе, но на основании данных типовых диагнозов видов помещена в дихотомический ключ.

Составленные ключи для видовой идентификации помещены в таблицах 12, 13 и 14. Дихотомический ключ построен по классической схеме: слева — пункт признака, в скобках указан тот пункт, от которого перешли к текущему; в среднем столбце для каждого пункта указаны две взаимно исключающие характеристики, напротив каждой — пункт для перехода в случае соответствия или наименование вида / группы. Синоптический ключ также традиционной компоновки, состоит из двух таблиц; в первой — группы фенотипических признаков с кодами, во второй — виды, группы видов и соответствующие им комбинации признаков в виде сочетаний кодов.

Таблица 12 – Краткий дихотомический ключ для идентификации возбудителей аспергиллеза

1	Среда Чапека с дрожжевым экстрактом позволяет сформировать годные к исследованию колонии за 5 — 7 суток при 28° — 37°C.	→4
	На обычной среде Чапека с дрожжевым экстрактом оптимальный рост наблюдают при 25°C очень медленно, оптимальный темп роста достигается при пассаже на среде Чапека с дрожжевым экстрактом и 20% сахарозы.	→2
2 (1)	Колонии темно-красные или коричнево-красные	<i>A. ruber</i>
	Колонии имеют различные оттенки зеленого	→3
3 (2)	Конидиальные головки приближаются к радиальным, терминальное расширение сферическое или приближается к такому по форме, покрыто стеригмами на протяжении не менее дистальных 2/3 площади. В культуре можно видеть клейстотеции.	<i>A. reptans</i>

Продолжение таблицы 12

	Конидиальные головки столбчатые (колонковидные), формируются на грушевидных или субсферических терминальных расширениях сравнительно малого диаметра по отношению к конидиеносцу. Терминальное расширение покрыто стеригмами на протяжении дистальной трети площади. В культуре клейстотеции не образуются.	группа <i>A. restrictus</i>
4 (1)	Терминальное расширение сферическое, субсферическое, грушевидное или овальное.	→5
	Терминальное расширение отчетливо булавовидное, вытянутое.	<i>A. clavatus</i>
5 (4)	В культуре формируются клейстотеции.	→6
	В культуре клейстотециев нет.	→8
6 (5)	Клейстотеции окружены клетками Хюлле округлой формы, терминальное расширение несет 2 ряда стеригм, расположенных веерообразно.	группа <i>A. nidulans</i>
	Клейстотеции не покрыты клетками Хюлле, терминальное расширение несет 1 ряд стеригм.	→7
7 (6)	На среде Чапека с дрожжевым экстрактом колонии расширяются медленно, рост усиливается при пассаже на среде с 20% сахарозы, колонии темно-зеленые, серо-зеленые или коричнево-зеленые, клейстотеции желтые, мелкие, с хорошо заметными клетками их оболочки. Конидиеносцы многочисленные со сферическим терминальным расширением, покрытым стеригмами на большем протяжении.	группа <i>A. glaucus</i>
	На среде Чапека с дрожжевым экстрактом рост удовлетворительный, колонии белые, бело-кремовые, бело-сероватые, иногда с легким зеленоватым оттенком. Клейстотеции крупные, слабо пигментированы. Конидиеносцы в культуре немногочисленные, иногда единичные, с грушевидным терминальным расширением, покрыты стеригмами преимущественно на протяжении проксимальной 1/3 — 1/2 площади.	<i>Neosartorya spp.</i>
8 (5)	Колонии черные или коричнево-черные (аналогичный цвет у конидиальных головок).	→9
	Колонии другого цвета.	→10
9 (8)	На классической («голодной») среде Чапека колонии и конидиальные головки угольно-черные.	<i>A. niger-complex</i>
	На классической («голодной») среде Чапека колонии и конидиальные головки шоколадно-коричневые, иногда с оливковым оттенком.	<i>A. awamori</i>
10 (8)	Колонии светлых оттенков коричневого, оранжево-коричневые, терракотовые или белые (в последнем случаев с конидиальными головками плотно-столбчатого типа).	→11
	Колонии с другой пигментацией или приближаются к белым (в последнем случае с конидиальными головками радиального типа).	→13
11 (10)	Колонии плоские терракотовые с коричневым диффундирующим пигментом и коричневым экссудатом, у некоторых штаммов колонии белые. Конидиальные головки плотно-столбчатые.	<i>A. terreus</i>
	Признаки иные или указанные характеристики не сочетаются.	→12

Продолжение таблицы 12

12 (11)	Изолят хорошо растет при 37°C, колонии плоские бархатистые или с развитым воздушным мицелием, оранжево-коричневые, конидиальные головки радиальные или столбчатые, стеригмы двухрядные или двухрядные и однорядные в одной культуре.	<i>A. tamarii</i>
	Изолят растет при 22° — 28°C, колонии с сильно развитым воздушным мицелием, встречается слегка желтоватый экссудат в крупных каплях, конидиальные головки строго радиальные, формируются на длинных конидиеносцах.	<i>A. wentii</i>
13 (10)	В культуре спороношение сопровождается отчетливой цветной пигментацией.	→14
	При развитом спороношении культуры остаются белыми или разных оттенков белого, конидиальные головки двух типов: с мелким терминальным расширением или крупным сферическим терминальным расширением (оба типа сочетаются, либо превалирует один из них).	<i>A. candidus</i>
14 (13)	Колонии вначале белые, затем буро-серые, зеленовато-серые или светло-серые хотя бы на части площади. Конидиеносцы с темной стенкой.	→15
	Колонии различных оттенков зеленого или желтого. Конидиеносцы с прозрачными неокрашенными стенками.	→16
15 (14)	Колонии буро-серые или темно-серые с желтоватым центром, экссудат лимонно желтый. Изолят при 35°C не растет или рост слабый.	<i>A. ustus</i>
	Колонии светло-серые, экссудат янтарно-оранжевый. Изолят растет при 35°C.	<i>A. calidoustus</i>
16 (14)	Колонии различных оттенков зеленого, если желтые, то имеют (или приобретают со временем) зеленый оттенок.	→17
	Колонии светло-желтые или охристо-желтые без оттенков зеленого.	группа <i>A. ochraceus</i>
17 (16)	Конидиальные головки исключительно с одним рядом стеригм.	→18
	Конидиальные головки с двумя рядами стеригм или стеригмы однорядные и двурядные в одной культуре.	→19
18 (17)	Колонии светло-зеленые или травянисто-зеленые, терминальное расширение сферическое.	<i>A. parasiticus</i>
	Колонии темно-зеленые, синевато-зеленые, буро-зеленые, с возрастом буреют, терминальное расширение грушевидное.	<i>A. fumigatus</i>
19 (17)	Колонии светло-зеленые, травянисто-зеленые, или вначале желтые, затем зеленеют, экссудата и диффундирующего пигмента нет, быстро растущий изолят.	→20
	Колонии бирюзово-зеленые или сочетают разные темные оттенки зеленого обычно в виде поясов, образуется темно-красный диффундирующий пигмент и/или красноватый или коричневатый мелкокапельный экссудат, со временем колонии могут приобретать кирпичный оттенок, изоляты с умеренным темпом роста.	→21

Продолжение таблицы 12

20 (19)	Колонии плоские, бархатистые или с возвышающимся воздушным мицелием с различной архитектурой, терминальное расширение прозрачное, в двухрядных головках метули расходятся, имеют отчетливый округлый контур.	<i>A. flavus</i>
	Колонии несколько приподнятые войлочные с гранулярной текстурой (из-за конидиальных головок), у некоторых штаммов терминальное расширение зеленое, в двухрядных головках метули вытянутые, высокие, плотно примыкают друг к другу.	<i>A. oryzae</i>
21 (19)	Изолят растет при 35° — 37°C.	<i>A. sydowii</i>
	Изолят психрофильный, растет при t° не выше 28° — 30°C.	<i>A. versicolor</i>

Таблица 13 – Фенотипические признаки *Aspergillus* spp. в культуре для идентификации по синоптическому ключу

Код	Признаки
	Температура роста:
1	Быстро или умеренно быстро растет при 37°C.
2	При 37°C рост слабый или отсутствует, оптимальное развитие колонии происходит при 30°C или более низкой температуре.
	Осмолярность среды (концентрация углеводов):
3	Достаточное для нормального развития содержание сахарозы в среде — 2-3%.
4	При содержании сахарозы 2-3% колония растет очень медленно, оптимальных темпов роста удается достичь при концентрации углеводов 20-40% (вес к объему).
	Текстура поверхности колонии:
5	Бархатистая.
6	Гранулярная.
7	Войлочная или пушисто-войлочная.
	Относительная высота воздушного мицелия:
8	Колонии уплощенные.
9	Колонии с возвышающимся воздушным мицелием.
	Рельеф колонии:
10	Равномерный без складок.
11	Преимущественно радиально-складчатый.
12	«Мишеневидный» из радиальных и кольцевых складок.
13	«Мозговидно»-складчатый.
	Цвет лицевой поверхности колонии при нормальном спороношении:
14	Темно-зелено-бурый.
15	Насыщенный малахитово-зеленый.
16	Бирюзово-зеленый. В колонии сочетается с несколько оттенков зеленого.
17	Светло-травянисто-зеленый или желто-зеленый.
18	Серо-зеленый.
19	Тускло-зеленый с оттенками коричневого и желтого.
20	Часть колонии насыщенно-зеленая, часть-светло-желтая.
21	Бело-кремовые колонии, зеленеющие в центре или с периферии.
22	Зеленовато-красный.

Продолжение таблицы 13

Код	Признаки
23	Различные оттенки коричневого.
24	Светло-желтый, охристо-желтый.
25	Черный или коричнево-черный.
26	Серый, беловато-серый, коричневой серый, часть колонии может быть желтоватой.
27	Колонии различных оттенков белого или белые на большем протяжении.
	Окраска реверзума в молодой культуре (наличие диффундирующего пигмента):
28	Реверзум не имеет особой окраски, слегка желтоватый или желто-кремовый.
29	Коричневый, каштаново-коричневый.
30	Темно-красный.
31	С желтовато-зеленоватым диффундирующим пигментом.
	Наличие экссудата (в примакультуре или первом пересеве):
32	Колония экссудат не образует.
33	Экссудат в мелких и средних каплях коричневатый или красновато-коричневатый.
34	Экссудат в крупных каплях, светло-лимонно-желтый.
35	Экссудат в крупных каплях, янтарно-оранжевый.
36	Экссудат в каплях различной величины, прозрачный.
	Типы спорообразования в культуре:
37	Наблюдают только бесполое спорообразование (конидиогенез).
38	Сочетается бесполое и половое спорообразование.
	Особенности конидиеносцев:
39	Конидиеносцы не ветвятся.
40	В культуре, наряду с обычными, встречаются ветвящиеся конидиеносцы.
41	Стенка конидиеносца гладкая.
42	Стенка конидиеносца мелкошиповатая.
43	Стенка конидиеносца бугристая, бородавчатая.
44	Стенка конидиеносца не окрашена.
45	Стенка конидиеносца темно окрашена или темнеет в культуре с возрастом.
	Форма терминального расширения:
46	Сферическая или приближается к такой.
47	Грушевидная (колбовидная)
48	Булавовидная.
49	Эллиптическая.
	Особенности стеригм:
50	Стеригмы покрывают терминальное расширение по всей площади, охватывают место перехода конидиеносца в терминальное расширение или на небольшом протяжении оставляют его свободным.
51	Стеригмы покрывают терминальное расширение в пределах дистальной 1/3 — 2/3 поверхности.
52	Стеригмы одноярусные (однорядные).
53	Стеригмы двухъярусные (двурядные).
54	Стеригмы плотно прилежат друг к другу.
55	Стеригмы до некоторой степени расходятся.
	Особенности конидий:
56	Конидии в массе не окрашены.
57	Конидии в массе различных оттенков зеленого.
58	Конидии в массе светлых оттенков коричневого, рыже-коричневые, оранжево-коричневые.
59	Конидии желтоватые.

Продолжение таблицы 13

Код	Признаки
60	Конидии темно-коричневые или черно-коричневые.
61	Конидии могут приобретать золотистый оттенок.
62	Конидии гладкие.
62	Конидии шиповатые.
63	Конидии бугристые.
	Тип конидиальной головки:
64	Радиальная.
65	Столбчатая.
66	Конидиальная головка имеет вид широкой кисти.
	Вариации конидиальных головок:
67	В культуре конидиальные головки преимущественно однотипные.
68	В культуре встречается два варианта конидиальных головок (один может быть превалирующим).
	Особенности клейстотециев (если они образуются):
69	Молодые клейстотеции желто-коричневатые, при созревании становятся непрозрачными, крупными. Окружены клетками Хюлле.
70	Клейстотеции крупные, полупрозрачные, со слегка коричневатой стенкой. Клеток Хюлле нет.
71	Клейстотеции мелкие, расположены группами (кластерами). Желтоватые или коричневатые, с хорошо различимой оболочкой из многоугольных уплощенных клеток. Клеток Хюлле нет.

Таблица 14 – Синоптический ключ для идентификации *Aspergillus* spp.

Виды и комплексы	Сочетание кодов признаков
<i>A. fumigatus</i>	1, 3, 5, 8, 10, 11, 14, 28, 32, 37, 39, 41, 44, 47, 51, 52, 54, 57, 62, 65, 67
<i>Neosartorya</i> spp.	1, 3, 5, 8, 10, 11, 27, 28, 36, 38, 39, 41, 44, 47, 51, 52, 54, 56, 62, 65, 67, 70
<i>A. flavus</i>	1, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 17, 28, 32, 37, 39, 41, 42, 44, 46, 50, 51, 52, 53, 55, 57, 59, 62, 64, 65, 67
<i>A. parasiticus</i>	1, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 17, 28, 32, 37, 39, 41, 42, 44, 46, 50, 51, 52, 55, 57, 64, 67
<i>A. oryzae</i>	1, 3, 6, 7, 9, 10, 11, 17, 28, 32, 37, 39, 41, 42, 46, 50, 53, 54, 57, 62, 64, 67
<i>A. tamarii</i>	1, 3, 5, 8, 11, 12, 23, 28, 32, 37, 39, 41, 42, 44, 46, 50, 51, 52, 53, 55, 58, 64, 65, 67
<i>A. niger-complex</i>	1, 3, 5, 6, 8, 12, 25, 28, 32, 37, 39, 41, 44, 46, 50, 53, 54, 60, 63, 64, 67
<i>A. terreus</i>	1, 3, 5, 8, 11, 13, 23, 27, 29, 33, 37, 39, 41, 44, 46, 51, 53, 54, 58, 62, 65, 67
<i>A. ustus</i>	2, 3, 5, 7, 9, 11, 23, 29, 34, 37, 40, 41, 45, 46, 51, 53, 55, 57, 62, 66, 67
<i>A. calidoustus</i>	2, 3, 5, 7, 9, 11, 26, 31, 35, 37, 40, 41, 45, 46, 51, 53, 55, 57, 62, 66, 67
Группа <i>A. ochraceus</i>	2, 3, 6, 8, 12, 24, 28, 32, 37, 39, 41, 43, 44, 46, 50, 53, 54, 59, 63, 64, 67
Группа <i>A. glaucus</i>	2, 3, 5, 8, 11, 19, 28, 29, 32, 38, 40, 41, 44, 46, 50, 52, 55, 56, 57, 66, 67, 71
<i>A. repens (reptans)</i>	2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 17, 28, 32, 38, 40, 41, 44, 46, 50, 52, 55, 56, 57, 66, 67, 71
<i>A. ruber</i>	2, 4, 5, 8, 10, 22, 29, 30, 32, 38, 39, 41, 44, 46, 50, 52, 55, 56, 57, 66, 67, 71
Группа <i>A. versicolor</i>	2, 3, 5, 8, 10, 11, 16, 30, 32, 33, 37, 39, 41, 44, 46, 50, 53, 55, 57, 61, 62, 64, 67
<i>A. candidus</i>	2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 27, 28, 32, 37, 39, 41, 44, 46, 50, 51, 53, 54, 55, 56, 64, 68
Группа <i>A. nidulans</i>	1, 3, 5, 8, 10, 11, 15, 20, 29, 32, 33, 38, 40, 41, 45, 46, 50, 54, 57, 62, 66, 67, 69
<i>A. janus</i>	2, 3, 5, 7, 8, 11, 21, 28, 32, 37, 39, 41, 44, 46, 49, 50, 51, 53, 55, 57, 62, 64, 68

Продолжение таблицы 14

Виды и комплексы	Сочетание кодов признаков
<i>A. clavatus</i>	2, 3, 5, 8, 10, 11, 18, 28, 32, 37, 39, 41, 44, 48, 50, 52, 54, 57, 62, 64, 67
<i>A. wentii</i>	2, 3, 7, 9, 10, 11, 23, 27, 28, 36, 37, 39, 41, 44, 46, 50, 54, 58, 64, 67

Кроме признаков, представленных в ключах, для уточнения видовой принадлежности *A. fumigatus*, дифференцировки его от некоторых сходных видов (*A. lentulus*, *A. fumysynnematus*, *A. udagawae*, *A. fumigatiaffinis* и др.), рекомендуем проводить пассаж изолята на любой подходящей питательной среде при 50°C в течении 4 — 5 суток. Данный тест особенно актуален в том случае, если выделенный сходный с *A. fumigatus* изолят отличается слабыми спорообразованием и пигментацией, необычно высокими МИК к противогрибковым препаратам, либо малой эффективностью проводимой противогрибковой терапии.

Дихотомические ключи в микологии распространены больше, отличаются сравнительной простотой, синоптические ключи в работе, напротив, сложнее, но поскольку оперируют группами признаков, отличаются большей надежностью. В любом случае в работе с любыми проблемными изолятами следует сверять результат исследования с диагнозом вида.

Резюме. В результате проведенного микроскопического исследования удалось установить, что базовые микроморфологические черты у изученных видов проявляются на большинстве питательных сред, включенных в эксперимент. Тем не менее, выявили многие атипичные варианты организации конидиального спороношения, которые следует учитывать при проведении сравнительных исследований с участием штаммов из «классических» и «криптических» видов. Как оказалось, малые формы конидиеносцев образуют не только редкие возбудители аспергиллеза, у которых это явление принято считать одним из видовых признаков (*A. candidus*, *A. janus*), но также и представители наиболее частых видов в медицинской практике (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*).

Следует заметить, что для выявления типовой морфологии аспергиллов не следует ограничиваться модификациями среды Чапека и/или солодовым агаром, как это демонстрируют в своих работах многие зарубежные авторы [104, 194, 248, 299, 302]. На основании проведенной работы мы рекомендуем использовать для этих целей различные питательные среды. При составлении культурально-морфологического описания штаммов аспергиллов в качестве основных целесообразно использовать среду первичного выделения (Сабура или другую, в зависимости от протокола исследования), а также агар Чапека с дрожжевым экстрактом (в классической прописи и в варианте с 20% сахарозой для осмофильных видов). Проведенное морфологическое исследование позволило выявить атипичные варианты развития возбудителей аспергиллеза с учетом рецептур питательных сред, утвержденных действующей нормативно-методической базой в сфере микробиологии. Исследование позволило установить, что

культуральные свойства и микроморфология *Aspergillus* spp. на различных питательных средах, применяемых в исследовании биоматериалов и объектов окружающей среды, не одинаковы. Данное обстоятельство необходимо учитывать при проведении микологических исследований, а также при использовании штаммов *Aspergillus* spp. для контроля питательных сред. Наиболее переменными признаками у *Aspergillus* spp. в культуре является пигментация и рельеф колоний, которые в свою очередь определяются особенностями процесса спороношения у конкретного штамма – его интенсивностью в целом и пространственным распределением конидиеносцев.

Полученные данные подтверждают, что морфологическая идентификация возбудителей аспергиллезной инфекции человека позволяет определить их отношение к секциям рода, но дифференцировка видов внутри секций затруднена. Видоспецифичные морфологические признаки, позволяющих выделить из секций важнейших возбудителей аспергиллезной инфекции, часто нивелируются развитым у аспергиллов штаммовым полиморфизмом.

При изучении представителей группы так называемых «криптических» аспергиллов – *A. tubingensis*, *A. awamori* (сходные с *A. niger*), *A. calidoustus* (сходен с *A. ustus*), *A. oryzae* (сходен с *A. flavus*), *A. (E.) amstelodami* (сходен с *A. glaucus*) и *N. hiratsukae* (сходен с *N. fischeri*), установлено, что в типовых описаниях видов имеются отличительные признаки, позволяющие дифференцировать их со сходными «классическими» видами, однако, такие признаки не всегда отчетливо проявляются у конкретных штаммов (как в проведенном исследовании), либо вовсе недоступны для поточной лабораторной диагностической практики. В современных условиях преодоление таких ограничений необходимо для объективного понимания процессов в эпидемиологии аспергиллеза (особенно внутрибольничного) и быстрого выявления возбудителей с первичными (видоспецифичными, природными) механизмами устойчивости к противогрибковым препаратам. В связи с этими обстоятельствами необходима разработка эффективных протоколов точной видовой идентификации медицински значимых *Aspergillus* spp. физико-химическими и молекулярно-генетическими методами для работы микробиологических лабораторий первичного звена и референс-лабораторий.

ГЛАВА 3. Результаты MALDI-TOF-масс-спектрометрии клеточных экстрактов возбудителей аспергиллеза

3.1 Характеристика масс-спектра клеточного экстракта *Aspergillus* spp. Расчетный химический состав спектрообразующих белков и пептидов

Коллекцию культур из 238 изолятов подвергли масс-спектрометрическому исследованию со следующей повторностью опытов: 66 штаммов (27,7%) – 1 съемка масс-спектра; 99 штаммов (41,6%) – 2 съемки; 35 штаммов (14,7%) – 3 съемки; 38 штаммов (16,0%) – более 3 съемок.

Всего с учетом повторностей выполнили 658 съемок масс-спектров клеточных экстрактов *Aspergillus* spp., из которых 295 — в автоматическом режиме (из них 263 результативно ($\approx 89,2\%$) и 32 не успешно ($\approx 10,8\%$)), а также 393 — в «ручном» режиме (в последнем случае все завершены успешно). Как оказалось, связь использования ручного режима с результативностью съемки статистически значима ($\chi^2_{\text{эмп}}(44,710) > \chi^2_{\text{крит}}(6,635)$ при $f=1$ ($p < 0,01$)); связь признаков — средней силы по шкале Реа-Паркера (критерий Крамера $V=0,255$). Распределение случаев, когда из экстрактов получили масс-спектры без детектируемых пиков, оказалось следующим: *A. niger* (50%), *A. fumigatus* (25%), прочие виды — 25%. Таким образом, ручной режим съемки масс-спектра предпочтителен для идентификации *Aspergillus* spp. Типичный вид масс-спектра клеточного экстракта аспергилла (на примере *A. fumigatus*) показан на рисунке 18.

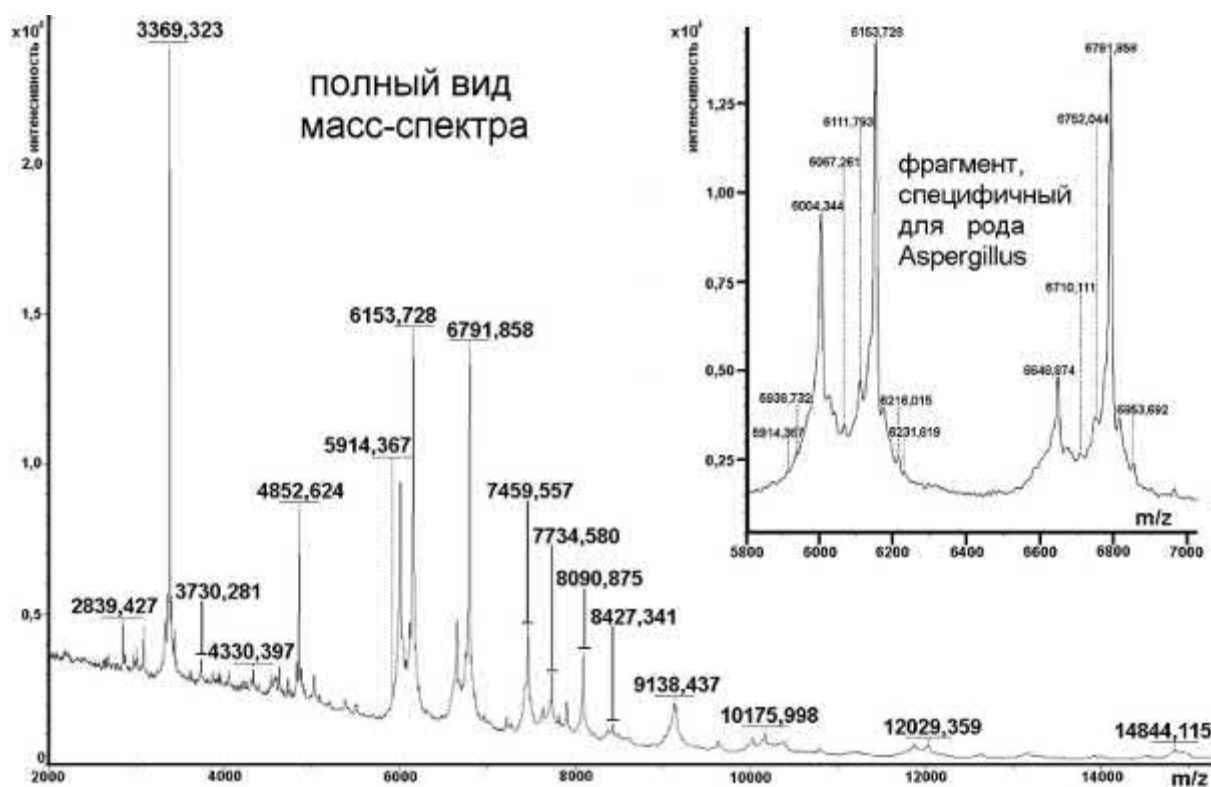


Рисунок 18 — Масс-спектр белкового экстракта *A. fumigatus* РКПГ F-1277

Детекция ионов в стандартном диапазоне для видовой идентификации (2-20 kDa) позволяет получить пики до 18 kDa, но наиболее отчетливые — до 12 kDa. При сопоставлении картин масс-спектров, полученных из культуральных экстрактов представителей различных видов *Aspergillus* spp., выявлены две консервативные для данного рода особенности. В низкомолекулярном диапазоне находится высокоинтенсивный пик, который у *A. fumigatus* РКПГ F-1437 соответствует $M_r=3368,966$ Da. Близкие по величине m/z пики удалось найти у штаммов *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. ustus*, *A. ochraceus*, *A. sydowii*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. awamori* и переходного между ними «геновида» *A. niger/awamori* (РКПГ F-1446 и F-1447). Отчетливо заметным масс-спектральным маркером рода *Aspergillus* является комбинация из 4 интенсивных пиков, встречающаяся у всех видов в диапазоне m/z , соответствующем $M_r=5,7 - 6,9$ kDa. Эта композиция у *A. fumigatus* РКПГ F-1437 представлена 6004,439 Da; 6153,937 Da; 6648,848 Da и 6791,803 Da, а также малоинтенсивными сателлитными пиками. Выявлено, что у штаммов одного вида m/z данных пиков отличается не более, чем на 1 — 1,5 единицы (Da). У представителей ряда видов (*A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*) данный комплекс визуализируется наиболее отчетливо, у других (*A. terreus*, *A. sydowii*, *A. versicolor*, *A. nidulans*, *A. candidus*) — менее ярко за счет некоторого видоизменения сателлитными пиками. Похожее сочетание пиков в указанном диапазоне встречается у грибов рода *Penicillium*, в частности, у изученных изолятов аспергиллов обнаружили по данному признаку сходство с коллекционными штаммами *P. discolor*, *P. roquefortii*, *P. digitatum*, *P. turbatum*, *P. italicum*, *P. glabrum*, *P. citreonigrum*, *P. discolor*, *P. chrysogenum* и *P. corylophilum*. Однако у данных штаммов пики в указанной композиции характеризуются другими величинами m/z . Грибы рода *Aspergillus* и *Penicillium* отличаются по композиции пиков в диапазонах 3,5 – 5,5 kDa и 7 – 9 kDa.

Для аннотирования выбрали масс-спектры штаммов *A. fumigatus* 1263, *A. terreus* «Д./кровь», *A. clavatus* РКПГ F-275, *A. nidulans* РКПГ F-1336, *A. oryzae* «Рос./мокрота».

Результаты аннотации для *A. fumigatus* представлены в таблице 15, а комплексная аннотация масс-спектра с учетом результатов аннотирования всех исследованных штаммов помещена на рисунке 19.

Таблица 15 – Масс-лист *A. fumigatus* 1263 и вероятное соответствие отдельных пиков белкам из протеома штаммов *A. fumigatus* Z5 и RP-2014

Пик (m/z)	Белок из протеома <i>A. fumigatus</i> Z5 или RP-2014, его молекулярная масса, длина цепи и последовательность в коде FASTA. В случае отсутствия данных о функции – сведения о структурных гомологах по данным BLAST (если есть)
В диапазоне m/z 2390,551 – 3001,608 выявлено 4 пика, но соответствующих пептидов нет.	
3076,381	Пептид из протеома <i>A. fumigatus</i> Z5, $M_r=3271$ Da. 31 аминокислота: MEQGANAVLSLPVRRSEVIDLGGPSQRCDGD

Продолжение таблицы 15

Пик (m/z)	Белок из протеома <i>A. fumigatus</i> Z5 или RP-2014, его молекулярная масса, длина цепи и последовательность в коде FASTA. В случае отсутствия данных о функции – сведения о структурных гомологах по данным BLAST (если есть)
В диапазоне m/z 3324,349 – 3607,225 выявлено 5 пиков, но соответствующих им пептидов найти не удалось.	
3730,257 4046,341	Пептид из протеома <i>A. fumigatus</i> Z5, Mr=3949 Da. 36 аминокислот: MSTAYISPVTQPVMGMSSIDLKPKSTLSPRWENVV
4570,223 4579,328 4852,930	Пептид протеома <i>A. fumigatus</i> Z5, Mr=4675 Da. 40 аминокислот: MDEYGVLSNLGETKRFVLIIDTHTFSPIHLYVPETQYSYP
5023,550 5089,057	Пептид из протеома <i>A. fumigatus</i> Z5, Mr=5342 Da. Структурные аналоги принадлежат к белкам типа Tom5 – субъединицы транслоказного комплекса митохондрий (например — у <i>Penicillium camambertii</i>). 49 аминокислот: MFAPGQEQLSKEELRAAEASQTVRAAITGGILLYLSPFAVDFVKKFL
5938,488 5960,615 5971,330	Белок из протеома <i>A. fumigatus</i> RP-2014, Mr=5982 Da. Отдалённые структурные аналоги есть среди аминотрансфераз (<i>N. fischeri</i>) и цистеин-десульфуриаз (<i>A. oryzae</i>) грибов. 54 аминокислоты: MESIVHTMLAPHIDQRSLSKTMVAVKKRTAQHAKLAAFMNAGPDEIGKRSSYI
6004,439 6018,155	Белок из протеома <i>A. fumigatus</i> Z5, Mr=6025 Da. Известны структурные аналоги у других представителей рода <i>Aspergillus</i> , а также у грибов рода <i>Penicillium</i> и <i>Marssonina</i> . 56 аминокислот: MCMPSKCNTCQKNTWWGCGSHIPVMDPVPESDRCTCSPKVNADGKEYPPKGPGPA
6042,153	Арилалкогольдегидрогеназа из <i>A. fumigatus</i> Z5, Mr=6045 Da. 58 аминокислот: MTVIDTNSAAVVANRLVEDPNTQVLVLEAGANRLTDPRILVPGLAPTAYGDPDLDSAI
6066,543	Пептид из протеома <i>A. fumigatus</i> Z5, Mr=6047 Da. 59 аминокислот: MGAVVSCIQGVFRSIGACLMGIVNTIGAVLKAINGVDEVFETSTIKGLIAAPARLDEL
6111,561	Пептид из протеома <i>A. fumigatus</i> Z5, Mr=6117 Da. 58 аминокислот: MPNREHPIGLEPRSVTGSAGGKESDRDQVPDAPSSAISVAADNILEHAFSDPNYINNA
6153,937	Субъединица АТФ-синтазы F1F0 из протеома <i>A. fumigatus</i> Z5, Mr=6170 Da. 57 аминокислот: MSLGKKFPAPVAKPMAFFAAGVVILYGVNSLANALMNTTEEFKNDPRNPNAKNVKH
6173,954	Пептид из протеома <i>A. fumigatus</i> Z5, Mr=6173 Da. Близкие по структуре белки, но более длинные (77 аминокислот), имеются у грибов рода <i>Metarhizium</i> , они являются внеклеточными протеиназами. 57 аминокислот: MPATDALQPPLTPAERAIVQSYGGWTQFMICFGLKPYELDDVDEAKSLVASLAADDD
6216,967	Белок из протеома <i>A. fumigatus</i> Z5, Mr=6228 Da. Гомологи известны у других грибов рода <i>Aspergillus</i> . 61 аминокислота: MRFTFFAALALLGTAFAPARTTSTATIPAGQTCKKDGSMSGVCQSGYCMQDEKASSGVCK
6585,674	Белок из протеома <i>A. fumigatus</i> Z5, Mr=6603 Da. Сходные белки описаны у аспергиллов, пенициллов и фузариев. 60 аминокислот: MPSTRVRPIEKFAKAASKCSAEAAATYGKIVADYNAVHKDMCAKEFMKLKDCFLAASKKV

Продолжение таблицы 15

Пик (m/z)	Белок из протеома <i>A. fumigatus</i> Z5 или RP-2014, его молекулярная масса, длина цепи и последовательность в коде FASTA. В случае отсутствия данных о функции – сведения о структурных гомологах по данным BLAST (если есть)
6585,674	Геранилгеранилпирофосфат-синтаза из <i>A. fumigatus</i> Z5, Mr=6606 Da. 56 аминокислот: MISTAMLDKTRPFSNLEEYVAYRIIDTAAPFVDTSMRFGMNIRLTPEEEERLHRL
В диапазоне m/z 6618,757 – 6750,994 выявлено 4 пика, но соответствующих им белков найти не удалось.	
6791,803	Белок из протеома <i>A. fumigatus</i> RP-2014, Mr=6795 Da. Сходные белки определили у других штаммов этого вида, а также <i>N. fischeri</i> и <i>N. udagawae</i> . 58 аминокислот: MAKESYLLKHYLKLVLNELRELKQANDSKEFSLKERADEHSGYGLKRVPTPYPLMARN
6853,979	Белок митохондриальных рибосом L33 из протеома <i>A. fumigatus</i> Z5, Mr=6882 Da. 60 аминокислот: MAKKAKSRTIAVRLISMAMTGYRTMVRPRTHRPLSMLKYDPVVKKKVLFLEATKGGRKAK
7269,718	Нет близких соответствий
7421,273	Белок из протеома <i>A. fumigatus</i> Z5, Mr=7472 Da. Сходные белки имеются в протеоме
7434,590	грибов рода <i>Aspergillus</i> и <i>Penicillium</i> . 67 аминокислот:
7459,946	MFSCANYPRGCRGRANVEGGKCPDCVSLKLRPSALSSPFAQPRDYRRALPSEILNDSPYRAIVQDL
7493,374	Белок из протеома <i>A. fumigatus</i> Z5, Mr=7524 Da. 66 аминокислот: MPIYLISKFADPIFAFTIGTSAALIRIRREEREKHPERAGEIGFGTIAKTGADRVRRWWAGDFESL Белок из протеома <i>A. fumigatus</i> RP-2014, Mr=7543 Da. По структуре напоминает концевой фрагмент аминокислотной цепи ацил-КоА-лигазы длинноцепочных жирных кислот у <i>N. udagawae</i> . 67 аминокислот MSLWSSYRSLTPKTRALFGVGLMAWASLGLWFSPQIENAMGMVPSAEEKEELERKLALRVSRVEKGN Белок из протеома <i>A. fumigatus</i> Z5, Mr=7541 Da. 70 аминокислот: MGLPSASSQVDDADSAATQRTPPDDSLVAWSVVLGAWCASFCFSRLNSVGVFQEYPLRSIDCLRAWIST
7630,078	Белок из протеома <i>A. fumigatus</i> RP-2014, Mr=7662 Da. 74 аминокислоты: MKITAKGIATPIPAFAPVERPVDWTPGSTGSDVAIAVAVSDTVRALTCPVAPDSQEKALSATGCLLCNSVYWLM Белок из протеома <i>A. fumigatus</i> Z5, Mr=7664 Da. 73 аминокислоты: MALCINVIYRDVAVIGGGAAGTYAAIQLGDLGQSVVLIEKKTVLGGQTEAYKDPTTGNIIDYGVENFQNTMLV
7714,238	Белок из протеома <i>A. fumigatus</i> Z5, Mr=7726 Da. Сходный белок выявлен у <i>N. udagawae</i> . 70 аминокислот: MFNIDSLNPFSSKKEEREKPTWDPNTLVMTTPSTATPAPPNQLVSQQPPAQEQIDMRLRGGGEKDICCQV
7734,283	Фактор транскрипции, специфичный для грибов , из протеома <i>A. fumigatus</i> Z5, Mr=7734 Da. 64 аминокислоты: MPSLHQFRHNLHDARKQIEELEQQVALYEELLQHLRFRVDTQDAELIARTLHRVIMTVHFHSPS
7817,186	Субъединица SecE из транслоказного комплекса <i>A. fumigatus</i> Z5, Mr=7852 Da. 70 аминокислот: MSDTIQELADIPRDFLRDGMFLVRRCTKPKDKREFIKISQAVGMGFIMGAIGYFIKLIHIPVNNILVGGA

Продолжение таблицы 15

Пик (m/z)	Белок из протеома <i>A. fumigatus</i> Z5 или RP-2014, его молекулярная масса, длина цепи и последовательность в коде FASTA. В случае отсутствия данных о функции – сведения о структурных гомологах по данным BLAST (если есть)
7817,186	Белок из протеома <i>A. fumigatus</i> Z5, Mr=7832 Da. Очень сходные по структуре белки найдены у <i>N. fischeri</i> , а также у представителей родов <i>Fusarium</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Talaromyces</i> , <i>Microsporum</i> , <i>Trichophyton</i> , <i>Tolypocladium</i> , <i>Colletotrichum</i> и некоторых других. По-видимому, это довольно консервативный компонент протеома аскомицетов. 72 аминокислоты: MPQNQD YTYKSSGTNSQGNHYCARDYGSGAANSNSYHYSNSDGSYYYSNPNGSTYYNDGKGNASYTPPGGKK
7904,939	Белок из протеома <i>A. fumigatus</i> Z5, Mr=7935 Da. Гомологичен белку-ингибитору протеазы В из <i>N. udagawae</i> . 74 аминокислоты: MPAVMAGRT TPPSEILEQSRVKDNITSSGSGSIKPDFELVKGFTA EVPDGMVGVLNHDFIENVEEDANVSTQR Белок из протеомов <i>A. fumigatus</i> RP-2014 и <i>A. fumigatus</i> Z5, Mr=7940 Da. Сходный белок известен у <i>N. fischeri</i> . 75 аминокислот: MDKLAGLASKLGGSQST PANQTQGE PQSQEDLLDKGLDALEQRLGGGKIDPAQLRSTNEKITDAAREQFEKATG
8090,643	Белок из протеома <i>A. fumigatus</i> Z5, Mr=8107 Da. Сходный белок известен у <i>N. fischeri</i> . 69 аминокислот: MAVWTAIQSSFSKNQRCILNLDISQRQGMILRDKPQPGDLSWTIALVDRFRKLGNKKRKESMKEWLSK
9079,697	Белок из протеома <i>A. fumigatus</i> Z5, Mr=9087 Da. Структурные гомологи встречаются у других представителей рода <i>Aspergillus</i> . 83 аминокислоты MGLFDFFKSSKDASPAQQPTWDPNTLTMQPPRPEAPSTERVVTEQPKNQEAMNMQLRGGGAGDVCCGVYDT CYTTMAVEIG
9139,468	Белок устойчивости к меди Crd2 из <i>A. fumigatus</i> RP-2014, Mr=9143. 89 аминокислот: MVHPSSTCCKTSGDGSCVCAAQAKCSCGKENALHCTCSRSAIENTISGPRCSCRA RPAGQCTCERAAAENHPVTGDACPCGKRPSKLN Белок из протеома <i>A. fumigatus</i> Z5, Mr=9144 Da. Гомолог с более короткой цепью известен у <i>N. fischeri</i> . 91 аминокислота: MGNANYSAQQVLIFKGTLA ALTITIGVTATTEMSSASMISSTTTGGPSPAASTVAAETNTSAPLEPNQLGSRPESSQALQLAVSSVWLPS
9156,441	Белок из протеома <i>A. fumigatus</i> Z5, Mr=9163 Da. Структурно сходные белки встречаются у представителей родов <i>Aspergillus</i> и <i>Penicillium</i> , они принадлежат к семейству I78 ингибиторов пептидаз (ингибиторы эластаз, продуцируемых <i>Aspergillus</i> spp.). 81 аминокислота: MPLVVPGINSDMGSDKNEWLSKLVGKKISDSTSDV TTFAKKDLPEHHRVLRPGDAMTMDHRPERLNIHLDEEDKVVDVHFG
10174,341	Белок из протеома <i>A. fumigatus</i> Z5, Mr=10187 Da. Гомологи известны у других представителей рода <i>Aspergillus</i> . 97 аминокислот: MVKIALNLTLAALAPLAAARNC KDGLNYCGWNLLNIGKYGAQVNGALTAHQPTDDAHIRESLFHCNGGADGDISFIKYCGGGCKNGGNDRSDYC

Продолжение таблицы 15

Пик (m/z)	Белок из протеома <i>A. fumigatus</i> Z5 или RP-2014, его молекулярная масса, длина цепи и последовательность в коде FASTA. В случае отсутствия данных о функции – сведения о структурных гомологах по данным BLAST (если есть)
11869,197	Белок из протеомов <i>A. fumigatus</i> RP-2014, Mr=11870 Da. При поиске аналогов удалось установить, что он имеет BAR-домен (Bin-Амфифизин-Rvs) – фрагмент структуры, типичный для белков, связанных с изменением геометрии клеточных мембран. Также этот белок сходен с глутатион-S-трансферазами других аспергиллов, но данные ферменты гораздо длиннее по аминокислотной цепи (у <i>N. fischeri</i> – 260 аминокислот). 106 аминокислот: MRSKILAAALPWPVQVVVGNIYRKVTRNLQGQGTMAFTEEEISEFRQEIWASLNAVVAEAQKKQSDRDRPFVWVGEGPTEVDAGTGHKRDHQGVSCCGRLCETDP
12030,211	Белок из протеома <i>A. fumigatus</i> Z5, Mr=12047 Da, близкие структурные гомологи выявлены у других аспергиллов. 111 аминокислот MYTYTPTSKFLVLSPVQSRPVQTSKFLVLTPTESGPEYEFGASTPASPDVRNRSDSVSTDDSQIEATFSPFAGGFLYLGHGTRPSRISAFGLAAQKVMGISCNLDREEM
14004,935	Пептидил-пролил-цис-транс-изомераза из протеома <i>A. fumigatus</i> Z5, Mr=14004 Da. 129 аминокислот: MAPKNNAGGDKKGGKGDASEGDKGGGKGLKPATSINVRHILCEKFSKKEEALEKLRNGAKFDDVAREYSEDKARQGGSLGWKVRGSLNADFEKAAYELEPSTTANPKYVEVKTGFYHIIIMVEGRK
14857,153	Гистон H2B из протеома <i>A. fumigatus</i> Z5, Mr=14884 Da. 139 аминокислот: MPPKAAEKKPSTGGKAPAGKAPAEKKEAGKKTAAATGDKKKRGKTRKETYSYIYKVLKQVHPDTGISTRAMSILNSFVNDIFERVATEASKLAAYNKKSTISSREIQTSVRLILPGELAKHAVSEGTKAVTKYSSSAK
14876,829	Гистон H2B из протеома <i>A. fumigatus</i> Z5, характеристики те же
14891,281	14kDa-субъединица из комплекса сигнал-распознающей частицы (SRP) из протеома <i>A. fumigatus</i> Z5, Mr=14899 Da. 139 аминокислот MAKHLSHIEFFSSLDLSKTSQKARGSVFLTQKPLLPNNANTSTSENASSSSSLPILIRATDGNTNAPNPKTAKDQSQAARTSKVKLSTVVAQEDLETFARYAEVCKASMTGLKKRDRKKGKAKAGGASKVTKA
14907,929	Железозависимая алкогольдегидрогеназа из протеома <i>A. fumigatus</i> RP-2014, Mr=14911 Da. 134 аминокислоты: MTSIRVAPSAAKRALNLLRTVQYTHPPSCPCHSNPNHHHHLQSNHVRRLATPVDPSRQKEYAFEMAASSIRFGPGA TREVGMDFANMKAQRVCIVTDQNVAKLDAMKQAVEGLSKEGIEFTVYDKVRVEPKDSS Цитозин-дезаминаза/урацил-фосфорибозил-трансфераза из протеома <i>A. fumigatus</i> RP-2014, Mr=14914 Da. 133 аминокислоты: MRAGEAMEQGLRDCCRSVRIGKILQRDEETCKPKLFYEKLPDIANRWVLLLDPMFATGGSATLAVETLKAGVPEDRILFLNLIASPSGVADFAERFPNLRVVTAFIDQGLNEKKYIIPGLGDFGDRYYTM
14923,393	Легкая цепь динеина (Tctex1) из протеома <i>A. fumigatus</i> Z5, Mr=14924 Da. 141 аминокислота: MAVEKGPVSPPIPELTKIATDACDSALKSAEGYEHAKVGEWNSQIINTILKSLIAATAPESPSTSPPYRFTVNSTIVQQGLIDKSSAADGAVSNAGKRGMHASGAFWDVNRDGMWTFKYPGAERGLDVIVSVAWFALG

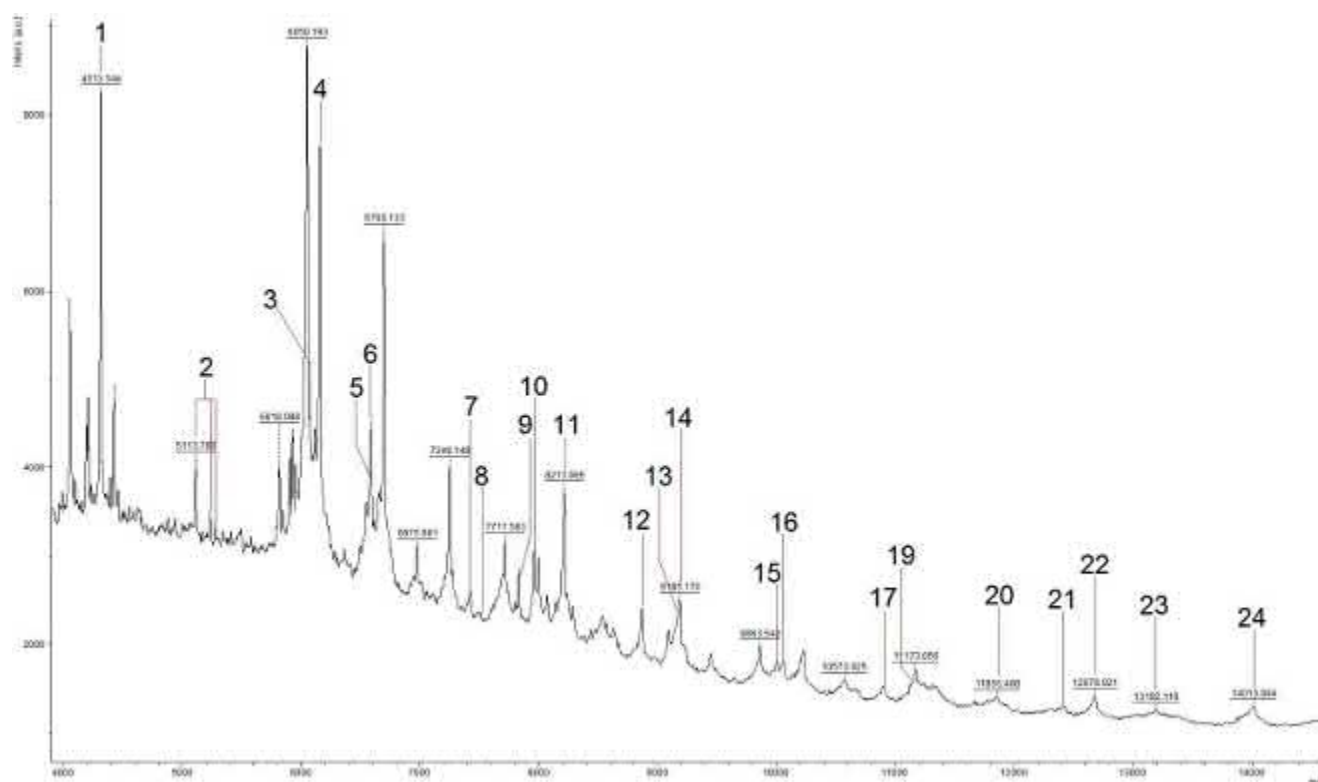


Рисунок 19 — Комплексная аннотация масс-спектра низкомолекулярной фракции протеома *Aspergillus* spp. на шаблоне масс-спектра *A. oryzae*

Примечание: Обозначения ферментов: 1 – зрелый митохондриальный цинк-связывающий пептид 1 (AT); 2 – фрагменты белка типа Tom5 (AF); 3 – арил-алкоголь-дегидрогеназа (AF); 4 – субъединица Tom7 из ТОМ-комплекса (АО, AN) или субъединица F1F2 АТФ-синтазы (AF); 5 – геранилгеранил-пирофосфат-синтаза; 6 – белок с трансмембранным доменом; 7 – фибриллярин-подобная рРНК-метилтрансфераза типа NOP1 (AN); 8 – фрагмент ацил-КоА-лигазы синтазы длинноцепочных жирных кислот (AF); 9 – фактор транскрипции, специфичный для грибов (AF); 10 – субъединица транслоказы SecE (AF) или рибосомальный белок L31 (AT); 11 – белок, сходный с ингибитором протеазы В (AF); 12 – гидрофобин HupC (АО); 13 – тримерная дезоксиуридиндифосфатаза (AT); 14 – регуляторный белок семейства Maf-Ham1 (AN) или белок устойчивости к меди типа Crd2 (AF); 15 – ингибитор пептидаз из семейства I78 (AF); 16 – токсин RtxA (АО) или субъединица Sem1 протеасомы 26S (AN); 17 – трансмембранный белок с доменом DUF543 (AN); 18 – митохондриальный цинк-несущий белок (АО); 19 – субъединица Tim13 транслоказы внутренней мембраны митохондрий (AN); 20 – H2A.Z-специфичный шаперон Chz1 (АО); 21 – субъединица ДНК-зависимой РНК-полимеразы (AN); 22 – конидиальный гидрофобин (АО); 23 – асоризин А (АО); 24 – фрагмент птерин-4-альфа-карбиноламин-дегидратазы (АО) или рибосомальный белок типа L32p (AN). **Обозначения видов:** АО – *A. oryzae*; AF – *A. fumigatus*; AN – *A. nidulans*; AT – *A. terreus*

При аннотировании масс-спектров (масс-листов), как видно из таблицы 15, для некоторых пиков не удалось найти соответствующих белков, доля неаннотированных пиков составила для *A. fumigatus* – 23,2%; для *A. terreus* – 77,2%; *A. clavatus* – 38,5%; *A. nidulans* – 10,9%, *A. oryzae* – 75%. Примененные методы выявления функциональной принадлежности белков и пептидов отличались близкой результативностью у представителей разных видов (Рисунок 20).

