

С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің **Ғылым жаршысы** (пәнаралық) = **Вестник науки** Казахского агротехнического университета им. С.Сейфуллина (междисциплинарный). - 2019. - №3 (102). - С.172-184

## **БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЗООФИЛЬНОГО ШТАММА *TRICHOPHYTON VERRUCOSUM*, ВЫДЕЛЕННОГО ОТ ЧЕЛОВЕКА**

*Кухар Е.В.*

### **Аннотация**

В Казахстане наблюдается увеличение числа заболеваемости людей, вызванной *T. verrucosum*, несмотря на достижения медицинской и ветеринарной микологии. Сделан анализ причин роста заболеваемости зоофильной трихофитией среди популяций в городской среде и в сельской местности, где контакт с животными более частый. Указаны проблемы высокого уровня зараженности сельскохозяйственных животных дерматомикозами в Казахстане. Авторами проведены исследования по изучению биологических свойств зоофильного штамма *Trichophyton verrucosum*, вызвавшего заражение человека, с использованием классических и современных методов: поверхностного культивирования, роста на дифференциальных средах, микроскопии в агаровых блоках и скотч-препаратах, молекулярно-генетической идентификации. Штамм *T. verrucosum* отличался высокой полиморфностью культуральных признаков, наличием типичных морфологических структур, высокой глюколитической и слабой уреазной активностью. Авторы подтвердили заражение пациента зоофильным штаммом дерматомицета *Trichophyton verrucosum* сиквенс-типированием по Сэнгеру со 100%-ой достоверностью.

**Ключевые слова:** возбудители дерматомикозов, дерматомицеты, зоонозные болезни, питательные среды, трихофития, артроспоры, мицелий, микроконидии, макроконидии.

### **Введение**

Несмотря на высокую частоту встречаемости грибковых инфекций, существует недостаток внимания к ним со стороны мирового научного сообщества. В целом, исследованиям патогенных грибов в последнее время уделялось значительно меньше внимания, чем другим инфекционным агентам. Логично, что в некоторых специальных журналах все чаще

публикуются сообщения либо о появлении вспышек зоонозной трихофитии или микроспории в благополучных странах [1, 2, 3, 4], либо о выявлении новых возбудителей классических микозов [5], или же о заболевании дерматомикозами животных, у которых ранее никогда не встречались эти патологии [6].

Гриб *Trichophyton verrucosum* впервые описал Эмиль Боден в 1902 году. Он распространен по всему миру, вызывает заболевания у животных (крупный рогатый скот, буйволы, зебу, лошади и др.) и человека. В последние годы отмечается тенденция к постепенному росту заболеваемости среди жителей благодаря активной миграции населения. Заболеваемость людей веррукозной трихофитией обычно регистрируется в сельской местности, где контакт с животными более частый. В связи с этим заболеваемость сельского населения в 10-15 раз выше городского [7, 8].

На этом фоне в последние годы в Республике Казахстан прослеживается тенденция увеличения вспышек зоонозной трихофитии у людей, обусловленной зоофильным *Trichophyton verrucosum* [9]. Он являлся одной из распространенных причин стригущего лишая в дореволюционном Казахстане [10]. Не потерял возбудитель своей актуальности и сейчас, особенно в связи с подъемом развития мясного и молочного скотоводства в Республике. Увеличение численности поголовья; скученность и нарушение технологии содержания животных; наложение аборигенной и ввезенной микрофлоры; адаптационные стрессы; отсутствие плановой вакцинации от трихофитии как импортного, так и отечественного скота; наличие стационарных очагов трихофитии на территории Казахстана; высокая устойчивость возбудителя к факторам внешней среды и длительное выживание в пораженных волосах и чешуйках кожи, попавших в почву – все это способствуют массовому за-

ражению поголовья животных и перезаражению персонала животноводческих ферм и членов их семей [11].

Причин роста заболеваемости дерматомикозами человека называется много. Самой актуальной причиной подобного феномена в последнее время считается нарушение экологического равновесия, в том числе, и из-за изменения климата. Эта проблема приводит к тому, что микроорганизмы приобретают новые свойства. В частности, свободноживущие или условно патогенные грибы могут проявлять патогенные и вирулентные свойства, и становятся новыми возбудителями различных микозов у людей и животных [12, 13].

Следующей проблемой необходимо назвать снижение резистентности организма вследствие гиподинамии, сидячего образа жизни, уменьшения двигательной активности; появления хронических незаразных заболеваний, связанных с нарушением обмена веществ (сахарный диабет и другое) [14, с. 29].

Традиционные системы эпиднадзора за инфекционными заболеваниями у людей зачастую действуют отдельно от систем эпизоотического надзора для животных. Следует назвать несогласованность этих органов в Соединенных Штатах и в других странах. Такое разделение препятствует общению должностных лиц по вопросам здоровья человека и животных о случаях зоонозов, которые могут угрожать здоровью человека [15]. Отсутствие государственной программы по диагностике и профилактике дерматофитий животных, недостаток квалифициро-

ванных медицинских и ветеринарных микологов, отсутствие микологических отделов в ветеринарных лабораториях Республики и регламентированных методов диагности-

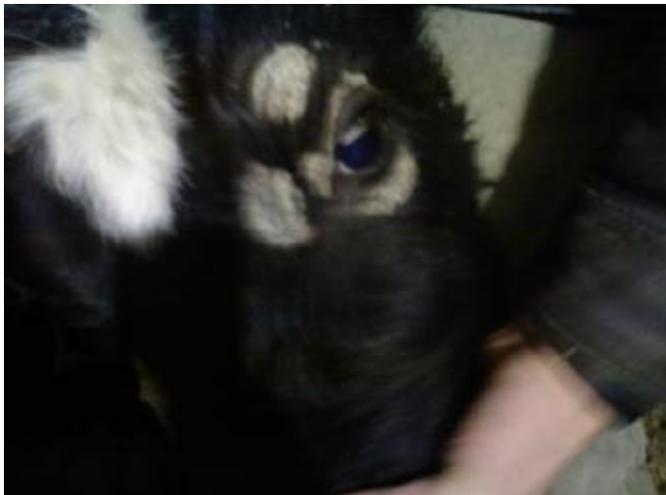


Рисунок 1 – Клинически выраженная трихофития у тельца

В ходе проведения научно-исследовательской работы нами выделены разнообразные возбудители дерматомикозов от животных различных видов и человека, как классические, так и нетрадиционные [16]. Данной статьей мы начинаем цикл публикаций, посвященных

#### **Материалы и методика исследований**

Для выделения культуры гриба *T. verrucosum* использовали пробу биоматериала (соскоб кожи и волосы), полученную в 2012 г. от добровольца А. – больного человека с клиническими признаками дерматомикоза – четко ограниченным очагом поражения кожи на границе волосистой части головы и шеи, имеющего окаймление в виде красного валика. Молодой человек находился в ауле некоторое время и помогал в выпасе телят.

