

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-14-18

УДК 616.928.6+616.992.282

А.В. Липницкий, А.М. Маркин, Р.С. Суркова, Д.В. Викторов, А.В. Топорков

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ГИСТОПЛАЗМОЗА

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград, Российская Федерация

Гистоплазмоз – системный микоз, который распространен по всему миру. Наибольшая встречаемость болезни описана на Американском континенте, но она также отмечается в Китае, Индии, Юго-Восточной Азии, Африке, Австралии и Европе. Клинические синдромы гистоплазмоза не специфичны и у большинства иммунокомпетентных индивидуумов не проявляются или отмечаются в виде легкой гриппоподобной болезни. У иммунокомпрометированных пациентов, особенно у больных СПИДом, может развиваться тяжелая и смертельная инфекция в связи с диссеминацией возбудителя во многие органы. Этиологический агент гистоплазмоза – диморфный гриб *Histoplasma capsulatum*, который обитает в почве, контаминированной выделениями птиц или летучих мышей. Установлены три биологических варианта этого гриба: *H. capsulatum* var. *capsulatum*, *H. capsulatum* var. *duboisii* и *H. capsulatum* var. *farciminosum*. Генетические отличия отмечены среди штаммов из различных регионов мира. Основные молекулярные методологии для генетического типирования гриба базируются на выявлении ДНК. Они являются важным инструментом идентификации возможных источников инфекции при вспышках гистоплазмоза. Генетические профили изолятов *H. capsulatum* от летучих мышей и людей помогли установить распределение болезни в определенных эндемичных регионах. Традиционная диагностика гистоплазмоза проводится путем культурального и микроскопического исследования образцов из респираторного тракта и биологических жидкостей. Однако эти приемы дают положительные результаты только в 50 % случаев. В последние два десятилетия на основе технологии ПЦР разработаны подходы по выявлению *H. capsulatum* в клинических образцах с помощью различных молекулярных мишеней. Их использование для подтверждения диагноза может существенно сократить сроки анализа. Молекулярные методы обладают высокой специфичностью и чувствительностью, а также уменьшают риск инфицирования персонала лаборатории. В данном обзоре авторы обсудили недавно опубликованные данные об использовании основных молекулярных методов для диагностики гистоплазмоза.

Ключевые слова: гистоплазмоз, *Histoplasma capsulatum*, молекулярные методы, ПЦР.

Корреспондирующий автор: Липницкий Анатолий Васильевич, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Для цитирования: Липницкий А.В., Маркин А.М., Суркова Р.С., Викторов Д.В., Топорков А.В. Молекулярная диагностика гистоплазмоза. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 3:14–18. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-14-18

A.V. Lipnitsky, A.M. Markin, R.S. Surkova, D.V. Victorov, A.V. Toporkov

Molecular Diagnostics of Histoplasmosis

Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, Russian Federation

Abstract. Histoplasmosis is a systemic fungal disease that occurs worldwide. The highest incidence of the disease is reported on the American continent. It also occurs in China, India, South-Eastern Asia, Africa, Australia and Europe. Clinical syndromes of histoplasmosis are not specific and in most cases immunocompetent individuals are asymptomatic or present mild influenza-like disease. Immunocompromised patients especially individuals with AIDS, can develop a severe and fatal disease due to fungal dissemination to many organs. Etiological agent of histoplasmosis is the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*, which inhabits the soils contaminated with bird or bat droppings. Three biological varieties are considered for this fungus: *H. capsulatum* var. *capsulatum*, *H. capsulatum* var. *duboisii* and *H. capsulatum* var. *farciminosum*. Genetic differences are observed among *H. capsulatum* strains from diverse regions of the world. The main molecular methodologies for genetic typing of fungi are based on DNA fingerprinting. They have been an important instrument to identify possible sources of infection in outbreaks of histoplasmosis. Genetic profiles of *H. capsulatum*, isolated from bats and humans, helped to understand the distribution of the disease in certain endemic regions. The conventional diagnosis of histoplasmosis is performed by means of cultural and microscopic examination of samples from the respiratory tract and biologic fluids. However, these techniques yield positive results in only 50 % of cases. In the last two decades, approaches for the detecting of *H. capsulatum* in clinical samples, using different molecular targets, based on PCR assay have been developed. Their use can shorten the time span of analysis for diagnosis confirmation. Molecular methods have high specificity and sensitivity and reduce the risk of infection for the laboratory personnel. In this study we reviewed the recently published data on the use of main molecular methods for diagnosis of histoplasmosis.

