

МРНТИ 34.27.29: 34.15.17

<https://doi.org/10.26577/eb.2022.v90.i1.10>**Е.В. Кухар*** , **В.С. Киян** 

Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина, Казахстан, г. Нур-Султан

*e-mail: kucharev@mail.ru

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АНАМОРФЫ И ТЕЛЕОМОРФЫ ВОЗБУДИТЕЛЯ ИНТЕРДИГИТАЛЬНОЙ ТРИХОФИТИИ ЧЕЛОВЕКА

В статье представлены результаты выделения антропофильных штаммов дерматомицетов и анализа их биологических свойств: культуральных, морфологических, биохимических. Проведена фенотипическая и генетическая идентификация штаммов. Установлено, что штамм гриба *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* №5, выделенный из кожи и пораженного ногтя пациента, отличался полиморфизмом культуральных признаков и разнообразием морфологических микроструктур. Штамм гриба *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* №9, выделенный с кожи очага поражения межпальцевой складки ног, имел более стабильные культурально-морфологические признаки. Анализ биохимических свойств позволил выявить наличие сахаролитической и уреазной активности.

При первичном выделении культуры антропофильные штаммы фенотипически достоверно являлись штаммами *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*. Длительное хранение культур методом субкультивирования привело к появлению морфологически разнородных колоний штаммов, что выражалось в появлении выраженной морщинистости, заметных радиальных борозд и зональных колец, мощного ветвления в субстрат и его разрывов, изменения цвета колонии, смены пигментации реверзума.

В результате молекулярно-генетической идентификации штамма методом анализа ITS региона в BLAST, выявлено, что культуры являются телеоморфой дерматомицета *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, известной как *Arthroderma vanbreuseghemii* со 100%-ной достоверностью.

Ключевые слова: анаморфа, телеоморфа, возбудители дерматомикозов, антропофильные дерматомицеты, интердигитальная трихофития, артроспоры, мицелий, микроконидии, макроконидии.

Ye.V. Kukhar *, V.S. Kiyani

S.Seifullin Kazakh Agrotechnical University, Kazakhstan, Nur-Sultan

*e-mail: kucharev@mail.ru

Biological properties of anamorphe and teleomorphe of the causing agent of human interdigital trichophythy

The article presents the results of isolation of anthropophilic strains of dermatomycetes and analysis of their biological properties. The biological properties of dermatomycetes were studied: cultural, morphological, biochemical, phenotypic and genetic identification of strains was carried out. It has been established that the *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* No. 5 isolated from the patient's skin and affected nail was distinguished by polymorphism of cultural characters and a variety of morphological microstructures. The fungus strain *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* No. 9 isolated from the skin of the lesion of the interdigital folds of the legs had more stable cultural and morphological characteristics. Analysis of biochemical properties revealed the presence of saccharolytic and urease activity.

At the initial isolation of the culture, the anthropophilic strains were phenotypically reliably the strains of *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*. Long-term storage of cultures by subculturing has led to the appearance of morphologically heterogeneous colonies of strains which was expressed in the appearance of pronounced wrinkling, noticeable radial grooves and zonal rings, powerful branching into the substrate and its breaks, changes in the color of the colony, changes in the pigmentation of the reverzum.

As a result of the molecular genetics identification of the strain strain by analysis of the ITS region in BLAST, it was revealed that the cultures are a teleomorph of the dermatomycete *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* known as *Arthroderma vanbreuseghemii* with 100% confidence.

Key words: anamorph, teleomorph, pathogens of dermatomycosis, anthropophilic dermatomycetes, interdigital trichophytosis, arthrospores, mycelium, microconidia, macroconidia.

Е.В. Кухар*, В.С. Киян

С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті, Қазақстан, Нұр-Сұлтан қ.

*e-mail: kucharev@mail.ru

Адамның интердигиталды трихофитиясы қоздырушысының анаморфтық және телеоморфтық биологиялық қасиеттері

Мақалада дерматомицеттердің антропофильдік штаммдарын бөліп алу мен олардың биологиялық қасиеттерінің: өсінділік, морфологиялық, биохимиялық талдау нәтижелері келтірілген. Штаммдардың фенотиптік және генетикалық идентификациялау жұмыстары жүргізілген. Зерттеу барысында №5 *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* саңырауқұлағымен зақымдалған науқастың терісі мен тырнағынан бөлініп алынған штаммының өсінділік қасиеттерінің полиморфизм танытатыны және морфологиялық микроқұрылымдарының алуан түрлі сипат білдіретіні анықталды. Ал, саусақаралық қатпар терісінен бөлініп алынған №9 *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* саңырауқұлағы штаммының өсінділік-морфологиялық белгілері тұрақтырақ болды. Биохимиялық қасиеттерін талдау арқылы сахаролитикалық және уреазалық белсенділік білдіретіні анықталды.

Өсінділердің біріншілік бөлініп алынуы кезінде антропофильдік штаммдар фенотиптік тұрғыдан нақты *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* штаммдары болып шықты. Субкультивациялау әдісімен өсінділерді ұзақ сақтаған кезде штаммдардың морфологиялық әртекті колониялары пайда болатыны анықталған. Әртекті колониялар келесі белгілермен сипатталған: қатпарлардың пайда болуы, айқын радиалды ойықтардың пайда болуы, зоналық сақиналардың пайда болуы, колониялардың субстратқа тармақталуы, колония түсінің өзгеруі және реверзум пигментациясының өзгеруі.

Штаммды BLAST әдісін қолдана отырып ITS аумағын молекулярлық-генетикалық идентификациялау нәтижесінде өсінділердің *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* дерматомицетінің телеоформасы болып табылатыны анықталды, олар 100% *Arthroderma vanbreuseghemii* штаммы екені белгілі.

Түйін сөздер: анаморфа, телеоморфа, дерматомикоз қоздырушылары, антропофильдік дерматомицеттер, интердигиталды трихофития, артроспоралар, мицелилер, микроконидилер, макроконидилер

Введение

Грибы, вызывающие поражения кожи у животных и человека, называют дерматомицетами (дерматофитами), они широко распространены в природе. Дерматофиты родов *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton* паразитируют только на кератинизированных слоях кожи и ее придатках, поэтому патология носит название дерматомикозы.

Дерматомицеты долгое время относились к несовершенным грибам – *Fungi imperfecti* (дейтеромицеты, несовершенные грибы), которые являются условным, формальным классом грибов, объединяющим грибы, не имеющие полового размножения, образующие септированный мицелий, размножающиеся только бесполом путем в результате формирования конидий [1]. Дерматомицеты являются многоклеточными бесхлорофильными эукариотическими, грамположительными микроорганизмами с клеточной стенкой, образуют ветвящиеся тонкие нити (гифы), сплетающиеся в грибницу, или мицелий. Гифы дерматомицетов разделены перегородками, или септами с отверстиями.

Известно, что размножение грибов происходит половым и бесполом путями. Половое размножение грибов происходит с образованием гамет, половых спор и других половых форм, которые называются *телеоморфами*. Бесполое, вегетативное размножение грибов происходит с образованием соответствующих форм, называемых *анаморфами*. Такое размножение происходит почкованием, фрагментацией гиф и бесполом спорами. На первых этапах изучения у возбудителей дерматомикозов не было выявлено полового пути размножения и наличия половой формы. В то же время у дерматомицетов было установлено наличие большого разнообразия формирующихся конидий, так называемый плеоморфизм.

