

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ
(ФГБНУ «ИЭМ»)

На правах рукописи

Пчелин Иван Михайлович

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕРМАТОФИТОВ
РОДА *TRICHOPHYTON* — ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОНИХОМИКОЗА

1.5.11. Микробиология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Доктор медицинских наук
Сергеев Алексей Юрьевич

Санкт-Петербург, 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
1 Обзор литературы	11
1.1 Морфологические и физиологические особенности представителей рода <i>Trichophyton</i>	11
1.2 Классификация грибов рода <i>Trichophyton</i>	13
1.3 Генетическое разнообразие дерматофитов и методы его описания	18
1.4 Генетическое разнообразие в группе видов <i>Trichophyton mentagrophytes</i> / <i>T. interdigitale</i>	24
1.5 Генетическое разнообразие вида <i>Trichophyton rubrum</i>	27
2 Материалы и методы исследования	38
2.1 Фенотипические методы.....	38
2.2 Молекулярно-генетические методы	39
2.3 Статистические методы	51
3 Результаты и обсуждение.....	52
3.1 Фенотипическая характеристика штаммов <i>Trichophyton</i> spp.	52
3.2 Реконструкция филогенетических отношений в роде <i>Trichophyton</i>	54
3.3 Разнообразие и география генотипов ITS <i>Trichophyton mentagrophytes</i> и <i>T. interdigitale</i>	59
3.4 Анализ межвидовых границ в комплексе <i>Trichophyton mentagrophytes</i> / <i>T. interdigitale</i>	66
3.5 Структура популяции гриба <i>Trichophyton rubrum</i>	75
3.6 Сравнение разрешающей способности методов типирования штаммов <i>Trichophyton rubrum</i>	90
4 Выводы.....	91
5 Практические рекомендации.....	92
Заключение.....	93
Список сокращений	94
Список литературы.....	95
Приложение А Нуклеотидные последовательности, полученные в ходе исследования	118
Приложение Б Скрипт puttorights.py	123
Приложение В Скрипт compactor.py	129
Приложение Г Скрипт countriestotable.py	141

Приложение Д Скрипт <code>attributegenotypes.py</code>	145
Приложение Е Скрипт <code>snamestocoordinates.py</code>	150
Приложение Ж Скрипт <code>genotype_vs_tinea.py</code>	153
Приложение З Скрипт <code>accnos.py</code>	156
Приложение И Скрипт <code>incrustator.py</code>	157
Приложение К Скрипт <code>tabletogenemapper.py</code>	162
Приложение Л Скрипт <code>nondouble.py</code>	164

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Онихомикоз является широко распространенным микотическим заболеванием, которым страдает до 8–13% населения Земного шара, и при этом отмечается рост заболеваемости [1]. Проблема онихомикоза особенно характерна для пациентов старшей возрастной группы, и затрагивает 20% населения в популяции старше 60 лет и до 50% лиц старше 70 лет. *Trichophyton rubrum*, *T. interdigitale*, *T. mentagrophytes* — основные возбудители онихомикоза на большинстве территорий (за исключением Австралии, Ирана и части африканских стран) [2-6]. В последние годы лечение дерматомикозов осложняется появлением штаммов дерматофитов, резистентных к противогрибковым средствам [7, 8].

С середины XIX века по вторую половину XX века на основании изучения морфо-биологических свойств изолятов исследователи предложили для рода *Trichophyton* 151 название видовой группы [9]. Современный этап развития микробиологических исследований связан с широким внедрением молекулярно-генетических методов, которые позволяют, в том числе, получать информацию о структуре биологического разнообразия микромицетов и таксономической принадлежности патогенных грибов. Проведенные за последние два десятилетия молекулярные исследования позволили сузить границы рода и синонимизировать значительную часть описанных ранее таксонов, в результате чего современный состав рода *Trichophyton* ограничен 20 видами [10-12]. Этиология дерматомикозов на территории РФ остается неизученной современными методами. В связи с этим, актуально изучение молекулярно-генетических характеристик и генетического разнообразия дерматофитов на территории РФ.

Результаты секвенирования ДНК (по Сенгеру и полногеномного) дерматофитов указывают на то, что современной таксономической схеме этой группы присущ ряд проблем. Среди них — отсутствие выраженных межвидовых

границ между *T. mentagrophytes* и *T. interdigitale*, образующих видовой комплекс. Неизвестна структура популяции гриба *T. rubrum*, основного возбудителя грибкового поражения стоп и ногтей в РФ [13, 14]. Вместе с тем, существует потребность в таксономических схемах, отражающих реальную структуру генетического и функционального разнообразия [15].

Степень разработанности темы исследования

В мировой литературе существует небольшое количество работ, посвященных генетическому разнообразию гриба *T. rubrum*, генетическая структура популяции гриба до сих пор не была описана [16-19]. Проблеме видовых границ между *T. mentagrophytes* и *T. interdigitale* было посвящено фундаментальное исследование Хайдемманна с соавторами [20]. В нем была обнаружена связь между генотипами и происхождением изолятов. Однако оставалось не описанным общее генетическое разнообразие комплекса *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale*. Сведения по генотипам дерматофитов, присутствующих на территории РФ, практически отсутствуют. Таким образом, тема исследования недостаточно разработана во всем мире, и почти не затронута отечественными авторами.

Цели и задачи исследования

Целью настоящего исследования является изучение генетического разнообразия грибов рода *Trichophyton*.

Задачами настоящего исследования являются:

1. Осуществить филогенетический анализ рода *Trichophyton* на основании изучения нуклеотидного полиморфизма региона внутреннего транскрибируемого спейсера рДНК и генов 28S рРНК и бета-тубулина.

2. Изучить разнообразие и географию генотипов ITS *Trichophyton mentagrophytes* и *T. interdigitale*.

3. Установить филогенетические связи внутри комплекса *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* на основании полногеномных последовательностей.

4. Изучить генетический полиморфизм гриба *T. rubrum* на примере изолятов, выделенных от пациентов с дерматомикозами на территории Санкт-Петербурга и Екатеринбурга.

5. Сравнить разрешающую способность типирования изолятов вида *T. rubrum* по локусам нетранскрибируемого спейсера рДНК и по микросателлитному полиморфизму.

Научная новизна исследования

Впервые проведена реконструкция филогенетических отношений в роде *Trichophyton* с использованием отечественных изолятов. Впервые описан полиморфизм белок-кодирующих последовательностей гриба *T. rubrum* и внутривидовой полиморфизм дерматофитов, выделенных на территории РФ. Впервые в РФ получены и опубликованы последовательности региона ITS, локусов *BT2* и *TEF1 α* *T. mentagrophytes*, *T. interdigitale* и *T. rubrum*. Впервые обнаружена неоднородность в географическом распространении генотипов грибов *T. mentagrophytes* и *T. interdigitale*. Изучена молекулярно-генетическая структура популяции гриба *T. rubrum* на территории Санкт-Петербурга и Екатеринбурга.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Определение нуклеотидных последовательностей геномов штаммов комплекса *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale*, получение данных о полиморфизме длин микросателлитных локусов и однонуклеотидном полиморфизме белок-кодирующих генов *T. rubrum* имеют значение для глобальной эпидемиологии дерматомикозов и популяционной генетики.

Новые данные о невозможности разделения штаммов *T. mentagrophytes* и *T. interdigitale* методами филогенетического анализа вносят вклад в установление их таксономического статуса.

На основании систематического анализа содержимого базы данных Генбанк выявлены генотипы гриба *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* с ограниченным географическим распространением, что имеет важное значение при проведении глобальных эпидемиологических исследований.

Десять разработанных универсальных скриптов для анализа нуклеотидных последовательностей грибов и форматирования файлов данных с длинами микросателлитных локусов могут быть использованы для обработки больших объемов информации, вносят вклад в методологию биоинформационного анализа.

Методология и методы исследования

Настоящая диссертационная работа основана на серии экспериментальных исследований, проведенных в соответствии с гипотетико-дедуктивной методологией и с применением аналитических, синтетических и индуктивных логических приемов. Были использованы методы медицинской микробиологии, молекулярной генетики и биоинформационные подходы.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования внедрены в образовательный процесс кафедр медицинской микробиологии и дерматовенерологии, работу микологической клиники и НИЛ «Российская коллекция патогенных грибов» ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова.

Положения, выносимые на защиту

1. Грибы *Trichophyton mentagrophytes* и *Trichophyton interdigitale* принадлежат к одному и тому же филогенетическому виду.
2. Популяция гриба *Trichophyton rubrum* на территории Санкт-Петербурга и Екатеринбурга имеет двухчастную структуру.
3. На территории РФ обнаружены пять генотипов комплекса *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale*, имеющих европейское распространение — "FM986750", "KT285210", "MF926358", и глобальное — "JX122216", "KP132819".

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов исследования обусловлена решением задач с использованием репрезентативных выборок изолятов и нуклеотидных последовательностей, а также использованием адекватных методов статистической обработки материала. Результаты исследования апробированы на XVIII-XXI Всероссийских Конгрессах по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (Кашкинских чтениях), проходивших в Санкт-Петербурге в 2015-2018 годах, а также на следующих международных конференциях:

1. «Третья Китайско-российская международная конференция по микробиологии, иммунологии и связанным заболеваниям» (CRICMID), 1–6

сентября 2016 г., Харбин и Пекин, Китай. Доклад «Molecular typing of *Trichophyton rubrum* isolates from Saint Petersburg, Russia».

2. Семинар Международного общества медицинской и ветеринарной микологии «Успехи клинической и фундаментальной науки о дерматофитах» (ISHAM Workshop Developments in Clinical and Fundamental Aspects of Dermatophytes) 29–30 октября 2016 г., Утрехт, Нидерланды. Доклад «New typing scheme for *Trichophyton rubrum* isolates, based on single nucleotide polymorphism».

3. Семинар Международного общества медицинской и ветеринарной микологии «Onygenales» (ISHAM Workshop «Onygenales») 28–29 июня 2018 г., Амстердам, Нидерланды. Доклад «The known diversity of internal transcribed spacer region genotypes of *Trichophyton* spp.».

4. Международная конференция по предотвращению и контролю инфекционных заболеваний (International Conference on the Prevention and Control of Infectious Diseases, ICPCID) 27–29 декабря 2018 г., Харбин, Китай. Доклад «Causative agents of dermatophytoses on agenda: whole genome sequences shed light on the species problem in *Trichophyton mentagrophytes* and *T. interdigitale*».

Личный вклад автора

Автором запланированы, организованы и проведены исследования, определены объемы и методы исследований, проведены микробиологические исследования, обработаны и переведены в цифровой формат результаты исследований, проведена статистическая обработка, выполнен анализ, проведено обобщение и обсуждение результатов, подготовлены публикации по теме диссертации. Доля участия в сборе материала составляет 70%, в обобщении материалов — 95%.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 7 работ. В том числе, 2 статьи в журнале из списка, рекомендованного ВАК и 5 статей в изданиях, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science.

Структура и объем диссертации

Работа изложена на 164 страницах (русскоязычная версия), и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследования и их обсуждения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 200 источников, из них 12 отечественных и 188 зарубежных, и одиннадцати приложений.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Морфологические и физиологические особенности представителей рода *Trichophyton*

Виды рода *Trichophyton* имеют мицелиальное строение, и паразитируют на кератинизированных покровах млекопитающих, включая человека. Согласно характеристике рода, колонии представителей имеют в основном пушистую структуру, их окраска варьирует от белой до желтоватой. Окраска стороны колонии, обращенной к субстрату, — реверзума, может быть кремовой, коричневой, красной или фиолетовой. Гифы тонкостенные, прозрачные. Макроконидии и микроконидии, если присутствуют, располагаются на концах или вдоль недифференцированных гиф. Макроконидии двух- или многоклеточные, тонкостенные и гладкостенные, гиалиновые. Они могут иметь цилиндрическую, булавовидную или сигарообразную форму. Микроконидии тонкие и гладкостенные, гиалиновые, одноклеточные, яйцевидные, грушевидные до булавовидных [10]. Как и большая часть аскомицетов, *Trichophyton* spp. обладают биполярной системой спаривания. Типы спаривания условно обозначаются (+) и (–), также иногда — (A) и (a). При совместном культивировании мицелиев с противоположными типами спаривания образуются плодовые тела — гимнотеции, содержащие аски с аскоспорами [21]. Описание скрещивания изолятов морфологического комплекса *T. mentagrophytes*, опубликованное Айелло и Ченг в 1967 году, возможно, является первым сообщением о совершенной форме гриба рода *Trichophyton*.

В исследованиях второй половины XX века было установлено, что тип спаривания определяется двумя альтернативными вариантами последовательности геномного локуса *MAT*. Гены, кодирующие белок, содержащий альфа-бокс домен (*MAT1-1*) и белок, содержащий домен HMG (*MAT1-2*), фланкированы с 5'-конца генами, кодирующими белок,

контролирующий сборку цитоскелета *SLA2*, субъединицу VIa цитохром с-оксидазы *COX13*, белок, схожий с ДНК-лиазой *APN2*, и два гипотетических белка [22].

Стокдэйл [23] заметил, что бесполое изоляты вызывают реакцию спаривания, указывающую на их тип спаривания, при совместном культивировании со штаммами-тестерами *T. simii*. Как тест Стокдейла, так и более свежие молекулярные данные показали, что большинство признанных бесполок видов дерматофитов включают только один тип спаривания [24]. Поскольку половое размножение наблюдается почти во всех филогенетических ветвях дерматофитов, считается, что клональные линии произошли от полового предка, а другой тип спаривания мог быть утерян или чрезвычайно редок, или вид мог быть получен от одного типа спаривания [25].

В роде *Trichophyton* наблюдается множественный переход к клональному размножению. Например, группа видов *T. benhamiae* содержит 3 клональных линии (*T. concentricum*, *T. benhamiae*, *T. japonicum*), и одну рекомбинирующую, — вид *T. europaeum*, а группа видов *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* содержит две клональных линии и одну рекомбинирующую. В целом, зоонозные и антропонозные *Trichophyton* spp. в отличие от сапронозных дерматофитов других родов характеризуются менее частым половым размножением [26]. Считается, что потеря одного из двух типов спаривания, например, у *T. rubrum*, представляет собой адаптацию к существованию в стабильной экологической нише — на покровах человека [17, 19]. В популяциях, сохраняющих обе идиоморфы локуса *MAT*, они распространены в неравных пропорциях. В недавней работе немецких авторов, количество выявленных изолятов с идиоморфой *MAT1-1* в популяции *T. mentagrophytes* относилось к количеству изолятов с *MAT1-2* как 6 к 24, а в популяции *T. benhamiae* — 15 к 8 [27].

Размеры геномов *Trichophyton* spp. варьируют в пределах от 22,2 (*T. europaeum*) до 24,2 (*T. equinum*) мегабаз. Для дерматофитов характерно малое

количество видоспецифичных генов, вероятно, отражающее их недавнее происхождение от общего предка [28]. У вида *T. rubrum* геном распределен по пяти хромосомам [29]. Сведения по структурной организации генома у других представителей рода отсутствуют.

1.2 Классификация грибов рода *Trichophyton*

С точки зрения систематики, род *Trichophyton* относится к семейству *Arthrodermataceae* аскомицетного порядка *Onygenales*, в который помимо прочих грибов также входят диморфные первичные патогены — возбудители эндемичных глубоких микозов *Blastomyces*, *Histoplasma*, *Coccidioides* и *Paracoccidioides*. Первое научное описание гриба рода *Trichophyton* относится к 1848 году, когда шведский врач Пер Хенрик Мальмстен (1811–1883) описал грибные споры внутри волос больных стригущим лишаем и назвал гриб *Trichophyton tonsurans* (с греческого языка: τριχῶν = волос, φυτό = растение) [30].

С тех пор можно наблюдать процесс усовершенствования таксономической системы дерматофитов. В нем можно условно выделить отдельные этапы, каждый из которых характеризуется ведущей ролью одного из исследовательских методов. Интересно, что в условиях постоянной смены парадигм ни один из них не потерял своего значения. В наиболее авторитетных современных работах можно видеть их применение в едином комплексе [31-33].

Период с конца XIX века по середину XX века можно обозначить как как патогенетический этап развития классификации дерматофитов [34]. Преобладающим методом являлось культивирование дерматофитов на питательных средах, сопровождаемое описанием микро- и макроморфологии колоний, а также тканевых форм дерматофитов [35; 36]. Главными диагностическими признаками стали клинические проявления болезни, строение колоний и морфология конидий — бесполой спор. Несмотря на определенную изменчивость формы спор и регулярное появление неспорносящих культур,

известное как плеоморфизм, эти признаки не утратили своего значения и в настоящее время. Одним из наиболее заметных достижений этого этапа является система Ланжерона и Ванбрезгема [37], в которой дерматофиты включали в себя следующие рода: *Ctenomyces*, *Sabouraudites*, *Trichophyton*, *Langeronia*, *Epidermophyton*. К этому времени была описана большая часть возбудителей дерматомикозов, актуальных в начале третьего десятилетия XXI века.

В середине XX века было обнаружено, что некоторые виды дерматофитов можно различать при помощи физиологических тестов [38, 39]. Долгое время формы дерматофитов, не продуцирующие плодовых тел и половых спор (анаморфы), классифицировали отдельно от половых стадий (телеоморф). Поэтому важным шагом вперед стало введение в исследовательскую практику скрещиваний, при помощи которого было установлено соответствие между родами *Arthroderma* и *Trichophyton* [40-42]. Однако применение биологической концепции вида к рассматриваемой группе порождает противоречия со сложившимся делением, основанным на морфологических признаках и клинической картине вызываемого заболевания. Наиболее яркий пример этих противоречий изложен в работе Кавасаки и соавторов [43]. Японский исследователь скрестил штаммы *T. simii* (тип спаривания +) и *T. mentagrophytes* (тип спаривания -), потомство от этих скрещиваний также могло быть скрещено с *T. mentagrophytes* (+) и *T. benhamiae* (-). *Trichophyton simii* также скрещивался с *T. benhamiae* и *T. rubrum*, а гибрид *T. simii* × *T. rubrum* — с *T. benhamiae*, с образованием зрелых аскоспор. Таким образом, по существу было показано, что все разнообразие рода потенциально укладывается в один биологический вид. Однако следует заметить, что попытки других исследователей скрестить обладающие разными типами спаривания и генетически близкие *T. rubrum* и *T. megninii* не увенчались успехом, равно как и не были воспроизведены эксперименты по скрещиванию *T. rubrum* и *T. simii* [19].

Традиционно, в систематике дерматофитов учитываются клинические признаки вызываемых заболеваний и хозяйные предпочтения гриба. По этим

предпочтениям, *Trichophyton* spp. разделяются на антропонозные и зоонозные виды, при этом антропонозные способны циркулировать только в человеческой популяции, а зоонозные — среди животных, и периодические цепочки передачи возбудителя неспецифическому хозяину быстро обрываются. *Trichophyton mentagrophytes* является исключением из этого правила. Он способен циркулировать как в популяции животных [44], так и человека [45, 46]. По признаку хозяйных предпочтений были разделены виды *T. tonsurans* и *T. equinum* [47].

На современном этапе развития науки, для изучения филогении дерматофитов используются молекулярно-генетические методы, с преобладанием секвенирования ДНК по Сенгеру. Молекулярные методы являются более универсальными и воспроизводимыми по сравнению с фенотипическими методиками. Ранние работы были связаны с получением профилей ПДРФ митохондриальной ДНК, в этот период был упорядочен родовой состав дерматофитов [48], выявлено сходство бесполого *T. interdigitale* и *A. vanbreuseghemii* [49]. Произошел переход сначала к исследованиям одиночных нуклеотидных последовательностей [50], а затем к наборам локусов [10, 51-53]. Среди изученных локусов — фрагмент гена 28S рРНК большой субъединицы рибосом [53], регион ITS [50], фрагменты белок-кодирующих генов *ACT* [51], *BT2* [53, 54], *TEF1 α* [52], *CaM* [55]. Современная классификация в общих чертах была сформирована к 2008 году [24], и все последующие изменения [10, 56] были обусловлены не более глубоким пониманием структуры филогенетических связей, а скорее субъективным пересмотром некоторых решений.

В Таблице 1 приведена синонимия родовых названий из работы де Хога с соавторами [10], — новейшей на 2021 год таксономической сводке по дерматофитам. По современным представлениям, 21 вид рода *Trichophyton* распределен по трем ветвям филогенетического дерева, названным по телеоморфам *T. mentagrophytes*, *T. simii*, *T. benhamiae* и *T. rubrum* (Таблица 2). Наибольшее значение для РФ имеют ветви *T. rubrum* и *T. mentagrophytes* / *T. simii*.

Несмотря на довольно длительную историю изучения этих грибов, границы между видами в ряде случаев остаются недостаточно четко очерченными.

Таблица 1. Синонимия родовых названий дерматофитов [10].

<i>Achorion</i> 1845 = <i>Trichophyton</i> 1848 = <i>Trichomyces</i> 1848 = <i>Ectotrichophyton</i> 1919 = <i>Pinoyella</i> 1919 = <i>Megatrichophyton</i> 1921 = <i>Grubyella</i> 1923 = <i>Bodinia</i> 1923 = <i>Langeronia</i> 1950 = <i>Sabouraudiella</i> 1951 = <i>Kaufmannwolfia</i> 1962
<i>Epidermophyton</i> 1907 = <i>Epidermomyces</i> 1983
<i>Langeronites</i> 1957 (nom. inval.) = <i>Nannizzia</i> 1961 = <i>Favomicrosporon</i> 1967
<i>Microsporum</i> 1843 = <i>Closteroaaleurosporia</i> 1924
<i>Arthroderma</i> 1860 = <i>Keratinomyces</i> 1962 = <i>Ctenomyces</i> 1880

Таблица 2 — Видовой состав рода *Trichophyton*. 22 вид распределен по трем филогенетическим ветвям.

Ветвь <i>T. mentagrophytes</i> / <i>T. simii</i>
<i>Trichophyton equinum</i>
<i>Trichophyton interdigitale</i>
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
<i>Trichophyton quinckeanum</i>
<i>Trichophyton schoenleinii</i>
<i>Trichophyton simii</i>
<i>Trichophyton tonsurans</i>
Ветвь <i>T. benhamiae</i>
<i>Trichophyton africanum</i>
<i>Trichophyton benhamiae</i>
<i>Trichophyton bullosum</i>
<i>Trichophyton concentricum</i>
<i>Trichophyton erinacei</i>
<i>Trichophyton eriotrephon</i>
<i>Trichophyton europaeum</i>
<i>Trichophyton japonicum</i>
<i>Trichophyton persicum</i>
<i>Trichophyton spiraliforme</i>
<i>Trichophyton verrucosum</i>
Ветвь <i>T. rubrum</i>
<i>Trichophyton rubrum</i>
<i>Trichophyton soudanense</i>
<i>Trichophyton violaceum</i>
<i>Trichophyton yaoundei</i>

1.3 Генетическое разнообразие дерматофитов и методы его описания

Разнообразие признаков дерматофитов позволяет объединять их в группы, расположенные в иерархическом порядке [24]. Объясняется данный феномен происхождением от единого общего предка [57-60]. При этом, генератором разнообразия является непрерывный мутационный процесс [61]. Наиболее распространенным способом визуализации иерархической структуры биоразнообразия дерматофитов является построение кладограмм [24, 50, 52, 62]. Исторически это осуществляли разнообразными методами, на основании морфологических и физиологических признаков, а с конца XX века в практику стали входить филогенетические реконструкции на основе последовательностей ДНК. Поскольку связь между морфологическими, физиологическими и протеомными признаками и наследственным материалом не жесткая [31, 63-65], именно последовательности ДНК наиболее пригодны для изучения организации биоразнообразия. По тем же причинам, именно таксономия, основанная на генетической характеристике, является наиболее надежной основой для обсуждения значимых для практики свойств грибов рода *Trichophyton*. Вместе с тем, значимые с практической точки зрения свойства микромицетов, такие как патогенность, устойчивость к лекарственным средствам, эпидемиологический источник, часто коррелируют с таксономической принадлежностью. Подробная молекулярно-генетическая характеристика, нацеленная на выделение внутривидовых генетических линий, позволяет проследить пути распространения инфекции.

Геном дерматофитов является сложной гетерогенной системой, и состоит из участков с разным строением и разными функциями [28, 66]. К основным функциональным классам геномных участков относятся белок и РНК-кодирующие гены, транспозоны и группа «прочих генетических последовательностей», в которую в том числе входят повторы крупных сегментов

и микросателлиты, то есть повторы, в единицу которых входит 1-6 пар оснований [67]. Мутационные изменения накапливаются в разных участках с разной скоростью. Экзоны цитоскелетных белков, гены рибосомных РНК изменяются очень медленно. Интроны белок-кодирующих генов и внутренние транскрибируемые спейсеры рДНК являются умеренно быстро мутирующими последовательностями. Наименее стабильными являются микросателлитные локусы, скорость их мутирования оценивается в пределах 10^{-2} - 10^{-6} событий на локус на клеточное деление [67]. Скорость возникновения точечных мутаций у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на усредненный участок ДНК протяженностью 100 п.н. составляет примерно от $3,3 \times 10^{-6}$ до $1,7 \times 10^{-8}$ мутационных событий на деление [68-70]. Медленно эволюционирующие нуклеотидные последовательности применяются для реконструкции филогенетических отношений между крупными таксонами. Их изменчивости может быть недостаточно для разграничения видов, для чего используются часто мутирующие локусы. Иногда последние также пригодны для типирования штаммов. С другой стороны, в быстро эволюционирующих последовательностях вследствие последовательных нуклеотидных замен в одних и тех же позициях происходит эрозия филогенетического сигнала [71].

Визуализация генетического разнообразия дерматофитов может быть осуществлена по результатам расчета генетических расстояний. Например, при изучении структуры популяции микромицетов при помощи микросателлитного анализа, генетические расстояния могут быть выражены через сумму разностей длин продуктов ПЦР по микросателлитным локусам, нормализованной по общему числу изученных локусов [72]. Недостатком такого подхода является зависимость вклада отдельных локусов от числа нуклеотидов в единице повтора, поскольку одиночная инсерция или делеция локуса с большей длиной единицы повтора будет иметь больший вклад в возникшие различия между аллелями. Поэтому в нашей работе мы использовали расстояния, выраженные

в вероятностях мутационных событий, описываемых с помощью пошаговой мутационной модели [73].

Альтернативный подход к визуализации генетического разнообразия основан на расчете вероятности эволюционных сценариев с использованием различных моделей нуклеотидных замен (метод максимального правдоподобия). Среди наиболее известных моделей можно упомянуть модель Джукса-Кантора JC69 [74], двухпараметрическую модель Кимуры K2P [75] и генерализованную симметричную модель GTR [76]. Модель JC69 основывается на предположении, что все четыре нуклеотида встречаются в нуклеотидной последовательности с равной частотой, и что все типы нуклеотидных замен происходят с одинаковой вероятностью. Двухпараметрическая модель Кимуры различает вероятности транзиций и трансверсий, модель GTR независимо рассматривает скорости всех шести однонуклеотидных замен, и учитывает неодинаковую представленность нуклеотидов в последовательностях. При проведении филогенетической реконструкции методом максимального правдоподобия модели нуклеотидных замен используются для оценки вероятности древ. Данный метод широко распространен в настоящее время в силу высокой достоверности получаемых результатов, и поэтому был использован в настоящей работе для изучения филогении грибов, принадлежащих роду *Trichophyton*.

Кладограммы обладают врожденным свойством представлять связь между двумя узлами единым путем. Как следствие, даже если выравнивание нуклеотидных последовательностей содержит позиции, поддерживающие разные топологии, визуализирована будет только одна. Для оценки степени достоверности ветвлений широко применяется метод бутстреп-анализа [77]. Суть его заключается в построении множества древ (как правило, 100 или 1000) на неполных наборах данных. При этом ветви дерева, построенного на полном наборе данных, появляются в полученной выборке с определенной частотой, которая и представляет собой уровень поддержки. Однако, уровень бутстреп-поддержки может быть высоким даже для недостоверных ветвлений [78]. Для решения

данной проблемы был разработан метод филогенетических сетей [79], позволяющий визуализировать все связи между последовательностями в выравнивании. Перспективным направлением совершенствования филогеномных методов является отказ от выравниваний нуклеотидных последовательностей, что значительно снижает затраты вычислительного времени и трудоемкость проведения анализа [80].

Одной из ключевых проблем биологии является проблема вида [81-83]. В эпоху развития вычислительных подходов в биологии получили распространение методы, позволяющие исходя из математических моделей разбить выборку нуклеотидных последовательностей на видовые группы. В качестве примера можно привести метод построения древ в программе *ASTRAL*, основанный на коалесцентной модели [84]. Определяющее свойство данной модели заключается в допущении множественности топологий. Программа *ASTRAL* принимает на вход выборку древ, и возвращает одну итоговую топологию, которую часто называют «деревом видов» (*species tree*) [85]. Так называемые «вычислительные методы разграничения видов» работают с выравниваниями нуклеотидных последовательностей. Подход автоматического определения баркодowego зазора *ABGD* [86] включает в себя расчет распределения генетических расстояний в выборке и разделение выборки на основе выявленного баркодowego зазора. Метод *PTP* (пуассоновские процессы ветвления) основывается на модели видообразования, включающей в себя мутационный процесс. Накопление мутаций, в том числе, влекущее за собой события видообразования, происходит по распределению Пуассона. Два класса пуассоновских процессов, связанных со скоростью видообразования относительно к количеству нуклеотидных замен и с описанием ветвлений внутри видовых кластеров, наносятся на кладограмму, результат анализа характеризуется логарифмической оценкой правдоподобия (*log-likelihood score*) [87].

