



Филогенетический анализ дерматофитов, выделенных от мелких домашних животных

А. М. Смагулова^{1,2}, Е. В. Кухар¹, Т. И. Глотова², А. Г. Готов²

¹ НАО «Казахский агротехнический исследовательский университет имени С. Сейфуллина» (НАО «КАТУ им. С. Сейфуллина»), г. Астана, Республика Казахстан

² Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СФНЦ РАН (ИЭВСИДВ СФНЦ РАН), р. п. Краснообск, Новосибирская обл., Россия

РЕЗЮМЕ

Дерматофитозы – широко распространенные во всем мире заболевания кожи и ее производных, чаще всего вызываемые грибами родов *Microsporum* и *Trichophyton*. Идентификация вида возбудителя имеет большое эпидемиологическое значение, а также необходима для проведения эффективной терапии. Цель исследований – идентификация и филогенетический анализ дерматофитов, выделенных от собак и кошек на территории Республики Казахстан и Российской Федерации, с помощью молекулярных методов. Видовая принадлежность изолятов грибов была подтверждена секвенированием по двум парам праймеров внутреннего транскрибируемого спейсерного участка (internal transcribed spacer, ITS) рДНК, что позволило депонировать их в базу данных GenBank. На основании результатов секвенирования были идентифицированы *Microsporum canis* (12 штаммов) и *Trichophyton benhamiae* (2 штамма). Проведен анализ нуклеотидных последовательностей и построены филогенетические деревья с учетом результатов идентификации дерматофитов по двум парам праймеров. Построение филогенетического дерева, основанное на отражении родственных связей дерматофитов, показало, что, независимо от использования разных пар праймеров, возбудители рода *Microsporum* и *Trichophyton* во всех случаях достоверно распределены по разным кладам. Анализ структур фрагментов последовательности *ITS4F/ITS5R* позволил выявить генетическое родство штаммов *Trichophyton benhamiae*, впервые выделенных от кошек на территории России, с российским штаммом, изолированным от морской свинки. Сравнительный анализ геномов грибов рода *Microsporum* и *Trichophyton* с референтными штаммами показал относительно невысокий уровень внутривидового полиморфизма и точечных мутаций последовательностей. В результате анализа данных был определен высокий процент гомологии нуклеотидных последовательностей, что позволяет использовать праймеры для проведения полимеразной цепной реакции в качестве диагностического теста при дерматофитозах кошек и собак.

Ключевые слова: дерматофитоз, *Microsporum canis*, *Trichophyton benhamiae*, филогенетическое дерево, гомология, референтный штамм, нуклеотидная последовательность

Благодарности: Работа выполнена в рамках научно-исследовательской темы № 0118РКИ0321 «Биология микроскопических грибов – возбудителей микозов кожи сельскохозяйственных животных» в 2018–2022 гг.

Для цитирования: Смагулова А. М., Кухар Е. В., Глотова Т. И., Готов А. Г. Филогенетический анализ дерматофитов, выделенных от мелких домашних животных. *Ветеринария сегодня*. 2023; 12 (3): 259–264. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-3-259-264.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Глотова Татьяна Ивановна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории биотехнологии – диагностический центр ИЭВСИДВ СФНЦ РАН, 630501, Россия, Новосибирская обл., Новосибирский район, р. п. Краснообск, e-mail: t-glotova@mail.ru.

Phylogenetic analysis of dermatophytes isolated from small domestic animals

A. M. Smagulova^{1,2}, E. V. Kukhar¹, T. I. Glotova², A. G. Glotov²

¹ NCJSC “S. Seifullin Kazakh Agrotechnical Research University” (“S. Seifullin KATU” NCJSC), Astana, Republic of Kazakhstan

² Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East SFSCA RAS, Krasnoobsk, Novosibirsk Oblast, Russia

SUMMARY

Dermatophytoses are diseases of skin and its accessory structures that are widely spread worldwide. They are most commonly caused by fungi of the genera *Microsporum* and *Trichophyton*. The identification of the agent's species has a great epidemiological significance and is essential for effective therapy. The aim of the study is the identification and phylogenetic analysis of dermatophytes isolated from dogs and cats in the Republic of Kazakhstan and the Russian Federation by means of molecular techniques. The fungal isolate species were confirmed by sequencing using two rDNA internal transcribed spacer (ITS) primer pairs, and this allowed for their deposition to the GenBank database. Based on the sequencing results, *Microsporum canis* (12 strains) and *Trichophyton benhamiae* (2 strains) were identified. The nucleotide sequences were analysed, and phylogenetic trees were constructed, taking into account the results of the dermatophyte identification using two primer pairs. The constructed phylogenetic trees reflecting the relationships of dermatophytes showed that, irrespective of the primer pairs used, the *Microsporum* and *Trichophyton* pathogens are in all cases reliably assigned to different clades. The analysis of *ITS4F/ITS5R* sequence fragment structures enabled the establishment of genetic relatedness between the *Trichophyton benhamiae* strains first isolated from cats in Russia and the Russian strain recovered from a guinea pig. The comparative analysis of the genomes of the *Microsporum* and *Trichophyton* fungi and reference strains revealed a relatively low level of intraspecies polymorphism and point mutations of the sequences. The data analysis demonstrated a high percentage of nucleotide sequence homology, and this allows using the primers for PCR tests intended for dermatophytosis diagnosis in cats and dogs.