Проводили поверхностное культивирование культуры гриба

ки и выявления микозов приводит к массовому распространению заболеваний среди животных (рисунок 1) и, соответственно, к перезаражению людей (рисунок 2).



Рисунок 2 – Очаг трихофитии, вызванный *T. verrucosum* №41

описанию их биологических свойств.

Цель исследования – изучение биологических свойств и молекулярно-генетическая идентификация возбудителя зоонозной трихофитии человека.

при температуре 28° С до завершения формирования характерных колоний. Для изучения культурально-морфологических свойств полученной культуры гриба *T. verrucosum* использовали бульон Сабуро и агаровые среды: Сабуро, Чапека, медовую, кукурузную и картофельную. Биохимические свойства изучали на средах Гисса с углеводами (глюкоза, лактоза, манноза, манит, сахароза) и среде Кристенсена с 40%-ой мочевиной.

Культуральную и микроскопическую характеристику дермато-

мицета выявляли при культивировании на чашках Петри и агаровых блоках по Кадену.

Микроскопию культуры гриба проводили в скотч-препаратах, нативных и окрашенных по Граму мазках через 24-48-72 и более часов роста в световом микроскопе при увеличении  $\times 40$ . Детально препарат изучали под иммерсионной системой при увеличении  $\times 400$ . Идентификацию проводили с использованием соответствующего определителя [17].

Определение нуклеотидной последовательности целевых генов культуры гриба проводили методом ПЦР по двум парам праймеров ITS 4-ITS 5 и D1-D2, затем пробы ДНК очищали для секвенирования. После

### **Основные результаты исследований НИР**

Представлены результаты выделения штамма дерматомицета, возбудителя зоонозной трихофитией, анализа биологических свойств и молекулярно-генетической идентификации штамма *Trichophyton verrucosum* №41. В лабораторных экспериментах, проведенных на базе лаборатории биотехнологии грибов кафедры микробиологии и биотехнологии КАТУ им. С. Сейфуллина, была получена чистая культура дерматомицета и изучены его биологические свойства: культуральные, морфологические, биохимические. Молекулярно-генетическая характеристика штамма и его идентификация по нуклеотидной последовательности целевых генов дерматомицетов проведена в лаборатории коллективного пользования РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК. Были выявлены

### **Обсуждение полученных данных и заключение**

расшифровки ДНК, результаты вносили в базу данных на сайте [www.ncbi.com](http://www.ncbi.com). Полученные последовательности были идентифицированы в GeneBank по алгоритму BLAST. Идентификация была осуществлена 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 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) [18-21].

характерные морфологические структуры штамма, позволившие идентифицировать его как типичного представителя рода *Trichophyton*, вида *verrucosum*. Культуральные свойства отличались полиморфизмом, выявлены признаки свойственные как варианту *T. album* Sabouraud, 1908, так и варианту *T. ochraceum* Sabouraud, 1909. Анализ биохимических свойств позволил выявить наличие сахаролитических свойств и слабой уреазной активности. Сиквенс-типирование по Сэнгеру с применением двух пар праймеров ITS 4-ITS 5 и D1-D2, позволило идентифицировать данный штамм как *Trichophyton verrucosum* со 100%-ной достоверностью.

Данные результаты определили возможность депонирования штамма в Республиканской коллекции микроорганизмов РК.

Задачами наших исследований являлось изучение культурально-морфологических и биохимических свойств зоофильного штамма *Trichophyton verrucosum* №41, а также молекулярно-генетическая идентификация штамма и депонирование в республиканской коллекции микроорганизмов.

Известно, что телята с 5-ти дневного возраста заражаются *T. verrucosum*, а с месячного возраста, при условии плохого содержания и низкой резистентности, у них уже могут проявиться клинические признаки заболевания. Поэтому они являются основным источником зоонозной трихофитии среди обслуживающего персонала и членов их семей.

В соответствии с классификацией Георга возбудитель трихофитоза животных имеет основное название *Trichophyton verrucosum* Bodin, 1902 (syn: *T. album* Sabouraud, 1908; *T. ochraceum* Sabouraud, 1909; *T. discoides* Sabouraud, 1909; *T. faviforme-med.ac*). *Trichophyton verrucosum* (Bodin) – зоофильный гриб, поражающий волосы по типу крупноспорового эктотрикса. У человека вызывает микозы гладкой

кожи, волосистой части головы, паразитарный сикоз. Основным источником заражения – крупный рогатый скот. Имеет географическое распространение по всему миру.

На питательных средах культуры *T. verrucosum* обычно образуют различные по форме и цвету колонии, медленно развиваются в первых генерациях. Колонии могут иметь возвышения и морщинистость в центре или в виде концентрических зон, центральная из которых приподнята. Обычно только к 25-40 дню развиваются белые, бархатистые или кожистые колонии, плоские или бугристые, края дольчатые, мицелий глубоко погружается в агар. Окраска колоний варьирует от белой до охряно-желтой. Пигмент обратной стороны, при его наличии, желтый.

Первичное выделение проводили культивированием на агаре Сабуро при 28 °С в присутствии антибиотиков.

Рост культуры гриба отмечали в месте посева в виде плотной, четко обозначенной точки белого цвета диаметром 0,2-0,3 см на пятые сутки. Завершение формирования колонии отмечали на 30-е сутки (рисунок 3).



А



Б

Рисунок 3 – Сформированная колония гриба *T. verrucosum* №41 на агаре Сабуро: а – лицевая сторона, б – обратная сторона

Колонии *T. verrucosum* №41 белые, с желтоватым оттенком поверхности центра колонии, окрашенным реверзумом желто-коричневого цвета и интенсивной пигментацией субстрата, отличались наличием хорошо заметных радиальных борозд, выраженной морщинистости. Диаметр зрелых колоний от 2,0-3,0 до 4,0-5,5 см.

Сформированные колонии *T. verrucosum* штамма №41 морфологически неоднородные. Первоначально округлой формы, белые, непрозрачные, плотной консистенции, больше бархатистые, колонии постепенно приобретали зональность с четко выраженными мучнистой, бархатистой и пушистой зонами. С возрастом отмечали полиморфизм, связанный с изменением внешнего вида колоний. Они приобрели очаговую пигментацию мицелия и изменение снежно-белой (*album*) бархатистой поверхности зоны в выраженную желтоватую. В ходе формирования колоний наблюдали нерав-

номерный рост мицелия от центра, появление морщинистости центре колонии, формирование радиальной складчатости.