Экзогенные споры (конидии) формируются на кончиках плодоносящих гиф – конидиеносцах. Основные типы конидий у дерматомицетов: артроконидии (артроспоры), образуются путем равномерного септирования и расчленения гиф. Чаще всего это происходит на стареющих гифах воздушного мицелия. Это связано с тем, что эволюционно так сложилось, что растущие над поверхностью субстрата – воздушные или ре-

продуктивные гифы отвечают за бесполое размножение. Одноклеточные небольшие конидии называются микроконидиями. Они могут быть округлыми, булавовидными или иметь другую морфологическую форму. Большое количество микроконидий обычно образуют дерматофиты рода *Trichophyton*. Многоклеточные, большие конидии называются макроконидиями. Они чаще встречаются у представителей рода *Microsporium*, а также у разных вариантов гриба *Trichophyton mentagrophytes*, имеют характерную форму и служат основным критерием морфологической идентификации.

К бесполом формам грибов относят также хламидоконидии, или хламидоспоры (толстостенные клетки или комплекс мелких клеток) – покоящиеся органы грибов, способствующие их выживанию в неблагоприятных условиях. Для дерматомицетов характерно образование интеркалярных и терминальных хламидоспор, т.е. расположенных, соответственно, в середине или на конце мицелиальной нити [2].

Анаморфа или несовершенная стадия – это стадия бесполого или вегетативного размножения дерматомицетов. Она отличается морфологически и кариологически от совершенной (половой) стадии – телеоморфы. Анаморфы и телеоморфы грибов исторически описывались как самостоятельные виды. Это привело к накоплению огромного количества видов у разных родов грибов. Сегодня молекулярные методы позволяют обнаружить описанные дважды виды [3].

В настоящее время благодаря развитию и совершенствованию методов молекулярной биологии выявлено наличие совершенной стадии у многих несовершенных грибов класса *Fungi imperfecti*, что внесло диссонанс в номенклатуру Царства грибов и привело к изменению их систематики и классификации. Известно, что у аскомицетов, в зависимости от условий организм может переходить в телеоморфу, а может – и нет, в результате чего часто один и тот же аскомицет описывался как два разных вида. Например, название *Aspergillus fisheri* дано анаморфе, телеоморфа которой описана, как *Neosartoria fisheri*. Аналогичная ситуация с *Amorphotheca resinae* и *Hormoconis resinae* и многими другими [4].

Установлено наличие совершенных форм и для дерматомицетов рода *Trichophyton*, к примеру, *Trichophyton mentagrophytes*. Как известно, он имеет две основные разновидности: а) var. *gypseum* (мучнистый) и б) var. *interdigitale* (пу-

шистый). Для обеих разновидностей установлены совершенные формы гриба *Arthroderma benhamiae* и *A. vanbreuseghemii* [5].

Ряд авторов акцентирует внимание на том, что чаще телеоморфы у дерматомицетов выявляются для штаммов, паразитирующих на животных, т.е. для зоофильных штаммов. Так, например, эпидемиологически *Trichophyton mentagrophytes* разделен на две различные формы: зоофильную и антропофильную. Зоофильные изоляты *T. mentagrophytes*, как правило, идентифицируют путем исследования морфологических и биохимических свойств, а также с помощью экспериментов по спариванию. Подтвержденными телеоморфами зоофильных изолятов комплекса *T. mentagrophytes* являются *Arthroderma benhamiae*, *A. simii* и *A. vanbreuseghemii* [6].

В сообщении о случае семейной инфекции, спровоцированной заражением от кроликов с кроликофермы, первоначально возбудителем была названа анаформа зоофильного дерматомицета *Trichophyton mentagrophytes*. Морфологические и биохимические характеристики подтвердили, что инфекция у ребенка и его родителей была вызвана зоофильными *T. mentagrophytes*. Однако, секвенирование продуктов транскрибирования *ITS1/ITS4*, амплифицированных из первичных изолятов культуры, в полимеразной цепной реакции, установило происхождение культуры как *Arthroderma vanbreuseghemii*. Анализ методом RAPD-ДНК показал, что эти изоляты могут быть одним и тем же штаммом [7].

Описан аналогичный случай вспышки дерматофитоза в ветеринарной школе в Берне (Швейцария), который был вызван совершенной формой интердигитального трихофитона *Arthroderma vanbreuseghemii* (формально *Trichophyton mentagrophytes pro parte*). Достоверность идентификации возбудителя была подтверждена фенотипическими характеристиками и последовательностью *ITS* дерматофитов [8].

Сообщается о совершенной форме *Arthroderma benhamiae*, которая также является телеоморфой *Trichophyton mentagrophytes*. В попытке понять эпидемиологические особенности *Trichophyton mentagrophytes* японскими учеными впервые выявлены специфические гены спаривания типа (-) – *alpha-box* и типа (+) – ДНК-связывающего домена с высокой подвижностью (*HMG*) у зоофильных дерматофитов *Arthroderma benhamiae* [9].

Trichophyton mentagrophytes считается видовым комплексом, состоящим из нескольких

штаммов, которые включают как антропофилов, так и зоофилов. Точное различие их между собой имеет решающее значение для всестороннего понимания клинических и эпидемиологических последствий генетической гетерогенности этого комплекса. Типирование молекулярных штаммов обеспечивает эффективный способ идентификации каждого штамма. Поэтому для клинических изолятов *T. mentagrophytes* очень важна не только классическая культурально-морфологическая характеристика до уровня подвидов, но также и генетическая с использованием молекулярных методов [10].

Цель исследования – фенотипическая и генетическая идентификация возбудителей интердигитальной трихофитии человека и сравнительная характеристика биологических свойств совершенной и несовершенной формы возбудителей интердигитальной трихофитии *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*.

Материалы и методика исследований

Для первичного выделения возбудителя были отобраны 2 пробы биоматериала от анонимных добровольцев – пациентов наркологического диспансера г. Астана с клиническими признаками межпальцевой трихофитии.

Проба 1 (2007 г.) – соскоб кожи в межпальцевом пространстве между третьим и четвертым пальцами левой ноги женщины. Клинически заболевание проявлялось в поражении ногтевой пластинки 4 пальца левой ноги (рыхлая, белесая, утолщенная) и межпальцевого пространства между 2-3 и 3-4 пальцами, наличии зуда, красноты, отслоения кожи.

Проба 2 (2012 г.) – соскоб кожи ниже большого пальца правой ноги человека с покраснением, зудом и мокнутием (кусочки кожи). Поражение кожи стопы клинически проявлялось в виде очага шелушения под большим пальцем, ороговения кожи и нескольких гнойных пузырьков на ступне, наличия зуда и покраснения.

Проведен анализ биологических свойств первичной культуры штаммов, выделенных из биоматериала, изучены биологические свойства дерматомицета: культуральные, морфологические, биохимические.