Keywords: dermatophytosis, *Microsporum canis*, *Trichophyton benhamiae*, phylogenetic tree, homology, reference strain, nucleotide sequence

Acknowledgements: The study was conducted within research topic No. 0118RKI0321 "Biology of microfungi – livestock dermatomycosis agents" in 2018–2022.

For citation: Smagulova A. M., Kukhar E. V., Glotova T. I., Glotov A. G. Phylogenetic analysis of dermatophytes isolated from small domestic animals. *Veterinary Science Today*. 2023; 12 (3): 259–264. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-3-259-264.

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

For correspondence: Tatyana I. Glotova, Doctor of Science (Biology), Professor, Chief Researcher, Laboratory of Biotechnologies – Diagnostic Center, Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East SFSCA RAS, 630501, Russia, Novosibirsk Oblast, Novosibirsky District, Krasnoobsk, e-mail: t-glotova@mail.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Дерматофиты – кератинофильные грибы, принадлежащие к семейству *Arthrodermataceae* (*Onygenales*, *Ascomycota*), включающие десятки родственных видов, различающихся в основном по их анаморфам или бесполом формам, объединенные в три классических рода: *Trichophyton*, *Microsporum* и *Epidermophyton* [1]. Роды *Trichophyton* и *Microsporum* включают антропофильные, зоофильные и геофильные виды дерматофитов, которые способны вызывать инфекцию преимущественно у людей или животных, встречаются в почве в качестве свободноживущих обитателей. Род *Epidermophyton* включает в себя лишь один вид – *E. floccosum*, который поражает только человека.

Заболевания, вызываемые этими грибами, – дерматофитозы – распространены по всему миру, число случаев заражения ежегодно увеличивается не только у животных, но и у людей. Особое значение имеет распространение дерматофитозов среди мелких домашних животных – кошек и собак, являющихся компаньонами человека [2–4]. *Microsporum canis* и *Trichophyton mentagrophytes* являются наиболее значимыми видами дерматофитов, выделенных от инфицированных собак, кошек и других плотоядных [5, 6].

До недавнего времени диагностика дерматофитозов основывалась на анализе клинических признаков заболевания, которые ненадежны из-за изменчивого характера дерматологических поражений и сходства с другими кожными заболеваниями, имитирующими симптомы, характерные для дерматофитозов [6]. Прямое микроскопическое исследование проб биологического материала, отобранных из очагов поражений, и изолирование культур дерматофитов на питательных средах являются золотым стандартом диагностики дерматофитозов. Однако в некоторых случаях для видовой идентификации может потребоваться дополнительное изучение биохимических свойств выделенных культур дерматофитов. Поэтому видовая идентификация дерматофитов на основе изучения фенотипических свойств является трудоемким процессом, требующим больших затрат времени и высокой квалификации исследователей [7].

Молекулярные методы являются перспективными для прямого обнаружения ДНК грибов в клинических образцах и их видовой идентификации [8]. В настоящее время методы, основанные на определении нуклеотидной последовательности рибосомальных генов, используются для видовой идентификации дермато-

фитов в некоторых странах [9]. Результаты полностью либо частично секвенированных генов рРНК различных видов микроорганизмов поступают в международные базы данных и могут быть использованы в качестве референтных. Сравнение последовательностей генов и отдельных участков генов, кодирующих рибосомальные РНК, может способствовать выявлению родственных связей между дерматофитами [10]. Применение метода мультилокусного микросателлитного типирования было использовано для изучения путей распространения и передачи *M. canis* в Японии [11]. Результаты изучения распространенности *M. canis* среди кошек, собак и людей с помощью молекулярно-генетического типирования с применением прямого (*ITS1* 5'-TC CGTAGGTGAACCTGCGG-3') и обратного (*ITS4* 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') праймеров показало, что домашние и уличные животные, а также кошки и собаки с симптомами или без симптомов заболевания являются основными источниками дерматофитов для человека [12]. Применение молекулярных методов позволило установить этиологическую структуру дерматофитозов в Иране, которая была представлена следующими видами: *M. canis* – 78,5%, *M. gypsum* – 10,7% и *T. mentagrophytes* – 10,7% [13].

Целью исследований было оценить возможность применения молекулярных методов для идентификации и филогенетического анализа дерматофитов, выделенных от собак и кошек на территории Республики Казахстан и Российской Федерации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись нуклеотидные последовательности 5.8, 18, 28S рРНК межгенной области (internal transcribed spacer, внутренний транскрибируемый спейсер, или *ITS*-область) представителей дерматофитов двух родов: *Microsporum* ($n = 12$) и *Trichophyton* ($n = 2$), выделенных от собак и кошек на территории Республики Казахстан и Российской Федерации (табл.).

Амплификацию маркерных генов (*ITS*) проводили в конечном реакционном объеме 25 мкл, содержащем 1× Phusion HF-буфер, 2,5 мМ MgCl₂, 1U Phusion ДНК-полимеразу и 200 мкМ dNTP (New England BioLabs Inc., США), 25 пмоль каждого праймера и 20 нг экстрагированной ДНК из одного образца.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили при следующих условиях термоциклирования: предварительная денатурация ДНК при 95 °C в течение 5 мин,

далее 35 циклов при 95 °C в течение 30 с, при 58 °C в течение 40 с, при 72 °C в течение 50 с и окончательная элонгация 5 мин при 72 °C. Амплифицированные продукты ДНК анализировали на горизонтальном электрофореze в 1,5%-м агарозном геле с использованием 1× TAE буферного раствора и EtBr. Параметры протекания электрофореze – 120 V, 250 мА, 50 W, время реакции – 30 мин. Амплифицированные фрагменты ДНК секвенировали с помощью метода Сэнгера и набора BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США).