При дальнейшем культивировании *T. verrucosum* штамма №41 на поверхности колонии отмечали появление нескольких бугристых очагов роста белого пушистого вторичного мицелия.

Обратная сторона колоний (реверзум) окрашена неравномерно. Цвет пигмента реверзума характерный – от соломенного до темно-коричневого. Также с обратной стороны хорошо заметно формирование концентрических кругов. Со временем появились многочисленные разрывы питательной среды.

Анализ края зрелой колонии (рисунок 4) показал, что мицелий разрастается неравномерно. Край колонии неровный, пушистый, формируется складчатость и концентрические кольца, пересекаемые радиальными полосами. Хорошо заметен погруженный мицелий, мощно

выросший в субстрат шириной до 1,0-

1,3 см.

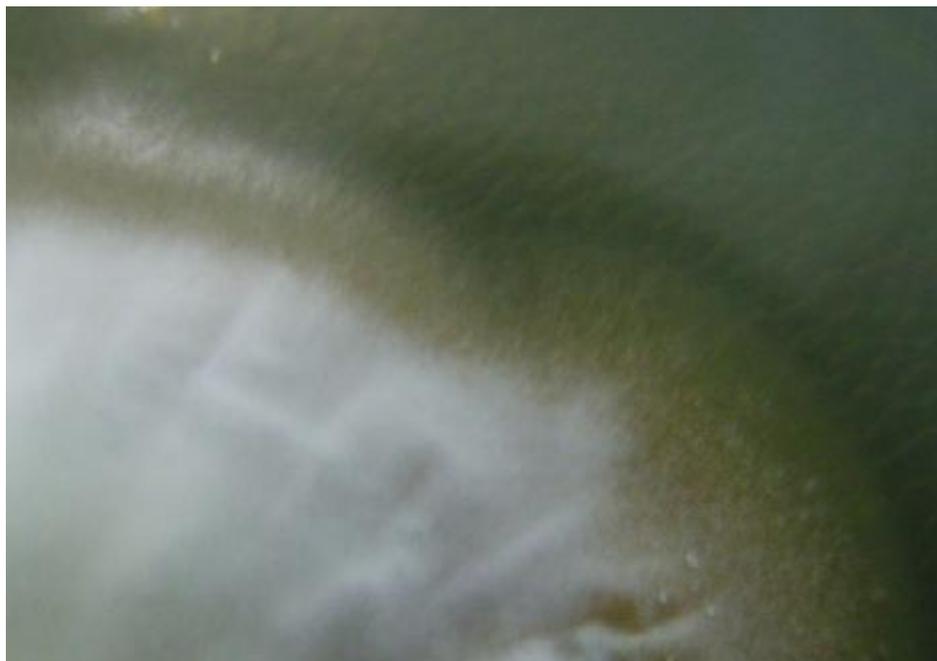


Рисунок 4 – Неровный пушистый край колонии *T. verrucosum* №41 с видимой зоной глубинного роста, агар Сабура, 28 °С, ×40

При последующих пересевах культура гриба *T. verrucosum* штамма №41 отличалась разнообразием культурально-морфологических свойств, особенно при изменении состава питательных сред.

Сравнительный анализ способности к утилизации питательных компонентов показал, что культивирование *T. verrucosum* №41 на средах с различными источниками углеводов приводит к различиям в

скорости и характере роста, структуре, консистенции, плотности колоний данного штамма. Выросшие колонии гриба активно накапливали биомассу, имели выраженную зональность, различную степень пигментации реверзума на питательных агарах с различными источниками углеводов: картофельный (1), медовый (2), кукурузный (3), Чапека (4) (рисунок 5).

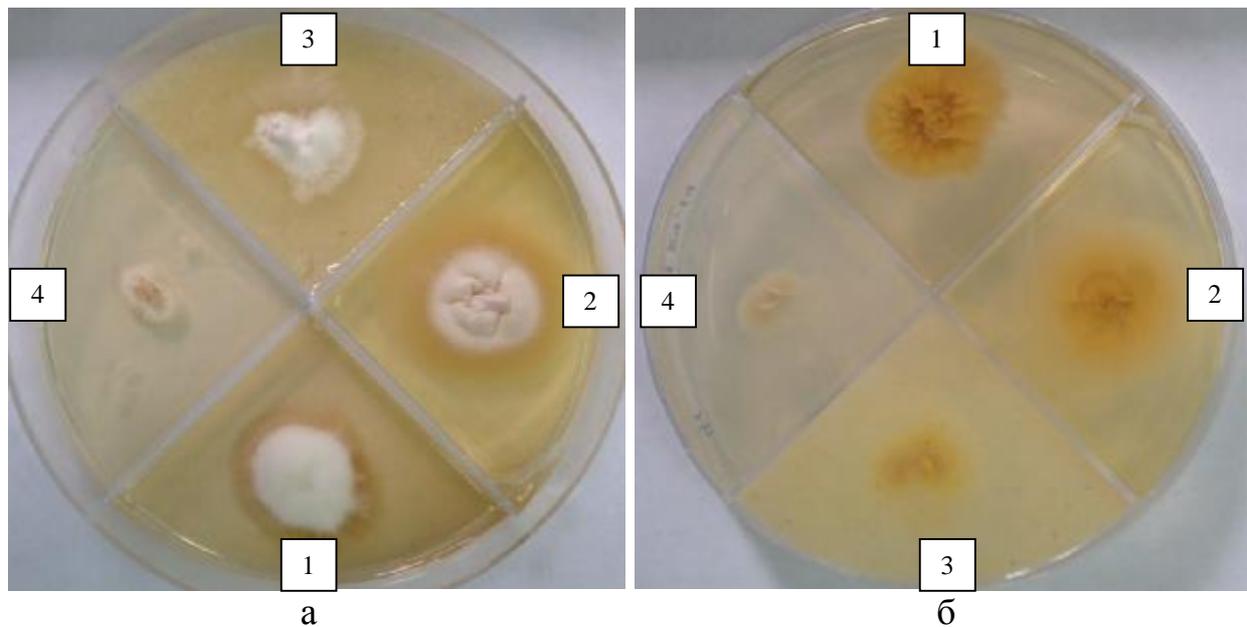


Рисунок 5 – Характер роста колоний *T. verrucosum* №41  
(а – лицевая сторона, б – обратная сторона колонии)

Как видно из рисунка 5, поверхность колоний чрезвычайно полиморфна: гладкая с углублением в центре, пушистая – на картофельном агаре (1), морщинисто-складчатая, бархатистая – на медовой среде (2). У них отмечали выраженную зону роста погруженного мицелия по краю колоний. Особенно широкую зону глубинного роста имела колония, росшая на медовом агаре. Также следует отметить наличие мощных ветвлений в субстрат у *T. verrucosum* №41 на картофельном агаре, практически не заметных с лицевой стороны колонии. На кукурузном агаре колония повторяла форму первоначально выделенной из биоматериала колонии с еле заметной зоной глубинного роста. Имела бархатистую неровную поверхность по центру, пушистый или крошковатый характер по краю колонии (3). На агаре Чапека колония *T. verrucosum* №41 была кожистой по центру, пушистой по краю (4).