Типирование штаммов микромицетов при помощи микросателлитного анализа включает в себя амплификацию локусов тандемных повторов с длиной

единицы повтора в две-шесть пар нуклеотидов с последующим определением длин этих локусов при помощи капиллярного электрофореза в присутствии стандартов молекулярных весов [88]. В результате, каждый изолят характеризуется набором чисел, на основании которого рассчитываются генетические расстояния. Наиболее совершенный подход к вычислению генетических расстояний, вероятно, предложен Бруво с соавторами [73]. Предложенная мера расстояния является производной вероятности и учитывает не только аллельные соответствия, но и расстояния между аллелями одного локуса. Дистанции Бруво между двумя аллелями рассчитываются как $d = 1 - 2^{-|x|}$, где x — это число повторов, на которые различаются аллели. Дистанции рассчитываются для всех комбинаций аллелей одного локуса, после чего минимальная средняя дистанция между комбинациями аллелей принимается как дистанция для данного локуса. Расстояние между изолятами представляют собой среднее для расстояний между локусами.

Индекс ассоциации был первоначально разработан Браун с соавторами для анализа популяционной структуры дикого ячменя [89]. Он широко используется в качестве инструмента для выявления клонального размножения в популяциях. Популяции с половым размножением производят гаметы посредством мейоза и, таким образом, перетасовывают аллели. В клональных популяциях размножение происходит посредством митоза, и изменение генотипов в этом случае связано с мутационным процессом. Скорость мутации варьируется от вида к виду, но редко бывает достаточно высокой, чтобы приблизиться к случайной перетасовке аллелей. При расчете индекса ассоциации определяют соотношение дисперсии числа различий между индивидуумами и суммы этих различий по каждому локусу.

Назначение антимикотической терапии в большинстве случаев требует знания видовой принадлежности возбудителя, в первую очередь в связи с различиями в профилях МПК лекарственных средств [90, 91]. Возможность непосредственного выявления механизмов устойчивости у микромицетов в ходе

рутинной диагностики молекулярными методами является скорее исключением, чем правилом. На селективное воздействие антимикотиков гриб отвечает мутациями во многих областях генома [92] и есть примеры, когда открытие новых механизмов устойчивости [93] ставило под вопрос применимость ранее разработанных тест-систем, ориентированных на непосредственное выявление функциональных мутаций [94]. Однако часто не только устойчивость, но целый комплекс других интересных свойств штамма могут быть ассоциированы с его генотипом, что делает актуальной систематизацию знаний в этой области.

В Южной Азии развивается эпидемия дерматомикоза, вызванная *T. mentagrophytes* [95]. Данный гриб может быть одновременно определен и типирован по последовательностям региона ITS [96]. Проблема устойчивости зарегистрирована у штаммов одного определенного генотипа, встречающегося исключительно в Азии и Океании, что потенциально может сэкономить время, необходимое для тестирования на резистентность стандартными фенотипическими методами. В РФ описан заносный случай заболевания, вызванный грибом данного генотипа [45]. В целом, генотип *Trichophyton* sp. может быть ассоциирован с географическим источником изолята (*T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*), лекарственной устойчивостью (*T. mentagrophytes*), эпидемиологическим источником инфекции (*T. interdigitale*), клинической картиной заболевания (*T. mentagrophytes*, *T. interdigitale*).

Таким образом, к настоящему времени накопилось достаточно данных, свидетельствующих в пользу внедрения методов типирования микромицетов в рутинную диагностику. Быстрое выявление резистентных генетических линий возбудителей может помочь в назначении эффективной терапии. Также это путь к улучшению понимания эпидемиологии грибковых заболеваний. Поэтому перспективны исследования, направленные на сравнение эффективности применения различных молекулярных методов типирования штаммов.

1.4 Генетическое разнообразие в группе видов *Trichophyton mentagrophytes* / *T. interdigitale*

Согласно классическим представлениям, морфологический вид *Trichophyton mentagrophytes* содержит зоонозную и антропонозную формы [97]. Исследования, проведенные с использованием секвенирования ДНК, показали гетерогенность данной группы. В рамках современной классификации зоонозные представители морфологического комплекса отнесены к видам *T. simii*, *T. benhamiae*, *T. quinckeanum*, *T. erinacei*, *T. europaeum*, *T. japonicum*, *T. mentagrophytes*, а антропонозные — *T. interdigitale* [10, 32]. В данной работе были изучены *T. mentagrophytes* и *T. interdigitale* в современном понимании, выработанном прежде всего по результатам изучения последовательностей региона внутреннего транскрибируемого спейсера рДНК, ITS. Анализ последовательностей региона ITS *T. mentagrophytes* и *T. interdigitale*, депонированных в Генбанке, выявил в общей сложности 17 генотипов, представленных не менее, чем тремя записями и депонированных по крайней мере из двух разных стран [98]. Для научной коммуникации существует классификация генотипов региона ITS, в которой они условно обозначены римскими цифрами и звездочками [96, 99]. Генотипы обоих грибов образуют непрерывный ряд изменчивости, и видовой комплекс может рассматриваться как единый филогенетический вид [98]. На территории РФ комплекс *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* представлен не менее чем пятью генотипами, часть которых ассоциирована с конкретными клиническими проявлениями и географическими областями [53, 96]. Наиболее распространенными, вероятно, являются изоляты с последовательностью ITS Тип II, традиционно описываемые как *T. interdigitale* [3].

Основным фактором, влияющим на структуру популяции, является способ размножения. Для свободного скрещивания изолятов *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* существует ряд серьезных препятствий. Во-первых, для прохождения полового процесса необходим грунт. Поэтому скрещивание доступно в первую очередь для грибов, паразитирующих на животных, ведущих

нормный образ жизни [25]. Во-вторых, существуют физиологические барьеры — изоляты Тип II неспособны скрещиваться с тестерами противоположного типа спаривания [100]. В целом, между клональностью, — размножением, не сопровождающимся рекомбинацией генетического материала, и панмиксией нет четкой границы. При рассмотрении различных видов грибов, можно увидеть градиент выраженности барьеров для рекомбинации [101], в котором крайние состояния практически не представлены. Поэтому некоторые авторы предлагают определять клональность не как полное отсутствие рекомбинации, а как ее недостаточность для того, чтобы нарушить клональный паттерн структуры популяции [102]. В рамках этой концепции, популяция считается клональной, если в ней хорошо выражен филогенетический сигнал, а также наблюдается неслучайное взаимное распределение аллелей разных локусов, обозначаемое термином «неравновесие связей», «linkage disequilibrium» [103, 104].

Согласно современной концепции, *T. mentagrophytes* — зоонозный, половой вид. *Trichophyton interdigitale* — антропонозный и бесполой [10]. Очевидно, в это деление заложено понимание структуры популяции *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale*. Оно базируется на двух знаковых экспериментальных работах. В первой из них [20] был связан полиморфизм региона ITS изолятов, сходных по морфологии с *T. mentagrophytes*, и их эпидемиологический источник. В комплексе *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale*, обозначенном согласно принятой в то время номенклатуре как *T. interdigitale*, изоляты Тип I и II были этиологическими агентами микоза стоп и онихомикоза в 88% и 97% случаев. Типовой штамм *T. interdigitale* CBS 428.63 принадлежал к одному из этих антропофильных генотипов. Изоляты Тип III в основном имели ветеринарное происхождение или были ассоциированы с микозом гладкой кожи человека. Таким образом было показано, что микоз гладкой кожи и микоз стоп/онихомикоз обусловлены штаммами разного эпидемиологического происхождения. Действительно, анализ аннотаций последовательностей региона ITS из Генбанка, проведенный в начале 2019 года, подтвердил ассоциацию изолятов Тип II с микозом стоп и

онихомикозом [96]. В той же работе изоляты Тип V, описанные у кошек [105], овец [106], лошадей [107], были ассоциированы с микозом гладкой кожи.

Второе знаковое исследование, результаты которого легли в основу современной таксономической схемы комплекса *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale*, было посвящено проблеме видовой принадлежности зоонозных и антропонозных анаморф [100]. С целью ответить на этот вопрос, авторы осуществили секвенирование ДНК по региону ITS и локусу 28S рДНК коллекции европейских изолятов. Изоляты Тип II, выделенные от патогенного материала пациентов с микозом стоп и онихомикозом, стимулировались тестерами Тип III*, но образующиеся гимнотеции не содержали асков со спорами. Три изученных в работе Symoens et al. изолята Тип II* относились к обоим типам спаривания, при скрещивании с тестерами образовывали гимнотеции со спорами и были отнесены к «зоонозной форме *T. interdigitale*», которая трактуется как в современном понимании как *T. mentagrophytes*. Таким образом, «антропонозная форма *T. interdigitale*», все изоляты которой относились к типу спаривания (+), была охарактеризована как отдельный бесполой вид, ассоциированный с человеком, в противоположность половой «зоонозной форме *T. interdigitale*».

Существует немало данных, не укладывающихся в изложенную схему. Уже в исследовании Symoens et al. [100] два штамма, несущие не известный из других исследований генотип ITS GU646879, изолированные в Швейцарии от человека и от собаки, относившиеся к типу спаривания (+), не стали образовывать фертильные гимнотеции при спаривании с тестерами, что вероятно указывает на наличие физиологических барьеров для полового размножения. В Сенегале был обнаружен изолят Тип II, вызвавший микоз волосистой части головы [108]. В мексиканской серии из 55 изолятов Тип II только 5 штук были выделены от случаев микоза стоп и онихомикоза, что составляет 9%. Остальные 91% изолятов были обнаружены в случаях микозов гладкой кожи и волосистой части головы [109]. Последовательности ITS Тип II и Тип II* отличаются одной нуклеотидной заменой, что может быть достаточным для обсуждения их различий. Например,

такая же разница существует между ITS довольно хорошо очерченных видов *T. tonsurans* и *T. equinum* [33, 110]. На филогеномных деревьях последовательности изолятов Тип II и II* ветвятся вместе и образуют обособленную ветвь в кроне клады *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* [98]. Более того, согласно нашим неопубликованным данным, изоляты упомянутых генотипов практически не различимы по некодирующим последовательностям. Для базально ветвящихся изолятов индийского генотипа VIII было показано чрезвычайно низкое генетическое разнообразие, один тип спаривания (+) [111] и эффективная антропонозная передача [45, 99]. Таким образом, необходим пересмотр текущего понимания структуры популяции комплекса *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale*.

1.5 Генетическое разнообразие вида *Trichophyton rubrum*

Наиболее распространенные дерматофиты принадлежат к комплексу *Trichophyton rubrum*; он включает фенотипически разнообразные организмы с различными клиническими, культуральными, морфологическими и физиологическими характеристиками, которые ранее были известны под несколькими названиями, такими как *T. circonvolutum*, *T. fischeri*, *T. fluviomuniense*, *T. glabrum*, *T. gourvilii*, *T. kanei*, *T. kuryangei*, *T. megninii*, *T. pedis*, *T. raubitschekii*, *T. rodhainii*, *T. soudanense*, *T. violaceum* и *T. yaoundei* [10]. Основываясь на незначительности различий между таксонами антропонозных дерматофитов на молекулярном уровне, Грээр с соавторами синонимизировали большинство этих названий с *T. rubrum* или *T. violaceum* [112]. *Trichophyton violaceum*, основной возбудитель микоза волосистой части головы, представляет собой медленно разрастающийся, плохо спорулирующий организм, впервые описанный Сабуро в 1902 году. Восемь лет спустя был описан быстрорастущий, обильно спорулирующий *T. rubrum*, ответственный за микозы стоп и гладкой кожи [113]. Большинство названий видов в комплексе *T. rubrum* были впоследствии введены для описания фенотипических вариаций. Де Хог и коллеги представили обзор дерматофитов, основанный на результатах мультилокусного

секвенирования, включая секвенирование рибосомной ДНК (рДНК) с внутренним транскрибированным спейсером (ITS), фрагмент гена 28S РНК большой субъединицы рибосом (LSU), тубулина и рДНК 60S L10. Полученные результаты указывали на то, что с точки зрения молекулярной филогении *T. violaceum* практически неотличим от *T. rubrum* [10, 114]. Другое исследование показало, что *T. rubrum* и *T. violaceum* находятся в одной группе гомологии по ITS1 [115]. Gräser et al. [112] оценили валидность всех таксонов в группе *T. rubrum* с существующим типовым материалом. Они использовали комбинацию морфологических, физиологических и молекулярных методов, включая секвенирование региона ITS, ПЦР-фингерпринтинг и полиморфизм длины амплифицированных фрагментов (AFLP). По результатам этой работы все разнообразие фенотпов и генотипов грибов комплекса было предложено рассматривать в рамках двух видов, *T. rubrum* и *T. violaceum*. Анализ разнообразия *T. rubrum* с помощью метода случайно амплифицированной полиморфной ДНК (RAPD) выявил 40 различных паттернов у 55 изолятов [116]. Для ПЦР-фингерпринтинга использовали праймер (GACA)₄, позволивший выявить видоспецифический профиль *T. rubrum*. Однако этот метод не смог обнаружить различий в комплексе *T. rubrum* [117]. В ходе исследования 96 штаммов с четырех континентов с помощью ПЦР-фингерпринтинга, AFLP и случайной амплификации мономорфной ДНК (RAMD) был сделан вывод о том, что *T. rubrum* является клональным, что свидетельствует о быстром глобальном распространении патогена [118]. Недавнее исследование с использованием полногеномного анализа также проиллюстрировало глобальную клональную популяционную структуру *T. rubrum* [19]. Охст с соавторами [16] и Грэзер с соавторами [17] обнаружили четыре полиморфных аллеля в микросателлитном маркере *T. violaceum* и *T. rubrum* T1, которые были существенно связаны с географическим происхождением. MALDI-TOF масс-спектрометрия стала популярной для рутинной идентификации грибов и имеет уровень точности от 13,5 до 100% для дерматофитов [119]. *Trichophyton violaceum* и *T. rubrum* также были идентифицированы с помощью MALDI-TOF MS [120]. Пакё и другие [11]

включили больше штаммов *T. soudanense* и выделили его в третью группу согласно MALDI-TOF масс-спектрометрии и секвенированию региона ITS. Представленные выше данные демонстрируют очевидную молекулярную изменчивость в комплексе *T. rubrum*, в значительной степени соответствующую клиническим характеристикам и географическому распространению [121].

Данные секвенирования ITS Су с соавторами [31] показывают существование трех видов в комплексе *Trichophyton rubrum*. Хотя физиологические, морфологические, географические данные, данные MALDI-TOF масс-спектрометрии или AFLP все вместе или по отдельности не были однозначно диагностическими, были выявлены различные статистически значимые тенденции. В этом исследовании, выборка изолятов комплекса *T. rubrum* разделилась на три группы, содержащие типовые штаммы *T. violaceum*, *T. soudanense* и *T. rubrum*. Три упомянутых названия являются самыми старыми эпитетами в группах, что делает их валидными названиями. Группа 1 содержала типовой штамм *T. yaoundei* из Конго. Авторы статьи считают, что для рассмотрения этой группы штаммов в самостоятельный вид нужны дополнительные исследования. Группа 3 содержала типовые штаммы *T. fischeri*, *T. fluviumuniense*, *T. kanei*, *T. raubitschekii* и *T. rodhainii*, которые, следовательно, могут рассматриваться как подтвержденные синонимы *T. rubrum*. *T. violaceum* и *T. soudanense* чаще всего встречаются на волосистой части головы, тогда как *T. rubrum* чаще всего встречается в случаях микоза гладкой кожи. Географическое происхождение штаммов довольно сложно отследить из-за увеличения количества путешествий и миграции людей. Не принимая во внимание изоляты из западных стран, было обнаружено, что *T. rubrum* и *T. violaceum* имеют глобальное распространение, тогда как *T. soudanense* ограничен Африкой. Случаи инфицирования *T. soudanense*, зарегистрированные в США, также наблюдались среди пациентов африканского происхождения [122]. В целом, колонии *T. violaceum* и *T. soudanense* гладкие, растут медленнее, чем у *T. rubrum*. У большинства изолятов *T. violaceum* отсутствуют микроконидии, которые обычно

присутствуют у *T. soudanense* и *T. rubrum*. Еще одним диагностическим маркером является рефлексивное ветвление, поскольку оно очень характерно для *T. soudanense* и редко или никогда не наблюдается у двух других видов. Макроконидии встречаются только у *T. rubrum*, но, поскольку они легко теряются после повторного посева, этот фенотипический признак имеет ограниченное значение. Большинство колоний *T. violaceum* имеют кремовый цвет, *T. soudanense* — желто-оранжевый, *T. rubrum* — коричневый. Производное нафтахинона, ксантомегнин, основной пигмент, синтезируемый членами комплекса *T. rubrum*, был сначала выделен из штамма, идентифицированного как *T. megninii*, а затем из других штаммов комплекса [123-125]. Он также может быть обнаружен в коже и ногтях человека, инфицированных *T. rubrum* [126]. РН-обратимый пигмент ксантомегнин является основным пигментом, отвечающим за наблюдаемые цвета колоний. Более темные оттенки *T. rubrum*, возможно, связаны с более высокой метаболической активностью, что приводит к более высокому образованию аммония и щелочному рН. Почти все проанализированные штаммы были положительными на гидролиз мочевины при 24 °С, что указывает на экспрессию уреазы. Сообщается, что бульон с мочевиной и агар бесполезны для идентификации видов в составе комплекса *T. rubrum*, хотя *T. rubrum* имеет тенденцию гидролизовать мочевины медленнее, чем *T. mentagrophytes* [127]. Уреазную активность не следует рассматривать как критерий дифференциации *T. rubrum* var. *raubitschekii*, поскольку оба таксона показали положительные результаты [128]. Гидролиз поверхностно-активного вещества Tween 80 используется для выявления липолитических ферментов. Липазы могут быть связаны с различными типами проникновения дерматофитов в волосы. *Trichophyton violaceum* и *T. soudanense* в основном вызывают дерматомикоз волосистой части головы. Гладкая кожа и кожа головы различаются размером и густотой волос, а также обилием сальных желез, выделяющих жирный материал в волосяные фолликулы. Согласно тесту с использованием Tween 80, *T. violaceum* обладают более высокой липолитической способностью, чем другие виды.

Вероятно, *T. rubrum* на гладкой коже напрямую участвует в деградации эпидермиса кожи, тогда как *T. violaceum* и *T. soudanense* прорастают в волосяной фолликул через сальную железу, попадая в более богатый липидами центральный слой волоса. Эта гипотеза согласуется с тем фактом, что наиболее распространенным типом инфекции волос, вызываемым последними видами, является эндотрикс, что приводит к появлению коротких сломанных волос, которые клинически наблюдаются при дерматомикозе головы. Сниженный гидролиз Tween 80 у *T. soudanense* может быть связан с более сухим типом волос, преобладающим в Африке; однако это предположение требует дальнейшего экспериментального подтверждения. Считается, что *T. violaceum* чаще поражает детей, чем взрослых, из-за возможной фунгистатической активности длинноцепочечных жирных кислот в кожном сала, секретиромом сальными железами, активность которых увеличивается с возрастом. Кроме того, более высокая частота дерматомикоза у детей также может быть связана с недоразвитым иммунитетом. Двойная функция кожного сала при грибковых инфекциях требует дальнейшего изучения. Микроскопическое исследование волос, инфицированных *T. violaceum*, выявляет эндотрикс, сопровождающийся множественными грибковыми спорами внутри волос, хотя этот вид обычно не спорулирует *in vitro*. Отрицательные результаты теста на перфорацию волос для всех изученных штаммов *T. violaceum* указывают на то, что *in vitro* эти грибы неспособны к деградации ороговевшей кутикулы волоса, чтобы достичь более мягкой сердцевинной части [127]. *Trichophyton rubrum* показал самую высокую деградацию кератина лазурного, которая отсутствовала или была слабой у других видов. Тест на протеолиз кератина, химически модифицированного лазурным красителем, был впервые проведен на грибах Скоттом и Унтеррайнером [129], которые сообщили, что *T. rubrum* способен вызвать слабое высвобождение красителя через 6 недель. Большинство штаммов *T. rubrum* показали высвобождение синего красителя через 1 месяц инкубации, и почти половина штаммов *T. violaceum* и одна треть штаммов *T. soudanense* показали

ограниченную способность разрушать кератин. Было подтверждено, что неспецифические сериновые протеазы субтилизин 3 (Sub3) и Sub4, обнаруженные в супернатантах культур *T. rubrum* [130], разлагают лазурный кератин, и обе, как было предсказано, экспрессируются в *T. rubrum* и *T. violaceum* с помощью полногеномного анализа [131]. Экспрессия кератиназ, таких как Sub3 и Sub4, и сопутствующая деградация кератина, по-видимому, довольно различаются в пределах одного вида. MALDI-TOF масс-спектрометрия позволила отделить большинство штаммов *T. violaceum* от *T. rubrum* и *T. soudanense*, но обладал недостаточной дискриминационной способностью, чтобы однозначно отличить *T. rubrum* от *T. soudanense* [31]. Исследование идентификации дерматофитов с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии показало, что включение *T. soudanense* в базу данных потенциально может привести к неправильной идентификации *T. rubrum* [132]. Генотипирование методом AFLP выявило высокую степень сходства между группами последовательностей региона ITS. Приблизительные группы AFLP были выделены на основе общих профилей, отсортированных с помощью UPGMA-кластеризации общих профилей. *Trichophyton violaceum* содержал штаммы, разделенные по всем паттернам AFLP, подтверждая предковую позицию, как было отмечено в данных ITS, для *T. rubrum* и *T. soudanense*, которые имели общие профили. Производные характеристики *T. rubrum* могут объяснить описанную выше низкую производительность MALDI-TOF масс-спектрометрия, при этом *T. rubrum* показывает 43,9% несоответствий, тогда как *T. soudanense* и *T. violaceum* распознаются в подавляющем большинстве случаев. В заключение, *T. violaceum*, *T. soudanense* и *T. rubrum* демонстрируют согласованные различия в независимых параметрах клинических признаков, морфологии, физиологии и генетике, хотя ни один из этих параметров не является строго диагностическим. Сочетание фенотипических различий и клинической предрасположенности при отсутствии полового размножения свидетельствует о том, что это отдельные сущности, проходящие симпатрическое видообразование, но с выраженным явлением неполноты сортировки линий, как это также

наблюдалось у других мало дивергировавших дерматофитов [33]. Виды с уровнем достоверности 90% вызывают различные типы инфекций и демонстрируют отличную морфологию колоний и микроскопические особенности. Физиологические тесты на деградацию кератина и липолиз указывают на различия в экологической специализации, но не подходят в качестве критериев идентификации, а AFLP и MALDI-TOF масс-спектрометрия не обладают достаточной дискриминирующей способностью, чтобы надежно различать все виды. Согласно выводам Су с соавторами [31], золотым стандартом диагностики является секвенирование ДНК по региону ITS. Для лабораторий, не имеющих доступа к возможностям секвенирования, клинические проявления могут быть объединены с морфологическими характеристиками штаммов для идентификации. *Trichophyton violaceum* и *T. soudanense* чаще всего вызывают дерматомироз волосистой части головы. Различия между *T. violaceum* и *T. rubrum* по баркодовому маркеру ITS составляют 6 п.н. (1,06%), что превышает общепринятый предел, который можно принять как разные виды. Генетические различия с *T. soudanense* меньше, но его эндемизм в северной Африке как причина микозов волосистой части головы, дополненный его фенотипическими различиями, делает различие этого объекта клинически значимым.

В то время как *T. rubrum* является преобладающим видом, вызывающим инфекции кожи и ногтей в Европе, другие представители, такие как *T. violaceum* и *T. soudanense*, преобладают в засушливых климатических зонах западного Китая, Африки и Ближнего Востока, в основном вызывая микоз волосистой части головы [2]. Жан с соавторами [4] отметили, что молекулярные различия даже между этими основными видами были удивительно малы. Однако существуют значительные различия в клинической картине инфекций, морфологических характеристиках, географическом происхождении и микросателлитных маркерах, в то время как филогенетический анализ показывает, что отношения между этими видами более сложны. В частности, обсуждается статус *T. soudanense* как возможного синонима *T. violaceum* [26]. Де Хог и др. [10] приняли *T. soudanense*

как вид и неотипизировали его (ИНЕМ 19751), но также отметили, что этот вид может быть неотличим от *T. violaceum*. Оба вида имеют одни и те же распространенные места изоляции, то есть кожу головы и волосы, но демонстрируют явные различия в морфологии и разное географическое распространение. В то время как *T. violaceum* считается основным возбудителем дерматомикоза головы на Ближнем Востоке и в странах Восточной Африки, *T. soudanense* преимущественно наблюдается в странах Западной Африки, таких как Мали и Сенегал. Наряду с миграцией людей эти два вида также ответственны за вспышки микоза волосистой части головы в нескольких европейских странах [133].

Охст с соавторами [16] подвергли сомнению предложенную ранее синонимию *T. soudanense* и *T. violaceum* [112]. По микросателлитным данным, изоляты *T. soudanense* и *T. gourvilii* группируются с *T. rubrum*, а не с *T. violaceum*. В своем более позднем исследовании, Грэзер с соавторами [17] обозначили изоляты *T. soudanense* как часть «африканской популяции» *T. rubrum*. В сообщениях о случаях микозов волосистой части головы из Новой Зеландии [134], США [135], Мали [136] и Италии [137] *T. soudanense* и *T. violaceum* были (морфологически) идентифицированы как разные возбудители. Это иллюстрирует их отличительные фенотипы и широкое признание концепции обоих видов в медицинском сообществе. Несколько исследований уже подтвердили, что область гена ITS обеспечивает достаточное филогенетическое разрешение для поддержки различных клонов внутри рода *Trichophyton*. Добавление данных о последовательности β -тубулина не дает дополнительной поддержки [10, 114, 138, 139]. Это также имело место в наших результатах, где данные о частичной последовательности β -тубулина обеспечивали недостаточно хорошее разрешение, будучи способными обнаружить только две линии. Полученные в настоящем исследовании данные о последовательностях ITS показывают три основные группы, которые интерпретируются как *T. rubrum*, *T. soudanense* и *T. violaceum*. Одна замена и по крайней мере один индел отделяют штаммы клады *yaoundei* от

клады *T. violaceum*. Группа *T. yaoundei* демонстрирует однородный фенотип (белый фронт колонии и очень медленный рост). Кластеризация последовательностей региона ITS, проведенная методом максимального правдоподобия, не позволяет различить штаммы линии *T. soudanense* в зависимости от наличия делеции 37 пар оснований в ITS1, что находится в согласии с результатами фенотипического анализа и результатов MALDI-TOF масс-спектрометрии. В отличие от работы Грэзер с соавторами [112], штамм, ранее идентифицированный как *T. circonvolutum* (CBS 286.30), Су с соавторами отнесли к линии *T. soudanense*. Анализ сети гаплотипов показал, что *T. soudanense* занимает промежуточное положение между *T. rubrum* и *T. violaceum*, каждый со своими специфическими фенотипическими тенденциями [31]. Большинство изолятов *T. soudanense* желтовато-оранжевые, продуцируют микроконидии и имеют гифы с рефлексивными ветвями; другие штаммы демонстрируют, по крайней мере, комбинацию двух из этих признаков. Для штаммов *T. violaceum* характерно наличие пурпурной или коричневой пигментации после первоначального кремового цвета и отсутствие микроконидий. Могут присутствовать рефлексивные гифы, а иногда обратная сторона колонии остается кремовой. В этом исследовании два штамма *T. violaceum* могли быть ошибочно идентифицированы как *T. soudanense* на основании морфологии: ИЕМ 25555 и ИЕМ 4887 продуцировали микроконидии и имели рефлексивные гифы. Все штаммы клады *yaoundei* росли чрезвычайно медленно и давали культуры с белым фронтом и желтовато-оранжевым оборотом, при отсутствии микроконидий и рефлексивных гиф. Ни один из этих штаммов не приобрел пурпурный цвет. Четыре штамма клады *kyuangei* давали белые культуры с желтовато-коричневой обратной стороной и, как и у *T. rubrum*, рефлексивные гифы отсутствовали, в то время как микроконидии часто производились в большом количестве. Морфологически штаммы из клады *kyuangei* трудно различимы от некоторых штаммов *T. rubrum*. Четыре штамма клады *kyuangei* были изолированы от случаев микозов волосистой части головы, тогда как *T. rubrum* обычно

выделяется от дерматофитозов гладкой кожи, таких как *tinea pedis* или *tinea corporis*. Анализ, проведенный Су с соавторами при помощи MALDI-TOF масс-спектрометра, идентифицировал эти штаммы как *T. rubrum* или *T. soudanense*. Де Хог и др. [10] и Жан с соавторами [114] считают *T. kuryangei* синонимом *T. violaceum*, но филогенетический анализ, дополненный построением сетей гаплотипов в работе Пакё с соавторами [11], предполагают более тесное родство с *T. soudanense*. Очевидно, что этот вопрос следует изучить более подробно, добавив в базу данных больше эталонных спектров *T. kuryangei*. В то время как Варшавский и Айелло [140] рассматривали *T. kuryangei* и *T. megninii* как синонимы, *T. megninii* в настоящее время рассматривается как синоним *T. rubrum*, несмотря на отсутствие типового материала [10, 112]. В целом, на уровне видов комплекс *T. rubrum* содержит по крайней мере четыре генетических линии, обладающие характерным фенотипом и идентифицируемые с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии, включая *T. violaceum*, *T. rubrum* s. str., *T. soudanense* и *T. yaoundei*.