Последовательности праймеров использовали такие же, как и для ПЦР.

Для обеспечения точности результатов амплифицированные фрагменты секвенировали с двумя парами праймеров: *ITS1F* прямой (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) и *ITS4R* обратный (TCCTCCGCTTATTGATATGC) [12]; *ITS4F* прямой (TCCTCCGCTTATTGATATGC) и *ITS5R* обратный (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) [14].

Продукты секвенирования изучали на генетическом анализаторе ABI 3130XL (Applied Biosystems, США). Анализ и редактирование хроматограммы проводили с использованием Sequencing Analysis Software v5.2, Patch 2 (Applied Biosystems, США). Полученные последовательности депонировали в международную базу данных GenBank. Множественное выравнивание полученных последовательностей осуществляли с помощью алгоритмов MUSCLE и ClustalW.

Филогенетический анализ проводили по методу максимального правдоподобия и ближайшего соседа с использованием программы для биоинформационного анализа MEGA (v11).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате секвенирования 12 изолятов рода *Microsporium* и 2 рода *Trichophyton* по Сэнгеру с использованием пары праймеров *ITS1F/ITS4R*, 6 изолятов рода *Microsporium* и 2 штаммов рода *Trichophyton* с помощью пары праймеров *ITS4F/ITS5R* были идентифицированы возбудители дерматофитозов кошек и собак *M. canis* и *T. benhamiae*.

Высокий процент совпадений нуклеотидных последовательностей у анализируемых изолятов с референтными штаммами позволил депонировать их в международную базу данных NCBI. Им были присвоены индивидуальные инвентарные номера при регистрации результатов генотипирования