Колонии *T. verrucosum* №41 на медовой и картофельной средах имели выраженную пигментацию реверзума. Слабо выражена пигментация колонии на кукурузном агаре. На агаре Чапека дерматомицетом практически не вырабатывается пигмент, еле заметный оттенок реверзума наблюдается по центру колонии.

Максимальную скорость роста гриба отмечали при культивировании на медовом и картофельном агаре. Минимальную скорость роста зафиксировали на безбелковом агаре Чапека с высокими концентрациями солей и наличием глюкозы.

Микроскопический анализ морфологических структур позволил выявить наличие ровного, тонкого, ветвящегося бесцветного мицелия с одиночными микроконидиями. Заметно формирование артростор из зрелого мицелия, редкие многоклеточные макроконидии (рисунок 6).

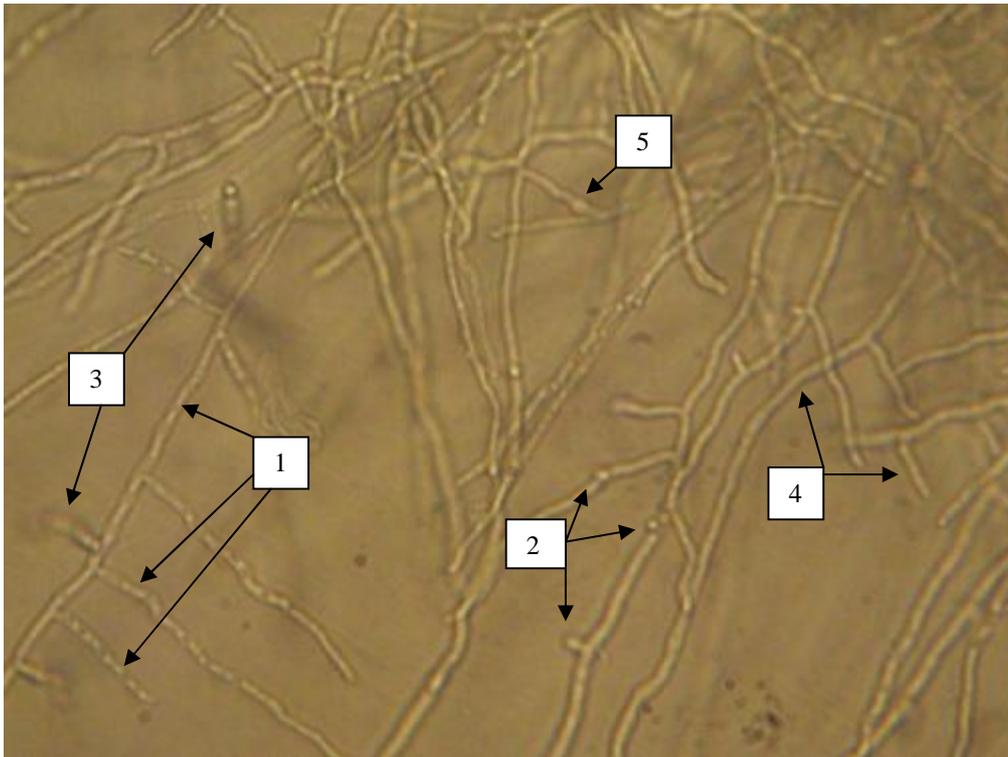


Рисунок 6 – Морфологические структуры *T. verrucosum* №41 в агаровых блоках: артроспоры (1), микроконидии (2) и макроконидии (3), ветвление молодого мицелия (4), хламидоспоры (5). Агар Сабуро, 28 °С, 5 суток, ×400

На рисунке 6 отчетливо виден ровный, ветвящийся септированный мицелий с мелкими булавовидными микроконидиями и редкими многокамерными макроконидиями, формирующимися артроспорами в виде цепочки бус, крупными хламидоспорами.

Ферментативную активность гриба изучали на стандартных средах Гисса с различными сахарами (маннит, мальтоза, сахароза, лактоза, глюкоза) и агаре Кристенсена с 40% раствором мочевины (рисунок 7).

Среды Гисса с сахарами			Среда Кристенсена	
глюкоза	лактоза	маннит	сахароза	мальтоза
			контроль	мочевина