Key words: histoplasmosis, *Histoplasma capsulatum*, molecular methods, PCR.

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

Corresponding author: Anatoly V. Lipnitsky, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Citation: Lipnitsky A.V., Markin A.M., Surkova R.S., Victorov D.V., Toporkov A.V. Molecular Diagnostics of Histoplasmosis. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsiy* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2019; 3:14–18. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-14-18

Received 08.04.19. Revised 19.06.19. Accepted 01.07.19.

Цель работы – оценка молекулярных методов диагностики гистоплазмоза на основе современных данных.

Инфицированность людей в мире эндемическими микозами (гистоплазмозом, кокцидиоидомикозом, бластомикозом, паракокцидиоидомикозом) постоянно возрастает. Возбудители этих микозов – первичные патогены и, в отличие от оппортунистических грибов, вызывают заболевания не только у иммунокомпromетированных, но и у иммунокомпетентных субъектов. Общим для всех возбудителей эндемических микозов является их диморфизм, т.е. существование во внешней среде в мицелиальной, а в организме инфицированных людей и животных – в дрожжевой (тканевой, паразитической) фазе.

Гистоплазмоз – самый распространенный из эндемических микозов. Ежегодно в мире регистрируют более 500 тыс. инфицированных гистоплазмозом людей [1]. Наибольший уровень заболеваемости регистрируют в США (долины рек Огайо и Миссисипи) и в Латинской Америке [2, 3]. Эндемичные регионы выявлены в странах Азии (Индия, КНР, Таиланд) [4–8]. Недавно описаны случаи индигенного гистоплазмоза в Южной Корее [9]. Заболевание выявлено в некоторых африканских странах, преимущественно у ВИЧ-инфицированных [10, 11]. Аутохтонные случаи гистоплазмоза в Европе редки, однако зафиксированы в Испании, Италии, Германии, Турции [12, 13]. Факторы, обуславливающие определенное географическое распределение гистоплазмоза в мире, слабо изучены, но они, как правило, связаны с умеренной температурой воздуха и наличием почв, содержащих гуано летучих мышей или экскременты птиц [1]. Гистоплазмоз встречается у различных видов млекопитающих [14]. Инфицирование происходит при ингаляции спор (микроконидий). Развитие диссеминированной формы чаще происходит у субъектов с иммуносупрессией [15, 16].

На основе фенотипической характеристики род *Histoplasma* разделен на три варианта одного вида: *H. capsulatum* var. *capsulatum*, *H. capsulatum* var. *duboisii* и *H. capsulatum* var. *farcinosum*. Наиболее широко распространен вариант *capsulatum*. Вариант *duboisii* ограничен тропическими зонами в Африке, а вариант *farcinosum* встречается в Европе, Северной Африке, Индии и Юго-Восточной Азии, вызывая заболевание лошадей и мулов (эпизоотический лимфангоит), но не человека [17].

Таксономия. С помощью методов генотипирования, таких как RFLP (restriction fragment length polymorphism), ДНК-гибридизация, RAPD (random amplified polymorphic DNA) и секвенирования ITS-1-5, 8S-ITS2 (internal transcribed spacers) выявлено значительное генетическое разнообразие изолятов *H. capsulatum*, частично связанное с географическим распространением [18]. Установлено, что *H. capsulatum* s. l. является комплексом, состоящим, по меньшей мере, из восьми клад, определенных как Австралийская, Нидерландская, Евразийская,

Северо-Американская (классы 1 и 2 – NAm1, NAm2), Латино-Американская (группы А и В – LAmA, LAmB) и Африканская. За исключением Евразийской, эти клады представляют филогенетические виды. При исследовании популяционной структуры *H. capsulatum* с применением набора разнообразных методов обнаружены еще шесть дополнительных филогенетических видов внутри клад LAmA и LAmB (LAmA1, LAmA2, LAmB1, LAmB2, RJ и BAC-1) [17]. Криптический вид BAC-1 включает только изоляты от мигрирующих видов летучих мышей [19]. Кроме того, результаты молекулярного исследования изолятов, полученных от кошек, обитающих вне известных эндемических регионов гистоплазмоза, показали, что они наиболее близки к кладе NAm1, но представляют отдельный кластер [20].