Таблица

Перечень изолятов дерматофитов, выделенных от собак и кошек

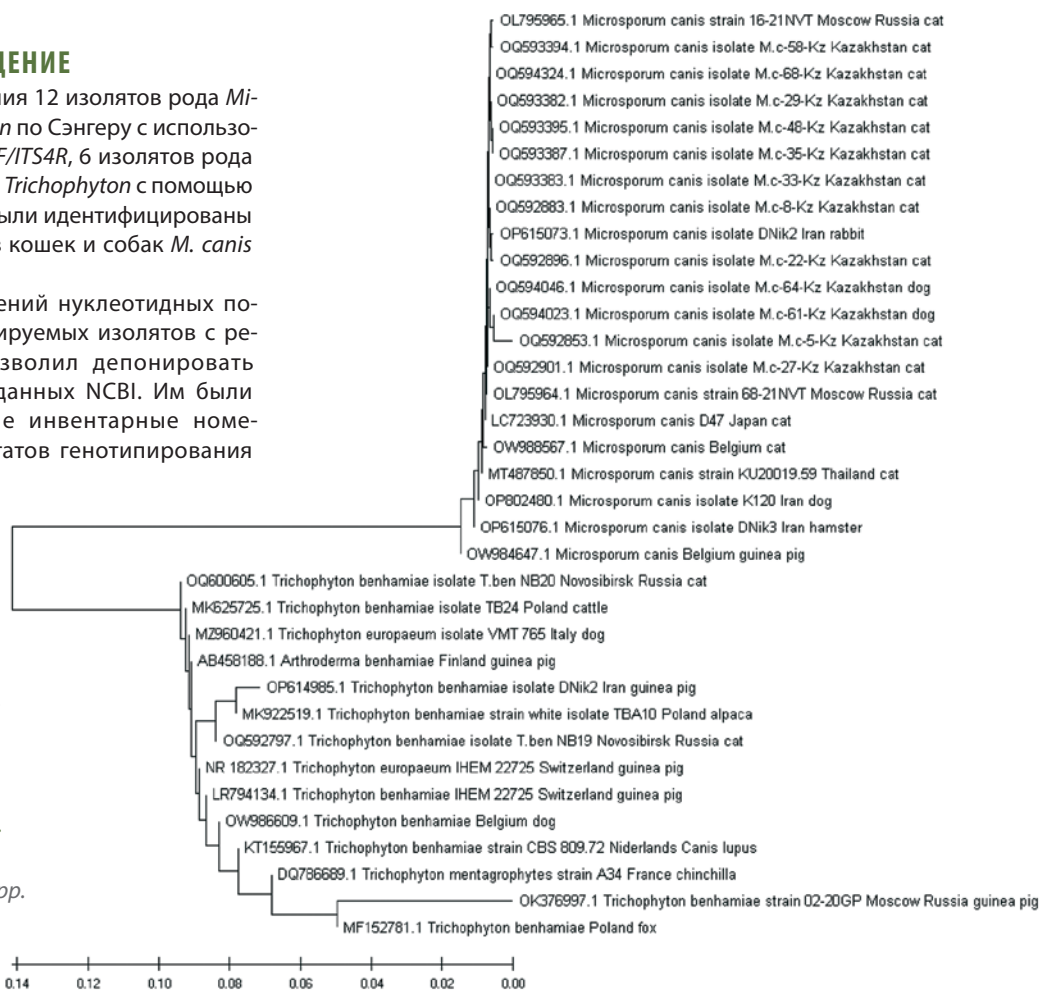
Table

The list of dermatophyte isolates recovered from dogs and cats

№ п/п	Предполагаемый возбудитель	Номер изолята	Дата выделения на питательных средах	Вид животного	Регион
1	Microsporium spp.	5	04.05.2021	кошка	Республика Казахстан
2		8	31.05.2021		
3		22	14.09.2021		
4		27	17.09.2021		
5		29	21.09.2021	кот	
6		33	10.10.2021		
7		35	11.10.2021		
8		48	28.10.2021	кошка	
9		58	21.12.2021		
10		61	25.12.2021	собака	
11		64	25.12.2021		
12	Trichophyton spp.	68	12.01.2022	кошка	Российская Федерация
13	Trichophyton spp.	19	02.12.2021	кошка	
14		20	02.12.2021	кот	

Рис. 1. Филогенетическое дерево, основанное на анализе структур фрагментов последовательности *ITS1F/ITS4R*, дерматофитов *Microsporium* и *Trichophyton* spp.

Fig. 1. Phylogenetic tree of *Microsporium* and *Trichophyton* spp. dermatophytes based on *ITS1F/ITS4R* sequence fragment structure analysis



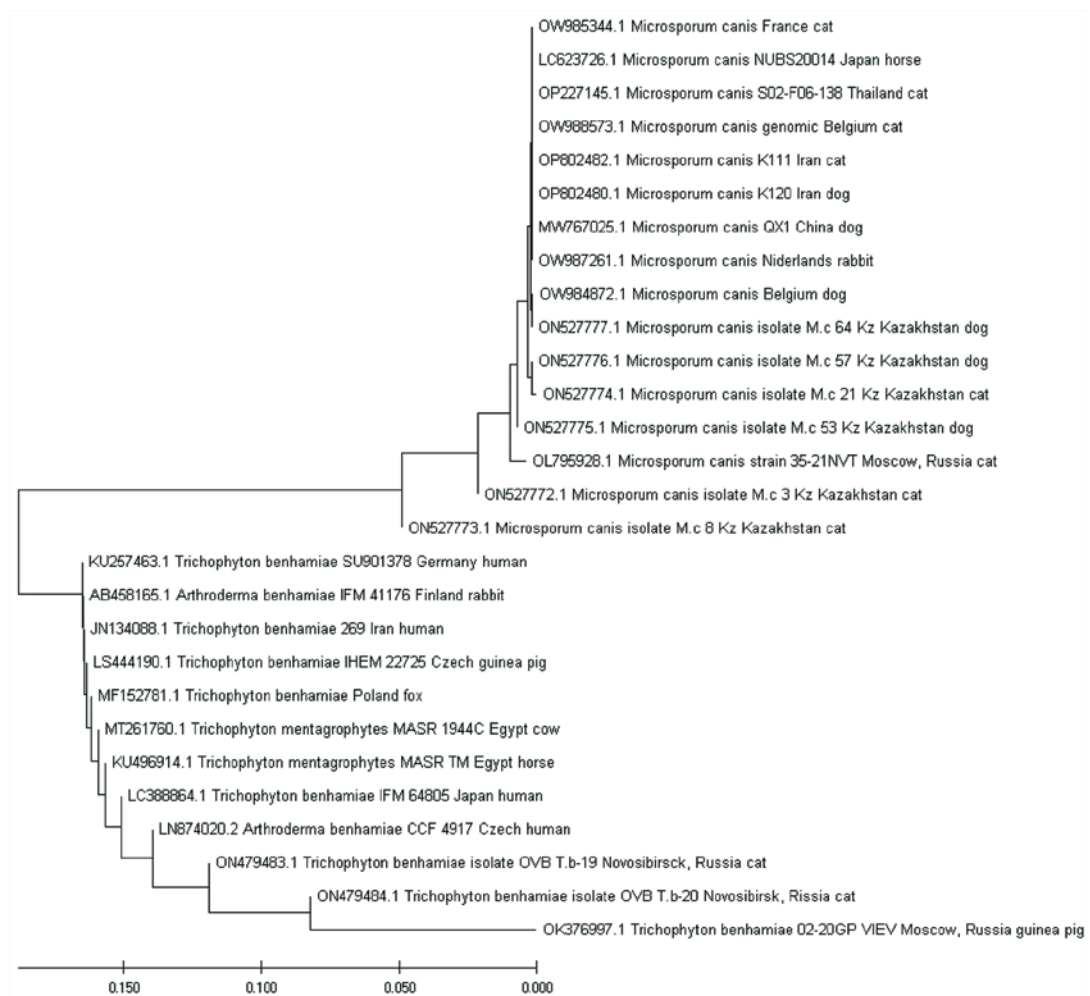


Рис. 2. Филогенетическое дерево, основанное на анализе структур фрагментов последовательности ITS4F/ITS5R, дерматофитов *Microsporium* и *Trichophyton* spp.

Fig. 2. Phylogenetic tree of *Microsporium* and *Trichophyton* spp. dermatophytes based on ITS4F/ITS5R sequence fragment structure analysis

по ITS1F/ITS4R: *M. canis* – OQ592853.1, OQ592883.1, OQ592896.1, OQ592901.1, OQ593382.1, OQ593383.1, OQ593387.1, OQ593395.1, OQ593394.1, OQ594023.1, OQ594046.1, OQ594324.1; *T. benhamiae* – OQ592797.1, OQ600605.1.