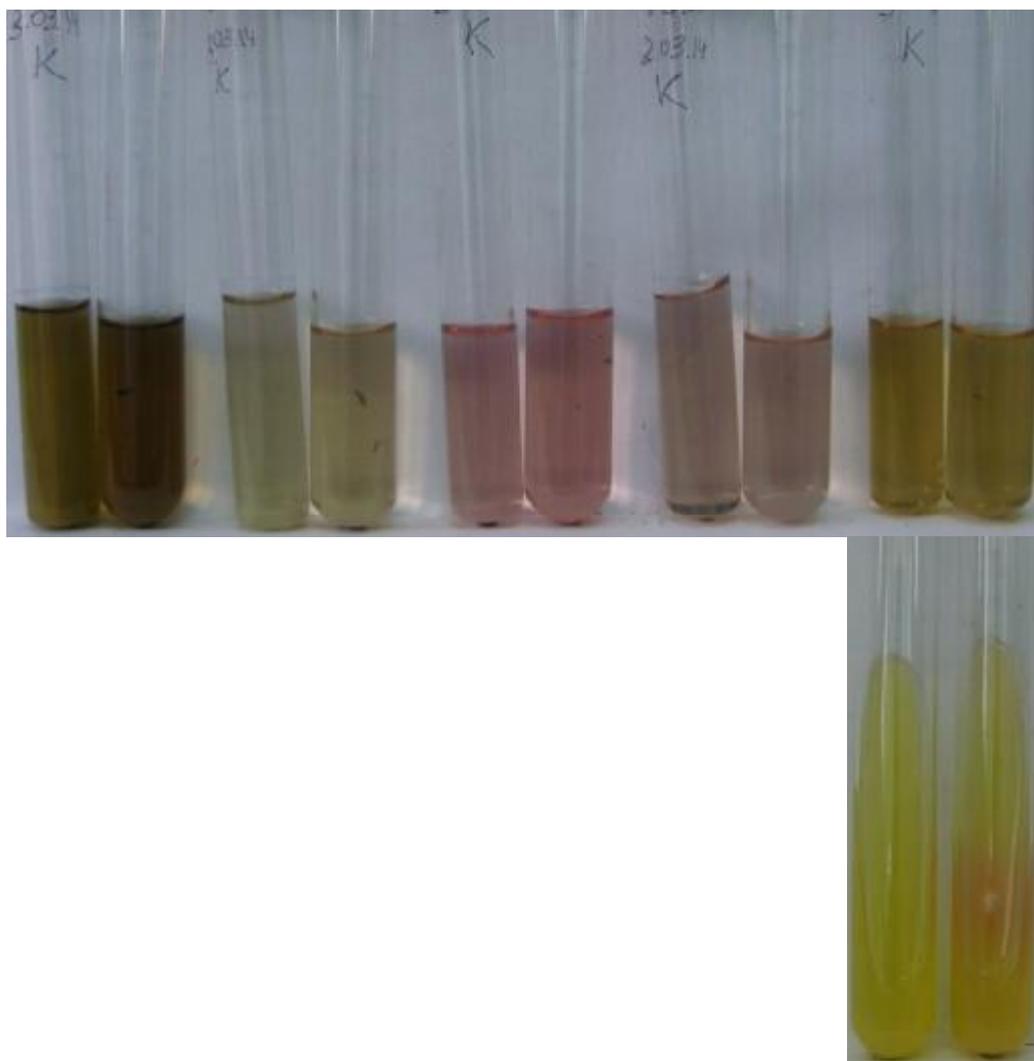


Рисунок 7 – Ферментативные свойства штамма *T. verrucosum* №41

В результате проведенных исследований установили, что культура гриба *T. verrucosum* №41 на средах Гисса интенсивно сбраживает глюкозу, практически не расщепляет остальные сахара. Наблюдается слабая активность фермента уреазы, сопровождающаяся расщеплением мочевины на среде Кристенсена, что сопровождается изменением желтого цвета субстрата на слабо-розовый.

Культивирование штамма *T. verrucosum* №41 на питательных средах в присутствии антибиотиков показало, что он устойчив к пенициллину, стрептомицину,

канамицину, клотримазолу, используемых при первичном выделении культуры из биоматериала для подавления роста банальной микрофлоры: бактерий, дрожжей, плесеней.

Таким образом, результаты изучения культурально-морфологических и биохимических свойств выделенной культуры гриба позволили установить ее принадлежность к виду *Trichophyton verrucosum*.

В результате идентификации гриба методом анализа ITS региона в BLAST получено 100% подтверждение того, что выделенная нами куль-

тура гриба принадлежит роду *Trichophyton*, виду *verrucosum* (таб-лица 1).

Таблица 1 – Результаты идентификации дерматомицета *T. verrucosum* №41 методом анализа ITS региона в BLAST

№ культуры	Последовательность фрагмента 16S r RNA гена	Идентификация нуклеотидных последовательностей в международной базе данных ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a> ) алгоритм BLAST		
		Инвентарный номер GeneBank (Accession number) или коллекционный номер штамма	Наименование штамма	Наименование штамма
41	AAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGAT CATTAACGCGCAGGCCGGAGGCTGGCCCCC ACGATAGGGATCAGCGTTCCATCAGGGGTGT GCAGATGTGCGCCGGCCTTACGCCCCATTCTT GTCTACCTTACTCGGTTGCCTCGGCGGGCCGC GCTCTCCCCGGAGAGTCGTCCGGCGAGCCTCT TCGGGGGCTTTAGCTGGATCGCGCCCCGCCG AGGACAGACATCAAAAAATCTTGAAGAGCTG TCAGTCTGAGCGTTAGCAAGCAAAATCAGTT AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGG CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA GTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATC GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTA TTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTT CAACCCCTCAAGCTCGGCTTGTGTGATGGAC GACCGTCCGGCCCCCTTTTCGGGGGCGGGA CGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGAT TCCGGCTTCTGGGCGAATGGGCAATCAAAC CAGCGCCCTCAGGACCGCCGCTCTGGCCTTC CCCAAATCTCTCTGAGATTTTTTTCAGGTTG ACCTCGGATCAGGTAGGGATA	AB443930.1	<i>Trichophyton verrucosum</i>	100
		AF168126.1	<i>Trichophyton verrucosum</i>	100
		Z98003.1	<i>Trichophyton verrucosum</i>	100

Лиофильное высушивание идентифицированного штамма *T. verrucosum* №41 для длительного хранения проводили в защитной среде с желатином: желатин 1,5% раствор, сахара 10%, агар-агар 0,1%.

Режим замораживания: суспензию клеток в защитной среде разливали в стерильные стеклянные флаконы с резиновыми пробками и металлическими крышечками по 1

см<sup>3</sup>, охлаждали до 70 °С, устанавливали в лиофилизатор и высушивали.

Число жизнеспособных клеток после размораживания составляло не менее 70-80%. Процент выживания определяли путем посева на агар Сабуро суспензии в разведении до  $1 \times 10^{12}$ . На 10-15 сутки появлялся характерный рост колоний в чашках Петри, начиная с разведения  $1 \times 10^7$ .

В настоящее время культура гриба *T. verrucosum* №41 в лиофильно высушенном состоянии хранится

в коллекции микроорганизмов лаборатории биотехнологии грибов, где была первоначально выделена, а также депонирована под названием «F-Tv – 41» в коллекции микроорганизмов Республиканского государственного предприятия на праве хозяйственного ведения «НИИ проблем биологической безопасности» Комитета науки МОН РК.

Выделенная нами культура дерматомицета отличалась характерными культуральными свойствами: первоначально имела снежно-белый цвет, характерный вариантам *T. album* Sabouraud, 1908 [22]. В то же время во время формирования колонии отмечали необычный полиморфизм, обычно несвойственный культурам *T. verrucosum* при первичном выделении.