Традиционные методы диагностики. Традиционная диагностика гистоплазмоза включает микроскопию дрожжевых клеток гриба размером 2–4 мкм для var. *capsulatum* и 6–12 мкм – для var. *duboisii* в тканях или биологических жидкостях. Чаще клетки располагаются внутри мононуклеарных фагоцитов (макрофаги, моноциты), но могут обнаруживаться и внеклеточно. Культивирование гриба лишь в 50 % дает положительные результаты, в основном при исследовании больных с диссеминированной или хронической легочной формами гистоплазмоза [22]. Для получения и идентификации изолятов требуются длительные сроки (до четырех недель). В целях ускоренной диагностики может быть использовано выявление в биологических жидкостях (сыворотка, моча) специфического антигена (галактоманна) *H. capsulatum*, но, как правило, его обнаруживают лишь при диссеминированном гистоплазмозе [23]. Возможны ложноположительные реакции у больных другими эндемическими микозами [24]. Серологические тесты для выявления антител к *H. capsulatum* также достаточно часто сопровождаются перекрестными реакциями с некоторыми грибами (*Blastomyces* spp., *Paracoccidioides* spp., *Coccidioides* spp.) и *Mycobacterium tuberculosis* [25]. Антитела регистрируют через 4–8 недель после острой инфекции, но они могут отсутствовать у больных с иммуносупрессией, особенно у реципиентов трансплантируемых органов [26].

Применение молекулярных методов в диагностических и эпидемиологических исследованиях. Применение молекулярных методов является альтернативой существующих способов диагностики гистоплазмоза. Попытки повышения чувствительности и специфичности диагностических приемов в значительной степени связаны с улучшением способов выделения нуклеиновых кислот гриба. В настоящее время молекулярные методы идентификации *H. capsulatum*, в основном варианты полимеразной цепной реакции (ПЦР), играют существенную роль в диагностике, хотя во многих случаях отсутствует надежная стандартизация метода. В публикациях не всегда приводятся данные о выборе объекта ис-

следования, метода экстракции нуклеиновых кислот, мишени для амплификации. Так, L. Samraio *et al.* [27] показали, что при оценке трех методов экстракции ДНК для постановки ПЦР наилучшим оказался способ на основе коммерческих силикоmemбран.

Для исследования в ПЦР клинического материала от больных гистоплазмозом предложено несколько молекулярных мишеней [28–30]. Чаще используется уникальный фрагмент гена, кодирующего белок в 110 кДа (Hcp100). Этот белок, по-видимому, включается в процессы регуляции, необходимые для адаптации и выживаемости гриба внутри клеток макрофагов [29]. При исследовании клинических образцов чувствительность метода составила 100 %, а специфичность – 95,2 % [31]. J. Hernandez *et al.* [32] исследовали с помощью гнездовой ПЦР с праймерами, комплементарными Hcp100, образец периферической крови иммунокомпетентного пациента с синдромом глазного гистоплазмоза (OHS). Секвенс-анализ ПЦР-продукта показал идентичность в 97 % с референтной последовательностью гена, а лечение антимикотиками привело к улучшению зрения. Кроме того, ПЦР в режиме реального времени (РТ-ПЦР) на основе Hcp100-гена успешно использована для выявления *H. capsulatum* в фиксированных формалином парафинизированных тканях от больных гистоплазмозом [33].

С праймерами, сконструированными для амплификации локуса Hcp100, C. Shell *et al.* [34] оценили возможность использования для быстрой диагностики гистоплазмоза метода LAMP (loop-mediated isothermal amplification). Чувствительность метода оценивали на образцах ДНК, экстрагированных из 91 клинического изолята гриба, а специфичность – на ДНК 50 штаммов других видов грибов и *Mycobacterium tuberculosis*. При 100 % чувствительности и специфичности метод оказался полезным для выявления ДНК гриба в моче больных. Технологию быстрой и простой изотермальной ДНК-амплификации (RCA-rolling-circle amplification) *in vitro* с использованием зондов-замков (padlock) для идентификации *H. capsulatum* применили J. Furie *et al.* [35]. Новые диагностические маркеры гистоплазмоза предложены на основе panospray tandem масс-спектрометрии. При исследовании образцов мочи больных обнаружены 52 пептида белков *H. capsulatum*, отличающиеся от контрольных образцов [36].