Поверхностное культивирование для выделения чистой культуры и изучения культурально-морфологических свойств проводили при температуре 28°C на агаровых средах: Сабуро, Чапека, медовой, кукурузной, картофельной –

до завершения формирования характерных колоний. Культурально-морфологическую характеристику дерматомицетов выявляли при росте штаммов на чашках Петри и агаровых блоках по Кадену. Микроскопию культуры гриба проводили в скотч-препаратах, нативных и окрашенных мазках через 24-48-72 и более часов роста в световом микроскопе при увеличении $\times 40$ и $\times 400$. Идентификацию проводили с использованием определителя *Deanna A. Sutton et al.* (2001) [11].

Биохимические свойства изучали на средах Гисса с глюкозой, лактозой, маннозой, маннитом, сахарозой (сахаролитическая активность), среде Кристенсена с 40%-ой мочевиной (уреазная активность), на волосах (кератинолитическая активность).

Наработку биомассы для выделения ДНК проводили на бульоне Сабуро. Определение нуклеотидной последовательности целевых генов дерматомицетов проводили методом ПЦР по паре праймеров *ITS4-ITS5*, затем пробы ДНК очищали для секвенирования. После расшифровки ДНК, результаты вносили в базу данных на сайте www.ncbi.com. Полученные последовательности были идентифицированы в *GeneBank* по алгоритму *BLAST*.

Идентификация последовательностей осуществлялась относительно инвентарных номеров *GeneBank* первых трех нуклеотидных последовательностей, имеющих максимальное совпадение. Реакцию секвенирования проводили с применением *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)* согласно инструкции производителя, с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе *3730x1 DNA Analyzer (Applied Biosystems)* [12].

Результаты исследования и их обсуждение

Штаммы антропофильного гриба *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, полученные нами при первичном выделении из биоматериала (проба 1 и 2), культивировали на агаре Сабуро при 28°C в присутствии антибиотиков. Рост культур двух штаммов гриба отмечали в месте посева в виде плотной, четко обозначенной точки белого цвета диаметром 0,2-0,3 см на третьи-четвертые сутки. Штамму, выделенному из пробы 1, присвоен внутренний коллекционный номер №5; штамму, выделенному из пробы 2, соответственно, номер №9.

Завершение формирования колонии отмечали на 25-30-е сутки (рисунок 1).

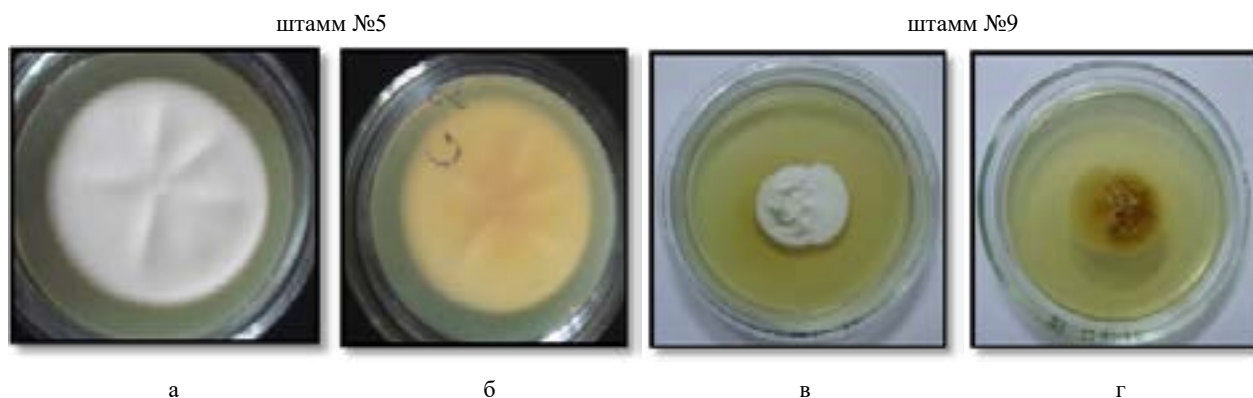


Рисунок 1 – Сформированные колонии штаммов *T. mentagrophytes var. interdigitale* на агаре Сабуро: а, в – лицевая сторона, б, г – обратная сторона

Как видно из рисунка 1, при получении чистых культур *T. interdigitale* от колоний, выделенных из биоматериала, оба штамма имели ряд сходных признаков (верхний ряд): округлую форму, белый цвет, бархатистую поверхность, выраженную зональность, наличие пигмента с обратной стороны колонии.

При этом заметный рост колонии *T. interdigitale* №5 (а, б) начинался в месте посева с третьих суток, колония сформировалась к 30-35 суткам. Молодые колонии белые, пушистые, диаметр 4,0-5,5 см, приподнятые в центре. Зрелые колонии *T. interdigitale* бархатистые, белого цвета, со слабо выраженными коническими кольцами, с практически равномерно окрашенным реверзумом желтого цвета, диаметром – 6,0-7,0 см, с обратной стороны – слабо выраженный пигмент песочного оттенка. В местах

расположения радиальных борозд отмечали выраженные разрывы питательной среды.

Белая бархатистая колония *T. interdigitale* №9 (в, г) отличалась более выраженной морщинистостью поверхности колонии, интенсивной очаговой пигментацией реверзума до насыщенного коричневого цвета. Диаметр зрелых колоний 3,0×4,1 см.

Анализ края зрелых колоний (рисунок 2) показал, что у разных штаммов мицелий разрастается неравномерно. Край колонии *T. interdigitale* №5 ровный, пушистый, заметного роста глубинного мицелия не выявлено. Край колонии *T. interdigitale* №9 неровный, пушистый, хорошо заметны две зоны глубинного роста погруженного мицелия, мощно вросшего в субстрат шириной до 1,0-1,3 см.



Рисунок 2 – Край колонии штаммов гриба *T. mentagrophytes var. interdigitale*: а) штамм №5, (б) штамм №9; агар Сабуро, 28°C

При изменении состава питательных сред в последующих пересевах культура штаммов гриба *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* отличалась постоянством культурально-морфологических свойств. На питательных средах с различными источниками углеводов: картофельный (1), медовый (2), кукурузный (3), Чапека (4)

(4) культуры имели белый цвет, хорошо заметные зоны роста поверхностного и глубинного мицелия, практически одинаковую окраску реверзума на всех средах. Штамм №5 имел выраженный соломенно-желтый пигмент обратной стороны колонии (рисунок 3), штамм №9 – песочный (рисунок 4).