Он проявлялся в изменении характера поверхности (бархатистая, пушистая, мучнистая), появления желтоватой очаговой пигментации, свойственной вариантам *T. ochraceum* Sabouraud, 1909, неравномерностью характера пигментации. В нашем случае пигмент коричневого цвета на агаре Сабуро накапливался ближе к центру, а интенсивно-желтый – окаймлял край колонии, хотя обычно накопление пигмента прямо пропорционально возрасту колонии. Аналогичные закономерности описывают различные авторы, хотя они указывают на полиморфизм культур в последующих генерациях при пересевах [23].

Наличие такой значительной вариабельности культуральных признаков при первичном выделении связываем с наличием мутаций, вызванных влиянием на организм дерматомицета противогрибковых пре-

паратов, которые самостоятельно применял больной до обращения к врачу по данным анамнеза.

При микроскопическом исследовании культуры обнаруживали бесцветный мицелий, цепочки артроспор и хламидоспоры. Гифы септированные, с редкими булавовидными микроконидиями (4-7×2-3 мкм). Макроконидии – 35-45×4-7 мкм, многоклеточные, в виде нитки бус или стручка фасоли, редкие в поле зрения. Такие морфологические структуры, по данным Б.В. Сбойчкова с соавторами, являются наиболее характерными для *T. verrucosum* [24].

Анализ биохимических свойств указал на типичные характеристики, присущие именно *T. verrucosum*: низкая уреазная активность и активное усвоение углеводов, в частности, глюкозы [25]. Хотя предыдущими исследованиями (Шарипова А.М. с соавт., 2015) описаны штаммы и с более широким диапазоном активности ферментов, к примеру, вакцинный штамм *T. verrucosum* №130, применяемый для изготовления вакцины ЛТФ-130.

Молекулярно-генетическая идентификация гриба посредством анализа ITS региона в BLAST позволила подтвердить результаты культурально-морфологической характеристики выделенной нами культуры гриба и доказать его принадлежность роду *Trichophyton*, виду *verrucosum*.

Полная идентификация штамма с описанием биологических свойств, его высокая патогенность и вирулентность для человека, представляющая научный и практический интерес использования в каче-

стве вакцинного штамма, послужило основанием для его депонирования в Коллекции микроорганизмов «НИИ проблем биологической безопасности» КН МОН РК.

Таким образом, на основании вышеизложенного, можно сделать следующие выводы:

1 Выделенный из биологического материала штамм гриба, является представителем зоофильных дерматофитов *Trichophyton verrucosum*;

2 Штамм *Trichophyton verrucosum* №41 отличается высокой поли-

морфностью культуральных признаков, наличием типичных морфологических структур, высокой глюколитической и слабой уреазной активностью;

3 Анализ нуклеотидной последовательности посредством анализа ITS региона в BLAST позволил подтвердить результаты культурально-морфологической характеристики, полностью идентифицировать и депонировать штамм как представителя рода *Trichophyton*, вида *verrucosum*

### Список литературы

1 Grills C.E., Bryan P.L., O'Moore E., Venning V.A. *Microsporum canis*: report of a primary school outbreak // Australas J Dermatol. – 2007. – 48. – P. 88-90.

2 Morrell J., Stratman E. Primary care and specialty care delays in diagnosing *Trichophyton verrucosum* infection related to cattle exposure // J Agromedicine. – 2011. – 16. – P. 244-50.

3 Pietro Nenoff, Constanze Krüger, Gabriele GinterHanselmayer, Hans-Jürgen Tietz. Mycology – an update. Part 1: Dermatophytes: Causative agents, epidemiology and pathogenesis. // Journal of the German Society of Dermatology. – Deutsche Dermatologische Gesellschaft (DDG). Published by John Wiley & Sons Ltd. | JDDG | 1610-0379/2014/1203. – 2014. – P. 188-210.

4 Moriello K. Feline dermatophytosis: aspects pertinent to disease management in single and multiple cat situations // J Feline Med Surg. – 2014. – 16(5). – P. 419-431.

5 Casadevall A., Kontoyiannis D.P., Robert V. On the emergence of *Candida auris*: climate change, azoles, swamps, and birds. mBio 2019. 10:e01397-19. [Электрон. ресурс]. – 2019. – URL: <https://doi.org/10.1128/mBio.01397-19>. (Дата обращения: 24.07.2019).

6 Peano, Andrea & Tizzani, Paolo & G. Gallo, M & Molinar, Anna & Rambozzi, Luisa & Meneguz, Pier Giuseppe. Dermatophytosis due to *Trichophyton verrucosum* in a chamois (*Rupicapra rupicapra*) // European Journal of Wildlife Research. – 2007. – 54. – P. 153-156.

7 Степанищева А.С. *Trichophyton verrucosum* как биообъект промышленной микробиологии [Электрон. ресурс]. – 2019. – URL: [https://rep.polessu.by/bitstream/123456789/15401/1/53Stepanishcheva%20A.S\\_Trichophyton\\_verrucosum\\_kak%20bioobekt.pdf](https://rep.polessu.by/bitstream/123456789/15401/1/53Stepanishcheva%20A.S_Trichophyton_verrucosum_kak%20bioobekt.pdf). (Дата обращения: 25.07.2019).

8 Титова Т.Н. Разработка и оценка информативности нового способа детекции *Microsporium canis*, *Trichophyton verrucosum* и *Trichophyton mentagrophytes* в клиническом материале: дисс. ... канд. биол. наук: 03.02.03. – Уфа, 2017. – С. 11-14.

9 Кухар Е.В., Байдуйсенова Э.Э., Акимбаева А.К., Нағызбекқызы Э., Пернебекова Д., Шамренова Л. ИФА әдісімен зоонозды дерматомикоздар қоздырғыштарына адамның қан сарысуынан антиденелерді анықтау // Астана медициналық журналы. – Астана, 2007. – № 4. – С. 76-79.

10 Бердыбаев У.Б. Грибковые заболевания в Казахстане. – Алматы: КазГосИздат, 1959. – С. 65.

11 Арысбекова А.Т. Ит, мысық, қоян дерматомикоздардын алдын-алу және емдеу: мал дәр. ғыл. канд ... автореф.: 16.00.03. – Алматы, 2010. – 31 б.

12 Медведева, Т.В. Случай онихомикоза, вызванного *Microsporium canis* / Т.В. Медведева, Г.А. Чилина // Проблемы мед. микологии. – 2011. – Т. 13, № 2. – С. 42-44.

13 Панин А.Н., Маноян М.Г., Овчинников Р.С., Савицкая М.Е. Изменение спектра зооантропофильных дерматофитов, поражающих лошадей // Усп. мед. микологии. – СПб., 2003. – Т. II. – С. 118-119.