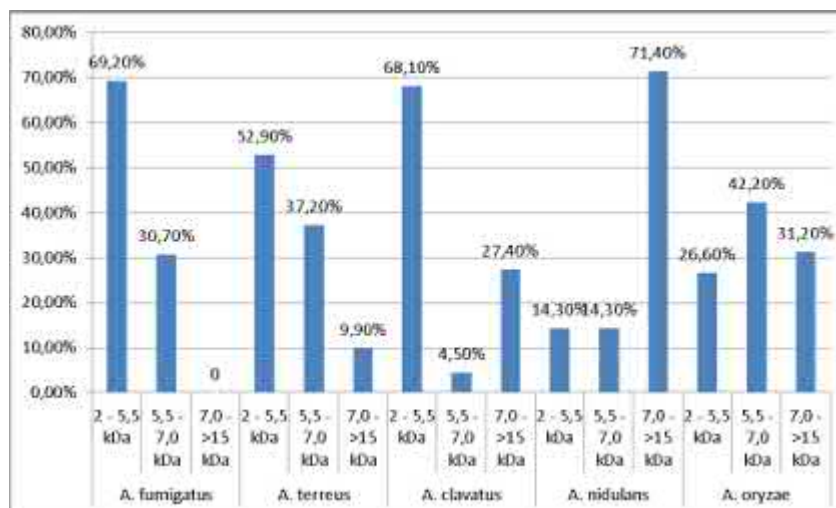


Рисунок 20 – Распределение неаннотированных пиков по диапазонам молекулярных масс детектируемых ионов

Примечание: по оси абсцисс указаны изученные виды и условно выделенные диапазоны молекулярных масс, по оси ординат – доли неаннотированных пиков в конкретном диапазоне Мг

Всего для отдельных видов удалось определить следующее количество белков, потенциально формирующих картину масс-спектра: *A. fumigatus* – 42, *A. terreus* – 16, *A. clavatus* – 36, *A. nidulans* – 66, *A. oryzae* – 17. На рисунке 21 показано распределение этих белков по 3-м категориям, отражающим результат определения. Оказалось, что у всех изученных видов более половины аналитически выявленных белков не удалось идентифицировать. Наиболее вероятные причины такого результата связаны с малым охватом представителей аскомицетов ДНК-секвенированием и аннотированием генома, а также недостаточно полными экспериментальными исследованиями протеома аспергиллов, направленными на выяснение биологической роли отдельных белков, а не только реконструкцию их структуры на основе ДНК-секвенирования. Также повлиять на получение такого результата могла посттрансляционная модификация белков, которая приводит к сдвигу Мг относительно прогнозируемой, вычисляемой на основании перевода последовательности структурного гена в аминокислотную последовательность.

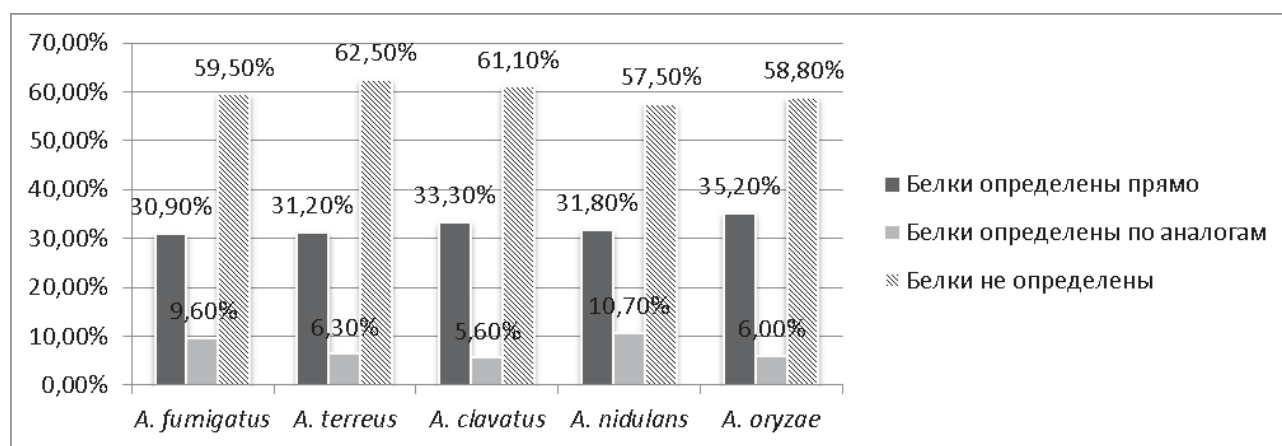


Рисунок 21 – Распределение выявленных белков в зависимости от результатов их определения

Примечание: «определены прямо» означает, что функцию белка выявили авторы, выполнившие изучение генома и протеома типовых штаммов, данные которых использовали в данной работе для аннотирования масс-спектров. «Определены по аналогам» - авторы, исследовавшие белок или производящий его структурный ген не дали ему описания, однако, удалось найти близкие структурные аналоги с известной функцией в данном исследовании

Поиск аналогов позволил выявить специфичность белков для отдельных таксономических групп, что представлено на рисунке 22. Следует учитывать, что на результат распределения, показанный на рисунке 22, оказывает влияние полнота изученности геномов и протеомов аспергиллов и других аскомицетов. Обращает на себя внимание сравнительно высокая доля белков, специфичных для отдельных видов аспергиллов (21,4 – 41,1%), что является базисом для использования MALDI-TOF-масс-спектрометрии в идентификации этих грибов, поскольку данные уникальные белки формируют пики с характеристиками, достаточными для распознавания специальным программным обеспечением масс-спектрометра.

Поскольку масс-спектры протеомов *Aspergillus* spp. имеют сходные черты, то следовало бы ожидать, что будут получены сходные результаты аннотирования масс-листов. Однако при завершении анализа это положение не подтвердилось. В таблице 16 приведены белки и группы белков, которые характерно повторялись у изученных штаммов. Наименьшее количество таких консервативных групп обнаружено у *A. terreus* и *A. oryzae*, что можно объяснить недостаточно полной проработкой анализа их геномов. Тем не менее, сопоставляя консервативные пики масс-спектров, можно выявить большее количество повторяющихся в экстрактах белков, даже в том случае, если данный белок еще не выявлен у конкретного вида методами геномики и протеомики.

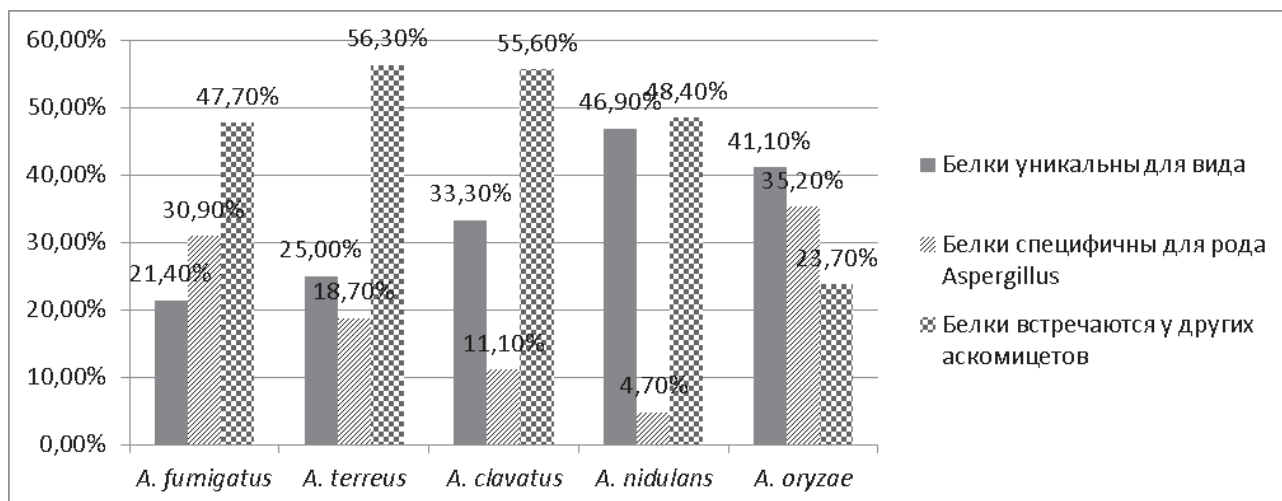


Рисунок 22 – Распределение выявленных белков по специфичности в отношении таксонов микромицетов

Таблица 16 – Некоторые белки, повторяющиеся в экстрагируемом протеоме изученных видов

Белки и группы белков	Виды				
	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. terreus</i>	<i>A. clavatus</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. oryzae</i>
Субъединицы Tim-Tom комплекса	+	—	+	+	—
Легкая цепь динеина	+	—	+	—	—
Глутаредоксин	—	—	+	+	—
Белки с доменом DUF543*	—	—	+	+	—
Субъединицы АТФ-синтазы	+	+	—	—	—
Гистон H2B	+	—	+	—	—
Zn-связывающие белки митохондрий*	—	+	—	—	+
Эукариотический фактор инициации	—	—	+	+	—
Протеинкиназы*	+	—	+	+	—

Примечание: * - группы белков, представители которых могут существенно отличаться по Mr

Распределение различных групп аминокислот, объединенных по принципу свойств радикала, в первичной структуре определенных белков и пептидов приведено на рисунке 23. Из рисунка отчетливо заметно, что описанное распределение почти не отличается у изученных видов. Средняя доля отдельных аминокислот в первичной структуре установленных полипептидов представлена на рисунках 24, 25 и 26.



Рисунок 23 – Средняя удельная доля групп аминокислот по типу радикала в первичной структуре идентифицированных полипептидов

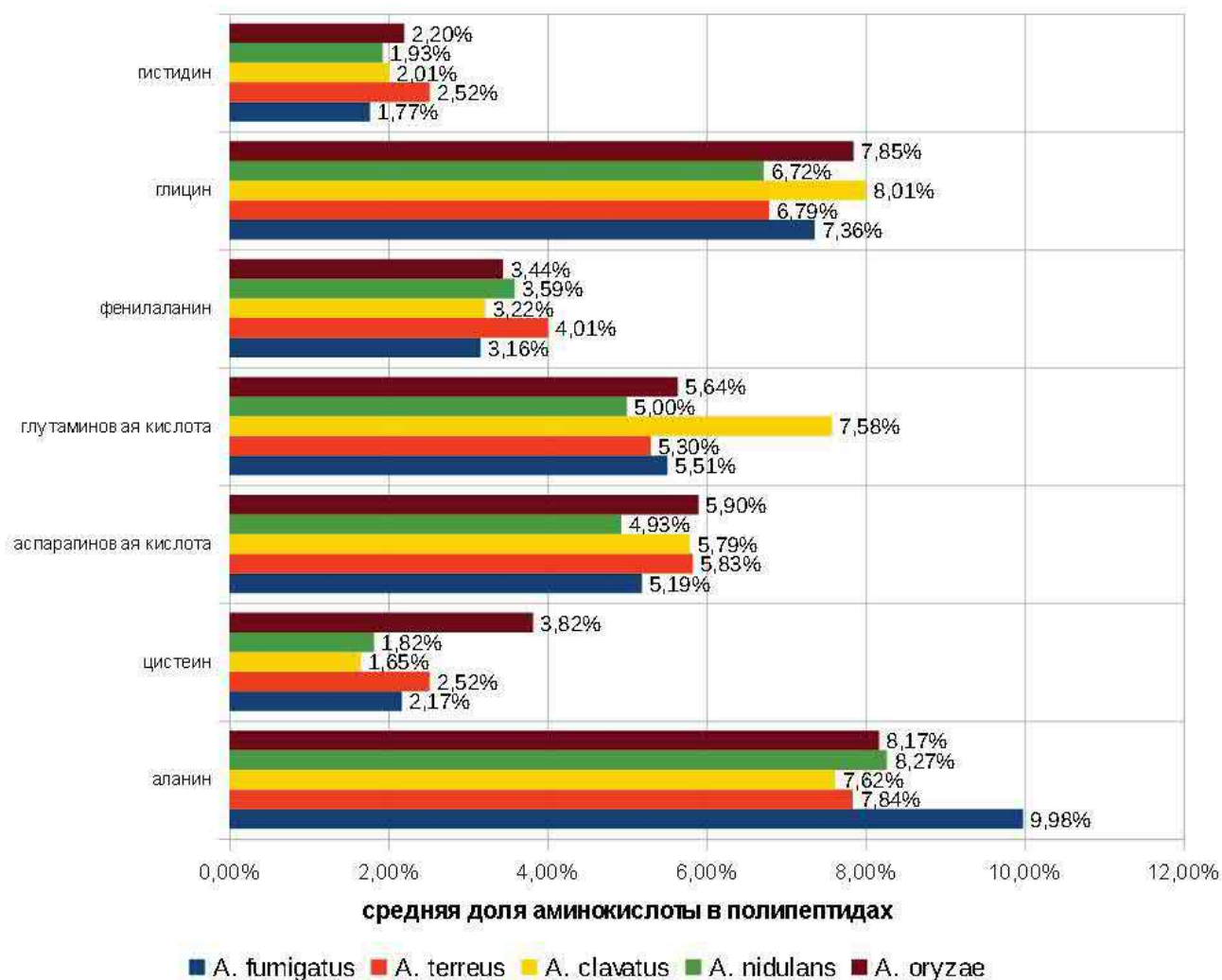


Рисунок 24 – Средняя удельная доля аминокислот в первичной структуре идентифицированных полипептидов

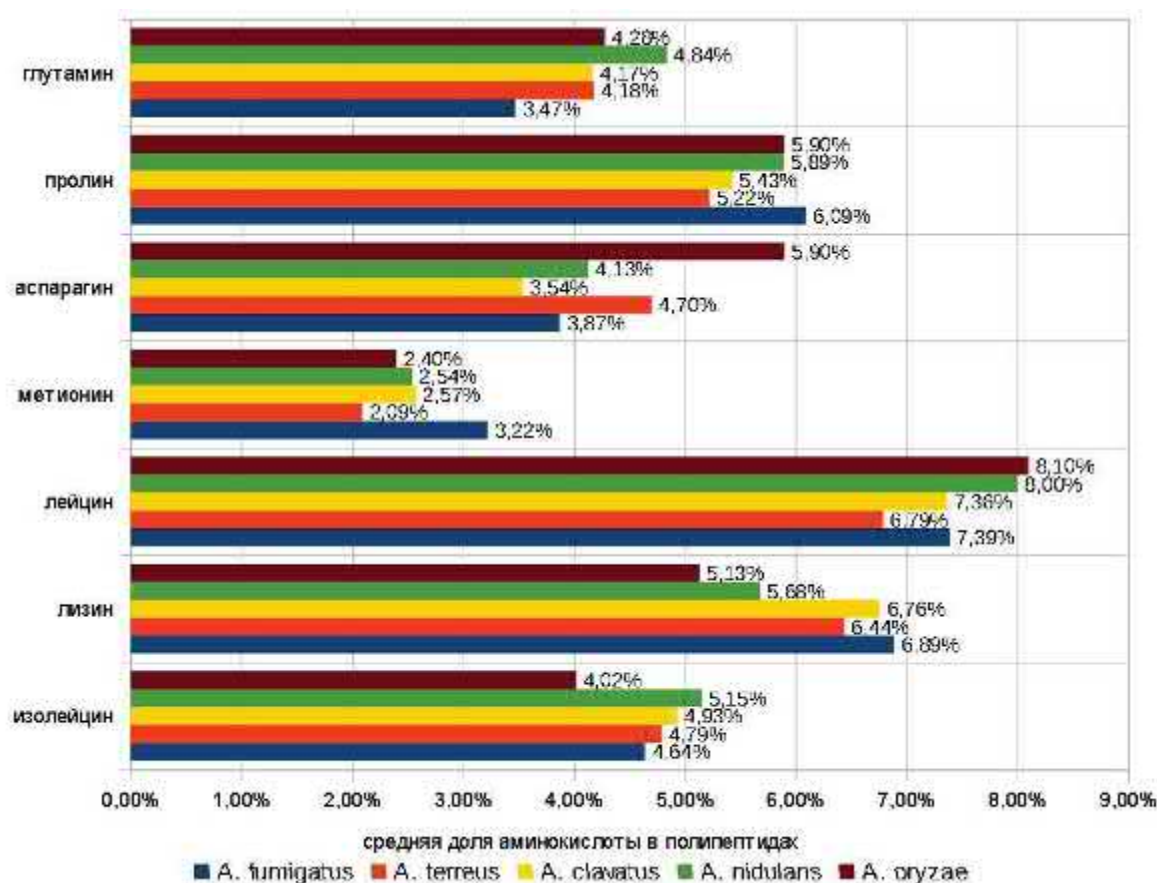


Рисунок 25 – Средняя удельная доля аминокислот в первичной структуре идентифицированных полипептидов

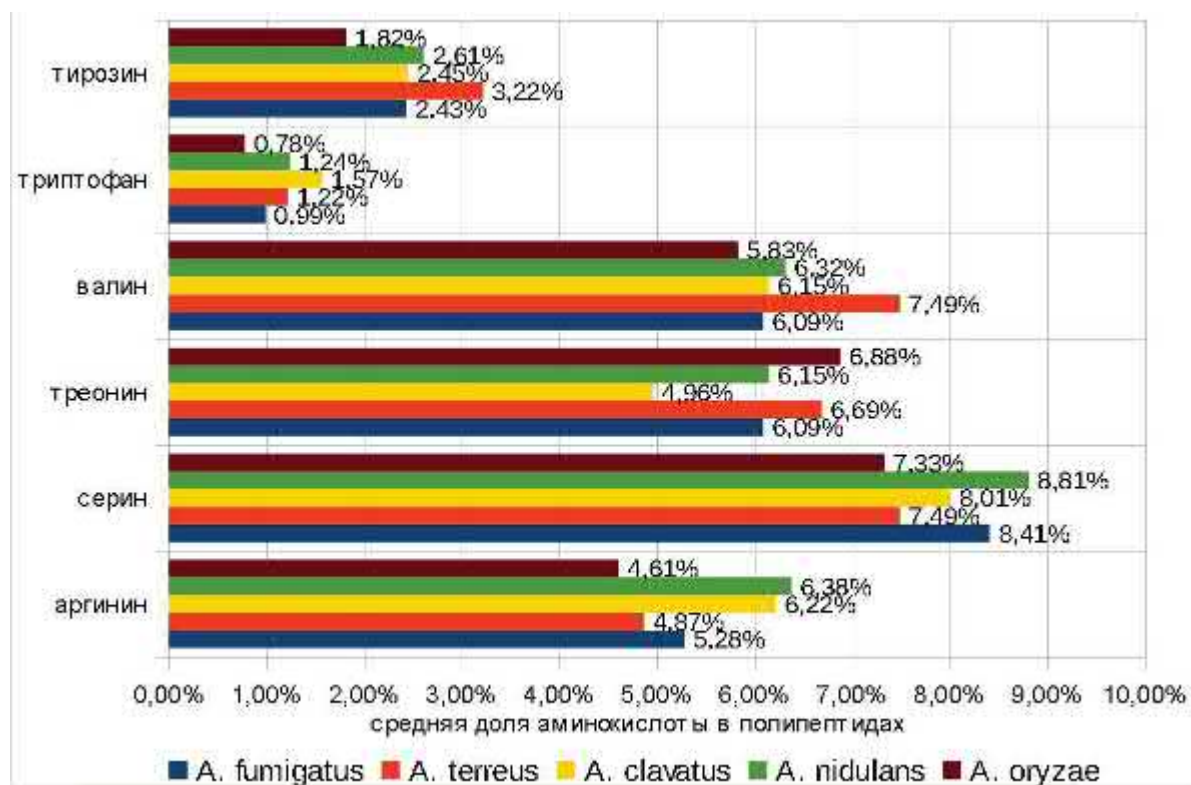


Рисунок 26 – Средняя удельная доля аминокислот в первичной структуре идентифицированных полипептидов

Как видно из приведенного на рисунках 24 - 26 распределения, аминокислотный состав аналитически изученных полипептидов также близок. Тем не менее, можно выделить некоторые яркие видоспецифичные особенности. В спектрообразующих полипептидах *A. fumigatus* относительно высокое содержание аланина (в сравнении с белками других видов), метионина, лизина и пролина, но при этом они бедны глутамином; *A. terreus* отличается наивысшим содержанием валина и тирозина; у *A. clavatus* выявили наивысшее содержание глутаминовой кислоты и триптофана, но наименьшую долю аспарагина. Спектрообразующим белкам *A. nidulans* присуще высокое содержание серина и глутамин. Для белков *A. oryzae* характерно высокое содержание цистеина и аспарагина, но доли в полипептидах изолейцина, лизина, триптофана и тирозина относительно низкие.

В целом наиболее частыми в изученных полипептидах аминокислотами оказались аланин, лейцин, серин и глицин; наименьшие доли в структуре характерны для триптофана. В структуре полипептидов не обнаружили селеноцистеина. «Размах» долей различных аминокислот среди спектрообразующих белков изученных видов приведен в таблице 17. Из таблицы видно, что наибольшей вариабельностью по содержанию в первичной структуре отличались глутаминовая кислота, аспарагин и аланин; наименьшей — триптофан и пролин.

Таблица 17 – Максимальная разница средних долей аминокислот в структуре спектрообразующих белков

Аминокислоты	Δ, %	Аминокислоты	Δ, %	Аминокислоты	Δ, %
аланин	2,35%	метионин	1,13%	тирозин	1,40%
цистеин	2,17%	аспарагин	2,36%	лейцин	1,31%
аспарагиновая кислота	0,97%	пролин	0,68%	триптофан	0,79%
глутаминовая кислота	2,58%	глутамин	1,37%	лизин	1,76%
фенилаланин	0,85%	аргинин	0,67%	изолейцин	1,13%
глицин	1,29%	серин	1,48%	валин	1,66%
гистидин	0,75%	треонин	1,92%		

Поскольку данные об аминокислотном составе получены *in silico*, а не в лабораторном опыте, а также ограничены поиском в первичной структуре небольших групп белков, приведенные распределения не являются адекватным отражением состава всего протеома. Однако, полученные сведения потенциально составляют основу для возможности предсказания действия различных источников аминокислот различного состава на формирование масс-спектра протеома. А решение последней задачи позволит использовать MALDI-TOF-MS, как инструмент изучения физиолого-биохимических реакций микроорганизмов.

3.2 Особенности показателей видовой идентификации среди представителей различных видов *Aspergillus* spp.

Выявили, что по результативности видовой идентификации с помощью MALDI-TOF-MS, выраженной качественно (факт определения принадлежности к определенному виду) и количественно (по показателю достоверности идентификации), различные группы аспергиллов — представителей разных видов и секций рода — достоверно различаются между собой. Качественно результаты идентификации различных представителей рода *Aspergillus* представлены в таблице 18, их анализ позволил установить, что связь принадлежности изолята к определенной секции рода с результативностью видовой идентификации статистически значима ($\chi^2_{\text{эмп}}(29,993) > \chi^2_{\text{крит}}(11,345)$ при $f=3$ ($p<0,01$)).

Статистическое исследование генеральной совокупности из 595 масс-спектров *Aspergillus* spp. (234 – *A. fumigatus*; 160 – секция *Nigri*; 123 – секция *Flavi*; 78 – представители других видов) выявило, что медианные значения этих признаков в выборках не равны (согласно расчета критерия Краскелла-Уоллиса: $H=15,432$; $\chi^2_{\text{эмп}}(15,432) > \chi^2_{\text{крит}}(5,991)$ при $f=2$ ($p<0,01$), уровень значимости $\alpha=0,05$).

Таблица 18 – Сравнение результатов идентификации масс-спектров среди разных видов *Aspergillus* spp.

Секции	Виды	Результат идентификации (количество масс-спектров)		Всего
		Score value $\geq 1,700$	Score value $\leq 1,699$	
Fumigati	<i>A. fumigatus</i>	181 (77,4%)	53 (22,6%)	234
Nigri	<i>A. niger</i> , <i>A. awamori</i> , <i>A. tubingensis</i>	115 (71,9%)	45 (28,1%)	160
Flavi	<i>A. flavus</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. tamaraii</i>	76 (61,8%)	47 (38,2%)	123
Другие секции	<i>Aspergillus</i> spp.	36 (46,2%)	42 (53,8%)	78
Итого		408 (68,6%)	187 (31,4%)	595

Попарное сравнение представителей отдельных групп показано в таблице 19. Как видно из таблицы, результативность идентификации успешно полученного масс-спектра различается для представителей различных секций рода *Aspergillus*, прежде всего в случаях попарного сравнения секций *Fumigati* и *Nigri* с другими секциями.

Таблица 19 – Выявление различий между группами *Aspergillus* spp. по показателю «Score Value»

Сравниваемые пары групп	Величина $\chi^2_{\text{эмп}}$	Соотношение $\chi^2_{\text{эмп}}$ и $\chi^2_{\text{крит}}$	V-критерий Крамера	Сила связи признаков по шкале Реза-Паркера
<i>A. fumigatus</i> и <i>Aspergillus</i> spp.	26,884	$\chi^2_{\text{эмп}} > \chi^2_{\text{крит}}$	0,294	связь средняя
<i>Aspergillus</i> spp. и секция <i>Nigri</i>	14,958	$\chi^2_{\text{эмп}} > \chi^2_{\text{крит}}$	0,251	связь средняя
<i>A. fumigatus</i> и секция <i>Flavi</i>	9,682	$\chi^2_{\text{эмп}} > \chi^2_{\text{крит}}$	0,165	связь слабая
<i>Aspergillus</i> spp. и секция <i>Flavi</i>	4,729	$\chi^2_{\text{эмп}} > \chi^2_{\text{крит}}$	0,153	связь слабая
секция <i>Nigri</i> и секция <i>Flavi</i>	3,224	$\chi^2_{\text{эмп}} < \chi^2_{\text{крит}}$	0,107	связь слабая
<i>A. fumigatus</i> и секция <i>Nigri</i>	1,525	$\chi^2_{\text{эмп}} < \chi^2_{\text{крит}}$	0,062	связь несущественная

Примечание: *Aspergillus* spp. — представители других секций, помимо перечисленных;
 $\chi^2_{\text{крит}}=3,841$ при $f=1$, $P=0,05$

3.3 Сопоставление результатов видовой идентификации аспергиллов, полученных при использовании MALDI-TOF-масс-спектрометрии, таргетного ДНК-секвенирования, а также морфологического исследования *Aspergillus* spp.

Получены данные сравнения точности результатов видовой идентификации аспергиллов (47 штаммов) на основе морфологического исследования, MALDI-TOF-масс-спектрометрии и путем ДНК-секвенирования (Таблица 20).

Таблица 20 – Результаты видовой идентификации модельной выборки штаммов *Aspergillus* spp. с использованием трех различных подходов

№	Штамм	Таргетное ДНК-секвенирование		MALDI-TOF-MS экстракта из культуры		Морфологическое исследование	
		Результат	Оценка, баллы	Результат	Оценка, баллы	Результат (указан гарантированный результат, в скобках – предполагаемый результат)	Оценка, баллы
1	F-109	<i>A. terreus</i>	5	<i>A. terreus</i>	5	<i>Aspergillus</i> sp. группа XII (« <i>A. terreus</i> »)	3
2	F-1123	<i>A. terreus</i>	5	<i>A. terreus</i>	5	<i>Aspergillus</i> sp.	1
3	F-1275	<i>A. terreus</i>	5	<i>A. terreus</i>	5	<i>Aspergillus</i> sp. группа XII (« <i>A. terreus</i> »)	3
4	К/абсцесс	<i>A. flavus</i>	5	<i>A. flavus</i>	5	<i>Aspergillus</i> sp. группа X (« <i>A. flavus</i> »)	3
5	F-1498	<i>A. flavus</i>	5	<i>A. flavus</i>	5	<i>Aspergillus</i> sp. группа X (« <i>A. flavus</i> »)	3
6	F-1332	<i>A. fumigatus</i>	5	<i>A. fumigatus</i>	5	<i>Aspergillus</i> sp. группа I (« <i>A. fumigatus</i> »)	3
7	F-1324	<i>A. flavus</i>	5	<i>A. flavus</i>	5	<i>Aspergillus</i> sp. группа X (« <i>A. flavus</i> »)	3
8	F-1510	<i>A. flavus</i>	5	<i>A. flavus</i>	5	<i>Aspergillus</i> sp. группа X (« <i>A. flavus</i> »)	3

Продолжение таблицы 20

№	Штамм	Таргетное ДНК-секвенирование		MALDI-TOF-MS экстракта из культуры		Морфологическое исследование	
		Результат	Оценка, баллы	Результат	Оценка, баллы	Результат (указан гарантированный результат, в скобках – предполагаемый результат)	Оценка, баллы
9	F-1375	<i>A. flavus</i>	5	<i>A. flavus</i>	5	<i>Aspergillus sp.</i> группа X (« <i>A. flavus</i> »)	3
10	F-1388	<i>A. flavus</i>	5	<i>A. flavus</i>	5	<i>Aspergillus sp.</i> группа X (« <i>A. flavus</i> »)	3
11	F-1284	<i>A. niger</i>	5	<i>A. niger</i>	5	<i>Aspergillus sp.</i> группа VIII (« <i>A. niger</i> »)	3
12	F-1446	<i>A. niger/awamori</i>	4	<i>A. niger</i>	4	<i>Aspergillus sp.</i> группа VIII (« <i>A. niger</i> »)	3
13	F-1329	<i>A. awamori</i>	5	<i>A. niger</i>	0	<i>Aspergillus sp.</i> группа VIII (« <i>A. niger</i> »)	3
14	F-1447	<i>A. niger/awamori</i>	4	<i>A. niger</i>	4	<i>Aspergillus sp.</i> группа VIII (« <i>A. niger</i> »)	3
15	F-1345	<i>A. niger</i>	5	<i>A. niger</i>	5	<i>Aspergillus sp.</i> группа VIII (« <i>A. niger</i> »)	3
16	F-1445	<i>A. awamori</i>	5	<i>A. niger</i>	0	<i>Aspergillus sp.</i> группа VIII (« <i>A. niger</i> »)	3
17	F-1448	<i>A. niger</i>	5	<i>A. niger</i>	5	<i>Aspergillus sp.</i> группа VIII (« <i>A. niger</i> »)	3
18	F-1281	<i>A. awamori</i>	5	<i>A. niger</i>	0	<i>Aspergillus sp.</i> группа VIII (« <i>A. niger</i> »)	3
19	F-1249	<i>A. niger</i>	5	<i>A. niger</i>	5	<i>Aspergillus sp.</i> группа VIII (« <i>A. niger</i> »)	3
20	F-1248	<i>A. fumigatus</i>	5	<i>A. fumigatus</i>	5	<i>Aspergillus sp.</i> группа I (« <i>A. fumigatus</i> »)	3
21	F-1277	<i>A. fumigatus</i>	5	<i>A. fumigatus</i>	5	<i>Aspergillus sp.</i> группа I (« <i>A. fumigatus</i> »)	3
22	F-1268	<i>A. fumigatus</i>	5	<i>A. fumigatus</i>	5	<i>Aspergillus sp.</i> группа I (« <i>A. fumigatus</i> »)	3
23	F-1335	<i>A. fumigatus</i>	5	<i>A. fumigatus</i>	5	<i>Aspergillus sp.</i> группа I (« <i>A. fumigatus</i> »)	3
24	F-1437	<i>A. fumigatus</i>	5	<i>A. fumigatus</i>	5	<i>Aspergillus sp.</i> группа I (« <i>A. fumigatus</i> »)	3
25	F-1279	<i>A. fumigatus</i>	5	<i>A. fumigatus</i>	5	<i>Aspergillus sp.</i> группа I (« <i>A. fumigatus</i> »)	3
26	F-1377	<i>A. fumigatus</i>	5	<i>A. fumigatus</i>	5	<i>Aspergillus sp.</i> группа I (« <i>A. fumigatus</i> »)	3
27	F-1114	<i>A. fumigatus</i>	5	<i>A. fumigatus</i>	5	<i>Aspergillus sp.</i> группа I (« <i>A. fumigatus</i> »)	3
28	F-1384	<i>A. fumigatus</i>	5	<i>A. fumigatus</i>	5	<i>Aspergillus sp.</i> группа I (« <i>A. fumigatus</i> »)	3
29	F-1327	<i>A. fumigatus</i>	5	<i>A. fumigatus</i>	5	<i>Aspergillus sp.</i> группа I (« <i>A. fumigatus</i> »)	3
30	F-1266	<i>A. fumigatus</i>	5	<i>A. fumigatus</i>	5	<i>Aspergillus sp.</i> группа I (« <i>A. fumigatus</i> »)	3
31	F-1334	<i>A. fumigatus</i>	5	<i>A. fumigatus</i>	5	<i>Aspergillus sp.</i> группа I (« <i>A. fumigatus</i> »)	3
32	F-1108	<i>A. fumigatus</i>	5	<i>A. fumigatus</i>	5	<i>Aspergillus sp.</i> группа I (« <i>A. fumigatus</i> »)	3
33	F-1267	<i>A. fumigatus</i>	5	<i>A. fumigatus</i>	5	<i>Aspergillus sp.</i> группа I (« <i>A. fumigatus</i> »)	3
34	F-1333	<i>A. fumigatus</i>	5	<i>A. fumigatus</i>	5	<i>Aspergillus sp.</i> группа I (« <i>A. fumigatus</i> »)	3
35	F-1325	<i>A. fumigatus</i>	5	<i>A. fumigatus</i>	5	<i>Aspergillus sp.</i> группа I (« <i>A. fumigatus</i> »)	3
36	Еж/БАЛ	<i>A. nidulans/tetrazonus</i>	4	<i>A. nidulans</i>	4	<i>Aspergillus sp.</i> секция Nidulantes (« <i>A. nidulans</i> »)	2
37	F-1511	<i>A. flavus</i>	5	<i>A. flavus</i>	5	<i>Aspergillus sp.</i> группа X (« <i>A. flavus</i> »)	3
38	F-1494	<i>A. candidus</i>	5	<i>A. candidus</i>	5	<i>Aspergillus sp.</i> секция Candidi (« <i>A. candidus</i> »)	2

Продолжение таблицы 20

№	Штамм	Таргетное ДНК-секвенирование		MALDI-TOF-MS экстракта из культуры		Морфологическое исследование	
		Результат	Оценка, баллы	Результат	Оценка, баллы	Результат (указан гарантированный результат, в скобках – предполагаемый результат)	Оценка, баллы
39	F-1250	<i>E. amstelodami</i>	5	<i>E. amstelodami</i>	5	<i>Eurotium</i> sp. (« <i>E. herbariorum</i> »)	2
40	F-1382	<i>A. flavus</i>	5	<i>A. flavus</i>	5	<i>Aspergillus</i> sp. группа X (« <i>A. flavus</i> »)	3
41	F-1376	<i>A. tubingensis</i>	5	<i>A. niger</i>	0	<i>Aspergillus</i> sp. группа VIII (« <i>A. niger</i> »)	3
42	F-1444	<i>A. awamori</i>	5	<i>A. niger</i>	0	<i>Aspergillus</i> sp. группа VIII (« <i>A. niger</i> »)	3
43	F-1287	<i>A. sydowii</i>	5	<i>A. sydowii</i>	5	<i>Aspergillus</i> sp. секция Versicolores (« <i>A. versicolor</i> »)	2
44	F-1115	<i>A. sydowii</i>	5	<i>A. sydowii</i>	5	<i>Aspergillus</i> sp. секция Versicolores (« <i>A. versicolor</i> »)	2
45	F-1336	<i>A. nidulans</i>	5	<i>A. nidulans</i>	5	<i>Aspergillus</i> sp. секция Nidulantes (« <i>A. nidulans</i> »)	3
46	К/БАЛ	<i>A. flavus</i>	5	<i>A. flavus</i>	5	<i>Aspergillus</i> sp. группа XI (« <i>A. tamarii</i> »)	0
47	П/БАЛ	<i>A. flavus</i>	5	<i>A. flavus</i>	5	<i>Aspergillus</i> sp. группа XI (« <i>A. tamarii</i> »)	0
48	Ч-18	<i>N. hiratsukae</i>	5	<i>A. fumigatus</i>	0	<i>Aspergillus</i> sp. группа III (« <i>N. fischeri</i> »)	0
Показатели рядов балльных оценок по трем методам идентификации (обозначения стандартные)							
–	М	–	4,94	–	4,31	–	2,67
–	m	–	0,03	–	0,24	–	0,12
–	σ	–	0,24	–	1,65	–	0,8
–	Mo	–	5	–	5	–	3
–	Me	–	5	–	5	–	3
–	cV	–	4,9%	–	38,21%	–	29,97%

Руководствовались положением о ДНК-секвенировании избранных генов, как о «золотом стандарте» видовой идентификации мицелиальных грибов согласно данным таблицы 20, альтернативные методы отличались следующими долями ошибочных результатов: MALDI-TOF-MS – 10,64% («сходимость» – 89,36%); морфологическое исследование – 20,5% («сходимость» – 82,98%). При сравнении результатов видовой идентификации аспергиллов на выборке из 238 штаммов расхождение MALDI-TOF-MS и культурально-морфологического исследования составило 3,78% (в основном при различении *A. flavus*, *A. oryzae* и *A. tamarii* между собой).

Расчёт критерия Фридмана по результатам балльных оценок из таблицы 20 показал, что между тремя предпринятыми подходами к видовой идентификации аспергиллов имеются статистически значимые различия (эмпирическое значение $\chi^2_{\text{т}}=57,8229$; критическое табличное значение в этом случае $\chi^2_{\text{т}}=9,125$ – по Neave H.R., 1978; фактический уровень значимости $p<0,00001$). Парные сравнения трех методов идентификации с помощью критерия Уилкоксона позволили установить следующие особенности. Таргетное ДНК-секвенирование по точности превосходит MALDI-TOF-масс-спектрометрию клеточного экстракта, хотя следует заметить, что данное положение при полученном значении «ненулевых» сдвигов статистически находится

«на границе области значимости» ($W_{\text{эмп.}} = W_{\text{крит.}} = 0$ при $p < 0,05$). С учетом этого обстоятельства можно заключить, что по итогам изучения модельной выборки метод идентификации аспергиллов на основе MALDI-TOF-масс-спектрометрии приближается по точности к методу на основе ДНК-секвенирования, но его возможности пока ограничены физико-химическим сходством близкородственных видов *Aspergillus* spp., проявляющимися при заданных режимах подготовки образцов и съемки масс-спектров. Морфологическая идентификация значимо уступает по точности как подходу на основе ДНК-секвенирования ($W_{\text{эмп.}} < W_{\text{крит.}}$; $W_{\text{эмп.}} = 0$, $N_{\text{«ненулевых» сдвигов}} = 48$, $W_{\text{крит.}} = 274$ при $\alpha = 0,001$), так и MALDI-TOF-масс-спектрометрии ($W_{\text{эмп.}} < W_{\text{крит.}}$; $W_{\text{эмп.}} = 200$, $N_{\text{«ненулевых» сдвигов}} = 47$, $W_{\text{крит.}} = 260$ при $\alpha = 0,001$). Обращает внимание, что разница критических табличных и эмпирических значений больше в случае сопоставления морфологического исследования с ДНК-секвенированием, что указывает на большую статистическую значимость имеющихся различий. Следует отметить, что с учетом сравнительно больших количеств «ненулевых» сдвигов и факта приближения статистики Уилкоксона к нормальному распределению в данных случаях уместно использования для оценки значимости изменений Z-критерий, однако, для введенной нами бальной оценки точности идентификации возможность применения этого показателя следует изучить в дальнейшем.

В результате проведенного исследования технологии видовой идентификации возбудителей аспергиллеза следует ранжировать в следующем порядке по мере убывания точности: таргетное ДНК-секвенирование, линейная MALDI-TOF-масс-спектрометрия клеточного экстракта, морфологическое исследование. Данное положение подкрепляется не только избранными статистическими критериями, но и наглядно проявляется различиями среднеарифметических показателями бальной оценки для трех методов. Интересно, что для ДНК-секвенирования получили наименьший коэффициент вариации, указывающий на универсальность данного подхода вне зависимости от фактической видовой принадлежности возбудителя. Для подхода на основе MALDI-TOF-масс-спектрометрии, напротив, коэффициент вариации наивысший – результативность метода для разных видов возбудителей (в данном случае – секции *Nigri*) варьирует в связи с особенностями наполнения баз (библиотек) типовых масс-спектро-профилей. Что касается морфологического исследования – здесь гарантированная точность результата ограничена отдельными группами видов и секциями рода *Aspergillus*. Такие ограничения могут быть отчасти преодолимы путем введения некоторых дополнительных фенотипических тестов (посев на дифференциальные среды расширенного состава, подбор условий формирования склероциев, температурный диапазон роста, «твердофазный» тест Эрлиха и др.), однако, подобные исследования не удобны для поточной практики диагностических лабораторий не-референс-типа.

При рассмотрении масс-спектрометрической идентификации *Aspergillus spp.*, как метода лабораторного исследования для диагностики *in vitro*, представляет интерес расчёт показателей клинической информативности согласно действующим регламентирующим документам (ГОСТ Р 53022.3-2008). Схема представления данных и распределенные согласно этой схеме исходные данные для расчета показателей эффективности помещены в таблицах 21 и 22 соответственно, а собственно значения показателей эффективности – в таблице 23. В таблице 21 обозначено: а – число изолятов данного вида, правильно классифицированные с помощью анализируемого метода (истинно положительные); b – число изолятов других видов, неверно отнесенные анализируемым методом к конкретному виду (ложно положительные); с – число изолятов данного вида, неверно классифицированные с помощью анализируемого метода (ложно отрицательные); d – число изолятов других видов, правильно классифицированные с помощью анализируемого метода (истинно отрицательные)

Таблица 21 – Структура представления исходных данных для расчета показателей эффективности MALDI-TOF-масс-спектрометрии, как метода видовой идентификации *Aspergillus spp.*

Результат идентификации с использованием MALDI-TOF-MS	Результат идентификации методом таргетного ДНК-секвенирования		Всего
Положительный результат (отнесение к данному виду)	a	b	a+b
Отрицательный результат (отнесение к другим видам)	c	d	c+d
Всего	a+c	b+d	a+b+c+d

Таблица 22 – Промежуточный этап расчета показателей эффективности MALDI-TOF-масс-спектрометрии, как метода видовой идентификации *Aspergillus spp.*, в соответствии с порядком представления согласно таблице 21

Результат идентификации с использованием MALDI-TOF-MS	Результат идентификации методом таргетного ДНК-секвенирования регионов ITS и β -тубулина (с поправкой для <i>A. oryzae</i> и <i>A. tamarii</i>)		Всего
	число изолятов данного вида	число изолятов других видов	
Показатели видовой идентификации с помощью MALDI-TOF-MS для <i>A. fumigatus</i>			
Положительный результат (отнесение к данному виду)	17	0	17
Отрицательный результат (отнесение к другим видам)	0	30	30
Всего	17	30	47

Продолжение таблицы 22

Результат идентификации с использованием MALDI-TOF-MS	Результат идентификации методом таргетного ДНК-секвенирования регионов ITS и β -тубулина (с поправкой для <i>A. oryzae</i> и <i>A. tamaritii</i>)		Всего
	число изолятов данного вида	число изолятов других видов	
Показатели видовой идентификации с помощью MALDI-TOF-MS для <i>A. niger</i>			
Положительный результат (отнесение к данному виду)	6	5	11
Отрицательный результат (отнесение к другим видам)	0	36	36
Всего	6	41	47
Показатели видовой идентификации с помощью MALDI-TOF-MS для <i>A. flavus</i>			
Положительный результат (отнесение к данному виду)	7	3	10
Отрицательный результат (отнесение к другим видам)	0	37	37
Всего	7	40	47

Таблица 23 – Показатели эффективности MALDI-TOF-масс-спектрометрии клеточного экстракта, как метода видовой идентификации *Aspergillus spp.*

Показатели эффективности теста	Значения показателей эффективности для основных видов возбудителей аспергиллеза		
	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>
Диагностическая чувствительность	100%	100%	100%
Диагностическая специфичность	100%	87,8%	92,5%
Прогностичность положительного результата	100%	54,5%	70%
Прогностичность отрицательного результата	100%	100%	100%

Полученные показатели эффективности оказались наивысшими для *A. fumigatus* в силу того обстоятельства, что в модельную выборку не попали криптоические виды секции *Fumigati*, их значение в данном случае несколько идеализировано. Второй фактор, повлиявший на данный результат, очевидно, кроется в разной результативности экстракции белков, которая происходит менее продуктивно у *A. flavus* и *A. niger* по причине наличия более толстой клеточной стенки.

Графическое представление видового состава, установленного на основании данных коллекционных штаммов, идентифицированных по морфологическим критериям (исходный), а

также в результате пересмотра идентификации с учетом применения комплексного подхода, включая углубленное морфологическое исследование, MALDI-TOF-масс-спектрометрию и таргетное ДНК-секвенирование, помещено на рисунке 27. Уточнение видового состава позволило опровергнуть начальное представление о гомогенности клинических изолятов аспергиллов секции *Nigri*, *Flavi* и *Usti*, что проявилось выявлением таких видов, как *A. tamaritii*, *A. awamori*, *A. niger/awamori-complex*, *A. tubingensis*, *A. calidoustus*. Среди других таксономических изменений следует обратить внимание на реидентификацию *Neosartorya fischeri*, как *N. hiratsukae*; *Aspergillus sp.*, как *Eurotium rubrum*; *A. glaucus*, как *E. amstelodami*, а также один из штаммов *A. flavus*, как *Eurotium repens*. Все штаммы «*A. versicolor*» переопределены и отнесены к виду *A. sydowii*, а изоляты *A. nidulans* по данным таргетного ДНК-секвенирования отнесены к комплексу *A. nidulans/tetrazonus* в силу сходства исследованных локусов генома этих близкородственных видов.

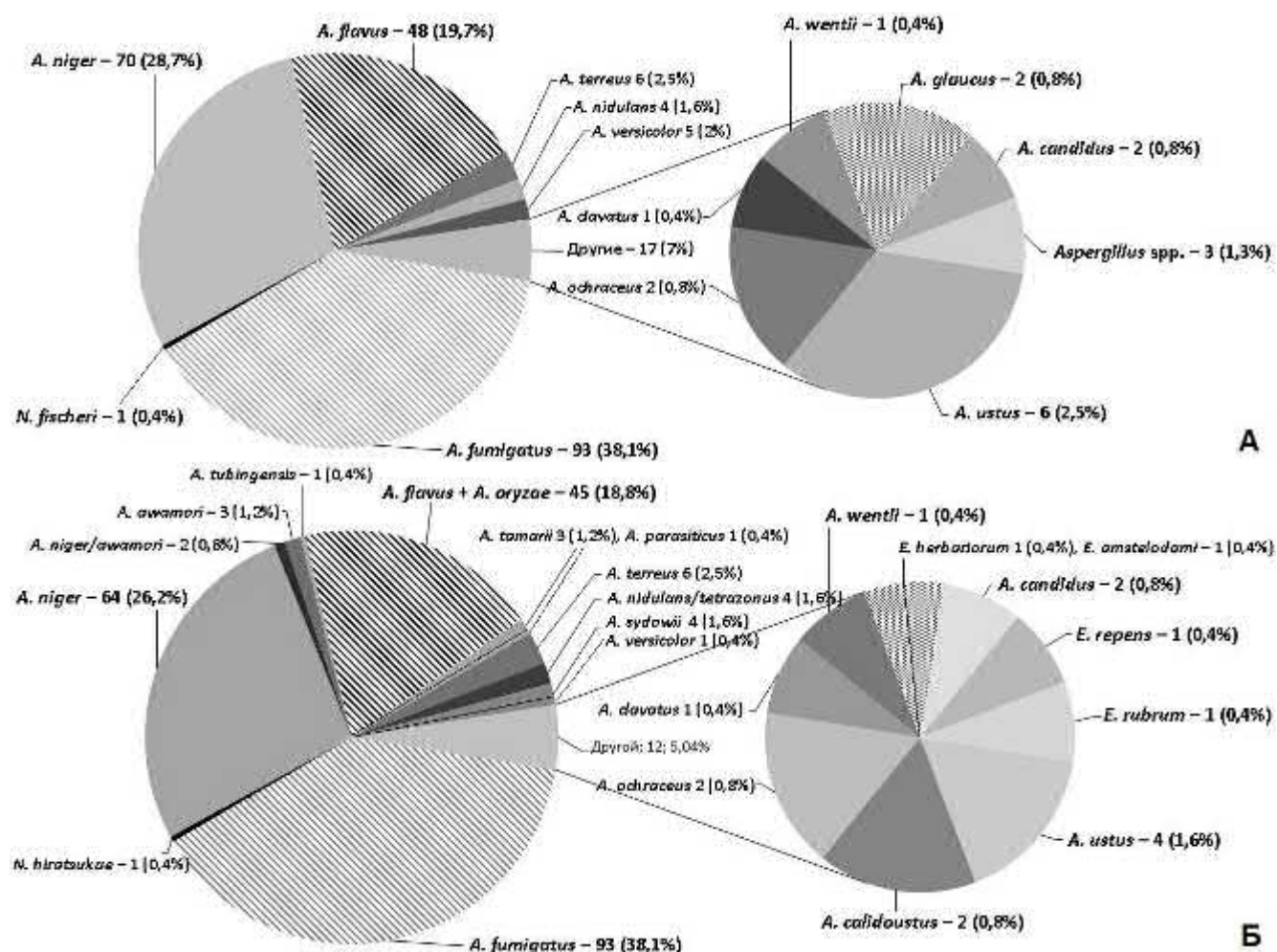
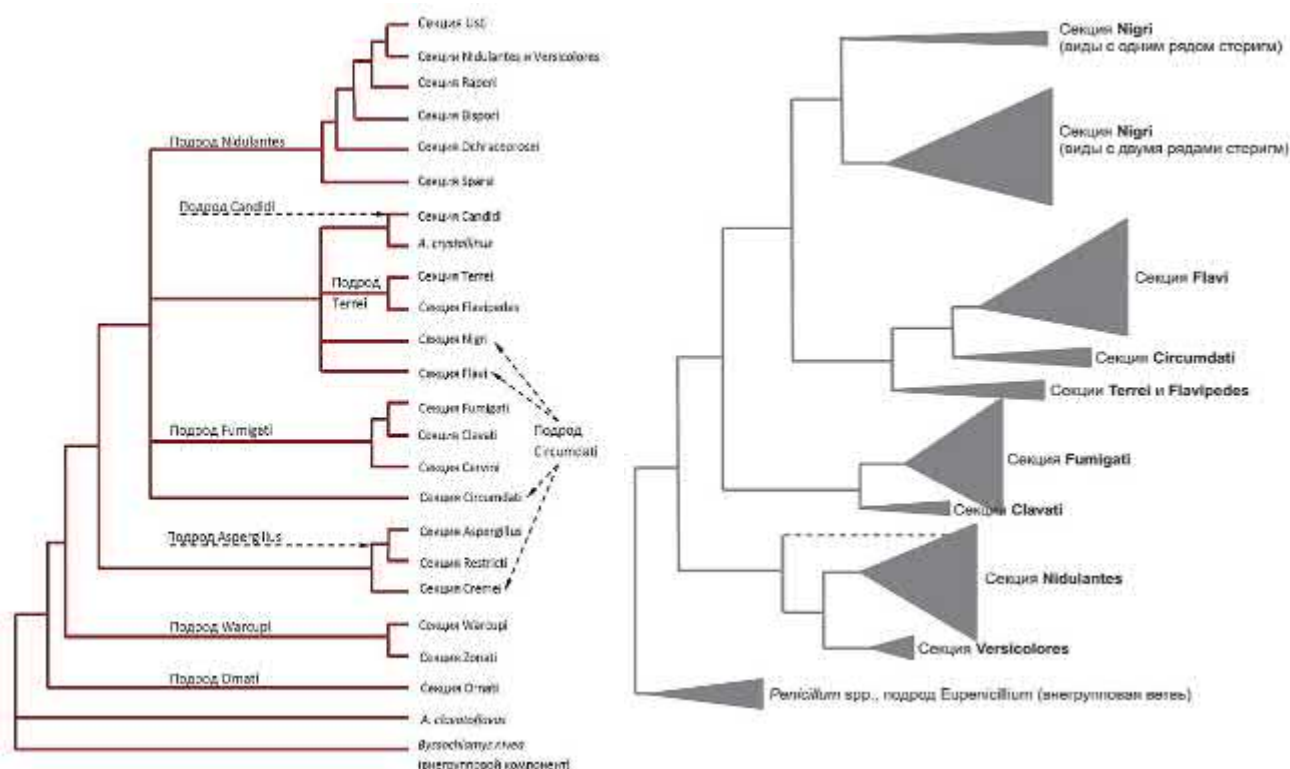


Рисунок 27 – Уточнение видового состава изученной выборки штаммов *Aspergillus* spp.