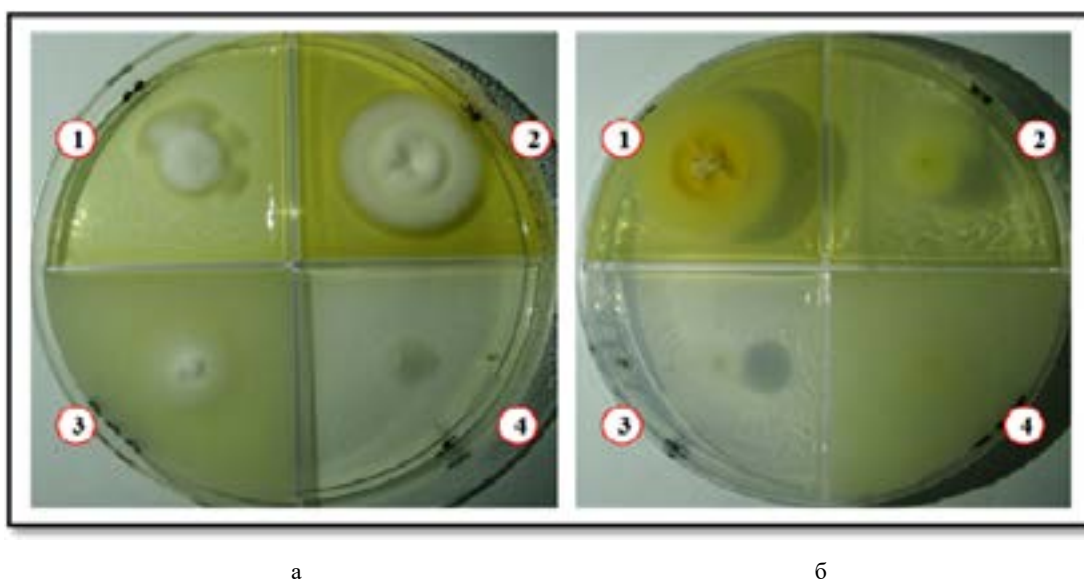


Рисунок 3 – Характер роста колоний *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* №5 на картофельной (1), медовой (2), кукурузной (3) средах и агаре Чапека (4) (а – лицевая сторона, б – обратная сторона колонии)

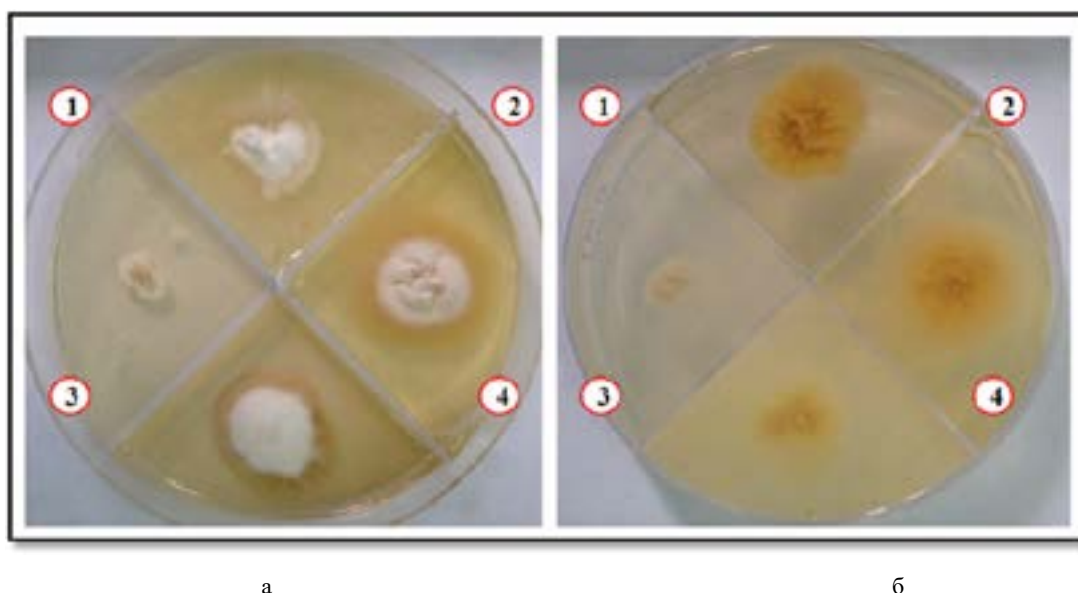


Рисунок 4 – Характер роста колоний *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* №9 на картофельной (1), медовой (2), кукурузной (3) средах и агаре Чапека (4): (а – лицевая сторона, б – обратная сторона колонии)

Как видно из рисунка 4, грибы активно накапливали биомассу на медовой среде, слабее – на картофельном и кукурузном агарах.

Диаметр колоний дерматомицетов, сформированных на агаре Чапека был наименьшим, хотя мы связываем это с низкой концентрацией белка и высокой концентрацией солей в составе данного субстрата.

Сравнительный анализ ферментативной активности штаммов показал, что культивирование *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* на агаровых средах с различными источниками углеводов позволяет культурам усваивать их все, хотя скорость утилизации разная. Активнее усваивается фруктоза, затем – глюкоза, слабее – мальтоза и крахмал.

Несмотря на то, что оба штамма относятся к одному виду *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*,

их ферментативная активность отличалась разнообразием.

Сахаролитическая активность в отношении глюкозы явно выражена у обоих штаммов, также как и уреазная активность.

Остальные сахара штаммы расщепляют избирательно: штамм №9 сбраживает лактозу, штамм №5 – все сахара, кроме лактозы (таблица 1).

Микроскопия мазков при первичном культивировании штаммов позволила выявить характерные морфологические структуры *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* (рисунок 5).

На рисунке 5 указаны: прозрачный септированный прямой и извитой мицелий (а, г), формирование ростовых трубок (б), завитки (в, г), терминальные хламидоспоры (а), микроконидии (а, д, е) и макроконидии (д).

Таблица 1 – Ферментативные свойства штаммов *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*

№ штамма	Среды Гисса с сахарами					Среда Кристенсена	Контроль
	сахароза	маннит	глюкоза	мальтоза	лактоза	мочевина	
№5	++	+	++	+++	–	++	–
№9	–	–	++	–	++	+++	+