14 Буравкова А.Г., Новикова Л.А., Бахметьева Т.М., Бялик Л.Р., Демьянова О.Б., Полуэктова Т.Е. Современные подходы к лечению онихомикозов у больных сахарным диабетом // Пробл. мед. микологии. – СПб., 2008. – Т.10, №2. – С. 29.

15 National Research Council (US) Committee on Achieving Sustainable Global Capacity for Surveillance and Response to Emerging Diseases of Zoonotic Origin; Keusch GT, Pappaioanou M, Gonzalez MC, et al., editors // Washington (DC): National Academies Press (US); 2009. [Электрон. ресурс]. – 2009. – URL: [www.nap.edu](http://www.nap.edu) (Дата обращения: 26.07.2019).

16 Кухар Е.В. Фенотипическая и молекулярно-генетическая характеристика возбудителей дерматофитий и создание тест-систем для диагностики микроспории, руброфитии и гипсовой трихофитии (промежуточный отчет). Инвентарный номер 0212РК01776. – Астана, 2012. – 27 с.

17 Саттон Д., А. Фотергилл, М. Ринальди. Определитель патогенных и условно патогенных грибов / пер. с англ. – М.: Мир, 2001. – 486 с.

18 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.

19 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.

20 Korf I., Yandell M., Bedell J. BLAST. - O'Reilly Media, 2003 – 360 p. 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.

21 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.

22 Papini R, Nardoni S, Fanelli A, Mancianti F. High infection rate of *Trichophyton verrucosum* in calves from Central Italy // Zoonoses Public Health. – 2009. – Vol. 56. – P. 59-64.

23 Notes on the Identification of Common Dermatophytes. David Ellis, Mycology Unit, Women's and Children's Hospital, Adelaide, Australia [Elektronii resurs]  
<https://web.archive.org/web/20070221142501/http://www.mycology.adelaide.edu.au/downloads/DermID2.pdf> – P. 7.

24 Андреев В.А., Зачиняева А.В., Москалев А.В., Сбойчаков В.Б. Медицинская микология: руководство / под ред. Б.В. Сбойчакова – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – С. 69-71.

25 Practical Identification of Common Dermatophytes David Ellis, Mycology Unit, Women's and Children's Hospital, North Adelaide, 5006 Australia Full descriptions and colour illustrations are available in «Mycology Online» [www.mycology.adelaide.edu.au](http://www.mycology.adelaide.edu.au) [Электрон. ресурс]. – 2019. – URL: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/downloads/DermatID.pdf>. – 3 с. (Дата обращения: 25.07.2019).

## References

1 Grills C.E., Bryan P.L., O'Moore E., Venning V.A. *Microsporum canis*: report of a primary school outbreak // Australas J Dermatol. – 2007. – 48. – P. 88-90.

2 Morrell J., Stratman E. Primary care and specialty care delays in diagnosing *Trichophyton verrucosum* infection related to cattle exposure // J Agromedicine. – 2011. – 16. – P. 244-50.

3 Pietro Nenoff, Constanze Krüger, Gabriele GinterHanselmayer, Hans-Jürgen Tietz. Mycology – an update. Part 1: Dermatophytes: Causative agents, epidemiology and pathogenesis. // Journal of the German Society of Dermatology. – 2014. – P. 188-210.

4 Moriello K. Feline dermatophytosis: aspects pertinent to disease management in single and multiple cat situations // J Feline Med Surg. – 2014. – 16(5). – P. 419-431.

5 Casadevall A., Kontoyiannis D.P., Robert V. On the emergence of *Candida auris*: climate change, azoles, swamps, and birds. mBio 2019. 10:e01397-19. [Elektronii resurs]. – 2019. – URL: <https://doi.org/10.1128/mBio.01397-19>. (Дата обращения: 24.07.2019).

6 Peano, Andrea & Tizzani, Paolo & G. Gallo, M & Molinar, Anna & Rambozzi, Luisa & Meneguz, Pier Giuseppe. Dermatophytosis due to *Trichophyton verrucosum* in a chamois (*Rupicapra rupicapra*) // European Journal of Wildlife Research. – 2007. – 54. – P. 153-156.

7 Stepanischeva A.S. *Trichophyton verrucosum* kak bioob'ekt promyshlennoi microbiologii [Elektronii resurs]. – 2019. – URL: [https://rep.polessu.by/bitstream/123456789/15401/1/53Stepanishcheva%20A.S Trichophyton\\_verrucosum\\_kak%20bioobekt.pdf](https://rep.polessu.by/bitstream/123456789/15401/1/53Stepanishcheva%20A.S%20Trichophyton_verrucosum_kak%20bioobekt.pdf). (Data obrascheniya: 25.07.2019).

8 Titova T.N. Razrabotka i otsenka informativnosti novogo sposoba detekzii *Microsporium canis*, *Trichophyton verrucosum* i *Trichophyton mentagrophytes* v klinicheskom materiale: diss. ... kand. biol. nauk: 03.02.03. – Ufa, 2017. – P. 11-14.

9 Kuhar E.V., Baiduisenova A.U., Akimbaeva A.K. Nagyzbekkyzy E., Pernebekova D., Shamrenova L. IFA edisimen zoonozdy dermatomikozdar qozdyrgyshtaryna adamnyn kan sarysuynan antidenelerdi anyktau // Astana medizinalyk zhurnaly. – Astana, 2007. – №4. – P. 76-79.

10 Berdybaev U.B. Gribkovye zabolevaniya v Kazahstane. – Almaty: KazGosIzdat, 1959. – P. 65.

11 Arysbekova A.T. It, mysyk, koyan dermatomikozdardyn aldyn-alu zhene emdeu: mal der. gyl. kand. ... avtoref.: 16.00.03. – Almaty, 2010. – 31 b.

12 Medvedeva T.V. Chilina G.A. Sluchai onihomikoza, vyzvannogo *Microsporium canis* // Problemy med. mikologii. – 2011. – T. 13, №2. – P. 42-44.

13 Panin A.N., Manoyan M.G., Ovchinnikov R.S., Savickaya M.E. Izmenenie spektra zooantropofilnyh dermatofitov, porajayuschih loshadei // Uspehi med. mikologii. – SPb., 2003. – T.II. – P. 118-119.

14 Buravkova A.G., Novikova L.A., Bahmet'eva T.M. Byalik L.R., Dem'yanova O.B., Poluektova T.E. Sovremennye podhody k lecheniyu onihomikozov u bol'nyh saharnym diabetom // Problemy med. mikologii. – 2008. – T.10, №2. – P. 29.