Основная часть работ по внутривидовому генетическому разнообразию гриба *T. rubrum* была основана на методе ПЦР по локусам TRS-1 и TRS-2 рибосомной ДНК, содержащим вторичные нуклеотидные повторы [141]. Первоначально метод был опробован на 101 изоляте грибов из Европы, Африки и Азии. С его помощью был описан 21 паттерн распределения продуктов ПЦР по локусу TRS-1 и 11 паттернов ПЦР по локусу TRS-2. Комбинация локусов дала 23 типа штаммов [141]. Вместе с тем, отчеты о последующих работах с применением рассматриваемого метода на локальной выборке штаммов содержат информацию о гораздо меньшем разнообразии. Так, типирование 67 изолятов *T. rubrum* из Бразилии выявило три паттерна распределения продуктов ПЦР по локусу TRS-1, два — для TRS-2 и четыре в совокупности [142]. В исследовании, проведенном на 30 штаммах из Польши, было обнаружено пять, три и семь паттернов, соответственно. Дискриминационная сила типирования по локусам TRS в этом исследовании составила 0,478 [143]. В Санкт-Петербурге выборка из 50 изолятов

была еще менее разнообразной, с дискриминационной силой метода 0,180. Индекс клонального разнообразия составил 0,163 [144]. Одной из важных находок, сделанных на основе изучения полиморфизма локусов TRS, является обнаружение до трех генотипов *T. rubrum* в высеве из одного пораженного ногтя [145]. При поражениях кожи стоп, вызванных *T. rubrum*, были обнаружены только одиночные штаммы [146]. Также не было обнаружено различий между штаммами, изолированными с разных частей тела одного пациента [142].

Работы, основанные на микросателлитном анализе, внесли вклад в понимание путей распространения гриба *T. rubrum* по Земному шару. Схема типирования, разработанная группой Ивонны Грэзер, позволила выявить во всемирной выборке из 236 изолятов две независимые популяции гриба и заключить, что предположительный природный ареал *T. rubrum* находится в Африке, а дальнейший путь возбудителя в Европу и Северную Америку лежал через Юго-Восточную Азию [16, 17]. Однако если обратить внимание на изученную данными авторами выборку, то окажется, что присутствующие в ней африканские изоляты относятся к виду *T. soudanense*. Действительно, данная схема типирования оказалась не эффективной для работы с изолятами *T. rubrum sensu stricto* из Китая, для чего понадобилось подобрать новый набор локусов [18]. Китайские изоляты, 234 шт., распределились по двум популяциям, члены которых найдены во всех 11 изученных городах. Не было обнаружено корреляции генотипа с вызванным заболеванием. Интересно, что дискриминационная сила использованных микросателлитных маркеров была очень высокой, и составила 0,993.

Несмотря на наличие значительного пласта работ по генетическому разнообразию *T. rubrum*, вопрос о наличии генетических линий внутри популяции *T. rubrum s. str.*, которых можно было бы выявить набором независимых методов типирования, до сих пор остается открытым.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для решения поставленных задач фенотипическими и молекулярно-генетическими методами в совокупности был изучен 151 изолят дерматофитов, включая 26 штаммов грибов рода *Trichophyton* из Российской коллекции патогенных грибов, 105 клинических изолятов, выделенных от пациентов с онихомикозом в клинике НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, Санкт-Петербург, а также 20 клинических изолятов, полученных от больных с онихомикозом в лаборатории ГБУЗ СО «Свердловский областной КВД», Екатеринбург. Клинические изоляты дерматофитов были получены в 2015–2018 годах посевом патогенного материала на агар Сабуру с добавлением 2% глюкозы.

2.1 Фенотипические методы

Инкубирование клинических изолятов и коллекционных штаммов дерматофитов осуществляли на агаре Сабуру с добавлением 2% глюкозы в суховоздушных термостатах при 27 °С. Изучение микро- и макроморфологии проводили на двухнедельных культурах при помощи микроскопа Axiostar Plus (Carl Zeiss, Германия). Сравнительные результаты фенотипической идентификации и секвенирования ДНК приведены на Рисунке 1.

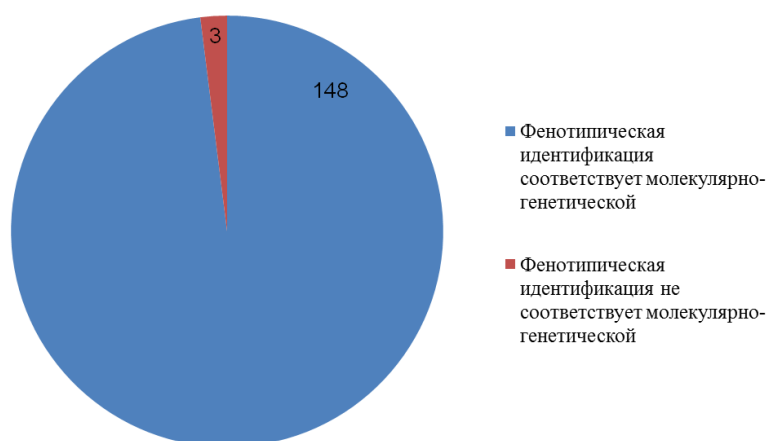


Рисунок 1. Сравнительные результаты видовой идентификации фенотипическими и молекулярно-генетическими методами.

2.2 Молекулярно-генетические методы

2.2.1 Выделение ДНК

Для получения препаратов гДНК было использовано два метода. Материалом служил 1 мм³ воздушного мицелия гриба. Первый метод выделения ДНК — преципитация смесью хлороформа и изоамилового спирта. В 1,5-мл пробирку с 450 мкл лизирующего буфера (20 мМ Трис/НСl рН 8,0, 5 мМ ЭДТА рН 8,0, 100 мМ NaCl, 1% ДСН) и двумя стеклянными шариками (5 мм) вносили материал, после чего встряхивали на гомогенизаторе. Добавляли протеиназу К до концентрации 50 мкг/мл и инкубировали при температуре 55 °С два часа. К лизату добавляли 450 мкл смеси хлороформа и изоамилового спирта (24:1), аккуратно перемешивали и центрифугировали 10 минут при 9000 g. Верхнюю фазу переносили в новую пробирку, содержащую 45 мкл 3М ацетата натрия и 1 мл 96 % этанола. Аккуратно перемешивали до появления видимого преципитата, 2 часа инкубировали при температуре -20 °С. Далее центрифугировали 10 минут при 20000 g при +4 °С, осадок дважды отмывали 0,5 мл 70% этилового спирта, высушивали и растворяли в 50 мкл дистиллированной воды.

Второй метод — выделения на колонках. Использовали фирменный набор GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, Литва). Воздушный мицелий со спорами соскребали наконечниками к дозаторам в 1,5-мл пробирки, содержащие 350 мкл лизирующего буфера А, и встряхивали в течение 30 секунд на гомогенизаторе. Добавляли 50 мкл лизирующего буфера Б и 20 мкл РНКазы А. Инкубировали при 65 °С, периодически встряхивая. Добавляли 130 мкл преципитирующего раствора и перемешивали, переворачивая пробирку 2–3 раза. Центрифугировали 5 минут при 20000 g. Надосадочную жидкость переносили в новую микроцентрифужную пробирку, содержащую 400 мкл связывающего раствора и 400 мкл 96% этанола, после чего интенсивно встряхивали. Полученную смесь в два этапа пропускали через колонки, внося по

600-700 микролитров и центрифугируя при 6000 g. Затем проводили отмывку предназначенными для нее растворами 1 и 2 и дважды проводили элюцию ДНК 100 мкл элюирующего буфера. Концентрацию полученной ДНК измеряли на флуориметре Qubit (Invitrogen, США).

2.2.2 Полимеразная цепная реакция

Реакции проводили в объеме 50 мкл, амплификацию микросателлитных локусов проводили в объемах 25 мкл. Был использован стандартный набор реактивов для ДНК-диагностики (Синтол, Россия). Реакционная смесь состояла из 100 mM Трис/НСl (рН 9,0), 250 mM КСl, 10 mM Tween-20, 2,5 mM MgCl₂, 250 мкМ каждого дНТФ. На 50 мкл реакционной смеси использовали 1 ед. полимеразы Taq. Последовательности использованных в работе олигонуклеотидов приведены в Таблице 3.

При амплификации микросателлитных локусов Tr001-Tr008, Tr(СТ)₂₀, Tr(GA)₂₅, локусов *BT2*, LSU (с праймеров NL1 и NL4) и региона ITS на одну реакцию добавляли 5 пМ праймеров. Локус TRS-2 амплифицировался с добавлением 30 пМ, и TRS-1 — 50 пМ праймеров. При амплификации локусов TRS-1 и TRS-2 в реакционную смесь добавляли 5 нг гДНК, при амплификации остальных локусов брали 1-2 мкл гДНК, без измерения концентрации. Для получения продуктов ПЦР региона ITS и локуса LSU с помощью термоциклера C1000 Touch (Bio-Rad, США) после начальной стадии денатурации в течение 5 мин при 95 °С выполнялось 34 цикла амплификации при следующих условиях: денатурация в течение 30 с при 95 °С, отжиг 30 с при 56 °С и элонгация 1 мин при 72 °С. Финальная стадия элонгации длилась 10 мин при 72 °С.

Таблица 3 — Олигонуклеотиды, использованные в настоящем исследовании. Модификации даны полужирным шрифтом.

Праймер	Последовательность	Ссылка
ITS5	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'	[147]
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	[147]
NL1	5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'	[148]
NL4	5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'	[148]
BT2a	5'-GGTAACCAATCGGTGCTGCTTTC-3'	[149]
BT2b	5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCTTGGC-3'	[149]
TrNTSF-2	5'-ACCGTATTAAGCTAGCGCTGC-3'	[141]
TrNTSR-4	5'-TGCCACTTCGATTAGGAGGC-3'	[141]
TrNTSR-1	5'-CTCAGTCGAACCGTGAGGC-3'	[141]
TrNTSC-1	5'-CGAGACCACGTGATACATGCG-3'	[141]
Tr001_F	5'- FAM -GTGGGCTCGAACCGAGACAAAC-3'	[18]
Tr001_R	5'-GGTGA CTGGAGGGTGAAGGG-3'	[18]
Tr002_F	5'- HEX -CTCGCATTTGGCCTTGAGTGT-3'	[18]
Tr002_R	5'-CTGGCTGGTGGAAAGGACATAG-3'	[18]
Tr003_F	5'- FAM -GCCAGTGATCCTGCATCGTCC-3'	[18]
Tr003_R	5'-CGGGCTTCTCGTCTTGCTCTTC-3'	[18]
Tr004_F	5'- HEX -CAGGAGGGTAGAAGACGAGAAG-3'	[18]
Tr004_R	5'-AAAGAAAAACAAAGTCAAGCACGC-3'	[18]
Tr005_F	5'- FAM -AAAGTACCTCCTGTTTACCATC-3'	[18]
Tr005_R	5'-GGCATTCCGGGCAGTTGAAGC-3'	[18]
Tr006_F	5'- HEX -TAAGACAGGGATCTCAGAATG-3'	[18]
Tr006_R	5'-CGGAACCGCTACAAGCAGAAT-3'	[18]
Tr007_F	5'- TAMRA -TGGGATACAGCCATGCCGTT-3'	[150]
Tr007_R	5'-CTCAGCCCTACCAGACGACC-3'	[150]
Tr008_F	5'- TAMRA -AGGCCCCCAAGGTAGAGGAT-3'	[150]
Tr008_R	5'-GTGCCTGCGCGAAATACGAA-3'	[150]
Tr009_F	5'- HEX -ACGACGATACTGGCTGGACAA-3'	[150]
Tr009_R	5'-GTTATGACTTCCACGGTGTACG-3'	[150]
STRTr9_F	5'- TAMRA -ACACTGCTCTTCGCATCTTGA-3'	[150]
STRTr9_R	5'-GGCTGTTGTTGTTTCGCTGCT-3'	[150]
Tr(CT) ₂₀ _F	5'- FAM -GCGGTGGCGTCTTCTATC-3'	[17]
Tr(CT) ₂₀ _R	5'-CAGCAGACAACATAGCAGTCG-3'	[17]
Tr(GA) ₂₅ _F	5'- HEX -GCGATGGTTGGAGGAGTTG-3'	[17]
Tr(GA) ₂₅ _R	5'-GCCTGTCGCTGCTTACTTG-3'	[17]
TERG_02941_F	5'-CGGCCTCGTTCTGCGTTAAC-3'	[144]
TERG_02941_R	5'-CTTGCCGGCTTCCAAGTCTTT-3'	[144]
TERG_03298_F	5'-GCGAGGAGGACTGGCTGAT-3'	[144]
TERG_03298_R	5'-AAGCACCAGAGCAACAGCAAT-3'	[144]
TERG_02941RT_F	5'-GGCTTACCACGCCCGTC-3'	[150]
TERG_02941RT_R	5'-CCACTTGTTCTTGCCGGCTT-3'	[150]
TERG_02941_793A	5'- ROX -TCCGTTTCACTTTGCGAGTGGC- BHQ2 -3'	[150]
TERG_02941_793G	5'- FAM -TCCGTTTCACTTTGCGAGCGGC- BHQ1 -3'	[150]

Условия амплификации локуса *BT2* были следующими: начальная денатурация в течение 5 мин при 94 °С, 34 цикла амплификации: денатурация в течение 15 с при 94 °С, отжиг 30 с при 60 °С, элонгация в течение 30 с при 68 °С и конечная стадия элонгации в течение 5 мин при 68 °С. Для амплификации локусов TRS-1 и TRS-2 был запрограммирован следующим образом: первоначальная денатурация в течение 15 мин. при 95 °С, 30 циклов, состоящих из 30 с при 94 °С, 30 с при либо 52 °С (TRS-1), либо 55 °С (TRS-2), и 3 мин (TRS-1) или 2 мин (TRS-2) при 72 °С, и финальная элонгация 10 мин при 72 °С. Условия реакции для локуса TERG_02941: 5 мин при 95 °С, 39 циклов 30 с при 95 °С, 1 мин 5 с при 64 °С, и финальный этап 5 мин при 72 °С. Лocus TERG_03298 был амплифицирован по программе, включающей в себя следующие этапы: 5 мин при 95 °С, 39 циклов 30 с при 95 °С, 30 с при 62 °С, 36 с при 72 °С, и финальный этап 5 мин при 72 °С. Микросателлитные локусы амплифицировали по программе, состоящей из денатурации 10 минут при 95 °С, 30 циклов [50 с 95 °С, 1 мин. 58 °С, 1 мин. 72 °С] и заключительного этапа элонгации — 10 мин. при 72 °С.

Для типирования *T. rubrum* по точечной замене в позиции 793 гена TERG_02941 нами была подобрана пара праймеров и зонды по технологии TaqMan (Таблица 1). Для проведения типирования данным методом была использована следующая программа: 95 °С 3 мин.; 39 × [95 °С 10 с; 55 °С 30 с]. Примеры полученных кривых накопления флуоресцентного сигнала приведены на Рисунках 2 и 3.

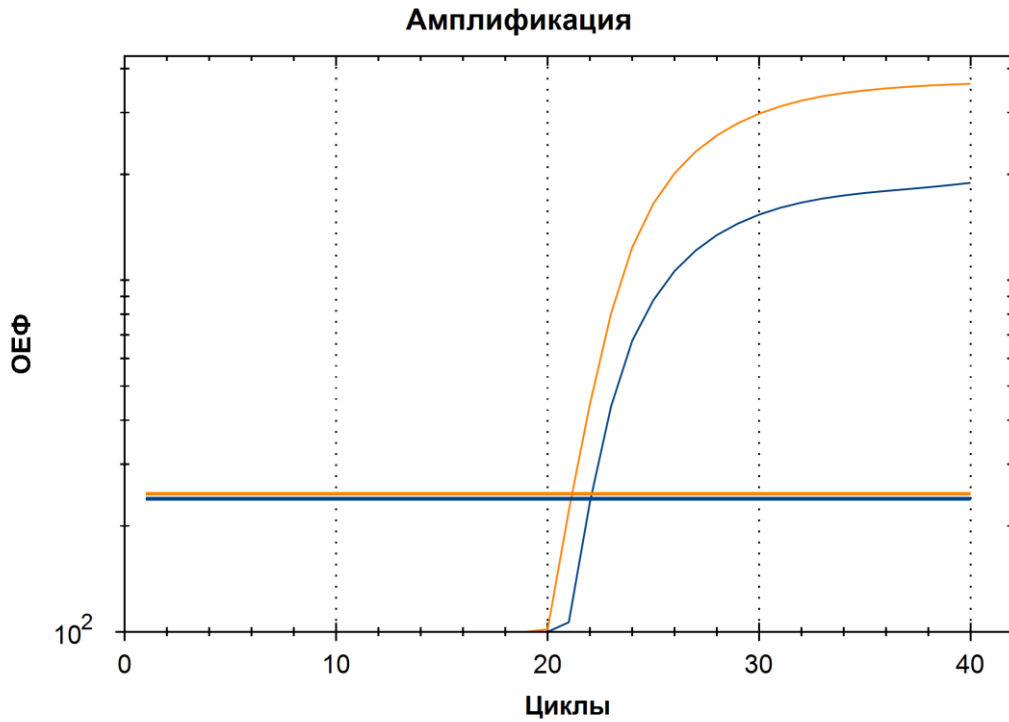


Рисунок 2. *Trichophyton rubrum*. Пример амплификации локуса TERG_02941 в реальном времени, изолят с генотипом 793А.

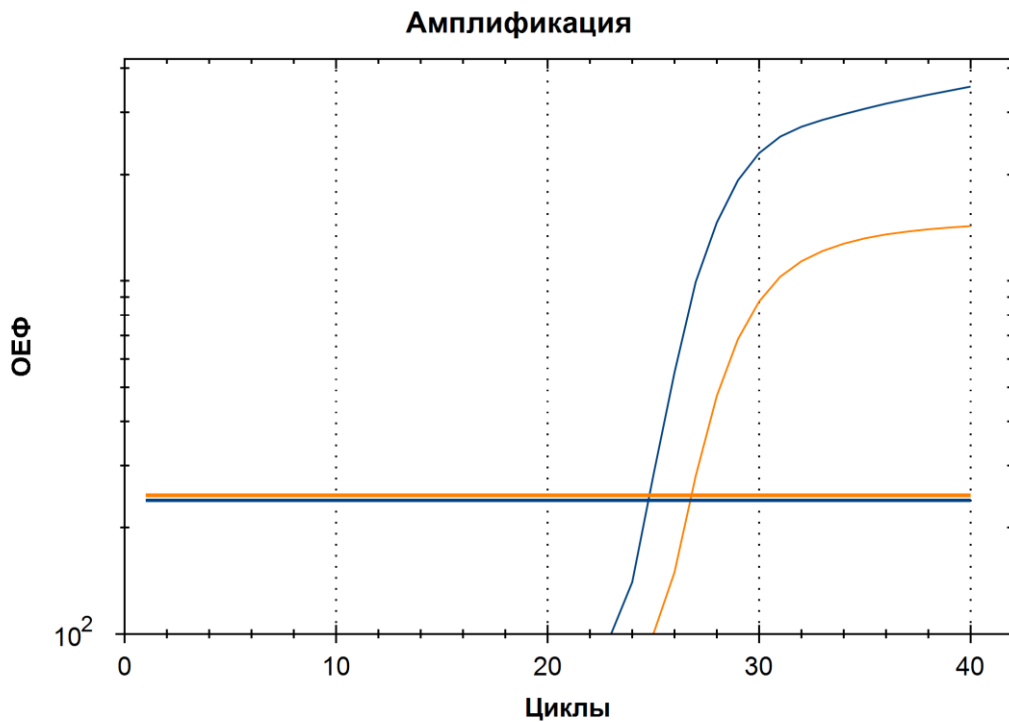


Рисунок 3. *Trichophyton rubrum*. Пример амплификации локуса TERG_02941 в реальном времени, изолят с генотипом 793G.

2.2.3 Секвенирование ДНК по Сенгеру

Продукты ПЦР по локусам *BT2*, *LSU*, *TERG_02941*, *TERG_03298* и региону *ITS* очищали осаждением изопропанолом в присутствии гликогена в кислой среде. Очищенные ампликоны использовали в реакциях с терминирующими нуклеотидами, поставленных при помощи набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, и продукты которых очищали сорбентным методом при помощи набора BigDye Xterminator Purification Kit (Applied Biosystems, США). Для определения последовательности ДНК методом Сенгера использовали секвенатор ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, США). Нуклеотидные последовательности считывали в прямом и обратном направлениях. Список нуклеотидных последовательностей, полученных в ходе исследования, приведен в приложении А.

2.2.4 Работа с нуклеотидными последовательностями

Количество полиморфных сайтов оценивалось с помощью пакета SeaView 4.3.5 [151]. Для описания полиморфизма региона *ITS* группы видов *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* (TMTISC) мы использовали схему, опубликованную Нине с соавторами [152] и развитую в работе [20]. Схема полиморфизма включала эталонные последовательности антропофильных изолятов Тип I "AF506033" и Тип II "AF506036". Зоофильные изоляты TMTISC были представлены следующими последовательностями: Тип III "AF506034", Тип III* "FM986758" и Тип IV "AB246678". Мы использовали номера нуклеотидных позиций из выравнивания работы Хайдемана и соавторов при обсуждении нуклеотидных замен. Для решения вопроса о стабильности мутаций в регионе *ITS* мы пассажировали референсные штаммы в течение шести месяцев (РКПГ 1207 и РКПГ 1278) или года (штаммы РКПГ 1301, 1261, 1425, 1640), после чего заново проводили выделение ДНК и секвенирование. При этом вновь полученные последовательности были идентичны исходным. Также мы выполнили поиск сайтов рестрикции в регионе *ITS T. interdigitale* с помощью программы Genome

Compiler 2.2.43, чтобы выяснить, может ли наша схема типирования быть проверена методом ПЦР-ПДФ и успешно верифицировали полиморфизмы C139T и C460T с помощью рестриктаз MvaI и MboI, соответственно.

При проведении филогенетического анализа последовательности были выровнены вручную, с использованием пакета SeaView 4.3.5. Построение кладограмм методом максимального правдоподобия и бутстрэп-анализ выполнялись с использованием RAxML 8.1.11. [153], а байесовский анализ был проведен с использованием MrBayes 3.2.3. [154], распределения GTR + Г и 1569 однозначно выровненных позиций для 50 изолятов. Число категорий гамма-скорости составило 25 для RAxML. Лучшее дерево, созданное двумя независимыми запусками RAxML со случайными стартовыми деревьями, было оценено 1000 повторами процедуры бутстрэп. Байесовский анализ проводился с 2 независимыми прогонами из 4 цепей MCMC на 10 миллионов поколений; значение *burn in* составляло 25%. Среднее стандартное отклонение частот разделения достигало 0,001472 в конце запуска.

Построение филогенетических сетей проводили в программе SplitsTree 4.14.6 [155]. Описание мультилокусных наборов данных, использованных для анализа межвидовых границ в комплексе видов *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale*, приведено в Таблице 4.

Для получения подробной информации об известном генетическом разнообразии генотипов региона ITS грибов комплекса *Trichophyton mentagrophytes* / *T. interdigitale*, в базе данных Генбанк были выполнены 16 текстовых поисков, по числу описанных видов согласно последней таксономической схеме [10]. Каждый поисковый запрос состоял из биномена одного отдельно взятого вида рода *Trichophyton* и фразы «internal transcribed spacer». Поиски по всем видам рода были выполнены с целью охватить последовательности с ошибочно определенной видовой принадлежностью.

Таблица 4 — Описание трех мультилокусных наборов данных, на основании которых были построены филогенетические сети.

№	Источник нуклеотидных последовательностей	Кол-во изолятов	Локус							Длина выравнивания, п.н.	
			<i>ACT</i>	<i>BT2</i>	<i>CaM</i>	<i>GPD</i>	<i>ITS</i>	<i>LSU</i>	<i>TEF1α</i>		<i>TOP2</i>
1	Kawasaki et al. [51]	36	+				+	+		+	1668
2	Rezaei-Matehkolaei et al. [54], Mirhendi et al. [52], Ahmadi et al. [55]	17*		+	+			+		+	2834
3	Pchelin et al. [53]	49		+				+	+		1493

* включая дополнительные последовательности, извлеченные из геномов *Trichophyton* sp. CBS 112371 ABSU000000000, *T. equinum* CBS 127.97 ABWI000000000, *T. mentagrophytes* M8436 FUFL000000000, *T. soudanense* CBS 452.61 AOKW010000000, *T. verrucosum* НКI 0517 ACYE000000000 и *Trichophyton* sp. H6 AOKS000000000.

Для того, чтобы дополнить выборку записями с последовательностями региона ITS, не содержащими полной фразы «internal transcribed spacer», в базе данных Генбанк был выполнен поиск инструментом Blast по ранее отобраным генотипам грибов *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* с исключением результатов, содержащих фразу «internal transcribed spacer». Далее при помощи скрипта puttorights, написанного на языке Python, (Приложение Б) были отобраны уникальные записи базы данных, содержащие полную последовательность гена 5,8S рРНК. после чего было осуществлено выравнивание и обрезка нуклеотидных последовательностей (Рисунок 4). Последовательности, не содержавшие полный регион ITS, были удалены из выборки. При помощи скрипта compactor (Приложение В) идентичные последовательности были объединены в группы.

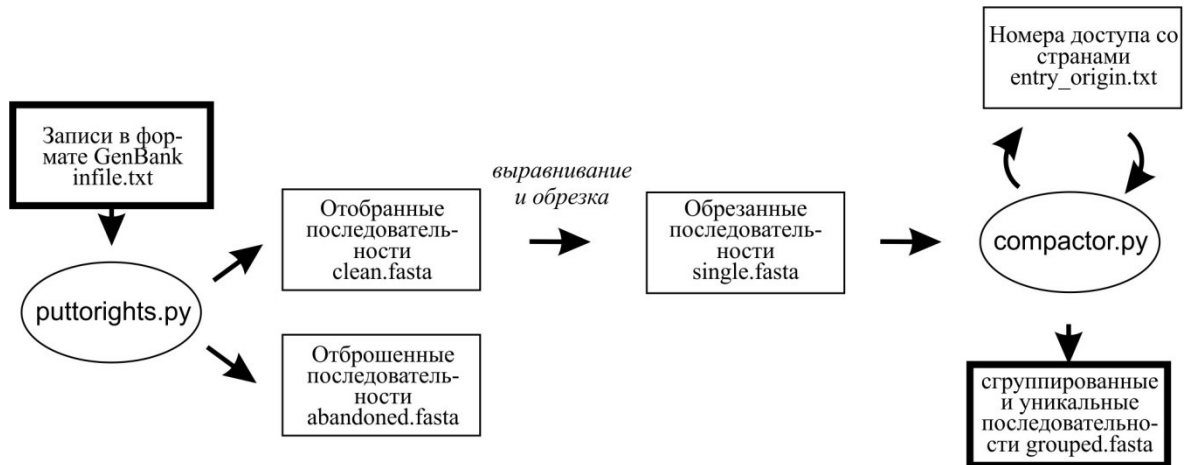


Рисунок 4. Схема подготовки нуклеотидных последовательностей к анализу при помощи разработанного программного кода. Овалами обозначены скрипты, прямоугольниками – рабочие файлы. Скрипт `compactor.py` использует `infile.txt` для извлечения информации о странах нахождения лабораторий, депонировавших записи базы данных.

Для отсева недостоверных генотипов отбирались только те последовательности, которые были депонированы не менее, чем трижды и как минимум, лабораториями из двух разных стран. На основании получившейся выборки в программе PhyML v3.0 пакета SeaView 4.5.3 была построена кладограмма по методу максимального правдоподобия. Для сведения географических данных в таблицу был использован скрипт `countriestotable.py` (Приложение Г). При помощи скрипта `clinical.py` из исходного файла с записями базы данных в формате GenBank было выписано содержимое полей `\note`, `\isolation_source` и `\host`. Для написания скриптов был использован язык программирования Python. Код набирали вручную в редакторе Sublime Text 3.1. Корректность работы скриптов проверяли просмотром выравниваний нуклеотидных последовательностей, обработкой тестовых выборок и поисками по репрезентативным последовательностям инструментом `blast` в базе данных Генбанк. Для запуска скриптов их помещали вместе с необходимыми рабочими файлами в отдельные директории, в адресную строку папки вводили команду `cmd`, вызывающую

командную строку, после чего вводили в нее команду «python имя_скрипта», например, «python incrustator.py». Для работы использовали версию Python 3.6.4.

Отдельный анализ содержимого Генбанка был проведен для построения карты географического распространения генотипов *T. mentagrophytes* и *T. interdigitale*. Мы произвели поиск в базе данных GenBank с ключевыми словами «*Trichophyton* internal transcribed spacer». Также выполнили поиск по алгоритму megablast в Генбанке, в качестве запроса послужила последовательность MF926358 [10]. Найденные последовательности проверили на наличие консервативной последовательности гена 5,8S рРНК и выровнили. Записи, не содержавшие полную последовательность региона ITS, были удалены. При распределении последовательностей региона ITS дерматофитов *T. mentagrophytes* и *T. interdigitale* по генотипам мы учитывали все без исключения инсерции, делеции и точечные мутации, находящихся строго в границах этого региона. Для обозначения генотипов региона ITS грибов *T. mentagrophytes* и *T. interdigitale* мы использовали номера доступа Генбанка, взятые в кавычки. Мы приняли границы региона ITS точно так же, как они были депонированы в записи KT354634 [156], но не принимали во внимание консервативный мотив CAGG на 3'-конце последовательностей для расширения выборки.

2.2.5 Микросателлитный анализ

Флуоресцентные продукты амплификации микросателлитных локусов разбавляли водой в 25 раз, подвергали денатурации в 20 мкл формамида с добавлением 0,25 мкл стандартов молекулярных весов Red DNA Size Standard (MCLAB, США) и анализировали капиллярным электрофорезом на приборе ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, США). Размер аллелей был определен в программе GeneMapper 4.1. На основании длин микросателлитных локусов в пакете polysat 1.7 [157] для R 3.4.3 по методу Бруво с соавторами [73] были рассчитаны парные генетические расстояния, далее использованные в анализе

методом главных компонент. Анализ главных компонент и визуализация его результатов так же были проведены в пакете *polysat* 1.7 для R.

Для расширения панели локусов для микросателлитного анализа в геномных контигах штамма CMCC(F)T11 были выполнены текстовые поиски мотивов (GA)₇ и (CT)₇. Всего было найдено 170 локусов, содержащих данные и другие типы повторов. Последовательности этих локусов для 12 штаммов *T. rubrum* были выровнены в программе SeaView 4. При обнаружении между штаммами различий размером 9 и более повторяющихся единиц, последовательности локусов были использованы для подбора праймеров онлайн-инструментом Primer-BLAST [158].