Примечание: А – Исходный видовой состав изученной коллекции штаммов (на основании культурально-морфологическом исследовании); Б – Актуализированный видовой состав изученной рабочей коллекции штаммов, пересмотренный с помощью таргетного ДНК-секвенирования, MALDI-TOF-масс-спектрометрии и расширенного морфологического исследования

3.4 Аналитическая основа MALDI-TOF-масс-спектрометрии клеточного экстракта, как метода видовой идентификации и дифференцировки *Aspergillus* spp.

Полученные в данном экспериментальном исследовании результаты идентификации группы штаммов *Aspergillus* spp., а также рассчитанные показатели статистического сравнения с другими методами и клинической информативности, требуют подкрепления путем поиска, установления связи масс-спектрометрических признаков этих грибов с положением конкретных видов в существующей системе рода *Aspergillus*. Поскольку только такой подход может предопределить реальные возможности метода, если бы экспериментальную выборку штаммов стремились увеличить. В целях реализации данного раздела работы на основе модельной выборки масс-спектров *Aspergillus* spp. построили 56 дендрограмм, отличающиеся различными комбинациями методов измерения дистанции и связывания. Для выбора алгоритма иерархической кластеризации определяли наличие группировки масс-спектров из штаммов одного вида в единые клады, а также сопоставляли оригинальные распределения видов (масс-спектров), с дендрограммами, выполненными на основе кластеризации данных ДНК-секвенирования нескольких локусов генома с использованием байесовской статистики, которые приведены в монографии Varga J. и Samson R.A., 2008 (Рисунок 28) [298].



А. В основе - кластеризация последовательностей 3-х локусов генома
Б. В основе - кластеризация последовательностей 10-ти локусов генома
 Рисунок 28 – Данные геносистематики рода *Aspergillus*, использованные в качестве основания для оценки точности иерархической кластеризации масс-спектров

На рисунке 28 под п. «А» обозначено иерархическое древо максимальной парсимонии, построенное на основе ДНК-секвенирования 3 локусов представителей различных секций рода *Aspergillus* spp. (кальмодулин, РНК-β-полимераза, часть 28S рДНК); в п. «Б» приведено иерархическое древо максимальной парсимонии, построенное на основе ДНК-секвенирования 10 локусов представителей различных секций рода *Aspergillus* spp. (LSU, β-тубулин, eIF-2, HSP70C, TCP-1, митохондриальный белок теплового шока 70kDa, белок, несущий ДНК-зависимый АТФазный домен семейства SNF; CDC42, АТФаза типа Р). Показаны упрощенные схемы оригинальных филограмм, помещенных в монографии Varga J. и Samson R.A., 2008 [298]. В результате анализа группировки видов оказалось, что наиболее приближено к эволюционному распределению древо иерархической кластеризации, построенное с помощью комбинации метода измерения дистанции по Минковскому и алгоритма связывания по Дж. Уорду (Рисунок 29). Как видно из представленной дендрограммы (филограммы) при использовании избранного метода иерархической кластеризации произошло распределение масс-спектров из культур аспергиллов с учетом не только видовой принадлежности, но также в определенной степени с сохранением принадлежности к секциям и под родам. Тем не менее, обнаружили также и ряд специфических особенностей. Подрод *Circumdati* в данном случае «расщепился», слагающие его секции оказались в неблизких кладах, но и при различных филогенетических исследованиях секции этого подрода также не всегда группируются вместе (Рисунок 28, А).

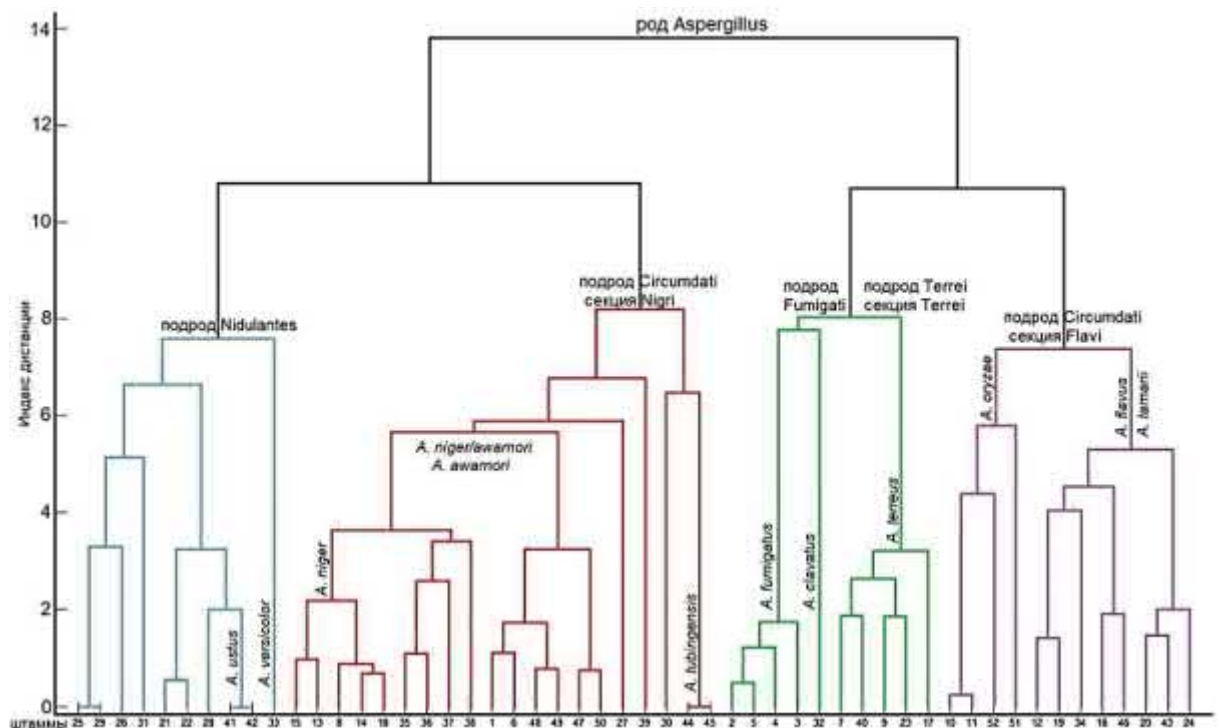


Рисунок 29 – Филограмма, полученная путем иерархической кластеризации масс-спектров *Aspergillus* spp. по эмпирически избранному методу

Примечание: на вертикальной оси отмечен показатель дистанции, на горизонтальной – условные номера штаммов модельной выборки

В силу близких масс-спектрометрических свойств оказались в одной кладе *A. flavus* и *A. tamarii* (последний при MALDI-TOF-масс-спектрометрии удается определить, как *A. flavus*).

Для проверки полученного на модельной выборке метода иерархической кластеризации генеральную совокупность масс-спектров разделили в соответствии с тремя диапазонами значений показателя достоверности идентификации («Score Value», SV): 1-ая группа с $SV \geq 2,000$; 2-ая группа с SV от 1,700 до 1,999; 3-я группа с $SV \leq 1,699$. Данное деление произвели для более удобного чтения результирующих дендрограмм (1), а также, чтобы избежать ошибок группировки, связанных с наличием в выборках разнокачественных спектров. Результат кластеризации масс-спектров первой группы приведен на рисунке 30. На представленной дендрограмме отчетливо видно, что подразделение большинства масс-спектров трех ведущих видов возбудителей аспергиллеза (*A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*) оказалось четким. Однако в кладе *A. niger* оказался масс-спектр штамм *A. nidulans* О/мокрота, при детальном анализе перечня типовых масс-спектро-профилей, сходных с оригинальным МСП, выявили совпадение с *A. niger* DSM 737 (SV=1,493). Интересно, что масс-спектры *A. terreus* оказались не в изолированной кладе, а разделились на 2 группы, клады которых отходят от общих узлов ветвления с *A. niger*-complex и *A. fumigatus*. Группы, соответственно, обозначили «нигроподобные» и «фумигатоподобные» *A. terreus*. Чтобы понять, почему эти две группы оказались в разных кладах, а также наличие особой клады из масс-спектров разных видов, возникающей из того же узла ветвления, что и «фумигатоподобные» *A. terreus*, выполнили сопоставление масс-спектров указанных групп в виде псевдоголей (Рисунок 30). Дополнительно сформировали псевдоголи из масс-спектров *A. niger* РКПГ F-1322 и *A. fumigatus* РКПГ F-1277. Из проведенного сопоставления различия между двумя группами *A. terreus* видны не четко, но заметно, что в диапазоне Mr низкомолекулярных ионов 2 – 6 kDa композиции масс-спектров двух групп не идентичны. Для поиска дальнейших различий групп *A. terreus* в обеих группах выполнили наложение масс-спектров в реальном масштабе, результирующие картины показаны на рисунке 31. Как оказалось, у группы «фумигатоподобных» *A. terreus* в низкомолекулярном диапазоне находится высокий пик с $m/z \approx 3,4$ kDa, доминирующий по интенсивности над всеми компонентами спектра. А в целом низкомолекулярный диапазон (диапазон пептидов) характеризуется умеренной детализацией. Родоспецифичный комплекс отчетливо определяется, но уступает по интенсивности указанному пику пептидного диапазона.

Группа «нигроподобных» *A. terreus*, напротив, отличается тем, что наибольшей интенсивности у них достигает именно родоспецифичный комплекс. Пептидный диапазон спектра в этой группе содержит умеренно интенсивные пики, но отличается хорошей детализацией.

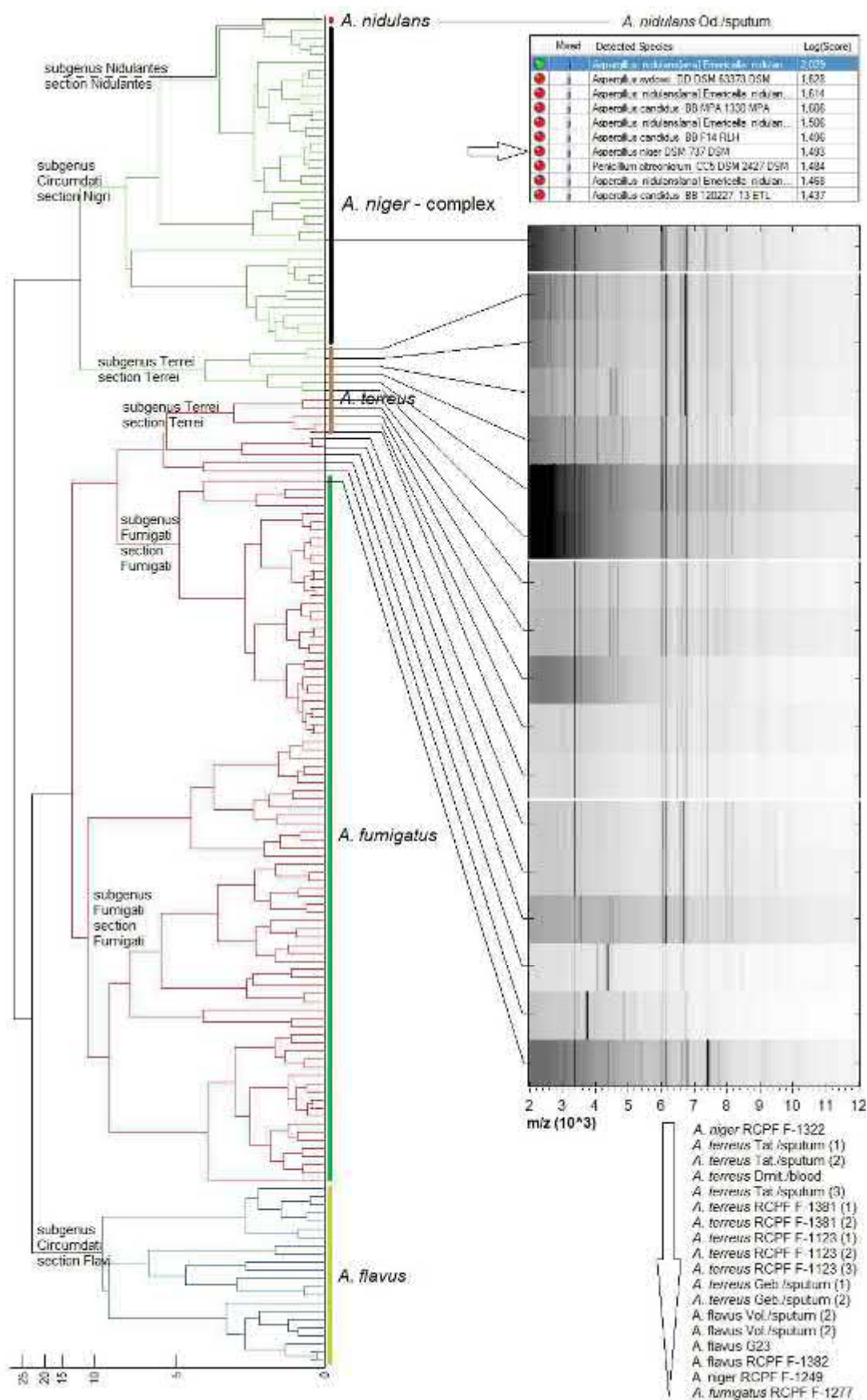


Рисунок 30 – Дендрограмма, описывающая группировку масс-спектров *Aspergillus* spp. из выборки с $SV \geq 2,000$

Примечание: section – секция; subgenus – подрод

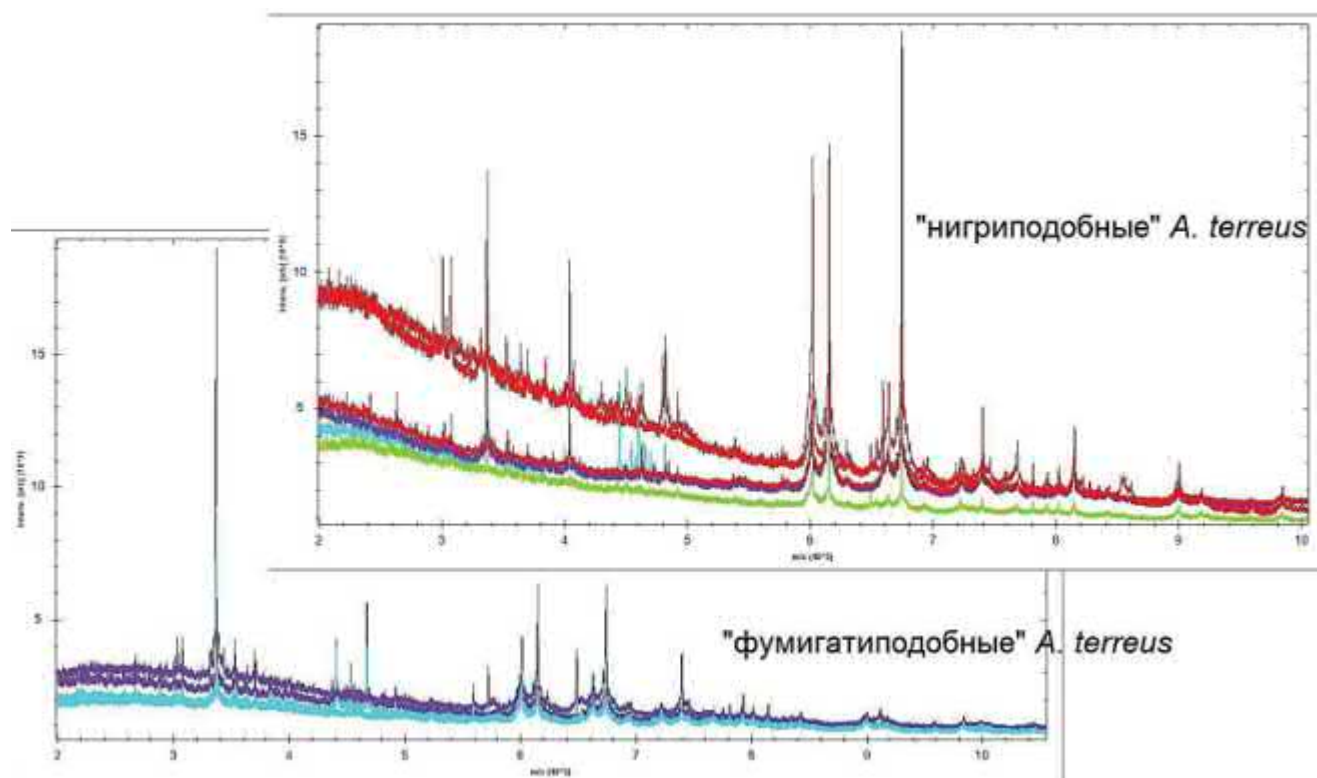


Рисунок 31 – Сравнение композиций масс-спектров двух групп *A. terreus*

Масс-спектры штаммов *A. flavus* и *A. niger*, расположенных в кладе вблизи «фумигатоподобных» *A. terreus*, очевидно, являются атипичными для данных видов. Кластеризация масс-спектров группы с SV от 1,700 до 1,999 показала, что подразделение дистальных ветвей дендрограммы сохраняет принцип видовой принадлежности изолятов, из экстрактов которых получены масс-спектры (для краткости дендрограмма не показана). В качестве исключения нужно указать пары *A. flavus* – *A. oryzae*, *A. flavus* – *A. tamarii*, *A. awamori* – *A. niger*.

В перечисленных парах видов масс-спектры трудно разделимы для более точной идентификации, но, с другой стороны, представители этих видов часто сложно различить и при культурально-морфологическом исследовании. В разделении и содержании ветвей дендрограммы также выявили отдельные масс-спектры – исключения, в том числе – *A. sydowii* и *A. flavus* в ветви *A. fumigatus*, а также *A. fumigatus* и *A. nidulans* в кладе *A. niger*-complex. Очевидно, указанные масс-спектры отличаются атипичной для перечисленных видов композицией. В обеих группах (с $SV \geq 2,000$ и с SV 1,700 – 1,999), как и на модельной выборке секции подрода *Circumdati* (*Flavi* и *Nigri*) оказались в разнесенных кладах. Единичный масс-спектр *A. ochraceus* оказался в кладе *A. niger*, очевидно, в силу принадлежности к одному подроду. В данной группе (SV 1,700 – 1,999) обращает внимание наличие на дендрограмме в обособленной клады, содержащей масс-спектры штаммов 13 видов (в том числе – «*A. unguis*» – ошибочно идентифицированный изолят *Penicillium* sp.).

В группе с низкими показателями достоверности идентификации ($SV \leq 1,699$) до сих пор типичное в большей части разделение масс-спектров в соответствии с видовой принадлежностью не сохраняется (для краткости дендрограмма не показана). Тоже справедливо и в отношении внутриродовых таксонов. Исключением явились только представители подрода *Nidulantes*, у которых масс-спектры оказались в единой обособленной кладе. Выявленные ошибки идентификации наблюдали при неверном отнесении аспергиллов известных видов к другим представителям семейства *Trichocomaceae*, а также и отдаленно родственным грибам. Несмотря на утрату стройного таксономического порядка на всех сегментах дендрограммы отчетливо заметно объединение на уровне дистальных ветвей масс-спектров, полученных от одного штамма. Особенно это свойство ярко проявилось крупными, обособленными на высоком уровне ветвями, содержащими масс-спектры *A. glaucus* РКПГ F-1250, *A. oryzae* РКПГ F-20 и *A. versicolor* РКПГ F-1287.

Таким образом, наш опыт позволил предложить оптимальный алгоритм для иерархической кластеризации масс-спектров *Aspergillus* spp. в таксономическом исследовании. Тем не менее, для эффективного проведения таких работ необходим отбор масс-спектров из опытных выборок, что связано с рядом факторов, установленных благодаря применению избранного метода кластеризации на генеральной совокупности:

1. Масс-спектры от различных видов аспергиллов должны быть представлены группами, примерно эквивалентными по численности, в противном случае редкие масс-спектры одного вида могут быть включены в кладу более крупной выборки масс-спектров другого вида;
2. Необходимо отбирать масс-спектры, сходные по качеству съемки и показателям точности видовой идентификации (в последнем случае – если типовые масс-спектро-профили конкретного вида есть в базе для идентификации);
3. Перед исследованием желательно провести пробную кластеризацию с использованием выборки масс-спектров 2 – 3 видов для обнаружения атипичных, «выпадающих» масс-спектров, не поддающихся правильной группировке с использованием предложенного алгоритма.

Определенная сложность в использовании масс-спектра, полученного методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии, для таксономического (филогенетического) исследования заключается в том, что в отличие от последовательности локуса генома, на формирование и свойства масс-спектра влияет большее разнообразие факторов со стороны протеома культуры, податливости для разрушения ее клеточной стенки, особенностей работы прибора и оператора.

3.5 Разработка и испытание оригинальной базы (библиотеки) масс-спектро-профилей *Aspergillus* spp.

Для получения базы (библиотеки) типовых масс-спектро-профилей из собранного масс-спектрометрического банка извлекли масс-спектры экстрактов основных возбудителей аспергиллеза, руководствуясь следующими критериями: (1) источник MALDI-масс-спектра – штамм, успешно идентифицированный методом таргетного ДНК-секвенирования таксономически значимого локуса генома (ITS или бета-тубулина); (2) при исследовании культуры культурально-морфологическим и физико-химическим методом в ней не обнаружили посторонних микроорганизмов; (3) MALDI-масс-спектр в выборке для конкретного вида *Aspergillus* spp. отличается сочетанием высоких значений показателей интенсивности доминантных пиков и наибольшей детализировкой масс-листа. После составления базы провели работу по оценке ее чувствительности («положительный контроль») и специфичности («отрицательный контроль»). Для обоих контролей использовали изоляты и MALDI-масс-спектры *Aspergillus* spp. (положительный контроль), а также других микромицетов и бактерий (отрицательный контроль). Работы произвели на MALDI-TOF-масс-спектрометре LaserToF LT2Plus (SAI, Великобритания) с пакетом программного обеспечения BactoSCREEN-ID (ООО «ПФ Литех», Россия). Подготовку культур к исследованию, линейную MALDI-TOF-масс-спектрометрию, внедрение масс-спектров в базу данных провели согласно протоколам производителей оборудования и программного обеспечения. В качестве базы сравнения использовали встроенную в стандартное программное обеспечение масс-спектрометра LaserToF LT2Plus. По завершении испытаний провели расчёт диагностической чувствительности и специфичности.

На первом этапе исследования получили данные о результативности физико-химической идентификации *Aspergillus* spp. с использованием МСП-базы сравнения (основная база-библиотека МСП на платформе BactoSCREEN). Для этих целей из собранного в данном исследовании масс-спектрометрического банка выкопировали 119 масс-спектров клеточных экстрактов *Aspergillus* spp., включая 66 (55,5%) – *A. fumigatus*; 28 (23,5%) – *A. niger*-complex; 19 – *A. flavus* (16,0%); 6 – *A. terreus* (5,0%). В результате пробной идентификации оказалось, что с помощью базы сравнения не удалось идентифицировать ни одного масс-спектра *A. terreus* (100%), а также не получили успешных результатов с 18 масс-спектрами *A. flavus* (94,7% от объема вида в выборке), и 1 масс-спектром *A. niger* (3,6%). Для совершенствования видовой идентификации аспергиллов в рамках реализации данного метода составили оригинальную МСП-базу «AMPSL» (Aspergillosis Main Pathogens Spectra Library), в нее согласно разработанным критериям включили 47 масс-спектров из культур коллекционных штаммов *Aspergillus* spp., полученных для ряда штаммов в нескольких субкультурах (адаптация к

биохимическому полиморфизму). Штаммовый состав базы следующий: *A. flavus* РКПГ F-1295; *A. flavus* РКПГ F-1340; РКПГ F-1382; *A. flavus* РКПГ F-1375; *A. flavus* РКПГ F-1388; *A. flavus* РКПГ F-1511 (2 субкультуры); *A. flavus* РКПГ F-1611 (первый штамм в РФ, устойчивый к вориконазолу); *A. fumigatus* РКПГ F-1114; *A. fumigatus* РКПГ F-1248 (5 субкультур); *A. fumigatus* РКПГ F-1267; *A. fumigatus* РКПГ F-1277 (3 субкультуры); *A. fumigatus* РКПГ F-1279 (2 субкультуры); *A. fumigatus* РКПГ F-1325 (2 субкультуры); *A. fumigatus* РКПГ F-1327 (4 субкультуры); *A. fumigatus* РКПГ F-1384 (2 субкультуры); *A. fumigatus* РКПГ F-1437; *A. nidulans* РКПГ F-1709; *A. niger* РКПГ F-1249; *A. niger* РКПГ F-1338 (2 субкультуры); *A. niger* РКПГ F-1343; *A. niger* РКПГ F-1345; *A. niger* РКПГ F-1448; *A. niger-complex* РКПГ F-1444; *A. niger-complex* РКПГ F-1446 (3 субкультуры); *A. niger-complex* РКПГ F-1447; *A. niger* РКПГ F-1322; *A. terreus* РКПГ F-1123 (3 субкультуры); *A. terreus* РКПГ F-1275 (2 субкультуры).

При идентификации масс-спектров, входящих в состав AMPSL, с использованием основной базы МСП вновь не удалось успешно определить масс-спектры *A. flavus* и *A. terreus*. Напротив, благодаря использованию библиотеки «AMPSL» успешно идентифицировали все масс-спектры *Aspergillus* spp. из тестовой выборки. С целью оценки диагностической эффективности базы AMPSL использовали выборку масс-спектров — «дистракторов» (негативный контроль, оценка специфичности) из культур про- и эукариот (их таксономический состав показан в таблице 24). Всего в выборку включили 199 MALDI-масс-спектров из штаммов 37 видов микроскопических грибов, а также 117 масс-спектров из штаммов бактерий 85 видов. Все включенные во вторую модельную выборку штаммы имели клиническое происхождение.

Таблица 24 – Таксономический состав выборки масс-спектров культур бактерий и дрожжевых грибов для негативного контроля идентификации с использованием библиотеки «AMPSL»

№ п/п	Таксон	Кол-во МС	№ п/п	Таксон	Кол-во МС
1	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	1	63	<i>Lactococcus garviae</i>	1
2	<i>Aerococcus viridans</i>	1	64	<i>Lactococcus lactis</i>	1
3	<i>Aeromonas caviae</i>	1	65	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	1
4	<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	66	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	1
5	<i>Alcaligenes faecalis</i>	1	67	<i>Macrococcus caseolyticus</i>	2
6	<i>Arthrobacter cummingsii</i>	2	68	<i>Magnusiomyces capitatus</i>	4
7	<i>Bacillus licheniformis</i>	1	69	<i>Malassezia pachydermatis</i>	1
8	<i>Bacillus megaterium</i>	1	70	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	11
9	<i>Bacillus odysseyi</i>	2	71	<i>Moraxella canis</i>	1
10	<i>Bacillus oleronius</i>	2	72	<i>Moraxella catarrhalis</i>	2
11	<i>Bacillus pumilus</i>	1	73	<i>Moraxella osloensis</i>	1
12	<i>Bacillus subtilis</i>	2	74	<i>Neisseria macacae</i>	1
13	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	2	75	<i>Neosartorya hiratsukae</i>	3

Продолжение таблицы 24

№ п/п	Таксон	Кол-во МС	№ п/п	Таксон	Кол-во МС
14	<i>Bacteroides fragilis</i>	1	76	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	9
15	<i>Bacteroides ovatus</i>	1	77	<i>Paenibacillus farisporus</i>	1
16	<i>Bacteroides uniformis</i>	2	78	<i>Paenibacillus pasadensis</i>	2
17	<i>Bacteroides vulgatus</i>	1	79	<i>Pandorea sputorum</i>	1
18	<i>Brevibacillus agri</i>	1	80	<i>Pantoea calida</i>	2
19	<i>Brevibacillus borstelensis</i>	1	81	<i>Penicillium camembertii</i>	3
20	<i>Brevibacillus centrosporus</i>	1	82	<i>Penicillium chrysogenum</i>	3
21	<i>Candida albicans-complex</i>	3	83	<i>Penicillium digitatum</i>	18
22	<i>Candida bracarensis</i>	2	84	<i>Penicillium spp.</i>	34
23	<i>Candida glabrata</i>	5	85	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	2
24	<i>Candida inconspicua</i>	1	86	<i>Pichia cactophila</i>	3
25	<i>Candida maltosa</i>	1	87	<i>Pichia kudriavzevii</i>	8
26	<i>Candida parapsilosis</i>	12	88	<i>Pichia norvegensis</i>	1
27	<i>Candida pararugosa</i>	1	89	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	1
28	<i>Candida rugosa</i>	1	90	<i>Pluribacter gergoviae</i>	2
29	<i>Candida spp.</i> (mix-культура)	2	91	<i>Propionibacterium sp.</i>	2
30	<i>Candida tropicalis</i>	6	92	<i>Pseudomonas citronellolis</i>	1
31	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	2	93	<i>Pseudomonas fulva</i>	2
32	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	2	94	<i>Pseudomonas jinjuensis</i>	1
33	<i>Comamonas kerstersii</i>	1	95	<i>Pseudomonas koreensis</i>	1
34	<i>Corynebacterium argentoratense</i>	1	96	<i>Pseudomonas luteola</i>	1
35	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	1	97	<i>Pseudomonas monteilii</i>	1
36	<i>Corynebacterium minutissimum</i>	1	98	<i>Pseudomonas mosselii</i>	1
37	<i>Corynebacterium propinquum</i>	1	99	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	1
38	<i>Corynebacterium pseudodiphthericum</i>	1	100	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	4
39	<i>Cronobacter sakazakii</i>	1	101	<i>Ralstonia pickettii</i>	2
40	<i>Cryptococcus neoformans</i>	13	102	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	4
41	<i>Cupriavidus pauculus</i>	1	103	<i>Roseomonas mucosa</i>	1
42	<i>Delftia acidovorans</i>	2	104	<i>Rothia amarae</i>	2
43	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	1	105	<i>Rothia mucilaginosa</i>	1
44	<i>Elizabethkingia miricola</i>	1	106	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
45	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	1	107	<i>Salmonella spp.</i>	7
46	<i>Enterococcus avium</i>	2	108	<i>Saprochaete sp.</i>	9
47	<i>Enterococcus durans</i>	2	109	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	6
48	<i>Erwinia sp.</i>	1	110	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	2
49	<i>Escherichia hermannii</i>	1	111	<i>Staphylococcus felis</i>	1
50	<i>Gemella haemolysans</i>	1	112	<i>Staphylococcus intermedius</i>	1
51	<i>Geotrichum silvicola</i>	1	113	<i>Staphylococcus simulans</i>	1

Продолжение таблицы 24

№ п/п	Таксон	Кол-во МС	№ п/п	Таксон	Кол-во МС
52	<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>	1	114	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2
53	<i>Herbaspirillum huttiense</i>	1	115	<i>Trichoderma koningii</i>	2
54	<i>Klebsiella variicola</i>	1	116	<i>Trichoderma sp.</i>	1
55	<i>Kluyvera ascorbata</i>	2	117	<i>Trichoderma spp.</i> (mix-культура)	1
56	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	1	118	<i>Trichophyton rubrum</i>	3
57	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	5	119	<i>Trichosporon asahii</i>	2
58	<i>Kocuria kristinae</i>	2	120	<i>Trichosporon japonicum</i>	7
59	<i>Kocuria rosea</i>	1	121	<i>Veilonella atypica</i>	1
60	<i>Lactobacillus salivarius</i>	1	122	<i>Wohlfahrtiimonas chitiniclastica</i>	2
61	<i>Lactobacillus brevis</i>	1	123	<i>Yarrowia lipolytica</i>	4
62	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	2			

Примечание: таксоны микромицетов выделены жирным шрифтом

В результате проведенного испытания определили, что созданная база относительно стандартной, ранее установленной производителем в п/о BactoSCREEN-ID, оказалась более чувствительной (100% против 79,8%), хотя несколько менее специфичной (98,2% против 100%). В целом база «AMPSL» на испытании продемонстрировала большую диагностическую эффективность в сравнении с таким показателем у стандартной базы (98,5% и 96,7%). При идентификации масс-спектров-«дистракторов» с использованием базы «AMPSL» оказалось, что перекрестное срабатывание (ложнопозитивные результаты) наблюдали в отношении отдельных масс-спектров штаммов *Penicillium sp.*, *P. digitatum*, *Purpureocillium lilacinum* и *Scopulariopsis brevicaulis*. Эти микромицеты, некогда относимые к роду *Penicillium*, являются близкородственными для *Aspergillus spp.*, с этим фактом связано сходство композиции MALDI-масс-спектров данных грибов. Данное ограничение сравнительно легко преодолимо с помощью стереомикроскопии поверхности колонии или микроскопии препарата из культуры. Главное диагностическое достоинство созданной базы «AMPSL» заключается в возможности идентификации основных этиологических агентов аспергиллеза человека, и особенно, в сравнении со стандартной базой – штаммов *Aspergillus flavus* и *Aspergillus terreus* – возбудителей, отличающихся «сложными» профилями антимикотической чувствительности (резистентность или сниженная чувствительность к амфотерицину В, сравнительно высокие МИК и/или клиническая устойчивость к вориконазолу).

3.6 Антимикробная чувствительность возбудителей аспергиллеза. Масс-спектрометрические особенности резистентных и чувствительных штаммов

Проводили определение минимальных ингибирующих концентраций к вориконазолу,

итраконазолу и амфотерицину В по стандартному протоколу на модельной выборке из 51 штамма. Результаты определения чувствительности штаммов представлены в таблице 25, а распределение у штаммов различных видов МИК указанных антимикотиков показано на рисунке 32 (на рисунке 32: «Ч» - чувствительный, «Р» - резистентный, «ЗН» - зона технической неопределенности; «●» - 1 штамм).

Таблица 25 – Результаты определения чувствительности клинических изолятов *Aspergillus* spp. к противогрибковым препаратам

№ п/п	Штаммы	Чувствительность к противогрибковому препарату (МИК, мкг/мл)		
		Амфотерицин В	Итраконазол	Вориконазол
1	<i>A. niger</i> К/БАЛ	1 (S)	>16 [R]	0,125 [S]
2	<i>A. fumigatus</i> К/легкое	4 (R)	16 (R)	<0,0313 (S)
3	<i>A. fumigatus</i> Ш-П/БАЛ	4 (R)	0,125 (S)	<0,0313 (S)
4	<i>A. flavus</i> С/БАЛ	16 [R]	1 (S)	0,0313 [S]
5	<i>A. niger</i> К/мокрота	1 (S)	0,125 [S]	0,0313 [S]
6	<i>A. fumigatus</i> С/мокрота	0,5 (S)	2 (R)	0,125 (S)
7	<i>A. fumigatus</i> К/мокрота	0,5 (S)	0,0625 (S)	0,0313 (S)
8	<i>A. fumigatus</i> М/БАЛ	0,5 (S)	0,125 (S)	<0,0313 (S)
9	<i>A. fumigatus</i> Ж/мокрота	1 (S)	0,25 (S)	0,0313 (S)
10	<i>A. terreus</i> РКПГ F-109	>16 [R]	0,125 (S)	0,0313 [S]
11	<i>A. terreus</i> РКПГ F-1123	>16 [R]	1 (S)	0,25 [S]
12	<i>A. terreus</i> РКПГ F-1275	>16 [R]	1 (S)	0,0625 [S]
13	<i>A. flavus</i> А/ликвор	2	0,0625 (S)	<0,0313
14	<i>A. flavus</i> П/мокрота	2	2 (R)	1 [S]
15	<i>A. flavus</i> М/БАЛ	16 [R]	1 (S)	0,25 [S]
16	<i>A. flavus</i> Г/роговица	16 [R]	1 (S)	0,25 [S]
17	<i>A. tamarii</i> П/мокрота	1	0,0625	<0,0313
18	<i>A. flavus</i> К/абсцесс	>16 [R]	>16 (R)	>16 [R]
19	<i>A. flavus</i> РКПГ F-1498	8 [R]	0,125 (S)	<0,0313 [S]
20	<i>A. niger</i> Ш/БАЛ	1 (S)	2	1 [S]
21	<i>A. niger</i> О/БАЛ	8 (R)	>16 [R]	0,125 [S]
22	<i>A. niger</i> Л/пазуха	0,5 (S)	0,125	<0,0313 [S]
23	<i>A. niger</i> С/БАЛ	1 (S)	0,125 [S]	<0,0313 [S]
24	<i>A. flavus</i> РКПГ F-1324	>16 [R]	1 (S)	1 [S]
25	<i>A. flavus</i> РКПГ F-1328	2 (R)	1 (S)	0,125 [S]
26	<i>A. flavus</i> РКПГ F-1388	1 (S)	0,0625 (S)	<0,0313 [S]
27	<i>A. fumigatus</i> М/БАЛ	0,5 (S)	2 (R)	0,0625 (S)
28	<i>A. fumigatus</i> Пин	2 (R)	0,5 (S)	<0,0313 (S)
29	<i>A. fumigatus</i> К/БАЛ	1 (S)	0,125 (S)	<0,0313 (S)
30	<i>A. fumigatus</i> Д/БАЛ	2 (R)	2 (R)	0,0625 (S)
31	<i>A. niger</i> РКПГ F-1284	0,5 (S)	4	1 [S]
32	<i>A. niger/awamori</i> РКПГ F-1446	0,5 (S)	2	0,125 [S]
33	<i>A. awamori</i> РКПГ F-1329	1	2	0,125
34	<i>A. niger/awamori</i> РКПГ F-1447	0,5 (S)	0,0625 [S]	<0,0313 [S]
35	<i>A. niger</i> Х/БАЛ	0,5 (S)	0,125 [S]	0,0313 [S]

Продолжение таблицы 25

№ п/п	Штаммы	Чувствительность к противогрибковому препарату (МИК, мкг/мл)		
		Амфотерицин В	Итраконазол	Вориконазол
36	<i>A. awamori</i> РКПГ F-1445	0,5	4	0,5
37	<i>A. niger</i> РКПГ F-1448	1 (S)	0,0313 [S]	<0,0313 [S]
38	<i>A. awamori</i> РКПГ F-1281	2	>16	1
39	<i>A. fumigatus</i> РКПГ F-1437	1 (S)	0,25 (S)	0,0313 (S)
40	<i>A. fumigatus</i> РКПГ F-1279	0,5 (S)	1 (S)	0,0625 (S)
41	<i>A. fumigatus</i> РКПГ F-1384	0,5 (S)	2 (R)	0,5 (S)
42	<i>A. fumigatus</i> РКПГ F-1327	1 (S)	1 (S)	0,125 (S)
43	<i>A. candidus</i> РКПГ F-1494	4	<0,0313	<0,0313
44	<i>A. calidoustus</i> РКПГ К/БАЛ	1	>16	16
45	<i>E. amstelodami</i> РКПГ F-1250	0,0625	>16	8
46	<i>A. oryzae</i> (<i>flavus</i>) РКПГ F-1382	4 [R]	0,125 (S)	0,0313 [S]
47	<i>A. flavus</i> Т/БАЛ	>16 [R]	1 (S)	0,25 [S]
48	<i>A. awamori</i> РКПГ F-1444	0,5	0,25	0,0625
49	<i>A. sydowii</i> РКПГ F-1287	2	1	0,0313
50	<i>A. nidulans</i> РКПГ F-1336	16 [R]	0,25 [S]	0,0313 (S)
51	<i>A. clavatus</i> РКПГ F-12	2	4	0,5

Примечание: в круглых скобках приведена экспертная интерпретация относительно установленных пороговых концентраций; в квадратных скобках – интерпретация согласно эпидемиологической точки отсечения. S – чувствительный, R – устойчивый

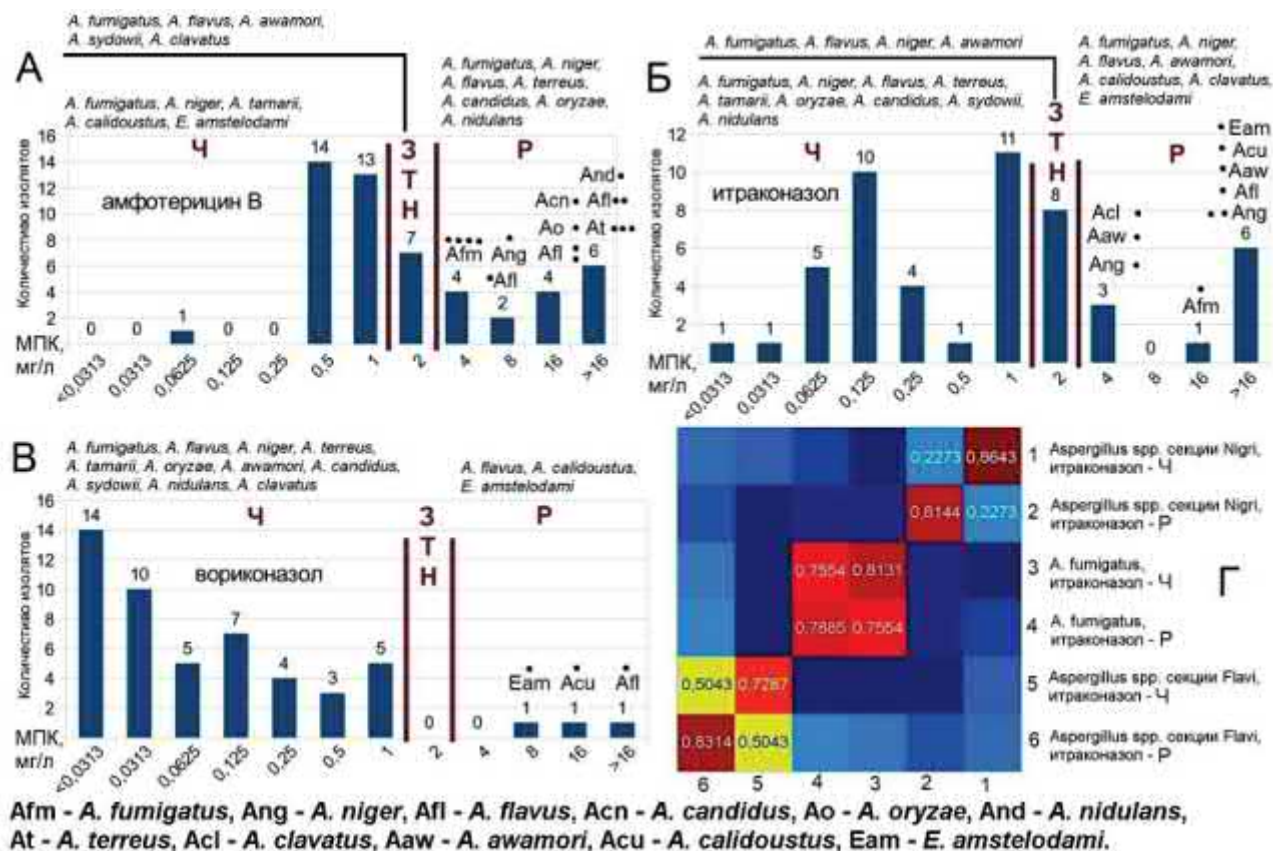


Рисунок 32 – Распределение МПК ПГЛС для изученных штаммов *Aspergillus* spp. (А, Б, В) и матрица сложного коэффициента корреляции, отображающая сравнения масс-спектров *Aspergillus* spp. с различной чувствительностью к итраконазолу (Г)

Из приведенных в таблице 25 и на рисунке 32 данных о чувствительности видно, что штаммы возбудителей аспергиллезной инфекции, выделенные в Санкт-Петербурге, гетерогенны по чувствительности к противогрибковым препаратам.

Позитивным признаком является сохранение сравнительно высокой активности *in vitro* вориконазола – опорного препарата в этиотропной терапии инвазивного аспергиллеза. Данный препарат оказался наиболее эффективным в опыте в сравнении с двумя другими, однако, нами обнаружены единичные резистентные к вориконазолу штаммы, выделенные из биоматериалов от пациентов, погибших от аспергиллеза. У штаммов *A. flavus* и *E. amstelodami* чувствительность определили однократно в силу однократного выделения от пациентов, в то же время *A. calidoustus* удалось выделить от больного повторно с интервалом 15 суток, притом первый изолят имел МИК вориконазола 4 мкг/мл, а при повторном выделении МИК составила уже 16 мкг/мл (!). Также особого внимания заслуживает панрезистентный штамм *A. flavus*, выделенный из материала подкожного абсцесса в случае диссеминированного аспергиллеза.

При исследовании чувствительности к двум другим антимикотикам оказалось, что сила подавление роста аспергиллов этими препаратами (итраконазолом и амфотерицином В) в модельной выборке выражена гораздо более гетерогенно, чем у вориконазола. Притом в отношении вориконазола следует заметить, что разделение устойчивых и чувствительных штаммов по отношению к нему выражено более отчетливо, чем у итраконазола и амфотерицина В. В опыте амфотерицин В оказался наименее эффективным против штаммов модельной выборки, однако, в отношении полиенов сам факт наличия корреляции между антифунгальным эффектом *in vitro* и *in vivo* подвергают сомнению [80, 253].

Для изучения связи масс-спектрометрических особенностей с восприимчивостью к антимикотикам методом сложного коэффициента корреляции создали следующие группы сравнения:

1. *Aspergillus* spp. секции *Nigri*, чувствительные к итраконазолу – 20 масс-спектров от 5 штаммов;
2. *Aspergillus* spp. секции *Nigri*, устойчивые к итраконазолу – 31 масс-спектр от 7 штаммов;
3. *A. fumigatus*, чувствительные к итраконазолу – 37 масс-спектров от 10 штаммов;
4. *A. fumigatus*, устойчивые к итраконазолу – 14 масс-спектров от 5 штаммов;
5. *Aspergillus* spp. секции *Flavi*, чувствительные к итраконазолу – 15 масс-спектров от 11 штаммов;
6. *Aspergillus* spp. секции *Flavi*, устойчивые к итраконазолу – 7 масс-спектров от 2 штаммов;
7. *Aspergillus* spp. секции *Nigri*, чувствительные к амфотерицину В – 20 масс-спектров от 6 штаммов;

8. *Aspergillus* spp. секции *Nigri*, устойчивые и промежуточные к амфотерицину В – 8 масс-спектров от 2 штаммов;
9. *A. fumigatus*, чувствительные к амфотерицину В – 14 масс-спектров от 5 штаммов;
10. *A. fumigatus*, устойчивые и промежуточные к амфотерицину В – 12 масс-спектров от 3 штаммов;
11. *Aspergillus* spp. секции *Flavi* с высокими МИК амфотерицина В (2 – 8 мкг/мл) – 3 масс-спектра от 2 штаммов;
12. *Aspergillus* spp. секции *Flavi* со сверхвысокими МИК амфотерицина В (≥ 16 мкг/мл) – 5 масс-спектров от 3 штаммов.

Для вориконазола аналогичные группы создать не удалось в силу редких устойчивых изолятов. Результат сопоставления данных групп методом построения матрицы сложного коэффициента корреляции (СКК) приведены отдельно для итраконазола и амфотерицина В на рисунке 33.

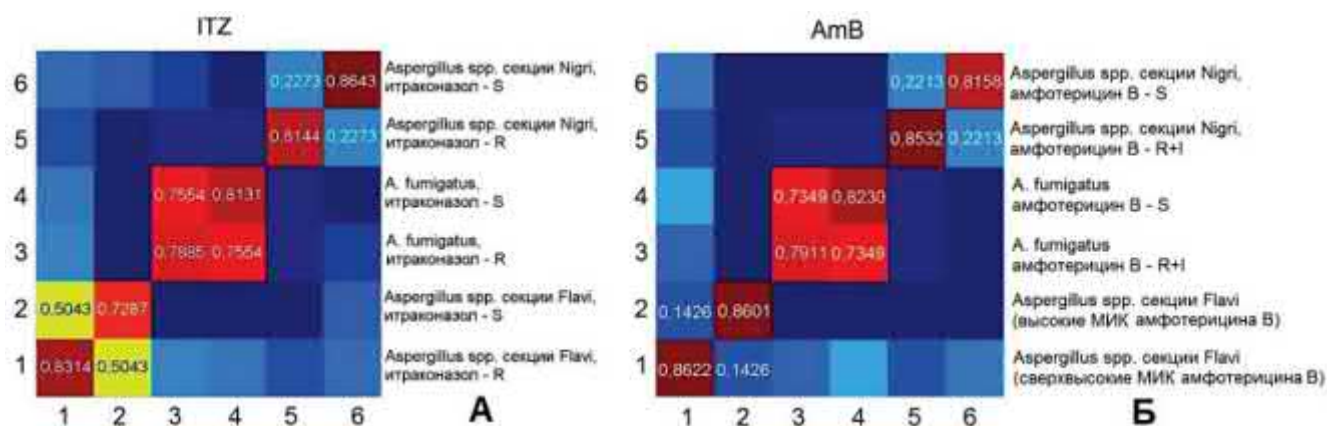


Рисунок 33 – Матрицы сложного коэффициента корреляции, отображающие попарное сравнение групп масс-спектров от штаммов аспергиллов с различной чувствительностью к антимикотикам: А – к итраконазолу (ITZ); Б – к амфотерицину В (AmB)

Примечание: для удобства с двух сторон обеих матриц помещены цифровые шкалы для распознавания сочетаний сравниваемых групп на пересечении векторов от горизонтали и вертикали. Значения СКК отражены цветовой шкалой тепловизора, а в квадратах интересующих сопоставлений также численно

По диагонали матриц произведено сравнение составленных масс-спектрометрических групп внутри самих себя по однородности. Судя по значениям СКК, которые оказались высокими на обеих матрицах (0,7287–0,8643 для итраконазола и 0,7911–0,8622 для вориконазола), собранные группы отличались относительно однородными свойствами у своих представителей. Примечательно, что у штаммов *A. fumigatus* изоляты с различной чувствительностью как к итраконазолу, так и к амфотерицину В, почти не различаются по масс-

спектрометрическим свойствам (СКК составил 0,7554 для итраконазола и 0,7349 для амфотерицина В). Слабо отличаются в том же аспекте представители секции *Flavi*, чувствительные и устойчивые к итраконазолу (СКК = 0,5043).

Контрастные различия наблюдали в группах «черных» аспергиллов с различными категориями чувствительности к итраконазолу и амфотерицину В (СКК для первой матрицы – 0,2273; для второй – 0,2213). Наиболее резко различались группы масс-спектров из штаммов секции *Flavi* с «высокими» и «сверхвысокими» МИК амфотерицина В, СКК для данного сравнения оказался наименьшим и составил 0,1426. Данные группы оказались немногочисленными и для более точного суждения необходимо дополнить выборки. Выявленный феномен потенциально указывать на наличие в модельной выборке, по меньшей мере, двух различных типов механизмов устойчивости *A. flavus* и сходных видов к триазолам: (1) аминокислотные замены в ланостерол-14 α -деметилазе и (2) трансформация состава клеточной стенки и цитоплазматической мембраны (химические свойства которых влияют на результат масс-спектрометрического исследования).

Резюме. Таким образом, проведенное исследование позволило установить, что на основании такой характеристики клеточного экстракта, как масс-спектр, снятый методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии, возможно установить многие биологические свойства штамма *Aspergillus* spp., и, очевидно, других клеточных микроорганизмов. В числе таких свойств и характеристик следующие: (1) видовая принадлежность штамма; (2) филогенетические связи штамма с другими представителями того же вида, а также — более крупных выше стоящих таксономических или условных групп; (3) принадлежность изолятов к группе штаммов с определенными фенотипическими свойствами (например, особыми профилями резистентности); а также (4) ориентировочно идентифицировать спектрообразующие белки и пептиды. Исходя из показателей точности видовой идентификации MALDI-TOF-масс-спектрометрия является тестом, пригодным для проведения культурально-морфологической диагностики микозов.

Аннотация масс-спектра позволяет установить состав сравнительно малой, но часто недоступной для других методов протеомики (например, 2D гель-электрофореза) фракции клетки, включающей одновременно пептиды и низкомолекулярные белки. В перспективе при использовании дополнительного этапа фракционирования клеточного экстракта аннотирование масс-спектра можно будет развить до самостоятельного полноценного протеомного исследования.

ГЛАВА 4. Биоинформационный анализ аминокислотной последовательности мишени действия азольных антимикотиков – ланостерол-14 α -деметилазы *Aspergillus* spp.

4.1 Аминокислотный полиморфизм CYP51A у *Aspergillus* spp.

Банк последовательностей ферментов типа CYP51A. Аминокислотные последовательности ланостерол-14- α -деметилаз, гомологичные CYP51A из *A. fumigatus* Af293, которые обнаружили с помощью поиска в ресурсе BLAST среди штаммов *A. fumigatus*, а также среди группы видов «*Aspergillus non-fumigatus*», указаны в таблицах 26 и 27 соответственно [45, 113, 120, 160-163, 207, 211, 222, 231, 233, 248, 289]. Для дальнейшего анализа в соответствии с установленными критериями удалось получить 27 последовательностей CYP51A у представителей *A. fumigatus* и 24 последовательности, принадлежащие штамма других видов.