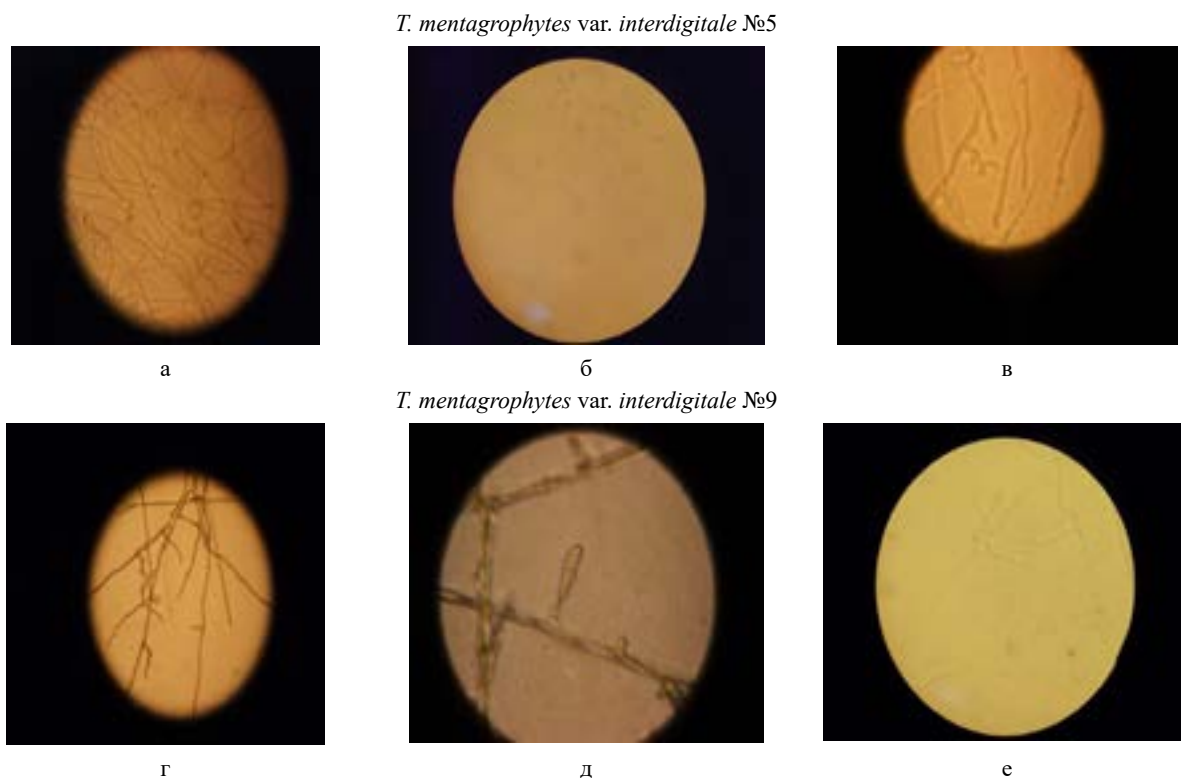


Рисунок 5 – Характерные морфологические структуры *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, агар Сабуро, 28° С, 6 суток, агаровые блоки по Кадену

Анализ биологических свойств после хранения методом субкультивирования в течении 7-10 лет выявил проявление полиморфизма колоний

данных штаммов, что выражалось в довольно резком изменении культуральных свойств (рисунок 6).

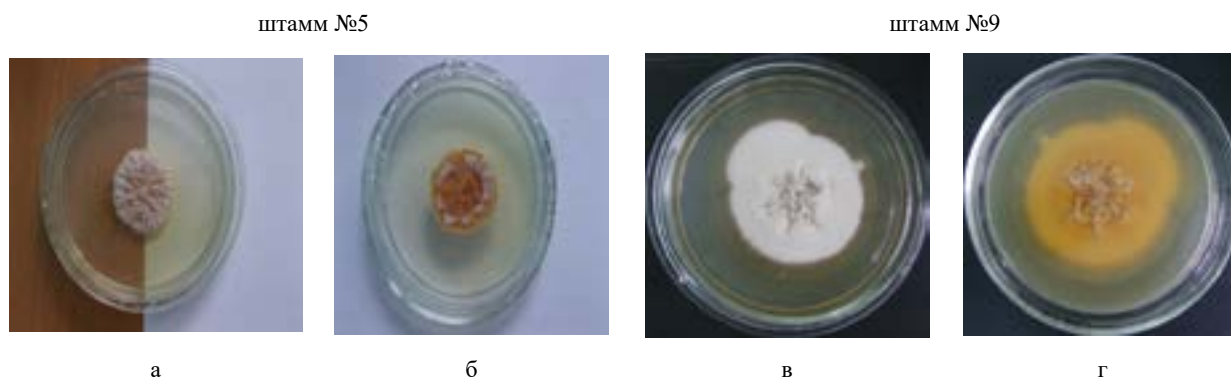


Рисунок 6 – Сформированные колонии штаммов *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* на агаре Сабуро: а, в – лицевая сторона, б, г – обратная сторона

У штамма дерматомицета *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* №5 (д, е) отмечалось появление выраженной морщинистости, заметных радиальных борозд и зональных колец, мощного ветвления в субстрат с прорастанием мицелия до самого дна чашек Петри, разрывов питательного субстрата, изменения цвета колонии с белого на розовый, смены пигментации реверзума от песочного до бежево-коричневого. Колонии формировались на 20-25 сутки, диаметр 3,5-4,0, который практически не менялся при дальнейшем культивировании.

Колония *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* №9 (ж, и) имела менее выраженную полиморф-

ность культуральных свойств. Форма колонии внешне напоминала первично выделенную колонию, цвет лицевой стороны колонии оставался белым, сохранилась выраженная очаговая морщинистость. Цвет пигмента реверзума изменился от коричневого до оранжевого. Диаметр зрелой колонии увеличился: зона поверхностного роста имела размеры 5,3×6,1 см, общий диаметр с учетом зоны глубинного роста был равен 6,8×7,5.

Микроскопия культур дерматомицетов позволила выявить наличие морфологических особенностей, ранее не встречавшихся в культурах *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* (рисунок 9).

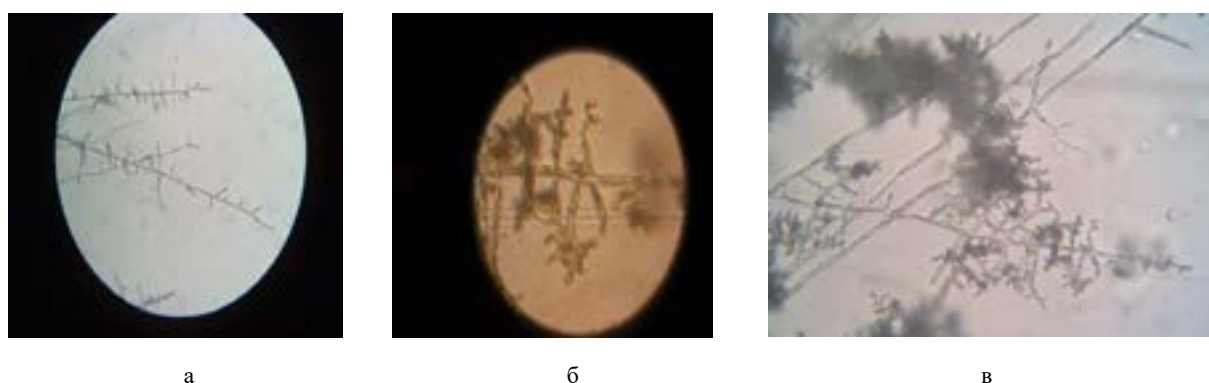


Рисунок 7 – Морфологические структуры штаммов *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, агар Сабуро, 28 °С, агаровые блоки, 6 сутки

Как видно из рисунка 7, бесцветные септированные гифы дерматомицетов стали более утолщенными (б), боковые гифы расположены чаще супротивно (а, б). Мицелий ровный, гифы без завитков и спиралей. Появились гроздевидные скопления практически шаровидных алейроспор, их число стало большим (в). Наблюдали наличие большого количества тонких булавовидных макроконидий с многочисленными перегородками (а).

Для решения проблемы контаминации при длительном хранении штаммов продуцентов была проведена генетическая идентификация

описанных штаммов *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*.

В результате идентификации грибов методом анализа *ITS* региона в *BLAST* получено 100% подтверждение того, что обе выделенные нами культуры дерматомицетов принадлежит роду *Arthroderma*, виду *vanbreuseghemii*. В то же время со 100% подтверждением тем же количеством последовательностей было установлено, что эти же штаммы являются дерматомицетами рода *Trichophyton* вида *mentagrophytes* разновидности (variant) *interdigitale* (таблица 2).