2.2.6 Полногеномное секвенирование

Для полногеномного секвенирования, качество и количество ДНК оценивали прибором Quantus Fluorometer, dsDNA (Promega, Madison, WI, США). Фрагментирование гДНК до средней длины 500 п.н. было проведено ультразвуком на приборе S2 (Covaris, Woburn, MA, США), в соответствии с протоколом производителя. Качество полученных фрагментов гДНК оценивали на TapeStation 2200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, США). Библиотеки ДНК были подготовлены при помощи набора Кара НТР Library Preparation Kit (Roche, Wilmington, MA, США) и отсеквенированы на приборе MiSeq (Illumina, San Diego, CA, США) с получением двухсторонних прочтений длиной 250 п.н.

Контроль качества исходных прочтений осуществляли программой FastQC [159]. Прочтения низкого качества и адаптеры TruSeq2 удаляли в ПО Trimmomatic [160]. Сборка геномных последовательностей была осуществлена *de novo* в ассемблере SPAdes 3.9.0 [161]. Филогеномную реконструкцию проводили с использованием коалесцентной модели в программе ASTRAL-III [162], а также методом максимального правдоподобия по точечным мутациям в программе FastTree2 пакета Harvest [163]. Информация об изолятах *T. mentagrophytes*, изученных филогеномными методами, приведена в Таблице 5.

Таблица 5 — Изоляты *Trichophyton mentagrophytes*, для которых в ходе работы были получены полногеномные последовательности.

Изолят	Год выделения	Страна происхождения	Клиническая картина	Регион ITS, номер доступа	Геном, номер доступа
Д15П152	2017	Россия	tinea capitis	MH708282	QQSP00000000
Д15П127	2016	Россия	tinea capitis	MH708281	QQSR00000000
Д15П156	2017	Молдова	tinea capitis	MH708283	QQSO00000000
Д15П135	2016	Индия	tinea cruris & corporis	KY761968	QQSQ00000000

Также было получено шесть полногеномных последовательностей *T. rubrum* (Таблица 6).

Таблица 6 — Изоляты *Trichophyton rubrum*, для которых в ходе работы были получены полногеномные последовательности.

Изолят	Год выделения	Место выделения	Клиническая картина	Геном, номер доступа
Д15П33	2015	Санкт-Петербург	Онихомикоз, микоз стоп	SRX6389058
Д15П44	2015	Санкт-Петербург	Онихомикоз	SRX6389060
Д15П50	2016	Санкт-Петербург	Онихомикоз	SRX6389057
Д15П62	2016	Санкт-Петербург	Онихомикоз	SRX6389059
Д15П71	2016	Санкт-Петербург	Онихомикоз	SRX6389062
Y1013	2017	Екатеринбург	Онихомикоз	SRX6389061

Для разработки схемы типирования *T. rubrum* методами секвенирования ДНК и ПЦР-РВ, основанными на однонуклеотидном полиморфизме, мы провели выравнивание 12 опубликованных геномов гриба *T. rubrum* с помощью ПО MUMmer 3.0 [164] по алгоритму NUCmer. Запись Генбанка для генома штамма CMCC(F)T1i LHPM00000000, штамма CBS 202.88 AOKX00000000, CBS 288.86 AOKU00000000, CBS 289.86 AOKV00000000, CBS 735.88 JHQM00000000, CBS 100081 AOKT00000000, CBS 118892 ACPH00000000, D6 AOLB00000000, IGIB-SBL-C11 JPGR00000000, MR850 AOKR00000000, MR1448 AOKZ00000000, MR1459 AOLC00000000. Локализация одиночных мутаций в белок-кодирующих локусах была проведена с использованием геномной сборки GCA_001651445.1 штамма CMCC(F)T1i в качестве референса. Полиморфные нуклеотидные позиции были аннотированы в программе SnpEff [165]. По результатам верификации обнаруженного полиморфизма на локальных выравниваниях в программе SeaView 4 для дальнейшего изучения субъективно был отобраны локусы

TERG_02941 и TERG_03298. Праймеры для амплификации данных геномных участков были подобраны вручную, с расчетом температуры плавления по методу Уоллеса: $T_m = 2(A + T) + 4(G + C) + 4$ [166].

2.2.7 Сравнение разрешающей способности методов типирования штаммов *T. rubrum*

Разрешающая способность методов типирования *T. rubrum* по локусам нетранскрибируемого спейсера рДНК и микросателлитного анализа была выражена через отношение числа индивидуальных генотипов к объему выборки. Сравнение разрешающей способности методов мы провели с использованием формулы для индекса клонального разнообразия $R = (G - 1)/(N - 1)$, где G — это число отдельных генотипов и N — число изолятов [167].

2.3 Статистические методы

Нулевая гипотеза об отсутствии связи между генотипами гриба *T. rubrum* и локализацией поражения на теле пациента была проверена при помощи критерия χ^2 . Расчет проводился в программной среде R 4.1.2 на выборке из 67 изолятов с однозначно известной локализацией [150].

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Фенотипическая характеристика штаммов *Trichophyton* spp.

Для изучения филогенетических отношений в роде *Trichophyton* мы изучили 55 штаммов, в том числе — 28 штаммов из Российской коллекции патогенных грибов. Их фенотипическая характеристика представлена в Таблице 7.

Таблица 7 — Фенотипическая характеристика изученных штаммов *Trichophyton* spp.

№	Штамм	Верхняя сторона колонии, фактура	Верхняя сторона колонии, цвет	Цвет обратной стороны колонии	Микроконидии	Макроконидии
<i>Trichophyton benhamiae</i>						
1	РКПГ 1457	Бархатистая	Кремовато-белый	Коричневый	Округлые и грушевидные	Н/о
<i>Trichophyton interdigitale</i>						
2	РКПГ 1229	Бархатисто-пушистая	Беловато-кремовый	Светло-коричневый	Округлые	Н/о
3	РКПГ 1301	Бархатисто-пушистая	Беловато-кремовый	Коричневый с вишневым оттенком	Каплевидные и грушевидные	Н/о
4	РКПГ 1394	Бархатисто-пушистая	Кремовато-белый	Темно-коричневый	Округлые и грушевидные	Н/о
5	РКПГ 1404	Мучнистая, мелкозернистая	Беловато-кремовый	Светло-коричневый	Округлые	Н/о
6	РКПГ 1459	Мелкозернистая и бархатистая	Бежевый	Темно-коричневый	Округлые	Н/о
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>						
7	РКПГ 266	Бархатисто-пушистая	Белый	Темно-коричневый	Грушевидные и округлые	Н/о
8	РКПГ 267	Бархатисто-мучнистая	Беловато-кремовый	Светло-коричневый	Округлые, грушевидные	Н/о
9	РКПГ 1207	Бархатисто-мучнистая	Желтовато-белый	Коричневый	Округлые и грушевидные	Н/о
10	РКПГ 1261	Мучнистая	Беловато-кремовый	Коричневый	Округлые	Н/о
11	РКПГ 1278	Бархатисто-мучнистая	Беловато-кремовый	Светло-коричневый	Округлые	Н/о
12	РКПГ 1425	Порошисто-мучнистая	Желтовато-белый	Темно-коричневый	Округлые	Н/о
13	РКПГ 1640	Мучнисто-	Беловато-	Темно-	Округлые	Тонкостенные

		порошистая	кремовый	коричневый		гладкие
			<i>Trichophyton rubrum</i>			
14	РКПГ 1280	Бархатистая	Беловато-кремовый	Светло-коричневый	Каплевидные	Н/о
15	РКПГ 1393	Кожисто-бархатистая	Желтовато-белый	Желтовато-коричневый	Н/о	Н/о
16	РКПГ 1408	Бархатистая	Розовато-белый	Темно-коричневый	Грушевидные, каплевидные	Н/о
17	РКПГ 1864	Пушистая	Белый	Желтый	Булавовидные, каплевидные	Н/о
18	РКПГ 1865	Пушистая	Белый	Желтый	Булавовидные, каплевидные	Н/о
19	РКПГ 1866	Бархатистая	Розовато-белый	Темно-вишневый	Булавовидные, каплевидные	Тонкостенные, сигарообразные
20	РКПГ 1867	Бархатистая	Белый	Желтый с вишневым	Булавовидные, каплевидные	Н/о
21	РКПГ 1868	Бархатистая	Желтый	Желтый	Булавовидные, каплевидные	Н/о
22	РКПГ 1869	Бархатистая	Белый	Желтый	Булавовидные, каплевидные	Н/о
23	РКПГ 1870	Бархатистая	Белый	Желтый с красным	Булавовидные, каплевидные	Н/о
			<i>Trichophyton schoenleinii</i>			
24	РКПГ 234	Мучнистая	Серовато-белый	Оранжевато-коричневый	Н/о	Н/о
			<i>Trichophyton simii</i>			
25	РКПГ 317	Бархатистая	Белый	Коричневый	Округлые	Н/о
			<i>Trichophyton tonsurans</i>			
26	РКПГ 212	Мучнистая	Белый	Желтовато-коричневый	Грушевидные	Н/о
27	РКПГ 1458	Зернисто-мучнистая	Рыжевато-красновато-коричневый	Красновато-коричневый	Округлые, каплевидные, булавовидные	Удлиненные тонкостенные
			<i>Trichophyton violaceum</i>			
28	РКПГ 1211	Бархатистая	Бледно-фиолетовый	Коричневато-фиолетовый	Н/о	Н/о

Н/о, не обнаружено.

У видов *T. interdigitale*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. tonsurans*, для которых было изучено три и более штаммов, изученные морфологические признаки варьировали. Например, микроконидии *T. interdigitale* имели округлую, каплевидную и грушевидную формы. Такой же спектр форм микроконидий мы

наблюдали у *T. mentagrophytes* [53]. Микроконидии *T. rubrum* имели булавовидную, каплевидную и грушевидную формы. В целом, четыре изученных признака не имели каких-либо видоспецифичных состояний, за одним исключением: колонии *T. violaceum* РКПГ 1211 с верхней стороны имели бледно-фиолетовый, а с обратной стороны — коричневато-фиолетовый цвет. Трихофитоны других видов подобной окраски не демонстрировали. Следует также отметить, что особенностью мицелия штамма *T. schoenleinii* РКПГ 234 было наличие ветвлений в виде «рогов оленя», характерных именно для данного вида [168].

3.2 Реконструкция филогенетических отношений в роде *Trichophyton*

При помощи филогенетического анализа конкатенированных последовательностей региона ITS и локуса LSU рибосомной ДНК, а также гена бета-тубулина *BT2* мы получили древо, разделенное на три хорошо поддержанные основные ветви *T. mentagrophytes* / *T. simii*, *T. benhamiae* и *T. rubrum* (Рисунок 5) [53]. Терминальная часть ветви *T. mentagrophytes* / *T. simii* содержала генетически однородные антропофильные изоляты *T. interdigitale*, сгруппированные вместе. Второй кластер в этой части древа принадлежал штаммам *T. tonsurans* и *T. equinum*. Изоляты *T. mentagrophytes* не образовывали самостоятельного кластера, и занимали базальное положение по отношению к изолятам *T. interdigitale*, *T. tonsurans* и *T. equinum*. *Trichophyton schoenleinii* группировался с последовательностями *T. simii* и *T. quinckeanum*, составляя базальную кладу для остальных членов ветви *T. mentagrophytes* / *T. simii*. Ветвь *T. benhamiae* была представлена группами *T. verrucosum* + *T. erinacei* и *T. benhamiae* + *T. concentricum*. Ветвь *T. rubrum* содержала генетически однородные изоляты *T. rubrum* и один штамм *T. violaceum*. Деревья, построенные исключительно на последовательностях ITS и *BT2*, обеспечивали удовлетворительное разрешение, в то время как на древе LSU отсутствовали кластеры *T. interdigitale* и *T. tonsurans*.

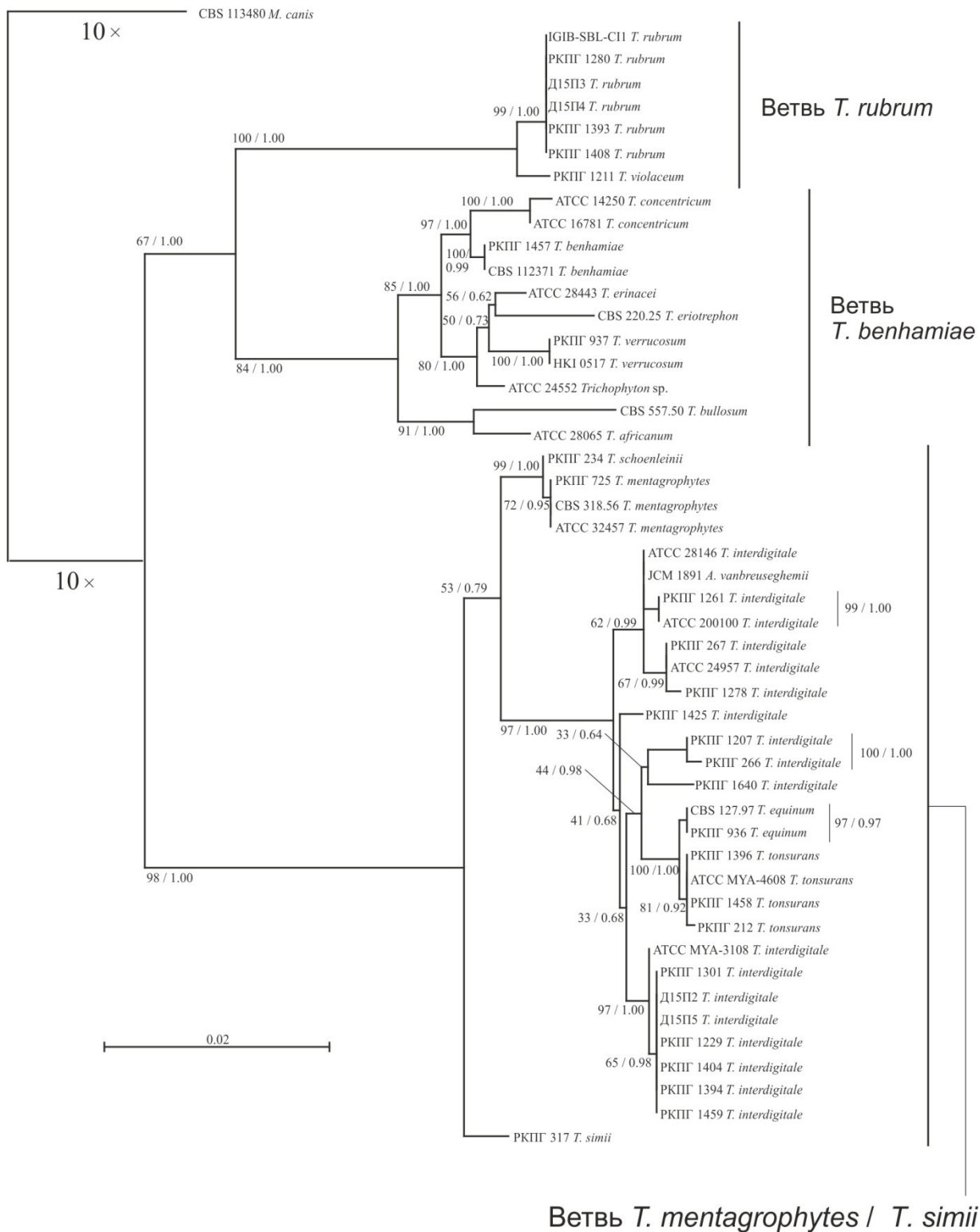


Рисунок 5. Филогенетическое древо рода *Trichophyton*, реконструированное методом максимального правдоподобия по нуклеотидным последовательностям локусов LSU, *BT2* и региона ITS.

Мы сравнили полиморфизм трех локусов у трех видов рода *Trichophyton*, используя равное количество последовательностей для каждого локуса. Набор для *T. interdigitale* содержал 11 последовательностей, и мы обнаружили шесть полиморфных сайтов в LSU, 12 полиморфных сайтов в ITS и 11 сайтов в *BT2*. Набор для *T. tonsurans* содержал три последовательности. Мы обнаружили только один полиморфный сайт в ITS, и два других локуса не содержали полиморфных позиций. Последовательности *T. rubrum*, семь для каждого локуса, оказались также очень однородными. Семь LSU, а также семь последовательностей *BT2* были идентичны. Из семи последовательностей ITS *T. rubrum* мы обнаружили только одну вариацию числа ТА-мотивов на 3'-концах последовательностей [53].

В литературе нет единого мнения насчет базальной филогенетической ветви рода *Trichophyton*. Поэтому для каждого из трех описанных в статье [98] наборов данных, или мультилокусных выравниваний (Таблица 4), в программе RAUP* мы вычислили 100 правдоподобных деревьев, и оценили их приблизительно объективным тестом Шимодайры (Shimodaira's AU test). Данный тест рассчитывает вероятность каждого дерева в выборке, после чего используя уровень значимости в ней оставляют только деревья, достоверно не отличающиеся от наилучшего. Для набора данных 1 93% деревьев не были отвергнуты тестом. Из этого числа в 86 случаях базальное положение занимала ветвь *T. benhamiae*, в 4 случаях — *T. rubrum*, и в 2 случаях — *T. mentagrophytes* / *T. simii*. В наборе данных 2 37% деревьев достоверно не отличались от наилучшего, соотношение базальных ветвей было 0:3:34. Для набора данных 3 с 84% не отвергнутых деревьев соотношение было 0:0:84.

Таким образом, мы провели реконструкцию филогенетических отношений в роде *Trichophyton* и выявили три основных филогенетических ветви, а также проанализировали историческую последовательность их возникновения. Сопоставление биологии размножения и филогенетических паттернов дерматофитов выявляет направление исторического развития группы в переходе от сапронозного экологического типа к зоонозному и антропонозному. В

классических работах по дерматофитам сравнение видов, использующих разные экологические стратегии, включало в себя признаки спороношения, адаптивные особенности морфологии мицелия, уреазной активности, выделения вторичных метаболитов [25]. В последние два десятилетия арсенал методов изучения разнообразия дерматофитов дополнился секвенированием баркодовых локусов ДНК и методиками точного типирования штаммов — МЛСТ, микросателлитным анализом.

Основная трехчастная структура филогенетических связей в роде *Trichophyton* была выявлена в 1999 году [115]. Дальнейшая работа сопровождалась публикацией конфликтующих топологий, основанных на новых, ранее не изученных у дерматофитов, локусах и с добавлением неопределенности в общую картину. Поэтому для определения базальной ветви филогенетического древа *Trichophyton* мы применили приблизительно объективный тест Шимодайры. Однако однозначный результат получен не был, для одного набора данных было показано базальное расположение ветви *T. benhamiae*, для двух — *T. mentagrophytes* / *T. simii*. Вероятно, базальной ветвью рода *Trichophyton* является группа *T. mentagrophytes*, как это видно на древе, построенном на основании полногеномных последовательностей [28], однако чего-то более определенного насчет более терминальных ветвлений сказать нельзя из-за того, что в процитированной работе изучено только пять из 22 известного вида дерматофитов.

На протяжении последних 20 лет в таксономию дерматофитов регулярно вносятся изменения. В литературе обсуждаются дальнейшие шаги по пересмотру классификации группы, однако отсутствует общая концепция того, как их следует предпринимать. Большая часть решений в области таксономии принимается на основании следующих концепций вида: биологической, филогенетической, экологической и морфологической. Популяция *T. rubrum* имеет хорошо очерченную двухчастную структуру, которая выявляется при изучении полиморфизма белок-кодирующих последовательностей, локусов вторичных

повторов рДНК, а также микросателлитов. Это позволяет их рассматривать как самостоятельные виды в рамках филогенетической концепции вида. Вместе с признаваемыми в настоящее время видами *T. soudanense* и *T. violaceum*, хорошо различимых по морфологии, *T. rubrum* образует компактную ветвь на филогенетическом древе рода *Trichophyton*. Геном *T. rubrum* содержит две белок-кодирующие последовательности, для которых нет ортологов в геноме *T. violaceum*. Геном *T. violaceum*, в свою очередь, содержит 15 таких последовательностей. Виды имеют ярко выраженные различия по клинической картине вызываемых заболеваний: если *T. rubrum* поражает в основном ногти и кожу стоп, то *T. violaceum* инфицирует в основном волосистую часть головы. Считается, что данные различия могут быть объяснены различным репертуаром адгезинов. Однако сходство последовательностей геномов *T. rubrum* и *T. violaceum* достигает 99%, в связи с чем обсуждается синонимичность этих таксонов, имеющих ярко выраженные экологические различия. На мультилокусных филогенетических древах *T. interdigitale* и близкие к нему изоляты образуют хорошо очерченную группу. Также, *T. interdigitale* вызывает заболевания с иными клиническими проявлениями по сравнению с *T. mentagrophytes*. Однако самостоятельный статус *T. interdigitale* не подтверждается при проведении филогенетического анализа. Генотипы региона ITS *T. mentagrophytes* и *T. interdigitale* образуют непрерывный ряд, в филогенетических сетях, построенных по мультилокусным выравниваниям, шум преобладает над сигналом. Это может служить основанием для объединения двух видов. Наконец, в литературе можно найти описание получения фертильных гибридов *T. mentagrophytes* и *T. simii*, способных скрещиваться, в том числе, с *T. benhamiae*, с образованием фертильного потомства. *Trichophyton simii* скрещивался и с *T. benhamiae*, тоже с образованием фертильного потомства, что свидетельствует в пользу объединения *T. mentagrophytes* и *T. benhamiae* в единый вид, на основании биологической концепции. Генетическое разнообразие рода *Trichophyton* имеет многоуровневую структуру, и разбито на виды достаточно

дробно, в связи с их значимостью для медицины. При относительно хорошей изученности биоразнообразия, существуют концептуальные основы как для слияния существующих видов, так и для их дальнейшего разделения. Поскольку к интерпретации генетического разнообразия нет единственного правильного подхода, любые изменения в таксономии должны делаться только при крайней необходимости.

3.3 Разнообразие и география генотипов ITS *Trichophyton mentagrophytes* и *T. interdigitale*

Изучение разнообразия и распространения генотипов ITS *T. mentagrophytes* и *T. interdigitale* было проведено на последовательностях из базы данных Генбанк. Это потребовало написания скриптов, которые бы позволяли отбирать записи базы данных и сортировать последовательности по генотипам. Скрипт `puttorights.py` предназначен для отбора нуклеотидных последовательностей по наличию определенного тестового элемента. Код представлен в Приложении Б. Тестовый элемент задан в начале скрипта, после чего следует определение функции «complement», которая переводит нуклеотидные последовательности в комплементарную форму. После этого следует блок, выводящий в окно терминала последовательность тестового элемента и запрашивающий согласие с условием отбора последовательностей или останавливающий выполнение скрипта. После этого в файл `clean.fasta` выписываются все уникальные последовательности в направлении 5'-3'. Отдельный блок выписывает последовательности, не соответствующие критерию отбора, в файл `abandoned.fasta`. По завершении работы скрипта на экран выводятся следующие показатели: общее число проанализированных записей, число однокопийных записей. При наличии записей с одинаковыми номерами доступа выводится их число. Также указывается число записей, переписанных в файл `clean.fasta` и отброшенных последовательностей.

Скрипт `compactor.py` (Приложение В) предназначен для объединения идентичных последовательностей в группы (генотипы). Он принимает на вход файл с последовательностями в формате FASTA. Для обеспечения корректной работы скрипта эти последовательности должны быть выровнены и обрезаны в любой подходящей для этого программе, например, SeaView 4. Первый функциональный блок кода (строки 15–33) осуществляет проверку дублирования номеров доступа в исходном файле и выводит на экран количество уникальных последовательностей, а также количество повторяющихся последовательностей. Второй и третий блоки (35–73 строки) запрашивают решение об удалении последовательностей, содержащих вырожденные нуклеотиды и о использовании правила 3/2 для отбора последовательностей. Необходимо вводить строчные буквы `u` и `n`, результаты записываются в виде значений переменных. Блок 4 (строки 76–112) запускается при наличии положительного решения о применении правила 3/2 для отбора последовательностей, если в рабочей директории отсутствует файл `«entry_origin.txt»`, содержащий информацию о локализации лабораторий, депонировавших ту или иную последовательность. В ходе выполнения блока 4 создается файл `«entry_origin.txt»`, в которых из файла `infile.txt` с записями в формате GenBank переписываются генотипы. В названиях генотипов через дефис указывается количество вхождений данной последовательности в исходном файле. Скрипты `puttorights.py` и `compactor.py`, использованные для работы с нуклеотидными последовательностями, были размещены на веб-странице <https://github.com/Ivan-Pchelin/genotyping-by-sequencing>.

На разных этапах работы потребовалось написать к ним малых вспомогательных скриптов. Скрипт `attributegenotypes.py` (Приложение Д) предназначен для сравнения двух файлов в формате FASTA: набора данных `"single.fasta"` и файла с референсными последовательностями `"referenceset.fasta"`. Результатом работы скрипта является таблица `"attributed.txt"`, первая колонка которой содержит названия последовательностей из `"single.fasta"`, а во второй колонке приведены номера доступа идентичных последовательностей из

"referenceset.fasta". Скрипт `snamestocoordinates.py` (Приложение Е) принимает на вход таблицу со списками стран и таблицу с долготами и широтами и преобразует их в список координат. Скрипт `genotype_vs_tinea.py` (Приложение Ж) суммирует содержимое файла `genotype_vs_tinea.txt` в виде таблицы `summary.txt`, где колонки соответствуют разновидностям дерматомикоза: микозу стоп, онихомикозу, микозу гладкой кожи, крупных складок, рук, волосистой части головы, лица. Строки содержат названия генотипов из файла `tm-ti_groups.txt`, а в ячейки вносятся количество записей, в которых определенная патология вызывается некоторым генотипом. Скрипт `assnos.py` (Приложение З) считает количество слов в комментариях файла FASTA и выписывает их в новый файл, каждое с новой строки, с угольной скобкой.

Для анализа накопленных мировым научным сообществом данных по генетическому разнообразию и биогеографии *T. mentagrophytes* и *T. interdigitale* мы отобрали последовательности, которые были размещены в базе данных как минимум три раза лабораториями как минимум из двух стран [98]. Это дало в общей сложности 1205 записей, содержащих 17 генотипов *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale*. Из этого числа 971 запись имела географические аннотации или могла быть аннотирована на основе поисков в онлайн-базах данных ATCC, INEM и CBS или в оригинальной литературе. Десять генотипов имели как минимум 10 географических аннотаций и были нанесены на карту мира с использованием программного обеспечения R [169, 170] (Рисунок 6). Северная и Южная Америка вносили только 2% последовательностей в общее количество и не имели уникальных генотипов и поэтому не были показаны. Африка внесла менее 1% последовательностей в мировой набор данных. Мы разделили хорошо аннотированные генотипы на три группы. Генотипы "FM986750", "KT285210" были найдены только в европейских странах. Изоляты с генотипом "MF926358" были обнаружены в 18% от всех европейских записей и 1% записей из Азии и Океании. Генотипы "KT192500" и "KU315316" были обнаружены только в Азии и Океании, изоляты с генотипом "KU496915" были обнаружены в 27% записей из

Азии и Океании и отсутствовали в европейских записях. Генотипы "JX122216", "FM986691", "AF170453", "KP132819" были представлены как в Европе, так и в Азии. Поэтому генотипы "FM986750", "KT285210" и "MF926358" считались европейскими, а генотипы "KT192500", "KU315316" и "KU496915" — азиатско-океаническими. Другие четыре достаточно аннотированных генотипа были обозначены как космополитические. На территории РФ обнаружены пять генотипов комплекса *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale*, имеющие европейское распространение — "FM986750", "KT285210" и "MF926358", глобальное — "JX122216" и "KP132819" [96].

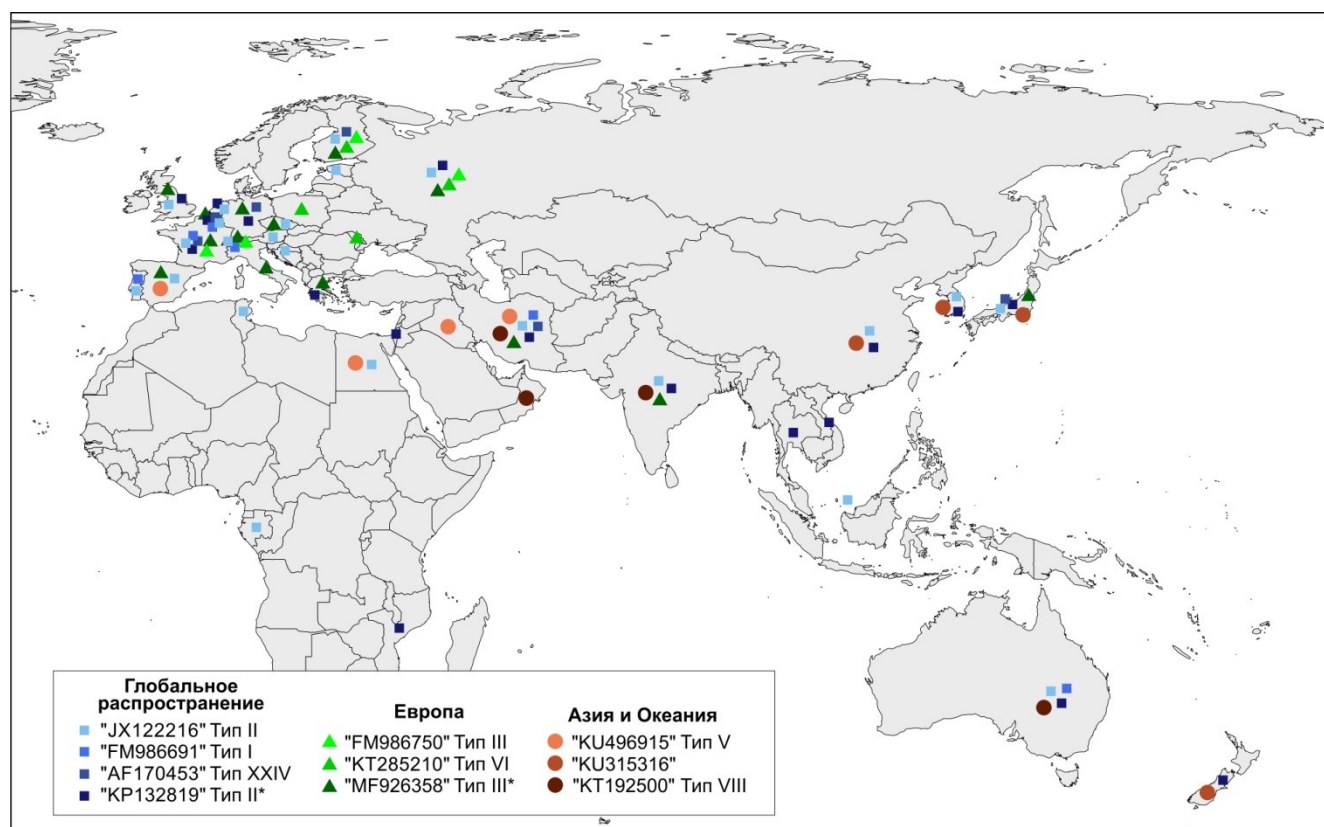


Рисунок 6. Географическое распределение генотипов грибов *Trichophyton mentagrophytes* / *T. interdigitale*, для которых доступно не менее 10 географических аннотаций (n = 971). Вклад выборки изолятов из Северной и Южной Америк в общее число географических аннотаций составил 2%, при отсутствии уникальных генотипов. Поэтому данные континенты не показаны на иллюстрации.