Таблица 26 – Белки штаммов *A. fumigatus*, гомологичные CYP51A из *A. fumigatus* Af293

Штамм	№ в BLAST	Штамм	№ в BLAST
<i>A. fumigatus</i> Af293	XP_752137.1	<i>A. fumigatus</i> FMR 10528	ALL54995.1
<i>A. fumigatus</i> CM 2733	ACF17708.1	<i>A. fumigatus</i> CM 2164	ACF17705.1
<i>A. fumigatus</i> F13560	AGH55423.1	<i>A. fumigatus</i> CM 1244	ACF17699.1
<i>A. fumigatus</i>	AAF32372.1	<i>A. fumigatus</i> CM 2627	ACF17707.1
<i>A. fumigatus</i> CM 3248	ACF17709.1	<i>A. fumigatus</i> CM 2159	ACF17704.1
<i>A. fumigatus</i> 011.15	AME17223.1	<i>A. fumigatus</i> F11628	ACL83607.1
<i>A. fumigatus</i> F16867	ACL83626.1	<i>A. fumigatus</i> CM 796	ACF17700.1
<i>A. fumigatus</i> PSL13110842	AHX83126.1	<i>A. fumigatus</i> F15861	ACL83622.1
<i>A. fumigatus</i> s9	AKE50948.1	<i>A. fumigatus</i> CM 2097	ACF17701.1
<i>A. fumigatus</i> h18	AKE50938.1	<i>A. fumigatus</i> CM 3500	ACF17702.1
<i>A. fumigatus</i> F15122	ACL83619.1	<i>A. fumigatus</i> F13619	ACL83612.1
<i>A. fumigatus</i> CM 4593	ACF17706.1	<i>A. fumigatus</i> Z5	KMK54417.1
<i>A. fumigatus</i> CM 1245	ACF17703.1	<i>A. fumigatus</i> s42b	AKE50937.1
		<i>A. fumigatus</i> FMR 7739	ALL54994.1

Анализ распределения аминокислотных последовательностей в аспекте таксономии и чувствительности к антимикотикам. На основании изучения полиморфизма длин собранного банка гомологов установили, что длина последовательности ферментов типа CYP51A у аспергиллов варьирует от 507 (*A. flavus*) до 515 аминокислотных остатков (аспергиллы секции Fumigati – *A. fumigatus*, *A. fischeri*, *A. lentulus*, *A. oerlinghausenensis*).

Кластеризация последовательностей согласно избранному алгоритму «ближайшего соседа» с расчетом дистанции по Гришину Н.В. [146] отображена в форме дендрограммы, которая показана на рисунке 34.А.

Таблица 27 – Белки штаммов «*Aspergillus non-fumigatus*», гомологичные CYP51A из *A. fumigatus* Af293

Штамм	№ в BLAST	Штамм	№ в BLAST
<i>N. fischeri</i> NRRL 181	XP_001267338	<i>A. flavus</i> NRRL 3357	XP_002375123.1
<i>A. lentulus</i> CBS 117884	AEB77690.1	<i>A. flavus</i> AF70	KOC13200.1
<i>A. lentulus</i> 20684.091	AEB77695.1	<i>A. ruber</i> CBS 135680	EYE96192.1
<i>A. lentulus</i>	ADI80344.1	<i>A. tubingensis</i> NRRL 4700	AEK81587.1
<i>A. lentulus</i> IFI05.0046	AEB77692.1	<i>A. awamori</i> F5412a	AEK81588.1
<i>A. lentulus</i> CBS 116881	AEB77687.1	<i>A. niger</i> CBS 513.88	XP_001394224.1
<i>A. clavatus</i> NRRL 1	XP_001271579.1	<i>A. awamori</i> F7577	AEK81595.1
<i>A. terreus</i> NIH2624	XP_001215095.1	<i>A. oryzae</i> RIB40	XP_001824687.1
<i>Aspergillus</i> sp. AN216	AEK81585.1	<i>A. awamori</i> F12140	AEK81600.1
<i>A. acidus</i> F6511	AEK81591.1	<i>A. niger</i> ATCC 1015	AEK81582.1
<i>A. rambellii</i> SRRC 1468	KKK26746.1	<i>A. tubingensis</i> F7220	AEK81594.1
<i>A. oerlinghausenensis</i>	ALT83526.1	<i>A. ochraceoroseus</i> SRRC	KKK17534.1
CBS 139183		1432	

Из приведенной дендрограммы видно, что последовательности штаммов сгруппированы согласно видовой принадлежности, а также по отдельным секциям рода *Aspergillus*.

В итоге данного сопоставления, удалось, в частности, выявить ряд особенностей (далее положения аминокислотных сайтов приведено относительно CYP51 *A. fumigatus* Af293). Только у аспергиллов секции *Fumigati* в положениях 2-8 есть сочетание аминокислот Вал-Про-Мет-Лей-Три-Лей-Тре, также у представителей этой секции в положении 193 находится глутамин (у других видов — глутаминовая кислота), в положении 249 также глутамин (у других — глутаминовая или аспарагиновая кислота). У аспергиллов секции *Ochraceorosei* в положении 12 находится остаток цистеина, а в положении 261 — метионина (у других серин, очень редко — лейцин). У представителей секции *Nigri* в положении 164 находится остаток аспарагина. CYP51 у *A. terreus* (*Terrei*) имеет вставку Вал-Глу-Ала-Гли между положениями 258 и 259 (у других видов ее нет). Сопоставление последовательностей с выравниванием в режиме маркирования идентичных регионов позволило выявить в первичной структуре CYP51A 102 консервативных локуса и 104 варибельных локуса, которые чередуются (варибельные локусы расположены также на С- и N-концах молекулы). Среди варибельных локусов 57,7% составляют сайты из 1 аминокислоты, наименее часто встречаются исчезновения или вставки нескольких аминокислот (9,6%), в остальных случаях имеют место вариации по группам аминокислот (32,7%). Соответствие полученного распределения (кластеризации) и секций рода *Aspergillus* показано на рисунке 34 (Б). Среди отобранного банка последовательностей наибольший интерес представляет анализ выборки CYP51A штаммов *A. fumigatus*.

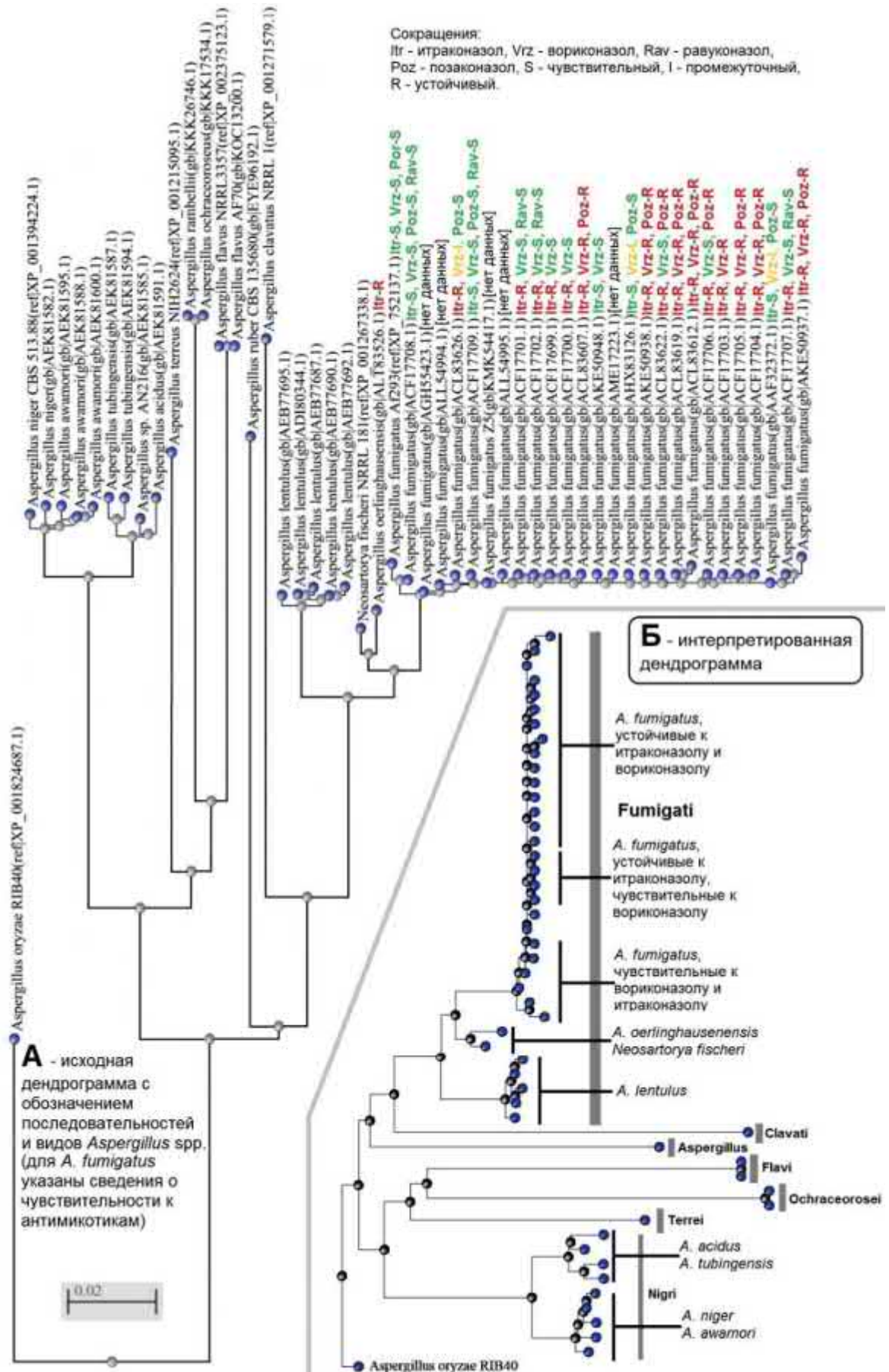


Рисунок 34 – Дендрограмма, полученная в результате кластеризации последовательностей CYP51 по избранному алгоритму

Целесообразность такого анализа связана со следующими фактами: (1) по данному виду получили наибольшую выборку структур фермента, (2) разработаны и опробованы критерии определения чувствительности *A. fumigatus* к триазольным антимикотикам [126, 288], (3) именно для этого вида среди всех медицински значимых аспергиллов наиболее подробно изучена связь первичной структуры фермента с особенностями чувствительности к триазольным антимикотикам [43, 155, 211, 231, 357]. Выравнивание последовательностей CYP51A у *A. fumigatus* в редакторе COBALT позволило выявить различия в аминокислотных сайтах, которые можно выразить перечнем, включающем доминирующие аминокислоты по соответствующим положениям и альтернативы (в коде FASTA): (1) 54G, альтернативные: E, V, R, W; (2) вставка ASLKI между 67K и 68Y; (3) 98L, альтернативная H; (4) 121Y, альтернативная F; (5) 147H, альтернативная Y; (6) 220M, альтернативные I, V, T, K; (7) 297S, альтернативная T; (8) 318E, альтернативная X; (9) 427E, альтернативная G или K; (10) 432G, альтернативная A; (11) 448G, альтернативная S; (12) исчезновение фрагмента у позиции 505. Для обозначения позиций в качестве эталона взяли CYP51A у *A. fumigatus* Af293.

Ранее установили связь между устойчивостью к триазольным антимикотикам и мутациям, ведущим к аминокислотным заменам в позициях перечня 1, 3, 6 [357]; 4, 5, 10 [211]; 7, 9 [50]; 11 [263]. Те же авторы сообщили и о других аминокислотных заменах, которые ведут к развитию антимикробной устойчивости у *A. fumigatus*, эти замены затрагивают аминокислотные сайты 431Y, 289T, 138G, 495F. Для штаммов *Aspergillus* spp. секции *Fumigati* распределение первичных структур CYP51A и его соответствие чувствительности к триазольным антимикотикам также показано на рисунке 34, где из дендрограмм видно, что согласно анализу последовательностей CYP51A, штаммы оказались сгруппированными в соответствии с определенными доминантными фенотипами чувствительности к двум триазольным антимикотикам. Таких фенотипов можно выделить три: (1) – чувствительный к итраконазолу и вориконазолу; (2) резистентный к итраконазолу, но чувствительный к вориконазолу; (3) резистентный к обоим антимикотикам.

Следует отметить, что, несмотря на наличие доминантных фенотипов чувствительности, у штаммов, включённых в соответствующие ветви дендрограммы, встречаются исключения по данному признаку.

Среди медицински значимых аспергиллов из группы «*Aspergillus non-fumigatus*» связи первичной структуры CYP51 с резистентностью к триазольным антимикотикам изучены фрагментарно [164, 212, 260].

Известно, что представители *A. flavus* в сравнении с тремя другими доминантными видами возбудителей инвазивного аспергиллеза (*A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus*) в целом отличаются наиболее высокими МИК к различным триазолам [144, 288]. Молекулярные

особенности ланостеролдеметилены *A. flavus* еще не изучены достаточно подробно, в том числе отсутствуют данные рентгеноструктурного анализа. Кроме того, известно, что в РФ в структуре устойчивости *Aspergillus* spp. к антимикотикам доминируют *A. flavus* и *A. calidoustus*. В связи с этим обстоятельством, а также принадлежностью к доминирующим возбудителям аспергиллеза человека, последовательность CYP51A представителя *A. flavus* избрали для биоинформационного исследования.

4.2 Свойства ланостерол-14 α -деметилены CYP51A *Aspergillus flavus*

Особенности состава, базовые физико-химические свойства и близкие по ним белки из протеома *A. flavus*. Биоинформационное исследование выполнили на основе последовательности фермента CYP51A из *A. flavus* NRRL 3357 (код XP_002375123.1), включающей 513 аминокислотных остатков, которая в коде FASTA имеет следующий вид: MIFSRSMASTLVSAAYAAAGLLAIIVLNLLRQLLFRNKTDPPPLVFHWIPFLGSTVTYGMDPYAFF FSCRQKYGDIFTFILLGRKITVYLGIQGNEFILNGKLKDVNAEEIYSPLTTPVFGSDIVYDCPNSK LMEQKKFIKFGLTQAALESHVPLIEKEVLDYDKTSPNFKGTSGRVEITDAMAEITIFTAGRALQ GEEVRKKLTAEFADLYHDLDRGFTPIINFMLPWAPLPRNRKRDAAHARMREIYMDIINERRKNP DRETSDMIWNLMHCTYKNGQPLPDKEIAHMMITLLMAGQHSSSSISSWIMLRLASEPAVMEEL YQEQTITKLSPDGRTLPLQYRDLDDLPLHQNLIKETLRLHLSIHSLMRKVKNPMPVPGTPYVVP ADHVLLASPGVTALSDEYFPNASRWDPHRWENRVEKEDEEDIVDYG YGTVSKGTSSPYLPFG AGRHRCIGEKFAFVN LGVIVATMARHMKLFNVDGKKGV PATDYSSMFSGPSKPAIIGWERRFP EKS. Аминокислотный состав фермента, пересчитанный в данном исследовании, в представлен в таблице 28.

Таблица 28 – Аминокислотный состав молекулы фермента CYP51A из *A. flavus* NRRL 3357 (по данным расчета в Protein Calculator v 3.4)

Аминокислотные остатки			Количество	Аминокислотные остатки			Количество
A	Ala	Аланин	34	M	Met	Метионин	20
R	Arg	Аргинин	30	F	Phe	Фенилаланин	25
N	Asn	Аспарагин	19	P	Pro	Пролин	35
D	Asp	Аспарат	27	S	Ser	Серин	34
Q	Gln	Глутамин	12	T	Thr	Треонин	28
E	Glu	Глутамат	30	Y	Tyr	Тирозин	20
G	Gly	Глицин	31	V	Val	Валин	27
H	His	Гистидин	14	W	Trp	Триптофан	7
I	Ile	Изолейцин	33	C	Cys	Цистеин	4
L	Leu	Лейцин	53	U	SeC	Селеноцистеин	0
K	Lys	Лизин	30				

Молекулу изученного фермента отражает брутто-формула $C_{2636}N_{699}O_{741}S_{24}H_{4113}$. Последовательность характеризуется молекулярной массой около 58222,1680 Da (рассчитана по усредненному содержанию изотопов) и прогнозируемой изоэлектрической точкой $pI=8,31$, рассчитанной исходя из величин pK_a у аминокислотных остатков, как у изолированных аминокислот. Последний показатель, как следует ожидать, должен приближаться к экспериментальной величине, поскольку во вторичной структуре данного белка β -складки занимают сравнительно малую протяженность последовательности, что удалось показать при моделировании вторичной и третичной структур (см. ниже).

Исходя из полученных величин M_r и pI удалось спрогнозировать некоторые белки *A. flavus*, близкие к анализируемой последовательности по положению на геле второго разделения при двумерном геле-электрофорезе. Избран диапазон колебаний параметров $M_r=57639,78 - 58804,22$ Da и $pI=8,2-8,4$. По данным диапазонам найдено 9 белков, последовательности которых резервированы в базе TrEMBL, эти среди них – некоторые транспортные белки (в том числе – ассоциированные с множественной лекарственной устойчивостью), ацилтрансферазы и некоторые представители класса оксидоредуктаз (Таблица 29).

Таблица 29 – Белки из протеома *A. flavus*, прогностически сходные по электрофоретической подвижности с анализируемым ферментом в двумерном геле-электрофорезе

Белки и штаммы, у которых они определены	Mw	pI	n A/K
Белок семейства ацилтрансфераз (<i>A. flavus</i> ATCC MYA-384/AF70)	58266	8,30	501
Моноксигеназа неутонченной функции (<i>A. flavus</i> ATCC MYA-384/AF70)	57979	8,35	510
Предполагаемый цитохром p450 (<i>A. flavus</i> ATCC 200026)	57704	8,26	511
Предполагаемая ацилтрансфераза (<i>A. flavus</i> ATCC 200026)	58233	8,30	501
Белок, связанный с трансмембранным переносом (тот же штамм)	58786	8,34	535
Предполагаемый «монокарбоксилат-транспортёр» (<i>A. flavus</i> ATCC 200026)	58786	8,34	535
Предполагаемый MFS-транспортёр, ассоциированный с множественной лекарственной устойчивостью (<i>A. flavus</i> ATCC 200026)	58025	8,28	525
Предполагаемый белок-насос, ассоциированный с множественной лекарственной устойчивостью (<i>A. flavus</i> ATCC 200026)	58047	8,30	541
Оксидоредуктаза (<i>A. flavus</i> ATCC 200026)	58349	8,35	523

Реконструкция вторичной структуры фермента и расчет сольватации аминокислотных остатков выполнены в редакторе Raptor X с использованием 2-х молекул – «шаблонов» – CYP51B *A. fumigatus* и CYP51 *S. cerevisiae* (поскольку те же последовательности использовали и

при создании модели третичной структуры фермента, показатели достоверности реконструкции подробно обсуждаются в следующем разделе). По доступности для растворителя аминокислотные остатки, входящие в состав белка, определили, как открытые – 26%; средне доступные – 43% и скрытые – 30%. Доли основных типов вторичных структур для полученной модели оказались следующими: α -спираль – 45%; β -складка – 6%; виток (поворот) – 47%.

Реконструкция третичной структуры фермента. При конструировании третичной структуры фермента в редакторе RaptorX получили изображение молекулы, сходное с типичным строением подобных ферментов (как, например, у *Candida glabrata*) – результат моделирования показан на рисунке 35 (А). Данная картина, в частности, включает каталитический домен, который образован α -спиралями, β -складками и «поворотами», а также трансмембранный домен, включающий 2 участка α -спиралей, соединенных поворотным фрагментом. Также на рисунке 35 (Б) отражен характер взаимодействия трансмембранного домена с мембраной органоида (диаграмму реконструировали в ресурсе Phyre 2).

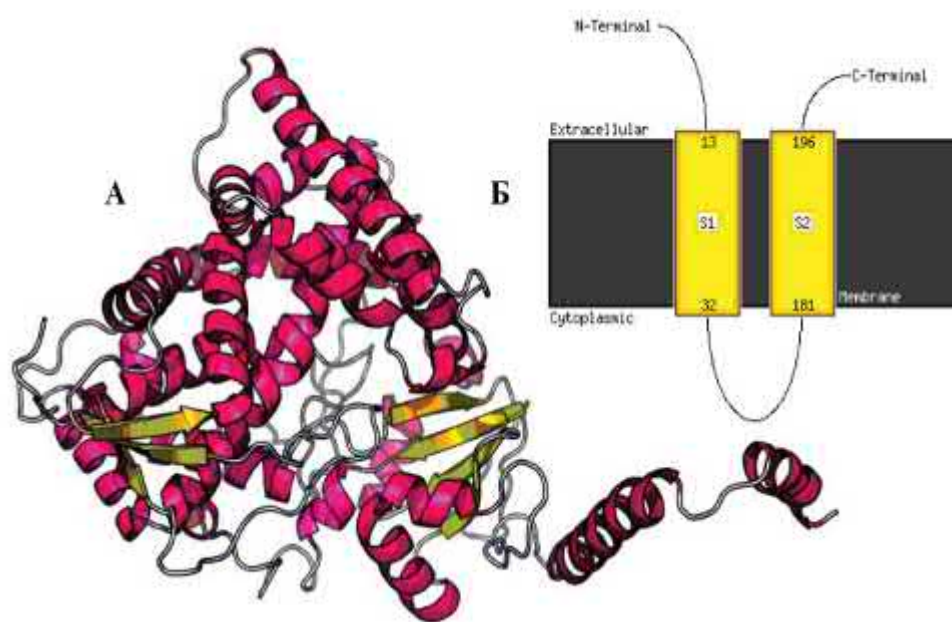


Рисунок 35 – Третичная структура ланостерол-14- α -деметиلاзы CYP51A из *A. flavus* NRRL 3357, смоделированная с помощью редактора RaptorX (А) и ее трансмембранный домен (Б)

Благодаря использованию редактора Raptor X смоделировали положение всех аминокислотных остатков, однако из них 53 остатка (10%) с наибольшей вероятностью смоделированы с отклонением от реальной позиции. Качество (точность) реконструкции третичной структуры белка в редакторе Raptor X определяют несколькими показателями, в числе которых следующие:

1. «**Score**» – индикатор выравнивания искомой последовательности и последовательности-шаблона третичной структуры, варьирует от 0 до полного количества аминокислотных остатков в последовательности.
2. **P-уровень** — показатель, отражающий, насколько прогнозируемая модель для изучаемой последовательности хуже, чем набор случайно сгенерированных моделей для данной последовательности. Обобщенный показатель качества подобранной модели; чем ниже его значение, тем лучше модель. Для белков с большим содержанием α -спиралей оптимальным считается значение $P < 10^{-3}$; для белков с большим содержанием β -складок оптимальным считается значение $P < 10^{-4}$.
3. **uGDT** – ненормализованный общий тест дистанции. $uGDT = 1 \cdot N_1 + 0,75 \cdot N_2 + 0,5 \cdot N_4 + 0,25 \cdot N_8 + \dots$, где N_x — число аминокислотных остатков с расчетной ошибкой моделирования их позиции (в Å), менее, чем x . **GDT** – общий тест дистанции. $GDT = (uGDT/n) \cdot 100$, где n – длина белка (в аминокислотах). Оба показателя отображают абсолютное качество модели. Для белка, состоящего более, чем из 100 остатков, оптимальным показателем является $uGDT > 50$. Для белков, состоящих менее, чем из 100 остатков, оптимальным показателем является $GDT > 50$. Если у модели $uGDT > 50$, но $GDT < 50$, то лишь небольшая часть модели построена верно.
4. **uSeqID** – число идентичных остатков (изучаемой последовательности и последовательности-шаблона) в выравнивании. $SeqID = (uSeqID/n) \cdot 100$, где n – длина белка (в аминокислотах). Чем выше оба показателя, тем лучше построение модели. Для белков, состоящих более чем из 200 аминокислот, оптимальным является показатель $SeqID > 30\%$.

Для созданной модели получены следующие показатели, характеризующие точность и достоверность: «Score» = 466; P-уровень = $6,25e-11$; ненормализованный и нормализованный общий тест дистанции (uGDT и GDT) соответственно 415 и 80; ненормализованной и нормализованное число идентичных остатков (uSeqID и SeqID) соответственно 295 и 58. Полученные показатели указывают на оптимальный выбор последовательности-шаблона для моделирования вторичной и третичной структуры и на высокую достоверность модели. В качестве последовательности – «шаблона» (template) применили кристаллографическую структуру CYP51B *A. fumigatus* (код 4uyl). Однако значение «Score» отличное от полного числа аминокислотных остатков реконструируемого фермента явно свидетельствует о том, что конфигурация анализируемой последовательности и последовательности – «шаблона» сопоставимы гомологичными участками не по всей длине. Очевидно, их несовпадение связано, в том числе с трансмембранным доменом, что подкрепляется данными о вероятных ошибках моделирования: большая часть трансмембранного домена построена неправильно. Причины

неполной реконструкции трансмембранного домена стала очевидной при использовании для воссоздания третичной структуры фермента 2-х других ресурсов: Swiss-Model и Phyre 2 (Рисунок 36).

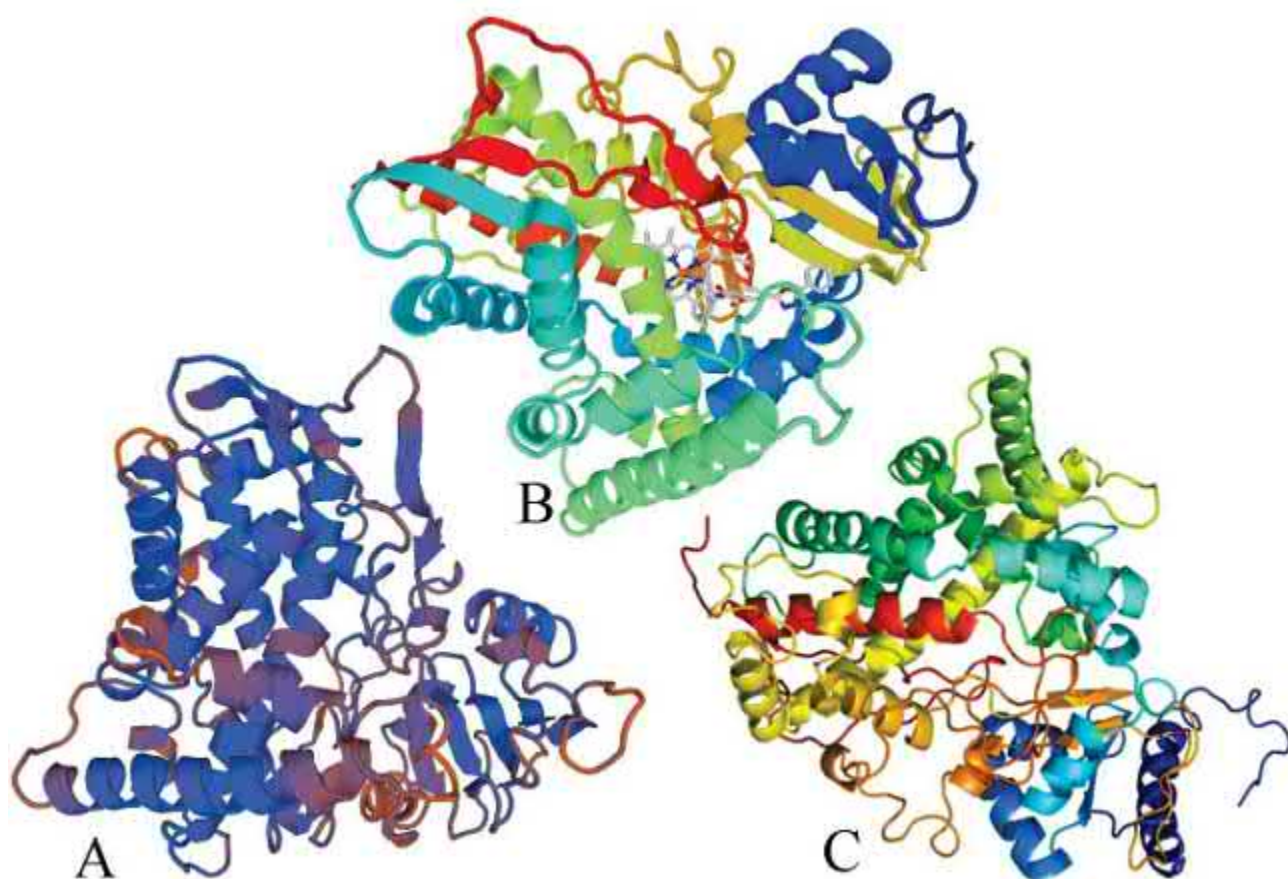


Рисунок 36 – Третичная структура ланостерол-14- α -деметиلاзы *A. flavus* NRRL 3357

Примечание: А – модель, полученная в редакторе Swiss-Model; В – структура CYP51В *A. fumigatus* (4uyl.1.A), использованная в Swiss-Model в качестве «шаблона», с гемом и вориконазолом в активном центре; С – модель, полученная в редакторе Phyre 2 (ожидаемые размеры молекулы по трем осям 93,013 Å x 60,605 Å x 55,281 Å)

Как видно из рисунка 36, в других моделях трансмембранный домен фактически не определяется (Рисунок 36 А и С). Для использованного в Swiss-Model «шаблона» 4uyl.1.A (Рисунок 36.В) трансмембранный домен вообще не воссоздан (по-видимому – ошибка ДНК-секвенирования кодирующего структурного гена, либо неполная реконструкция кристаллографической модели). Аналогичное явление проявилось при использовании ресурса Phyre 2: «шаблон» c4uylB (CYP51 из *A. fumigatus*) значительно короче на N-конце, чем «шаблон» c4lxjA (CYP51 из *S. cerevisiae*). В последнем случае использование сразу 2-х шаблонов позволило построить модель с высокой достоверностью (Рисунок 36.С) – только 6

остатков смоделировали *ab initio* (менее достоверно, чем при наложении на кристаллографическую модель).

В отношении реконструкции ланостерол-14- α -деметилазы в редакторе Swiss-Model следует заметить, что в данном анализе достоверность результата определяют, главным образом, по двум показателям: GMQE и QMEAN4. **GMQE** (общая оценка качества модели) – показатель, характеризующий точность построенной модели на основании результатов выравнивания оригинальной последовательности и последовательности-шаблона. Варьирует от 0 до 1 (наивысший показатель). На величину GMQE влияет показатель QMEAN4. **QMEAN4** – показатель качества модели, представляющий собой сложную функцию индексов торсионных углов трех последовательно расположенных аминокислотных остатков («Torsion»), сольватации (доступности остатков растворителям, «Solvation») и парных потенциалов взаимодействия атомов углерода полипептидной цепи в целом («All Atom») и C β -атомов («Cbeta») в отдельности. Показатель QMEAN4 отражает потенциальное сходство построенной аналитической модели с экспериментальной рентгеноструктурной моделью. Как значение QMEAN, так и отдельно входящие в него показатели, отображаются величиной Z-оценки, которая варьирует от -6 до 2. Исходя из реальных значений данных показателей для построенной модели, в частности GMQE=0,78 при перекрытии с «шаблоном» 0,91 и сходством с последовательностью «шаблона» 64,09%, следует рассматривать результат реконструкции, как удовлетворительный. Однако обращает внимание большой разброс качества моделирования позиций отдельных аминокислотных остатков, что в конечном итоге проявилось невысоким значением показателя QMEAN4 и отдельных функций, которые его определяют.

Сравнение реконструированной структуры CYP51A из *A. flavus* с третичными структурами сходных белков, полученных на основе данных рентгеноструктурного анализа приведено на рисунке 37. Как следовало ожидать, реконструированный белок структурно схож с другими ланостерол-14-альфа-деметилазами микромицетов, но в то же время имеет сходные элементы с простациклин-синтазой человека. Последнее обстоятельство в определенной степени объясняет некоторые нежелательные эффекты противогрибковых препаратов группы азолов. Сходные в функциональном отношении белки бактерий обладают довольно отдаленной структурной организацией в сравнении с CYP51A *A. flavus*, поэтому азольные антимикотики выраженным антибактериальным действием не отличаются.

Реконструкция активного центра фермента. Для исполнения данного раздела работы комбинировали данные об аминокислотных остатках, образующих так называемый «пакет» (из Phyre 2), а также сайтах связывания лигандов, полученных из ресурса Raptor X binding sites. Следует заметить, что ценные данные о сайтах связывания получили ранее другими авторами для кристаллографических моделей белков, на основании которых в трех использованных

редакторах провели реконструкцию третичной структуры. Однако чтобы полноценно использовать указанные данные, необходимо выполнить 2 принципиальных условия: (1) определить, насколько последовательности – «шаблоны» из трех редакторов сходны друг с другом, а в случае, если они не тождественны – выявить гомологичные аминокислотные сайты этих белков; (2) сопоставить по аминокислотным сайтам (выполнить выравнивание) последовательности(ей) – шаблона(ов) и анализируемой последовательности.

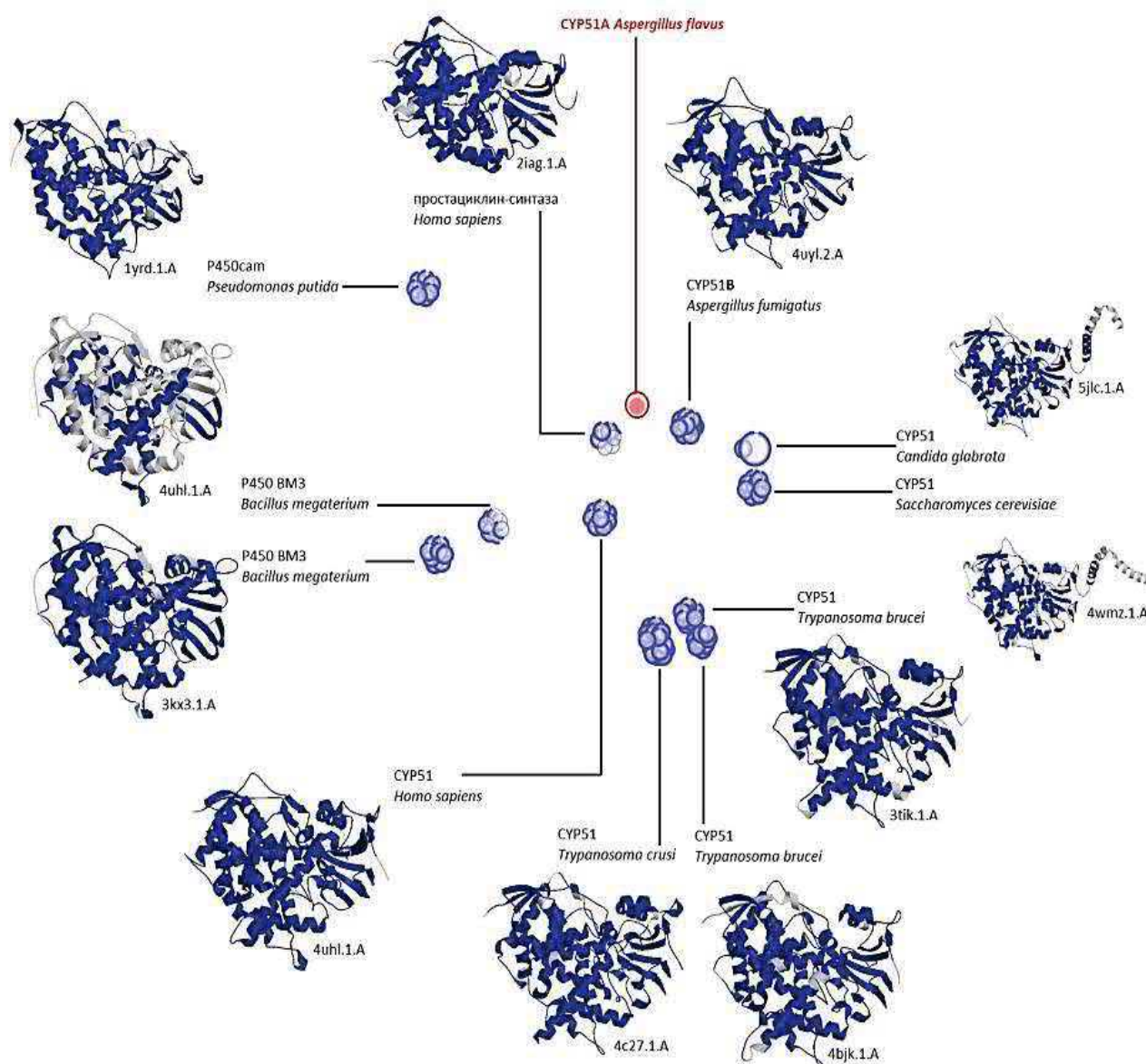


Рисунок 37 – Сравнение третичной структуры CYP51A *A. flavus* с рентгеноструктурными моделями других сходных белков семейства p450 (анализ в Swiss-Model)

При моделировании в редакторах Raptor X, Phyre 2 и Swiss-Model использовали «шаблоны» 4uylA, c4uylB и 4uyl.1.A соответственно (в последнем случае редактор первоначально использовал шаблон 4uym.2.A, но его заменили на равноценный для наилучшей

сходимости результатов построения во всех 3-х редакторах). При сопоставлении в ресурсе EMBOSS Matcher оказалось, что все использованные шаблоны по аминокислотной последовательности идентичны.

Таким образом, путем сопоставления CYP51B *A. fumigatus* и CYP51A *A. flavus*, а также по данным ресурса «Raptor X binding sites» выявили сайты связывания гема, вориконазола и позаконазола, а также нового триазольного антимикотика под кодовым названием TU1, близкого по строению позаконазолу (наименование приведено по базе Protein Data Bank, химическое название – 4-[2,5-ди(фторанил)фенил]-2-фторанил-N-[(2R)-3-(1H-индол-3-ил)-1-оксиданилден-1-(пиридин-4-иламино)пропан-2-ил]-бензамид).

Безусловно важной характеристикой активного центра является набор сайтов связывания ланостерола, поскольку он определяет естественную функцию исследуемого фермента. Для CYP51 *Aspergillus spp.* такие данные не известны, поэтому для определения этих сайтов провели сопоставление CYP51A *A. flavus* и CYP51 *S. cerevisiae* (4lxj).

Данные о «пакете» фермента из Phyre 2 позволили также выявить аминокислотные сайты, не связывающие лиганды непосредственно, но, очевидно, формирующие надлежащую конформацию активного центра. К таким следует отнести группы аминокислотных остатков на участках T54-G58, L80-I85 и A190-L194. Лиганд-связывающие сайты активного центра по данным Raptor X binding sites способны к взаимодействию только с органическими соединениями (исключая пептиды и полинуклеотиды). Установленный нами перечень сайтов активного центра и их лигандов помещен в таблице 30.

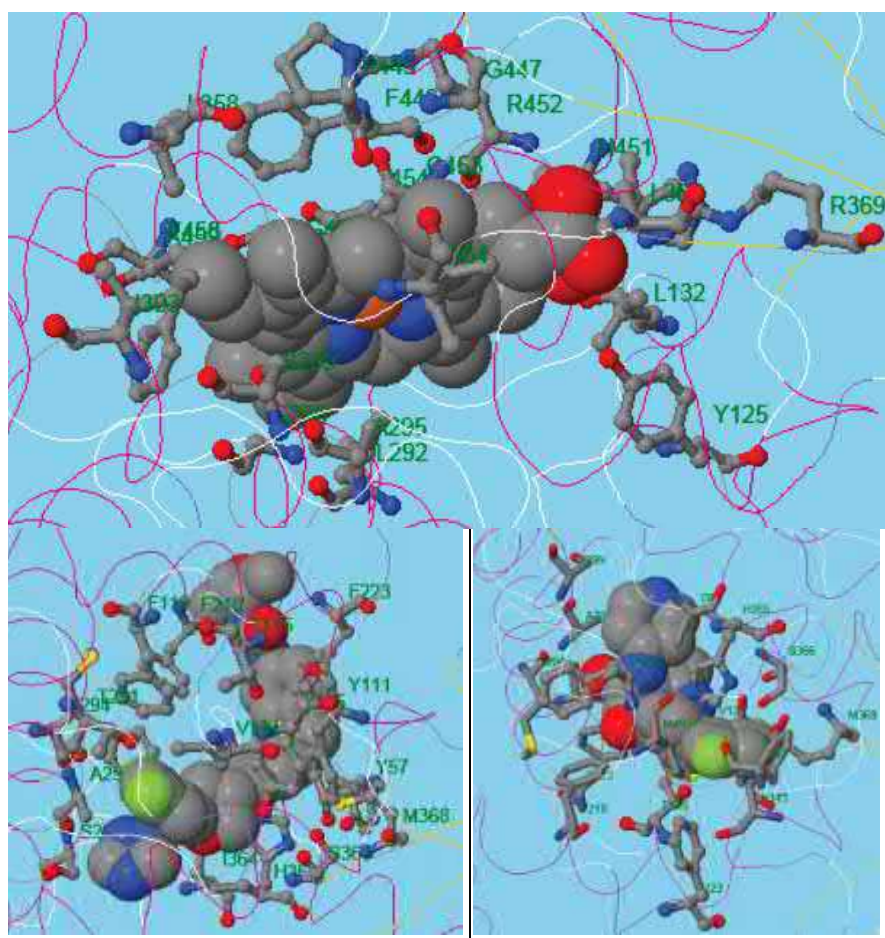
Таблица 30 – Описание сайтов активного центра фермента CYP41A *A. flavus* NRRL 3357

Аминокислотные остатки, позиции «пакета» активного центра и связь с лигандами (лиганды: Vr – вориконазол; Pz – позаконазол; Lan – ланостерол; Hem – гем)				
T54	F119 – Vr, Pz	P226	L362	I454 – Hem
Y57	Y125 – Vr, Pz, Hem	W227	S363 – Hem	G455 – Hem
G58	L132 – Hem	L292 – Hem, Lan (?)	I364 – Vr, Pz, Lan, Hem	F458 – Hem
L80	K136 – Hem	M294 – Pz	S366 – Vr, Pz, Lan	A459 – Hem
L81	I139	A295 – Vr, Pz	L367 – Hem	Y460
R83	L143	G296 – Hem	M368 – Pz, Lan	N462
I85	A190	H298	L391	L463
I110	L194	S299 – Pz, Hem	P445 – Hem	S491 – Lan
Y111 – Vr, Pz	F218 – Pz, Lan	S300	F446 – Hem	S492 – Lan
P113	N222	I303 – Hem	H451 – Hem	M493 – Vr, Pz, Lan

Продолжение таблицы 30

Аминокислотные остатки, позиции «пакета» активного центра и связь с лигандами (лиганды: Vr – вориконазол; Pz – позаконазол; Lan – ланостерол; Hem – гем)				
L114 – Lan	F223 – Pz, Lan	I354	R452	F494 – Vr, Pz
T115 – Pz, Lan	M224	L358 – Hem	C453 – Hem	—

При реконструкции картины взаимодействия активного центра фермента с лигандами гемом и триазольными антимикотиками (позаконазолом и TU1) в Raptor X binding sites получили группы, включающие сам лиганд и связывающие его аминокислотные остатки под наименованием соответственно «пакет 1» и «пакет 2» (Рисунок 38). В примененном редакторе качество (достоверность) воссоздания пакета характеризуется показателем «кратность пакета». Кратность пакета представляет частоту встречаемости данного пакета в группе белков, связывающих похожие лиганды. Чем выше показатель, тем точнее прогнозирование пакета (оптимально – свыше 40). Для построенных пакетов она составила, соответственно 83 и 59, что указывает на высокую точность прогнозирования.



Связывание гема. Сайты: Y125, L132, K136, L292, A295, G296, S299, I303, L358, I364, L367, R369, P445, F446, G447, H451, R452, C453, I454, G455, F458, A459.

Пакет 1.

Связывание некоторых азольных антимикотиков. Сайты: Y56, Y111, T115, F119, V124, Y125, F218, F223, T291, M294, A295, S299, I364, H365, S366, M368, M463, F494.

Пакет 2.

Связывание позаконазола

Связывание TU1

Рисунок 38 – Взаимодействие активного центра ланостерол-14-α-деметиلاзы CYP51 *A. flavus* с некоторыми лигандами (структурные картины)

В результате проведенной работы на основании аминокислотной последовательности изученного белка удалось определить некоторые его физико-химические свойства, а также реконструировать вторичную и третичную структуру, воссоздать активный центр. Проведенный анализ показал, что ланостерол-14- α -деметилазы в структурном отношении являются достаточно консервативной группой белков, что позволило успешно воссоздать строение одного из представителей данной группы. Сопоставляя аминокислотные остатки, которые находятся в активном центре CYP51 у различных представителей рода *Aspergillus* представляется, возможным прояснить их видоспецифические различия в чувствительности этих грибов к триазолам.

Нами показано, что наиболее полную информацию о взаимодействии изучаемого фермента с лигандами, естественными и синтетическими, удалось получить путем сопоставления изучаемой аминокислотной последовательности и так называемых последовательностей-«шаблонов», у которых кристаллографические модели получены путем съемки изолированного фермента с конкретным лигандом в активном центре. Именно благодаря предпринятому анализу для CYP51A *A. flavus* определили характер связывания такого количества лигандов, которое еще не удалось охватить в изучении взаимодействия аналогичных ферментов других видов аспергиллов с применением методов традиционной биохимии.

Резюме. Полученные таким образом новые данные о строении и функциональных особенностях ланостерол-14- α -деметилазы *A. flavus* позволят, в числе прочих сведений, разрабатывать «молекулярные эскизы» и синтезировать новые антимикотики целенаправленно, а не использовать менее эффективный эмпирический подход.

В первичной структуре CYP51A выявлены области, постоянные у всех представителей рода *Aspergillus*, и переменные области, являющиеся потенциальными видовыми маркерами. Впервые аналитически воссоздана вторичная и третичная структура CYP51A из протеома *Aspergillus flavus*, получены данные о сайтах связывания с лигандами.

ГЛАВА 5. Совершенствование методологии исследования *Aspergillus* spp.

5.1 Модификация агара Чапека с дрожжевым экстрактом

Синтетическая питательная среда, предложенная ботаником Карлом Чапеком в 1923 г., уже почти на протяжении века является неотъемлемым материалом для экспериментальных исследований различных микромицетов, включая *Aspergillus* spp. Ее отличает сравнительно простой состав и универсальность для неприхотливых микромицетов, способных к использованию минерального азота. Другие синтетические среды (среды Ролена, Понтекорво, Стейнберга, Армстронга, В.И. Билай) в современных исследованиях применяют нечасто, и в отличие от среды Чапека, их не выпускают промышленно, состав ряда из них значительно более сложен [3, 14]. Несмотря на определенные преимущества среды Чапека, многие исследователи предложили ее модификации, направленные на (1) улучшение ростостимулирующих свойств и (2) адаптацию к трофическим потребностям определенной группы микроорганизмов. Так, появились варианты среды с добавками дрожжевого экстракта, пептона, экстракта из зерен кукурузы, повышенным содержанием сахара (20% и более), с аргинином и аминобензойной кислотой и многие другие [55]. Известнейшая модификация – среда Чапека-Докса, имеющая некоторые особенности минерального состава, использовавшаяся в жидком варианте на производстве бензилпенициллина [244]. Большая часть модификаций среды Чапека включала измененный источник азота (повышенный минеральный; минеральный, дополненный особым органическим источником), либо измененную композицию микроэлементов, а варианты с заменой углеводного компонента известны менее. Так, в работах специалиста по селекции штаммов – продуцентов аллергенов Н.П. Журавлевой использована среда Чапека с глюкозой вместо сахарозы [9, 11, 12]. Сахароза, как типичный компонент среды, действительно является одним из наиболее доступных и дешевых углеводов, отличающимся огромным объемом мирового производства. Однако данный углевод является типичным для растений, в организмах человека и животных сахароза потребляется в энергетических целях, но не образуется, и не является нормальным компонентом клеток или межклеточного вещества. Среди массово производимых для различных целей дисахаридов возможно рассматривать лактозу, которая в затронутом аспекте представляет интерес с нескольких позиций: (1) данное соединение специфично для животных, (2) используется в организме не только для энергетического, но и пластического обмена (полученная из лактозы галактоза необходима для образования галактоцереброзида, ряда гликопротеинов и мукополисахаридов), (3) имеется опыт использования в микробиологической промышленности (в частности, в производстве сред для культивирования энтеробактерий). Таким образом, в данной работе возникла предпосылка

опробовать модифицированный вариант среды Чапека с дрожжевым экстрактом, где сахароза заменена на лактозу.

Модифицированную среду приготовили так же, как описано в разделе «Культурально-морфологическое исследование *Aspergillus* spp.» с заменой сахарозы на такое же количество лактозы (Реахим, Россия). Пассажи тест-штаммов *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *A. sydowii*, *A. candidus*, *A. nidulans*, *A. ochraceus*, *A. tamaris*, *A. amstelodami*, *A. calidoustus*, *A. ustus*, *A. wentii* выполнили трехточечным методом на агаре, разлитом в чашки. Инкубацию выполнили при 30°C (для *A. wentii* – при 25°C) 7 суток (для *A. ustus*, *A. fumigatus* и *A. wentii* – 10 суток). По окончании срока инкубации регистрировали культуральные свойства, в том числе с использованием фотофиксации. Характеристики колоний, полученные для тест-штаммов на среде с лактозой, сравнивали с аналогичными характеристиками на среде с сахарозой.

Большинство исследованных штаммов *Aspergillus* spp. на двух средах (классической и модифицированной) сходны по своим свойствам (Рисунок 39. А), некоторые замеченные различия касаются деталей строения: у *A. (E.) amstelodami* продукция клейстотециев несколько снижена; у *A. tamaris* образуются более высокие конидиеносцы с более крупными конидиальными головками, конидиеносцы расположены несколько более разреженно; воздушный мицелий в колониях *A. parasiticus* более низкий, культура имеет более бархатистую, а не войлочную текстуру, у *A. calidoustus* в центре колоний появляется высокий белый воздушный мицелий. Данные особенности по своей выраженности находятся в пределах естественной вариации строения колоний указанных видов, выявленных при проведении культурально-морфологического раздела исследования. У тест-штамма *A. sydowii* на среде произошла продукция типичного темно-красного диффундирующего пигмента, что нечасто бывает у культур с длительным сроком музейного хранения.

Сложнее оказалось испытание модифицированной среды в отношении штамма *A. wentii*: представители данного вида отличаются осмо- и галофильностью, на классической среде Чапека с дрожжевым экстрактом развивается высокий плотно сплетенный воздушный мицелий, но спороношение может не проявляться. В случае использования лактозы спороношения также не обнаружили, колонии были меньше, чем на среде с сахарозой. Последующие пассажи для *A. wentii* выполнили не в чашках, а в пробирках, поскольку на подсыхающем скосе среды естественно создается более высокая концентрация солей и углеводов. Чтобы уточнить трофические предпочтения культуры приготовили еще две модификации среды Чапека с компонентами, доступными для утилизации *Aspergillus* spp., - мальтозой (входит в состав агара с солодовым экстрактом) и D-маннитом (входит в состав среды Стейнберга) [332, 333]. Инкубацию посевов провели при 25°C 12 суток (данный вид — психрофил).