Таблица 2 – Результаты идентификации дерматомицетов вида *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* методом анализа *ITS* региона в *BLAST*

№ культуры	Идентификация нуклеотидных последовательностей в международной базе данных (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) алгоритм BLAST							
	Инвентарный номер GeneBank (Accession number) или коллекционный номер штамма	Максимальный балл	Наименование штамма	% совпадения	Инвентарный номер GeneBank (Accession number) или коллекционный номер штамма	Максимальный балл	Наименование штамма	% совпадения
5	AB458207.1	1219	<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i>	100	AF168124.1	1219	<i>Trichophyton interdigitale</i>	100
	AB458205.1	1219	<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i>	100	Z98001.1	1212	<i>Trichophyton interdigitale</i>	99
	AB458202.1	1219	<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i>	100	EU181446.1	1206	<i>Trichophyton interdigitale</i>	100
9	AB458207.1	1218	<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i>	100	AF168124.1	1218	<i>Trichophyton interdigitale</i>	100
	AB458205.1	1218	<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i>	100	Z98001.1	1210	<i>Trichophyton interdigitale</i>	99
	AB458202.1	1218	<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i>	100	JN133969.1	1206	<i>Trichophyton interdigitale</i>	100

Таким образом, в ходе исследований идентифицированы анаформа дерматомицета *Trichophyton interdigitale* и его телеоформа *Arthroderma vanbreuseghemii*.

В результате молекулярно-генетической идентификации штамма, проведенной в лаборатории коллективного пользования РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК, выявлено, что культуры являются телеоморфой дерматомицета *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, известной как *Arthroderma vanbreuseghemii* со 100%-ной достоверностью.

Как известно, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* – типичный антропофильный дерматомицет,

бархатистый вариант *T. mentagrophytes*. Зрелые колонии чаще белые, бархатистые, цвет может варьировать от розового до коричневого, поверхность ровная, реже радиально исчерченная, с углублением в центре. На картофельном агаре при 25°C колонии *T. interdigitale* обычно белые и пушистые, могут быть от порошистых до зернистых. Пигмент меняется от желтого до коричневого, иногда винно-красный. При микроскопии выявляют длинный, ветвистый, септированный мицелий с тонкими завитками и спиральями. Гифы однотипны с зоофильным вариантом. Встречаются узловатые органы и интеркалярные хламидоспоры. Макроконидии встречаются редко [17].

При первичном выделении культуры антропофильные штаммы *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* №5 и №9 имели фенотипическое сходство. В дальнейшем установлено, что штамм гриба *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* №5 отличается полиморфизмом, у него выявлено появление новых культуральных признаков и морфологическое разнообразие микроструктур. Считаем, что к появлению морфологически разнородных колоний штаммов привело длительное хранение культур методом субкультивирования.

Штамм гриба *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* №9 имел более стабильные культурально-морфологические признаки. Анализ биохимических свойств позволил выявить наличие уреазной и кератинолитической активности у обоих штаммов, сахаролитические свойства имели сходство только в отношении глюкозы.

Анализ культуральных, морфологических и биохимических свойств позволил сделать заключение:

– клинический штамм №5 является типичным представителем антропофильных дерматомицетов *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, отличается наличием характерных культурально-морфологических признаков, высокой сахаролитической активностью, активно усваивает мочевины;

– клинический штамм №9 является типичным представителем антропофильных дерматомицетов *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, отличается наличием типичных культурально-морфологических признаков, отличается слабой сахаролитической активностью, активно усваивает мочевины.

Классические генетические исследования, которые разграничивали группы интерфертильности в пределах *A. benhamiae* и *A. vanbreuseghemii*, были проведены региональными исследованиями комплексных изолятов *T. mentagrophytes* в нескольких частях мира [18], включая Западную Европу [19], Восточную Европу [20, 21], Японию [22], Северную Америку [23].

Полученные нами результаты согласуются с данными различных исследователей, которые утверждают, что антропофильные *T. mentagrophytes* развились из спаривающегося штамма *A. vanbreuseghemii* (+). Они доказали это наличием группы с высокой подвижностью: *HMG*, т.е. ДНК-связывающего домена в зоофильных дерматофитах *A. benhamiae*, *A. simii*

и *A. vanbreuseghemii*, которые имеют два типа спаривания: тип спаривания (MAT) (-) – специфичный ген MAT1-1 (альфа-бокс) и MAT (+) – специфический ген MAT1-2. Согласно данным, полученным Kano R. (2012), последовательность MAT1-1 составляла около 1,3 т.п.н. и содержала 2 экзона в штамме спаривающегося типа *A. benhamiae*, *A. simii* и *A. vanbreuseghemii* (-). Последовательность MAT1-2 составляла 1,9 т.п.н. и содержала 2 экзона в штамме спаривающегося типа *A. benhamiae*, *A. simii* и *A. vanbreuseghemii* (+). Из 15 исследованных изолятов животных и 72 изолятов человека MAT1-1 был обнаружен авторами в 5 изолятах животных и ни в одном из изолятов человека, тогда как MAT1-2 был обнаружен в остальных 10 изолятах животных и во всех человеческих изолятах [24].

Анализ тридцати девяти изолятов *Arthroderma vanbreuseghemii*, идентифицированных по спариванию, которые были проанализированы Anzawa K., с соавторами (2011) для определения генотипов их внутренней транскрибируемой спейсерной (*ITS*) области рибосомного гена РНК, показал, что двадцать два изолята типа спаривания (+) и четыре (-) показали генотип *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*, девять изолятов типа спаривания (+) и четыре (-) показали генотип *A. vanbreuseghemii*. Девять из 14 изолятов с морфологией гранулярных или астероидных колоний показали генотип *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*. Авторами не было установлено не никакой связи между генотипом и морфологией или типом спаривания изолятов. Авторами было доказано, что генотип изолятов *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* включает в себя не только сексуально вырожденные зоофильные штаммы с морфологией зернистых колоний, а также сексуально и морфологически вырожденные антропофильные штаммы и может представлять собой генотип гетерогенного вида *A. vanbreuseghemii* [25].

В то же время создававшаяся ситуация с идентификацией по *Trichophyton interdigitale*, которая обычно считается анаморфой *Arthroderma vanbreuseghemii*, основанной на секвенировании внутреннего транскрибированного спейсера (*ITS*), приводит к путанице в достоверной идентификации штаммов.

Ряд авторов считает, что создавшуюся проблему на основе одновременного присвоения штаммам двух названий через их анаморфную/телеоморфную связь следует предупредить на основе филогении β -тубулина. В своих исследо-

ваниях им удалось добиться 100% отличия штаммов. Последовательности *ITS* и *D1/D2* их изолята были на 99% гомологичны *A. vanbreuseghemii*, а последовательность β -тубулина была на 100% идентична *T. interdigitale*. Как видно, авторам удалось идентифицировать изолят от кроликов как *T. interdigitale* на основании анализа максимальной вероятности β -тубулина [26]. Выражаем солидарность авторам статьи и считаем исследования в данной области весьма важными для науки и клинической микологии.

Штамм *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* №5 *F-Tm-i-5* депонирован в Коллекции микроорганизмов ДГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» НЦБ РК КН МОН Республики Казахстан с регистрационным номером М-59-13/Д, как штамм-продуцент специфических антигенов. Штамм *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* №9 *F-Tm-i-9* хранится в Коллекции микроорганизмов лаборатории биотехнологии грибов КАТУ им. С.Сейфуллина.