15 National Research Council (US) Committee on Achieving Sustainable Global Capacity for Surveillance and Response to Emerging Diseases of Zoonotic Origin; Keusch GT, Pappaioanou M, Gonzalez MC, et al., editors // Washington (DC): National Academies Press (US); 2009. [Elektronnii resurs]. – 2009. – URL: [www.nap.edu](http://www.nap.edu) (Дата обращения: 26.07.2019).

16 Kuhar E.V. Fenotipicheskaya i molekulyarno-geneticheskaya harakteristika vzbuditelei dermatofitiyi i sozdanie test-sistem dlya diagnostiki mikrosporii, rubrofitii i gipsovoi trihofitii (promejutochnyi otchet). Inventarnyi nomer 0212PK01776. – Astana, 2012. – P. 27.

17 Satton D., Fotergill M., Rinaldi M. Opredelitel patodennyh i uslobno patodennyh gribov / per. s angl. – M.: Mir, 2001. – P. 486.

18 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. – P 482.

19 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.

20 Korf I., Yandell M., Bedell J. BLAST. - O'Reilly Media, 2003 – 360 p. 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.

21 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.

22 Papini R, Nardoni S, Fanelli A, Mancianti F. High infection rate of *Trichophyton verrucosum* in calves from Central Italy // *Zoonoses Public Health*. – 2009. – Vol. 56. – P. 59-64.

23 Notes on the Identification of Common Dermatophytes. David Ellis, Mycology Unit, Women's and Children's Hospital, Adelaide, Australia [Elektronii resurs]<https://web.archive.org/web/20070221142501/http://www.mycology.adelaide.edu.au/downloads/DermID2.pdf> – P. 7.

24 Andreev V.A., Zachinyaeva A.V., Moskalev A.V., Sboichakov V.B. *Meditsinskaya mikologiya: rukovodstvo / pod red. B.V. Sboichakova* – M.: GOETAR-Media, 2008. – P. 69-71.

25 Practical Identification of Common Dermatophytes David Ellis, Mycology Unit, Women's and Children's Hospital, North Adelaide, 5006 Australia Full descriptions and colour illustrations are available in «Mycology Online» [www.mycology.adelaide.edu.au](http://www.mycology.adelaide.edu.au) [Elektronii resurs] – 2019. – URL: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/downloads/DermatID.pdf>. – P. 3. (Дата обращения: 25.07.2019).

## АДАМНАН БӨЛІНІП АЛЫНҒАН *TRICHOPHYTON VERRUCOSUM* ЗООФИЛЬДІ ШТАМЫНЫҢ БИОЛОГИЯЛЫҚ ҚАСИЕТТЕРІ МЕН МОЛЕКУЛЯРЛЫҚ ГЕНЕТИКАЛЫҚ СИПАТТАМАСЫ

Кухар Е.В.

### Түйін

Мақалада адамның жұқтырылуын тудырған *Trichophyton verrucosum* зоофильді штамын бөліп алу және оған сипаттама беру тұрғысында жүргізілген зерттеу нәтижелері келтірілген. өткізілген зерттеулер нәтижесінде біріншілей *Trichophyton verrucosum* ретінде идентифицирленген саңырауқұлақ штаммы алынған, оның өсінділік-морфологиялық, биохимиялық қасиеттері мен молекулярлық генетикалық сипаты зерттеліп, танылған. Зерттеушілер бөліп алған дерматомицет өсіндісі өзіне тән өсінділік қасиеттер танытқан және өзіне тән морфологиялық құрылымда болған, яғни: мицелилері түссіз, микро- және макроконидилері, артроспоралары мен хламидоспоралары байқалатын сипатта болған. Айта кетері колониялар түзілуі барысында біріншілей бөліп алған кезде *T. verrucosum* өсіндісіне тән емес өзгеше түрдегі полиморфизм байқалған.

Сэнгер бойынша жүргізілген сиквенс-типтеу зертханалық зерттеулерді растау мүмкіндігін берген. Сонымен қатар, саңырауқұлақты аймақты ITS талдау әдісімен BLAST жағдайында идентификациялау бөлініп алынған саңырауқұлақ өсіндісінің *Trichophyton* тұқымына қатысты *verrucosum* түріне жататынын 100% растап берген.

**Кілттік сөздер:** дерматомикоз қоздырушылары, дерматомицеттер, зоонозды аурулар, қоректік орталар, трихофития, артроспоралар, мицелилер, микроконидиялар, макроконидиялар

# **BIOLOGICAL PROPERTIES AND MOLECULAR GENETIC CHARACTERISTIC OF THE ZOOPHILIC STRAIN *TRICHOPHYTON VERRUCOSUM*, ISOLATED FROM HUMAN**

*Kukhar Ye. V.*

The article presents the results of researchers connected with isolation and characterization of the zoophilic strain *Trichophyton verrucosum*, which caused the infection of the person. As a result of the research, a strain of the fungus, initially identified as *Trichophyton verrucosum* was obtained, its cultural-morphological, biochemical properties and molecular genetic characteristics were studied. The culture of dermatomycete isolated by us differed by typical cultural properties, had characteristic morphological structures: colorless mycelium, micro- and macroconidia, arthrospores and chlamydospores. At the same time, during the formation of the colony, an unusual polymorphism was noted, usually unusual for *T. verrucosum* cultures during the initial isolation.

Sequencing typing on Sanger allowed to confirm results of laboratory researches. Identification of the fungus by the method of analysis of the ITS region in BLAST obtained 100% confirmation that the culture of the fungus we isolated belongs to the genus *Trichophyton, verrucosum* species.

**Key words:** dermatomycoses pathogens, dermatomycetes, zoonotic diseases, nutrient media, trichophytosis, arthrospores, mycelium, microconidia, macroconidia

## **Благодарность**

Статья подготовлена по результатам исследований, проводимых в рамках гранта по теме №0112РК01358 «Фенотипическая и молекулярно-генетическая характеристика возбудителей дерматофитий и создание тест-систем для диагностики микроспории, руброфитии и гипсовой трихофитии» за 2012-2014 гг. по программе 055 «Научная и/или научно-техническая деятельность» МОН РК и зарегистрированной НИР №0118РКИ0321 «Биология микроскопических грибов – возбудителей микозов кожи сельскохозяйственных животных», выполняемой в 2018-2019 гг.

Выражаю благодарность Смагуловой А.М., Никулиной А.И., Егорчевой Е.В., Шевцову А.Б., за содействие в проведении исследований.