Для идентификации *H. capsulatum* также используют фрагмент в 220 п.н. (1281-1283₍₂₂₀₎). Его специфичность подтверждена Саузерн-блот гибридизацией. С мишенью 1281-1283₍₂₂₀₎ разработана ПЦР, апробированная на образцах из внешней среды и от больных [28]. M. Vuitrago *et al.* [37] разработали вариант количественной РТ-ПЦР (RT-qPCR) на основе ITS1-региона рДНК. По их данным, вариант qPCR превосходил гнездовую ПЦР с Hcp100 и классическую с 1281-1283₍₂₂₀₎. Тем не менее авторы полагают, что для лабораторий с небольшими финансовыми ресурсами более рациональным явля-

ется применение гнездовой и классической ПЦР. M. Frias-de-Leon *et al.* [25] применили ПЦР на основе мишеней Hcp100 и 1281-1283₍₂₂₀₎ при вспышках гистоплазмоза. Семь клинических образцов исследованы также с помощью твердофазного иммуноферментного анализа – enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Антитела к *H. capsulatum* выявлены в ELISA во всех образцах и в шести из них амплифицированы целевые регионы Hcp100 и 1281-1283₍₂₂₀₎ *H. capsulatum*. Из 14 образцов проб почвы только в одном обнаружены генетические мишени (Hcp100 и 1281-1283₍₂₂₀₎). Из этого же образца получена культура гриба. По результатам секвенирования ПЦР-продуктов определено сходство 95–98 и 98–100 % с референтными последовательностями GenBank для Hcp100 и 1281-1283₍₂₂₀₎ соответственно. Оба маркера оказались эффективными для изучения вспышек гистоплазмоза, поскольку идентифицировали патоген как в клинических, так и в природных образцах. При этом диагноз у подавляющего большинства пациентов установлен раньше, чем с помощью ELISA. Однако концентрация ДНК патогена в сыворотках больных даже с высоким титром антител была недостаточной для амплификации [27]. По данным N. Elias *et al.* [38], с помощью мультиплексной ПЦР удалось точно идентифицировать 51 штамм *H. capsulatum* var. *capsulatum*, выделенный из клинических образцов и почвы. Этот вариант ПЦР разработан с использованием комбинации двух пар праймеров, одна из которых была специфичной для *Histoplasma* (Hc1-Hc2), а другая – универсальной для большинства видов патогенных грибов (ITS1-ITS4). Успешная амплификация обоих регионов свидетельствовала о положительном результате, тогда как невозможность амплификации ДНК-мишени в ПЦР с праймерами Hc1-Hc2 при успешной амплификации региона ITS1-ITS4 даже с изолятами близкородственных грибов (в частности, возбудителем паракокцидиоидоза *Paracoccidioides brasiliensis*) указывает на высокую специфичность метода. Возможность использования ITS-региона в качестве специфичной для диагностики гистоплазмоза мишени показана S. Simon *et al.* [39] в РТ-ПЦР с зондом TaqMan. При исследовании 348 образцов от больных гистоплазмозом они определили клиническую чувствительность метода в 95,4 %, а специфичность – в 96 %.

Молекулярными маркерами, используемыми для идентификации *H. capsulatum*, являются также гены специфических М- и Н-антигенов [40]. H. Ohno *et al.* [41] использовали гнездовую ПЦР, основанную на амплификации фрагмента гена М-антигена, при обследовании семи пациентов с подозрением на гистоплазмоз, у пяти диагноз подтвердился.

Новые варианты ПЦР для диагностики гистоплазмоза основаны на выявлении гена, кодирующего N-acetylated- α -linked acidic dipeptidase (NAALAD-аза), присутствующую в сыворотках больных. Секвенирование гена NAALAD-азы выявило высокую степень его консервативности у различных

штаммов гриба (сходство 98,2–100 %) при низкой общности со штаммами генетически родственных грибов, в том числе *Blastomyces dermatitidis* (сходство 85,3 %). РТ-ПЦР со специфическими праймерами (HcN2F/HcN1R) была высокоспецифичной и обладала значительной чувствительностью (10 копий ДНК на реакцию). Для повышения клинической чувствительности разработана гнездовая РТ-ПЦР с дополнительной парой праймеров (HcN4F/HcN4R) [42].