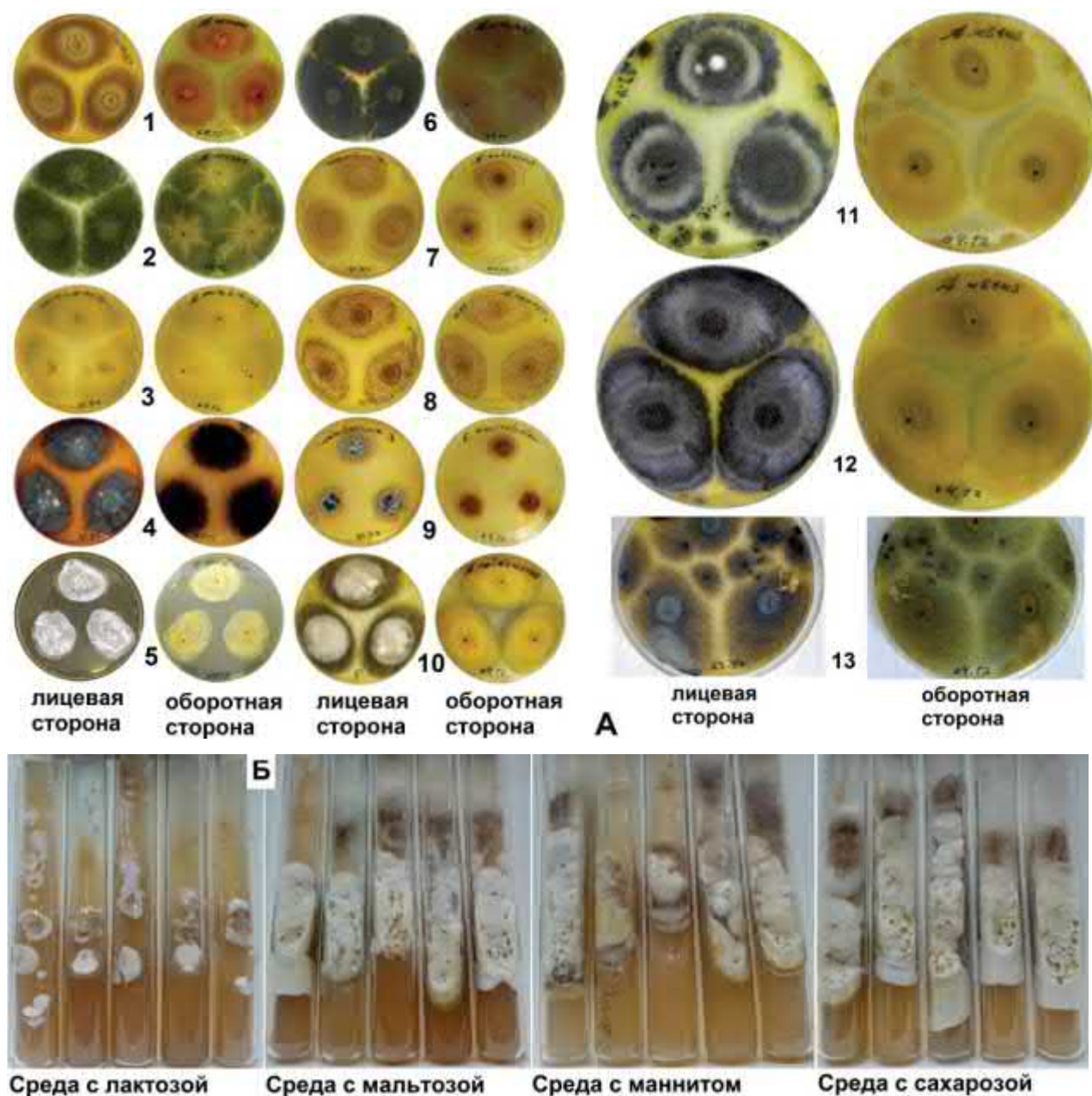


Рисунок 39 – Культуральные свойства *Aspergillus* spp. на среде Чапека с дрожжевым экстрактом модифицированного состава

Примечание: А – колонии штаммов *Aspergillus* spp., для которых лактоза является оптимальным источником углерода (1 – *A. terreus*; 2 – *A. oryzae*; 3 – *A. parasiticus*; 4 – *A. sydowii*; 5 – *A. candidus*; 6 – *A. nidulans*; 7 – *A. ochraceus*; 8 – *A. tamarii*; 9 – *A. amstelodami*; 10 – *A. calidoustus*; 11, 12 – *A. ustus*; 13 – *A. fumigatus*), Б – рост *A. wentii* на средах Чапека с различными углеводами

Как оказалось, многоатомный спирт маннит, а также мальтоза и сахароза обладают хорошим трофическим действием на *A. wentii*: в центральной части скоса развиваются крупные высокие белые колонии с каплями чуть желтоватого экссудата, которые, подсыхая, образуют «кратеры», а на высоте скоса развито спороношение, эта область роста имеет буро-коричневую

окраску и бархатистую текстуру. При микроскопии препаратов из колоний в зоне спороношения видны крупные конидиальные головки, характерные для вида.

Напротив, на среде с лактозой рост заметно более ограниченный, в колониях экссудат не образуется, спороношение развито при визуальном осмотре очень слабо, немногочисленные конидиеносцы видны при микроскопии (Рисунок 39.Б). Такие особенности роста *A. wentii* очевидно связаны с тем, что представители этого вида не образуют β -галактозидазу, поэтому используют для роста на среде только углерод аминокислот из дрожжевого экстракта. В доступной литературе не удалось обнаружить сообщение о наличии β -галактозидазы (лактазы) у *A. wentii*.

В целом разработанная модифицированная среда Чапека с дрожжевым экстрактом и лактозой обладает достаточными трофическими и дифференцирующими качествами для культивирования и морфологической дифференцировки условно-патогенных *Aspergillus* spp. Ограничения по ее использованию у редких аспергиллов-возбудителей инфекций могут быть обусловлены видоспецифичными особенностями спектра сахаролитических ферментов. Кроме того, возможность использования лактозы аспергиллами делает перспективным разработки новых питательных сред на основе молочной сыворотки.

5.2 Особенности масс-спектрометрического исследования экстракта из клеток *Aspergillus* spp.

Создание оригинального масс-спектрометрического банка. Перед исследованием споры штаммов быстрорастущих видов (*A. fumigatus*, представителей секции *Nigri* и *Flavi*, *A. terreus*) в объеме 1 бактериологической петли №2 засевали в 0,5 мл бульона Сабуро с 2% глюкозы, разлитого в пробирки Эппендорф объемом 1,5 мл, и инкубировали 1 сутки при 37°C. Штаммы более медленно растущих видов инкубировали в 2 мл бульона Сабуро в пробирках при 30°C с ежедневным просмотром до получения тонкой пленчатой колонии. Полученные пленчатые колонии отмывали от питательной среды путем повторного встряхивания в деионизованной воде на центрифуге-вортексе MSC-6000 (Biosan, Латвия). Затем материал колонии обрабатывали в 500 мл 70% этанола на 30 мин, после этого удаляли этанол путем повторного центрифугирования и аспирации. К материалу колонии добавляли 50 мкл 70% муравьиной кислоты, встряхивали на центрифуге-вортексе, выдерживали 10 минут, затем вносили 50 мкл ацетонитрила и перемешивали жидкость пипетированием. После центрифугирования (6000 об/мин, 1 мин) по 2 мкл полученного экстракта из культуры наносили на 2 позиции мишени масс-спектрометра (384-точечная стальная мишень с полированным покрытием). Экстракты на мишени высушивали в химическом вытяжном шкафу, затем на каждую позицию мишени с экстрактом наносили 1 мкл насыщенного при комнатной температуре раствора вещества матрицы для ионизации белков в диапазоне молекулярных масс 0,7–20 kDa. В качестве матрицы

использовали α -циано-4-гидроксициннамовую кислоту (Bruker Daltonik GmbH, Германия) в стандартном растворителе: 50% хроматографического ацетонитрила; 47,5% деионизованной воды; 2,5% трифторуксусной кислоты и вновь сушили под тягой.

Использован MALDI-TOF-масс-спектрометр Autoflex speed TOF/TOF (Bruker Daltonik GmbH, Германия) с программой управления flexControl 3.4 (того же производителя). Масс-спектрометрию проводили в линейном режиме с детекцией положительно заряженных ионов, соответствующих диапазону молекулярных масс 2000–20137 Da. Напряжение на «источниках ионов» задано, соответственно, 19,89 кВ (1-ый источник) и 18,64 кВ (2-ой источник). Установили подавление сигналов от продуктов распада матрицы до 1 kDa. Ультрафиолетовый лазер (Nd:YAG) для ионизации исследуемых образцов за 1 цикл производил 200 вспышек с частотой 1 кГц. С каждой позиции мишени производили съемку суммарного масс-спектра, соответствующего ≥ 1200 вспышкам (не менее 6 циклов). Съемку масс-спектров проводили с ручным управлением, а также автоматически с использованием MALDI Biotyper RTC.

Перед проведением исследования масс-спектрометр калибровали с помощью стандартной смеси белков Bruker BTS (включает экстракт белков *E. coli* DH5 α , а также рекомбинантные миоглобин и РНКазу человека).

Изучение масс-листа полученных масс-спектров (выборочно) провели с помощью flexAnalysis 3.1. Для видовой идентификации масс-спектров белковых экстрактов использовали MALDI Biotyper OC 3.1 со встроенной базой (библиотекой) масс-спектро-профилей мицелиальных грибов «Fungi Library». При установлении видовой принадлежности изолятов по данным масс-спектрометрии руководствовались 2-мя стандартными критериями «score value» (далее – показатель достоверности идентификации) и «категорией идентификации». Диапазоны значений и классическая интерпретация показателя «Score Value»: 1,700-1,999 – возможная родовая идентификация; 2,000-2,299 – уверенная родовая идентификация, возможная видовая идентификация; 2,300-3,000 – видовая идентификация с высокой вероятностью. Категории идентификации (А, В, С) на основании свойств выборки из 10 типовых масс-спектров (МСП), наиболее близких к идентифицируемому, имеют следующие определения:

А. Наиболее сходному масс-спектру из базы данных соответствует значение score value в диапазоне 2 — 3, другие близкие спектры со score value в том же диапазоне соответствуют тому же виду, что и первый. Прочие масс-спектры со score value в диапазоне 1,7 — 1,9 соответствуют тому же роду, что и наиболее близкий.

В. В эту категорию включают образцы (масс-спектры), для которых не полностью выполняются критерии категории «А», но применимы следующие требования: (1) наиболее схожему масс-спектру из базы данных соответствует значение score value 1,7 — 3; (2) другие

близкие спектры с тем же диапазоном значение score value соответствуют, по меньшей мере тому же роду, что и первый наиболее близкий масс-спектр.

С. В выборке масс-спектров из базы данных нет сходства по родам и видам.

Штаммы подвергали масс-спектрометрическому исследованию данной процедуре повторно с целью получения более высоких показателей видовой идентификации. Количество повторных съемок на 1 штамм оказалось следующим: 1 съемка – 66 (27,7%); 2 съемки – 99 (41,6%); 3 съемки – 35 (14,7%); >3 съемок – 38 (16,0%). Особенности масс-спектрометрических свойств аспергиллов, выявленные в ходе реализации данного направления работы, представлены в разделе 3.2 «Особенности показателей видовой идентификации среди представителей различных видов *Aspergillus* spp.» Главы 3.

Создание и испытание оригинальной базы масс-спектро-профилей для совершенствования видовой идентификации возбудителей аспергиллеза с использованием MALDI-TOF-масс-спектрометрии. Для получения базы (библиотеки) типовых масс-спектро-профилей из собранного масс-спектрометрического банка извлекли масс-спектры экстрактов основных возбудителей аспергиллеза, руководствуясь следующими критериями: (1) источник MALDI-масс-спектра - штамм, успешно идентифицированный методом таргетного ДНК-секвенирования таксономически значимого локуса генома (ITS или β -тубулина); (2) при исследовании штамма культурально-морфологическим и физико-химическим методом в его культуре не обнаружили посторонних микроорганизмов; (3) MALDI-масс-спектр в выборке для конкретного вида *Aspergillus* spp. отличается сочетанием высоких значений показателей интенсивности доминантных пиков и наибольшей детализировкой масс-листа. После составления базы провели работу по оценке ее чувствительности («положительный контроль») и специфичности («отрицательный контроль»). Для обоих контролей использовали изоляты и MALDI-масс-спектры *Aspergillus* spp. (положительный контроль), а также других микромицетов и бактерий (отрицательный контроль), культуры которых собрали и идентифицировали морфологическими, биохимическими и физико-химическими методами. Работы произвели на MALDI-TOF-масс-спектрометре LaserToF LT2Plus (SAI, Великобритания) с пакетом программного обеспечения BactoSCREEN-ID (ООО «ПФ Литех», Россия). Подготовку культур к исследованию, линейную MALDI-TOF-масс-спектрометрию, внедрение масс-спектров в базу данных провели согласно протоколам производителей оборудования и программного обеспечения. В качестве базы сравнения использовали встроенную в стандартное программное обеспечение базу масс-спектрометра LaserToF LT2Plus. По завершении испытаний провели расчёт диагностической чувствительности, специфичности и диагностической эффективности составленной базы.

Результаты работы по данному направлению представлены в разделе 3.5 «Разработка и испытание оригинальной базы (библиотеки) масс-спектро-профилей *Aspergillus* spp.» Главы 3.

Аннотирование масс-спектров (поиск полипептидов, соответствующих пикам масс-спектра) провели с помощью ресурса TagIdent (<http://web.expasy.org/tagident/>). Для аннотирования выбрали штаммы видов *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. terreus*, *A. oryzae* и *A. clavatus*, поскольку для этих видов проведены наиболее детальные работы по изучению и воссозданию генома [86, 217, 248, 249]. Из собранного банка данных выбирали кандидатные масс-спектры по следующим критериям: (1) величина показателей достоверности идентификации, (2) сравнение абсолютной интенсивности доминирующих консервативных пиков при наложении масс-спектров, (3) в качестве дополнительного критерия в малых выборках — величины отношения сигнал/шум для консервативных пиков. Выбор масс-спектров (по 1 на каждый интересующий вид) проводили с использованием flexAnalysis и MALDI Biotyper OC. Из отобранных масс-спектров получали масс-листы с помощью flexAnalysis.

Аннотирование масс-спектров (масс-листов) в TagIdent выполнили по величинам m/z пиков ($\approx M_r$ полипептидов), руководствуясь следующими допущениями: (1) при ионизации белков в ходе MALDI-TOF-масс-спектрометрии ионы (в-основном) получают заряд +1; (2) допускается несколько сниженное численное значение величины m/z по причине протеолиза отдельных белков клеткой, а также частичной фрагментации при ионизации лазером; (3) M_r белка численно не может быть меньше величины m/z соответствующего ему пика в масс-спектре. Из масс-листов для аннотирования выбирали пики с соотношением интенсивности сигнал/шум (S/N) не менее 3. Поиск полипептидов выполняли в базах Swiss-Prot и TrEMBL. В случае, когда функцию полипептида не удалось определить непосредственно, выполняли поиск аналогичных полипептидов с известной функцией с использованием базы BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), раздела pBLAST по алгоритму «protein-protein blast».

Использованы данные о геномах следующих штаммов: *A. fumigatus* Z5, *A. fumigatus* RP-2014, *A. terreus* NIH 2624, *A. clavatus* NRRL 1, *A. nidulans* FGSC A4, *A. oryzae* 100-8, *A. oryzae* ATCC 42149, *A. oryzae* 3.042 (данные находятся в свободном доступе в открытых базах данных UniProtKB/Swiss-Prot, UniProtKB/TrEMBL, Protein Data Bank и других).

По результатам аннотирования изучено распределение выявленных полипептидов по особенностям идентификации (определены непосредственно, определены по аналогам, не идентифицированы), а также распределение идентифицированных полипептидов по специфичности в отношении таксонов микромицетов (уникальны для вида, специфичны для рода *Aspergillus*, встречаются у других аскомицетов). Для пиков, которые аннотировать не удалось, строили распределение по диапазонам величин m/z (M_r). Сравнивали аминокислотный состав групп спектрообразующих полипептидов у исследуемых видов аспергиллов. Для этого

группировали вместе все полученные последовательности аминокислот конкретного вида *Aspergillus* spp. в формате FASTA в единый файл. Затем суммарное количество аминокислот каждого вида делили на количество аналитически обнаруженных полипептидов и определяли долю аминокислоты (в %) от среднего количества аминокислот в спектрообразующем полипептиде у данного вида аспергиллов. На основании этого расчета определяли обобщенную характеристику аминокислотного состава белков, экстрагируемых с использованием стандартного протокола и формирующих масс-спектр экстракта из культуры. Также определяли доли групп аминокислот с различными типами радикалов (неполярные, полярные незаряженные, кислые и щелочные).

Наиболее полно результаты работы по данному направлению представлены в разделе 3.1 «Характеристика масс-спектра клеточного экстракта *Aspergillus* spp. Расчетный химический состав спектрообразующих белков и пептидов» Главы 3. В качестве примера использования приемов аннотирования MALDI-масс-спектра показан анализ спектрообразующего белка *A. fumigatus*, соответствующего пику 14,9 kDa (Рисунок 40.А). С помощью серии биоинформационных редакторов найден белок, соответствующий данному пику, он идентифицирован, определена сеть его взаимодействий с другими белками. Избран один из наиболее высокомолекулярных белков из спектра, им оказалась цитозин-дезаминаза / урацил-фосфорибозил-трансфераза. Данный фермент, как видно из наименования, бифункционален, позволяет получать в клетках микромицета уридинмонофосфат из цитозина для включения в состав РНК; реакция идет в две стадии, имея вид: цитозин + H₂O ↔ NH₃ + урацил; урацил + рибозилпирофосфат ↔ дифосфат + уридинмонофосфат (УМФ); обе стадии реакции обратимы. Интересно, что у млекопитающих более типично образование УМФ иным путем – через предшественника в виде оротидинмонофосфата, который претерпевает декарбоксилирование [95], а у бактерий встречается 3 альтернативных варианта биосинтеза УМФ: два уже описанных и за счет прямого фосфорилирования уридина с помощью уридинкиназы [206].

Третичная структура воссоздана с помощью редактора Swiss-Model; фермент образуют глобулу, включающую α-спирали и β-складчатые структуры (Рисунок 40.Б); вероятно, может формироваться и четвертичная структура различных типов (гомоолигомеров), поскольку анализируемый белок относится к группе так называемых «морфеинов» [308].

Благодаря редактору STRING 10 определили сеть межбелковых взаимодействий цитозин-дезаминазы / урацил-фосфорибозил-трансферазы (Рисунок 40.В). Отдельные белки показаны в виде цветных сфер с уникальными номерами во внутренней базе данных редактора, далее для удобства у каждого белка отмечены 3 последние цифры номера-идентификатора: №191 цитозин-дезаминаза/урацил-фосфорибозил-трансфераза (анализируемый белок);

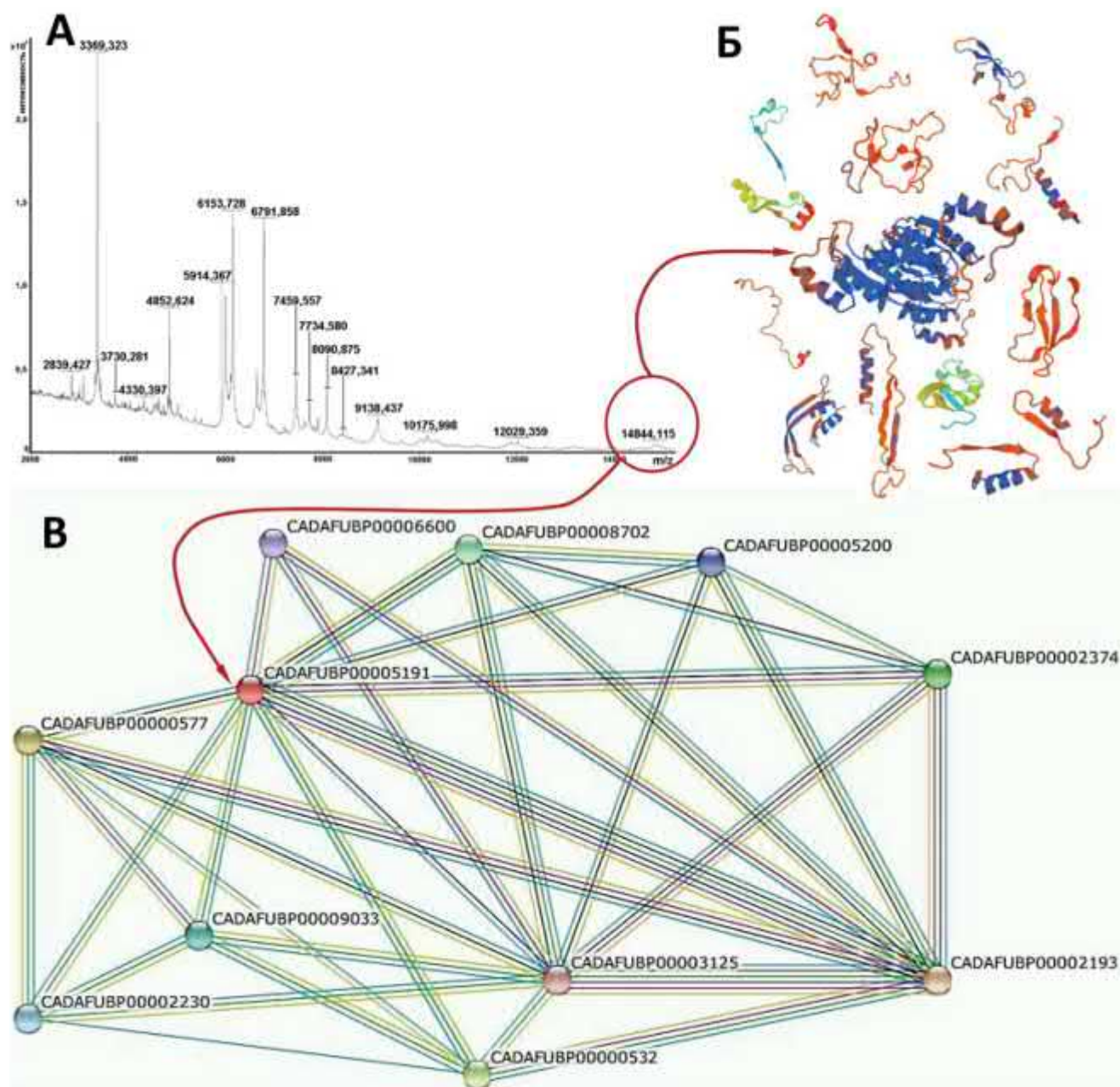


Рисунок 40 – Пример результата анализа спектрообразующего белка из протеома *A. fumigatus*, соответствующего пику 14,9 kDa

Примечание: А – MALDI-масс-спектр экстракта из культуры штамма *A. fumigatus*; Б – третичная структура спектрообразующих белков *A. fumigatus* по результатам реконструкции; В – сеть межбелковых взаимодействий анализируемого белка. Пик, структура и положение белка в сети взаимодействий объединены красными линиями

№600 АТФаза-понтин семейства AAA; №702 уридинкиназа Ura6; №200 неканоническая пуриновая NTP-пирофосфатаза семейства rdgB/HAM1; №374 оротидин-5'-фосфат-декарбоксилаза PycG; №577 уридиннуклеозидаза Urh1; №033 инозин- и гуанозин-специфичная

пуриновая нуклеозид-фосфорилаза I; №230 белок, несущий домен IdgA; №532 цитозиндезаминаза; №125 урацилфосфорибозилтрансфераза; №193 уридинкиназа.

Цветными соединительными линиями показаны различные типы взаимодействия (согласно особенностям отображения в STRING 10): **вишневая** – экспериментально зарегистрированное взаимодействие белков; **голубая** – взаимодействие белков известно по данным сторонних биоинформационных баз; **зеленая** – белки во взаимодействующей паре кодируются соседними генами в хромосоме; **красная** – структурный ген одного белка возник благодаря слиянию предшественника с геном второго белка из взаимодействующей пары; **синяя** – гены белков взаимодействующей пары присутствуют в геномах различных живых организмов обычно совместно; **светло-зеленая** – в различных информационных ресурсах наименования белков взаимодействующей пары часто используют при поиске вместе; **черная** – гены белков взаимодействующей пары экспрессируются совместно; **фиолетовая** – белки в паре являются гомологами по первичной последовательности.

Все возможные типы межбелковых взаимодействий имеются между цитозиндезаминазой / урацил-фосфорибозил-трансферазой и уридинкиназой. Наличие последнего фермента и оротидин-5'-фосфат-декарбоксилазы указывает на то, что у *A. fumigatus* также имеется 3 варианта образования УМФ. Присутствие большей части белков в сети взаимодействия очевидно, поскольку они относятся к процессам биосинтеза и превращения азотистых оснований нуклеиновых кислот и моонуклеотидов. Кроме того, белок с доменом IdgA тоже имеет отношение к превращению азотистых оснований, он является гидролазой, катализирующей реакцию вида: псевдоуридин-5'-фосфат → рибозо-5'-фосфат + урацил [331]. Название домена «IdgA» происходит от имени пигмента индигоидин А, в синтезе которого участвуют белки-носители фермента IdgA [285]. Наиболее необычным «звеном» сети взаимодействий является АТФаза-понтин семейства «ААА» (АТФазы, ассоциированные с широким кругом клеточных процессов), поскольку этот фермент напрямую не связан с обменом нуклеотидами, но, вероятно, задействуется при экспрессии генов других белков сети взаимодействия цитозин-дезаминазы / урацил-фосфорибозил-трансферазы. Показано, что понтин, наряду с другими белками того же класса – рептинами, образуют комплексы с нуклеосомами, участвуют в организации структуры хроматина [279]. Гипотеза о роли понтин в экспрессии белков из сети взаимодействий анализируемого фермента подкрепляется тем, что большинство из них, как видно на Рисунке 40.В, имеют структурные гены, близко расположенные на нуклеосоме. В целом же наличие цитозин-дезаминазы / урацил-фосфорибозил-трансферазы в MALDI-масс-спектре указывает на высокую концентрацию этого белка в молодой растущей культуре *A. fumigatus* (и *Aspergillus* spp.), что объясняется большой потребностью в УМФ для синтеза матричной РНК.

Резюме. Таким образом, в представленной работе, наряду с общепринятыми методами микробиологических исследований, выполнен ряд разработок для совершенствования исследования свойств условно-патогенных *Aspergillus* spp. имеющих прикладное значение. Модифицированную среду Чапека с дрожжевым экстрактом и лактозой можно использовать для дифференцировки *Aspergillus* spp. по культурально-морфологическим свойствам, в перспективе ее также можно выделять для выделения аспергиллов и сходных по трофическим потребностям микромицетов из объектов внешней среды. Последний вариант использования интересен, например, для выявления грибковой контаминации лекарственных средств, где лактоза часто содержится в качестве вспомогательного компонента.

«Отправной точкой» совершенствования масс-спектрометрического исследования *Aspergillus* spp. явился способ получения культуры для последующей экстракции белков и пептидов. Классические приемы забора материала из культуры, рекомендованные производителем оборудования, подразумевает либо использование краевого мицелия растущей колонии на плотной питательной среде, либо рекультивирование штамма в жидкой питательной среде в пробирках, закрепленных во вращающемся штативе-ротаторе, для получения микроколоний-«пеллет» [227]. Оба подхода обладают рядом недостатков. При заборе краевого мицелия оператор неизбежно захватывает фрагмент питательной среды, который может мешать анализу; кроме того неизбежно попадание в материал разновозрастных клеток, часть из которых непригодна для исследования. При работе с «пеллетами» повышается возможность образования аэрозоля секретируемых аллергенов *Aspergillus* spp., кроме того, «пеллеты» обладают очень малой плотностью относительно воды, поэтому их не удастся эффективно «отмывать» от питательной среды на центрифуге. «Пеллеты» часто закрывают устье наконечника микродозатора при манипуляциях им, и делают перемену экстрагирующих реагентов невозможной. В качестве другого альтернативного способа можно рассматривать забор материала «точечной» ранней колонии аспергилла с питательной среды. Когда колония еще только начинает формироваться из конидии (конидий), ее можно снять с поверхности агара целиком, и после этого обработать муравьиной кислотой прямо на мишени масс-спектрометра, так же, как колонии дрожжевых грибов. В нашей практике удавалось получить результативную съемку при подготовке культуры таким методом, в частности, при работе с *A. fumigatus*, но следует учитывать, что (1) при этой манипуляции колонии микромицетов сильно повреждаются, (2) необходимо включать в анализ многие колонии, поскольку на этапе отбора материала микромицеты в посевах еще не успеют развить необходимую для дифференцировки морфологию.

Субкультивирование микромицетов на жидкой среде Сабуро с целью подготовки к масс-спектрометрии ранее в сравнении с другими приемами подготовки исследовали Cassagne С. и

соавторы [96], однако, они не обнаружили достоинств этого метода, и в заключении своей работы сообщили, что наиболее эффективно исследование краевого мицелия с агара Сабуро. При этом на снимках MALDI-масс-спектров *A. fumigatus* в оригинальной публикации авторов (!) видно, что типичный для аспергиллов комплекс пиков достигает наибольшей интенсивности именно при работе с жидкой, а не с плотной средой.

Пленчатую микроколонию, полученную на жидкой питательной среде без механического перемешивания удобно «отмывать» от компонентов среды на центрифуге, добавлять и удалять в ее присутствии экстрагирующие реагенты с помощью микродозатора. Во время манипуляции наконечником дозатора колонию смещают на край пробирки (типа Эппендорф), таким образом, она не перекрывает устье наконечника, и не мешает оператору. Пленчатая микроколония состоит в основном из гиф прорастающих конидий, которые имеют мягкую клеточную стенку, податливую для кислотной (химической) экстракции белков и пептидов. Полученный из пленчатой микроколонии экстракт позволяет производить результативную масс-спектрометрическую съемку при настройках оборудования, типичных для микробной идентификации, которые детально указаны в данной главе.

К настоящему моменту для видовой идентификации микромицетов создано несколько масс-спектрометрических баз («библиотек»). База «AMPSL», разработанная в данном исследовании, отличается от аналогов (1) способом субкультивирования микромицетов, как указано выше и (2) включением результатов съемок нескольких субкультур для ряда штаммов *Aspergillus* spp. Последнее обстоятельство позволяет более полно учитывать биохимический (физико-химический) полиморфизм аспергиллов, который может затруднять идентификацию MALDI-масс-спектра при использовании традиционных коммерческих баз.

По-видимому, первой успешной попыткой аннотирования MALDI-масс-спектра клеток микроорганизма была работа Рыжова В.и Фенселау К. [295], опубликованная в 2001 г. С помощью сетевого ресурса «Sequence Retrieval System module», ныне не существующего, а также биоинформационной базы SwissProt/TrEMBL, авторы аннотировали MALDI-масс-спектр *E. coli* K-12. В результате работы установили, что почти половина всех белков, формирующих MALDI-масс-спектр кишечной палочки, происходит из рибосом. В работе обращает на себя внимание тот факт, что авторы почти не акцентируют внимание на возможные проблемы поиска соответствий в базе данных белков, допуская только расхождение при утрате белковым ионом N-концевого остатка метионина. Несмотря на потенциальные возможности в микробиологии, которые предоставляет аннотирование MALDI-масс-спектра, нельзя утверждать, что это направление получило интенсивное развитие в дальнейшем. Его воплощения связаны в большей степени не с расшифровкой полных MALDI-масс-спектров, а экспресс-обнаружением отдельных факторов вирулентности и резистентности к противомикробным препаратам по

соответствующим пикам. Так, например, для исследования штаммов *Staphylococcus aureus* были предложены способы выявления метициллин-чувствительных (MSSA) и метициллин-устойчивых вариантов (MRSA) с некоторой дифференцировкой типа генетической кассеты *SCCmec* [189], простого обнаружения при исследовании целых клеток σ -гемолизина [133] и токсина Пантон-Валентайна [79].

При работе с микроорганизмами-эукариотами исследователь сталкивается с несоизмеримо большим геномом и протеомом, что делает процесс аннотирования MALDI-масс-спектра более сложным, требующим выбора из ряда альтернативных белков для конкретного пика, выдвижения гипотез о допустимых вариантах потери молекулярной массы (части молекулы) белком при MALDI-ионизации. В определенной степени в этом процессе остается доля субъективного влияния исследователя, поскольку акт MALDI-ионизации различных биополимеров, несмотря на длительный период развития метода, до конца не ясен. Тем не менее, только средства биоинформатики позволят получить представления о наиболее полной композиции MALDI-масс-спектра целых клеток или клеточного экстракта, о наличии в нем пиков белков и пептидов, определяющих важные в медицинском отношении качества грибкового патогена: критические витальные процессы, реализация вирулентности, резистентности к антимикробным препаратам, возможно – антигенных и аллергенных свойств.

На современном этапе, как это удалось показать в данной работе, возможен не только поиск и идентификация спектрообразующих белков и пептидов. Предложенный в работе алгоритм аннотирования, основанный на возможностях группы биоинформационных редакторов и баз, позволяет определять гомологи белка, что особенно важно, если нет исходных данных о его функциональном предназначении, а также *in silico* моделировать его подробные характеристики, включая вторичную и третичную структуры, межбелковое взаимодействие. Значение этого знания заключается в возможности интерпретировать изменение параметров пика конкретного спектрообразующего белка, прежде всего интенсивности, при изменении условий культивирования в опыте или при сравнении штаммов одного вида, как физиологический ответ на воздействие или индивидуальные метаболические особенности штамма соответственно.

Таким образом, решение задач исследования потребовало дополнить существующую методологическую базу для изучения *Aspergillus* spp., включая морфологическое и физико-химическое направления работы. Разработанные приемы могут быть применены как в диагностической практике, так и при исследовании прикладных и фундаментальных аспектов биологии аспергиллов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За 250-летний исторический период изучения аспергиллов и вызываемых ими патологий накоплен значительный объем данных по их биологическим свойствам, представляющих интерес, в том числе в прикладном аспекте – то есть для лабораторной диагностики. Тем не менее, в связи с рядом событий недавнего прошлого и современности эти сведения недостаточны для работы современного медицинского микробиолога. Явления, ставшие предпосылками этой ситуации – следующие. В связи с прогрессом трансплантологии, онкологии и терапии аутоиммунных патологий последних десятилетий стали доступны методы лечения ряда заболеваний, ранее считавшихся абсолютно летальными. При этом существенно расширился круг пациентов с факторами риска развития инвазивного аспергиллеза, по существу именно в этих сферах клинической медицины аспергиллез, как осложнение фоновой патологии, стали регистрировать чаще, чем при других предрасполагающих состояниях [2, 13, 84]. Кроме того, существенный вклад в заболеваемость вносит пандемия ВИЧ-инфекции [138]. Хотя инвазивный аспергиллез не считают типичным ВИЧ/СПИД-ассоциированным микозом, именно у этой категории пациентов его чаще выявляют посмертно [361]. Кроме того, ИА может проявиться в качестве осложнения других тяжелых инфекционных поражений органов дыхания, вызываемых вирусом гриппа [48] и SARS-CoV2 [353], а также микобактериями туберкулезного комплекса [335]. Наконец, эпизодически аспергиллез легких возникает, как вентилятор-ассоциированная пневмония у пациентов реанимаций различного профиля вне типичных предрасполагающих групп риска [52]. Такие случаи особенно сложны для планирования профилактических мероприятий и своевременного выявления «микологических» пациентов.

Необходимость совершенствования культурального исследования для диагностики аспергиллеза связана с некоторыми фактическими особенностями его результативности. К сожалению, по информации некоторых авторов его чувствительность в среднем варьирует в пределах 25% - 50%, и кроме того, существенно колеблется в зависимости от фоновой патологии: при онкогематологических заболеваниях – 72%; состояниях после трансплантации солидных органов – 58%; ВИЧ-инфекции в стадии СПИД – всего 14% (!) [311]. Среди случаев аспергиллеза легких, подтвержденных гистологически, в 20% случаев возбудитель не удалось выделить в культуре [181]. Попытки получить гемокультуру аспергиллов оказываются успешными лишь у единичных пациентов, не более, чем в 1% исследований. В последнем случае возможными причинами считают (1) малую «микробную нагрузку» циркулирующей крови жизнеспособными элементами аспергиллов; (2) нефизиологичными условиями среды-флакона гемокультуратора для аспергиллов; (3) склонность гиф к повреждению эндотелия сосудов и быстрому укрытию их тромботическими массами; (4) неспособности мигрирующих

элементов аспергиллов, находящихся внутри фагоцитов, адаптироваться в питательной среде [90].

Последние 2 декады развития лабораторной микробиологии ознаменовались появлением новых приемов индикации и идентификации возбудителей микозов, основанные на методах амплификации нуклеиновых кислот и выявлении специфических пептидных и белковых биомаркеров [43, 97, 283, 315, 321]. Перспективным является направление по обнаружению детерминант резистентности к антимикотикам в диагностической практике [82], которое ранее уже сформировалось в бактериологии [106]. Для успешного использования новых возможностей необходимо углубленное изучение *Aspergillus* spp., создание подробных характеристик тех интересующих субстанций аспергиллов, которые используют (или планируют к использованию) в качестве «мишеней» в молекулярно-генетических и физико-химических методах лабораторной диагностики. Кроме того, определенные изменения происходят и в сфере «традиционных» микробиологических методов – изменились технологии получения компонентов питательных сред, внедрены в практику новые питательные среды (в том числе для выявления *Aspergillus* spp. (ГОСТ Р ИСО 16000, части 16 – 21)) в объектах внешней среды, появились программные средства обработки изображений, которые могут существенно обогатить возможности микроскопического исследования.

Таким образом, по сочетанию вышеизложенных фактов, прикладные биологические особенности условно-патогенных *Aspergillus* spp., значимые для эффективной лабораторной диагностики аспергиллеза, на современном этапе развития лабораторной медицины нуждаются в актуализации, а в ряде случаев данные в этой сфере необходимо получить впервые. Разрешению данных проблемных обстоятельств посвящено настоящее диссертационное исследование.

В результате проведенного экспериментального наблюдения и сопоставления полученных данных с сообщениями в литературе [36, 170, 302-304] удалось выявить две основные тенденции, которые проявились в изучении многообразия *Aspergillus* spp., в том числе имеющих медицинское значение, в конце XX – начале XXI вв.: ярко выраженный полиморфизм отдельных видов (1) и рост числа видов, обоснованных (по большей части) на основании молекулярно-генетического, а не морфологического критерия (2).

В проведенном морфологическом исследовании собран описательный и иллюстративный материал, позволивший в достаточной степени описать морфологический полиморфизм аспергиллов, связанных с (1) индивидуальными особенностями морфогенеза штаммов, а также (2) составом питательной среды. Сформулированы закономерности в разнообразии макро- и микроморфологической организации аспергиллов. Важным аспектом последующего использования данных об изменчивости аспергиллов является уточнение различий в диагнозах

видов, доступных к изучению признаков «классических» и «криптических» возбудителей аспергиллеза.

Собранные в сфере биологии «криптических» видов *Aspergillus* spp. собственные данные и наблюдения из литературы не только вновь указывают на необходимость мониторинга штаммов *Aspergillus* spp., но и требует от современных микологов оценки эволюционной позиции этой группы возбудителей: (1) они являются вымирающей или эволюционно-прогрессивной группой; (2) частотное соотношение встречаемости в конкретных регионах мира определяется действием природных или антропогенных факторов?

В результате проведенного морфологического исследования получены данные о культуральных свойствах аспергиллов на различных питательных средах, а также о морфологическом полиморфизме *Aspergillus* spp.; дополнены сведения об атипичных вариациях конидиального спороношения этих грибов. В данном аспекте работы следует отметить, что полиморфизм возбудителей аспергиллеза, несмотря на их широкую распространенность этих грибов и отсутствие особых питательных потребностей, до сих пор изучали фрагментарно.

В неоднократно цитированных работах Centraalbureau voor Schimmelcultures [161, 170, 179, 304, 343, 352, 345] описание видов и иллюстративный материал приведен, в основном, на единичных штаммах без указания вариаций макро- и микроморфологических признаков. Билай В.И. и Коваль Э.З. [2] в своем атласе поместили фотоснимки, демонстрирующие разнообразие вариантов колоний у некоторых видов аспергиллов (*A. fumigatus*, *A. ustus*, *A. tamaris*, *A. wentii* и некоторых других) на среде Чапека. Также среди отечественных авторов спонтанную изменчивость штаммов аспергиллов (*A. fumigatus*, *A. niger*, *A. clavatus*) из банка культур продуцентов аллергенов изучила Журавлева Н.П. с соавторами [9, 10, 11, 12]. Однако их исследования проведены в ином направлении: изменчивость культуральных свойств на модифицированной среде Чапека-Докса изучена среди клонов штаммов *A. niger* РКПГ F-967, *A. fumigatus* РКПГ F-157/2308, *A. clavatus* РКПГ F-12/275 и некоторых полученных от них селекционированных штаммов. При этом по морфологии колоний популяции клонов штаммов *A. niger* и *A. clavatus* оказались однородными. Среди клонов штаммов *A. fumigatus* авторы выделили 2 морфологических типа колоний: I-ый с нормально развитой пигментацией и спороношением, II-ой, отличающийся образованием белых радиально-складчатых колоний со звездчатым краем и редуцированным спороношением. Последний вариант, вероятно, следует считать проявлением плеоморфной дегенерации у *A. fumigatus*. В случаях исследования различных видов исходные популяции оказались гетерогенными по активности прорастания конидий [10, 11, 12]. Данные, полученные в настоящем исследовании, указывают на более гетерогенный состав штаммов *A. fumigatus* по типу образуемых колоний. Разнообразие связано с использованием более богатых питательных сред, в частности – среды Чапека с дрожжевым

экстрактом (СУА). Наличие дрожжевого экстракта, вероятно, позволяет переориентировать метаболизм гриба. На среде Чапека-Докса биосинтез элементов клетки осуществляется из глюкозы (при использовании модификации среды Н.П. Журавлевой) и нитрата, экспансивный рост колоний происходит, главным образом, как адаптация гриба к потреблению все большего количества ресурсов, а инициация роста возможна только при использовании витаминов, кофакторов ферментов и иных эссенциальных метаболитов, запасенных в конидиях. Дрожжевой экстракт привносит в среду витамины и кофакторы, способствующие уже на начальном этапе роста колонии включения многих метаболических путей, которые обеспечивают не только выживание, как в случае с минимальной средой, но и запуск механизмов дифференцировки мицелия, конидиогенеза и биосинтеза пигментов. Кроме того, более полные данные о полиморфизме аспергиллов в нашей работе связаны с использованием значительно большего количества штаммов.

Группа исследователей из Вагенингенского Университета (Debets A.J.M., Slakhorst M., de Visser A.) в проекте «Экспериментальная эволюция гриба *Aspergillus nidulans*» проводят последовательные пересевы спор, возникших в результате бесполого процесса от двух штаммов (с зелеными и желтыми спорами) и на протяжении исследования регистрируют изменение морфологических признаков (особенности ветвления мицелия, признаки полового процесса и другие). В результате 20 недель опыта (с пересевом каждую неделю) получили различные культуральные варианты у штаммов — потомков. Однако результаты проекта еще не опубликованы, представлено предварительное краткое on-line сообщение [109]. Так по приведенному снимку колоний различных наблюдаемых штаммов заметно, что среди них встречаются варианты с зеленой и серо-зеленой пигментацией, а также разными оттенками желтого пигмента; отдельные штаммы отличались сильно развитым вторичным воздушным мицелием, покрывающим всю колонию.

По нашим данным штаммы с зеленой и желтой пигментацией колоний скорее являются не стойкими, а адаптивными вариантами, и при использовании различных питательных сред возможно осуществлять перевод одного и того же штамма из одного культурального варианта в другой. При проведении серии пассажей через среды с препаратами дрожжевого экстракта (модифицированная среда Чапека, картофельно-глюкозно-дрожжевой агар, но не среду YPD), из бархатистых колоний с изумрудно-зеленой пигментацией можно получить почти полностью желтые колонии с мелкозернистой поверхностью. Интересно, что в последнем случае в колонии уже на ранних сроках инкубации появляется большое количество клеток Хюлле даже в отсутствии клейстотециев.

В значительной доле работ, прямо или косвенно связанных с полиморфизмом аспергиллов, отражены наблюдения не о спонтанной, а об индуцированной изменчивости,

связанной с воздействием какого-либо фактора. Van Diepeningen A.D. и соавторы [338] под действием ультрафиолетового облучения получили на минимальной среде Понтекорво мутанты *Aspergillus japonicus*, *A. carbonarius*, *A. aculeatus*, *A. awamori*, *A. phoenicus*, *A. niger*, *A. intermedius*, *A. usami* и *A. nanus*, отличающиеся от оригинальных штаммов (черных или черно-коричневых) вариантами окраски: желтовато-коричневые, коричневые, серые, оливково-зеленые, белые. В настоящем наблюдении у представителей секции *Nigri* отмечали аномалии окраски колоний, связанной со слабо развитым процессом спорообразования или разреженным расположением конидиеносцев (плеоморфные изменения). В данном случае они явились естественным атрибутом некоторых изученных штаммов, а не насажденным признаком.

Журавлева Н.П. [9] детально изучила проявление действия миковирусов в культуре аспергиллов и некоторых других микромицетов, инициирующих развитие аллергических заболеваний человека. Авторами проведено наблюдение за проявлением действия миковируса при хранении штаммов *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. clavatus* в виде живых культур на скошенных агаризованных средах Сабуро, Чапека-Докса (в собственной модификации с 2% глюкозы вместо сахарозы) и сусло-агаре на различных сроках. В целом, у штаммов всех указанных видов при хранении негативные колонии наблюдали редко. С использованием тех же питательных сред, но с различной концентрацией агара и pH изучили проявление действия миковирусов в гигантских колониях. Как оказалось, наиболее удачными условиями для активации миковирусов оказалось субкультивирование на сусло-агаре с концентрацией агар-агара 1,4% и pH=4,5. Литическое действие проявилось ажурным краем колонии гриба из слившихся негативных колоний миковируса. Напротив, на средах Сабуро и Чапека-Докса с концентрацией агара 2,0% и pH=6,5 наблюдали редкие негативные колонии миковирусов. По данным настоящей работы на основании проведенных наблюдений и собранного фотоархива снимков гигантских колоний можно заключить, что морфологических изменений, свойственных для активации миковирусов, практически не выявляли. Причина этого явления, очевидно, связана с тем, что примененные условия хранения культур в определенной степени близки к рекомендациям по хранению, предложенным Журавлевой Н.П. А именно: использовали питательные среды с концентрацией агара 2%; применяли среды с pH близких к нейтральным (в оригинальной рекомендации 6,0 – 6,5). Но иные условия хранения отличались: срок пересевов установили длиннее (в рекомендациях – не более 3-х месяцев); хранение вели при комнатной температуре (в рекомендациях – при +4°C).

Pihet M. и соавторы [273] в работе, связанной с изучением меланина, как компонента клеточной стенки *A. fumigatus*, привели данные над наблюдением культуральных свойств штаммов дымчатого аспергилла с различной выраженностью меланинообразования. На глюкозо-пептонно-дрожжевой среде наблюдали классические темно-серо-зеленые, совершенно

белые и коричневые колонии. В данном случае исследовали штамм с природными свойствами, а не в результате индуцированных мутаций. Сходные морфологические варианты окраски наблюдали и в настоящей работе на среде Сабуро, но на этой среде не было абсолютно коричневых колоний, как у описанного зарубежными авторами *A. fumigatus* IHEM 15998, а наблюдали сочетание тускло-коричневой центральной части колонии и темно-зеленой краевой части. Хотя на агаре Чапека штамм *A. fumigatus* IHEM 15998 (снимок приведен в той же работе) образовал бледно-рыже-коричневые колонии, которые оказались сходными по пигментации с ростом некоторых штаммов, изученных в данном исследовании на той же среде. Показано, что такие вариации окраса колонии могут быть связаны с дефектами генов лакказы, а также генов, кодирующих факторы транспорта меди.

В практическом аспекте изучения морфологии аспергиллов данная работа является предпосылкой к использованию отечественных штаммов *Aspergillus* spp., в частности из Российской коллекции патогенных грибов, для контроля качества микологических питательных сред по биологическим показателям. До сих пор в отечественной нормативной базе по контролю питательных сред использование эталонных штаммов мицелиальных грибов фактически не предусмотрено (МУК 4.2.2316-08). А коммерческие производители чаще описывают рост тест-штаммов не достаточно подробно, притом указывают обычно штаммы Американской типовой коллекции культур (ATCC).

Как было отмечено в литературном обзоре [97, 283, 289], а затем показано практически в главе 5 настоящего исследования, физико-химический подход, в частности MALDI-TOF-масс-спектрометрия, является значимой альтернативой молекулярно-генетической и морфологической идентификации аспергиллов. Причины различий в результативность идентификации успешно полученного масс-спектра для представителей различных секций рода *Aspergillus* обусловлены, по-видимому, (1) особенностями клеточной стенки гиф, влияющими на результативность экстракции белков, а также (2) составом библиотек масс-спектров для видовой идентификации (особенно существенно для редких видов).

Фактические данные нашего исследования показывают, что аналитическая специфичность MALDI-TOF-масс-спектрометрии клеточного экстракта, как метода внутривидовой идентификации, по существу ограничена только полнотой охвата видового состава базой (библиотекой) типовых масс-спектро-профилей, применяемой для идентификации. С учетом данного обстоятельства актуальны более широкомасштабные исследования разнообразия микроскопических грибов этим методом.

Проведенное комплексное исследование позволило выявить некоторые «криптические» виды *Aspergillus* spp. среди возбудителей аспергиллезной инфекции в Санкт-Петербурге, а именно – *A. awamori*, *A. tubingensis*, *A. calidoustus*, *N. hiratsukae*. Из них первые 3 вида, исходя из

сообщений об их неоднократных находках в различных регионах мира, являются космополитами [44, 71, 121, 152, 178, 188, 198, 209, 256, 305, 341, 343]. В то же время, многие криптоические виды, вероятно, судя по немногочисленным находкам, являются эндемиками, либо видами с относительно ограниченным ареалом распространения (связанным с типом почв, климатическими условиями и прочее). В этом аспекте многообразие представителей рода *Aspergillus* в различных регионах России изучено недостаточно. Важность данного направления в медицинском аспекте обусловлена тем, что инвазивные и неинвазивные формы аспергиллеза, а также микоаллергозы, ассоциированные с аспергиллами, вызываются свободноживущими представителями данного рода. В роду *Aspergillus* в ходе эволюции не сформировались виды, способные к строго паразитическому существованию.

Альтернативным решением проблемы создания системы коллекций аспергиллов (и других микромицетов) является разработка общедоступных баз данных, включающих сведения (1) об источнике выделения штамма, исследователе и учреждении, где получен и идентифицирован изолят, (2) о макро- и микроморфологических свойствах изолята на наиболее распространенных микологических питательных средах, (3) молекулярно-генетических свойствах (последовательностях отдельных локусов генома, данных полногеномного секвенирования), (4) физико-химических свойствах (инфракрасном спектре клеточной стенки, MALDI-масс-спектре полипептидов клеточного экстракта, других характеристиках), (5) малых метаболитах (экстролитах), (6) связи с клиническими случаями у человека и животных, (7) чувствительности к антимикотикам с указанием протокола определения чувствительности, (8) о белках и пептидах (протеомная карта, первичная, вторичная и третичная структура отдельных белков), (9) результате видовой идентификации и методе идентификации, (10) ссылки на опубликованные работы и/или научные отчеты, выполненные с использованием данного штамма. Вышеназванный перечень характеристик составляет по своей сути основу «идеального» паспорта штамма. Однако такой комплексный подход в полной мере не реализован ни в одной крупной микологической коллекции, хотя, отдельные базы данных позволяют осуществлять сетевой доступ к сведениям подобного рода. Среди таких ресурсов можно назвать NCBI (сведения о публикациях, полных геномах, хромосомных картах, локусах генома, последовательностях и кристаллографической структуре белков для типовых штаммов), *Aspergillus* DB (полные геномы некоторых типовых штаммов с транскриптами и их описанием), KEGG (метаболические пути со связями с локусами генома и белками, осуществляемыми биохимическими реакциями типовых штаммов), *Aspergillus.org.uk* (продукция малых метаболитов, но на уровне видов, а не штаммов) и других. Впоследствии опыт создания и работы этих сетевых ресурсов, а также данные, полученные в настоящем исследовании, можно будет использовать для разработки обозначенной выше универсальной базы по микромицетам.

Сравнение различных методов видовой идентификации аспергиллов, предпринятое в данном исследовании на модельной выборке, а также в других работах показало различную точность MALDI-TOF-масс-спектрометрии и морфологического исследования в сравнении с таргетным ДНК-секвенированием. Необходимо предусмотреть возможность исследования проблемных для идентификации образцов в референс-лаборатории методом таргетного ДНК-секвенирования, поскольку сравнительно редко встречающиеся возбудители аспергиллеза, такие, как *A. lentulus*, *A. alabamensis*, *A. calidoustus*, отличаются множественной природной антимикотикорезистентностью, а также трудностью в определении их видов фенотипическими методами. При участии в патологии человека представителей данных видов (и некоторых других, отличающихся сходными свойствами) ошибка идентификации, естественно, поведет к неверному выбору этиотропной терапии и гибели больного.