Таким образом, мы провели биоинформационный анализ нуклеотидных последовательностей и аннотаций к ним *T. mentagrophytes* и *T. interdigitale*, что позволило оценить разнообразие и распространение генотипов ITS.

Изучение структуры популяции патогенных микроорганизмов и разграничение генетических линий является необходимым аспектом исследований, направленных на объяснение их функционального разнообразия. Исторически считалось, что небольшой размер, наличие покоящихся стадий и быстрая репродукция живых организмов с размерами менее 2 миллиметров позволяют распространяться им глобально, вне зависимости от географических барьеров и расстояний. Индивидуальность видового состава конкретных биотопов объясняли различными условиями окружающей среды, что было выражено в известной формуле «Всё везде, но окружающая среда отбирает» («Everything is everywhere, but the environment selects») [171]. Исследования последних десятилетий опровергли эту точку зрения, предоставив теоретические и эмпирические доказательства в поддержку существования пространственных структур распространения микроорганизмов в разных масштабах и соответствующих биогеографических процессов [172-174].

Географически ограниченное распространение определенных генетических линий значимых для медицины грибов является распространенным явлением [101]. Это во многих случаях позволяет, используя секвенирование ДНК, проследить происхождение инфекционного агента [175]. Заболевания, вызванные отдельными географическими расами возбудителей, могут сопровождаться специфическими клиническими проявлениями и лекарственной устойчивостью [176]. На полной выборке последовательностей региона ITS группы *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* из Генбанка, дополненной оригинальными данными, мы смогли продемонстрировать, что более половины наблюдаемого генетического разнообразия в пределах видового комплекса принадлежит генотипам с географически ограниченными ареалами.

Как показал проведенный нами анализ, не менее шести генотипов *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* обладают ограниченным географическим распространением. В связи с этим, можно предложить несколько гипотез. Во-первых, есть ли связь микроэволюционных процессов в комплексе *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* с историческими миграциями человека? Такая связь, например, показана для вшей [177] и вируса гепатита В [178]. Эта гипотеза может быть проверена сверкой времени дивергенции в филогеномных наборах данных с известными датировками событий в эволюции и миграции человека [179]. Во-вторых, имел ли место независимый перенос грибов группы *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* от различных животных к человеку? Такой сценарий подразумевает относительно давнюю эволюционную историю комплекса по сравнению с распространением человека по Земному шару, которое произошло относительно недавно — всего около 60 тысяч лет назад [179]. Ответ на этот вопрос потребует более внимательного изучения генетического разнообразия группы на диких животных. До сих пор *T. mentagrophytes* находили у собак, кошек, хорьков, лошадей, антилоп, кроликов, мышей, крыс, белок, хомяков, шиншилл, морских свинок. Описаны случаи заболевания у таких экзотических животных, как гигантская панда и снежный леопард [180]. В-третьих, вносит ли климатический фактор вклад в распространенность инфекций, вызванных *T. mentagrophytes* и *T. interdigitale* с определенными генотипами? Это можно было бы проверить, моделируя инфекцию на подопытных животных при контролируемых температуре и влажности.

Интересно, что *T. mentagrophytes* с генотипом "КТ192500" Тип VIII ассоциирован с проблемами терапии тербинафином [45, 181]. Эта связь была объяснена наличием мутации в гене эпоксидазы сквалена [181]. Поскольку между генотипом ITS и нуклеотидной последовательностью фермента нет прямой связи, можно предположить, что резистентность к терапии и эффективная антропонозная передача изолятов привели к распространению устойчивой части пула изолятов генотипа "КТ192500". Это может быть подкреплено данными

проведенного недавно в Иране национального исследования, в ходе которого было изучено 397 штаммов *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale*. Были определены последовательности региона ITS изолятов, проводилось определение чувствительности к тербинафину. Было выявлено 5 устойчивых штаммов, с МПК > 32 мкг/мл. Все устойчивые штаммы обладали генотипом "КТ192500". При этом общее количество штаммов данного генотипа составило 35 штук. Соответственно, 6/7 от числа изолятов "КТ192500" не были устойчивы к действию лекарственного препарата [96].

Полученное знание о биогеографических паттернах распространения генотипов *T. mentagrophytes* и *T. interdigitale* может быть использовано для проведения эпидемиологических расследований. Так, в 2016 году нами было подтверждено экзотическое происхождение инфекции, вызванной штаммом с генотипом "КТ192500" [45]. Вместе с тем, четыре генотипа *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* распространены глобально. Это может указывать на значительный вклад миграции населения, туризма и торговли в формирование локальных популяций дерматофитов. Применимость секвенирования региона ITS для целей изучения эпидемиологии инфекций, обусловленных *Trichophyton* spp., может быть ограничена миграционными потоками, приводящими к изменениям этиологической структуры дерматофитий [182].

Выявленный нами географический паттерн распределения генотипов группы *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* схож с полученными ранее результатами для *T. tonsurans* [62]. В упомянутой работе глобальная выборка из 198 штаммов была изучена методом секвенирования ДНК по 13 генам. Было получено 4 ветви, две из которых встречались преимущественно в Северной Америке, одна — в Южной Америке, и одна — в Европе.

Пространственная структура распространения свободноживущих грибов объясняется различиями климатических условий разных территорий и историческим преобразованием суши [183]. Интересным примером

аллопатрического видообразования являются виды-двойники *Heterobasidion annosum* и *H. irregulare*. Это экономически значимые патогены хвойных растений, один распространен в Европе, а второй — в Северной Америке. Вероятнее всего, видообразование в этой группе было обусловлено движением литосферных плит. В настоящее время между ними наблюдаются различия в предпочтениях к растениям-хозяевам и определенным условиям окружающей среды. Генетические исследования выявляют фиксированные мутации [184]. Несмотря на это, в месте интродукции *H. irregulare* в Италию между двумя видами происходит обмен генетическим материалом [185].

Таким образом, проведенный нами анализ географических аннотаций записей базы данных Генбанк, содержащих последовательности рибосомного региона ITS грибов *T. mentagrophytes* и *T. interdigitale* показал, что они принадлежат к числу видов рода, имеющих генотипы с ограниченным распространением. В будущем предстоит ответить на вопрос о возможных факторах, приведших к формированию этих паттернов.

3.4 Анализ межвидовых границ в комплексе *Trichophyton mentagrophytes* / *T. interdigitale*

Поскольку наиболее значимый вклад в вопрос о границах видов в комплексе *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* был сделан с использованием последовательностей региона ITS рибосомной ДНК, мы изучили разнообразие последовательностей ITS грибов рода *Trichophyton* из базы данных Генбанк. Было выявлено 1396 записей, содержащих 44 отдельных генотипа. Из этого числа 15 принадлежали *T. mentagrophytes* и *T. interdigitale* (34%). Типовые и референсные последовательности, использованные для определения видовой принадлежности, приведены в Таблице 8.

Таблица 8 — Последовательности региона ITS типовых и аутентичного штамма *Trichophyton* spp. по де Хогу с соавторами, [10], использованные для определения видов.

Вид	Штамм	Номер доступа в Генбанке
<i>T. equinum</i>	CBS 270.66	KT155643
<i>T. interdigitale</i>	CBS 428.63	JX122216
<i>T. mentagrophytes</i>	ИЕМ 4268	MF926358
<i>T. quinckeanum</i>	ИЕМ 13697	NR_144899
<i>T. schoenleinii</i>	CBS 458.59	LC375549
<i>T. simii</i>	CBS 417.65*	KT155890
<i>T. tonsurans</i>	CBS 496.48	KT155650

* аутентичный штамм

Распределение генетических расстояний в выборке обладало выраженным штрих-кодовым зазором. Правдоподобная кладограмма была разделена на три основные группы видов, которые содержали 12 гипотез РТР и 15 гипотез АВGD. Три гипотезы РТР и четыре вида АВGD принадлежали ветви *T. mentagrophytes* / *T. simii*. Анализ АВGD объединил *T. mentagrophytes* с *T. interdigitale*, *T. equinum* с *T. tonsurans* и *T. quinckeanum* с *T. schoenleinii*. Первые две пары видов объединялись в одну гипотезу РТР (Рисунок 7).

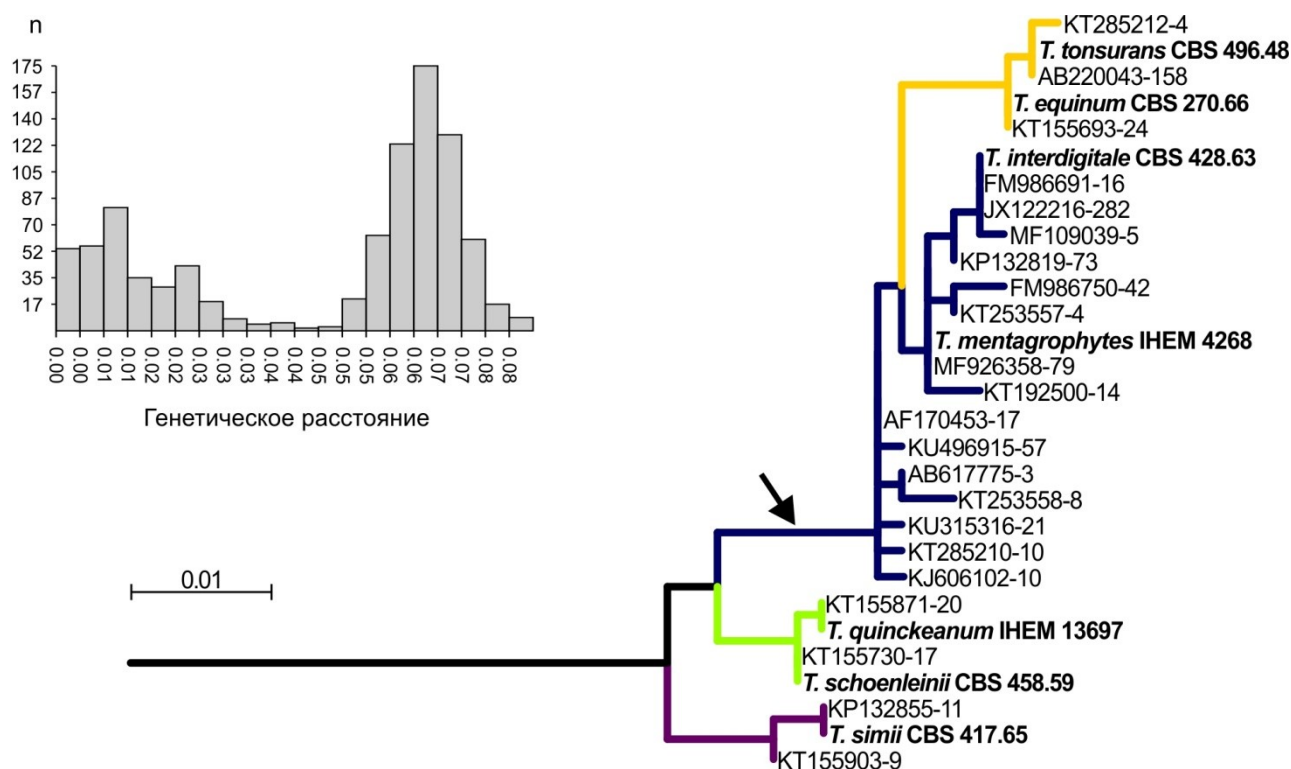


Рисунок 7. Вычислительный анализ видовых границ в ветви *T. mentagrophytes* / *T. simii* методами ABGD и PTP на основе выравнивания последовательностей региона ITS. Результаты нанесены на правдоподобное древо рода *Trichophyton*, также построенное на основе последовательностей региона ITS. Результаты, полученные методом ABGD, содержали четыре видовые гипотезы, отмеченные цветом. Методом PTP было получено три видовые гипотезы. Стрелкой отмечена ветвь, представленная одной видовой гипотезой в результатах PTP. Числа после дефисов указывают на число записей Генбанка, содержащих данный генотип. *Trichophyton mentagrophytes* и *T. interdigitale* принадлежат одной и той же видовой гипотезе в результатах обоих анализов. Промежуточный генотип ITS отмечен звездочкой. Врезка: распределение дистанций Джукса-Кантора между 44 известными вариантами последовательности региона ITS *Trichophyton* spp. Виден баркодовый зазор.

Мультилокусные наборы данных, априори ограниченные количеством изолятов, тем не менее, позволяют глубже понять филогенетический процесс по сравнению с однолокусными анализами. Кроме того, оригинальные публикации не поднимали вопрос о наличии филогенетического сигнала. Чтобы восполнить этот пробел, мы использовали метод построения филогенетических сетей.

Общая структура филогенетических сетей на основе трех мультилокусных наборов данных была аналогичной. В ветви *T. mentagrophytes* / *T. simii* виды *T. quinckeanum* и *T. simii* (набор данных 1) или *T. quinckeanum* и *T. schoenleinii* (набор данных 2) или все три (набор данных 3) занимали базальное положение, в то время как группа штаммов *T. mentagrophytes*, *T. interdigitale*, *T. tonsurans* и *T. equinum* образовывала один терминальный кластер без заметных ветвей (Рисунок 8).

Поскольку мы хотели решить вопрос о полифилии *T. mentagrophytes*, для полногеномного секвенирования мы выбрали изоляты с генотипами ITS, ветвящимися до *T. tonsurans* / *T. equinum* на древе ITS (Д15П156) и после них (Д15П127, Д15П135, Д15П152). На филогенетических деревьях *T. tonsurans* и *T. equinum* занимали основное положение относительно комплекса *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* и геномов *T. interdigitale* и изолятов с промежуточным звеном между *T. mentagrophytes* и *T. interdigitale*. Два изолята с промежуточным генотипом ITS и *T. interdigitale* занимали терминальное положение на древе и были отделены друг от друга не более чем 64337 точечными мутациями (*T. interdigitale* MR816 и *Trichophyton* sp. Д15П152). Это число было меньше, чем наименьшее расстояние между любыми изолятами *T. mentagrophytes* (89566 SNP между изолятами Д15П127 и М8436) и наименьшее расстояние от любого *T. interdigitale* или промежуточного изолята до любого изолята *T. mentagrophytes* (163623 SNP между изолятами *Trichophyton* sp. Н6 и *T. mentagrophytes* ТИММ 2789).

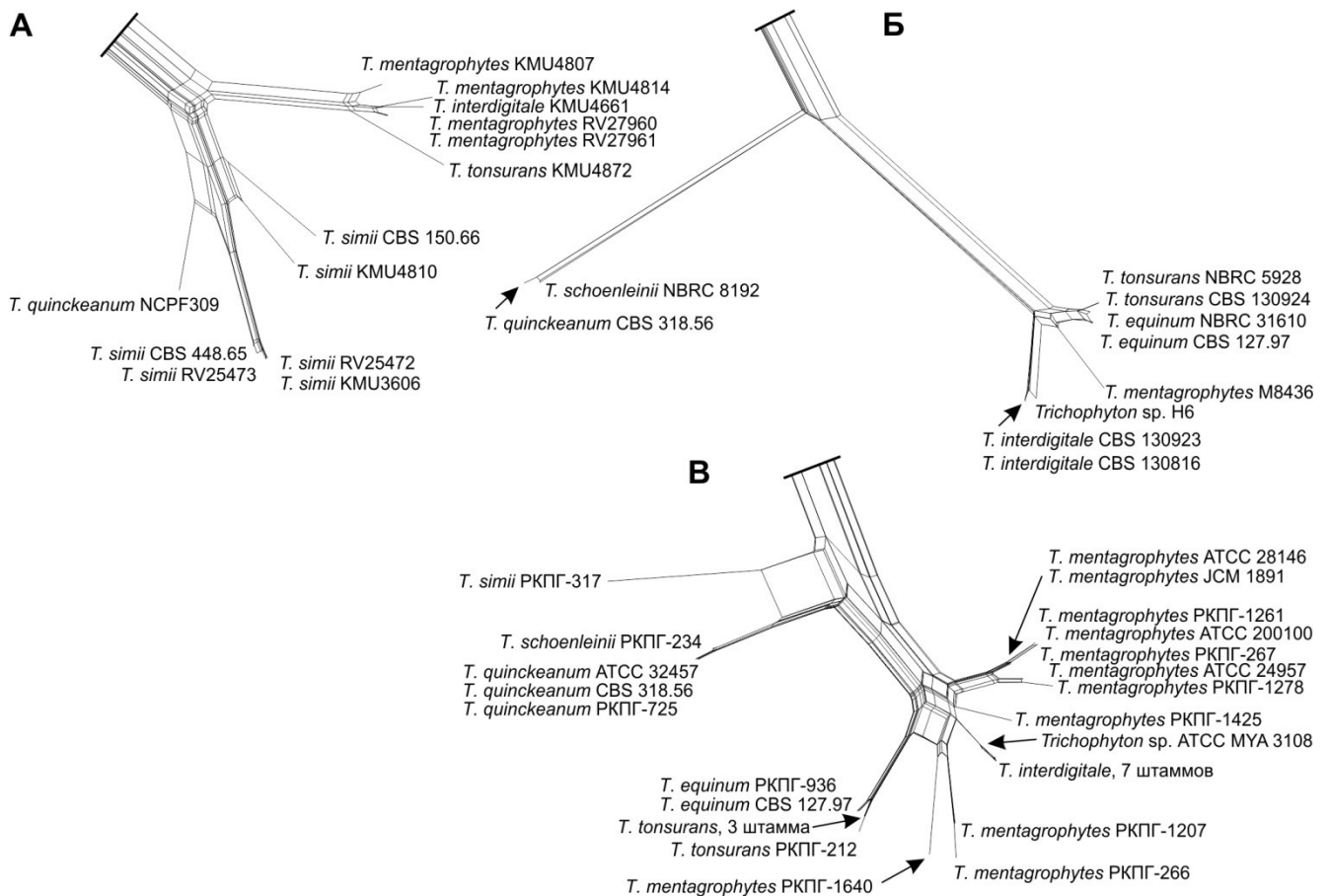


Рисунок 8. Филогенетические сети, визуализирующие структуру выравниваний конкатенированных последовательностей из работ: А, [51], Б, [52, 54, 55], В, [53]. Для всех трех сетей показан только участок с изолятами клады *T. mentagrophytes* / *T. simii*. Штаммы с промежуточным генотипом "КР132819", который не может быть однозначно определен как *T. mentagrophytes* или *T. interdigitale*, обозначены как «*Trichophyton* sp.»». Выравнивания не содержат определенных нуклеотидных паттернов, подтверждающих независимость *T. mentagrophytes* и *T. interdigitale*, а также общей группы обоих видов.

В то время как коалесцентное филогенетическое дерево содержало отдельную ветвь *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* (Рисунок 9), на дереве SNP она отсутствовала (Рисунок 10).

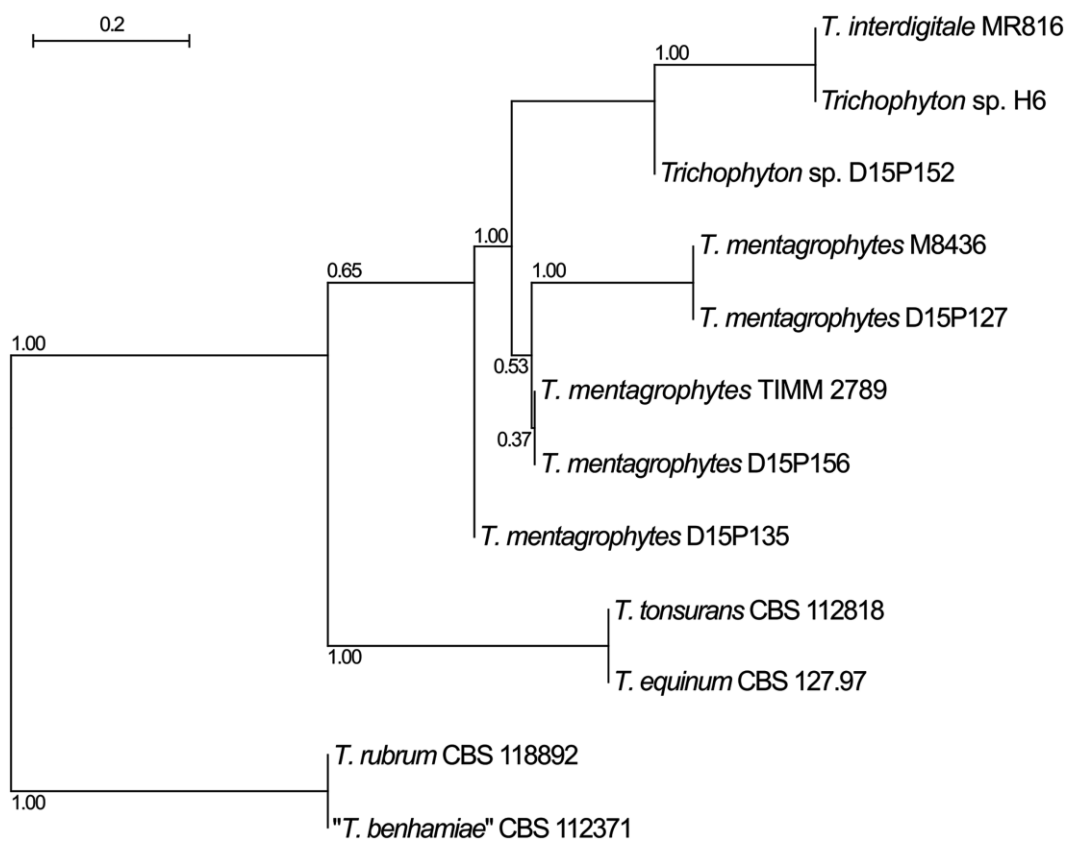


Рисунок 9. Группа видов *Trichophyton mentagrophytes* / *T. interdigitale*. Коалесцентное филогенетическое древо, построенное в программе ASTRAL III. Изолят *T. interdigitale* MR816 ветвится терминально с промежуточными штаммами Н6 и Д15П152. Нет отдельной ветви для изолятов *T. mentagrophytes*.

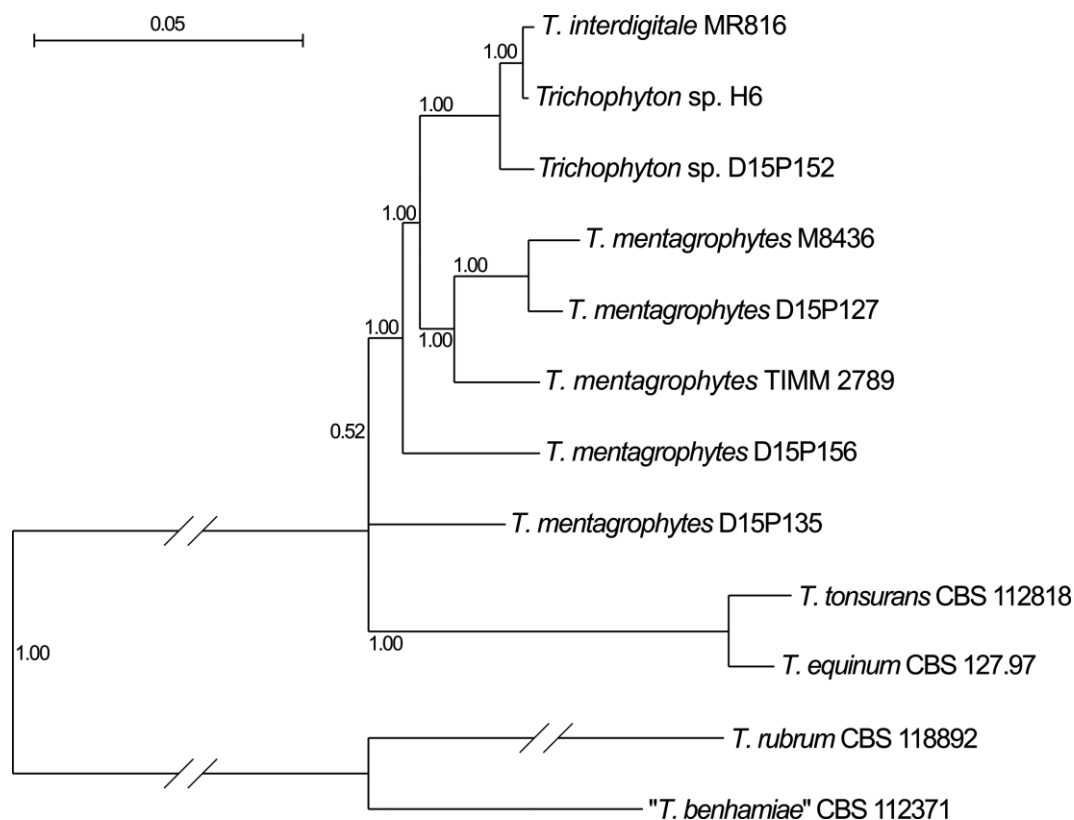


Рисунок 10. Группа видов *Trichophyton mentagrophytes* / *T. interdigitale*. Правдоподобное филогенетическое древо, основанное на ОНП. Изолят *T. interdigitale* MR816 ветвится терминально с промежуточными штаммами Н6 и Д15П152. Нет отдельной ветви для изолятов *T. mentagrophytes*. Общая ветвь *T. mentagrophytes* и *T. interdigitale* не разрешена.

Клинико-эпидемиологические данные являются краеугольным камнем обсуждения границ видов *T. mentagrophytes* и *T. interdigitale*. Мы решили не полагаться на ограниченное число наших собственных штаммов, а скорее на обобщение информации, доступной в аннотациях последовательностей из Генбанка. Для *T. mentagrophytes* были доступны 154 клинические аннотации. Для типа ITS-последовательности *T. interdigitale* мы нашли 90 аннотаций, «*T. interdigitale* sequence type I» не имели таких аннотаций. В последующем обсуждении мы полагаемся на данные Хайдемманна и др. о 10 таких изолятах, все из которых происходят из случаев микоза стоп и онихомикоза. Кроме того, клинические данные были доступны для 29 записей Генбанк с промежуточным генотипом. В общей сложности 43% записей с последовательностями региона ITS

группы видов *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* имели клинические аннотации. Клинические изоляты *T. mentagrophytes* происходили преимущественно из случаев *tinea corporis* (77%), тогда как *T. interdigitale* и промежуточные генотипы были обнаружены в основном в случаях онихомикоза и микоза стоп (59%). *Trichophyton mentagrophytes* и промежуточные генотипы были получены от млекопитающих (31% и 26% соответственно), но *T. interdigitale* имел строго человеческое происхождение. Строго говоря, все виды филогенетических анализов, применяемые здесь: вычислительный анализ видовых границ на основании последовательностей региона ITS, филогенетические сети, основанные на мультилокусных выравниваниях, полногеномная филогения, свидетельствуют о существовании только одного вида вместо двух, *T. mentagrophytes* и *T. interdigitale*. Поскольку таксономическая стабильность является фундаментальным принципом, может быть разумным сохранить независимый статус *T. interdigitale*. Чтобы заполнить таксономию эпидемиологическим смыслом, мы должны рассматривать штаммы с промежуточным генотипом "KP132819" как *T. mentagrophytes*. Поэтому *T. interdigitale* по существу оказывается ограниченным двумя генотипами: "FM986691" и "JX122216" [98].

Таким образом, мы определили последовательности четырех геномов гриба *T. mentagrophytes* и дополнили выборку геномами грибов рода *Trichophyton* из Генбанка. Кладограммы были построены на основании распределения точечных мутаций, а также с применением коалесцентной модели к выборке из 300 индивидуальных древ, полученных по методу присоединения соседей. Эти кладограммы, с одной стороны, показали обособленность ветви *T. tonsurans* / *T. equinum* относительно ветви *T. mentagrophytes* / *T. simii*, и терминальное положение *T. interdigitale* в ней. С другой стороны, клада *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* не была разрешена на древе, построенном по точечным мутациям. Кроме того, вычислительный метод разграничения видов ABGD, примененный к полной выборке последовательностей региона ITS грибов рода *Trichophyton* из Генбанка, не подтвердил выделение *T. mentagrophytes* и *T. interdigitale* в

отдельные виды. Более того, методом РТР к единой видовой гипотезе отнес четыре вида — *T. mentagrophytes*, *T. interdigitale*, *T. tonsurans* и *T. equinum*. Три филогенетические сети, построенные для ранее опубликованных мультилокусных нуклеотидных выравниваний, не содержали филогенетического сигнала в своих частях, относящихся к этим же четырем видам. Все эти обстоятельства позволили нам поддержать ранее высказанную в литературе точку зрения о том, что *T. mentagrophytes* и *T. interdigitale* относятся к одному филогенетическому виду [98].