Молекулярная диагностика гистоплазмоза является инструментом для установления границ эндемичных регионов и характеристики штаммов внутри них. Так, по данным М. Muniz *et al.* [43], изоляты *H. capsulatum* из штата Рио-де-Жанейро (Бразилия) группировались в три больших кластера, которые генетически отличались от штаммов из других штатов Бразилии, стран Латинской Америки, Африки и Азии. Исследование вспышки гистоплазмоза в Мексике, связанной с выемкой грунта, показало, что, по данным RAPD-ПЦР, штаммы имеют профиль, соответствующий высоковирулентному референтному штамму E-53, преобладающему в Мексике [44]. Генетический полиморфизм изолятов *H. capsulatum* от летучих мышей и людей помогает установить определенные эндемические регионы гистоплазмоза [45].

Таким образом, представленные материалы свидетельствуют о том, что схема лабораторной диагностики гистоплазмоза может значительно измениться при внедрении технологии молекулярной идентификации изолятов *H. capsulatum*. Стратегия сравнительного секвенирования является новым «золотым стандартом» идентификации возбудителей многих микозов [46]. Этот метод базируется на ПЦР-амплификации выбранного региона геномной ДНК с последующим секвенированием полученных ампликонов. Успех в использовании этой стратегии в значительной степени зависит от наличия надежных данных, представленных в базах данных нуклеотидных последовательностей, результатов секвенирования референтных и других изолятов исследуемого вида и близкородственных микромицетов.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

References / Список литературы

1. Wheat L.J., Azar M.M., Bahr N.C., Spec A., Relich R.F., Hage C. Histoplasmosis. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 2016; 30(1):207–27. DOI: 10.1016/j.idc.2015.10.009.
2. Negroni R. Histoplasmosis en América Latina. *Biomédica: revista del Instituto Nacional de Salud.* 2011; 31(3):301–4. DOI: 10.7705/biomedica.v31i3.597.
3. Colombo A.L., Tobón A., Restrepo A., Queiroz-Telles F., Nucci M. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Med. Mycol.* 2011; 49(8):785–98. DOI: 10.3109/13693786.2011.577821.
4. Gopalakrishnan R., Nambi P.S., Ramasubramanian V., Ghafur A., Parameswaran A. Histoplasmosis in India: truly uncommon or uncommonly recognized? *J. Assoc. Physicians India.* 2012; 60:25–8. PMID: 23777021.
5. Pan B., Chen M., Pan W., Liao W. Histoplasmosis: a new endemic fungal infection in China? Review and analysis of cases. *Mycoses.* 2013; 56(3):212–21. DOI: 10.1111/myc.12029.
6. Norkaew T., Ohno H., Sriburee P., Tanabe K., Tharavichitkul P., Takarn P., Puengchan T., Bumrungrisi S., Miyazaki Y. Detection of

environmental sources of *Histoplasma capsulatum* in Chiang Mai, Thailand, by nested PCR. *Mycopathologia.* 2013; 176(5–6):395–402. DOI: 10.1007/s11046-013-9701-9.

7. Wang Y., Pan B., Wu J., Bi X., Liao W., Pan W., Gu J. Detection and phylogenetic characterization of a case of *Histoplasma capsulatum* Infection in mainland China. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2014; 90(6):1180–3. DOI: 10.4269/ajtmh.14-0048.

8. De D., Nath U.K. Disseminated histoplasmosis in immunocompetent individuals – not a so rare entity, in India. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 2015; 7(1):e2015028. DOI: 10.4084/MJHID.2015.028.

9. Jung E.J., Park D.W., Choi J.W., Choi W.S. Chronic cavitary pulmonary histoplasmosis in a non-HIV and immunocompromised patient without overseas travel history. *Yonsei Med. J.* 2015; 56(3):871–4. DOI: 10.3349/ymj.2015.56.3.871.

10. Lofgren S.M., Kirsch E.J., Maro V.P., Morrissey A.B., Msuya L.J., Kinabo G.D., Saganda W., Diefenthal H.C., Ramadhani H.O., Wheat L.J., Crump J.A. Histoplasmosis among hospitalized febrile patients in northern Tanzania. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2012; 106(8):504–7. DOI: 10.1016/j.trstmh.2012.05.009.

11. Cottle L.E., Gkrania-Klotsas E., Williams H.J., Brindle H.E., Carmichael A.J., Fry G., Beeching N.J. A multinational outbreak of histoplasmosis following a biology field trip in the Ugandan rainforest. *J. Travel. Med.* 2013; 20(2):83–7. DOI: 10.1111/jtm.12012.