Известны и ограничения в использовании таргетного ДНК-секвенирования в идентификации видов аспергиллов секции *Flavi* – *A. oryzae* и *A. tamaritii*. Так, в работе известного специалиста по биологическому разнообразию аспергиллов Peterson S.W. [268] автор привел данные по филогенетическим связям внутри различных секций рода *Aspergillus* на основании результатов ДНК-секвенирования генов β -тубулина, кальмодулина, РНК-полимеразы II и внутреннего транскрибируемого спейсера в регионе рибосомальных РНК-генов. При построении филогенетического древа для секции *Flavi*, в одной кладе оказались штаммы «*A. flavus*», «*A. flavus* var. *columnaris*» и «*A. oryzae*». На близкое сходство между видами *A. flavus* и *A. oryzae* по молекулярно-генетическим признакам имеется указание в работе Михайловой Ю.В. и соавторов [23]. В настоящей работе (Глава 2) показаны отчетливо заметные морфологические различия у ряда штаммов *A. oryzae* и *A. flavus*, поэтому считать данные таксономические единицы абсолютно тождественными не следует. *A. tamaritii* по литературным данным отчетливо различим по генетическим критериям от *A. flavus*, тем не менее, некоторые штаммы в рабочей коллекции, идентифицированные как *A. flavus* благодаря ДНК-секвенированию, образовывали отчетливый ярко-коричневый пигмент, который согласно использованным определителям не упоминается для данного вида. Эти штаммы нами реклассифицированы, как *A. tamaritii*.

Видовой состав генеральной выборки штаммов, уточненный на основании комплексного (морфологического, физико-химического и молекулярно-генетического) подхода к видовой идентификации представляют: *A. fumigatus* – 93 (38,1%); *A. niger* – 64 (26,2%); *A. flavus* + *A. oryzae* – 45 (18,8%); *A. terreus* – 6 (2,5%); *A. ustus*, *A. sydowii*, *A. nidulans/tetrazonus* по 4 штамма каждого (1,6%); *A. awamori* и *A. tamaritii* по 3 штамма (1,2%); *A. ochraceus*, *A. candidus*, *A. calidoustus*, *A. niger/awamori* – по 2 штамма (0,8%); *A. clavatus*, *A. wentii*, *E. rubrum*, *E. repens*, *N. hiratsukae*, *E. herbariorum*, *E. amstelodami*, *A. parasiticus*, *A. tubingensis*, *A. versicolor* – по одному штамму (0,4%). В результате выявили два феномена, отличающих этиологию микозов,

вызванных *Aspergillus* spp., на территории России: (1) наличие в группах классических видов возбудителей представителей «криптических» видов, не определяемых в поточной лабораторной работе, и (2) относительно широкий спектр (сравнивая с поточными приемами идентификации) видов, ранее относимых к редко встречающимся в диагностической практике. Несмотря на то, что даже в результате детального пересмотра удельный вес доминантных видов в этиологии существенно не изменился, следует сосредоточить внимание на обнаруженных «минорных» агентах микозов. Основание для этого – исключительно высокий потенциал размножения *Aspergillus* spp. и полиадаптивность этих грибов, что вкуче при благоприятном для конкретного вида сочетании факторов окружающей (в том числе госпитальной среды) позволит этим микромицетам распространиться значительно, и получить широкий доступ к восприимчивым хозяевам – людям из групп риска.

Проведенные работы с привлечением MALDI-TOF-масс-спектрометрии показали, что данный метод обладает достаточной дискриминационной силой для различения основных «классических» видов-возбудителей аспергиллеза, а также до некоторой степени открывает для исследователя штаммовые различия аспергиллов. Однако в последнем случае следует заметить, что нестойкие изменения, видимые в масс-спектре, в том числе и технического характера, пока не позволяют уверенно утверждать о пригодности масс-спектрометрического исследования для внутривидового типирования аспергиллов. Данное обстоятельство фактически отражается тем, что при иерархической кластеризации выборки масс-спектров на результирующей дендрограмме масс-спектры от одного штамма оказываются в различных кладах.

Установить, является ли MALDI-TOF-MS клеточного экстракта адекватным методом внутривидовом типировании микроорганизмов [246], очевидно, станет возможным при экспериментальном соотнесении масс-спектрометрических свойств микробов с их видовой принадлежностью, филогенетическими связями штаммов одного вида и различных таксонов, а также некоторыми важными биологическими свойствами штаммов (например, антимикробной чувствительностью). Наиболее сложным обстоятельством в решении данной проблемы является выяснение вопроса о соотношении вклада штаммоспецифичных биологических факторов и технических факторов в формирование масс-спектра. Особые перспективы открываются для исследователя при использовании идентификации спектрообразующих белков и пептидов, которая позволяет получить доступ к их первичным структурам. В свою очередь, первичная структура — аминокислотная последовательность — благодаря технологиям биоинформатики является основой для реконструкции широкого перечня свойств, включая элементарные (расчетная изоэлектрическая точка при различных pH, молекулярная масса, брутто-формула) и структурные (вторичная, третичная и четвертичная структура), а также прогностические межбелковые и генно-белковые взаимодействия, наличие структурных

аналогов и гомологов у других живых организмов, филогенетические связи организмов на основании аминокислотной последовательности определенного белка или последовательности кодирующего гена, способность связывать различные вещества — лиганды, перечень наиболее вероятных антигенных эпитопов и прочее [264].

Нами показана возможность применения масс-спектрометрии и программно-математической обработки для филогенетического исследования *Aspergillus* spp. Различия дендрограмм, полученных на основе данных таргетного ДНК-секвенирования и масс-спектрометрии на проксимальных уровнях ветвления связано не только с разными принципами их конструирования, но и различными парами «ген-белок», которые изучают в данных исследованиях (по аналогии с сопоставлением морфологического и молекулярно-генетического исследования).

Существование двух различных по масс-спектрометрическим свойствам групп *A. terreus* требует дальнейшего внимания с целью выяснить наличие подвидов ранее установленных или требующих внедрения в таксономию рода *Aspergillus*.

Как уже упоминали ранее, работы с привлечением MALDI-TOF-масс-спектрометрии для неразделенного клеточного экстракта в отношении *Aspergillus* spp. и других мицелиальных грибов ранее выполняли, главным образом, с целью видовой идентификации и проверки ее точности в сравнении с более отработанными методиками [97, 96, 105, 246, 283]. В представленной работе предпринята попытка (одна из первых, но не исключительная), применить тот же методический подход с использованием данной техники, но с дополнительным анализом, для изучения молекулярной биологии аспергиллов. Применение биоинформационных ресурсов позволило использовать масс-спектрометрическое исследование не только для целей видовой идентификации, но и как своеобразный метод анализа в сфере протеомики. Однако следует заметить, что результат идентификации белков и пептидов в данном подходе имеет вероятностный характер в силу ряда допущений, детально описанных в разделе «Методология и методы исследования». К наиболее существенным проблемам данного исследования можно отнести следующие: (1) факт получения молекулами некоторых полипептидов (иногда) заряда более +1 (как, например, рибосомальный белок RL29 у *E. coli*, получающий заряд +2), а также (2) отсутствие возможности определить изоэлектрическую точку полипептида. С другой стороны, использованная методика, по-видимому, является одним из самых быстрых подходов к изучению определенной фракции протеома. К полученным результатам по аннотированию масс-спектров следует добавить, что многие найденные полипептиды до этого определили только при молекулярно-генетическом исследовании, но никогда ранее не находили с помощью биохимических и физико-химических методов.

Существует гипотеза, согласно которой при MALDI-TOF-масс-спектрометрии культур и

экстрактов масс-спектр образуют преимущественно рибосомальные белки. Эта гипотеза в определенной степени была подтверждена в бактериологии [159, 175]. При сопоставлении величин m/z по 5-ти указанным пикам из масс-спектра *A. fumigatus* РКПГ F-1437 с величинами молекулярных масс белков рибосомального протеома *A. fumigatus* Af293, депонированным в базе KEGG, установлено, что из 93 белков лишь 3 обладают относительно близкими величинами Mr: S28e (6191), S30 (6919) и L29e (7758). В отличие от прокариот, как показало наше исследование, состав спектрообразующих молекул у *Aspergillus* spp. более гетерогенный, включает в себя белки и пептиды мембранного, цитоплазматического, митохондриального и даже ядерного происхождения.

Обращает на себя внимание, что наиболее успешное аннотирование MALDI-масс-спектра получили для *A. nidulans* – вида, который имеет наиболее протяженную историю генетических исследований как модельный организм, что прямо или косвенно определило полученный результат.

Выявили распределение неаннотированных пиков по диапазонам масс детектируемых ионов (для MALDI-масс-спектров *Aspergillus* spp.). Условно выделили 3 диапазона: 2 – 5,5 kDa (преимущественно пептиды); 5,5 – 7,0 kDa (пики, которые в масс-спектре отличаются наивысшей интенсивностью; белки); 7,0 – >15,0 kDa (белки относительно высокой массы, пики которых обычно отличаются низкой интенсивностью). Для 3-х изученных видов (*A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. clavatus*) наибольшее количество неаннотированных пиков пришлось на низкомолекулярный диапазон, который формируют пептиды. Сложность изучения пептидома заключается в том, что многие его компоненты формируются не путем трансляции с уникальных для отдельных пептидов структурных генов, а путем посттрансляционного процессинга более крупных белков-предшественников, а также при самопереваривании белков клетки протеасомами, всасывании компонентов питательной среды и иных процессов. В двух последних случаях аминокислотный состав образующихся пептидов невозможно предсказать опосредовано на основании секвенирования генома, этот процесс требует включения экспериментальных исследований внутриклеточного и секретируемого пептидома.

По существу MALDI-TOF-ионизацию можно рассматривать, как своеобразный способ разделения веществ. В данном случае разделением происходит под действием электрического поля в вакууме. В качестве принципиально сходного метода разделения можно привести электрофорез белков в полиакриламидном геле в буфере, содержащем додецисульфат натрия. Данный метод хорошо известен под названием «SDS-PAGE», в нем также происходит разделение веществ под действием электрического поля, но в теле полимерного геля. Отличие также связано с предварительной ионизацией белков лазером в методе MALDI, а в SDS-PAGE предварительную ионизацию не производят. Интересно, что графическое представление

результатов обоих методов имеет сходство за счет возможности преобразования масс-спектра, полученного методом MALDI-TOF-MS, в так называемый «псевдогель».

С изучением протеома аспергиллов методом SDS-PAGE связаны работы ряда авторов, охватывающие достаточно большой временной период. Paris S. и соавторы [259] с помощью данного метода выделили конидиальные гидрофобины *A. fumigatus*, находящиеся во фракции белков, растворимых в трифторуксусной кислоте. Экстракт получен из спор, разрушенных ультразвуком, в геле его компоненты оказались представлены единичными полосами. В сообщении Simonovicova A. и соавторов [316] приведены данные о профиле кислых белков различных штаммов *A. niger*. Авторы не только привели снимки гелей, но и определили белки, образовавшие полосы на геле. Как оказалось, многие из них связаны с обменом углеводов. El-Sayed A. и соавторы [123] исследовали протеом *A. flavipes* в зависимости от наличия в минимальной питательной среде различных источников серы. Белковый экстракт из мицелия получен с использованием ультразвуковой обработки. Однако на снимках гелевых пластин, помещенных в статью, не удобно определять количество белковых компонентов из-за не вполне четкой окраски (авторы использовали для выявления белковых полос не нитрат серебра, а кумасси голубой, который дает менее четкие картины). В работе Gil M.L. и соавторов [141] методом одномерного электрофореза изучен протеом конидий *A. fumigatus*. На гелевой пластине, окрашенной кумасси голубым, отчетливо определяются 29 полос белков с Mr до 43 kDa. Напротив, при изучении протеома мицелия *A. fumigatus* в связи с выделением антигенных компонентов при использовании метода SDS-PAGE Piechura J.E. и соавторы [272] получили очень скудную картину, включающую не более 5 белковых полос. В качестве иллюстрации различия истинных гелей с разделенными внутриклеточными белками и «псевдогелей» приводим данные о протеоме *A. nidulans*.

Картины гелей конидиального и мицелиального протеома *A. nidulans* G1059wt включают 31 и 44 полосы соответственно. При сличении белковых полос протеома с полосами белков-калибрантов, можно заметить, что наиболее легкие белки по массе приближаются к калибранту Mr=14,4 kDa, а «верхний» предел различается: для мицелиальных белков он составил приблизительно чуть более 100 kDa, а для белков конидий – около 200 kDa [92, 277]. Приведенные снимки псевдогелей для штаммов *A. nidulans* содержат полосы, которые формируют от 28 пиков (штамм Е/мокрота) до 49 пиков (штамм РКПГ F-1336), наиболее высокомолекулярный пик в масс-спектре последнего штамма формируют ионы с массой более 15 kDa.

У отдельных аспергиллов возможно наличие и большего количества полос (пиков). Так у штамма *A. clavatus* РКПГ F-275 в масс-спектре определили 55 пиков (с отношением сигнал : шум не менее 3), а у оригинального штамма *A. fumigatus* C/мокрота в масс-спектре при данной

величине критерия S:N определили 96 пиков (!). Максимальную массу ионов белков *Aspergillus* spp., формирующих масс-спектр в MALDI-TOF-MS, определить затруднительно, поскольку интенсивность ионного тока по мере увеличения Mr в данном методе убывает, что проявляется мелкими пиками, трудно отличимыми от шума. У штаммов, рассматриваемых в сравнении, наиболее тяжелые белковые ионы при выполнении критерия $S/N \geq 3$ имели величину Mr 10933 Da (*A. nidulans* E/мокрота) и 15305 Da (*A. nidulans* РКПГ F-1336). У оригинального штамма *A. fumigatus* G-K22/мокрота при той же критической величине отношения S/N наибольшая масса детектируемых ионов составила 16894 Da, а у штамма *E. amstelodami* РКПГ F-1250 пики с более низким значением отношения S/N удалось детектировать при величине Mr ионов порядка 18 kDa.

Масс-спектрометрические признаки, определяющие принадлежность изолята к роду *Aspergillus*, как описано в главе 4 настоящего исследования, заключены в комплексе пиков сегмента «средних масс», особенности которого нами подробно приведены, а также высокоинтенсивном пике в сегменте «малых масс», однако, следует заметить, что в данном диапазоне m/z сходные пики встречаются у многих дрожжевых и мицелиальных грибов, последний указанный маркер является малоспецифичным.

В какой-то степени «параллельные» работы с использованием MALDI-TOF-масс-спектрометрии для различения аспергиллов – представителей секции *Fumigati* приведены японскими исследователями [246]. В данном случае авторы придерживались классической позиции, что масс-спектр при исследовании данного типа формируют в основном рибосомальные белки, и прибегли к специальной процедуре для извлечения рибосомальной фракции из протеома мицелия, включающей разрушение клеток циркониевыми гранулами и ультрацентрифугирование. Масс-спектрометрия проведена с использованием в качестве матрицы синапиновой кислоты. Приводимые авторами масс-спектры лишь отдаленно схожи с теми, которые получают в стандартных исследованиях, в том числе и данной работе. Диапазон детекции, который приводят на прилагаемых картинах масс-спектров, в данном случае оказался измененным: 5 – 17 kDa. Хотя комплекс в области 6 – 7 kDa напоминает типичный родоспецифический комплекс, описанный в данной работе (авторы полагают, что его также образуют рибосомальные белки). К некоторым недостаткам работы следует отнести то, что предложенный авторами способ экстракции белков для масс-спектрометрии является мало пригодным для внедрения в практические лаборатории.

Совершенствование традиционных и новых методов определения чувствительности условно-патогенных *Aspergillus* spp. к антимикотикам требует проблема нарастающей резистентности нитчатых микромицетов к противогрибковым препаратам.

В отечественной практике, по-видимому, наиболее масштабные исследования

антимикотической чувствительности у *Aspergillus* spp. проведены Кулько А.Б. для штаммов, выделенных от больных туберкулезом [16-20]. Наблюдение включает выборку из более 200 штаммов, а определение чувствительности провели методом серийных разведений с использованием коммерческой тест-системы и интерпретацией согласно действующим на период проведения работ экспертным критериям EUCAST. Автор считает, что использованная тест-система по получаемым результатам сопоставимой одному из международных протоколов CLSI M38-A2. По чувствительности к триазольным антикотикам – итраконазолу, вориконазолу и позаконазолу, изученная выборка оказалась гетерогенной. Так, обнаружили штаммы *A. ustus*, *A. nidulans* и *A. niger*, с высокими показателями МИК к одному или нескольким антимикотикам данной группы. В отношении *A. ustus* это согласуется с литературными данными, полученными рядом зарубежных авторов. По сравнению с триазолами слабой активностью против штаммов различных видов *Aspergillus* spp. в целом обладал имидазол – кетоконазол. Штаммы с высокими МИК амфотерицина В, выявили среди *A. flavus* (и *A. oryzae*), *A. terreus*, *A. usus*, *A. sydowii*, *A. versicolor*, что считают типичным для данных видов согласно действующим позициям EUCAST.

Обращает внимание, что в исследовании получены необычно высокие показатели МИК (МЭК) эхинокандинов (каспофунгина, микафунгина, анидулафунгина), за исключением одного штамма *A. glaucus*. Не проявили активности в отношении изученных штаммов аспергиллов 5-фторцитозин и, как следовало ожидать, флуконазол.

Как оказалось, влияние антимикотиков на *Aspergillus* spp. могут модулировать некоторые минеральные соединения. В опыте Баязитовой А.А. и соавторов [1] изучили особенности действия на штаммы *A. niger*, выделенных в случаях отомикозов и дерматитов, к тербинафину и флуконазолу. В опыте по оригинальной схеме диско-диффузионного метода на агаризованной среде Сабуро установили, что присутствие в среде сульфатов меди или цинка оказывает разнонаправленные эффекты. Катионы меди могут как стимулировать проявление резистентности к тербинафину у одних штаммов, так и потенцировать действие тербинафина у других. У катионов цинка влияние на чувствительность к тербинафину однонаправленное у разных штаммов, но дозозависимое: в низких концентрациях эффект тербинафина снижается, в высоких увеличивается. Флуконазол во всех случаях проявил слабое антифунгальное действие на *A. niger*. Высокие концентрации сульфатов меди и особенно цинка сами оказывают антифунгальное действие. Авторы полагают, что катионы этих металлов имеют биологические эффекты, связанные с биосинтезом стероидов и *A. niger*. Эстраполируя этот феномен на реальное фармакологическое производство также следует ожидать, что дополнительные компоненты в составе лекарственных средств, содержащие антимикотики, могут оказывать модулирующее влияние на их активность.

Таким образом, отечественный опыт изучения противогрибковой чувствительности

Aspergillus spp. существенно обогатил представления микробиологов по этому вопросу. Однако полученные в вышеуказанных исследованиях данные довольно сложно сравнивать между собой и с данными зарубежных исследователей, поскольку они получены с использованием принципиально разных протоколов. Для единого представления о процедуре определения антимикотической чувствительности, мониторинга за распространением антимикотической устойчивости у этих грибов, а также налаживания оптимального диалога лабораторного работника и врача-клинициста, в практику (диагностическую и исследовательскую) необходимо внедрение типовых международных протоколов. Данное практическое направление осуществлено в настоящей работе.

Кроме того, впервые удалось установить масс-спектрометрические различия между некоторыми *Aspergillus* spp. с различной чувствительностью к итраконазолу и амфотерицину В. Примечательно, что этот феномен проявился в культурах, не подверженных действию антимикотика непосредственно в опыте. По-видимому, природа найденных различий связана с некоторыми особенностями организации клеточной стенки, что отразилось в результативности экстракции спектрообразующих белков и соотношения их вклада в формирование масс-спектра. Данная гипотеза, однако, нуждается в детальном подтверждении, поскольку (1) не известно, как нарушение физических свойств цитоплазматических свойств мембраны в силу измененного метаболизма стероидов отражается на свойствах клеточной стенки, а также остаются невыясненными (2) физиологические различия чувствительных и резистентных штаммов вне воздействия антимикотика.

Кроме того, представляется остро необходимым мониторинг чувствительности к противогрибковым лекарственным средствам у *Aspergillus* spp. вне зависимости от типа устойчивости к ним (первичная или вторичная). В силу высокого пролиферативного потенциала аспергиллов, продукции большого количества конидий, легко разносимых с током воздуха, возникновение даже единичных устойчивых изолятов в природных источниках или антропогенной среде может стать началом широкого их распространения, а впоследствии, теоретически, даже изменения эффективности терапии аспергиллеза в пределах географических регионов.

Потенциально масс-спектрометрические различия групп *Aspergillus* spp. с различной чувствительностью к антимикотикам могут быть обусловлены двумя эффектами: (1) особыми свойствами клеточной стенки, которые изменяются при реализации определенных молекулярных механизмов устойчивости и могут влиять на результативность экстракции белков и пептидов; (2) составом и соотношением спектрообразующих белков и пептидов, измененным по физиологическим причинам. До настоящего момента при исследовании взаимодействия аспергиллов с триазолами и полиенами еще не установили связи антимикотикорезистентности с

биогенезом клеточной стенки, тем не менее, поиски этой взаимосвязи в дальнейшем необходимы. Результаты наблюдений указывают, что объектами исследования такого рода должны стать, прежде всего, представители секции *Nigri*, где ассоциация противогрибковой чувствительности и физико-химических свойств оказалась наиболее ярко представленной.

Сложность решения указанных проблемных аспектов связана еще и с недостаточно изученными механизмами устойчивости грибов к антимикотикам. Среди противогрибковых препаратов, активных в отношении возбудителей аспергиллеза, до сих пор остаются детально неизученными молекулярные факторы устойчивости к полиенам. По данным Blum G. и соавторов [81] у штаммов *A. terreus* МИК амфотерицина В не отличается как при нормально развитой клеточной стенке, так и в состоянии протопласта. Те же исследователи показали, что у *A. terreus* резистентность к амфотерицину В не опосредована снижением содержания эргостерола, которое ранее, как механизм устойчивости, зафиксировали у дрожжей. Авторы выявили повышенный уровень продукции каталазы у *A. terreus* в сравнении с *A. fumigatus*, чувствительным к амфотерицину В. Действие амфотерицина В на грибы сопровождается образованием в клетках активных форм кислорода, включая перекись, а гиперпродукция каталазы, таким образом, может играть в данном аспекте протективную роль. Данное явление позднее подтвердили Blatzer M. и соавторы [80], изучая уровни активных форм кислорода у полиенрезистентных и редких полиенчувствительных штаммов *A. terreus*. Они даже заключили, что использование амфотерицина В вместе с прооксидантами следует рассматривать, как возможный подход к терапии микозов, вызванных *A. terreus*, однако сама идея применения прооксидантов для системного воздействия в терапевтических целях, тем более с учетом тяжести и специфических особенностей организма больного инвазивным аспергиллезом, кажется сомнительной. Наряду с этим, как полагают, в устойчивости к полиенам имеют значение такие факторы, как изменение соотношения содержания в мембране стероидов и фосфолипидов, качественный химический состав цитоплазматической мембраны по стероидам и жирным кислотам. Так, у мутантных штаммов и клинических изолятов некоторых видов дрожжей (*S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. lusitaniae*, *Cryptococcus neoformans*), устойчивых к амфотерицину В, в ЦПМ обнаружили повышенное содержание промежуточных продуктов метаболизма стероидов, которые отличаются сниженным сродством к амфотерицину В: ланостерол, эбурикол, фекостерол, эпистерол, 5,6-дигидроэргостерол, 3- β -эргоста-7,22-диенол, 3- β -эргоста-8-диенол и другие. Этот механизм у аспергиллов (*N. fennelliae*, *A. terreus*) наряду со снижением концентрации эргостерола показан только на мутантных штаммах лабораторного происхождения, а у естественных клинических изолятов таких находок еще не выявляли [50]. Таким образом, мы располагаем отрывочными данными в отношении механизма устойчивости к амфотерицину В у возбудителей аспергиллеза. Вероятно, в какой то степени это недостаток

можно компенсировать сведениями о тонких механизмах резистентности к полиенам у других эукариот – лейшманий, против которых также применяют амфотерицин В, и механизмы устойчивости к которому изучены в этой сфере значительно лучше.

По аналогии с микроскопическими грибами у амфотерицин-устойчивых штаммов лейшманий (*Leishmania donovani*) цитоплазматическая мембрана отличается повышенной текучестью, а в химическом аспекте – повышенным содержанием холеста-5,7,24-триен-3 β -ола, слабо связывающего амфотерицин В. Также у этих простейших найден мембранный АТФ-зависимый эффлюкс, выводящий молекулы амфотерицина В из клетки (у грибов такой механизм дискутируется), и усиление метаболизма биогенных тиолов с участием трипаредоксина в ответ на внесение амфотерицина В [278]. В последнем случае достигается эффект нейтрализации активных форм кислорода (у аспергиллов в реализации этого же принципа повышается продукция каталазы). С другой стороны, активные формы кислорода, окисляя амфотерицин В, снижают его токсичность для мембраны. Позднее данные механизмы были подтверждены Kaur G. и Rajput B. [40]. В 2017 г. у *L. mexicana* описали своеобразный механизм устойчивости к полиенам, который связан с критической для катализа мутацией в одном из сайтов активного центра CYP51 [245]. Принципиально это явление вписывается в ранее описанный механизм изменения химической композиции мембранных стероидов, но интересно оно в другом аспекте: существование подобных микроорганизмов, теоретически, может означать возможность перекрестной устойчивости и к триазолам, и к полиенам за счет изменения одной мишени – структуры CYP51. Тогда ключевым фактором реализации такой устойчивости должна стать адаптация клетки к жизни в условиях неблагоприятной композиции стероидов. Очевидно, на молекулярном уровне такая адаптация опосредуется именно компенсаторной реорганизацией клеточной стенки, что требует дальнейших исследований для создания доказательной базы.

Проведенное биоинформационное исследование в отношении CYP51A – ланостерол-14 α -деметилазы позволило выявить разнообразие первичной структуры этого фермента у аспергиллов, которое является отражением действия мононуклеотидных полиморфизмов в структуре кодирующего гена. В свою очередь, данное разнообразие возникло параллельно с течением эволюции рода *Aspergillus*, что проявилось наличием аминокислотных сайтов, специфичных не только для видов, но и секций рода *Aspergillus*, иллюстрирующих многоступенчатый процесс становления данной группы микромицетов в биологической истории. Последние изменения, имеющие уже штаммовую специфичность, возникли в этих ферментах, вероятно, под влиянием антропогенного воздействия, прямого или косвенного, которое проявилось контактом аспергиллов с производными триазола сельскохозяйственного и лечебного применения. Описанное здесь сравнительное исследование структуры CYP51

является продолжением ряда работ в этом направлении, охватывающих различных представителей царства *Fungi* в связи с изучением особенностей этого фермента у *A. fumigatus* [357], *Fusarium graminearum* [74], *Moniliophthora perniciosa* [108], *Phanerochaete chrysosporium* [115], а также у оомицета *Aphanomyces euteiches* [118]. В филогенетическом исследовании, проведенном Warrilow A. и соавторами [357], на основании дендрограммы и численных различий в идентичности последовательностей изоформы CYP51A и CYP51B *A. fumigatus* сопоставлены с аналогичными ферментами других микромицетов. Работа de Oliveira Ceita с относительно небольшим разнообразием последовательностей позволила установить, что структуры CYP51 аскомицетов и базидиомицетов в распределении по принципу максимальной парсимонии кластеризуются отдельно [108]. В данном случае интересно, что CYP51 некультивируемого аскомицета *Pneumocystis jirovecii* (в работе указана, как *P. carinii*), находится в изолированной ветви, а общая клада высших грибов – *Dikarya* (*Ascomycota* и *Basidiomycota*), расположена на том же уровне ветвления. Doddapaneni H. с соавторами [115] указали на важный факт наличия нескольких генов CYP51 у аскомицетов, в отличие от других грибов, что является эволюционно прогрессивной чертой, сохраняющейся в дальнейшем у высших многоклеточных организмов (например, растений). Группа исследователей из Института сельскохозяйственных и пищевых наук Университета Мартина Лютера (Германия) [74] обнаружили, что некоторые представители родов *Fusarium* и *Aspergillus* имеет 3 изоформы фермента CYP51. Новый вариант фермента получил название изоформа C (CYP51C). Вскоре после открытия появились сообщения о том, что мутации в гене *cyp51C* у *A. flavus* с заменами аминокислот T788G и Y319H также связаны с развитием устойчивости к триазольным препаратам [212, 260]. Однако в целом эта недавно найденная изоформа остается слабо изученной.

При исследовании CYP51 *Aphanomyces euteiches* и филогенетических связях по последовательности этого фермента авторы провели анализ среди ланостерол-деметилаз широкого круга живых организмов, от бактерий до человека. Однако после установления сходства фермента у данного оомицета с гомологичными белками бурых и диатомовых водорослей и обнаружения значительно более отдаленной связи с CYP51 истинных грибов, далее анализ практически не продолжили.

В отличие от приведенных здесь работ с CYP51, в данном исследовании использовали комбинацию приема кластеризации последовательностей и их выравнивания, которые в таком сочетании позволили установить наличие в данном ферменте у аспергиллов секции-видо- и штаммоспецифичных аминокислотных сайтов. Также прием выравнивания оригинальной последовательности с эталонными, для которых изучены сайты связывания с лигандами, явился в работе одним из опорных при воссоздании активного сайта CYP51A желтого аспергилла.

Приведенные результаты свидетельствуют, что «молекулярная эволюция» фермента

CYP51A происходила параллельно с эволюцией представителей рода *Aspergillus* и запечатлела в первичной структуре дифференцировку предковой группы грибов на секции и отдельные виды. Исследованный тип ферментов обладает ярко выраженным аминокислотным полиморфизмом, который, в свою очередь, играет роль в процессе связывания с лигандами, включая триазольные антимикотики. Данное явление в практике возможно использовать для видовой идентификации и определения механизма резистентности одновременно при ДНК-секвенировании *cyp51*-генов. Это же обстоятельство, включая факт определения в работе трех основных фенотипов чувствительности у *A. fumigatus* с различным строением CYP51A, указывает на необходимость дальнейшего исследования каталитической активности различных форм CYP51A в отношении ланостерола и других стероидов. До сих пор не существует надежно обоснованной позиции, являются ли резистентные мутанты аспергиллов следствием широкого применения в сельском хозяйстве и медицине азолов, как фактора искусственного отбора, либо штаммы, устойчивые к триазолам, всегда существовали в структуре видов рода *Aspergillus*. Выявление указанных особенностей взаимодействия даст возможность понять, являются ли варианты ферментов устойчивых штаммов следствием включения особых, эволюционно новых путей метаболизма стероидов, либо аминокислотные замены в структуре фермента являются только вторично возникшим механизмом адаптации к антропогенному воздействию, жизненно необходимым для аспергиллов, но потенциально нейтральным или регрессивным по отношению к естественной катализируемой ферментом реакции.

Удаленная позиция последовательности CYP51 из штамма *A. oryzae* RIB40, которая оказалась на дендрограмме противопоставленной всем остальным ланостеролдеметилазам, вероятно, определяется существенным отличием от прочих включенных в анализ последовательностей, ввиду (1) принадлежности к иному функциональному типу 14 α -стеролдеметилаз (эбурикол-деметилаза, орбустифол-деметилаза) или (2) технических погрешностей в ДНК-секвенировании и аннотировании соответствующего структурного гена. Очевидно, основой полученного распределения являются особые аминокислотные сайты и регионы в структуре CYP51, которые отличаются специфичностью не только для отдельных видов, но и для секций рода, объединяющих виды по морфологическим и генетическим критериям.

Не удалось интерпретировать роль следующих изменений первичной структуры CYP51 *A. fumigatus*: (1) вставка ASLKI между 67K и 68Y; (2) E318X и (3) исчезновение фрагмента у позиции 505. Однако запись E318X не обязательно подразумевает аминокислотную замену, поскольку X – неуточненная аминокислота. Вероятно, подобные изменения могли возникнуть по причине ошибки ДНК-секвенирования. Хотя две других вариации в структуре CYP51A охватывают терминальные участки аминокислотной цепи фермента, удаленные от активного центра, их вклад в изменение структуры представляет интерес для проведения дальнейшего

биоинформационного и рентгеноструктурного исследования.

Сопоставление модели избранной последовательности CYP51A *Aspergillus flavus*, полученной с помощью «Swiss-Model», с другими нерезервированными третичными структурами белков из ресурса «Protein Data Bank», показало, что точка модели приближается к «сердцевине» конуса распределения Z-оценки. Данное обстоятельство, с одной стороны указывает на довольно консервативную организацию третичной структуры у группы белков, к которой относится реконструируемый объект, а с другой стороны – на наличие особых структурных свойств, факт существования которых делает проведенный анализ целесообразным.

При сравнении реконструированной структуры CYP51A из *A. flavus* с третичными структурами сходных белков, полученных на основе данных рентгеноструктурного анализа (Глава 4), выявили, что воссозданная модель наиболее отдалена от белков семейства цитохрома p450 прокариотического происхождения (из *Bacillus megaterium* и *Pseudomonas putida*), а наиболее сходна с ферментами семейства p450 микроскопических грибов и, как не странно, человека (ланостерол-14 α -деметилаза и простациклин-синтаза). Последнее обстоятельство объясняет токсическое действие триазольных антимикотиков на организм человека. CYP51 других эукариот – *Trypanosoma* spp., напротив, обладают с воссозданной моделью значительно меньшим сходством, что связано с несколько иной конфигурацией элементов каталитического домена (ближняя к наблюдателю α -спираль у белков трипаносом более протяженная, чем в других моделях). Как оказалось, среди всех кристаллографических моделей только у CYP51 *S. glabrata* и *S. cerevisiae* структура трансмембранного домена воссоздана в эксперименте (именно поэтому структура ланостерол-14- α -деметилазы *S. cerevisiae* использовали в одном из редакторов для реконструкции). Наибольшее структурное сходство определили с моделями CYP51B *A. fumigatus*, которые явились основными шаблонами для создания настоящей модели CYP51 у *A. flavus*.

В настоящем исследовании удалось выяснить, что часто встречающейся ошибкой кристаллографической реконструкции ферментов типа CYP51A является отсутствие в моделях трансмембранного домена. Однако последнее обстоятельство не является серьезным препятствием в изучении взаимодействия фермента и интересующих лигандов (триазольных антимикотиков). Следует заметить, что наиболее информативный анализ третичной структуры фермента и его активного центра удастся получить при комбинировании различных биоинформационных редакторов. С другой стороны, несколько затрудняет работы в данном исполнении наличие у каждого редактора собственной системы оценки качества создаваемых моделей, из-за чего становится мало возможным сравнивать итоги реконструкции одного и того же белка, полученные с помощью разных редакторов. Информацией, наиболее ценной с научно-

практической точки зрения, является воссоздание активного центра фермента, а именно сайтов связывания антимикотиков.

Таким образом, исследование биологии аспергиллов, имеющих медицинское значение, на современном этапе требует комплексного подхода, включающего культурально-морфологический метод, MALDI-TOF-масс-спектрометрию, методы геномики, протеомики и биоинформатики.

ВЫВОДЫ

1. Штаммовый полиморфизм возбудителей аспергиллеза проявляется в пространственном распределении зон спороношения в колониях, а также в интенсивности образования конидий, наличии карликовых (атипичных) вариантов конидиеносцев.
2. Пленчатые поверхностные колонии с жидкой питательной среды являются оптимальной формой культур *Aspergillus* spp. для масс-спектрометрического исследования, что позволило создать базу из 530 MALDI-масс-спектров, «библиотеку» для видовой идентификации из 47 типовых масс-спектро-профилей, аннотации MALDI-масс-спектров 5 видов возбудителей аспергиллеза.
3. Аспергиллы секций *Flavi* (*A. flavus*, *A. oryzae*, *A. tamarii*) и *Nigri* (*A. niger*, *A. awamori*, *A. niger/awamori*) с различной чувствительностью к вориконазолу и амфотерицину В отличаются по масс-спектрометрическим свойствам клеточных экстрактов. Штаммы *A. fumigatus* (секция *Fumigati*) с различной чувствительностью к итраконазолу и амфотерицину В по масс-спектрометрическим свойствам однородны.
4. Первичная структура ланостерол-14- α -деметиلاзы изоформы А у *Aspergillus* spp. включает аминокислотные сайты, константные для рода, и варианты сайты – маркеры видовой принадлежности и резистентности к триазольным антимикотикам.
5. Филогенетические связи медицински значимых *Aspergillus* spp. при работе с выборками последовательностей CYP51A удается оптимально реконструировать благодаря кластеризации по принципу «ближнего соседа» с расчетом дистанции по методу Гришина Н.В., а при работе с масс-спектрами клеточного экстрактов – благодаря иерархической кластеризации с расчетом дистанции по Минковскому и объединением по методу Уорда.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Данные о полиморфизме аспергиллов *in vitro* необходимо учитывать при культуральной (микологической) диагностике аспергиллезной инфекции.
2. Отличительные особенности колоний *Aspergillus* spp. на среде с бенгальским розовым, не тождественные с картинами роста на других питательных средах, необходимо учитывать при проведении санитарно-микологических исследований.
3. Для приготовления среды Чапека с дрожжевым экстрактом при необходимости (при отсутствии) сахарозу можно заменять на лактозу.
4. В целях получения демонстрационных культур *Aspergillus* spp., кроме *A. terreus* и группы *A. glaucus*, следует использовать среду Чапека с дрожжевым экстрактом, солодовый агар (для типовой морфологии), картофельно-глюкозно-дрожжевой агар (демонстрация изменчивости). Демонстрационные культуры *A. fumigatus*, представителей секции *Flavi* и *A. terreus* возможно получать на среде Сабуро, а представителей группы *A. glaucus* предпочтительно пассировать на среде Чапека с дрожжевым экстрактом и 20% сахарозы, либо на среде YPD. Накопление экссудата у видов аспергиллов, способных к этому, более выгодно осуществлять при пассаже штаммов в колбах. *A. wentii*, *A. clavatus*, *A. ochraceus*, *A. repens* и *A. ruber* следует выращивать при 25°C, культуры прочих видов - при 30°C.
5. При получении субкультуры аспергиллов, пригодной к экстракции белков для MALDI-TOF-масс-спектрометрии, целесообразно выращивать инокулом спор на жидкой среде Сабуро в модификации Ч. Эммонса при 37° (для термофильных видов) или 30° (для мезофильных видов) до появления пленчатой колонии без отчетливых признаков спороношения.
6. Для идентификации аспергиллов методом MALDI-TOF-MS предпочтительно использовать «ручной» режим ионизации образца.
7. Для аннотирования масс-спектров культур и культуральных экстрактов микроорганизмов, полученных методом MALDI-TOF-MS, оптимально применение комбинации функций, представленной в биоинформационных ресурсах TagIdent, BLAST и Protein Data Bank.
8. При определении чувствительности *Aspergillus* spp. к вориконазолу с учетом особенностей изолятов, выделенных в России, необходимо продлевать серию разведений этого препарата на 2 позиции в меньшую сторону.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

В развитии данного направления целесообразна разработка следующих экспериментальных разделов:

1. Создание расширенной базы масс-спектро-профилей *Aspergillus* spp. для видовой идентификации этих грибов с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии.
2. Изучение ланостерол-14- α -деметилазы *A. flavus* и других медицински значимых *Aspergillus* spp. с помощью рентгеноструктурного анализа.
3. Разделение и идентификация пептидов и белков из кислотного экстракта клеток *Aspergillus* spp.; сопоставление результатов протеомного профилирования с результатами биоинформационных аннотаций масс-спектров, полученных в данном исследовании.
4. В дальнейшем также представляет интерес сравнительное масс-спектрометрическое исследование аспергиллов с различной чувствительностью к эхинокандинам, поскольку их мишень (β -глюкан-синтаза) и эффект действия прямо связаны с клеточной стенкой.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

КГДА – картофельно-глюкозно-дрожжевой агар;

КМА – картофельно-морковный агар;

МИК — минимальная ингибирующая концентрация;

МСП — масс-спектро-профиль;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

РКПГ – Российская коллекция патогенных грибов;

AFPA – *Aspergillus flavus/parasiticus* agar;

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) – открытая биоинформационная база данных для поиска и сравнительного анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей;

CBS-KNAW: Centraalbureau voor Schimmelcultures (центральное бюро культур грибов) — Центр биологического разнообразия грибов при голландской Королевской Академии искусств и наук (Утрехт, Нидерланды);

CLSI – институт клинических и лабораторных стандартов (США);

COBALT (Constrait-based Multiple Alignment Tool) – программный алгоритм сопоставления аминокислотных последовательностей;

DSSP — Define Secondary Structure of Proteins – программный алгоритм реконструкции вторичной структуры белка по данным первичной структуры;

ESI-MS – электроспрей-ионизационная масс-спектрометрия;

EUCAST – Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам;

FASTA – однобуквенный код записи аминокислот и нуклеотидов;

FTIRS – инфракрасная спектроскопия с преобразованиями Фурье;

KEGG – Киотская энциклопедия генов и геномов, биоинформационная база данных;

LIFE – Leading International Fungal Education – международный многоцентровый проект по изучению микозов и иных патологий человека, ассоциированных с микроскопическими грибами;

MALDI-TOF-MS – матрично-активированная лазерная десорбционно/ионизационная времяпролетная масс-спектрометрия;

MOPS – 3-(N-морфолино)-пропансульфоновая кислота;

NCBI – Национальный центр биотехнологической информации; база медико-биологической литературы, а также молекулярно-биологических данных;

PES – полиэфирсульфон.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баязитова, А.А. Влияние тяжелых металлов на чувствительность клинических штаммов *Aspergillus niger* к антимикотикам / А.А. Баязитова, Н.И. Глушко, С.А. Лисовская, Е.В. Халдеева, В.Р. Паршаков, О.Н. Ильинская // Успехи медицинской микологии. – 2015. – Т. 14. – С. 331-333.
2. Билай, В.И. Аспергиллы / В.И. Билай, Э.З. Коваль. – Киев: Наукова думка, 1988. – 204 С.
3. Билай, В.И. Методы экспериментальной микологии. Справочник / В.И. Билай. – Киев: Наукова думка, 1982. – 552 С.
4. Борзова, Ю.В. Клинико-лабораторные варианты хронического аспергиллеза легких: автореферат дис. ... канд. мед. наук: 03.02.12 – микология / Борзова Юлия Владимировна. – Санкт-Петербург: СПбМАПО, 2010. – 22 С.
5. Елинов, Н.П. Аспергиллезная инфекция: подходы к ее диагностике и лечению / Н.П. Елинов, В.С. Митрофанов, Р.М. Чернопятава // Проблемы медицинской микологии. – 2002. – Т. 4, №1. – С. 13-20.
6. Елинов, Н.П. Некоторые итоги научно-исследовательской работы коллектива сотрудников НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина СПбМАПО в 2006-2010 гг. К 125-летию Академии / Н.П. Елинов // Сборник научных трудов: сборник материалов отчетной научной сессии 09.12.2010 г. / Под. Ред. А.В. Силина, И.Ю. Стюф. – СПб.: СПбМАПО, 2010. – С. 242.
7. Елинов, Н.П. Структурированные и неструктурированные формы существования микромицетов в искусственных и естественных условиях / Н.П. Елинов // Проблемы медицинской микологии. – 2009. – Т. 11, №3. – С. 3-9.
8. Елинов, Н.П. *Aspergillus persii* А.М. Корте и М. Зотти — новый вид и возбудитель онихомикоза у человека и *Aspergillus tanneri* К.Дж. Квон-Чунг, Дж.А. Сугуи и С.У. Петерсон — новый вид и возбудитель инвазивного рефрактерного заболевания / Н.П. Елинов // Проблемы медицинской микологии. – 2014. – Т. 16, №3. – С. 3-12.
9. Журавлева, Н.П. Выявление литического фактора у штаммов микромицетов – продуцентов аллергенов/ Н.П. Журавлева, Н.П. Елинов, Н.В. Васильева, И.А. Босак // Проблемы медицинской микологии. – 2013. – Т. 15, №1. – С. 40-48.
10. Журавлева, Н.П. Спонтанная изменчивость популяций селекционированных штаммов *Aspergillus fumigatus* Frezenius – продуцентов аллергенов / Н.П. Журавлева, Г.А. Чилина, Г.И. Соловьева, И.А. Босак // Проблемы медицинской микологии. – 2009. – Т. 11, №2. – С. 36-40.
11. Журавлева, Н.П. Спонтанная изменчивость популяций штаммов *Aspergillus clavatus*

- Desmazieres – продуцентов аллергенов / Н.П. Журавлева, Н.В. Васильева, Г.А. Чилина, О.В. Аак, Г.И. Соловьева // Проблемы медицинской микологии. – 2010. – Т. 12, №2. – С. 87-88.
12. Журавлева, Н.П. Спонтанная изменчивость популяций *Aspergillus niger* v. Tiegh. при многоступенчатой селекции штаммов — продуцентов аллергенов / Н.П. Журавлева, Н.В. Васильева, Г.А. Чилина, Г.И. Соловьева // Проблемы медицинской микологии. – 2011. – Т. 13, №4. – С. 32-34.
 13. Климко, Н.Н. Микозы: диагностика и лечение. Руководство для врачей. 2-е изд. перераб. и доп. / Н.Н. Климко. – М.: Ви Джи Групп, 2008. – 336 С.
 14. Козлов, Ю.А. Питательные среды в медицинской микробиологии / Ю.А. Козлов. – М.: Медгиз, 1950. – 251 С.
 15. Кулько, А.Б. Атлас условно-патогенных грибов рода *Aspergillus* – возбудителей бронхолегочных инфекций / А.Б. Кулько. – М.: Типография «Новости», 2012. – 155 С.
 16. Кулько, А.Б. Грибы рода *Aspergillus* в полостных образованиях в легких у больных туберкулезом: видовой состав и чувствительность к антимикотикам / А.Б. Кулько // Успехи медицинской микологии. – 2014. – Т. 12. – С. 182-183.
 17. Кулько, А.Б. Изучение чувствительности к противогрибковым препаратам грибов рода *Aspergillus* – возбудителей бронхолегочных инфекций у больных туберкулезом / А.Б. Кулько // Туберкулез и болезни легких. – 2017. – Т. 95, №7. – С. 54-60.
 18. Кулько, А.Б. Лабораторная диагностика грибковых инфекций легких у больных туберкулезом / А.Б. Кулько, С.Д. Митрохин // Проблемы медицинской микологии. – 2005. – Т. 7, №3. – С. 25-29.
 19. Кулько, А.Б. Сравнительная активность *in vitro* противогрибковых препаратов в отношении возбудителей бронхолегочного аспергиллеза / А.Б. Кулько, Н.И. Федорова // Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова. – 2018. – Т. 13, №4. – С. 75-79.
 20. Латыпова, Е.М. Структурный анализ гена *sur41A* резистентных штаммов *Aspergillus* spp. к препаратам группы азолов / Е.М. Латыпова, А.Е. Тараскина // Проблемы медицинской микологии. – 2015. – Т. 17, №2. – С. 98.
 21. Литвинов, М.А. Определитель микроскопических почвенных грибов / М.А. Литвинов. – Л.: Изд-во «Наука», Ленинград. отд., 1967. – 303 С.
 22. Михайлова, М.А. Чувствительность мицелиальных грибов к антимикотическим препаратам / М.А. Михайлова // «Отчетная сессия – 2007», отчеты научно-исследовательских подразделений. – СПб: ГБОУ ДПО СПбМАПО, 2007. – 94 С.
 23. Михайлова, Ю.В. Молекулярная идентификация представителей *Aspergillus* spp. из

- Российской коллекции патогенных грибов / Ю.В. Михайлова, Г.А. Чилина, А.Г. Полищук // Проблемы медицинской микологии. – 2012. – Т. 14, №4. – С. 46-49.
24. Сергеев, А.Ю. Онихомикоз, вызванный *Aspergillus ustus* / А.Ю. Сергеев, Ю.В. Сергеев, Н.Е. Жарикова, О.Н. Зайцева // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 1998. – № 3. – С. 52-54.
 25. Сергеев, А.Ю. *Aspergillus clavatus*: новый возбудитель онихомикоза / А.Ю. Сергеев, В.Е. Маликов, Ю.В. Сергеев, Н.Е. Жарикова // Тез. докл. Первого Съезда микологов России. – М.: 2002. – С. 339-340.
 26. Степанова, А.А. Морфогенез конидиогенного аппарата *Aspergillus niger* van Tieghem по данным электронной микроскопии / А.А. Степанова, И.А. Сеницкая // Проблемы медицинской микологии. – 2004. – Т. 6, №2. – С. 37-48.
 27. Степанова, А.А. Ультраструктура клеток вегетативного мицелия *Aspergillus flavus* Link, выращенного *in vitro* / А.А. Степанова, И.А. Сеницкая // Проблемы медицинской микологии. – 2006. – Т. 8, №1. – С. 40-45.
 28. Степанова, А.А. Ультраструктура клеток *Aspergillus niger* van Tieghem. Вегетативный мицелий / А.А. Степанова, И.А. Сеницкая // Проблемы медицинской микологии. – 2003. – Т. 5, №4. – С. 32-39.
 29. Степанова, А.А. Ультраструктура септ в клетках конидиогенного аппарата *Aspergillus terreus* Thom / А.А. Степанова, И.А. Сеницкая // Проблемы медицинской микологии. – 2009. – Т. 10, №2. – С. 81.
 30. Степанова, А.А. Ультраструктурные аспекты старения клеток некоторых видов рода *Aspergillus* / А.А. Степанова, И.А. Сеницкая // Проблемы медицинской микологии. – 2009. – Т. 11, №4. – С. 24-29.
 31. Степанова, А.А. Цитологическое изучение морфогенеза конидиогенного аппарата *Aspergillus fumigatus* Fres. / А.А. Степанова, И.А. Сеницкая // Проблемы медицинской микологии. – 2005. – Т. 7, №1. – С. 41-49.
 32. Степанова, А.А. Цитологическое изучение прорастающих конидий *Aspergillus fumigatus* Fres. / А.А. Степанова, И.А. Сеницкая // Проблемы медицинской микологии. – 2012. – Т. 14, №2. – С. 43-53.
 33. Степанова, А.А. Цитология клеток выращенного *in vitro* вегетативного мицелия *Aspergillus versicolor* (Vuill.) Tiraboschi / А.А. Степанова, И.А. Сеницкая // Проблемы медицинской микологии. – 2006. – Т. 8, №3. – С. 22-28.
 34. Хмельницкая, И.И. Грибы рода *Aspergillus* Mich.: распространение, синтез индольных алкалоидов: автореферат дис. ... канд. биол. наук: 03.02.12 – микология / Хмельницкая Ирина Игоревна. – М: МГУ им. М.В. Ломоносова, 2003. – 22 С.