Классической работой, рассматривающей генетическое разнообразие комплекса *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale*, является статья Хайдемана и соавторов [20]. В ней на основе изучения выборки из 124 западноевропейских и 6 китайских изолятов описываются три генотипа *T. mentagrophytes* (FM986750 — III, Европа; MF926358 — III*, космополит; KJ606102 — IV, особенности распространения не известны) и два генотипа *T. interdigitale*. Делается вывод, что генотипы *T. mentagrophytes* являются антропонозными, а *T. interdigitale* — зоонозными. Однако любое, даже самое подробное исследование, проведенное на ограниченной территории, не может быть всеохватывающим. Поэтому полученные нами результаты являются логичным развитием данного направления исследований. Анализ базы данных показал, что к настоящему времени известно 17 генотипов гриба *T. mentagrophytes*, причем не менее трех из них ограничены в своем распространении Азией и Океániей. В настоящее время степень аннотации записей Генбанка не позволяет сделать какие-либо выводы в отношении хозяйных предпочтений отдельных генотипов комплекса. Такое сравнение оказалось возможным провести для взятых в совокупности генотипов *T. mentagrophytes*, *T. interdigitale* и промежуточного генотипа. Проведенный нами анализ подтвердил заключение Хайдемана об антропонозном происхождении изолятов грибов вида *T. interdigitale*. Интересно, что если промежуточный генотип по этому признаку имел большее сходство с *T. mentagrophytes*, то по клинической картине вызываемых поражений оказался ближе к *T. interdigitale*.

Клинические аспекты имеют большое значение в систематике дерматофитов, и на данном этапе исследований нам не удалось однозначно разрешить вопрос о видовой принадлежности промежуточного генотипа. Сообщения о выделении данных изолятов можно найти в литературе [186], но вопрос ожидает своего решения.

3.5 Структура популяции гриба *Trichophyton rubrum*

Работа по охарактеризованию популяции *T. rubrum* на территории Санкт-Петербурга и Екатеринбурга молекулярно-генетическими методами была проведена в два этапа. На первом этапе выборка из 50 петербургских изолятов была типирована по электрофоретическим паттернам локусов TRS-1 и TRS-2 региона NTS. Результаты амплификации элемента TRS-1 были представлены шестью электрофоретическими паттернами, элемент TRS-2 был представлен четырьмя вариантами (Рисунок 11А). Паттерны продуктов амплификации локуса TRS-1 № 5 и № 6 были представлены несколькими полосами. Профили пятого типа проявляли небольшой полиморфизм, но хорошо отличались от профиля шестого типа (Рисунок 11Б).

Мы поставили перед собой задачу расширить арсенал методов типирования гриба. Путем выравнивания 12 опубликованных последовательностей геномов был составлен список однонуклеотидных замен, и для секвенирования методом Сенгера был субъективно отобран белок-кодирующие локусы TERG_02941 и TERG_03298. По этим двум локусам было проведено секвенирование ДНК той же выборки из 50 изолятов *T. rubrum*. В обоих локусах была выявлена единственная полиморфная нуклеотидная позиция. Мутации в двух локусах у всех изолятов были синхронные.

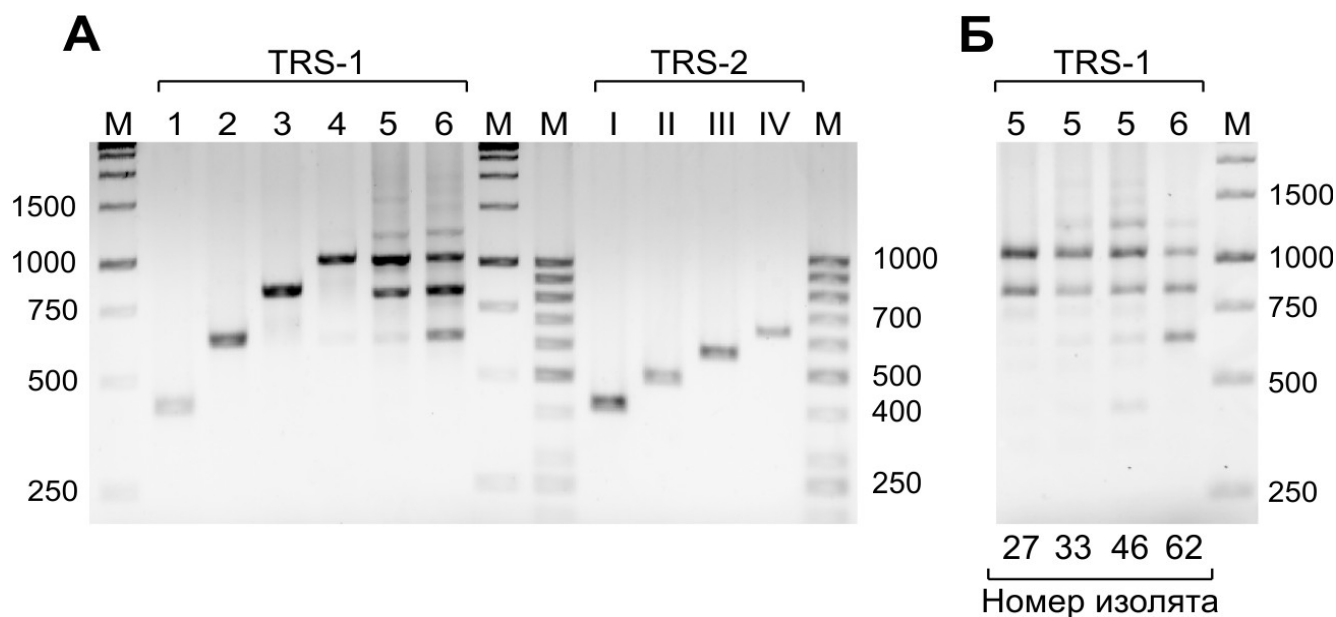


Рисунок 11. *Trichophyton rubrum*. А, Результат амплификации локусов вторичных повторов TRS-1 и TRS-2 нетранскрибируемого спейсера рДНК. Б, Электрофоретические паттерны продуктов амплификации локуса TRS-1 пятого типа в сравнении с паттерном шестого типа.

Наиболее обычный генотип TERG_02941 793A / TERG_03298 247T был обозначен как «тип последовательности 1» (ТП1), и второй генотип TERG_02941 793G / TERG_03298 247C — как «тип последовательности 2» (ТП2). Важно, что результаты секвенирования ДНК по локусам TERG_02941 / 03298 совпали с результатами типирования по локусу TRS-1. Продукт амплификации локуса TRS-1 изолятов ТП1 был представлен одиночной полосой, длиной примерно 450 п.н., только за одним исключением. Таким образом, изученная популяция имела двухчастную структуру, выявляемую двумя независимыми методами (Рисунок 12) [144].

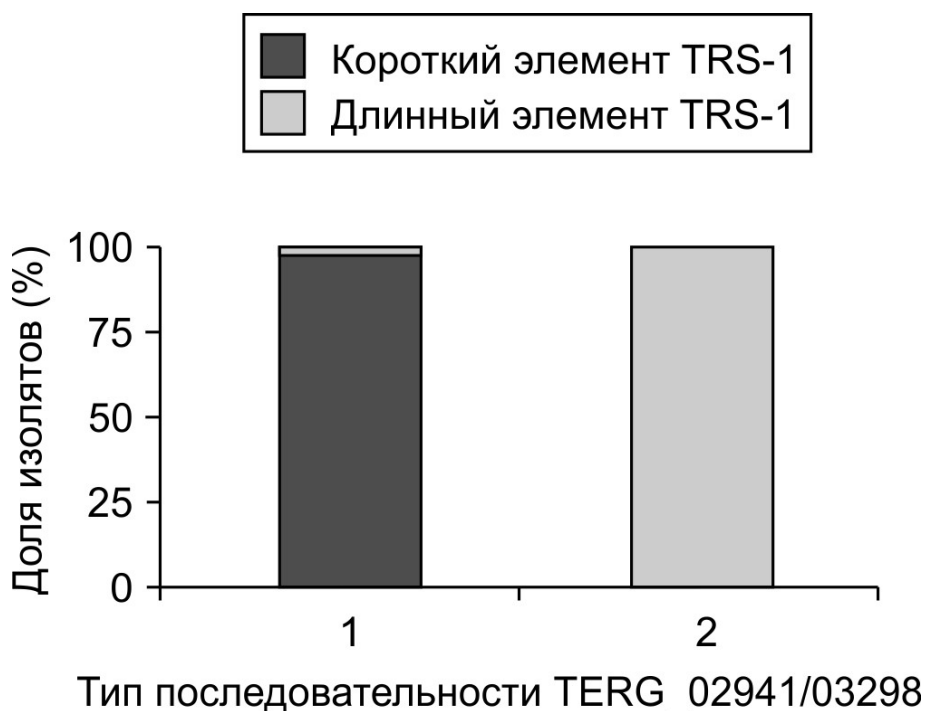


Рисунок 12. *Trichophyton rubrum*. Распределение коротких (≈ 450 п.н.) и длинных элементов TRS-1 в зависимости от генотипа TERG_02941/03298 изолята.

Поскольку мутации в белок-кодирующих локусах в изученной выборке наблюдались синхронно, дальнейшее типирование данным подходом было решено проводить только по локусу TERG_02941.

На втором этапе изучения структуры популяции *T. rubrum* на территории Санкт-Петербурга и Екатеринбурга мы использовали микросателлитный анализ. Была изучена выборка из 59 изолятов, из которых 18 были общими с выборкой первого этапа. Распределение частот парных генетических расстояний, рассчитанных по результатам анализа длин 12 микросателлитных локусов, было двухвершинным (Рисунок 13).

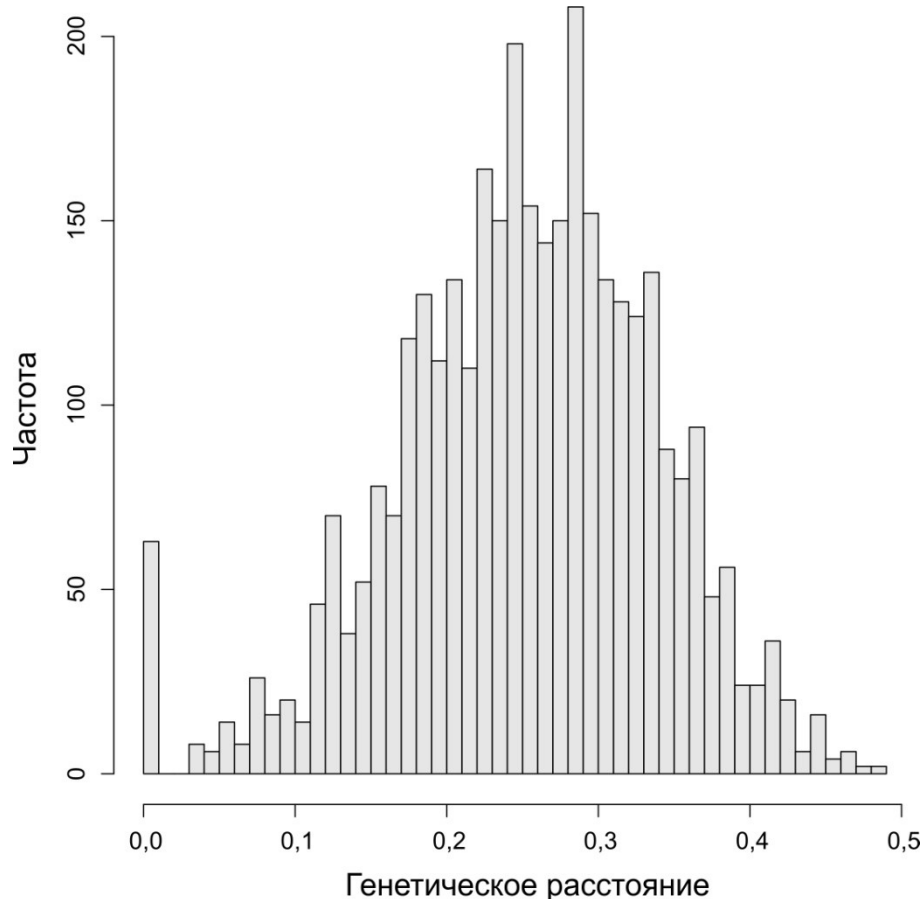


Рисунок 13. *Trichophyton rubrum*, $n = 59$. Распределение генетических расстояний, вычисленных методом Бруво по результатам амплификации 12 микросателлитных локусов.

Результаты анализа длин микросателлитных локусов *T. rubrum* отображены на Рисунке 14А. При наложении на полученную диаграмму рассеяния генотипов локуса TERG_02941 была выявлена двухчастная структура выборки. Одно из облаков точек было сформировано изолятами TERG_02941 793А, другое — 793G (Рисунок 14Б). Обе генетические линии *T. rubrum* были найдены на территории двух городов (Рисунок 14В). На Рисунке 16Г изоляты помечены в соответствии с клиническими данными.

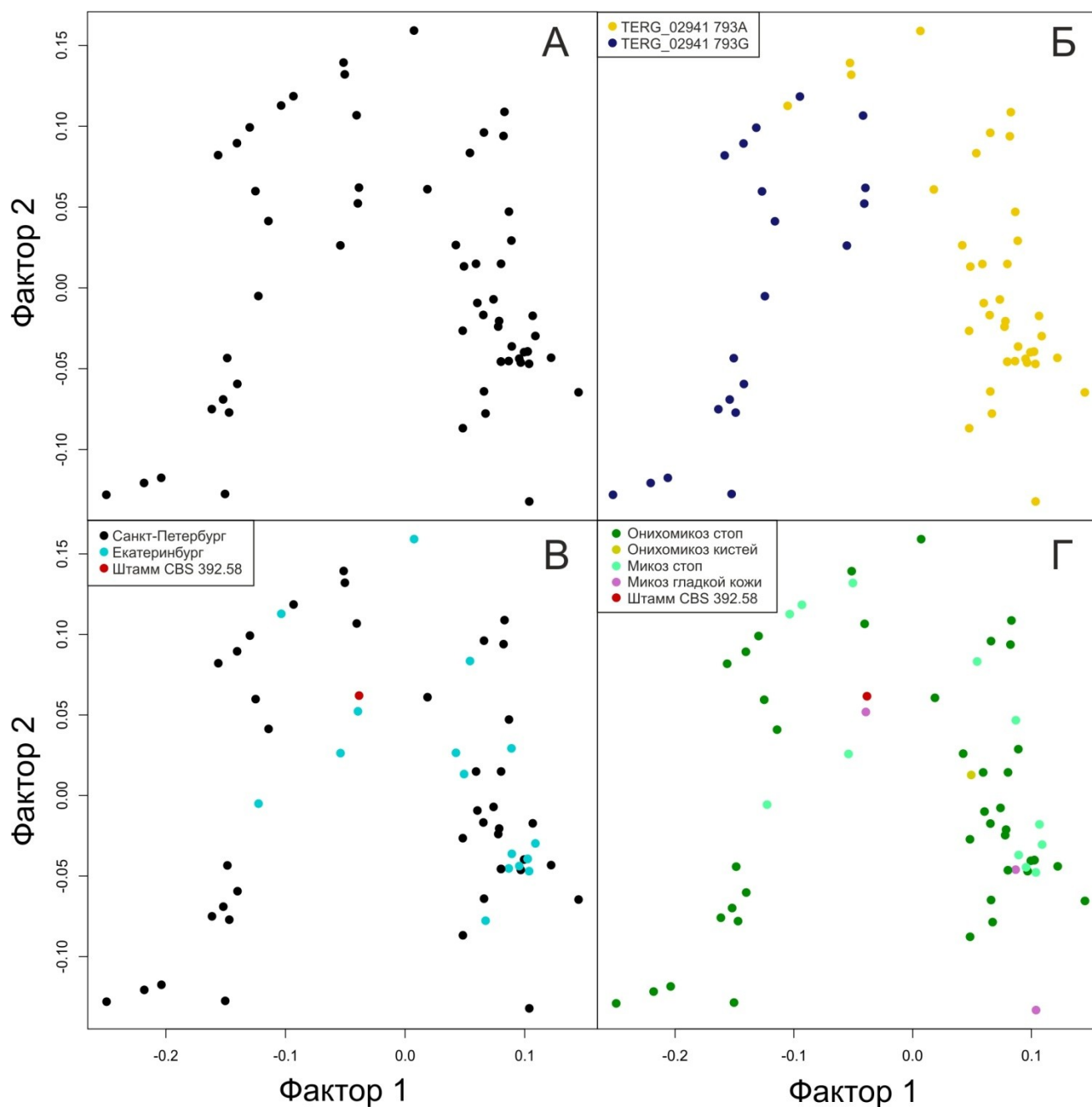


Рисунок 14. *Trichophyton rubrum*, $n = 59$. Диаграмма рассеяния, построенная по результатам анализа полиморфизма длин 12 микросателлитных локусов методом главных компонент. *А*, исходная диаграмма, *Б*, цветовая кодировка по генотипам TERG_02941, *В*, цветовая кодировка по городам выделения изолятов, *Г*, цветовая кодировка по клиническим проявлениям заболевания.

Значение индекса Симпсона, рассчитанного для равных выборок, значительно не различалось для разных генотипов TERG_02941. Этот индекс измеряет вероятность того, что два случайно отобранных из выборки изолята будут

принадлежать к одной и той же генетической линии. Индекс ассоциации, $\bar{r}_d = 0,02483$, был рассчитан в пакете poppr 2.8.1 для R методом Multilocus Style Permutation после удаления одного неинформативного локуса и проведения клональной коррекции. Значение индекса ассоциации лежало за правой границей распределения ожидаемых частот. Вероятность \bar{r}_d была оценена как 0,002, что позволило отклонить нулевую гипотезу об отсутствии связей между маркерами, что указывает на значимое отклонение от равновесия Харди-Вайнберга в популяции гриба и клональный способ размножения ее членов. Расчетное значение p-value для критерия χ^2 составило 0,4956, при значении критерия 3,3851, и четырех степенях свободы, что не позволяет отклонить нулевую гипотезу об отсутствии связи между генотипом TERG_02941 изолята и локализацией поражения на теле пациента при уровне значимости 0,05 [150].

Для того, чтобы проверить возможность дифференцировать изоляты *T. rubrum*, принадлежащие разным генетическим линиям, по макроморфологии изолятов, мы изучили выборку из 41 штамма с известным генотипом TERG_02941. Поскольку верхняя сторона колоний у большинства изолятов демонстрировала белый пушистый рост, мы остановились на изучении окраски реверзума при культивировании на среде Сабуро. У 11 изолятов был выявлен одноцветный реверзум: Д15П38, Д15П49, Д15П51, Д15П58, Д15П71, Д15П121, Д15П122, Д15П134, Y1484, Y1573 Y1766. У восьми изолятов была выявлена фестончатая окраска реверзума: Д15П50, Д15П125, Д15П128, Д15П131, Д15П136, Y1694, Y1696, Y1781. У 22 изолятов было обнаружено кольцевидное расположение пигментированных областей реверзума: Д15П45, Д15П46, Д15П48, Д15П62, Д15П133, Д15П137, Д15П138, Д15П37, Д15П61, Д15П123, Д15П130, Д15П132, Д15П139, Y2, Y948, Y1013, Y1702, Y1718, Y1738, Y1776, Y1864, Y1932. Изоляты обеих генетических линий проявляли схожие фенотипические признаки, что проиллюстрировано Рисунком 15.

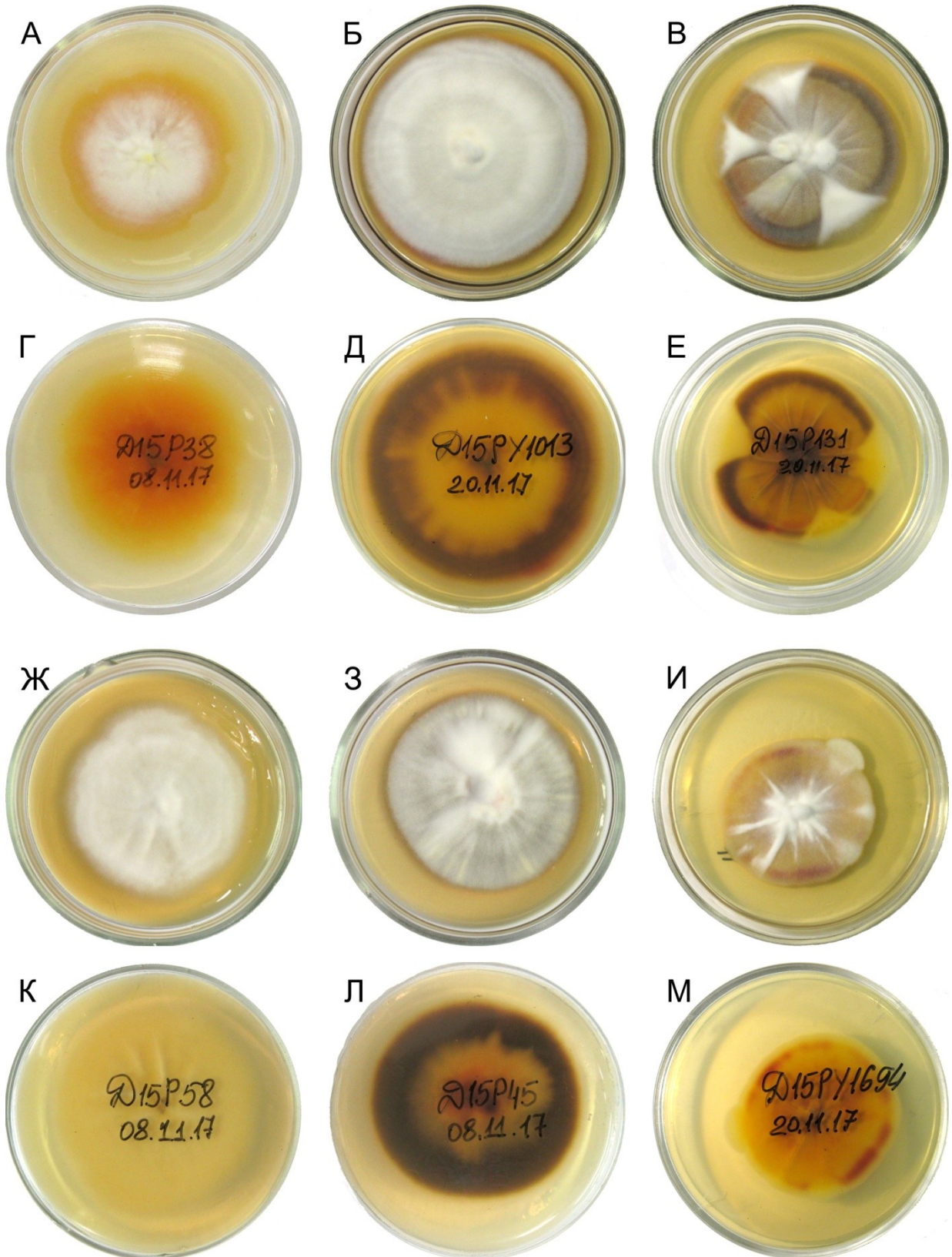


Рисунок 15. Внешний вид колоний *Trichophyton rubrum*. А-Е, изоляты с генотипом TERG_02941 793А. Ж-М, изоляты с генотипом TERG_02941 793Г.

Мы оценили возможность инфицирования пациентов полиморфным мицелием *T. rubrum*, для чего получили серийные изоляты от шести пациентов с онихомикозом и микозом стоп. В каждом случае заболевания методом микросателлитного анализа были выявлены уникальные мультилокусные генотипы гриба. Парные изоляты, полученные от пяти пациентов, имели одинаковые микросателлитные профили. Изолят Д15П100I с ногтей пациента с сочетанным поражением отличался от второго изолята с ногтей Д15П100II и от обоих изолятов с кожи стоп этого пациента по длине локуса Tr002. Для того чтобы выяснить, являются ли изоляты в серии самостоятельными или принадлежат одной и той же клональной линии, необходимо было ответить на два вопроса: 1) принадлежат ли все повторности одного мультилокусного генотипа одному клону и 2) принадлежит ли каждый отдельно взятый мультилокусный генотип отдельному клону. Ответ на первый вопрос был дан через анализ зависимости распределения числа выявляемых в выборке мультилокусных генотипов от числа используемых локусов. Второй вопрос потребовал анализа распределения частот парных генетических расстояний для того, чтобы обнаружить возможные соматические мутации или погрешности метода, которые приводят к приписыванию разным образцам одного и того же клона разных мультилокусных генотипов. Полученное нами распределение числа выявляемых микросателлитных профилей в зависимости от числа используемых локусов указывает на то, что примененная схема типирования была достаточной для того, чтобы считать повторности каждого мультилокусного генотипа принадлежащими одному клону (Рис. 16).

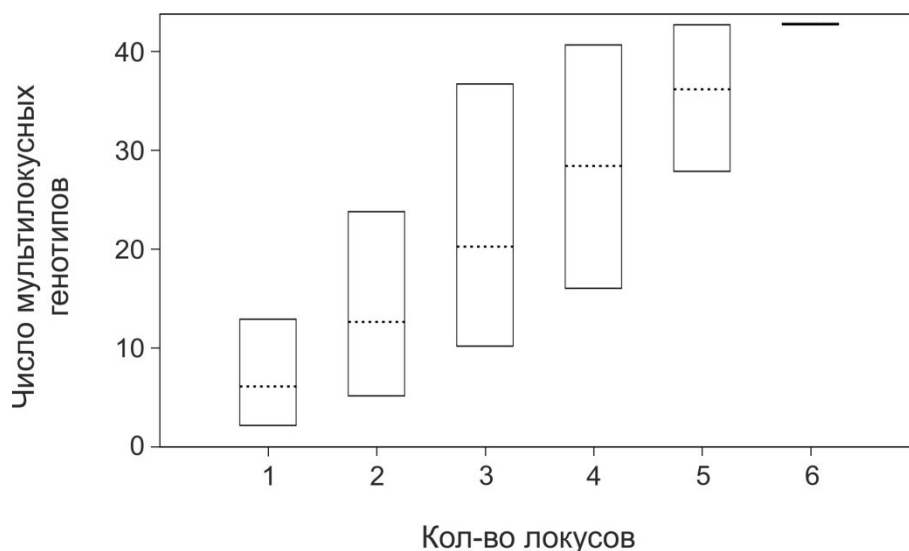


Рисунок 16. Разрешающая способность шести микросателлитных локусов, использованных для типирования выборки изолятов *Trichophyton rubrum*, $n = 50$.

В изученной выборке изолятов *T. rubrum* распределение парных генетических расстояний Бруво было унимодальным, с локальным максимумом представленности минимальных дистанций. Разброс значений был в пределах от 0,000 до 0,620. Генетическое расстояние между изолятами Д15П100I и Д15П100II составляло 0,059 и находилось в крайней левой части распределения. Иными словами, оно имело околонулевое значение (Рисунок 17).

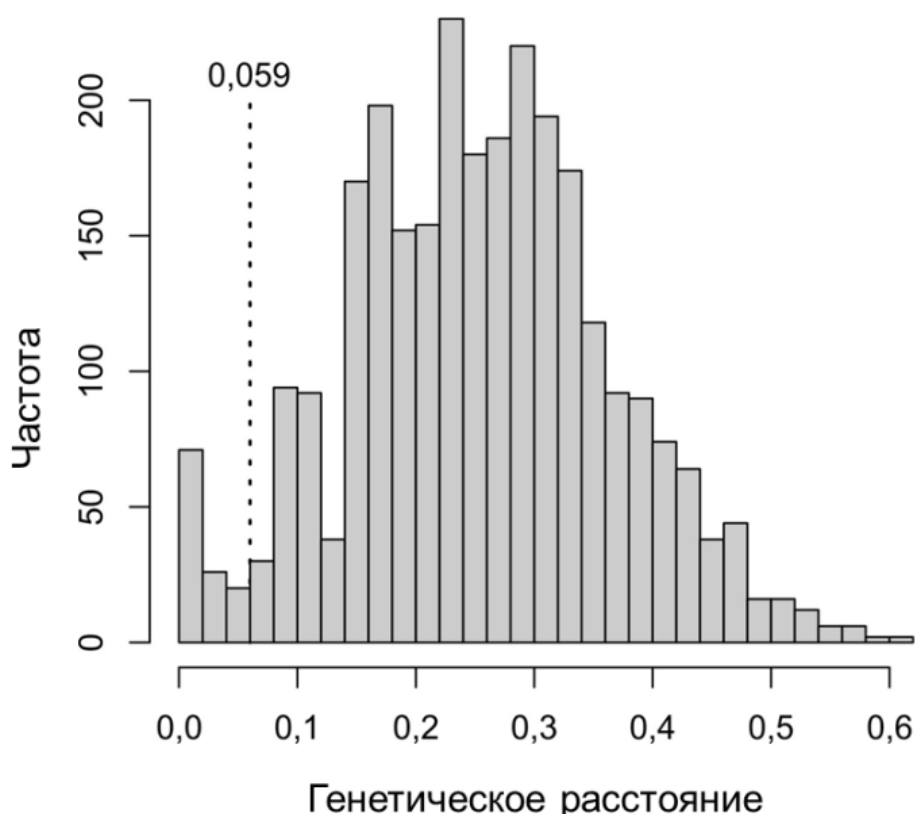


Рисунок 17. *Trichophyton rubrum*. Распределение генетических расстояний, рассчитанных по методу Бруво, на основании результатов амплификации шести микросателлитных локусов. Отмечено генетическое расстояние между изолятами Д15П100I и Д15П100II.