Заключение

На основании вышеизложенного, можно сделать следующие выводы:

1. Выделенные из биологического материала штаммы дерматомицетов, являются представителями антропофильных дерматофитов *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*;

2. Штаммы *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* отличаются высокой полиморфностью культуральных признаков, наличием типичных мор-

фологических структур, высокой сахаролитической и уреазной активностью;

3. Анализ нуклеотидной последовательности посредством анализа *ITS* региона в *BLAST* позволил подтвердить результаты культурально-морфологические характеристики и идентифицировать штаммы как представителей рода *Trichophyton* вида *mentagrophytes* разновидности *interdigitale* и как представителей рода *Arthroderma* вида *vanbreuseghemii*;

4. Анаморфы несовершенных грибов *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* имеют совершенную форму гриба, которая идентифицирована как телеоморфа *Arthroderma vanbreuseghemii*.

Конфликт интересов

Авторы не имеют конфликтов интересов.

Благодарности

Авторы выражают благодарность Смагуловой А.М., Никулиной А.И., Шевцову А.Б., за содействие в проведении исследований.

Источник финансирования

Статья подготовлена по результатам исследований, проводимым в рамках научно-исследовательской темы №0118РКИ0321 «Биология микроскопических грибов – возбудителей микозов кожи сельскохозяйственных животных», выполняемой в 2018-2022 гг.

Литература

- 1 Wael F. El-Tras, Ahmed A. Tayel, Radi A. Mohamed, Doaa M. El-Kordy, Nevein N. El-Kady, Ahmed Samir. Mixed rearing correlates with the existence of *Trichophyton verrucosum* pathogens in humans // *Dermatologica Sinica*. – 33(3). – P. 130-133.
- 2 Общая микология. Строение и классификация грибов // [Электрон. ресурс]. – 2019. – http://medicine-live.ru/atlas/micro/griby/ob_mikolog.htm. (Дата обращения: 04.08.2019).
- 3 Титова Т.Н. Разработка и оценка информативности нового способа детекции *Microsporum canis*, *Trichophyton verrucosum* и *Trichophyton mentagrophytes* в клиническом материале: дисс. ... канд. биол. наук: 03.02.03. – Уфа, 2017. – С. 11-14.
- 4 Белякова Г.А., Дьяков Ю.Т., Тарасов К.Л. Ботаника. Т.1. Водоросли и грибы. – М.: Издат. центр «Академия», 2006. – 320 с.
- 5 Грибковые заболевания кожи: учебное пособие. Под ред. проф. С.И. Данилова. – СПб: СПбГМА им. И.И. Мечникова, 2005. – С. 124.
- 6 Yang Y.P., Sheng P., Liu Z., Li W., Wang J.D., Huang W.M., Fan Y.M. Kerion and Tinea Corporis Caused by Rabbit-Derived *Trichophyton interdigitale* in Three Siblings and One Consulting Doctor Using β -Tubulin Gene to Identify the Pathogen // *Mycopathologia*. – 2016. – 181(7-8). – P. 539-46.
- 7 Hao Zhang, Yuping Ran, Yongfang Liu, Ruifeng Zhang, Xinyu Lin, Wei Yan, Yaling Dai. *Arthroderma vanbreuseghemii* infection in three family members with kerion and tinea corporis // *Medical Mycology*. – Vol. 47, Issue 5. – 2009. – P. 539-544.
- 8 Chollet A., Wespi B., Roosje P., Unger L., Venner M., Goepfert C., Monod M. An outbreak of *Arthroderma vanbreuseghemii* dermatophytosis at a veterinary school associated with an infected horse // *Mycoses*. – 2015. – 58(4). – P. 233-8.

- 9 Kano R., Yamada T., Makimura K., Kawasaki M., Mochizuki T., Kamata H., Hasegawa A. *Arthroderma benhamiae* (the teleomorph of *Trichophyton mentagrophytes*) mating type-specific genes // *Mycopathologia*. 2011 May;171(5):333-7.
- 10 Ramaraj V., Vijayaraman R.S., Hemanth V., Rangarajan S., Kindo A.J. Molecular strain typing of *Trichophyton mentagrophytes* (*T. mentagrophytes* var. *interdigitale*) using non-transcribed spacer region as a molecular marker // *Indian J Med Res.* – 2017. – Vol. 146(5). – P. 636-641.
- 11 Deanna A. Sutton. Fothergill A.W., Rinaldi M.G. *Guid to Clinically Significant Fungi* // Саттон Д., А. Фотергилл, М. Ринальди. *Определитель патогенных и условно патогенных грибов: пер. с англ.* – М.: Мир, 2001. – 486 с.
- 12 White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a guide to methods and applications* // Academic Press, New York, USA. – 1990. – 482 p.
- 13 Werle E., Schneider C., Renner M., Völker M., Fiehn W. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing // *Nucleic Acids Res.* – 1994. – Vol. 22. – P. 4354-4355.
- 14 Korf I., Yandell M., Bedell J. BLAST. – O'Reilly Media, 2003 – 360 p.
- 15 Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment // *Briefings in bioinformatics.* – 2004. – Vol. 5. – P. 150-163.
- 16 Clayton R.A., Sutton G., Hinkle P.S., Bult Jr.C., Fields C. Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa // *International Journal of Systematic Bacteriology.* – 1995. – Vol. 45. – P. 595–599.
- 17 Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. *Грибковые инфекции. Руководство для врачей.* – М.: БИНОМ, 2008. – 480 с.
- 18 Summerbell R., Weitzman I. and Padhye A. The *Trichophyton mentagrophytes* complex: Biological species and mating type prevalences of North American isolates, and a review of the worldwide distribution and host associations of species and mating types // *Studies in Mycology.* – 2002. – P. 75-86.
- 19 Contet-Audonneau N., Percebois G. Mating types of strains of the "mentagrophytes complex" in relation to clinical lesions. In: VAN BREUSEGHEM, R. & DE VROEY, C. (eds.): *Sexuality and pathogenicity of fungi.* – Masson, Paris, New York. – 1981. – P. 159-163.
- 20 Hejtmánek M., Hejtmánková N. Hybridization and sexual stimulation in *Trichophyton mentagrophytes* // *Folia Microbiol.* – 1989. – Vol. 34. – P. 77–79.
- 21 Vasilyev O.D., Bogomolova T.S. Типы спаривания и соverschennaya форма shtammov griba *Trichophyton dermatofitii* // *Mikol. Fitopatol.* – 1985. – Vol. 19. – P. 309-317.
- mentagrophytes (Robin) Blanchard, vydelennykh ot bol'nikh
- 22 Hironaga M., Watanabe S. Mating behaviour of Japanese isolates of *Trichophyton mentagrophytes* in relation to their ecological status // *Mycologia.* – 1980. – Vol. 72. – P. 1159-1170.
- 23 Delcourt P.A., Delcourt H.R. Paleoclimates, paleovegetation, and paleofloras of North America north of Mexico during the late quaternary. Chapter 4 (no page numbers) In: *FLORA OF NORTH AMERICA ASSOCIATION* (eds.): *Flora of North America.* Vol. 1 (online edition). – 2000.
- 24 Kano R. Classification of dermatophytes by mating type (MAT) gene analysis // *Med. Mycol. J.* – 2012. – 53(3). – P. 175-8.
- 25 Anzawa K., Kawasaki M., Hironaga M., Mochizuki T. Genetic relationship between *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* and *Arthroderma vanbreuseghemii* // *Med Mycol J.* – 2011. – 52(3). – P. 223-7.
- 26 Chowdhary A., Singh A., Singh P.K., Khurana A., Meis J.F. Perspectives on misidentification of *Trichophyton interdigitale*/*Trichophyton mentagrophytes* using internal transcribed spacer region sequencing: Urgent need to update the sequence database // *Mycoses.* – 2019. – 62(1). – P. 11-15.