35. Abad, A. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis / A. Abad, J.V. Fernández-Molina, J. Bikandi, A. Ramírez, J. Margareto, J. Sendino, F.L. Hernando, J. Pontón, J. Garaizar, A. Rementeria // Rev. Iberoam. Micol. – 2010. – Vol. 27, Is. 4. – P. 155-182.
36. Abbas, H.K. Relationships between aflatoxin production and sclerotia formation among isolates of *Aspergillus* section *Flavi* from the Mississippi Delta / H.K. Abbas, M.A. Weaver, R.M. Zablotowicz, B.W. Horn, W.T. Shier / European Journal of Plant Pathology. – 2005. – Vol. 112, Is. 3. – P. 283-287.
37. Abed, K.F. Differentiation of *Aspergillus niger* by random amplification of polymorphic DNA / K.F. Abed // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – Vol. 35, №9. – P. 1027-1032.
38. Abu Seadah, A.A. RAPD typing of *Aspergillus chevalieri*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus tetrazonus* (*quadrilineatus*) and their teleomorphs using 5'-d[AACGCGCAAC]-3' and 5'-d[CCCGTCAGCA]-3' primers / A.A. Abu Seadah, M.E. El Shikh // Mol. Biol. Rep. – 2008. – Vol. 35, №2. – P. 89-95.
39. Agarwal, R. Severe asthma with fungal sensitization / R. Agarwal // Current Allergy and Asthma Reports. – 2011. – Vol. 11, Is. 5. – P. 403-413.
40. Ahmad, S. Occurrence of triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* with TR₃₄/L98H mutations in outdoor and hospital environment in Kuwait / S. Ahmad, Z. Khan, F. Hagen, J.F. Meis // Environmental Research. – 2014. – Vol. 133. – P. 20-26.
41. Ahuja, O.P. Hamycin in experimental keratomycosis / O.P. Ahuja, A. Bal, K. Nath, H.V. Nema // Indian Journal of Ophthalmology. – 1967. – Vol. 15, Is. 1. – P. 19-22.
42. Akiyama, K. Allergic bronchopulmonary aspergillosis due to *Aspergillus oryzae* / K. Akiyama, H. Takizawa, M. Suzuki, S. Miyachi, M. Ichinohe, Y. Yanagihara // Chest. – 1987. – Vol. 91, №2. – P. 285-286.
43. Alcazar-Fuoli, L. Probing the role of point mutations in the *cyp51A* gene from *Aspergillus fumigatus* in the model yeast *Saccharomyces cerevisiae* / L. Alcazar-Fuoli, E. Mellado, M. Cuenca-Estrella, D. Sanglard // Medical Mycology. – 2011. – Vol. 49, Is. 3. – P. 276-284.
44. Alcazar-Fuoli, L. Species identification and antifungal susceptibility patterns of species belonging to *Aspergillus* section *Nigri* / L. Alcazar-Fuoli, E. Mellado, A. Alastuey-Izquierdo, M. Cuenca-Estrella, J.L. Rodríguez-Tudela // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2009. – Vol. 53, №10. – P. 4514-4517.
45. Alcazar-Fuoli, L. Three-dimensional models of 14 α -sterol demethylase (Cyp51A) from *Aspergillus lentulus* and *Aspergillus fumigatus*: an insight into differences in voriconazole interaction / L. Alcazar-Fuoli, I. Cuesta, J.L. Rodríguez-Tudela, M. Cuenca-Estrella, D. Sanglard, E. Mellado // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2011. – Vol. 38, № 5. – P. 426-434.

46. Alhambra, A. Isolation of *Aspergillus lentulus* in Spain from a critically ill patient with chronic obstructive pulmonary disease / A. Alhambra, M. Catalan, M.D. Moragues, S. Brena, J. Pontón, J.C. Montejo, A. del Palacio // Rev. Iberoam. Micol. – 2008. – №25. – P. 246-249.
47. Anaissie, E.J. Clinical Mycology. 2nd ed. / E.J. Anaissie, M.R. McGinnis, M.A. Pfaller. – Elsevier Health Sciences, 2009. – 700 P.
48. Antinori, S. Temporal trends of post-mortem invasive fungal infections among AIDS patients at a University hospital in Italy [Electronic resource] / S. Antinori, M. Nebuloni, C. Magni, M. Fasan, S. Korvasce, K. Parravicini, L. Vago // 2nd Trends in Medical Mycology, 2005. – Abstract Number: O1.1. Ref ID: 5232. – Mode of access: https://www.aspergillus.org.uk/conference_abstracts/temporal-trends-of-post-mortem-invasive-fungal-infections-among-aids-patients-at-a-university-hospital-initaly/
49. Arabatzis, M. Polyphasic identification and susceptibility to seven antifungals of 102 *Aspergillus* isolates recovered from immunocompromised host in Greece / M. Arabatzis, M. Kambouris, M. Kyprianou, A. Chrysaki, M. Foustoukou, M. Kanellopoulou, L. Kondyli, G. Kouppari, C. Koutsia-Karouzou, E. Lebesse, A. Pangalis, E. Petinaki, A. Stathi, E. Trikka-Graphakos, E. Vartzioti, A. Vogiatzi, T.-A. Vyzantiadis, L. Zerva, A. Velegraki // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2011. – Vol. 55, №6. – P. 3025-3030.
50. Araujo, R. Simple and highly discriminatory microsatellite-based multiplex PCR for *Aspergillus fumigatus* strain typing / R. Araujo, C. Pina-Vaz, A.G. Rodrigues, A. Amorim, L. Gusmão // Clinical Microbiology and Infection. – 2009. – Vol. 15, №3. – P. 260-266.
51. Arico-Muendel, C. Antiparasitic activities of novel, orally available fumagillin analogs / C. Arico-Muendel, P.A. Centrella, B.D. Contonio, B.A. Morgan, G. O'Donovan, C.L. Paradise, S.R. Skinner, B. Sluboski, J.L. Svendsen, K.F. White, A. Debnath, J. Gut, N. Wilson, J.H. McKerrow, J.L. DeRisi, P.J. Rosenthal, P.K. Chiang // Bioorganic & Medical Chemistry Letters. – 2009. – Vol. 19., Is. 17. – P. 5128-5131.
52. Arvanitis, M. Molecular and nonmolecular diagnostic methods for invasive fungal infections. / M. Arvanitis, T. Anagnostou, B.B. Fuchs, A.M. Caliendo, E. Mylonakis // Clin. Microbiol. Rev. – 2014. – Vol. 27, №3. – P. 490-526.
53. Asan, A. *Aspergillus*, *Penicillium* and related species reported from Turkey / A. Asan // Mycotaxon. – 2004. – Vol. 89, №1. – P. 155-157.
54. Ashoor, A.A. Is the classical classification of aspergillosis of the paranasal sinuses to non invasive and invasive still valid or not? / A.A. Ashoor A.A., Y. Abu-Baker // Bahrain Medical Bulletin. – 2002. – Vol.24, №3. – P. 1-8.
55. Atlas, R.M. The handbook of microbiological media for the examination of food / R.M. Atlas. – Boca Raton: CRS Press. 2006. – 464 P.

56. Auberger, J. First case of breakthrough pulmonary *Aspergillus niveus* infection in a patient after allogenic hematopoietic stem cell transplantation / J. Auberger, C. Lass-Flörl, J. Clausen, R. Bellmann, W. Buzina, G. Gastl, D. Nachbaur // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. – 2008. – Vol. 62, №3. – P. 336-339.
57. Aznar, C. Maxillary sinusitis from *Microascus cinereus* and *Aspergillus repens* / C. Aznar, C. de Bievre, C. Guiguen // Mycopathologia. – 1989. – Vol. 105, №2. – P. 93-97.
58. Badiie, P. Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management / P. Badiie, Z. Hashemizadeh // Indian J. Med. Res. – 2014. – Vol. 139, №2. – P. 195-204.
59. Bain, J.M. Multilocus sequence typing of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* / J.M. Bain, A. Tavanti, A.D. Davidson, M.D. Jacobsen, D. Shaw, N.A.R. Gow, F.C. Odds // J. Clin. Microbiol. – 2007. – Vol. 45, №5. – P. 1469-1477.
60. Balajee, S.A. *Aspergillus alabamensis*, a new clinical relevant species in the section *Terrei* / S.A. Balajee, J.W. Baddley, S.W. Peterson, D. Nickle, J. Varga, A. Boey, C. Lass-Flörl, J.C. Frisvad, R.A. Samson, ISHAM Working Group on *A. terreus* // Eukaryotic Cell. – 2009. – Vol. 8, №5. – P. 713-722.
61. Balajee, S.A. Mistaken identity: *Neosartorya pseudofischeri* and its anamorph masquerading as *Aspergillus fumigatus* / S.A. Balajee, J. Gribskov, M. Brandt, J. Ito, A. Fothergill, K.A. Marr // J. Clin. Microbiol. – 2005. – Vol. 43, Is. 12. – P. 5996-5999.
62. Balajee, S.A. Molecular identification of *Aspergillus* species collected for the transplant-associated infection surveillance network / S.A. Balajee, R. Kano, J.W. Baddley, S.A. Moser, K.A. Marr, B.D. Alexander, D. Andes, D.P. Kontoyiannis, G. Perrone, S. Peterson, M.E. Brandt, P.G. Pappas, T. Chiller // Journal of Clinical Microbiology. – 2009. – Vol. 47, №10. – P. 3138-3141.
63. Balajee, S.A. Nonsporulating clinical isolate identified as *Petromyces alliaceus* (anamorph *Aspergillus alliaceus*) by morphological and sequence-based method / S.A. Balajee, M.D. Lindsley, N. Iqbal, J. Ito, P.G. Pappas, M.E. Brandt // Journal of Clinical Microbiology. – 2007. – Vol. 45, №8. – P. 2701-2703.
64. Banerjee, B. Molecular characterization of *Aspergillus fumigatus* allergens / B. Banerjee, P.A. Greenberger, J.N. Fink, V.P. Kurup // Indian J. Chest Dis. Allied Sci. – 2000. – Vol. 42, Is. 4. – P. 239-248.
65. Baranyi, N. *Aspergillus lentulus* and *Aspergillus neoniger* as casual agents of mycotic keratitis in South India [Electronic resource] / N. Baranyi, S. Kocsube, A. Raghavan // 62nd Annual Conference of the Tamil Nadu Ophthalmic Association. Darshan. – 2014. – Mode of access: <http://www.tnoabstracts.com/ViewFreePaperByNo.aspx?id=385>
66. Baranyi, N. Keratitis caused by *Aspergillus pseudotamarii* / N. Baranyi, S. Kocsube, A.

- Szekeres, A. Raghavan, V. Narendran, C. Vágvölgyi, K.P. Selvam, Y.R.B. Singh, L. Kredics, J. Varga, P. Manikandanb // *Medical Mycology Case Reports*. – 2013. – Vol. 2. – P. 91-94.
67. Barbuddhe, S.B. Rapid identification and typing of *Listeria* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry / S.B. Barbuddhe, T. Maier, G. Schwarz, M. Kostrzewa, H. Hof, E. Domann, T. Chakraborty, T. Hain // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2008. – Vol. 74, №17. – P. 5402-5407.
68. Barrs, V.R. *Aspergillus felis* sp. nov., an emerging agent of invasive aspergillosis in humans, cats, and dogs [Electronic resource] / V.R. Barrs, T.M. van Doorn, J. Houbraken, S.E. Kidd, P. Martin, M.D. Pinheiro, M. Richardson, J. Varga, R.A. Samson // *PLOSone*. – 2013. – Vol. 8, Is. 6. – Mode of access: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0064871>.
69. Bart-Delabesse, E. Microsatellite markers for typing *Aspergillus fumigatus* isolates / E. Bart-Delabesse, J.-F. Humbert, E. Delabesse, S. Bretagne // *J. Clin. Microbiol.* – 1998. – Vol. 36, №9. – P. 2413-2418.
70. Bartoletti, M. Epidemiology of invasive pulmonary aspergillosis among intubated patients with COVID-19: a prospective study / M. Bartoletti, R. Pascale, M. Cricca, M. Rinaldi, A. Maccaro, L. Bussini, G. Fornaro, T. Tonetti, G. Pizzilli, E. Francalanci, L. Giuntoli, A. Rubin, A. Moroni, S. Ambretti, F. Trapani, O. Vatamanu, V.M. Ranieri, A. Castelli, M. Baiocchi, R. Lewis, M. Giannella, P. Viale, PREDICO Study Group // *Clin. Infect. Dis.* – 2020. – Vol. 73, Is. 11. – P. e3606-e3614. – Mode of access: <https://academic.oup.com/cid/article/73/11/e3606/5876990?login=false>
71. Bathoorn, E. Involvement of the opportunistic pathogen *Aspergillus tubingensis* in osteomyelitis of the maxillary bone: a case report [Electronic resource] / E. Bathoorn, N.E. Salazar, S. Sepehrkhoy, M. Meijer, H. de Cock, P.-J. Haas // *BMC Infectious Diseases*. – 2013. – Vol. 13:59. – Mode of access: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/13/59>.
72. Batista, A.C. Onicomiose produzida por «*Aspergillus clavato-nanica*» n. sp. / A.C. Batista, H. da Silva Maia, I.C. da Alecrim // *Anais da Faculdade de Medicina da Universidade do Recife*. – 1955. – Vol. 15, Is. 2. – P. 197-203.
73. Bau, M. RFLP characterization of *Aspergillus niger* aggregate species from grapes from Europe and Israel / M. Bau, G. Castella, M.R. Braqulat, F.J. Cabanes // *Int. J. Food Microbiol.* – 2006. – Vol. 111, Suppl. 1. – P. S18-S21.
74. Becher, R. Development of a novel multiplex DNA microarray for *Fusarium graminearum* and analysis of azole fungicide responses [Electronic resource] / R. Becher, F. Weihmann, H.B. Deising, S.G.R. Wirsal // *BMC Genomics*. – 2011. – Vol. 12. – Mode of access: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-12-52>

75. Bellete, B. Acquired resistance to voriconazole and itraconazole in a patient with pulmonary aspergilloma / B. Bellete, H. Raberin, J. Morel, P. Flori, J. Hafid, R.T. Manh Sung // Medical Mycology. – 2010. – Vol. 48, Is. 1. – P. 197-200.
76. Berrazeg, M. Biotyping of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF-MS [Electronic resource] / M. Berrazeg, S.M. Diene, M. Drissi, M. Kempf, H. Richet, L. Landraud, J.-M. Rolain // PLOS one. – 2013. – Vol. 8, Is. 4. – Mode of access: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0061428>.
77. Bills, G.F. Discovery of the parnafungins, antifungal metabolites that inhibit mRNA polyadenylation, from the *Fusarium larvarum* complex and other Hypocrealean fungi / G.F. Bills, G. Platas, D.P. Overly, J. Collado, A. Fillola, M.R. Jiménez, J. Martín, A. González del Val, F. Vicente, J.R. Tormo, F. Peláez, K. Calati, G. Harris, C. Parish, D. Xu, T. Roemer // Mycologia. – 2009. – Vol. 101, №4. – P. 449-472.
78. Biotechnology Handbooks: *Aspergillus* / Ed. by Smith J.E. – New York: Plenum Press, 1994. – 273 P.
79. Bittar, F. MALDI-TOF-MS for rapid detection of staphylococcal Pantone-Valentine leukocidin. / F. Bittar, Z. Ouchenane, F. Smati, D. Raoult, J.M. Rolain // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2009. – Vol. 34, Is. 5. – P. 467-470.
80. Blatzer, M. Amphotericin B resistance in *Aspergillus terreus* is overpowered by coapplication of pro-oxidants / M. Blatzer, E. Jukic, W. Posch, B. Schöpf, U. Binder, M. Steger, G. Blum, H. Hackl, E. Gnaiger, C. Lass-Flörl, D. Wilflingseder // Antioxidants & Redox Signaling. – 2015. – Vol. 23, №18. – P. 1424-1438.
81. Blum, G. Potential basis for amphotericin B resistance in *Aspergillus terreus* / G. Blum, S. Perkhof, H. Haas, M. Schrettl, R. Würzner, M.P. Dierich, C. Lass-Flörl // Antimicrobial Agents & Chemotherapy. – 2008. – Vol. 52, №4. – P. 1553-1555.
82. Bongomin, F. Post-tuberculosis chronic pulmonary aspergillosis: An emerging public health concern [Electronic resource] / F. Bongomin // PLOS Pathogens. – 2020. – Vol. 16, Is. 8. – Art. № e1008742 – Mode of access: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1008742>
83. Borsa, B.A. The first case of persistent vaginitis due to *Aspergillus protuberus* in an immunocompetent patient / B.A. Borsa, G. Ozgun, J. Houbaken, F. Okmen // Mikrobiyol. Bul. – 2015. – Vol. 49, №1. – P. 130-134.
84. Bossche, H.V. *Aspergillus* and aspergillosis / H.V. Bossche, D.W.R. Mackenzie, G. Cauwenberg. – Antwerp.: Springer Science, 1988. – 322 P.
85. Brasch, J. Nail infection by *Aspergillus ochraceopetaliformis* / J. Brasch, J. Varga, J.M. Jensen, F. Egberts, K. Tintelnot // Medical Mycology. – 2009. – Vol. 47. – P. 658-662.

86. Brich, M. DNA typing of epidemiologically-related isolates of *Aspergillus fumigatus* / M. Brich, N. Nolard, G.S. Shankland, D.W. Denning // *Epidemiology and Infection*. – 1995. – Vol. 114, Is. 1. – P. 161-168.
87. Bruno, J.F. Impacts of aspergillosis on sea fan coral demography: modeling a moving target / J.F. Bruno, S.P. Ellner, I. Vu, K. Kim, C.D. Harvell // *Ecological Monographs*. – 2011. – Vol. 81, №1. – P. 123-139.
88. Buchta, V. *In vitro* activities of 3-(halogenated phenyl)-5-acycloxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-ones against common and emerging yeast and molds / V. Buchta, M. Pour, P. Kubanova, L. Silva, I. Votruba, M. Vopršalová, R. Schiller, H. Fáková, M. Špulák // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2004. – Vol. 48, №3. – P. 873-878.
89. Bugni, T.S. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms / T.S. Bugni, C.M. Ireland // *Natural product reports*. – 2004. – Vol. 21, №1. – P. 143-163.
90. Burckhardt, I. Susceptibility Testing of Bacteria Using Maldi-Tof Mass Spectrometry [Electronic resource] / I. Burckhardt, S. Zimmermann // *Front. Microbiol.* – 2018. – Vol. 9. – Art. №1744. – Mode of access: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01744>
91. Caira, M. First case of breakthrough pneumonia due to *Aspergillus nomius* in patient with acute myeloid leukemia / M. Caira, B. Posteraro, M. Sanguinetti, E. de Carolis, G. Leone, L. Pagano // *Medical Mycology*. – 2012. – Vol. 50, №7. – P. 746-750.
92. Calera, J.A. *Aspergillus nidulans* antigens with media and time and temperature of growth / J.A. Calera, R. López-Medrano, M.C. Ovejero, P. Puente, F. Leal // *Infect. Immun.* – 1994. – Vol. 62, №6. – P. 2322-2333.
93. Campbell, C.K. Fine structure and physiology of conidial germination in *Aspergillus fumigatus* / C.K. Campbell // *Transactions of the British Mycological Society*. – 1971. – Vol. 57, Is. 3. – P. 393-402.
94. Campbell, C.R. Comparison of the API *Candida* system with the AUXACOLOR system for identification of common yeast pathogens / C.R. Campbell, K.G. Davey, A.D. Holmes, A. Szekely, D.W. Warnock // *J. Clin. Microbiol.* – 1999. – Vol. 37, №3. – P. 821-823.
95. Carrey, E.A. Detection and location of the enzymes of *de novo* pyrimidine biosynthesis in mammalian spermatozoa / E.A. Carrey, C. Dietz, D.M. Glubb, M. Löffler, J.M. Lucocq, P.F. Watson // *Reproduction*. – 2002. – Vol. 123. – P. 757-768.
96. Cassagne, C. Mould routine identification in the clinical laboratory by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry [Electronic resource] / C. Cassagne, S. Ranque, A.-C. Normand, P. Fourquet, S. Thiebault, C. Planard, M. Hendrickx, R. Piarroux // *PLOSone*. – 2011. – Vol. 6., Is. 12. – Mode of access: <http://journals.plos.org/plosone/article?>

id=10.1371/journal.pone.0028425.

97. Chalupova, J. Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry / J. Chalupova, M. Raus, M. Sedlarova, M. Sebela // *Biotechnology Advances*. – 2013. – Vol. 32, №1. – P. 230-241.
98. Chaturvedi, V. Mycology proficiency testing program / V. Chaturvedi, P. Ren. – New York: Wadsworth Center, New York State Department of Health. 2009. – 61 P.
99. Chiller, T.M. Clinical findings for fungal infections caused by methylprednisolone injections / T.M. Chiller, M. Roy, D. Nguyen, A. Guh, A.N. Malani, R. Latham, S. Peglow, T. Kerker, D. Kaufman, J. McFadden, J. Collins, M. Kainer, J. Duwve, D. Trump, C. Blackmore, C. Tan, A.A. Cleveland, T. MacCannell, A. Muehlenbachs, S.R. Zaki, M.E. Brandt, J.A. Jernigan, Multistate Fungal Infection Clinical Investigation Team // *The New England Journal of Medicine*. – 2013. – Vol. 369, №17. – P. 1610-1619.
100. Chim, C.S. Simultaneous *Aspergillus fischeri* and herpes simplex pneumonia in a patient with multiple myeloma / C.S. Chim, P.L. Ho, K.Y. Yuen // *Scand. J. Infect. Dis.* – 1998. – Vol. 30, №2. – P. 190-191.
101. Ching-lai, L. Identification of pathogenic fungal isolates by ITS sequencing / L. Ching-lai. – The University of Hong Kong. 2013. – 59 P.
102. Chotirmall, S.H. Immuno-evasive *Aspergillus* virulence factors / S.H. Chotirmall, B. Mirkovic, G.M. Lavelle, N.G. McElvaney // *Mycopathologia*. – 2014. – Vol. 178, №5 – 6. – P. 363-370.
103. Coelho, D. *Aspergillus viridinutans*: an agent of adult chronic invasive aspergillosis / D. Coelho, S. Silva, L. Vale-Silva, H. Gomes, E. Pinto, A. Sarmiento, M.D. Pinheiro // *Medical Mycology*. – 2011. – Vol. 49, №7. – P. 755-759.
104. Coriglione, G. *Neosartorya fischeri* var. *fischeri* (Wehmer) Malloch and Cain 1972 (anamorph: *Aspergillus fischerianus* Samson and Gams 1985) as a cause of mycotic keratitis / G. Coriglione, G. Stella, L. Gafa, G. Spata, S. Oliveri, A.A. Padhye, L. Ajello // *Eur. J. Epidemiol.* – 1990. – Vol. 6, №4. – P. 382-385.
105. De Carolis, E. Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry / E. de Carolis, B. Posteraro, C. Lass-Flörl, A. Vella, A.R. Florio, R. Torelli, C. Girmenia, C. Colozza, A.M. Tortorano, M. Sanguinetti, G. Fadda // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2012. – Vol. 18, Is. 5. – P. 475-484.
106. De Carolis, E. Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for caspofungin susceptibility testing of *Candida* and *Aspergillus* species / E. De Carolis, A. Vella, A.R. Florio, P. Posteraro, D.S. Perlin, M. Sanguinetti, B. Posteraro // *J. Clin.*

- Microbiol. – 2012. – Vol. 50, Is. 7 – P. 2479-2483.
107. de Hoog, G.S. Atlas of clinical fungi. 2nd ed. / G.S. de Hoog, J. Guarro, J. Gene, M.F. Figueres. — Utrecht: CBS, 2000. – 1126 P.
 108. de Oliveira Ceita, G. Analysis of the ergosterol biosynthesis pathway cloning, molecular characterization and phylogeny of lanosterol 14 α -demethylase (ERG11) gene of *Moniliophthora perniciosa* / G. de Oliveira Ceita, L.A. Vilas-Boas, M.S. Castilho, M.F. Carazzolle, C.P. Pirovani, A. Selbach-Schnadelbach, K.P. Gramacho, P.I.P. Ramos, L.V. Barbosa, G.A.G. Pereira, A. Góes-Neto // Genetics and Molecular Biology. – 2014. – Vol. 37, №4. – P. 683-693.
 109. Debets, A.J.M. Experimental evolution of fungus *Aspergillus nidulans* [Electronic resource] / A.J.M. Debets // Wageningen University & Research. – 2017. – Mode of access: <http://www.wur.nl/en/show/Experimental-evolution-of-fungus-Aspergillus-nidulans.htm> 115
 110. Degos, R. Aspergillosis of the eyelid / R. Degos, G. Segretain, G. Badillet, A. Maisler // Bull. Soc. Dermatol. Syphiligr. – 1970. – Vol. 77, №5. – P. 732-734.
 111. Dehghan, P. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis of clinical isolates of *Aspergillus flavus* from Iran reveals the first cases of *Aspergillus minisclerotigenes* associated with human infection [Electronic resource] / P. Dehghan, T. Bui, L.T. Campbell, Y.-W. Lai, N. Tran-Dinh, F. Zaini, D.A. Carter // BMC Infectious Diseases. – 2014. – Vol. 14:358 – Mode of access: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/14/358>.
 112. Denning, D.W. Echinocandins: a new class antifungal / D.W. Denning // J. Antimicrob. Chemother. – 2002. – Vol. 49, Is. 6. – P. 889-891.
 113. Diaz-Guerra, T.M. A point mutation in the 14 α -sterol demethylase gene cyp51A contributes to itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus* / T.M. Diaz-Guerra, E. Mellado, M. Cuenca-Estrella, J.L. Rodriguez-Tudela // Antimicrob. Agents Chemother. – 2003. – Vol. 47, № 3. – P. 1120-1124.
 114. Diffuse Lung Disease: a practical approach / Ed. By Baughman R.P., du Bois R.M. – Springer Science & Business Media, 2011. – 400 P.
 115. Doddapaneni, H. Genome-wide structural and evolutionary analysis of the P450 monooxygenase genes (P450ome) in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: Evidence for gene duplications and extensive gene clustering [Electronic resource] / H. Doddapaneni, R. Chakraborty, J.S. Yadav // BMC Genomics. – 2005. – Vol. 6. – Mode of access: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-6-92>
 116. Dotis, J. Femoral osteomyelitis due to *Aspergillus nidulans* in a patient with chronic granulomatous disease / J. Dotis, P. Panagopoulou, J. Filioti, R. Winn, C. Toptsis, C. Panteliadis, E. Roilides // Infection. – 2003. – Vol. 31, №2. – P. 121-124.

117. Duarte-Escalante, E. Population structure and diversity of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* isolated from different sources and geographic origins / E. Duarte-Escalante, G. Zuniga, O.N. Ramirez, S. Córdoba, N. Refojo, R. Arenas, L. Delhaes, M. del Rocío Reyes-Montes // *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* – 2009. – Vol. 104, №3. – P. 427-433.
118. Dumas, B. Sterol metabolism in the oomycete *Aphanomyces euteiches*, a legume root pathogen: Rapid report / M.-A. Madoui, J. Bertrand-Michel, E. Gaulin, B. Dumas // *New Phytologist.* – 2009. – Vol. 183, №2. – P. 291-300.
119. Dute, R.R. Ultrastructure of dormant and germinating conidia of *Aspergillus ochraceus* / R.R. Dute, J.D. Weete, A. Rushing // *Mycologia.* – 1989. – Vol. 81, №5. – P. 772-782.
120. Edlind, T.D. *Aspergillus fumigatus* CYP51 sequence: potential basis for fluconazole resistance / T.D. Edlind, K.W. Henry, K.A. Metera, S.K. Katiyar // *Med. Mycol.* – 2001. – Vol. 39, № 3. – P. 299-302.
121. Egli, A. Emergence of *Aspergillus calidoustus* infection in the era of posttransplantation azole prophylaxis / A. Egli, J. Fuller, A. Humar, D. Lien, J. Weinkauff, R. Nador, A. Kapasi, D. Kumar // *Transplantation.* – 2012. – Vol. 94, №4. – P. 403-410.
122. Ein-Gil, N. Presence of *Aspergillus sydowii*, a pathogen of gorgonian sea fans in the marine sponge *Spongia odbscura* / N. Ein-Gil, M. Ilan, S. Carmeli, G.W. Smith, J.R. Pawlik, O. Yarden // *The ISME journal.* – 2009. – Vol. 3, №6. – P. 752-755.
123. El-Sayed, A.S.A. Transcriptional and proteomic profiling of *Aspergillus flavipes* in response to sulfur starvation [Electronic resource] / A.S.A. El-Sayed, M.A. Yassin, G. Shad Ali, W. Ma // *PloS One.* – 2015. – Vol. 10, №12. – Mode of access: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0144304>.
124. Enoch, D.A. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options / D.A. Enoch, H.A. Ludlam, N.M. Brown // *Journal of Medical Microbiology.* – 2006. – Vol. 55, Pt. 7. – P. 809-818.
125. Espinel-Ingroff, A. E-test method for testing susceptibilities of *Aspergillus* spp. to the new triazoles voriconazole and posaconazole and to established antifungal agents: comparison with NCCLS broth microdilution method / A. Espinel-Ingroff, A. Rezusta // *Journal of Clinical Microbiology.* – 2002. – Vol. 40, №6. – P. 2101-2107.
126. Espinel-Ingroff, A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi / A. Espinel-Ingroff // *Rev. Iberoam. Micol.* – 2008. – Vol. 25, №2. – P. 101-106.
127. Esteban, A. Utility of microsatellite markers and amplified fragment length polymorphism in the study of potentially ochratoxigenic black *Aspergilli* / A. Esteban, S.-L. L.

- Leong, A.D. Hocking, M.L. Abarca, F.J. Cabañes, N. Tran-Dinh // *Current Microbiology*. – 2008. – Vol. 57, Is. 4. – P. 348-355.
128. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antifungal Agents. Breakpoint tables for interpretation of MICs. Version 6.1, valid from 2013-03-11. – EUCAST, 2013. – 5 P.
 129. Fakih, M.G. First reported case of *Aspergillus granulosis* infection in cardiac transplant patient / M.G. Fakih, G.E. Barden, C.A. Oakes, C.S. Berenson // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1995. – Vol. 33, №2. – P. 471-473.
 130. Fanti, F. Studies on the epidemiology of *Aspergillus fumigatus* infections in a university hospital / F. Fanti, S. Conti, L. Campani, G. Morace, G. Dettori, L. Polonelli // *Eur. J. Epidemiol.* – 1989. – Vol. 5, №1. – P. 8-14.
 131. Fernandez, M. *Aspergillus* species in hospital environments with pediatric patients in critical condition / M. Fernandez, M. Cattana, F. Rojas, M. de Los Ángeles Sosa, C. Aguirre, M. Vergara, G. Giusiano // *Rev. Iberoam. Micol.* – 2014. – Vol. 31, №3. – P. 176-181.
 132. Frisvad, J.C. Metabolomics of *Aspergillus fumigatus* / J.C. Frisvad, C. Rank, K.F. Nielsen, T. Larsen // *Medical Mycology*. – 2009. – Vol. 47, Suppl. 1. – P. S53-S71.
 133. Gagnaire, J. Detection of *Staphylococcus aureus* delta-toxin production by whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry [Electronic resource]. / J. Gagnaire, O. Dauwalder, S. Boisset, D. Khau, A.M. Freydière, F. Ader, M. Bes, G. Lina, A. Tristan, M.E. Reverdy, A. Marchand, T. Geissmann, Y. Benito, G. Durand, J.P. Charrier, J. Etienne, M. Welker, A. Van Belkum, F. Vandenesch // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7, №7 – Art. №e40660. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3391297/>
 134. Garcia-Martos, P. Onychomycosis caused by *Aspergillus sclerotiorum* / P. Garcia-Martos, J. Guarro, J. Gene, J. Mira // *Journal de Mycologie Medicale*. – 2001. – Vol. 11, №4. – P. 222-224.
 135. Gehlot, P. Molecular diagnostics of human pathogenic *Aspergillus* species / P. Gehlot, D.K. Purohit, S.K. Singh // *Indian Journal of Biotechnology*. – 2011. – Vol. 10. – P. 207-211.
 136. Geiser, D.M. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus* / D.M. Geiser, M.A. Klich, J.C. Frisvad S.W. Peterson, J. Varga, R.A. Samson // *Studies in Mycology*. – 2007. – Vol. 59. – P. 1-10.
 137. Gene, J. Cutaneous infection caused by *Aspergillus ustus*, an emerging opportunistic fungus in immunosuppressed patients / J. Gene, A. Azon-Masoliver, J. Guarro, G. De Febrer, A. Martínez, C. Grau, M. Ortoneda, F. Ballester // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2001. – Vol. 39, №3. – P. 1134-1136.
 138. Georgiev, V.St. Infectious diseases in immunocompromised hosts / V.St. Georgiev. –

CRC Press, 1997. – 1232 P.

139. Gerber, J. Pulmonary aspergillosis caused by *Aspergillus fischeri* var. *spinosus*: report of a case and value of serologic studies / J. Gerber, J. Chomicki, J.M. Brandsberg, R. Jones, K.J. Hammerman // Am. J. Clin. Pathol. – 1973. – Is. 60. – P. 861-866.
140. Ghebremedhin, B. Peritonitis due to *Neosartorya pseudofischeri* in elderly patient undergoing peritoneal dialysis successfully treated with voriconazole / B. Ghebremedhin, A. Bluemel, K.H. Neumann, B. Koenig, W. Koenig // Journal of Medical Microbiology. – 2009. – Vol. 58, Pt. 5. – P. 678-682.
141. Gil, M.L. Binding of extracellular matrix proteins to *Aspergillus fumigatus* conidia / M.L. Gil, M.C. Panalver, J.L. Lopez-Ribot, J.E. O'Connor, J.P. Martinez // Infection and Immunity. – 1996. – Vol. 64, №12. – P. 5239-5247.
142. Girling, S.J. Treatment of *Aspergillus* species infection in reptiles with itraconazole at metabolically scaled doses / S.J. Girling, M.A. Fraser // The Veterinary record. – 2009. – Vol. 165, №2. – P. 52-54.
143. Goncalves, S.S. *Aspergillus novoparasiticus*: a new clinical species of the section *Flavi* / S.S. Goncalves, A.M. Stchigel, J.F. Cano, P.C. Godoy-Martinez, A.L. Colombo, J. Guarro // Medical Mycology. – 2011. – Vol. 50, №2. – P. 152-160.
144. Goncalves, S.S. *In vitro* antifungal susceptibility of clinical relevant species belonging to *Aspergillus* section *Flavi* / S.S. Goncalves, A.M. Stchigel, J. Cano, J. Guarro, A.L. Colombo // Antimicrob. Agents Chemother. – 2013. – Vol. 57, №4. – P. 1944-1947.
145. Gori, S. Pulmonary aspergillosis caused by *Neosartorya fischeri* (*Aspergillus fischerianus*) in a liver transplant recipient / S. Gori, G. Pellegrini, F. Filipponi, S. Della Capanna // J. Mycol. Med. – 1998. – Vol. 8. – P. 105-107.
146. Grichin, N.V. Estimation of the number of amino acid substitutions per site when the substitution rate varies among sites / N.V. Grichin // Journal of Molecular Evolution. – 1995. – Vol. 41, Is. 5. – P. 675-679.
147. Guarro, J. Cerebral aspergillosis caused by *Neosartorya hiratsukae*, Brazil / J. Guarro, E.G. Kallas, P. Godoy, A. Karenina, J. Gené, A. Stchigel, A.L. Colombo // Emerg. Infect. Dis. – 2002. – Vol. 8, №9. – P. 989-991.
148. Gugnani, H.C. Onychomycosis due to *Emericella quadrilineata* / H.C. Gugnani, V.K. Vijayan, P. Tyagi, S. Sharma, A.M. Stchigel, J. Guarro // Journal of Clinical Microbiology. – 2014. – Vol. 42, №2. – P. 914-916.
149. Guinea, J. *Aspergillus citrinoterreus*, a new species of section *Terrei* isolated from samples of patients with nonhematological predisposing conditions / J. Guinea, M. Sandoval-Denis, P. Escribano, T. Peláez, J. Guarro, E. Bouza // Journal of Clinical Microbiology. – 2015.

- Vol. 53, №2. – P. 611-617.
150. Gurcan, S. A case report on *Aspergillus lentulus* pneumonia / S. Gurcan, M. Tikvesli, S. Ustundag, B. Ener // Balkan Medical Journal. – 2013. – №30. – P. 429-431.
 151. Hadrich, I. Microsatellite typing to trace *Aspergillus flavus* infections in a hematology unit / I. Hadrich, F. Makni, A. Ayadi, S. Ranque // J. Clin. Microbiol. – 2010. – Vol. 48, №7. – P. 2396-2401.
 152. Hageskal, G. Emerging pathogen *Aspergillus calidoustus* colonizes water distribution systems / G. Hageskal, R. Kristensen, R.F. Fristad, I. Skaar // Medical Mycology. – 2011. – Vol. 49, №6. – P. 588-593.
 153. Halsey, C. Necrotising external otitis caused by *Aspergillus wentii*: a case report / C. Halsey, H. Lumley, J. Luckit // Mycoses. – 2011. – Vol. 54, №4. – P. 211-213.
 154. Hamamoto, H. Tandem repeat of a transcriptional enhancer upstream of the sterol 14 α -demethylase gene (CYP51) in *Penicillium digitatum* / H. Hamamoto, K. Hasegawa, R. Nakaune, Y.J.Lee, Y. Makizumi, K. Akutsu, T. Hibi // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – Vol. 66, №8. – P. 3421-3426.
 155. Hargrove, T.Y. Structure-functional characterization of cytochrome P450 sterol 14 α -demethylase (CYP51B) from *Aspergillus fumigatus* and molecular basis for the development of antifungal drugs / T.Y. Hargrove, Z. Wawrzak, D.C. Lamb, F.P. Guengerich, G.I. Lepesheva // The Journal of Biological Chemistry. – 2015. – Vol. 290, №39. – P. 23916-23934.
 156. Henry, T. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2 / T. Henry, P.C. Iwen, S.H. Hinrichs // J. Clin. Microbiol. – 2000. – Vol. 38, №4. – P. 1510-1515.
 157. Hope, W.W. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis / W.W. Hope, T.J. Walsh, D.W. Denning // Lancet Infect. Dis. – 2005. – Vol. 5, №10. – P. 609-622.
 158. Horn, B.W. Sexual reproduction in *Aspergillus flaus* sclerotia naturally produced in corn / B.W. Horn, R.B. Sorensen, M.C. Lamb, V.S. Sobolev, R.A. Olarte, C.J. Worthington, I. Carbone // Phytopathology. – 2014. – Vol. 104, №1. – P. 75-85.
 159. Hotta, Y. Classification of genus *Pseudomonas* by MALDI-TOF MS based on ribosomal protein coding in S10-spc-alpha operon at strain level / Y. Hotta, K. Teramoto, H. Sato, H. Yoshikawa, A. Hosoda, H. Tamura // J. Proteome Res. – 2010. – Vol. 9, №12. – P. 6722-6728.
 160. Houbraken, J. *Aspergillus oerlinghausenensis*, a new mould species closely related to *A. fumigatus* [Electronic resource] / J. Houbraken, M. Weig, U. Gross, M. Meijer, O. Bader // FEMS Microbiology letters. – 2016. – Vol. 363, Is. 3. – Art. № fnv236. – Mode of access: <https://academic.oup.com/femsle/article/363/3/fnv236/2594526?login=false>

161. Houbraken, J. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Usti* / J. Houbraken, M. Due, J. Varga, M. Meijer, J.C. Frisvad, R.A. Samson // *Studies in Mycology*. – 2007. – Vol. 59. – P. 107-128.
162. Houshyarfard, M. Characterization of Iranian nonaflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus* based on microsatellite-primed PCR / M. Houshyarfard, H. Rouhani, M. Falahati-Rastegar, S. Malekzadeh-Shafaroudi, E. Mahdikhani-Moghaddam // *Molecular Biology Research Communications*. – 2015. – Vol. 4, №1. – P. 43-55.
163. Howard, D.H. Pathogenic Fungi in Humans and Animals. 2Nd ed. / D.H. Howard. – New York – Basel: CRC Press, 2003. – 800 P.
164. Howard, S.J. Cryptic species and azole resistance in the *Aspergillus niger* complex / S.J. Howard, E. Harrison, P. Bowyer, J. Varga, D.W. Denning // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2011. – Vol. 55, № 10. – P. 4802-4809.
165. Howard, S.J. Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure / S.J. Howard, D. Cerar, M.J. Anderson, A. Albarrag, M.C. Fisher, A.C. Pasqualotto, M. Laverdiere, M.C. Arendrup, D.S. Perlin, D.W. Denning // *Emerging Infect. Dis.* – 2009. – Vol. 15, № 7. – P. 1068-1076.
166. Howard, S.J. Major variations in *Aspergillus fumigatus* arising within aspergillomas in chronic pulmonary aspergillosis / S.J. Howard, A.C. Pasqualotto, M.J. Anderson, H. Leatherbarrow, A.M. Albarrag, E. Harrison, L. Gregson, P. Bowyer, D.W. Denning // *Mycoses*. – 2013. – Vol. 56, № 4. – P. 434-441.
167. Huang, L.U. A comparison of methods for yeast identification including CHROMagar *Candida*, Vitek system YBC and a traditional biochemical method / L.U. Huang, C.H. Chen, C.F. Chou, J.J. Lu, W.M. Chi, W.H. Lee // *Chinese medical journal*. – 2001. – Vol. 64, №10. – P. 568-574.
168. Hubka, V. *Aspergillus pragensis* sp. nov. discovered during molecular reidentification of clinical isolates belonging to *Aspergillus* section *Candidi* / V. Hubka, P. Lyskova, J.C. Frisvad, S.W. Peterson, M. Skorepova, M. Kolarik // *Medical Mycology*. – 2014. – Vol. 52. – P. 565-576.
169. Hubka, V. Rare and new etiological agents revealed among 178 clinical *Aspergillus* strains obtained from Czech patients and characterized by molecular sequencing / V. Hubka, A. Kubatova, N. Mallatova P. Sedlacek, J. Melichar, M. Skorepova, K. Mencl, P. Lyskova, B. Sramkova, M. Chudickova, P. Hamal, M. Kolarik // *Medical Mycology*. – 2012. – Vol. 50. – P. 601-610.
170. Hubka, V. Revision of *Aspergillus* section *Flavipedes*: seven new species and proposal of section *Jani* sect. nov. / V. Hubka, A. Novakova, M. Kolarik, Ž. Jurjević, S.W. Peterson // *Mycologia*. – 2015. – Vol. 107, №1. – P. 169-208.

171. Hubka, V. Taxonomic revision of *Eurotium* and transfer of species to *Aspergillus* / V. Hubka, M. Kolarik, A. Kubatova, S.W. Peterson // *Mycologia*. – 2013. – Vol. 105, №4. – P. 912-937.
172. Hui Wai-san, T. Clinical spectrum of *Aspergillus* infections in Hong Kong. Dissertation for the degree of master of medical sciences / T. Hui Wai-san. – The University of Hong Kong. 2014. – 87 P.
173. Jang, J.H. Identification of clinical mold isolates by sequence analysis of the internal transcribed spacer region, ribosomal large-subunit D1/D2, and β -tubulin / J.H. Jang, J.H. Lee, C.S. Ki, N.Y. Lee // *Annals of Laboratory Medicine*. – 2012. – Vol. 32, №2. – P. 126-132.
174. Jang, S.S. *Aspergillus deflexus* infection in four dogs / S.S. Jang, T.E. Dorr, E.L. Biberstein, A. Wong // *J. Med. Vet. Mycol.* – 1986. – Vol. 24, №2. – P. 95-104.
175. Jarv, H. Isolation of *Neosartorya pseudofischeri* from blood: first hint of pulmonary aspergillosis / H. Jarv, J. Lehtmaa, R.C. Summerbell, E.S. Hoekstra, R.A. Samson, P. Naaber // *J. Clin. Microbiol.* – 2004. – Vol. 42, Is. 2. – P. 925-928.
176. Jiajun, W. A case of pulmonary aspergillosis caused by *Aspergillus tetrazonus* / W. Jiajun, Z. Qiangqiang, L. Li // *Chinese Journal of Dermatology*. – 1996. – Vol. 29, №5. – P. 311-312.
177. Jones, D.B. Therapy of postsurgical fungal endophthalmitis / D.B. Jones // *Ophthalmology*. – 1977. – Vol. 85, №4. – P. 357-373.
178. Juhasz, A. Interpretation of mtDNA RFLP variability among *Aspergillus tubingensis* isolates / A. Juhasz, H. Engi, I. Pfeiffer, J. Kucsera, C. Vágvolgyi, Z. Hamari // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 2007. – Vol. 91, Is. 3. – P. 209-216.
179. Jurjevic, Z. *Aspergillus* section *Versicolores*: nine new species and multilocus DNA sequence based phylogeny / Z. Jurjevic, S.W. Peterson, B.W. Horn // *IMA Fungus*. – 2012. – Vol. 3, №1. – P. 59-79.
180. Jurjevic, Z. Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from indoor air / Z. Jurjevic, S.W. Peterson, G. Stea, M. Solfrizzo, J. Varga, V. Hubka, G. Perrone // *IMA Fungus*. – 2012. – Vol. 3, №2. – P. 159-173.
181. Kami, M. The mechanism for low yield of blood culture in invasive aspergillosis; the clinical importance of antigen detection tests revisited. / M. Kami, N. Murashige, T. Fujihara, N. Sakagami, Y. Tanaka // *Bone Marrow Transplant*. – 2005. – Vol. 36, Is. 1. – P. 85-86.
182. Karalti, I. Isolation and identification of *Aspergillus* spp. during one year in the hospitals / I. Karalti, G.T. Colakoglu // *Journal of Life Science*. – 2012. – №6. – P. 1220-1224.
183. Karkowska-Kuleta, J. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus* / J. Karkowska-Kuleta,

- M. Rapala-Kozik, A. Kozik // *Acta Biochimica Polonica*. – 2009. – Vol. 56, №2. – P. 211-224.
184. Kathuria, S. Molecular epidemiology and *in-vitro* antifungal susceptibility of *Aspergillus terreus* species complex isolates in Delhi, India: evidence of genetic diversity by amplified fragment length polymorphism and microsatellite typing [Electronic resource] / S. Kathuria, C. Sharma, P.K. Singh, P. Agarwal, K. Agarwal, F. Hagen, J.F. Meis, A. Chowdhary // *PLOSone*. – 2015. – Vol. 10, Is. 3. – Mode of access: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0118997>.
 185. Katou, K. A case of chronic necrotizing pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus flavipes* associated with pulmonary fibrosis / K. Katou, K. Nanjou, M. Kawakami // *The journal of the Japanese Respiratory Society*. – 1999. – Vol. 37, №11. – P. 938-942.
 186. Kaur, G. Comparative analysis of the omics technologies used to study antimonial, amphotericin B, and pentamidine resistance in *Leishmania* [Electronic resource] / G. Kaur, B. Rajput // *Journal of Parasitology Research*. – 2014. – Vol. 2014, Article ID 726328. – Mode of access: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/726328>
 187. Khan, S. Antifungal susceptibility testing method for resource constrained laboratories / S. Khan, S. Singhal, T. Mathur, D.J. Upadhyay, A. Rattan // *Indian Journal of Medical Microbiology*. – 2006. – Vol. 24, №3. – P. 171-176.
 188. Khan, Z. Aerial prevalence of *Aspergillus calidoustus* isolates in and around tertiary care hospital on Kuwait and assessment of their pathogenicity / Z. Khan, S. Ahmad, L. Joseph // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2014. – Vol. 52, №9. – P. 3402-3405.
 189. Kim J.M. Rapid Discrimination of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by MALDI-TOF MS [Electronic resource] / J.M. Kim, I. Kim, S.H. Chung, Y. Chung, M. Han, J.S. Kim. // *Pathogens*. – 2019. – Vol. 8, Is. 4. – Art. №214. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6963962/>
 190. Kim, D.-H. Reidentification of *Aspergillus* spp. isolated from clinical specimens of patients suspected pulmonary aspergillosis in Korea / D.-H. Kim, S.-H. Kim, Y.-K. Kim, S.-O. Kim // *Korean J. Med. Mycol*. – 2009. – Vol. 14, №3. – P. 133-144.
 191. Kitaura, T. A case of lung abscess due to *Aspergillus viridinutans* in patient with aplastic anemia / T. Kitaura, H. Chikumi, H. Murota, H. Fujiwara, H. Touge, K. Okada, M. Nakamoto, T. Igishi, N. Burioka, T. Yaguchi, E. Shimizu // *The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases*. – 2014. – Vol. 88, №6. – P. 855-860.
 192. Klaassen, C.H.W. *Aspergillus* strain typing in genomic era / C.H.W. Klaassen, N. Osharov // *Studies in Mycology*. – 2007. – Vol. 59. – P. 47-51.
 193. Klich, M.A. Identification of clinically relevant *aspergilli* / M.A. Klich // *Medical Mycology*. – 2006. – Vol. 44, Suppl. 1. – P. 127-131.

194. Klich, M.A. Identification of common *Aspergillus* species / M.A. Klich. – Utrech: Centraalbureau voor Schimmelculture, 2002. – 116 P.
195. Kousha, M. Pulmonary aspergillosis: a clinical review / M. Kousha, R. Tadi, A.O. Soubani // European Respiratory Review. – 2011. – Vol. 20, № 121. – P. 156-174.
196. Koutroutsos, K. *Neosartorya hiratsukae* peritonitis through continuous ambulatory peritoneal dialysis / K. Koutroutsos, M. Arabatzis, G. Bougatsos, A. Xanthaki, M. Toutouza, A. Velegraki // J. Med. Microbiology. – 2010. – № 59 (Pt. 7). – P. 862-865.
197. Kredics, L. Cause of keratitis caused by *Aspergillus tamarii* / L. Kredics, J. Varga, S. Kocsube Ilona Dóczy, Robert A. Samson, R. Rajaraman, V. Narendran, M. Bhaskar, C. Vágvölgyi, P. Manikandan // Journal of Clinical Microbiology. – 2007. – Vol. 45, №10. – P. 3464-3467.
198. Kredics, L. Infectious keratitis caused by *Aspergillus tubingensis* / L. Kredics, J. Varga, S. Kocsube, A. Raghavan, I. Dóczy, M. Bhaskar, T.M. Németh, Z. Antal, N. Venkatapathy, C. Vágvölgyi, R.A. Samson, M. Chockaiya, M. Palanisamy // Cornea. – 2009. – Vol. 28, №8. – P. 951-954.
199. Kredics, N. Molecular identification and antifungal susceptibility of *Aspergillus lentulus* isolates came from keratitis cases from India / L. Kredics, B. Nikolett, K. Sándor, R. Anita, N. Venkatapathy, V. Csaba, S.K. Panneer, S.Y.R. Babu, L. Balázs, V. János, M. Palanisamy // SIHAM 2014: 10th Annual Meeting of the Society for Indian Human & Animal Mycologists. 10.01.2014 – 12.01.2014. – Coimbatore, India. 2014. – P. 45.
200. Kristensen, L. Onychomycosis due to *Aspergillus tamarii* in 3-yaer-old boy / L. Kristensen, J. Stenderup, A. Otkjaer // Acta Derm. Venereol. – 2005. – Vol. 85, №3. – P. 261-262.
201. Krysinska-Traczyk, E. *Aspergillus candidus*: a respiratory hazard associated with grain dust / E. Krysinska-Traczyk, J. Dutkiewicz // Ann. Agric. Environ. Med. – 2000. – Vol. 7, №2. – P. 101-109.
202. Kurosawa, M. A case of occupational allergic bronchopulmonary aspergillosis unique in Japan / M. Kurosawa, S. Kobayashi, Y. Yanagihara, T. Shida // Br. J. Clin. Pract. – 1990. – Vol. 44, №11. – P. 482-489.
203. la Touche, C.J. Some unusual findings in the human external auditory meatus / C.J. la Touche // The Journal of Laryngology & Otology. – 1966. – Vol. 80, Is. 9. – P. 957-961.
204. Lau, A.F. Development of a clinically comprehensive database and a simple procedure for identification of molds from solid media by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry / A.F. Lau, S.K. Drake, L.B. Calhoun, C.M. Henderson, A.M. Zelazny // J. Clin. Microbiol. – 2013. – Vol. 51, №3. – P. 828-834.