При регистрации результатов генотипирования по ITS4F/ITS5R им были присвоены следующие индивидуальные инвентарные номера: *M. canis* – ON527772.1, ON527773.1, ON527774.1, ON527775.1, ON527776.1, ON527777.1; *T. benhamiae* – ON479483.1, ON479484.1.

Для построения филогенетического дерева был проведен поиск типовых представителей дерматофитов родов *Microsporium* и *Trichophyton* по базе данных полных нуклеотидных последовательностей 5.8, 18, 28S рРНК межгенной области для дальнейшего использования их в качестве референтных штаммов для сравнительного филогенетического анализа идентифицированных штаммов.

Эволюционное родство штаммов было выведено с использованием метода Neighbor-joining (объединения соседей) [15]. Филогенетическое дерево построено в масштабе, показывающем эволюционное расстояние, соответствующее 14 заменам на каждые 100 нуклеотидов. Эволюционные расстояния были вычислены с использованием метода максимального составного правдоподобия [16] и выражены в единицах количества

замен оснований на сайт. Все неоднозначные позиции были удалены для каждой пары последовательностей (опция попарного удаления). В итоговом наборе данных было в общей сложности 1419 позиций. Филогенетические деревья, основанные на анализе структур фрагментов последовательности ITS1F/ITS4R и ITS4F/ITS5R, отражающие родственные связи дерматофитов рода *Microsporium* и *Trichophyton*, представлены на рисунках 1 и 2 соответственно.

Отображенный на рисунке 2 оптимальный вариант дерева построен в масштабе, показывающем эволюционное расстояние, соответствующее 15–20 заменам на каждые 100 н. о. Анализ включал 28 нуклеотидных последовательностей. Все неоднозначные позиции были удалены для каждой пары последовательностей (опция попарного удаления). В итоговом наборе данных было в общей сложности 1152 позиции. Эволюционный анализ был проведен с использованием программы для биоинформационного анализа MEGA (v11) [17].

Построение филогенетического дерева, основанное на отражении родственных связей дерматофитов, показало, что, независимо от использования разных пар праймеров, возбудители рода *Microsporium* и *Trichophyton* во всех случаях достоверно распределены по разным кладам. Анализ структур фрагментов последовательности ITS4F/ITS5R позволил установить гене-

тическое родство всех штаммов *T. benhamiae*, впервые изолированных от кошек на территории России, с российским штаммом, выделенным от морской свинки.

Эволюционное родство штаммов, выявленное при анализе данных генома каждого штамма дерматофита, полученных с помощью праймеров *ITS1F/ITS4R*, показано на рисунках 3 и 4.

Для сравнения релевантной последовательности рДНК межгенной области видов *M. canis* были подобраны последовательности из внешней группы исследуемых штаммов.

На рисунке 3 виден высокий уровень гомологии последовательностей 5.8, 18, 28S рДНК межгенной области видов *M. canis*. Последовательности LC723930.1 и MT487850.1 имеют всего по одной нуклеотидной замене, что указывает на точечную мутацию. У OL795964.1 выявлены три мононуклеотидные делеции (т. е. полиморфизм). Наличие всего одной делеции выявлено у OW988567.1, так же как и у последовательности казахстанского штамма OQ594324.1 (отмечено *).

Аналогичными методами провели анализ релевантной последовательности рДНК межгенной области штаммов *T. benhamiae*.

Из представленных на рисунке 4 данных видно, что в последовательности штамма OQ592797.1 (отмечено *) имеются дополнительные нуклеотидные вставки, указывающие на полиморфизм. Второй штамм OQ600605.1 *T. benhamiae* был гомологичен референтным штаммам. Точечные мутации выявлены в последовательностях штаммов OP614985.1, MK922519.1, MK625725.1. Нуклеотидная последовательность штамма OK376997.1 имела две замены, что также свидетельствует о точечных мутациях.

Эволюционное родство штаммов, выявленное при анализе данных генома каждого штамма дерматофита, полученных с помощью праймеров *ITS4F/ITS5R*, показано на рисунках 5 и 6.

Для сравнения релевантной последовательности рДНК межгенной области штаммов *M. canis* были подобраны последовательности из внешней группы исследуемых штаммов.

На рисунке 5 видно, что девять из одиннадцати представленных последовательностей имеют единственный случай полиморфизма, одна последовательность имеет мутацию. Анализируемая последовательность (отмечено *) имеет три нуклеотидные замены.

Сравнительный анализ релевантных последовательностей рДНК межгенной области штаммов вида *T. benhamiae* с помощью праймеров *ITS4F/ITS5R* представлен на рисунке 6.

Как видим, все нуклеотидные последовательности штаммов *T. benhamiae* гомологичны. Последовательности трех штаммов MT261760.1, KU496914.1 и OK376997.1 имеют по одной мутации в каждой. Две нуклеотидные делеции выявлены у штаммов *T. mentagrophytes* MT261760.1 и KU496914.1. Данные штаммы находятся в одном кладе, не являются представителями вида *T. benhamiae*, что достоверно повышает специфичность диагностического теста и позволяет дифференцировать представителей двух видов одного рода.