Поскольку известный в литературе набор из восьми микросателлитных локусов для типирования *T. rubrum* не позволил повторить кластеризацию, ранее осуществленную нами на основании полиморфизма белок-кодирующих последовательностей TERG_02941 и TERG_03298 (опубликованных как A7C99_6411 и A7C99_6714) и локуса вторичных повторов рДНК TRS-1, для верификации ранее сделанных выводов о двухчастной структуре популяции *T. rubrum*, мы подобрали и протестировали по две пары праймеров для амплификации белок-кодирующих локусов A7C99_6946 и A7C99_7080. К сожалению, продукты амплификации локуса A7C99_6946 визуализировались как две полосы, а локуса A7C99_7080 — как четыре полосы, что исключало возможность непосредственного секвенирования. Попытки варьирования температуры отжига праймеров, количества циклов амплификации, добавления

ДМСО также были неудачными. В конечном итоге, для смешанной выборки из 10 изолятов TERG_02941 793A и 793G удалось получить последовательности локуса A7C99_6946, но предсказанная на основании полногеномного выравнивания мутация найдена не была. Так как праймеры были нужны для типирования изолятов *T. rubrum*, дальнейшие попытки получения последовательностей этих локусов были оставлены.

Результаты фрагментного анализа экспортируются из фирменной программы производителя секвенатора ABI 3500, GeneMapper 4.1, в виде файла с оригинальным форматом. Для каждого измерения в данном формате предусмотрена отдельная строка, состоящая из трех элементов: названия изолята, названия локуса и длины локуса, разделенных табуляцией. Такой же формат используется для файлов, предназначенных для обработки в пакете polysat для R. Однако очевидно, что такая запись не пригодна для обзора полученных данных. Поэтому мы создали два скрипта: `incrustator.py` (Приложение И), переписывающий файл из формата GeneMapper в сводную таблицу и `tabletogenemapper.py` (Приложение К), переписывающий данные из таблицы обратно в формат GeneMapper.

Скрипт `incrustator.py` принимает на вход файл «Addition.txt» с новыми данными в формате GeneMapper и основную таблицу «Mainfile.txt», состоящую из заголовка с названиями локусов и последующих строк, начинающихся с названия локуса и содержащих значения длин локусов. В обоих рабочих файлах разделение столбцов осуществляется табуляцией. Скрипт `incrustator.py` состоит из трех основных блоков. Первый блок, занимающий строки с 1 по 48, осуществляет проверку формата файла Addition и проверку полноты заголовка Mainfile. Проводится разбиение строк файла Addition на блоки непробельных символов. Первые элементы строк, содержащих менее трех блоков, записываются в отдельное множество, после чего выводятся на экран вместе с сообщением об ошибке. При нахождении трех блоков проверяется наличие между ними символов TAB. Если их количество не равно двум, то также выводится сообщение об

ошибке. Производится сбор множества с названиями локусов из файла Addition и проверка их наличия в заголовке основной таблицы Mainfile. Отсутствующие локусы выводятся на экран с сообщением об ошибке. Второй блок кода занимает 49-99 строки и записывает в новый текстовый файл Appended данные по изолятам, перечисленным в Mainfile. В первую строку файла Appended выписывается содержимое списка, содержащего названия микросателлитных локусов. Далее запускается цикл по всем строкам Mainfile. Строка, предназначенная на выписывание в Appended, собирается в виде списка из названия изолята из Mainfile. Вложенный цикл последовательно добавляет к ней длины локусов из Mainfile и Addition. При нахождении нескольких значений для одного локуса они разделяются дефисом (Приложение Л содержит вспомогательный скрипт pondouble.py для удаления множественных измерений из таблицы длин микросателлитных локусов). В ходе переписывания данных по изолятам из Mainfile собирается множество с названиями изолятов. Третий блок с 100 по 141 строки открывает для чтения файл Addition и файл Appended для дополнения. Если название изолята отсутствует в ранее собранном множестве, то осуществляется процедура сборки списка с длинами локусов, после чего он выписывается в Appended. При работе блоков 2 и 3 каждый акт добавления числа к строке, предназначенной для записи в итоговый файл, подсчитывается. Полученная сумма выводится на экран по завершении выполнения скрипта.

Для расширения возможностей схемы микросателлитного анализа нами был проведен поиск новых локусов. Были построены и просмотрены выравнивания 170 локусов-кандидатов. Для 9 локусов были заказаны и протестированы праймеры, в 4 локусах был обнаружен полиморфизм. Праймеры к непалиморфным локусам протестированы на следующем количестве изолятов: 14-6, 43 шт.; Vas, 56 шт.; A9-11 и A14-5 — 21 шт.; A14-11 — 19 шт. Размах полиморфизма в новых локусах Tr007 и Tr008 был в пределах 1 повторяющейся единицы, Tr009 — 9 ед., Tr010 — 2 ед.

Была проведена оценка эффективности разных методик расчета генетических расстояний. Мы исходили из того, что поскольку ранее выборка изолятов *T. rubrum* была разделена на две части двумя полностью независимыми методами, лучшая методика расчета генетических расстояний по длинам микросателлитных локусов должна давать схожие результаты. Данные по длинам 10 микросателлитных локусов были получены для 50 изолятов *T. rubrum*. Генетические расстояния, за исключением дистанций Бруво, рассчитывали в программе Populations 1.2.32. Дистанции Бруво были получены в пакете polysat 1.7 для программной среды R 3.4.3. Кластеризацию проводили по методу присоединения соседей. Если представить, что истинная кладограмма содержит отдельную ветвь изолятов с генотипом TERG_02941 793G, то лучший показатель для метода расчета генетических расстояний будет характеризоваться наименьшим количеством отделенных от основной группы, рассеянных по остальной кладограмме изолятов. Были получены следующие результаты: дистанции Животовского [187]: 6 группирующихся + 8 рассеянных изолятов TERG_02941 793G. Кавалли-Сфорца и Эдвардса [188]: 6+8. Стандартное генетическое расстояние Нея [189]: 7+7. Бруво с соавторами [73]: 9+5. Таким образом, использование расстояний Бруво для проведения микросателлитного анализа было признано оптимальным. Мы попытались верифицировать отдельную кластеризацию 6-9 изолятов генотипа TERG_02941 793G, то есть обосновать более дробное разделение изученной популяции *T. rubrum* s. str. на генетические линии, для чего амплифицировали локус TRS-1. Соответствия между типом электрофоретического профиля продуктов ПЦР по TRS-1 и положения изолята на микросателлитном древе найти не удалось.

В целом, по результатам наших исследований популяцию *T. rubrum* на территории Санкт-Петербурга и Екатеринбурга можно охарактеризовать как клональную, представленную двумя генетическими линиями, полиморфную по макроморфологии изолятов. При этом фенотипический полиморфизм не связан с генетической структурой популяции.

Полученные нами данные свидетельствуют в пользу присутствия двух генетических линий *T. rubrum* на территории Санкт-Петербурга и Екатеринбурга. Гонг с соавторами на территории Китая так же находят две популяции, однако получают эти данные в программе Structure. Вместе с тем, эта программа применима только для выборок с несцепленными локусами, а гриб *T. rubrum* размножается исключительно клонально. В рамках данного проекта мы получили истинное деление выборки изолятов *T. rubrum* на две части, основываясь на результатах типирования методом ПЦР локуса TRS-1 рДНК и секвенирования по двум впервые предложенным для этой цели белок-кодирующим локусам. Наш собственный опыт показал, что при определенных настройках программа Structure дает ложное разделение выборки изолятов, обработанных по схеме микросателлитного типирования Гонг с соавторами на две части, не совпадающее с результатами типирования по предложенной нами схеме. Аккуратная обработка данных микросателлитного анализа в специализированном ПО показал, что наиболее совершенная на настоящий момент схема типирования, предложенная китайскими авторами так же не предоставляет возможности выявлять внутривидовые генетические линии внутри таксона *T. rubrum*. Таким образом, полученные в рамках настоящего проекта результаты вносят существенный вклад в методические основы молекулярного типирования *T. rubrum*.

Как правило, доля максимально распространенного генотипа при использовании метода типирования по локусам TRS превышает 50%, что требует осторожности при трактовке отрицательных результатов, полученных данным подходом. Кроме того, наш опыт показывает, что локусы TRS-1 и TRS-2 сложно амплифицировать. Определенная доля изолятов не поддается типированию этим методом [141]. Однако важным преимуществом метода является сопоставимость результатов, полученных разными лабораториями. Морфологические признаки не проявляют корреляции с генотипами, полученными методом ПЦР по локусам нетранскрибируемого спейсера рДНК [143].

Изученные нами серийные изоляты *T. rubrum* принадлежали одному и тому же клону, являясь частями одного полиморфного мицелия, поскольку различия между ними были пренебрежимо малы. Явление генетического полиморфизма среди ядер отдельно взятого мицелия известно для целого ряда видов грибов. Так, 2-3 % ядер, изолированных из лабораторного штамма гриба *Neurospora crassa*, имели мутации, связанные с изменением морфологии мицелия [190]. Чен Дж. с соавторами [191] изучали распределение генотипов региона ITS в ядрах штамма гриба *Agaricus subrufescens*. Было найдено три варианта последовательности региона ITS, причем два из них были аллельны, а третий располагался в особом, не связанном локусе. Этот третий вариант присутствовал только в одном из двух конститутивных гаплоидных ядер клеток мицелия. Считается, что наибольший вклад в формирование генетического разнообразия вносит мутационный процесс, но генетически различные ядра могут также быть получены при слиянии гиф и генетическим обмене с другими мицелиями [192]. Генетический полиморфизм микромицетов на внутривидовом уровне связывают с рядом важных с практической точки зрения свойств [193, 194]. В изученных в работе [195] случаях инвазивного аспергиллеза, вызванного *Aspergillus fumigatus*, все изоляты не-респираторного происхождения имели одинаковый генотип, а изоляты из легких проявляли полиморфизм. В оригинальной статье это рассматривается как свидетельство того, что полость легких колонизируется многими изолятами *A. fumigatus* но лишь отдельные изоляты приобретают способность диссеминировать в другие ткани. Некоторые авторы также полагают, что данный феномен может быть связан с тем, что в полости легкого проходит конидиальное спороношение, которое сопровождается возникновением значительного количества мутаций вследствие большого числа митотических делений. В тканях же размножение гриба происходит только за счет пролиферации мицелия, и генетическое разнообразие не генерируется [196]. Последние исследования связывают тип спаривания изолята *A. fumigatus* и летальность вызванного им заболевания [197]. *Candida auris* является еще одним примером клонального вида

аскомицетов. Одна из генетических линий этого гриба проявляет ограниченную контагиозность, встречаясь практически исключительно в ушных раковинах. Напротив, изоляты других линий могут вызывать внутрибольничные вспышки заболевания [198]. Несмотря на то, что корреляции фенотипических свойств гриба *T. rubrum* и его генотипической принадлежности в настоящее время не выявлено, приведенные примеры позволяют полагать, что со временем такие данные появятся.

Обнаруженный нами полиморфизм мицелия относился к колониям, выделенных с ногтей, а не с кожи стоп. Это находится в согласии с результатами других авторов [145, 199], обнаруживших разнообразные изоляты именно в случаях ониомикоза, а не микоза стоп. Поскольку логичнее ожидать большее генетическое разнообразие в источнике инфекции, а не во вторичных очагах заболевания, все эти наблюдения ставят под вопрос высказанное в работе [1] понимание ониомикоза стоп как вторичного явления по сравнению с грибковым поражением кожи.

3.6 Сравнение разрешающей способности методов типирования штаммов *Trichophyton rubrum*

Было проведено сравнение эффективности двух молекулярно-генетических методов типирования штаммов *T. rubrum*: микросателлитного анализа по шести микросателлитным локусам и амплификации локусов вторичных повторов нетранскрибируемого спейсера рДНК. Для выборки из 50 штаммов было получено 43 индивидуальных микросателлитных профиля, что дало значение индекса клонального разнообразия 0,86. Для такой же выборки из 50 изолятов *T. rubrum* методом типирования по локусам нетранскрибируемого спейсера рДНК были получены 10 мультилокусных генотипов и гораздо более низкое значение $R = 0,18$, что отражает большую разрешающую способность метода микросателлитного анализа по сравнению с типированием по локусам нетранскрибируемого спейсера рДНК [200].

4 ВЫВОДЫ

1. Род *Trichophyton* представлен тремя основными ветвями филогенетического древа: *T. mentagrophytes* / *T. simii*, *T. benhamiae*, *T. rubrum*.

2. Комплекс *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* включает в себя 10 генотипов: "FM986750", "KT285210" и "MF926358" распространены на территории Европы, генотипы "KT192500", "KU315316" и "KU496915" — в Азии и Океании. Генотипы "JX122216", "FM986691", "AF170453" и "KP132819" распространены глобально.

3. *Trichophyton mentagrophytes* и *T. interdigitale* принадлежат к одному и тому же филогенетическому виду на основании результатов анализа полногеномных последовательностей, последовательностей региона ITS, LSU, *BT2*.

4. Популяция гриба *T. rubrum* на территории Санкт-Петербурга и Екатеринбурга представлена двумя генетическими линиями, выявленными типированием штаммов гриба тремя независимыми молекулярно-генетическими методами: секвенированием ДНК по локусам TERG_02941 и TERG_03298, ПЦР по локусу TRS-1 и микросателлитным анализом.

5. Микросателлитный анализ *T. rubrum* имеет более высокую разрешающую способность по сравнению с типированием по длинам локусов вторичных повторов нетранскрибируемого спейсера рДНК.

5 ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Ввиду обнаружения на территории РФ гриба *T. benhamiae*, не отличимого по морфологическим признакам от *T. mentagrophytes*, изучение этиологии дерматомикозов необходимо осуществлять молекулярно-генетическими методами.

2. Для типирования грибов вида *T. rubrum* предпочтительнее использовать метод микросателлитного анализа по сравнению с ПЦР по локусам TRS-1 и TRS-2 нетранскрибируемого спейсера рДНК.

3. При проведении рутинной идентификации дерматофитов методом секвенирования ДНК генотип "КР132819", занимающий промежуточное положение между видами *T. mentagrophytes* и *T. interdigitale*, следует относить к виду *T. mentagrophytes*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дерматофиты рода *Trichophyton* являются основными возбудителями онихомикоза в РФ и других странах мира. Вместе с тем, информация о генотипах дерматофитов, встречающихся на территории РФ, практически отсутствовала. В ходе настоящего исследования мы провели реконструкцию филогенетических отношений между видами рода, для чего впервые использовали отечественные штаммы. Мы получили кладограмму, отражающую филогенетические отношения в роде. Она состояла из трех основных ветвей: *T. mentagrophytes* / *T. simii*, *T. benhamiae* и *T. rubrum*. Мы получили четыре полные последовательности геномов *T. mentagrophytes*. Их анализ вместе с геномами *T. mentagrophytes* и *T. interdigitale* из Генбанка и значительным объемом нуклеотидных последовательностей из Генбанка позволил уточнить видовые границы в комплексе видов *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale*. Полученные результаты могут быть использованы при проведении рутинной диагностики дерматомикозов с применением секвенирования ДНК по Сенгеру.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

дНТФ — дезоксинуклеотидтрифосфат

ДМСО — диметилсульфоксид

ДСН — додецилсульфат натрия

МЛСТ — мультилокусное секвенирование-типирование

ОЕФ — относительные единицы флуоресценции

ПДРФ — полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

ПЦР — полимеразная цепная реакция

ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота

ABGD — автоматическое определение баркодowego зазора

BT2 — фрагмент гена, кодирующего β -тубулин

GTR — генерализованная симметричная модель нуклеотидных замен

ITS — внутренний транскрибируемый спейсер рДНК

JC69 — модель нуклеотидных замен Джукса-Кантора

K2P — двухпараметрическая модель нуклеотидных замен Кимуры

LSU — ген, кодирующий 28S РНК большой субъединицы рибосом

ML — метод максимального правдоподобия

NJ — метод присоединения соседей

РТР — пуассоновские процессы ветвлений

UPGMA — метод невзвешенного попарного среднего

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ameen M., Lear J. T., Madan V., Mohd Mustapa M. F., Richardson M. British Association of Dermatologists' guidelines for the management of onychomycosis 2014 // Br. J. Dermatol. 2014. Vol. 171. P. 937—958.
2. Сергеев А. Ю. Современная эпидемиология и этиология онихомикозов, концепция патогенеза и новые подходы к диагностике, лечению и профилактике: дис. ... докт. мед. наук. М., 2002. 281 с.
3. Васильева Н. В. Разнатовский К. И., Котрехова Л. П., и др. Этиология онихомикоза стоп в г. Санкт-Петербурге и г. Москве. Результаты проспективного открытого многоцентрового исследования // Пробл. мед. микол. 2009. Т. 11, № 2. С. 14—18.
4. Кожичкина Н. В. Этиология микозов стоп и онихомикоза // Вестн. дерматол. венерол. 2013. № 1. С. 9—13.
5. Sigurgeirsson B., Baran R. The prevalence of onychomycosis in the global population: a literature study // J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 2014. Vol. 28. P. 1480—1491.
6. Hainsworth S., Hubka V., Lawrie A. C., Carter D., Vanniasinkam T., Grando D. Predominance of *Trichophyton interdigitale* revealed in podiatric nail dust collections in Eastern Australia // Mycopathologia. 2020. Vol. 185, No. 1. P. 175—185.
7. Mulvaney P. M., Telang G. H., Jellinek N. *Trichophyton rubrum* endonyx onychomycosis resistant to standard oral and topical therapies // Dermatol Online J. 2015. Vol. 21, No. 9. pii: 13030/qt3jb3t80q.
8. Singh A., Masih A., Khurana A., et al. High terbinafine resistance in *Trichophyton interdigitale* isolates in Delhi, India harbouring mutations in the squalene epoxidase gene // Mycoses. 2018. Vol. 61, No. 7. P. 477—484.

9. Index Fungorum [Электронный ресурс]. URL: www.indexfungorum.org (дата обращения: 23.04.2019).
10. de Hoog G. S., Dukik K., Monod M., et al. Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes // *Mycopathologia*. 2017. Vol. 182, No 1-2. P. 5—31.
11. Packeu A., Stubbe D., Roesems S., et al. Lineages within the *Trichophyton rubrum* complex // *Mycopathologia*. 2020. Vol. 185, No. 1. P. 123—136.
12. Čmoková A., Rezaei-Matehkolaei A., Kuklová I., et al. Discovery of new *Trichophyton* members, *T. persicum* and *T. spiraliforme* spp. nov., as a cause of highly inflammatory tinea cases in Iran and Czechia // *Microbiol. Spectr.* 2021. Vol. 9, No. 2. e0028421.
13. Пупкова М. А. Диагностическое значение различных микромицетов, выделенных из ногтевых пластин: дис. ... канд. мед. наук. СПб., 2010. 107 с.
14. Кубасова Н. Л. Особенности диагностики и лечения онихомикоза, обусловленного недерматофитами: дис. ... канд. мед. наук. СПб., 2015. 121 с.
15. Hagen F., Lumbsch H. T., Arsic Arsenijevic V., et al. Importance of resolving fungal nomenclature: the case of multiple pathogenic species in the *Cryptococcus* genus // *mSphere*. 2017. Vol. 2, No. 4. pii: e00238-17.
16. Ohst T., de Hoog S., Presber W., Stavrakieva V., Gräser Y. Origins of microsatellite diversity in the *Trichophyton rubrum*-*T. violaceum* clade (Dermatophytes) // *J. Clin. Microbiol.* 2004. Vol. 42. P. 4444—4448.
17. Gräser Y., Fröhlich J., Presber W., de Hoog S. Microsatellite markers reveal geographic population differentiation in *Trichophyton rubrum* // *J. Med. Microbiol.* 2007. Vol. 56. P. 1058—1065.

18. Gong J., Wu W., Ran M., et al. Population differentiation and genetic diversity of *Trichophyton rubrum* as revealed by highly discriminatory microsatellites // Fungal Genet. Biol. 2016. Vol. 95. P. 24—29.
19. Persinoti G. F., Martinez D. A., Li W., et al. Whole genome analysis illustrates global clonal population structure of the ubiquitous dermatophyte pathogen *Trichophyton rubrum* // Genetics. 2018. Vol. 208. P. 1657—1669.
20. Heidemann S., Monod M., Gräser Y. Signature polymorphisms in the internal transcribed spacer region relevant for the differentiation of zoophilic and anthropophilic strains of *Trichophyton interdigitale* and other species of *T. mentagrophytes* sensu lato // Br. J. Dermatol. 2010. Vol. 162. P. 282—295.
21. Takashio M. Une nouvelle forme sexuee du complexe *Trichophyton mentagrophytes*, *Arthroderma vanbreuseghemii* sp. nov. // Annales de Parasitologie. 1973. Vol. 48. P. 713—732.
22. Li W., Metin B., White T. C., Heitman J. Organization and evolutionary trajectory of the mating type (*MAT*) locus in dermatophyte and dimorphic fungal pathogens // Eukaryot. Cell. 2010. Vol. 9. P. 46—58.
23. Stockdale P. M. Sexual stimulation between *Arthroderma simii* Stockd., Mackenzie and Austwick and related species // Sabouraudia. 1968. Vol. 6. P. 176—181.
24. Gräser Y., Scott J., Summerbell R. The new species concept in dermatophytes—a polyphasic approach // Mycopathologia. 2008. Vol. 166, No. 5-6. P. 239—256.
25. Summerbell R. C. Form and function in the evolution of dermatophytes / R. K. S. Kushwaha and J. Guarro (ed.), Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi. Revista Iberoamericana de Micologia. Bilbao, Spain, 2000. P. 30—43.
26. Metin B., Heitman J. Sexual reproduction in dermatophytes // Mycopathologia. 2017. Vol. 182. P. 45—55.

27. Kosanke S., Hamann L., Kupsch C., Moreno Garcia S., Chopra A., Gräser Y. Unequal distribution of the mating type (*MAT*) locus idiomorphs in dermatophyte species // *Fungal Genet Biol.* 2018. Vol. 118. P. 45—53.
28. Martinez D. A., Oliver B. G., Gräser Y., et al. Comparative genome analysis of *Trichophyton rubrum* and related dermatophytes reveals candidate genes involved in infection // *mBio.* 2012. Vol. 3, No. 5. e00259–12.
29. Cervelatti E. P., Ferreira-Nozama M. S., Aquino-Ferreira R., Fachin A. L., Martinez-Rossi N. M. Electrophoretic molecular karyotype of the dermatophyte, *Trichophyton rubrum* // *Genetics and Molecular Biology.* 2004. Vol. 27. P. 99—102.
30. Malmsten P. H. *Trichophyton tonsurans*, der haarscheerende Schimmel: Ein Beitrag zur Auseinandersetzung der Krankheiten, welche das Abfallen der Haare bewirken // *Arch. Anat. Physiol. Wiss. Med.* 1848. S. 1—19.
31. Su H., Packeu A., Ahmed S. A., et al. Species distinction in the *Trichophyton rubrum* complex // *J. Clin. Microbiol.* 2019. Vol. 57, No. 9. e00352-19.
32. Čmoková A., Kolařík M., Dobiáš R., et al. Resolving the taxonomy of emerging zoonotic pathogens in the *Trichophyton benhamiae* complex // *Fungal Diversity.* 2020. Vol. 104, No. 1. P. 333—387.
33. Kandemir H., Dukik K., Hagen F., Ilkit M., Gräser Y., de Hoog G. S. Polyphasic discrimination of *Trichophyton tonsurans* and *T. equinum* from humans and horses // *Mycopathologia.* 2020. Vol. 185, No. 1. P. 113—122.
34. Кашкин П. Н. Дерматомикозы. Л. : Медгиз, 1950. 226 с.
35. Sabouraud R. *Maladies du Cuir Chevelu. III. Les Cryptogamiques. Les Teignes.* Paris, France : Atlas, Masson, 1910. 855 p.
36. Kane J., Summerbell R., Sigler L., Kraiden S., Land G. *Laboratory Handbook of Dermatophytes.* Belmont, USA : Star Publishing, 1997. 344 p.

37. Langeron M., Vanbreuseghem E. Précis de Mycologie, 2e édition. Paris : Masson et Cie, 1952. 703 p.
38. Georg L. K. The nutritional requirements of the faviform *Trichophyton* // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1950. Vol. 50. P. 1315—1347.
39. Shadomy H. J., Philpot C. M. Utilization of standard laboratory methods in the laboratory diagnosis of problem dermatophytes // Am. J. Clin. Pathol. 1980. Vol. 74. P. 197—201.
40. Dawson C. O., Gentles J. C. The perfect states of *Keratinomyces ajelloi* Vanbreuseghem, *Trichophyton terrestre* Durie and Frey and *Microsporum nanum* Fuentes // Sabouraudia. 1961. Vol. 1. P. 49—57.
41. Currah R. S. Taxonomy of the Onygenales. Arthrodermataceae, Myxotrichaceae and Onygenaceae // Mycotaxon. 1985. Vol. 24. P. 1—216.
42. Weitzman I., McGinnis M. R., Padhye A. A., Ajello L. The genus *Arthroderma* and its synonym *Nannizzia* // Mycotaxon. 1986. Vol. 25. P. 505—518.
43. Kawasaki M. Verification of a taxonomy of dermatophytes based on mating results and phylogenetic analyses // Med. Mycol. J. 2011. Vol. 52. P. 291—295.
44. Cafarchia C., Weigl S., Figueredo L. A., Otranto D. Molecular identification and phylogenesis of dermatophytes isolated from rabbit farms and rabbit farm workers // Vet. Microbiol. 2012. Vol. 154, No. 3-4. P. 395—402.
45. Ларионов М. Д., Чилина Г. А., Богданова Т. В., Пчелин И. М. Редкий клинический случай дерматомикоза гладкой кожи и крупных складок, вызванного грибом *Trichophyton mentagrophytes* экзотического генотипа // Проблемы медицинской микологии. 2017. Т. 19, № 2. С. 95.
46. Chowdhary A., Singh A., Singh P. K., Khurana A., Meis J. F. Perspectives on misidentification of *Trichophyton interdigitale*/*Trichophyton mentagrophytes* using

internal transcribed spacer region sequencing: Urgent need to update the sequence database // *Mycoses*. 2019. Vol. 62, No. 1. P. 11—15.

47. Woodgyer A. The curious adventures of *Trichophyton equinum* in the realm of molecular biology: a modern fairy tale // *Med. Mycol.* 2004. Vol. 42, No. 5. P. 397—403.

48. Kawasaki M., Aoki M., Ishizaki H., Nishio K., Mochizuki T., Watanabe S. Phylogenetic relationships of the genera *Arthroderma* and *Nannizzia* inferred from mitochondrial DNA analysis // *Mycopathologia*. 1992. Vol. 118, No. 2. P. 95—102.

49. Mochizuki T., Takada K., Watanabe S., Kawasaki M., Ishizaki H. Taxonomy of *Trichophyton interdigitale* (*Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*) by restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA // *J. Med. Vet. Mycol.* 1990. Vol. 28. P. 191—196.

50. Gräser Y., El Fari M., Vilgalys R., et al. Phylogeny and taxonomy of the family Arthrodermataceae (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region // *Med. Mycol.* 1999. Vol. 37, No. 2. P. 105—114.

51. Kawasaki M., Anzawa K., Ushigami T., Kawanishi J., Mochizuki T. Multiple gene analyses are necessary to understand accurate phylogenetic relationships among *Trichophyton* species // *Med. Mycol. J.* 2011. Vol. 52, No. 3. P. 245—254.

52. Mirhendi H., Makimura K., de Hoog G. S., et al. Translation elongation factor 1- α gene as a potential taxonomic and identification marker in dermatophytes // *Med. Mycol.* 2015. Vol. 53. P. 215—224.

53. Pchelin I. M., Zlatogursky V. V., Rudneva M. V., et al. Reconstruction of phylogenetic relationships in dermatomycete genus *Trichophyton* Malmsten 1848 based on ribosomal internal transcribed spacer region, partial 28S rRNA and beta-tubulin genes sequences // *Mycoses*. 2016. Vol. 59, No. 9. P. 566—575.

54. Rezaei-Matehkolaei A., Mirhendi H., Makimura K., et al. Nucleotide sequence analysis of beta tubulin gene in a wide range of dermatophytes // *Med. Mycol.* 2014. Vol. 52. P. 674—688.
55. Ahmadi B., Mirhendi H., Makimura K., et al. Phylogenetic analysis of dermatophyte species using DNA sequence polymorphism in calmodulin gene // *Med. Mycol.* 2016. Vol. 54. P. 500—514.
56. Beguin H., Pyck N., Hendrickx M., Planard C., Stubbe D., Detandt M. The taxonomic status of *Trichophyton quinckeanum* and *T. interdigitale* revisited: a multigene phylogenetic approach // *Med. Mycol.* 2012. Vol. 50. P. 871—882.
57. Павлинов И. Я., Любарский Г. Ю. Биологическая систематика: эволюция идей. М. : Товарищество научных изданий КМК, 2011. 667 с.
58. Картавцев Ю. Ф. Генетическая дивергенция видов и других таксонов. Географическое видообразование и генетическая парадигма неodarвинизма в действии // *Усп. соврем. биологии.* 2013. Т. 133, № 5. С. 419—451.
59. Koumandou V. L., Wickstead B., Ginger M. L., van der Giezen M., Dacks J. B., Field M. C. Molecular paleontology and complexity in the last eukaryotic common ancestor // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2013. Vol. 48, No. 4. P. 373—396.
60. Weiss M. C., Sousa F. L., Mrnjavac N., et al. The physiology and habitat of the last universal common ancestor // *Nat. Microbiol.* 2016. Vol. 1, No. 9. P. 16116.
61. Абилев С. К., Глазер В. М., Асланян М. М. Основы мутагенеза и генотоксикологии. Лекции: учебное пособие. М.; СПб. : Нестор-История, 2012. 148 с.
62. Abdel-Rahman S. M., Sugita T., González G. M., et al. Divergence among an international population of *Trichophyton tonsurans* isolates // *Mycopathologia.* 2010. Vol. 169, No. 1. P. 1—13.