References

- 1 Anzawa K., Kawasaki M., Hironaga M., Mochizuki T. Genetic relationship between *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* and *Arthroderma vanbreuseghemii* // *Med Mycol J.* – 2011. – 52(3). – P. 223-7.
- 2 Belaykova G.A., D'aykov Uy.T., Tarasov K.L. *Botanika. T.1. Vodrosli i griby.* – М.: Izdat. centr «Akademia», 2006. – 320 s.
- 3 Chollet A., Wespi B., Roosje P., Unger L., Venner M., Goepfert C., Monod M. An outbreak of *Arthroderma vanbreuseghemii* dermatophytosis at a veterinary school associated with an infected horse // *Mycoses.* – 2015. – 58(4). – P. 233-8.
- 4 Chowdhary A., Singh A., Singh P.K., Khurana A., Meis J.F. Perspectives on misidentification of *Trichophyton interdigitale*/*Trichophyton mentagrophytes* using internal transcribed spacer region sequencing: Urgent need to update the sequence database // *Mycoses.* – 2019. – 62(1). – P. 11-15.
- 5 Clayton R. A., Sutton G., Hinkle P. S., Bult Jr. C., Fields C. Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa // *International Journal of Systematic Bacteriology.* – 1995. – Vol. 45. – P. 595–599.
- 6 Contet-Audonneau N., Percebois G. Mating types of strains of the "mentagrophytes complex" in relation to clinical lesions. In: VAN BREUSEGHEM, R. & DE VROEY, C. (eds.): *Sexuality and pathogenicity of fungi.* – Masson, Paris, New York. – 1981. – P. 159-163.
- 7 Deanna A. Sutton. Fothergill A.W., Rinaldi M.G. *Guid to Clinically Significant Fungi* // Саттон Д., А. Фотергилл, М. Ринальди. *Определитель патогенных и условно патогенных грибов: пер. с англ.* – М.: Мир, 2001. – 486 с.
- 8 Delcourt P.A., Delcourt H.R. Paleoclimates, paleovegetation, and paleofloras of North America north of Mexico during the late quaternary. Chapter 4 (no page numbers) In: *FLORA OF NORTH AMERICA ASSOCIATION* (eds.): *Flora of North America.* Vol. 1 (online edition). – 2000.

- 9 Gribkovye zabolevaniya kozhy: uchebnoe posobie. Pod red. prof. S.I. Danilova. – SPb: SPbGMA im. I.I. Mechnikova, 2005. – S. 124.
- 10 Hao Zhang, Yuping Ran, Yongfang Liu, Ruifeng Zhang, Xinyu Lin, Wei Yan, Yaling Dai. Arthroderma vanbreuseghemii infection in three family members with kerion and tinea corporis // *Medical Mycology*. – Vol. 47, Issue 5. – 2009. – P. 539-544.
- 11 Hejtmánek M., Hejtmánková N. Hybridization and sexual stimulation in Trichophyton mentagrophytes // *Folia Microbiol.* – 1989. – Vol. 34. – P. 77-79.
- 12 Hironaga M., Watanabe S. Mating behaviour of Japanese isolates of Trichophyton mentagrophytes in relation to their ecological status // *Mycologia*. – 1980. – Vol. 72. – P. 1159-1170.
- 13 Kano R., Yamada T., Makimura K., Kawasaki M., Mochizuki T., Kamata H., Hasegawa A. Arthroderma benhamiae (the teleomorph of Trichophyton mentagrophytes) mating type-specific genes // *Mycopathologia*. 2011 May;171(5):333-7.
- 14 Kano R. Classification of dermatophytes by mating type (MAT) gene analysis // *Med. Mycol. J.* – 2012. – 53(3). – P. 175-8.
- 15 Korf I., Yandell M., Bedell J. BLAST. – O'Reilly Media, 2003 – 360 p.
- 16 Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment // *Briefings in bioinformatics*. – 2004. – Vol. 5. – P. 150-163.
- 17 Obschaay mikologiya. Stroenie i klassifikaciya gribov // [Elektronniy resurs]. – 2019. – URL: – http://medicine-live.ru/atlas/micro/gribj/ob_mikolog.htm. (Data obrascheniya: 04.08.2019).
- 18 Ramaraj V., Vijayaraman R.S., Hemanth V., Rangarajan S., Kindo A.J. Molecular strain typing of Trichophyton mentagrophytes (T. mentagrophytes var. interdigitale) using non-transcribed spacer region as a molecular marker // *Indian J Med Res.* – 2017. – Vol. 146(5). – P. 636-641.
- 19 Sergeev A.Uy., Sergeev Uy.V. Gribkovye infekcii. Rukovodstvo dlay vrachei. – M.: BINOM, 2008. – 480 s.
- 20 Summerbell R., Weitzman I. and Padhye A. The Trichophyton mentagrophytes complex: Biological species and mating type prevalences of North American isolates, and a review of the worldwide distribution and host associations of species and mating types // *Studies in Mycology*. – 2002. – P. 75-86.
- 21 Titova T.N. Razrabotka i otsenka informativnosti novogo sposoba detekzii Microsporum canis, Trichophyton verrucosum i Trichophyton mentagrophytes v klinicheskom materiale: diss. ... kand. biol. nauk: 03.02.03. – Ufa, 2017. – S. 11-14.
- 22 Vasilyev O.D., Bogomolova T.S. Tipy sparivaniya i sovershennaya forma shtammov griba Trichophyton dermatofitiyami // *Mikol. Fitopatol.* – 1985. – Vol. 19. – 309-317.
- 23 Wael F. El-Tras, Ahmed A. Tayel, Radi A. Mohamed, Doaa M. El-Kordy, Nevein N. El-Kady, Ahmed Samir. Mixed rearing correlates with the existence of Trichophyton verrucosum pathogens in humans // *Dermatologica Sinica*. – 33(3). – P. 130-133.
- 24 Werle E., Schneider C., Renner M., Völker M., Fiehn W. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing // *Nucleic Acids Res.* – 1994. – Vol. 22. – P. 4354-4355.
- 25 White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a guide to methods and applications* // Academic Press, New York, USA. – 1990. – 482 p.
- 26 Yang Y.P., Sheng P., Liu Z., Li W., Wang J.D., Huang W.M., Fan Y.M. Kerion and Tinea Corporis Caused by Rabbit-Derived Trichophyton interdigitale in Three Siblings and One Consulting Doctor Using β -Tubulin Gene to Identify the Pathogen // *Mycopathologia*. – 2016. – 181(7-8). – P. 539-46.