Штамм OK376997.1 является представителем вида *T. benhamiae*, изолированным от морской свинки. В сравнении с анализируемыми штаммами *T. benhamiae*, выделенными от кошек, его нуклеотидные последовательности имеют одно отличие в виде точечной мутации.

OL795965.1	GAACCTGCGGAAGGATCATTAAACGCGCAAGAGGTGCGAAGTTGGCCCCGGAAGCTCTT
OL795964.1	GAA-CTGCGGAAGGATCA-TAACGCGCAAGAGGTGCGAAGTTGG-CCCCGAAGCTCTT
LC723930.1	GAACCTGCGGAAGGATCATTAAACGCGCAAGAGGTGCGAAGTTGGCCCCGGAAGCTCTT
MT487850.1	GAACCTGCGGAAGGATCATTAAACGCGCAAGAGGTGCGAAGTTGGCCCCGGAAGCTCTT
MT534183.1	GAACCTGCGGAAGGATCATTAAACGCGCAAGAGGTGCGAAGTTGGCCCCGGAAGCTCTT
OP615073.1	GAACCTGCGGAAGGATCATTAAACGCGCAAGAGGTGCGAAGTTGGCCCCGGAAGCTCTT
OP615076.1	GAACCTGCGGAAGGATCATTAAACGCGCAAGAGGTGCGAAGTTGGCCCCGGAAGCTCTT
OP802480.1	GAACCTGCGGAAGGATCATTAAACGCGCAAGAGGTGCGAAGTTGGCCCCGGAAGCTCTT
OW984647.1	GAACCTGCGGAAGGATCATTAAACGCGCAAGAGGTGCGAAGTTGGCCCCGGAAGCTCTT
OW988567.1	GAACCTGCGGAAGGATCATTAAACGCGC-AGAGGTGCGAAGTTGGCCCCGGAAGCTCTT
OQ594324.1*	GAA-CTGCGGAAGGATCATTAAACGCGCAAGAGGTGCGAAGTTGGCCCCGGAAGCTCTT

Рис. 3. Участки нуклеотидных последовательностей 5.8, 18, 28S рДНК межгенной области штаммов *M. canis*, содержащие нуклеотидные замены

Fig. 3. *M. canis* strain intergenic region 5.8, 18, 28S rDNA nucleotide sequence sites containing nucleotide substitutions

DQ786689.1	CCCCCAGCATAGG-GACCAACGTTCCGTCAGGGGTGTCAG-ATGTGCGCCGGC
NR182327.1	CCCCCAGCATAGG-GACCAACGTTCCGTCAGGGGTGTCAG-ATGTGCGCCGGC
MZ960421.1	CCCCCAGCATAGG-GACCAACGTTCCGTCAGGGGTGTCAG-ATGTGCGCCGGC
OW986609.1	CCCCCAGCATAGG-GACCAACGTTCCGTCAGGGGTGTCAG-ATGTGCGCCGGC
OP614985.1	CCCCCAGCATAGG-GACCAACGTTCCGTCAGGGGTGTCAG-ATGTGCGCCGGC
MK922519.1	CCCCCAGCATAGG-GACCAACGTTCCGTCAGGGGTGTCAG-ATGTGCGCCGGC
MK625725.1	CCCCCAGCATAGG-GACCAACGTTCCGTCAGGGGTGTCAG-ATGTGCGCCGGC
MT152781.1	CCCCCAGCATAGG-GACCAACGTTCCGTCAGGGGTGTCAG-ATGTGCGCCGGC
LR794134.1	CCCCCAGCATAGG-GACCAACGTTCCGTCAGGGGTGTCAG-ATGTGCGCCGGC
KT155967.1	CCCCCAGCATAGG-GACCAACGTTCCGTCAGGGGTGTCAG-ATGTGCGCCGGC
OQ600605.1*	CCCCCAGCATAGG-GACCAACGTTCCGTCAGGGGTGTCAG-ATGTGCGCCGGC
OQ592797.1*	CCCCCAGCATAGG-GACCAACGTTCCGTCAGGGGTGTCAG-ATGTGCGCCGGC
OK376997.1	CCCCCAGCATAGG-AACTCAACGTTCCGTCAGGGGTGTCAG-ATGTGCGCCGGC
LN609556.1	CCCCCAGCATAGG-GACCAACGTTCCGTCAGGGGTGTCAG-ATGTGCGCCGGC
AB48165.1	CCCCCAGCATAGG-GACCAACGTTCCGTCAGGGGTGTCAG-ATGTGCGCCGGC
AB48188.1	CCCCCAGCATAGG-GACCAACGTTCCGTCAGGGGTGTCAG-ATGTGCGCCGGC

Рис. 4. Участки нуклеотидных последовательностей 5.8, 18, 28S рДНК межгенной области штаммов *T. benhamiae*, содержащие нуклеотидные замены

Fig. 4. *T. benhamiae* strain intergenic region 5.8, 18, 28S rDNA nucleotide sequence sites containing nucleotide substitutions