205. Lavergne, R.-A. First description of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* due to TR₄₆/Y121F/T289A mutation in France / R.-A. Lavergne, F. Morio, L. Favennec, S. Dominique, J.F. Meis, G. Gargala, P.E. Verweij, P. Le Pape // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2015. – Vol. 59, №7. – P. 4331-4335.
206. Leroy, S. Insight into the Genome of *Staphylococcus xylosus*, a Ubiquitous Species Well Adapted to Meat Products [Electronic resource] / S. Leroy, A. Vermassen, G. Ras, R. Talon // Microorganisms. – 2017. – Vol. 5, Is. 3. – Art. №52. – Mode of access: <https://www.mdpi.com/2076-2607/5/3/52>
207. Lescar, J. *Aspergillus fumigatus* harbouring the sole Y121F mutation shows decreased susceptibility to voriconazole but maintained susceptibility to itraconazole and posaconazole / J. Lescar, I. Meyer, K. Akshita, K. Srinivasaraghavan, C. Verma, M. Palous, D. Mazier, A. Datry, A. Fekkar // J. Antimicrob. Chemother. – 2014. – Vol. 69, № 12. – P. 3244-3247.
208. Li, D.M. Three new *Aspergillus* species isolated from clinical sources as a causal agent of human aspergillosis / D.M. Li, Y. Horie, Y. Wang, R. Li // Mycoscience. – 1998. – Vol. 39, Is. 3. – P. 299-305.
209. Li, Y. Identification and susceptibility of *Aspergillus* section *Nigri* in China: prevalence of species and paradoxical growth in response to echinocandins / Y. Li, Z. Wan, W. Liu, R. Li // Journal of Clinical Microbiology. – 2015. – Vol. 53, №2. – P. 702-705.
210. Lin, D. Comparison of three typing methods for clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus* / D. Lin, P.F. Lehmann, B.H. Hamory, A.A. Padhye, E. Durry, R.W. Pinner, B.A. Lasker // J. Clin. Microbiol. – 1995. – Vol. 33, №6. – P. 1596-1601.
211. Liu, M. Multiple cyp51A-based mechanisms identified in azole-resistant isolates of *Aspergillus fumigatus* from China / M. Liu, R. Zeng, L. Zhang, D. Li, G. Lv, Y. Shen, H. Zheng, Q. Zhang, J. Zhao, N. Zheng, W. Liu // Antimicrob. Agents Chemother. – 2015. – Vol. 59, № 7. – P. 4321-4325.
212. Liu, W. The T788G mutation in the *cyp51C* gene confers voriconazole resistance in *Aspergillus flavus* causing aspergillosis / W. Liu, Y. Sun, W. Chen, W. Liu, Z. Wan, D. Bu, R. Li // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2012. – Vol. 56, №5. – P. 2598-2603.
213. Lonial, S. *Neosartorya fischeri*: an invasive fungal pathogen in an allogenic bone marrow transplant patient / S. Lonial, L. Williams, G. Carrum, M. Ostrowski, P. McCarthy Jr. // Bone Marrow Transplant. – 1997. – Vol. 19, №7. – P. 753-755.
214. Loudon, K.W. Pseudoclusters and typing by random amplification of polymorphic DNA of *Aspergillus fumigatus* / K.W. Loudon, A.P. Coke, J.P. Burnie // J. Clin. Pathol. – 1995. – Vol. 48, № 2. – P. 183-184.
215. Lyskova, P. Saprophytic microscopic fungi and dermatophytes accompanying infections

- of the skin and nails of patients in the Moravian-Silesian Region (Czech Republic) / P. Lyskova // Czech. Mycol. – 2007. – Vol. 59, №1. – P. 125-137.
216. Ma, H. Fungal surface remodeling visualized by atomic force microscopy / H. Ma, L.A. Snook, C. Tian, S.G. Kaminskyj, T.E. Dahms // Mycol. Res. – 2006. – Vol. 110, Pt. 8. – P. 879-886.
 217. Machida, M. *Aspergillus*: molecular biology and genomics / M. Machida, K. Gomi. – Norfolk: Horizon Scientific Press, 2010. – 238 P.
 218. Magliani, W. Yeast killer systems / W. Magliani, S. Conti, M. Gerloni D. Bertolotti, L. Polonelli // Clinical Microbiology Reviews. – 1997. – Vol. 10, №3. – P. 369 – 400.
 219. Manikandan, P. Keratitis caused by recently described new species *Aspergillus brasiliensis*: two case reports [Electronic resource] / P. Manikandan, J. Varga, S. Kocsube, R. Revathi, R. Anita, I. Dóczy, T.M. Németh, V. Narendran, C. Vágvolgyi, M. Bhaskar, C. Manoharan, R.A. Samson, L. Kredics // J. Med. Case Reports. – 2010. – Vol. 4:68. – Mode of access: <http://www.jmedicalcasereports.com/content/4/1/68>
 220. Manikandan, P. Mycotic keratitis due to *Aspergillus nomius* / P. Manikandan, J. Varga, S. Kocsube, R.A. Samson, R. Anita, R. Revathi, I. Dóczy, T.M. Németh, V. Narendran, C. Vágvolgyi, C. Manoharan, L. Kredics // Journal of Clinical Microbiology. – 2009. – Vol. 47, №10. – P. 3382-3385.
 221. Marquina, D. Biology of killer yeasts / D. Marquina, A. Santos, J.M. Peinado // International Microbiology. – 2002. – Vol. 5, №2. – P. 65-71.
 222. Martin-Vicente A. *In vivo* synergy of amphotericin B plus posaconazole in murine aspergillosis / A. Martin-Vicente, J. Capilla, J. Guarro // Antimicrob. Agents Chemother. – 2015. – Vol. 60, № 1. – P. 296-300.
 223. Martinez, A. Activities of sordarins in experimental models of candidiasis, aspergillosis, and pneumocystosis / A. Martinez, P. Aviles, E. Jimenez, J. Caballero, D. Gargallo-Viola // Antimicrob. Agents Chemother. – 2000. – Vol. 44, №12. – P. 3389-3394.
 224. Martos, A.I. Evaluation the Etest method for susceptibility testing of *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp. to three echinocandins / A.I. Martos, A. Romero, M.T. Gonzalez, C. Serrano, C. Castro, J. Pemán, E. Cantón, E. Martín-Mazuelos // Medical Mycology. – 2010. – Vol. 48, №6. – P. 858-861.
 225. Matsuda, H. Application of ubiquinone system and electrophoretic comparison of enzymes to identification of clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* and several other species of *Aspergillus* / H. Matsuda, S. Kohno, S. Maesaki, H. Yamada, H. Koga, M. Tamura, H. Kuraishi, J. Sugiyama // Journal of Clinical Microbiology. – 1992. – Vol. 30, №8. – P. 1999-2005.

226. Matsumoto, K. Successful treatment of *Aspergillus* peritonitis in a peritoneal dialysis patient / K. Matsumoto, H. Shiraga, K. Takahashi, K. Kikuchi, K. Ito // *Pediatr. Nephrol.* – 2002. – Vol. 17, №4. – P. 243-245.
227. MBT Filamentous Fungi Library [Electronic resource] / Bruker Daltonik. 2021. – Mode of access: <https://www.bruker.com/de/products-and-solutions/microbiology-and-diagnostics/microbial-identification/mbt-filamentous-fungi-library.html>
228. McAlpin, C.E. DNA-fingerprinting analysis of *Petromyces alliaceus* (*Aspergillus* section *Flavi*) / C.E. McAlpin, D.T. Wicklow // *Can. J. Microbiol.* – 2005. – Vol. 51, №12. – P. 1039-1044.
229. McClenny, N. Laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic observation and culture: the traditional approach / N. McClenny // *Medical Mycology.* – 2005. – Vol. 43, S1. – P. 125-128.
230. McGinnis, M.R. *Laboratory Handbook of Medical Mycology* / M.R. McGinnis. – London – New York: Elsevier, 2012. – 661 P.
231. Mellado, E. Substitutions at methionine 220 in the 14 α -sterol demethylase (Cyp51A) of *Aspergillus fumigatus* are responsible for resistance in vitro to azole antifungal drugs / E. Mellado, G. Garcia-Effron, L. Alcazar-Fuoli, M. Cuenca-Estrella, J.L. Rodriguez-Tudela // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2004. – Vol. 48, № 7. – P. 2747-2750.
232. Messer, S.A. Evaluation of disk diffusion and E-test compared to broth microdilution for antifungal susceptibility testing of posaconazole against clinical isolates of filamentous fungi / S.A. Messer, D.J. Diekema, R.J. Hollis, L.B. Boyken, S. Tendolkar, J. Kroeger, M.A. Pfaller // *Journal of Clinical Microbiology.* – 2007. – Vol. 45, №4. – P. 1322-1324.
233. Miao, Y. Genome-wide transcriptomic analysis of a superior biomass-degrading strain of *A. fumigatus* revealed active lignocellulose-degrading genes [Electronic resource] / Y. Miao, D. Liu, G. Li, P. Li, Y. Xu, Q. Shen, R. Zhang // *BMC Genomics.* – 2015. – Vol. 16, № 1. – Art. №: 459. – Mode of access: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-015-1658-2>.
234. Milstein, O.A. Lignin degrading ability of selected *Aspergillus* spp. / O.A. Milstein, A. Haars, A. Sharma, Y. Vered, L. Shragina, J. Trojanowski, H.M. Flowers, J. Gressel, A. Hüttermann // *Applied Biochemistry and Biotechnology.* – 1984. – Vol. 9, №4. – P. 393-394.
235. Mirchevska, G. *In Vitro* susceptibility testing of *Aspergillus* and non-*Aspergillus* filamentous moulds to antifungal agents: evaluation of three different methods / G. Mirchevska, P.P. Bosshard // *Macedonian Journal of Medical Sciences.* – 2012. – Vol. 15, №3. – P. 280-287.
236. Mirhendi, H. Identification of most important pathogenic *Aspergillus* species using

- conformational polymorphism of single stranded PSR / H. Mirhendi, M. Khoramizadeh, N. Jalalizand, K. Diba // The Journal of Urmia University of Medical Sciences. – 2009. – Vol. 20, №3. – P. 164-171.
237. Mirhendi, H. Typing of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus niger* strains by random amplification of polymorphic DNA analysis using a six primer set / H. Mirhendi, M. Moazeni, M. Nikaeen, K. Makimura // Shiraz E-Medical Journal. – 2009. – Vol. 10, №4. – P. 190-200.
238. Modi, D.A. Rapid identification of *Aspergillus terreus* from bronchoalveolar lavage fluid by PCR and electrospray ionization with mass spectrometry / D.A. Modi, J.J. Farrell, R. Sampath, N.S. Bhatia, C. Massire, R. Ranken, R.A. Bonomo // J. Clin. Microbiol. – 2012. – Vol. 50, №7. – P. 2529-2530.
239. Mohankumar, M. Analysis of molecular variability among isolates of *Aspergillus flavus* by PCR-RFLP of the its regions of rDNA / M. Mohankumar, A. Vijayasamundeeswari, M. Karthikeyan, S. Mathiyazhagan, V. Paranidharan, R. Velazhahan // Journal of Plant Protection Research. – 2010. – Vol. 50, Is. 4. – P. 446-451.
240. Monk, B.C. Architecture of a single membrane spanning cytochrome P450 suggests constraints that orient the catalytic domain relative to a bilayer / B.C. Monk, T.M. Tomasiak, M.V. Keniya F.U. Huschmann, J.D.A. Tyndall, J.D. O'Connell 3rd, R.D. Cannon, J.G. McDonald, A. Rodriguez, J.S. Finer-Moore, R.M. Stroud // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2014. – Vol. 111, №10. – P. 3865-3870.
241. Montenegro, G. Phenotypic and genotypic characterization of *Aspergillus lentulus* and *Aspergillus fumigatus* isolates in a patient with probable invasive aspergillosis / G. Montenegro, S.P. Sanchez, V.M. Jewtuchowicz, M.V. Pinoni, S. Relloso, E. Temporitti, C.A. Iovannitti, M.T. Mujica // Journal of Medical Microbiology. – 2009. – Vol. 58, №3. – P. 391-395.
242. Moonis, M. Liposomal hamycin in the control of experimental aspergillosis in mice: relative toxicity, therapeutic efficacy and tissue distribution of free and liposomal hamycin / M. Moonis, I. Ahmad, B.K. Bachhawat // Indian Journal of Biochemistry & Biophysics. – 1992. – Vol. 29, Is. 4. – P. 339-345.
243. Moubasher, A.H. *Aspergillus assiutensis*, a new species from the air of grapevine plantation, Egypt / A.H. Moubasher, Z. Soliman // Journal of Basic & Applied Mycology. – 2011. – Vol. 2(1). – P. 83-90.
244. Mukherjee, S. Synthetic Liquid Penicillin Medium with Glycerine as the Sole Source of Carbon Atom / S. Mukherjee, B. Sarkhel // Nature. – 1956. – Vol. 157. – P. 440.
245. Mwenechanya, R. Sterol 14 α -demethylase mutation leads to amphotericin B resistance in *Leishmania mexicana* [Electronic resource] / R. Mwenechanya, J. Kovarova, N.J. Dickens,

- M. Mudaliar, P. Herzyk, I.M. Vincent, S.K. Weidt, K.E. Burgess, R.J.S. Burchmore, A.W. Pountain, T.K. Smith, D.J. Creek, D.-H. Kim, G.I. Lepesheva, M.P. Barrett // PLoS Neglected Tropical Diseases. – 2017. – Vol. 11. – Mode of access: <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0005649>
246. Nakamura, S. Ribosomal subunit protein typing using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for the identification and discrimination of *Aspergillus* species [Electronic resource] / S. Nakamura, H. Sato, R. Tanaka, Y. Kusuya, H. Takahashi, T. Yaguchi // BMC Microbiology. – 2017. – Vol. 17. – Mode of access: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-017-1009-3>
247. Negri, C.E. Cryptic and rare *Aspergillus* species in Brazil: prevalence in clinical samples and in vitro susceptibility to triazoles / C.E. Negri, S.S. Goncalves, H. Xafranski, M.D. Bergamasco, V.R. Aquino, P.T.O. Castro, A.L. Colombo // Journal of Clinical Microbiology. – 2014. – Vol. 52, №10. – P. 3633-3640.
248. Nierman, W.C. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus* / W.C. Nierman, A. Pain, M.J. Anderson, J.R. Wortman, H.S. Kim, J. Arroyo, M. Berriman, K. Abe, D.B. Archer, C. Bermejo, J. Bennett, P. Bowyer, D. Chen, M. Collins, R. Coulsen, R. Davies, P.S. Dyer, M. Farman, N. Fedorova, N. Fedorova, T.V. Feldblyum, R. Fischer, N. Fosker, A. Fraser, J.L. García, M.J. García, A. Goble, G.H. Goldman, K. Gomi, S. Griffith-Jones, R. Gwilliam, B. Haas, H. Haas, D. Harris, H. Horiuchi, J. Huang, S. Humphray, J. Jiménez, N. Keller, H. Khouri, K. Kitamoto, T. Kobayashi, S. Konzack, R. Kulkarni, T. Kumagai, A. Lafton, J.-P. Latgé, W. Li, A. Lord, C. Lu, W.H. Majoros, G.S. May, B.L. Miller, Y. Mohamoud, M. Molina, M. Monod, I. Mouyna, S. Mulligan, L. Murphy, S. O'Neil, I. Paulsen, M.A. Peñalva, M. Perte, C. Price, B.L. Pritchard, M.A. Quail, E. Rabinowitsch, N. Rawlins, M.-A. Rajandream, U. Reichard, H. Renauld, G.D. Robson, S. Rodriguez de Córdoba, J.M. Rodríguez-Peña, C.M. Ronning, S. Rutter, S.L. Salzberg, M. Sanchez, J.C. Sánchez-Ferrero, D. Saunders, K. Seeger, R. Squares, S. Squares, M. Takeuchi, F. Tekai, G. Turner, C.R. Vazquez de Aldana, J. Weidman, O. White, J. Woodward, J.-H. Yu, C. Fraser, J.E. Galagan, K. Asai, M. Machida, N. Hall, B. Barrell, D.W. Denning // Nature. – 2005. – Vol. 438, № 7071. – P. 1151-1156.
249. Nierman, W.C. What the *Aspergillus* genomes have told us? / W.C. Nierman, G. May, H.S. Kim, M.J. Anderson, D. Chen, D.W. Denning // Med. Mycol. – 2005. – Vol. 43, Suppl. 1. – P. S3-S5.
250. Noonim, P. Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from Thai coffee beans / P. Noonim, W. Mahakarnchanakul, J. Varga, J.C. Frisvad, R.A. Samson // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2008. – Vol. 58, Pt. 7. – P. 1727-1734.

251. Novey, H.S. Allergic bronchopulmonary aspergillosis caused by *Aspergillus ochraceus* / H.S. Novey, I.D. Wells // American Journal of Clinical Pathology. – 1978. – Vol. 70, №5. – P. 840-843.
252. Nucci, M. How we treat invasive fungal diseases in patients with acute leukemia: the importance of an individualized approach / M. Nucci, E. Anaissie // Blood. – 2014. – Vol. 124, Is. 26. – P. 3858-3869.
253. O'Shaughnessy, E.M. Amphotericine B: a polyene resistance mechanisms / E.M. O'Shaughnessy, C.A. Lyman, T.J. Walsh // Antimicrobial Drug Resistance: Mechanisms of Drug Resistance / Ed. by Mayers D. – Springer Science & Business Media, 2009. – Vol. 1, Chapter 25. – P. 295-305.
254. Oliver, P.T.P. Conidiophore and spore development in *Aspergillus nidulans* / P.T.P. Oliver // Journal of General Microbiology. – 1972. – Vol. 73. – P. 45-54.
255. Ozhak-Baysan, B. *Aspergillus alliaceus* and *Aspergillus flavus* co-infection in acute myeloid leukemia patient / B. Ozhak-Baysan, A. Alastruey-Izquierdo, R. Saba, D. Ogunc, G. Ongut, A. Timuragaoglu, G. Arslan, M. Cuenca-Estrella, J.L. Rodriguez-Tudela // Medical Mycology. – 2010. – Vol. 48, №7. – P. 995-996.
256. Palencia, E.R. Use of a rep-PCR system to predict species in the *Aspergillus* section *Nigri* / E.R. Palencia, M.A. Klich, A.E. Glenn, C.W. Bacon // Journal of Microbiological Methods. – 2009. – Vol. 79, №1. – P. 1-7.
257. Paludetti, G. Invasive nasosinus aspergillosis in an immunocompetent patient / G. Paludetti, M. Rosignoli, E. Ferri, M.R. Cesari, G. Morace, M. Fantoni, J. Galli // Acta Otorhinolaryngol. Ital. – 1992. – Vol. 12, №6. – P. 581-591.
258. Panackal, A.A. *Aspergillus ustus* infections among transplant recipients / A.A. Panackal, A. Imhof, E.W. Hanley, K.A. Marr // Emerging Infectious Diseases. – 2006. – Vol. 12, №3. – P. 403-408.
259. Paris, S. Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus* / S. Paris, J.P. Debeaupuis, R. Cramer, M. Carey, F. Charlès, M.C. Prévost, C. Schmitt, B. Philippe, J.P. Latgé // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – Vol. 69, №3. – P. 1581-1588.
260. Paul, R.A. A novel Y319H substitution in CYP51C associated with azole resistance in *Aspergillus flavus* / R.A. Paul, S.M. Rudramurthy, J.F. Meis, J.W. Mouton, A. Chakrabarti // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2015. – Vol. 59, №10. – P. 6615-6619.
261. Pavie, J. Breakthrough disseminated *Aspergillus ustus* infection in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients receiving voriconazole or caspofungin prophylaxis / J. Pavie, C. Lacroix, D.G. Hermoso, M. Robin, C. Ferry, A. Bergeron, M.

- Feuilhade, F. Dromer, E. Gl., J.-M. Molina, P. Ribaud // Journal of Clinical Microbiology. – 2005. – Vol. 43, №9. – P. 4902-4904.
262. Pelaez, T. Invasive aspergillosis caused by cryptic *Aspergillus* species: a report of two consecutive episodes in a patient with leukaemia / T. Pelaez, S. Alvarez-Perez, E. Mellado, D. Serrano, M. Valerio, J.L. Blanco, M.E. Garcia, P. Muñoz, M. Cuenca-Estrella, E. Bouza // Journal of Medical Microbiology. – 2013. – Vol. 62, Pt 3. – P. 474-478.
263. Pelaez, T. Resistance to voriconazole due to a G448S substitution in *Aspergillus fumigatus* in a patient with cerebral aspergillosis / T. Pelaez, P. Gijon, E. Bunsow, E. Bouza, W. Sánchez-Yebra, M. Valerio, B. Gama, M. Cuenca-Estrella, E. Melladod // J. Clin. Microbiol. – 2012. – Vol. 50, №7. – P. 2531-2534.
264. Pennington, S.R. Proteomics: From Protein Sequence to Function / S.R. Pennington, M.J. Dunn – Garland Science, 2001. – 313 P.
265. Perrone, G. *Aspergillus aculeatinus* (new species) in chronic human dacryocystitis: the first report on its pathogenic role / G. Perrone, F. Epifani, K. Rambukwelle, H. Wijedasa, S. Arseculeratne // J. Infect. Dis. Antimicrob. Agents. – 2011. – №29. – P. 89-97.
266. Perrone, G. *Aspergillus fijiensis* n. sp. isolated from bronchial washings in human case of bronchiectasis with invasive aspergillosis: the first report [Electronic resource] / G. Perrone, G. Stea, C.N. Kulathunga, H. Wijedasa, S.N. Arseculeratne // Microbiology Discovery. – 2013. – Vol. 1. – Mode of access: <http://dx.doi.org/10.7243/2052-6180-1-9>.
267. Peterson, S.W. *Aspergillus* and *Penicillium* identification using DNA sequences: barcode or MLST? / S.W. Peterson // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2012. – Vol. 95, №2. – P. 339-344.
268. Peterson, S.W. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci / S.W. Peterson // Mycologia. – 2008. – Vol. 100, №2. – P. 205-226.
269. Petti, C.A. MM18-A. Interpretive Criteria for Identification of Bacteria and Fungi by DNA Target Sequencing; Approved Guideline / C.A. Petti, P.P. Bosshard, M.E. Brandt, J.E. Clarridge, T.V. Feldblyum, P. Foxall, M.R. Furtado, N. Pace, G. Procop // Clinical and Laboratory Standards Institute. – 2010. – Vol. 28, №12. – 71 P.
270. Pfaller, J.B. *In vitro* susceptibility testing of *Aspergillus* spp.: comparison of Etest and reference microdilution methods for determining voriconazole and itraconazole MICs / J.B. Pfaller, S.A. Messer, R.J. Hollis, D.J. Diekema, M.A. Pfaller // J. Clin. Microbiol. – 2003. – Vol. 41, №3. – P. 1126-1129.
271. Phaller, M. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends / M. Phaller, P.G. Pappas, J.R. Wingard // Clinical Infectious Diseases. – 2006. – Vol. 43, Suppl. 1. – P. S3-S14.
272. Piechura, J.E. Antigens of *Aspergillus fumigatus*. II. Electrophoretic and clinical

- studies / J.E. Piechura, C.J. Huang, S.H. Cohen, J.M. Kidd, V.P. Kurup, N.J. Calvanico // Immunology. – 1983. – Vol. 49, №4. – P. 657-665.
273. Pihet, M. Melanin is an essential component for the integrity of the cell wall of *Aspergillus fumigatus* conidia [Electronic resource] / M. Pihet, P. Vandeputte, G. Tronchin, G. Renier, P. Saulnier, S. Georgeault, R. Mallet, D. Chabasse, F. Symoens, J.-P. Bouchara // BMC Microbiol. – 2009. – Vol. 9. – Mode of access: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-9-177>.
274. Polacheck, I. *Aspergillus quadrilineatus*, a new causative agent of fungal sinusitis / I. Polacheck, A. Nagler, E. Okon, P. Drakos, J. Plaskowitz, K.J. Kwon-Chung // Journal of Clinical Microbiology. – 1992. – Vol. 30, №12. – P. 3290-3293.
275. Pore, R.S. Experimental pathology of *Aspergillus terreus-flavipes* group species / R.S. Pore, H.W. Larsh // Sabouraudia. – 1968. – Vol. 6, №2. – P. 89-93.
276. Posteraro, B. Uncommon *Neosartorya udagawae* fungus as a causative agent of severe corneal infection / B. Posteraro, R. Mattei, F. Trivella, A. Maffei, A. Torre, E. De Carolis, P. Posteraro, G. Fadda, M. Sanguinetti // Journal of Clinical Microbiology. – 2011. – Vol. 49, Is. 6. – P. 2357-2360.
277. Puente, P. Analysis of *Aspergillus nidulans* conidial antigens and their prevalence in other *Aspergillus* species / P. Puente, M.C. Ovejero, N. Fernandez, F. Leal // Infect. Immu. – 1991. – Vol. 59, №12. – P. 4478-4485.
278. Purkait, B. Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani* / B. Purkait, A. Kumar, N. Nandi, A.H. Sardar, S. Das, S. Kumar, K. Pandey, V.a Ravidas, M. Kumar, T. De, D. Singh, P. Das // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2012. – Vol. 56, №2. – P. 1031-1041.
279. Queval, R. Reptin and Pontin oligomerization and activity are modulated through histone H3 N-terminal tail interaction / R. Queval, C. Papin, M. Dalvai, K. Bystricky, O. Humbert // J. Biol. Chem. – 2014. – Vol. 289, №49. – P. 33999-34012.
280. Raclasky, V. Primer R108 performs best in the RAPD strain typing of three *Aspergillus* species frequently isolated from patients / V. Raclasky, J. Trtkova, L. Ruskova, V. Buchta, R. Bolehovská, M. Vacková, P. Hamal // Folia Microbiologica. – 2006. – Vol. 51, №2. – P. 136-140.
281. Radha, T.G. Allergic bronchopulmonary aspergillosis / T.G. Radha, R. Viswanathan // Respiration. – 1978. – Vol. 36, №2. – P. 104-111.
282. Rajendran, R. Azole resistance of *Aspergillus fumigatus* biofilms is partly associated with efflux pump activity / R. Rajendran, E. Mowat, E. McCulloch, D.F. Lappin, B. Jones, S. Lang, J.B. Majithiya, P. Warn, C. Williams, G. Ramage // Atimicrob. Agents Chemother. –

2011. – Vol. 55, №5. – P. 2092-2097.
283. Ranque, S. MALDI-TOF mass spectrometry identification of filamentous fungi in the clinical laboratory / S. Ranque, A.C. Normand, C. Cassagne, J.-B. Murat, N. Bourgeois, F. Dalle, M. Gari-Toussaint, P. Fourquet, M. Hendrickx, R. Piarroux // *Mycoses*. – 2013. – Vol. 57, №3. – P. 135-140.
 284. Raper, K.B. The genus *Aspergillus* / K.B. Raper, D.I. Fennell. – Baltimore: Williams, Wilkins Co., USA, 1965. – 686 P.
 285. Reverchon, S. Characterization of indigoidine biosynthetic genes in *Erwinia chrysanthemi* and role of this blue pigment in pathogenicity / S. Reverchon, C. Rouanet, D. Expert, W. Nasser // *J. Bacteriol.* – 2002. – Vol. 184, Is. 3. – P. 654-665.
 286. Robinson, W.F. Systemic mycosis due to *Aspergillus deflexus* in a dog / W.F. Robinson, M.D. Connole, T.J. King, J.I. Pitt, S.M. Moss // *Aust. Vet. J.* – 2000. – Vol. 78, №9. – P. 600-602.
 287. Rocha, E.M.F. A Ser678Pro substitution in Fks1p confers resistance to echinocandin drugs in *Aspergillus fumigatus* / E.M.F. Rocha, G. Garcia-Effron, S. Park, D.S. Perlin // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2007. – Vol. 51, №11. – P. 4174-4176.
 288. Rodrigues-Tudela, J.L. EUCAST definitive document E.DEF 9.1: Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds / J.L. Rodriguez-Tudela, M.C. Arendrup, S. Arikan, F. Barchiesi, J. Bille, E. Chryssanthou, M. Cuenca-Estrella, E. Dannaoui, D.W. Denning, J.P. Donnelly, W. Fegeler, C. Lass-Flörl, C. Moore, M. Richardson, P. Gaustad, A. Schmalreck, A. Velegraki, P. Verweij – EUCAST, 2008. – 13 P.
 289. Rodriguez-Tudela, J.L. Epidemiological cutoffs and cross-resistance to azole drugs in *Aspergillus fumigatus* / J.L. Rodriguez-Tudela, L. Alcazar-Fuoli, E. Mellado, A. Alastruey-Izquierdo, A. Monzon, M. Cuenca-Estrella // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2008. – Vol. 52, № 7. – P. 2468-2472.
 290. Roselle, G.A. *Aspergillus flavipes* group osteomyelitis / G.A. Roselle, I.M. Baird // *Arch. Intern. Med.* – 1979. – Vol. 139, №5. – P. 590-592.
 291. Roussel, S. Comparison of three antigenic extracts of *Eurotium amstelodami* in serological diagnosis of farmer's lung disease / S. Roussel, G. Reboux, B. Rognon, M. Monod, F. Grenouillet, M. Quadroni, J.-M. Fellrath, J.-D. Aubert, J.-C. Dalphin, L. Millon // *Clinical and Vaccine Immunology*. – 2009. – Vol. 17, №1. – P. 160-167.
 292. Rudramurthy, S.M. High resolution genotyping of clinical *Aspergillus flavus* isolates from India using microsatellites [Electronic resource] / S.M. Rudramurthy, H.A. de Valk, A. Chakrabarti, J.F.G.M. Meis, C.H.W. Klaassen // *PLOS one*. – 2011. – Vol. 6, Is. 1. – Mode of

access: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.001608>

293. Ruping, M.J. Patients at high risk of invasive fungal infections: when and how to treat / M.J. Ruping, J.J. Vehreschild, O.A. Cornely // *Drugs*. – 2008. – Vol. 68, №14. – P. 1941-1962.
294. Rypien, K.L. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Aspergillus sydowii*, a pathogen of Caribbean sea fan corals / K.L. Rypien, J.P. Andras // *Molecular Ecology Resources*. – 2008. – Vol. 8, №1. – P. 230-232.
295. Ryzhov V. Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells / V. Ryzhov, C. Fenselau // *Anal. Chem.* – 2001. – Vol. 73, Is. 4. – P. 746-750.
296. Sacho, H. Infection of the human orbit by *Aspergillus stromatoides* / H. Sacho, K.J. Stead, K.P. Klugman, Z. Lawrence // *Mycopathologia*. – 1987. – №97. – P. 97-99.
297. Samson, R.A. *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics* / R.A. Samson, J.I. Pitt. – New York: Plenum Press, 1986. – 483 P.
298. Samson, R.A. *Aspergillus systematics in the genomic era* / R.A. Samson, J. Varga. – Utrecht: CBS Fungal Biodiversity Centre, 2007. – 206 P.
299. Samson, R.A. Diagnostic tools to identify black *aspergilli* / R.A. Samson, P. Noonim, M. Meijer, J. Houbaken, J.C. Frisvad, J. Varga // *Studies in Mycology*. – 2007. – Vol. 59. – P. 129-145.
300. Samson, R.A. Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification / R.A. Samson, J.I. Pitt. – Amsterdam: CRS Press, 2000. – 524 P.
301. Samson, R.A. Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification / R.A. Samson, J.I. Pitt. – New York: Plenum Press, 1990. – 478 P.
302. Samson, R.A. New species in *Aspergillus* section *Terrei* / R.A. Samson, S.W. Peterson, J.C. Frisvad, J. Varga // *Studies in Mycology*. – 2011. – Vol. 69. – P. 39-55.
303. Samson, R.A. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus* / R.A. Samson, C.M. Visagie, J. Houbaken, S.-B. Hong, V. Hubka, C.H.W. Klaassen, G. Perrone, K.A. Seifert, A. Susca, J.B. Tanney, J. Varga, S. Kocsubé, G. Szigeti, T. Yaguchi, J.C. Frisvad // *Studies in Mycology*. – 2014. – Vol. 78. – P. 141-173.
304. Samson, R.A. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya* / R.A. Samson, S. Hong, S.W. Peterson, J.C. Frisvad, J. Varga // *Studies in Mycology*. – 2007. – Vol. 59. – P. 147-203.
305. Sato, Y. A case of primary cutaneous *Aspergillus calidoustus* infection caused by nerve block therapy / Y. Sato, K. Suzino, A. Suzuki, N. Fukasawa, Y. Ouchi, T. Yaguchi, T. Sato // *Medical Mycology Journal*. – 2011. – Vol. 52, №3. – P. 239-244.
306. Schmidt, H. Molecular typing of *Aspergillus ochraceus* and construction of species specific SCAR-primers based on AFLP / H. Schmidt, M. Ehrmann, R.F. Vogel, M.H. Taniwaki,

- L. Niessen // Systematic and Applied Microbiology. – 2003. – Vol. 26, Is. 1. – P. 138-146.
307. Schwetz, I. *Aspergillus oryzae* peritonitis in CAPD: case report and review of the literature / I. Schwetz, J. Horina, W. Buzina, J. Roob, H. Olschewski, R. Krause // Am. J. Kidney Dis. – 2007. – Vol. 49, №5. – P. 701-704.
 308. Selwood, T. Dynamic dissociating homo-oligomers and the control of protein function / T. Selwood, E.K. Jaffe // Arch. Biochem. Biophys. – 2012. – Vol. 519, Is. 2. – P. 131-143.
 309. Semidhini, C.P. New restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers for *Aspergillus fumigatus* / C.P. Semidhini, G. Delmas, S. Park, D. Armstrong, D. Perlin, G.H. Goldman // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 2001. – Vol. 31, №1. – P. 15-19.
 310. Serrano, R. Rapid identification of *Aspergillus fumigatus* within the section *Fumigati* [Electronic resource] / R. Serrano, L. Gusmao, A. Amorim, R. Araujo // BMC Microbiology. – 2011. – Vol. 11. – Mode of access: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-11-82>.
 311. Shah, A.A. Diagnostic accuracy of histopathologic and cytopathologic examination of *Aspergillus* species / A.A. Shah, K.C. Hazen // Am. J. Clin. Pathol. – 2013. – Vol. 139, Is. 1. – P. 55-61.
 312. Sharma, D. A rare case of onychomycosis caused by *Emericella quadrilineata* (*Aspergillus tetrazonus*) / D. Sharma, M.R. Capoor, V. Ramesh, S. Gupta, M.R. Shivaprakash, A. Chakrabarti // Indian Journal of Medical Microbiology. – 2015. – Vol. 33, Is. 2. – P. 314-316.
 313. Sharma, S. Primary cutaneous aspergillosis due to *Aspergillus tamaraii* in a immunocompetent host [Electronic resource] / S. Sharma, B.M. Yenigalla, S.K. Naidu, P. Pidakala // BMJ Case Reports. – 2013. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23970496>
 314. Shigeyasu, C. Keratomycosis caused by *Aspergillus viridinutans*: an *Aspergillus fumigatus*-resembling mold presenting distinct clinical and antifungal susceptibility patterns / C. Shigeyasu, M. Yamada, N. Nakamura, Y. Mizuno, T. Sato, T. Yaguchi // Medical Mycology. – 2012. – Vol. 50, №5. – P. 525-528.
 315. Shin, J.H. Detection, identification and distribution of fungi in bronchoalveolar lavage specimens by use of multilocus PCR coupled with electrospray ionization/mass spectrometry / J.H. Shin, R. Ranken, S.E. Sefers, R. Lovari, C.D. Quinn, S. Meng, H.E. Carolan, D. Toleno, H. Li, J.N. Lee, C.W. Stratton, C. Massire, Y.-W. Tang // Journal of Clinical Microbiology. – 2013. – Vol. 51, №1. – P. 1136-1141.
 316. Simonovicova, A. Influence of the environment on the morphological and biochemical characteristics of different *Aspergillus niger* wild type strains / A. Simonovicova, E. Hlinkova,

- K. Chovanova, D. Pangallo // Indian J. Microbiol. – 2013. – Vol. 53, №2. – P. 187-193.
317. Smith, W.M. A rare case of endogenous *Aspergillus conicus* endophthalmitis in an immunocompromised patient [Electronic resource] / W.M. Smith, G. Fahle, R.B. Nussenblatt, H.N. Sen // J. Ophthalmic Inflamm. Infect. – 2013. – Vol. 3. – Mode of access: <http://joii-journal.springeropen.com/articles/10.1186/1869-5760-3-37>.
 318. Soares, C. Three new species of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from almonds and maize in Portugal / C. Soares, P. Rodrigues, S.W. Peterson, N. Lima, A. Venâncio // Mycologia. – 2012. – Vol. 104, №3. – P. 682-697.
 319. Sohn, K.T. Ultrastructural study on the cleistothecium development in *Aspergillus nidulans* / K.T. Sohn, K.S. Yoon // Mycobiology. – 2002. – Vol. 30, Is. 3. – P. 117-127.
 320. Suarez, S. Ribosomal proteins as biomarkers for bacterial identification by mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory / S. Suarez, A. Ferroni, A. Lotz, K.A. Jolley, P. Guérin, J. Leto, B. Dauphin, A. Jamet, M.C.J Maiden, X. Nassif, J. Armengaud // J. Microbiol. Methods. – 2013. – Vol. 94, №3. – P. 390-396.
 321. Sugita, C. PCR identification system for the genus *Aspergillus* and three major pathogenic species: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* / C. Sugita, K. Makimura, K. Uchida, H. Yamaguchi, A. Nagai // Medical Mycology. – 2004. – Vol. 42, Is. 5. – P. 433-437.
 322. Sugui, J.A. *Aspergillus tanneri* sp. nov., a new pathogen that causes invasive disease refractory to antifungal therapy / J.A. Sugui, S.W. Peterson, L.P. Clark, G. Nardone, L. Folio, G. Riedlinger, C.S. Zerbe, Y. Shea, C.M. Henderson, A.M. Zelazny, S.M. Holland, K.J. Kwon-Chung // Journal of Clinical Microbiology. – 2012. – Vol. 50, №10. – P. 3309-3317.
 323. Sugui, J.A. Genetic relatedness versus biological compatibility between *Aspergillus fumigatus* and related species / J.A. Sugui, S.W. Peterson, A. Figat, B. Hansen, R.A. Samson, E. Mellado, M. Cuenca-Estrella, K.J Kwon-Chung // Journal of Clinical Microbiology. – 2014. – Vol. 52, №10. – P. 3707-3721.
 324. Summerbell, R.C. Graft-related endocarditis caused by *Neosartorya fischeri* var. *spinosa* / R.C. Summerbell, L. de Repentigny, C. Chartrand, G. St. Germain // Journal of Clinical Microbiology. – 1992. – Vol. 30, №6. – P. 1580-1582.
 325. Sutton, D.A. Cerebral aspergillosis caused by *Aspergillus granulosis* / D.A. Sutton, B.L. Wickes, A.M. Romanelli, M.G. Rinaldi, E.H. Thompson, A.W. Fothergill, M.K. Dishop, O. Elidemir, G.B. Mallory, S.P. Moonnamakal, A.M. Adesina, M.G. Schechter // Journal of Clinical Microbiology. – 2009. – Vol. 47, №10. – P. 3386-3390.
 326. Symoens, F. Molecular typing of *Aspergillus terreus* isolates by random amplification of polymorphic DNA / F. Symoens, J.P. Bouchara, S. Heinemann, N. Nolard // J. Hosp. Infect. –

2000. – Vol. 44, №4. – P. 273-280.
327. Symoens, F. Unusual *Aspergillus* species in patients with cystic fibrosis / F. Symoens, G. Haase, M. Pihet, J. Carrere, H. Beguin, N. Degand, L. Mely, J.-P. Bouchara // Medical Mycology. – 2010. – Vol. 48, Suppl. 1. – P. S10-S16.
 328. Szigeti, G. Species assignment and antifungal susceptibility of black *aspergilli* recovered from otomycosis cases in Iran / G. Szigeti, E. Sedaghati, A.Z. Mahmoudabadi, A. Naseri, S. Kocsubé, C. Vágvölgyi, J. Varga // Mycoses. – 2012. – Vol. 55, Is. 4. – P. 333-338.
 329. Tam, E.W.T. Misidentification of *Aspergillus nomius* and *Aspergillus tamaris* as *Aspergillus flavus*: characterization by internal transcribed spacer, β -tubulin, and calmodulin gene sequencing, metabolic fingerprinting, and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry / E.W.T. Tam, J.H.K. Chen, E.C.L. Lau, A.H.Y. Ngan, K.S.C. Fung, K.-C. Lee, C.-W. Lam, K.-Y. Yuen, S.K.P. Lau, P.C.Y. Woo // Journal of Clinical Microbiology. – 2014. – Vol. 52, №4. – P. 1153-1160.
 330. Tanaka, K. Change in ultrastructure of *Aspergillus oryzae* conidia during germination / K. Tanaka // J. Gen. Appl. Microbiol. – 1966. – Vol. 12, №3. – P. 239-246.
 331. Thapa, K. Molecular evolution of the bacterial pseudouridine-5'-phosphate glycosidase protein family / K. Thapa, T. Oja, M. Metsä-Ketelä // FEBS J. – 2014. – Vol. 281, Is. 19. – P. 4439-4449.
 332. Thom, C. A manual of the *Aspergilli* / C. Thom, K.B. Raper. – London: Bailliere Tindal, Cox, 1945. – 373 P.
 333. Thom, C. The *Aspergilli* / C. Thom, M.B. Church. – Baltimore: Williams, Wilkins, 1925. – 272 P.
 334. Thungapathra, M. Genetic typing of *Aspergillus flavus* isolates from allergic fungal rhinosinusitis (AFRS) cases in Northern India / M. Thungapathra, M. Sumit, M.R. Shivaprakash, K. Naresh Panda, A. Chakrabarty // The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology. – 2009. – Abstract № PP-02-3. – P. 311.
 335. Torres, A. Invasive Pulmonary Aspergillosis in Ventilator-associated Pneumonia: The Hidden Enemy? / A. Torres, I. Martin-Loeches // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2020. – Vol. 202, Is. 8. – P. 1071-1073.
 336. Tralamazza, S.M. Potential of Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) to differentiate environmental *Aspergillus* fungi species *A. niger*, *A. ochraceus* and *A. westerdijkiae* using two different methodologies / S.M. Tralamazza, A. Bozza, J.G. Destro, J.I. Rodríguez, P. do Rocio Dalzoto, I.C. Pimentel // Appl. Spectrosc. – 2013. – Vol. 67, №3. – P. 274-278.

337. van der Linden, J.W. Prospective multicenter international surveillance of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* / J.W. van der Linden, M.C. Arendrup, A. Warris, K. Lagrou, H. Pelloux, P.M. Hauser, E. Chryssanthou, E. Mellado, S.E. Kidd, A.M. Tortorano, E. Dannaoui, P. Gaustad, J.W. Baddley, A. Uekötter, C. Lass-Flörl, N. Klimko, C.B. Moore, D.W. Denning, A.C. Pasqualotto, C. Kibbler, S. Arikan-Akdogli, D. Andes, J. Meletiadis, L. Naumiuk, M. Nucci, W.J.G. Melchers, P.E. Verweij // *Emerging Infectious Diseases*. – 2015. – Vol. 21, №6. – P. 1041-1044.
338. van Diepeningen, A.D. Efficient degradation of tannic acid by black *Aspergillus* species / A.D. van Diepeningen, A.J. Debets, J. Varga, M. van der Gaag, K. Swart, R.F. Hoekstra // *Mycological Research*. – 2004. – Vol. 108, №8. – P. 919-925.
339. Vanhee, L.M. Comparison of multiple typing methods for *Aspergillus fumigatus* / L.M. Vanhee, F. Symoens, M.D. Jacobsen, H.J. Nelis, T. Coenye // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2008. – Vol. 15, Is. 7. – P. 643-650.
340. Varga, J. *Aspergillus* sect. *Aenei* sect. nov., a new section of the genus for *A. karnatakaensis* sp. nov. and some allied fungi / J. Varga, J.C. Frisvad, R.A. Samson // *IMA Fungus*. – 2010. – Vol. 1, №2. – P. 197-205.
341. Varga, J. Invasive infections attributed to *Aspergillus ustus* are caused by *A. calidoustus* sp. nov. [Electronic resource] / J. Varga, J. Houbraken, H. van der Lee, P.E. Verweij, R.A. Samson // 3rd Advances Against Aspergillosis. – 2010. – Abstract №132. – Mode of access: <http://www.aspergillus.org.uk/content/invasive-infections-attributed-aspergillus-ustus-are-caused-calidoustus-sp-nov>
342. Varga, J. Molecular typing of *aspergilli*: recent developments and outcomes / J. Varga // *Medical Mycology*. – 2006. – Vol. 44., Suppl. – P. 149-161.
343. Varga, J. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri* / J. Varga, J.C. Frisvad, S. Kocsube, B. Brankovics, B. Tóth, G. Szigeti, R.A. Samson // *Studies in Mycology*. – 2011. – Vol. 69. – P. 1-17.
344. Varga, J. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Candidi* based on molecular, morphological and physiological data / J. Varga, J.C. Frisvad, R.A. Samson // *Studies in Mycology*. – 2007. – Vol. 59. – P. 75-88.
345. Varga, J. Taxonomic revision of *Aspergillus* section *Clavati* based on molecular, morphological and physiological data / J. Varga, M. Due, J.C. Frisvad, R.A. Samson // *Studies in Mycology*. – 2007. – Vol. 59. – P. 89-106.
346. Varga, J. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi* / J. Varga, J.C. Frisvad, R.A. Samson // *Studies in Mycology*. – 2011. – Vol. 69(1). – P. 57-80.

347. Vermeulen, E. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* due to TR46/Y121F/T289 mutation emerging in Belgium, July 2012 [Electronic resource] / E. Vermeulen, J. Maertens, H. Schoemans, K. Lagrou // Eurosurveillance. – 2012. – Vol. 17, Is. 48. – Mode of access: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20326>.
348. Verweij, P.E. *Emericella quadrilineata* as cause of invasive aspergillosis / P.E. Verweij, J. Varga, J. Houbraken, A.J.M.M. Rijs, F.M. Verduyn Lunel, N.M.A. Blijlevens, Y.R. Shea, S.M. Holland, A. Warris, W.J.G. Melchers, R.A. Samson // Emerg. Infect. Dis. – 2008. – Vol. 14, №4. – P. 566-572.
349. Verweij, P.E. Invasive aspergillosis caused by *Aspergillus ustus*: case report and review / P.E. Verweij, M.F. van den Bergh, P.M. Rath, B.E. de Pauw, A. Voss, J.F.G.M. Meis // Journal of Clinical Microbiology. – 1999. – Vol. 37, №5. – P. 1606-1690.
350. Vinh, D.C. Chronic invasive aspergillosis caused by *Aspergillus viridinutans* / D.C. Vinh, Y.R. Shea, P.A. Jones, A.F. Freeman, A. Zelazny, S.M. Holland // Emerg. Infect. Dis. – 2009. – Vol. 15, №8. – P. 1292-1294.
351. Vinh, D.C. Invasive aspergillosis due to *Neosartorya udagawae* / D.C. Vinh, Y.R. Shea, J.A. Sugui, E.R. Parrilla-Castellar, A.F. Freeman, J.W. Campbell, S. Pittaluga, P.A. Jones, A. Zelazny, D. Kleiner, K.J. Kwon-Chung, S.M. Holland // Clin. Infect. Dis. – 2009. – Vol. 49, Is. 1. – P. 102-111.
352. Visagie, C.M. Ochratoxin production and taxonomy of the yellow *aspergilli* (*Aspergillus* section *Circumdati*) / C.M. Visagie, J. Varga, J. Houbraken, M. Meijer, S. Kocsubé, N. Yilmaz, R. Fotedar, K.A. Seifert, J.C. Frisvad, R.A. Samson // Studies in Mycology. – 2014. – Vol. 78. – P. 1-61.
353. Waldeck, F. Influenza-associated aspergillosis in critically-ill patients – a retrospective bicentric cohort study / F. Waldeck, F. Boroli, N. Suh, P.D.W. Garcia, D. Flury, J. Notter, A. Iten, L. Kaiser, J. Schrenzel, K. Boggian, M. Maggiorini, J. Pugin, G.-R. Kleger, W.C. Albrich // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2020. – Vol. 39, № 10. – P. 1915-1923.
354. Walker, L.A. Fungal echinocandin resistance / L.A. Walker, N.A.R. Gow, C.A. Munro // Fungal Genetics and Biology. – 2010. – Vol. 47, Is. 2. – P. 117-126.
355. Walsh, T.J. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the infectious diseases society of America / T.J. Walsh, E.J. Anaissie, D.W. Denning, R. Herbrecht, D.P. Kontoyiannis, K.A. Marr, V.A. Morrison, B.H. Segal, W.J. Steinbach, D.A. Stevens, J.-A. van Burik, J.R. Wingard, T.F. Patterson, Infectious Diseases Society of America // Clinical Infectious Diseases. – 2008 – Vol. 46., Is. 3. – P. 327-360.
356. Wang, L. Mitochondrial cytochrome b gene analysis of *Aspergillus fumigatus* and related species / L. Wang, K. Yokoyama, M. Miyaji, K. Nishimura // Journal of Clinical

- Microbiology. – 2000. – Vol. 38, №4. – P. 1352-1358.
357. Warrilow, A. Expression, purification, and characterization of *Aspergillus fumigatus* sterol 14- demethylase (CYP51) isoenzymes A and B / A. Warrilow, N. Melo, C.M. Martel, J.E. Parker, W.D. Nes, S.L. Kelly, D.E. Kelly // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2010. – Vol. 54, №10. – P. 4225-4234.
 358. Wicklow, D.T. Diversity of *Aspergillus oryzae* genotypes (RFLP) isolated from traditional soy sauce production within Malaysia and Southeast Asia / D.T. Wicklow, C.E. McAlpin, Q.L. Yeoh // Mycoscience. – 2007. – Vol. 48, Is. 6. – P. 373-380.
 359. Wierzbicka, M. Invasive pulmonary aspergillosis caused by *Aspergillus ochraceus* / M. Wierzbicka, B. Podsiadlo, M. Janczarski // Pneumonologia i Allergologia Polska. – 1997. – Vol. 65, № 3-4. – P. 254-260.
 360. Wilson, D.M. Biology and ecology of mycotoxigenic *Aspergillus* species as related to economic and health concerns / D.M. Wilson, W. Mubatanhema, Z. Jurjevic // Mycotoxins. – 2002. – Vol. 504. – P. 3-17.
 361. Zaias, N. Fungi in Toe Nails / N. Zaias, I. Oertel, D. Elliott // The Journal of Investigative Dermatology. – 1969. – №53. – P. 140-142.
 362. Zarei, F. The first case of onychomycosis due to *Aspergillus uvarum* (section *Nigri*) / F. Zarei, H. Mirhendi, H. Fakhim, M. Geramishoar // Mycoses. – 2015. – Vol. 58, Is. 4. – P. 239-242.
 363. Zbinden, A. Fatal outcome after heart transplantation caused by *Aspergillus lentulus* / A. Zbinden, A. Imhof, M.J. Wilhelm, F. Ruschitzka, P. Wild, G.V. Bloemberg, N.J. Mueller // Transplant Infectious Disease. – 2012. – Vol. 14, Is. 5. – P. 60-63.
 364. Zotti, M. Different species of *Aspergillus* involved in ungual pathologies / M. Zotti, M. Machetti, A. Persi, A. Parodi // J. Biol. Res. – 2011. – Vol. 84, №1. – P. 171-171.
 365. Zotti, M. Onychomycosis: first case due to *Aspergillus nomius* / M. Zotti, M. Machetti, A. Persi, G. Barabino, A. Parodi // Acta Derm. Venereol. – 2011. – Vol. 91, №5. – P. 591-592.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарит руководителя темы профессора Васильеву Наталью Всеволодовну за сопровождение работы на всех этапах; сотрудников кафедры медицинской микробиологии СЗГМУ им. И.И. Мечникова доцента Богомолу Татьяну Сергеевну, ассистента Пинегину Ольгу Николаевну, заведующую Российской коллекцией патогенных грибов Чилину Галину Анастасьевну, сотрудников отделения лабораторной диагностики микологической клиники Шурпицкую Ольгу Александровну, Суханову Юлию Александровну, Ремневу Надежду Прокофьевну, Кашуба Валентину Михайловну, Цветкову Галину Васильевну за переданные ими культуры *Aspergillus* spp. и других микроорганизмов, использованных в исследовании; научных сотрудников НИЛ молекулярно-генетической микробиологии Михайлову Юлию Владимировну и Рудневу Марию Викторовну за предоставление данных таргетного ДНК-секвенирования; доцента кафедры медицинской микробиологии Борзову Юлию Владимировну, доцента кафедры клинической микологии, иммунологии и аллергологии Шадривову Ольгу Витальевну, врача-аллерголога микологической клиники Десятник Екатерину Александровну за предоставление клинической информации об изолятах *Aspergillus* spp., студента Расулову Сабину Сиражутдиновну за помощь в работе с *Aspergillus wentii*.

Автор признателен коллективам НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина и кафедры медицинской микробиологии СЗГМУ им. И.И. Мечникова за ценные рекомендации при работе над темой, а также ООО НПФ «Литех» за возможность работы с масс-спектрометром *LaserToF* LT2Plus и программным обеспечением *BactoSCREEN*.