12. Ashbee H.R., Evans E.G., Viviani M.A., Dupont B., Chrystanthou E., Surmont I., Tomsikova A., Vachkov P., Enero B., Zala J., Tintelnot K., The ECMM Working Group on Histoplasmosis. Histoplasmosis in Europe: report on an epidemiological survey from the European Confederation of Medical Mycology Working Group. *Med. Mycol.* 2008; 46(1):57–65. DOI: 10.1080/13693780701591481.

13. Rodriguez-Tudela J.L., Alastruey-Izquierdo A., Gago S., Cuenca-Estrella M., León C., Miro J.M., Nuñez Boluda A., Ruiz Camps I., Sole A., Denning D.W., The University of Manchester in association with the LIFE program. Burden of serious fungal infection in Spain. *Clin. Microbiol. Infect.* 2015; 21(2):183–9. DOI: 10.1016/j.cmi.2014.07.013.

14. Damasceno L.S., Leitão T.M., Taylor M.L., Muniz M.M., Zancopé-Oliveira R.M. The use of genetic markers in the molecular epidemiology of histoplasmosis: a systematic review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2016; 35(1):19–27. DOI: 10.1007/s10096-015-2508-5.

15. Knox K.S., Hage C.A. Histoplasmosis. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2010; 7(3):169–72. DOI: 10.1513/pats.200907-069AL.

16. Horwath M.C., Fecher R.A., Deepe G.S. Jr. *Histoplasma capsulatum*, lung infection and immunity. *Future Microbiol.* 2015; 10(6):967–75. DOI: 10.2217/fmb.15.25.

17. de M. Teixeira M., Patané J.S., Taylor M.L., Gómez B.L., Theodoro R.C., de Hoog S., Engelthaler D.M., Zancopé-Oliveira R.M., Felipe M.S., Barker B.M. Worldwide phylogenetic distributions and population dynamics of the genus *Histoplasma*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(6):e0004732. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004732.

18. Vite-Garin T., Estrada-Bárceñas D.A., Cifuentes J., Taylor M.L. The importance of molecular analysis for understanding the genetic diversity of *Histoplasma capsulatum*: an overview. *Rev. Iberoam. Micol.* 2014; 31(1):11–5. DOI: 10.1016/j.riam.2013.09.013.

19. Taylor M.L., Hernández-García L., Estrada-Bárceñas D., Salas-Lizana R., Zancopé-Oliveira R.M., de la Cruz G.S., Galvão-Dias M.A., Curriel-Quesada E., Canteros C.E., Bojórquez-Torres G., Bogard-Fuentes C.A., Zamora-Tehozol E. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats randomly captured in Mexico, Brazil and Argentina, using the polymorphism of (GA)_n microsatellite and its flanking regions. *Fungal Biol.* 2012; 116(2):308–17. DOI: 10.1016/j.funbio.2011.12.004.

20. Arunmozhi Balajee S., Hurst S.F., Chang L.S., Miles M., Beeler E., Hale C., Kasuga T., Benedict K., Chiller T., Lindsley M.D. Multilocus sequence typing of *Histoplasma capsulatum* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues from cats living in non-endemic regions reveals a new phylogenetic clade. *Med. Mycol.* 2013; 51(4):345–51. DOI: 10.3109/13693786.2012.733430.

21. Eisenberg T., Seeger H., Kasuga T., Eskens U., Sauerwald C., Kaim U. Detection and characterization of *Histoplasma capsulatum* in a German badger (*Meles meles*) by ITS-sequencing and multilocus sequencing analysis. *Med. Mycol.* 2013; 51(4):337–44. DOI: 10.3109/13693786.2012.723831.

22. Hage C.A., Ribes J.A., Wengenack N.L., Baddour L.M., Assi M., McKinsey D.S., Hammoud K., Alapat D., Babady N.E., Parker M., Fuller D., Noor A., Davis T.E., Rodgers M., Connolly P.A., El Haddad B., Wheat L.J. A multicenter evaluation of tests for diagnosis of histoplasmosis. *Clin. Infect. Dis.* 2011; 53(5):448–54. DOI: 10.1093/cid/cir435.

23. Hage C.A., Davis T.E., Fuller D., Egan L., Witt J.R. 3rd, Wheat L.J., Knox K.S. Diagnosis of histoplasmosis by antigen detection in BAL fluid. *Chest.* 2010; 137(3):623–8. DOI: 10.1378/chest.09-1702.