OW988573.1	GTCCTCCCCCGGGCTCCCGGGGAGG-TGCGGGGCGGAGGGGTGCTCCGCGCGC
OW987261.1	GTCCTCCCCCGGGCTCCCGGGGAGG-TGCGGGGCGGAGGGGTGCTCCGCGCGC
OW985344.1	GTCCTCCCCCGGGCTCCCGGGGAGG-TGCGGGGCGGAGGGGTGCTCCGCGCGC
OW984872.1	GTCCTCCCCCGGGCTCCCGGGGAGG-TGCGGGGCGGAGGGGTGCTCCGCGCGC
OP802482.1	GTCCTCCCCCGGGCTCCCGGGGAGG-TGCGGGGCGGAGGGGTGCTCCGCGCGC
OP802480.1	GTCCTCCCCCGGGCTCCCGGGGAGG-TGCGGGGCGGAGGGGTGCTCCGCGCGC
OP227145.1	GTCCTCCCCCGGGCTCCCGGGGAGG-TGCGGGGCGGAGGGGTGCTCCGCGCGC
OL795928.1	GTCCTCCCCCGGGCTCCCGGGGAGG-TGCGGGGCGGAGGGGTGCTCCGCGCGC
MW76025.1	GTCCTCCCCCGGGCTCCCGGGGAGG-TGCGGGGCGGAGGGGTGCTCCGCGCGC
ON52776.1*	-TCTCCCCCGGGCTCCCGGGGAGG-TGCGGGGCGGAGGGGTGCTCCGCGCGC
LC623726.1	GTCCTCCCCCGGGCTCCCGGGGAGG-TGCGGGGCGGAGGGGTGCTCCGCGCGC

Рис. 5. Участки нуклеотидных последовательностей 5.8, 18, 28S рДНК межгенной области штаммов *M. canis*, содержащие нуклеотидные замены

Fig. 5. *M. canis* strain intergenic region 5.8, 18, 28S rDNA nucleotide sequence sites containing nucleotide substitutions

ON479484.1	TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAATCAGTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGT
ON479483.1	TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAATCAGTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGT
OK376997.1	TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAATCAGTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGT
MT261760.1	TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAATCAGTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGT
MT152781.1	TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAATCAGTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGT
LS444190.1	TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAATCAGTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGT
LN874020.1	TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAATCAGTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGT
LC38864.1	TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAATCAGTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGT
KU496914.1	TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAATCAGTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGT
KU257463.1	TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAATCAGTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGT
JN134088.1	TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAATCAGTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGT
AB48165.1	TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAATCAGTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGT

Рис. 6. Участки нуклеотидных последовательностей 5.8, 18, 28S рДНК межгенной области штаммов *Trichophyton* spp., содержащие нуклеотидные замены

Fig. 6. *Trichophyton* spp. strain intergenic region 5.8, 18, 28S rDNA nucleotide sequence sites containing nucleotide substitutions

Исходя из полученных данных, следует отметить важность видовой идентификации возбудителей дерматофитозов. Особенно актуальным это является для вида *T. benhamiae* – нового возбудителя дерматофитоза кошек, впервые выделенного нами на территории России [18].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате филогенетического анализа 12 штаммов рода *Microsporium* и 2 штаммов рода *Trichophyton* определен высокий процент гомологии их нуклеотидных последовательностей. Сравнительный анализ фрагментов генов рибосомальной РНК грибов рода *Microsporium* и *Trichophyton* с референтными штаммами в каждом случае показал относительно невысокий уровень внутривидового полиморфизма и точечных мутаций последовательностей. Это указывает на то, что определение нуклеотидных последовательностей генов 5.8, 18, 28S рДНК ITS-области может рассматриваться в качестве быстрого и достоверного метода идентификации близкородственных видов дерматофитов родов *Trichophyton* и *Microsporium*. Выявленное сходство нуклеотидных последовательностей у анализируемых и референтных штаммов дерматофитов указывает на достоверность полученных результатов и возможность применения методов молекулярной диагностики для их видовой идентификации.

Таким образом, метод ITS-ПЦР является достоверным и надежным для идентификации близкородственных видов дерматофитов, что позволяет его использовать для диагностики дерматофитозов кошек и собак.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Gräser Y., Scott J., Summerbell R. The new species concept in dermatophytes – a polyphasic approach. *Mycopathologia*. 2008; 166 (5–6): 239–256. DOI: 10.1007/s11046-008-9099-y.
- Ivaskiene M., Matusevicius A. P., Grigonis A., Zamokas G., Babickaite L. Efficacy of topical therapy with newly developed terbinafine and econazole formulations in the treatment of dermatophytosis in cats. *Pol. J. Vet. Sci.* 2016; 19 (3): 535–543. DOI: 10.1515/pjvs-2016-0067.
- Gordon E., Idle A., DeTar L. Descriptive epidemiology of companion animal dermatophytosis in a Canadian Pacific Northwest animal shelter system. *Can. Vet. J.* 2020; 61 (7): 763–770. PMID: 32655161.
- Paryuni A. D., Indarjulianto S., Widyarini S. Dermatophytosis in companion animals: A review. *Vet. World*. 2020; 13 (6): 1174–1181. DOI: 10.14202/vetworld.2020.1174-1181.
- Chupia V., Ninsuwon J., Piyaungsri K., Sodarath C., Prachasilchai W., Suriyasathaporn W., Pikulkaew S. Prevalence of *Microsporium canis* from pet cats in small animal hospitals, Chiang Mai, Thailand. *Vet. Sci.* 2022; 9 (1):21. DOI: 10.3390/vet9010021.
- Ibrahim M. A., Abdel-Latef G. K., Abdel-Rahim M. M., Aziz S. A. A. Epidemiologic and molecular characterization of zoonotic dermatophytes

from pet dogs and cats in Egypt. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 2021; 9 (12): 2225–2233. DOI: 10.17582/journal.aavs/2021/9.12.2225.2233.