24. Durkin M., Connolly P., Kuberski T., Myers R., Kuback B.M., Bruckner D., Pegues D., Wheat L.J. Diagnosis of coccid-

- oidomycosis with use of the Coccidioides antigen enzyme immunoassay. *Clin. Infect. Dis.* 2008; 47(8):e69–73. DOI: 10.1086/592073.
25. Frías-De-León M.G., Ramírez-Bárceñas J.A., Rodríguez-Arellanes G., Velasco-Castrejón O., Taylor M.L., Reyes-Montes M.D.R. Usefulness of molecular markers in the diagnosis of occupational and recreational histoplasmosis outbreaks. *Folia Microbiol. (Praha)*. 2017; 62(2):111–6. DOI: 10.1007/s12223-016-0477-4.
26. Assi M., Martin S., Wheat L.J., Hage C., Freifeld A., Avery R., Baddley J.W., Vergidis P., Miller R., Andes D., Young J.A., Hammoud K., Huprikar S., McKinsey D., Myint T., Garcia-Diaz J., Esguerra E., Kwak E.J., Morris M., Mullane K.M., Prakash V., Burdette S.D., Sandid M., Dickter J., Ostrander D., Antoun S.A., Kaul D.R. Histoplasmosis after solid organ transplant. *Clin. Infect. Dis.* 2013; 57(11):1542–9. DOI: 10.1093/cid/cit593.
27. Sampaio Ide L., Freire A.K., Ogusko M.M., Salem J.I., De Souza J.V. Selection and optimization of PCR-based methods for the detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. *Rev. Iberoam. Micol.* 2012; 29(1):34–9. DOI: 10.1016/j.riam.2011.03.008.
28. Frías De León M.G., Arenas López G., Taylor M.L., Acosta Altamirano G., Reyes-Montes Mdel R. Development of specific sequence-characterized amplified region markers for detecting *Histoplasma capsulatum* in clinical and environmental samples. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(3):673–9. DOI: 10.1128/JCM.05271-11.
29. Dantas K.C., Freitas R.S., Moreira A.P., Silva M.V., Benard G., Vasconcelos C., Criado P.R. The use of nested Polymerase Chain Reaction (nested PCR) for the early diagnosis of *Histoplasma capsulatum* infection in serum and whole blood of HIV-positive patients. *An. Bras. Dermatol.* 2013; 88(1):141–3. DOI: 10.1590/s0365-05962013000100025.
30. Gago S., Esteban C., Valero C., Zaragoza Ó., Puig de la Bellacasa J., Buitrago M.J. A multiplex real-time PCR for identification of *Pneumocystis jirovecii*, *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* in samples from AIDS patients with opportunistic pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(4):1168–76. DOI: 10.1128/JCM.02895-13.
31. Muñoz C., Gómez B.L., Tobón A., Arango K., Restrepo A., Correa M.M., Muskus C., Cano L.E., González A. Validation and clinical application of a molecular method for identification of *Histoplasma capsulatum* in human specimens in Colombia, South America. *Clin. Vaccine. Immunol.* 2010; 17(1):62–7. DOI: 10.1128/CVI.00332-09.
32. Hernández J.M., Muñoz-Cadavid C.O., Hernández D.L., Montoya C., González A. Detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in peripheral blood from a patient with ocular histoplasmosis syndrome. *Med. Mycol.* 2012; 50(2):202–6. DOI: 10.3109/13693786.2011.593050.
33. Koepsell S.A., Hinrichs S.H., Iwen P.C. Applying a real-time PCR assay for *Histoplasma capsulatum* to clinically relevant formalin-fixed paraffin-embedded human tissue. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(10):3395–7. DOI: 10.1128/JCM.01705-12.
34. Scheel C.M., Zhou Y., Theodoro R.C., Abrams B., Balajee S.A., Litvintseva A.P. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(2):483–8. DOI: 10.1128/JCM.02739-13.
35. Furuie J.L., Sun J., do Nascimento M.M., Gomes R.R., Waculicz-Andrade C.E., Sessegolo G.C., Rodrigues A.M., Galvão-Dias M.A., de Camargo Z.P., Queiroz-Telles F., Najafzadeh M.J., de Hoog S.G., Vicente V.A. Molecular identification of *Histoplasma capsulatum* using rolling circle amplification. *Mycoses.* 2016; 59(1):12–9. DOI: 10.1111/myc.12426.
36. Crockett D.K., Kushnir M.M., Cloud J.L., Ashwood E.R., Rockwood A.L. Identification of histoplasma-specific peptides in human urine. *Int. J. Pept.* 2012; 2012:621329. DOI: 10.1155/2012/621329.
37. Buitrago M.J., Canteros C.E., Frías De León G., González A., Marques-Evangelista De Oliveira M., Muñoz C.O., Ramirez J.A., Toranzo A.L., Zancope-Oliveira R., Cuenca-Estrella M. Comparison of PCR protocols for detecting *Histoplasma capsulatum* DNA through a multicenter study. *Rev. Iberoam. Micol.* 2013; 30(4):256–60. DOI: 10.1016/j.riam.2013.03.004.
38. Elias N.A., Cuestas M.L., Sandoval M., Poblete G., Lopez-Daneri G., Jewtuchowicz V., Iovannitti C., Mujica M.T. Rapid identification of *Histoplasma capsulatum* directly from cultures by multiplex PCR. *Mycopathologia.* 2012; 174(5–6):451–56. DOI: 10.1007/s11046-012-9567-2.
39. Simon S., Veron V., Boukhari R., Blanchet D., Aznar C. Detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human samples by real-time polymerase chain reaction. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2010; 66(3): 268–73. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.10.010.
40. Holbrook E.D., Edwards J.A., Youseff B.H., Rappleye C.A. Definition of the extracellular proteome of pathogenic-phase *Histoplasma capsulatum*. *J. Proteome Res.* 2011; 10(4):1929–43. DOI: 10.1021/pr1011697.
41. Ohno H., Tanabe K., Umeyama T., Kaneko Y., Yamagoe S., Miyazaki Y. Application of nested PCR for diagnosis of histoplasmosis. *J. Infect. Chemother.* 2013; 19(5):999–1003. DOI: 10.1007/s10156-013-0548-2.
42. Muraosa Y., Toyotome T., Yahiro M., Watanabe A., Shikanai-Yasuda M.A., Kamei K. Detection of *Histoplasma capsulatum* from clinical specimens by cycling probe-based real-time PCR and nested real-time PCR. *Med. Mycol.* 2016; 54(4):433–8. DOI: 10.1093/mmy/myv106.
43. Muniz Mde M., Morais E., Silva Tavares P., Meyer W., Nosanchuk J.D., Zancope-Oliveira R.M. Comparison of different DNA-based methods for molecular typing of *Histoplasma capsulatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010; 76(13):4438–47. DOI: 10.1128/AEM.02004-09.
44. Muñoz B., Martínez M.A., Palma G., Ramírez A., Frías M.G., Reyes M.R., Taylor M.L., Higuera A.L., Corcho A., Manjarrez M.E. Molecular characterization of *Histoplasma capsulatum* isolated from an outbreak in treasure hunters. *BMC Infect. Dis.* 2010; 10:264. DOI: 10.1186/1471-2334-10-264.
45. Reyes-Montes M.R., Rodríguez-Arellanes G., Pérez-Torres A., Rosas-Rosas A.G., Parás-García A., Juan-Sallés C., Taylor M.L. Identification of the source of histoplasmosis infection in two captive maras (*Dolichotis patagonum*) from the same colony by using molecular and immunologic assays. *Rev. Argent. Microbiol.* 2009; 41(2):102–4. PMID: 19623900.
46. Balajee S.A., Borman A.M., Brandt M.E., Cano J., Cuenca-Estrella M., Dannaoui E., Guarro J., Haase G., Kibbler C.C., Meyer W., O'Donnell K., Petti C.A., Rodriguez-Tudela J.L., Sutton D., Velegraki A., Wickes B.L. Sequence-based identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Mucorales* species in the clinical mycology laboratory: where are we and where should we go from here? *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47(4):877–84. DOI: 10.1128/JCM.01685-08.

Authors:

Lipnitsky A.V., Markin A.M., Surkova R.S., Victorov D.V., Toporkov A.V. Volgograd Research Anti-Plague Institute. 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russian Federation. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Об авторах:

Липницкий А.В., Маркин А.М., Суркова Р.С., Викторов Д.В., Топорков А.В. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Поступила 08.04.19.

Отправлена на доработку 19.06.19.

Принята к публ. 01.07.19.