7. Kidd S. E., Weldhagen G. F. Diagnosis of dermatophytes: from microscopy to direct PCR. *Microbiology Australia*. 2022; 43 (1): 9–13. DOI: 10.1071/MA22005.

8. Kondori N., Tehrani P. A., Strömbeck L., Faergemann J. Comparison of dermatophyte PCR kit with conventional methods for detection of dermatophytes in skin specimens. *Mycopathologia*. 2013; 176 (3–4): 237–241. DOI: 10.1007/s11046-013-9691-7.

9. Choi J., Kim S. H. A genome tree of life for the Fungi kingdom. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017; 114 (35): 9391–9396. DOI: 10.1073/pnas.1711939114.

10. Остроумов Л. А., Садовая Т. Н., Беспоместных К. В. Филогенетический анализ типовых штаммов плесеней *Roqueforti*, *Camemberti* рода *Penicillium*. *Техника и технология пищевых производств*. 2010; 3 (18): 107–111. EDN: MVQESD.

Ostroumov L. A., Sadovaya T. N., Bepomestnykh K. V. Phylogenetic analysis of type strains of fungi *Roqueforti*, *Camemberti* genus *Penicillium*. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2010; 3 (18): 107–111. EDN: MVQESD. (in Russ.)

11. Yamada S., Anzawa K., Mochizuki T. Molecular epidemiology of *Microsporium canis* isolated from Japanese cats and dogs, and from pet owners by multilocus microsatellite typing fragment analysis. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2022; 75 (2): 105–113. DOI: 10.7883/yoken.JJID.2020.809.

12. Jarjees K. I., Issa N. A. First study on molecular epidemiology of dermatophytosis in cats, dogs, and their companions in the Kurdistan region of Iraq. *Vet. World*. 2022; 15 (12): 2971–2978. DOI: 10.14202/vetworld.2022.2971-2978.

13. Katirae F., Kouchak Kosari Y., Soltani M., Shokri H., Hassan Minooieanhighi M. Molecular identification and antifungal susceptibility patterns of dermatophytes isolated from companion animals with clinical symptoms of dermatophytosis. *J. Vet. Res.* 2021; 65 (2): 175–182. DOI: 10.2478/jvetres-2021-0020.

14. 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*. Ed. by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White. New York: Academic Press; 1990; 315–322. DOI: 10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1.

15. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987; 4 (4): 406–425. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.

16. Tamura K., Nei M., Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101 (30): 11030–11035. DOI: 10.1073/pnas.0404206101.

17. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* 2021; 38 (7): 3022–3027. DOI: 10.1093/molbev/msab120.

18. Smagulova A. M., Kukhar Ye. V., Glotova T. I., Glotov A. G., Kim A. S. First record of *Trichophyton benhamiae* isolated from domestic cats in Russia. *Med. Mycol. Case Rep.* 2023; 40: 16–21. DOI: 10.1016/j.mmcr.2023.01.001.

Поступила в редакцию / Received 15.05.2023

Поступила после рецензирования / Revised 07.06.2023

Принята к публикации / Accepted 14.08.2023

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Смагулова Айнура Муратовна, магистр, старший научный сотрудник, соискатель, НАО «КАТУ им. С. Сейфуллина», г. Астана, Республика Казахстан; ИЭВСиДВ СФНЦА РАН, р. п. Краснообск, Новосибирская обл., Россия; <https://orcid.org/0000-0002-3067-3666>, e-mail: smagulova-ainura@inbox.ru.

Кухар Елена Владимировна, доктор биологических наук, доцент, НАО «КАТУ им. С. Сейфуллина», г. Астана, Республика Казахстан; <https://orcid.org/0000-0003-3794-434X>, e-mail: kucharev@mail.ru.

Глотова Татьяна Ивановна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, ИЭВСиДВ СФНЦА РАН, р. п. Краснообск, Новосибирская обл., Россия; <https://orcid.org/0000-0003-3538-8749>, e-mail: t-glotova@mail.ru.

Глотов Александр Гаврилович, доктор ветеринарных наук, профессор, главный научный сотрудник, ИЭВСиДВ СФНЦА РАН, р. п. Краснообск, Новосибирская обл., Россия; <https://orcid.org/0000-0002-2006-0196>, e-mail: glotov_vet@mail.ru.

Ainura M. Smagulova, Master, Senior Researcher, External PhD Student, “S. Seifullin KATU” NCJSC, Astana, Republic of Kazakhstan; Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East SFSCA RAS, Krasnoobsk, Novosibirsk Oblast, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-3067-3666>, e-mail: smagulova-ainura@inbox.ru.

Elena V. Kukhar, Doctor of Science (Biology), Associate Professor, “S. Seifullin KATU” NCJSC, Astana, Republic of Kazakhstan; <https://orcid.org/0000-0003-3794-434X>, e-mail: kucharev@mail.ru.

Tatyana I. Glotova, Doctor of Science (Biology), Professor, Chief Researcher, Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East SFSCA RAS, Krasnoobsk, Novosibirsk Oblast, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-3538-8749>, e-mail: t-glotova@mail.ru.

Alexander G. Glotov, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Chief Researcher, Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East SFSCA RAS, Krasnoobsk, Novosibirsk Oblast, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-2006-0196>, e-mail: glotov_vet@mail.ru.