63. Pozdnyakov I. R., Sokolova A. M., Ereskovsky A. V., Karpov S. A. Kinetid structure of choanoflagellates and choanocytes of sponges does not support their close relationship // *Protistology*. 2017. Vol. 11, No. 4. P. 248—264.

64. Hubka V., Peano A., Cmokova A., Guillot J. Common and emerging dermatophytoses in animals: well-known and new threats. In: Seyedmousavi S, de Hoog G, Guillot J, Verweij P, eds. *Emerging and epizootic fungal infections in animals*. Cham: Springer; 2018. P. 31—79.

65. Tang C., Kong X., Ahmed S. A., et al. Taxonomy of the *Trichophyton mentagrophytes*/*T. interdigitale* species complex harboring the highly virulent, multiresistant genotype *T. indotineae* // *Mycopathologia*. 2021. Vol. 186, No. 3. P. 315—326.

66. Tran V. D. T., De Coi N., Feuermann M., et al. RNA sequencing-based genome reannotation of the dermatophyte *Arthroderma benhamiae* and characterization of its secretome and whole gene expression profile during infection // *mSystems*. 2016. Vol. 1, No. 4. e00036-16.

67. Li Y. C., Korol A. B., Fahima T., Beiles A., Nevo E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review // *Mol. Ecol*. 2002. Vol. 11, No. 12. P. 2453—2465.

68. Lynch M., Sung W., Morris K., et al. A genome-wide view of the spectrum of spontaneous mutations in yeast // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008. Vol. 105. P. 9272—9277.

69. Lynch M. Evolution of the mutation rate // *Trends Genet*. 2010. Vol. 26, No. 8. P. 345—352.

70. Zhu Y.O., Siegal M. L., Hall D. W., Petrov D. A. Precise estimates of mutation rate and spectrum in yeast // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014. Vol. 111, No. 22. P. E2310—E2318.

71. Misof B., Rickert A. M., Buckley T. R., Fleck G., Sauer K. P. Phylogenetic signal and its decay in mitochondrial SSU and LSU rRNA gene fragments of Anisoptera // *Mol. Biol. Evol.* 2001. Vol. 18. P. 27—37.
72. Rozenfeld A. F., Arnaud-Haond S., Hernández-García E., et al. Spectrum of genetic diversity and networks of clonal organisms // *J. R. Soc. Interface.* 2007. Vol. 4, No. 17. P. 1093—1102.
73. Bruvo R., Michiels N. K., D'Souza T. G., Schulenburg H. A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level // *Mol. Ecol.* 2004. Vol. 13, No. 7. P. 2101—2106.
74. Jukes T. H., Cantor C. R. Evolution of protein molecules // *Mammalian Protein Metabolism* / H.N. Munro, ed. New York : Academic Press, 1969. P. 21—123.
75. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // *J. Mol. Evol.* 1980. Vol. 16, No. 2. P. 111—120.
76. Tavaré S. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences // *Lectures on Mathematics in the Life Sciences.* 1986. Vol. 17. P. 57—86.
77. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // *Evolution.* 1985. Vol. 39. P. 783—791.
78. Wägele J. W., Letsch H., Klussmann-Kolb A., Mayer C., Misof B., Wägele H. Phylogenetic support values are not necessarily informative: the case of the Serialia hypothesis (a mollusk phylogeny) // *Frontiers in Zoology.* 2009. Vol. 6. 12.
79. Wägele J. W., Mayer C. Visualizing differences in phylogenetic information content of alignments and distinction of three classes of long-branch effects // *BMC Evol. Biol.* 2007. Vol. 7. 147.

80. Yu X., Reva O. N. SWPhylo – a novel tool for phylogenomic inferences by comparison of oligonucleotide patterns and integration of genome-based and gene-based phylogenetic trees // *Evol. Bioinform. Online*. 2018. Vol. 14. 1176934318759299.
81. Kohn L. M. Mechanisms of fungal speciation // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2005. Vol. 43. P. 279—308.
82. Giraud T., Refrégier G., Le Gac M., de Vienne D. M., Hood M. E. Speciation in fungi // *Fungal Genetics and Biology*. 2008. Vol. 45. P. 791—802.
83. Restrepo S., Tabima J. F., Mideros M. F., Grünwald N. J., Matute D. R. Speciation in fungal and oomycete plant pathogens // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2014. Vol. 52. P. 289—316.
84. Mirarab S., Reaz R., Bayzid M. S., Zimmermann T., Swenson M. S., Warnow T. ASTRAL: Genome-scale coalescent-based species tree estimation // *Bioinformatics*. 2014. Vol. 30. P. i541—i548.
85. Rannala B. The art and science of species delimitation // *Curr. Zool.* 2015. Vol. 61. P. 846—853.
86. Puillandre N., Lambert A., Brouillet S., Achaz G. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation // *Mol. Ecol.* 2012. Vol. 21, No. 8. P. 1864—1877.
87. Zhang J., Kapli P., Pavlidis P., Stamatakis A. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements // *Bioinformatics*. 2013. Vol. 29, No. 22. P. 2869—2876.
88. de Valk H. Exact molecular typing of *Aspergillus fumigatus*. Methods and applications. Wageningen, the Netherlands : Ponsen & Looijen, 2008. 205 p.
89. Brown A. H. D., Feldman M. W., Nevo E. Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum* // *Genetics*. 1980. Vol. 96. P. 523—536.

90. Сергеев А. Ю., Сергеев Ю. В. Грибковые инфекции. Руководство для врачей. 2 изд. М. : Издательство БИНОМ, 2008. 480 с.
91. Диагностика и лечение микозов в отделениях реанимации и интенсивной терапии: Российские рекомендации / Отв. ред. Н.Н. Клишко. 2-е изд. доп. и перераб. М. : Фармтек, 2015. 96 с.
92. Ford C. B., Funt J. M., Abbey D., et al. The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans* // *Elife*. 2015. Vol. 4. e00662.
93. Sharma C., Nelson-Sathi S., Singh A., Radhakrishna Pillai M., Chowdhary A. Genomic perspective of triazole resistance in clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates without *cyp51A* mutations // *Fungal Genetics and Biology*. 2019. Vol. 132. 103265.
94. Mahmoudi S, Badali H, Rezaie S, et al. A simple and low cost tetra-primer ARMS-PCR method for detection triazole-resistant *Aspergillus fumigatus*. *Molecular Biology Reports*. 2019. Vol. 46, No. 4. P. 4537—4543.
95. Verma S. B., Panda S., Nenoff P., et al. The unprecedented epidemic-like scenario of dermatophytosis in India: I. Epidemiology, risk factors and clinical features // *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol*. 2021. Vol. 87, No. 2. P. 154—175.
96. Taghipour S., Pchelin I. M., Zarei Mahmoudabadi A., et al. *Trichophyton mentagrophytes* and *T. interdigitale* genotypes are associated with particular geographic areas and clinical manifestations // *Mycoses*. 2019. Vol. 62, No. 11. P. 1084—1091.
97. Kwon-Chung K. J., Bennett E. J. *Dermatophytosis: medical mycology*. Philadelphia : Lea & Febiger, 1992. P. 136—161.
98. Pchelin I. M., Azarov D. V., Churina M. A., et al. Species boundaries in the *Trichophyton mentagrophytes* / *T. interdigitale* species complex // *Med. Mycol*. 2019. Vol. 57, No. 6. P. 781—789.

99. Nenoff P., Verma S. B., Ebert A., et al. Spread of terbinafine-resistant *Trichophyton mentagrophytes* Type VIII (India) in Germany-"The tip of the iceberg?" // *J. Fungi (Basel)*. 2020. Vol. 6, No. 4. 207.
100. Symoens F., Jousson O., Planard C., et al. Molecular analysis and mating behaviour of the *Trichophyton mentagrophytes* species complex // *Int. J. Med. Microbiol.* 2011. Vol. 301, No. 3. P. 260—266.
101. Taylor J. W. Evolutionary perspectives on human fungal pathogens // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2015. Vol. 5, No. 9. a019588.
102. Tibayrenc M., Ayala F. J. Reproductive clonality of pathogens: a perspective on pathogenic viruses, bacteria, fungi, and parasitic protozoa // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012. Vol. 109, No. 48. E3305-13.
103. Smith J. M., Smith N. H., O'Rourke M., Spratt B. G. How clonal are bacteria? // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993. Vol. 90, No. 10. P. 4384—4388.
104. Tibayrenc M., Ayala F. J. Models in parasite and pathogen evolution: Genomic analysis reveals predominant clonality and progressive evolution at all evolutionary scales in parasitic protozoa, yeasts and bacteria // *Adv. Parasitol.* 2021. Vol. 111. P. 75—117.
105. Moosavi A, Ghazvini RD, Ahmadikia K, et al. The frequency of fungi isolated from the skin and hair of asymptomatic cats in rural area of Meshkin-shahr-Iran // *J. Mycol. Med.* 2019. Vol. 29, No. 1. P. 14—18.
106. Pérez-Laguna V., Rezusta A., Ramos J. J., et al. Daylight photodynamic therapy using methylene blue to treat sheep with dermatophytosis caused by *Arthroderma vanbreuseghemii* // *Small Ruminant Research*. 2017. Vol. 150. P. 97—101.

107. Tartor Y. H., El Damaty H. M., Mahmmod Y. S. Diagnostic performance of molecular and conventional methods for identification of dermatophyte species from clinically infected Arabian horses in Egypt // *Veterinary dermatology*. 2016. Vol. 27, No. 5. P. 401-e102.
108. Diongue K., Brécharde L., Diallo M. A., et al. A comparative study on phenotypic versus ITS-based molecular identification of dermatophytes isolated in Dakar, Senegal // *Int. J. Microbiol.* 2019. Vol. 2019. P. 1—6.
109. Frías-De-León M. G., Martínez-Herrera E., Atoche-Diéguez C. E., et al. Molecular identification of isolates of the *Trichophyton mentagrophytes* complex // *Int. J. Med. Sci.* 2020. Vol. 17, No. 1. P. 45—52.
110. Summerbell R. C., Moore M. K., Starink-Willemse M., Van Iperen A. ITS barcodes for *Trichophyton tonsurans* and *T. equinum* // *Med. Mycol.* 2007. Vol. 45, No. 3. P. 193—200.
111. Singh A., Masih A., Monroy-Nieto J., et al. A unique multidrug-resistant clonal *Trichophyton* population distinct from *Trichophyton mentagrophytes/Trichophyton interdigitale* complex causing an ongoing alarming dermatophytosis outbreak in India: Genomic insights and resistance profile // *Fungal Genet. Biol.* 2019. Vol. 133. 103266.
112. Gräser Y., Kuijpers A. F., Presber W., de Hoog G. S. Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* complex // *J. Clin. Microbiol.* 2000. Vol. 38. P. 3329—3336.
113. Castellani A. Observation on a new species of *Epidermophyton* found in tinea cruris // *Br. J. Dermatol.* 1910. Vol. 5. P. 148—150.
114. Zhan P., Dukik K., Li D., et al. Phylogeny of dermatophytes with genomic character evaluation of clinically distinct *Trichophyton rubrum* and *T. violaceum* // *Studies in Mycology*. 2018. Vol. 89. P. 153—175.

115. Makimura K., Tamura Y., Mochizuki T., et al. Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions // J. Clin. Microbiol. 1999. Vol. 37, No. 4. No. 920—924.

116. Hryniewicz-Gwóźdź A., Jagielski T., Dobrowolska A., Szepietowski J. C., Baran E. Identification and differentiation of *Trichophyton rubrum* clinical isolates using PCR-RFLP and RAPD methods // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2011. Vol. 30, No. 6. P. 727—731.

117. Faggi E., Pini G., Campisi E., Bertellini C., Difonzo E., Mancianti F. Application of PCR to distinguish common species of dermatophytes // J. Clin. Microbiol. 2001. Vol. 39. P. 3382—3385.

118. Gräser Y., Kühnisch J., Presber W. Molecular markers reveal exclusively clonal reproduction in *Trichophyton rubrum* // J. Clin. Microbiol. 1999. Vol. 37, No. 11. P. 3713—3717.

119. L'Ollivier C., Ranque S. MALDI-TOF-based dermatophyte identification // Mycopathologia. 2017. Vol. 182. P. 183—192.

120. Nenoff P., Erhard M., Simon J. C., et al. MALDI-TOF mass spectrometry—a rapid method for the identification of dermatophyte species // Med. Mycol. 2013. Vol. 51. P. 17—24.

121. Liu D., Pearce L., Lilley G., Coloe S., Baird R., Pedersen J. PCR identification of dermatophyte fungi *Trichophyton rubrum*, *T. soudanense* and *T. gourvilii* // J. Med. Microbiol. 2002. Vol. 51. P. 117—122.

122. Grigoryan K. V., Tollefson M. M., Olson M. A., Newman C. C. Pediatric tinea capitis caused by *Trichophyton violaceum* and *Trichophyton soudanense* in Rochester, Minnesota, United States // Int. J. Dermatol. 2019. Vol. 58, No. 8. P. 912—915.

123. Blank F., Day W., Just G. The isolation of xanthomegnin from *Trichophyton megninii* // J. Invest. Dermatol. 1963. Vol. 40. P. 133—137.
124. Wirth J. C., Beesley T. E., Anand S. R. The isolation of xanthomegnin from several strains of the dermatophyte, *Trichophyton rubrum* // Phytochemistry. 1965. Vol. 4. P. 505—509.
125. Blank F., Ng A., Just G. Isolation and tentative structures of vioxanthin and viopurpurin, two colored metabolites of *Trichophyton violaceum* // Can. J. Chem. 1966. Vol. 44. P. 2873—2879.
126. Gupta A. K., Ahmad I., Borst I., Summerbell R. C. Detection of xanthomegnin in epidermal materials infected with *Trichophyton rubrum*. J. Invest. Dermatol. 2000. Vol. 115. P. 901—905.
127. Ates A., Ozcan K., Ilkit M. Diagnostic value of morphological, physiological and biochemical tests in distinguishing *Trichophyton rubrum* from *Trichophyton mentagrophytes* complex // Med. Mycol. 2008. Vol. 46. P. 811—822.
128. Adamski Z., Kowalczyk M. J., Adamska K., et al. The first non-African case of *Trichophyton rubrum* var. *raubitschekii* or a urease-positive *Trichophyton rubrum* in Central Europe? // Mycopathologia. 2014. Vol. 178, No. 1-2. P. 91—96.
129. Scott J. A., Untereiner W. A. Determination of keratin degradation by fungi using keratin azure // Med. Mycol. 2004. Vol. 42. P. 239—246.
130. Jousson O., Lechenne B., Bontems O., et al. Secreted subtilisin gene family in *Trichophyton rubrum* // Gene. 2004. Vol. 339. P. 79—88.
131. Mercer D. K., Stewart C.S. Keratin hydrolysis by dermatophytes // Med. Mycol. 2018. Vol. 57. P. 13—22.
132. Theel E. S., Hall L., Mandrekar J., Wengenack N. L. Dermatophyte identification using matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry // J. Clin. Microbiol. 2011. Vol. 49. P. 4067—4071.

133. Kieliger S., Glatz M., Cozzio A., Bosshard P. P. Tinea capitis and tinea faciei in the Zurich area - an 8-year survey of trends in the epidemiology and treatment patterns // *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2015. Vol. 29, No. 8. P. 1524—1529.
134. Lamb S. R., Rademaker M. Tinea due to *Trichophyton violaceum* and *Trichophyton soudanense* in Hamilton // *N. Z. Aust. J. Dermatol.* 2001. Vol. 42, No. 4. P. 260—263.
135. Magill S. S., Manfredi L., Swiderski A., Cohen B., Merz W. G. Isolation of *Trichophyton violaceum* and *Trichophyton soudanense* in Baltimore // *Md. J. Clin. Microbiol.* 2007. Vol. 45, No. 2. P. 461—465.
136. Coulibaly O., Kone A. K., Niaré-Doumbo S., et al. Dermatophytosis among schoolchildren in three ecoclimatic zones of Mali // *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016. Vol. 10, No. 4. e0004675.
137. Farina C., Fazii P., Imberti G., Lombardi G., Passera M., Andreoni S. *Trichophyton violaceum* and *T. soudanense*: reemerging pathogens in Italy, 2005–2013 // *New Micobiol.* 2015. Vol. 38, No. 3. P. 409—415.
138. Irinyi L., Lackner M., de Hoog G. S., Meyer W. DNA barcoding of fungi causing infections in humans and animals // *Fungal Biol.* 2016. Vol. 120, No. 2. P. 125—136.
139. Kong F., Tong Z., Chen X., et al. Rapid identification and differentiation of *Trichophyton* species, based on sequence polymorphisms of the ribosomal internal transcribed spacer regions, by rolling-circle amplification // *J. Clin. Microbiol.* 2008. Vol. 46, No. 4. P. 1192—1199.
140. Varsavsky E., Ajello L. The perfect and imperfect forms of a new keratinophilic fungus *Arthroderma ciferrii* sp. nov.: *Trichophyton georgii* sp. nov. // *Riv. Patol. Veg.* 1964. Vol. 4. P. 351—364.

141. Jackson C. J., Barton R. C., Kelly S. L., Evans E. G. Strain identification of *Trichophyton rubrum* by specific amplification of subrepeat elements in the ribosomal DNA nontranscribed spacer // J. Clin. Microbiol. 2000. Vol. 38. P. 4527—4534.
142. Baeza L. C., Matsumoto M. T., Almeida A. M., Mendes-Giannini M. J. Strain differentiation of *Trichophyton rubrum* by randomly amplified polymorphic DNA and analysis of rDNA nontranscribed spacer // J. Med. Microbiol. 2006. Vol. 55. P. 429—436.
143. Hryniewicz-Gwóźdź A., Jagielski T., Sadakierska-Chudy A., et al. Molecular typing of *Trichophyton rubrum* clinical isolates from Poland // Mycoses. 2011. Vol. 54, No. 6. P. e726—e736.
144. Pchelin I. M., Azarov D. V., Chilina G. A., Dmitriev K. A., Vasilyeva N. V., Taraskina A. E. Single nucleotide polymorphism in a local population of *Trichophyton rubrum* // Med. Mycol. 2018. Vol. 56. P. 125—128.
145. Yazdanparast A., Jackson C. J., Barton R. C., Evans E. G. Molecular strain typing of *Trichophyton rubrum* indicates multiple strain involvement in onychomycosis // Br. J. Dermatol. 2003. Vol. 148, No. 1. P. 51—54.
146. Rad M. M., Jackson C., Barton R. C., Evans E. G. Single strains of *Trichophyton rubrum* in cases of tinea pedis // J. Med. Microbiol. 2005. Vol. 54. P. 725—726.
147. White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J, White T (eds), PCR protocols: A guide to methods and applications. Orlando, FL : Academic Press, 1990. P. 315—322.
148. O'Donnell K. *Fusarium* and its near relatives. In: Reynolds DR, Taylor JW (eds), The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics. Wallingford, UK : CAB International, 1993. P. 225—233.

149. Glass N. L., Donaldson G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes // *Appl. Environ. Microbiol.* 1995. Vol. 61. P. 1323—1330.
150. Pchelin I. M., Mochalov Y. V., Azarov D. V., et al. Genotyping of Russian isolates of *Trichophyton rubrum*, based on simple sequence repeat and single nucleotide polymorphism // *Mycoses.* 2020. Vol. 63. P. 1244—1254.
151. Gouy M., Guindon S., Gascuel O. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building // *Mol. Biol. Evol.* 2010. Vol. 27. P. 221—224.
152. Ninet B., Jan I., Bontems O., et al. Identification of dermatophyte species by 28S ribosomal DNA sequencing with a commercial kit // *J. Clin. Microbiol.* 2003. Vol. 41, No. 2. P. 826—830.
153. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies // *Bioinformatics.* 2014. Vol. 30. P. 1312—1313.
154. Ronquist F., Huelsenbeck J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // *Bioinformatics.* 2003. Vol. 19. P. 1572—1574.
155. Huson D. H., Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies // *Mol. Biol. Evol.* 2006. Vol. 23, No. 2. P. 254—267.
156. Garcia Garces H., Hrycyk M. F., Giacobino J., et al. Molecular identification and phylogenetical analysis of dermatophyte fungi from Latin America. *Mycoses.* 2016; 59(12): 787–797.
157. Clark L., Jasieniuk M. Polysat: an R package for polyploid microsatellite analysis // *Mol. Ecol. Resour.* 2011. Vol. 11, № 3. P. 562—566.
158. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T. L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction // *BMC Bioinformatics.* 2012. Vol. 13. P. 134.

159. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data [Электронный ресурс]. URL: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc> (дата обращения: 2010).
160. Bolger A. M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // *Bioinformatics*. 2014. Vol. 30. P. 2114—2120.
161. Nurk S., Bankevich A., Antipov D., et al. Assembling genomes and minimetagenomes from highly chimeric reads. In: Deng M, Jiang R, Sun F, Zhang X, eds. *Research in Computational Molecular Biology. RECOMB 2013. Lecture Notes in Computer Science*, vol 7821. Berlin : Springer, 2013. P. 158—170.
162. Mirarab S., Reaz R., Bayzid M. S., Zimmermann T., Swenson M. S., Warnow T. ASTRAL: Genome-scale coalescent-based species tree estimation // *Bioinformatics*. 2014. Vol. 30. P. i541—i548.
163. Treangen T. J., Ondov B. D., Koren S., Phillippy A. M. The Harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes // *Genome Biol*. 2014. Vol. 15. P. 524.
164. Kurtz S., Phillippy A., Delcher A. L., et al. Versatile and open software for comparing large genomes // *Genome Biol*. 2004. Vol. 5, No. 2. R12.
165. Cingolani P., Platts A., Wang le L., et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3 // *Fly (Austin)*. 2012. Vol. 6, No. 2. P. 80—92.
166. ПЦР в реальном времени / Д. В. Ребриков [и др.]; под ред. д. б. н. Д. В. Ребрикова. 5-е изд. М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. 223 с.
167. Arnaud-Haond S., Duarte C. M., Alberto F., Serrão E. A. Standardizing methods to address clonality in population studies // *Mol. Ecol*. 2007. Vol. 16, No. 24. P. 5115—5139.

168. Елинов Н. П. Дерматофиты (Лекция). Учебное пособие. СПб. : КОСТА, 2010. 48 с.
169. Brownrigg R., Becker R. A., Wilks A. R., Minka T. P., Deckmyn A. Maps: Draw Geographical Maps. R package version 3.1.0 [Электронный ресурс]. URL: <https://CRAN.Rproject.org/package=maps> (дата обращения: 2018).
170. Kahle D., Wickham H. Ggmap: Spatial visualization with ggplot2 // The R Journal. 2013. Vol. 5, No. 304. P. 144—161.
171. Baas Becking L. G. M. Geobiologie of inleiding tot de milieukunde. The Hague, the Netherlands : W.P. Van Stockum & Zoon, 1934. 263 p.
172. Foissner W. Biogeography and dispersal of micro-organisms: A review emphasizing protists // Acta Protozool. 2006. Vol. 45. P. 111—136.
173. Van der Gast C. J. Microbial biogeography: the end of the ubiquitous dispersal hypothesis? // Environmental Microbiology. 2014. Vol. 17, No. 3. P. 544—546.
174. Jean K., Burnside W. R., Carlson L., Smith K., Guegan J.-F. An equilibrium theory signature in the island biogeography of human parasites and pathogens // Global Ecol. Biogeogr. 2016. Vol. 25. P. 107—116.
175. Pchelin I. M., Azarov D. V., Churina M. A., et al. Whole genome sequence of first *Candida auris* strain, isolated in Russia // Med. Mycol. 2020. Vol. 58, No. 3. P. 414—416.
176. Ropars J., Maufrais C., Diogo D., et al. Gene flow contributes to diversification of the major fungal pathogen *Candida albicans* // Nat Commun. 2018. Vol. 9, No. 1. 2253.
177. Boutellis A., Abi-Rached L., Raoult D. The origin and distribution of human lice in the world // Infect. Genet. Evol. 2014. Vol. 23. P. 209—217.

178. Yuen L. K. W., Littlejohn M., Duchêne S., et al. Tracing ancient human migrations into Sahul using hepatitis B virus genomes // *Mol. Biol. Evol.* 2019. Vol. 36, No. 5. P. 942—954.

179. Vyas D. N., Kitchen A., Miró-Herrans A. T., Pearson L. N., Al-Meerri A., Mulligan C. J. Bayesian analyses of Yemeni mitochondrial genomes suggest multiple migration events with Africa and Western Eurasia // *Am. J. Phys. Anthropol.* 2016. Vol. 159, No. 3. P. 382—393.

180. Grob H., Wyss F., Wenker C., et al. *Trichophyton mentagrophytes*-from snow leopard to man: A molecular approach for uncovering the chain of infection // *Hautarzt.* 2018. Vol. 69, No. 12. P. 1021—1032.

181. Süß A., Uhrlaß S., Ludes A., et al. Extensive tinea corporis due to a terbinafine-resistant *Trichophyton mentagrophytes* isolate of the Indian genotype in a young infant from Bahrain in Germany // *Hautarzt.* 2019. Vol. 70, No. 11. P. 888—896.

182. Медведева Т. В., Леина Л. М., Петунова Я. Г., Чилина Г. А., Пчелин И. М. Антропонозная трихофития: представление об этиологии, эпидемиологии, дифференциальном диагнозе. Клинические случаи и обзор литературы // *Проблемы медицинской микологии.* 2021. Т. 23, № 3. С. 29—37.

183. Peay K. G., Kennedy P. G., Talbot J. M. Dimensions of biodiversity in the Earth mycobiome // *Nat. Rev. Microbiol.* 2016. Vol. 14, No. 7. P. 434—447.

184. Dalman K., Olson Å., Stenlid J. Evolutionary history of the conifer root rot fungus *Heterobasidion annosum* sensu lato // *Molecular Ecology.* 2010. Vol. 19. P. 4979—4993.

185. Gonthier P., Garbelotto M. Amplified fragment length polymorphism and sequence analyses reveal massive gene introgression from the European fungal pathogen *Heterobasidion annosum* into its introduced congener *H. irregulare* // *Mol. Ecol.* 2011. Vol. 20. P. 2756—2770.

186. Kim W. J., Kim J. G., Choi J. H., et al. Classification and typing of *Trichophyton mentagrophytes* isolated from a Korean population // Korean J. Med. Mycol. 2017. Vol. 22. P. 1—14.
187. Zhivotovsky L. A. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers // Mol. Ecol. 1999. Vol. 8, No. 6. P. 907—913.
188. Cavalli-Sforza L. L., Edwards A. W. F. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures // Am. J. Hum. Genet. 1967. Vol. 19. P. 233—257.
189. Nei M. 1972. Genetic distance between populations // Am. Nat. Vol. 106. P. 283—292.
190. Maheshwari R. Nuclear behavior in fungal hyphae // FEMS Microbiol. Lett. 2005. Vol. 249. P. 7—14.
191. Chen J., Moinard M., Xu J., et al. Genetic analyses of the internal transcribed spacer sequences suggest introgression and duplication in the medicinal mushroom *Agaricus subrufescens* // PLoS One. 2016. Vol. 11. e0156250.
192. Caten C. E., Jinks J. L. Heterokaryosis: its significance in wild homothallic ascomycetes and fungi imperfecti // Trans. Br. Mycol. Soc. 1966. Vol. 49. P. 81—93.
193. Rep M., Kistler H. C. The genomic organization of plant pathogenicity in *Fusarium* species // Curr. Opin. Plant Biol. 2010. Vol. 13. P. 420—426.
194. Ma L. J., van der Does H. C., Borkovich K. A., et al. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium* // Nature. 2010. Vol. 464. P. 367—373.
195. de Valk H. A., Meis J. F., de Pauw B. E., et al. Comparison of two highly discriminatory molecular fingerprinting assays for analysis of multiple *Aspergillus fumigatus* isolates from patients with invasive aspergillosis // J. Clin. Microbiol. 2007. Vol. 45. P. 1415—1419.

196. Verweij P. E., Zhang J., Debets A. J. M., et al. In-host adaptation and acquired triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a dilemma for clinical management // *Lancet Infect. Dis.* 2016. Vol. 16. P. e251—e260.

197. Monteiro M. C., Garcia-Rubio R., Alcazar-Fuoli L., et al. Could the determination of *Aspergillus fumigatus* mating type have prognostic value in invasive aspergillosis? // *Mycoses.* 2018. Vol. 61. P. 172—178.

198. Schelenz S., Hagen F., Rhodes J. L., et al. First hospital outbreak of the globally emerging *Candida auris* in a European hospital // *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 2016. Vol. 5. P. 35.

199. de Assis Santos D., de Carvalho Araújo R. A., Kohler L. M., Machado-Pinto J., Hamdan J. S., Cisalpino P. S. Molecular typing and antifungal susceptibility of *Trichophyton rubrum* isolates from patients with onychomycosis pre- and post-treatment // *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2007. Vol. 29, No. 5. P. 563—569.

200. Пчелин И. М., Крючкова М. А., Чилина Г. А., и др. Генетический полиморфизм серийных изолятов гриба *Trichophyton rubrum* (Castellani) — возбудителя онихомикоза и микоза стоп // *Проблемы медицинской микологии.* 2018. Т. 20, № 2. С. 35—39.

Приложение А
Нуклеотидные последовательности, полученные в ходе
исследования

№	Вид	Изолят или штамм	Локус	Номер доступа
1	<i>Trichophyton benhamiae</i>	РКПГ 1457	ITS	KT253567.2
2	<i>Trichophyton benhamiae</i>	РКПГ 1457	LSU	KU378216.1
3	<i>Trichophyton benhamiae</i>	РКПГ 1457	BT2	KT336428.1
4	<i>Trichophyton bullosum</i>	CBS 557.50	LSU	KU205266.1
5	<i>Trichophyton bullosum</i>	CBS 557.50	BT2	KU378225.1
6	<i>Trichophyton equinum</i>	РКПГ 936	ITS	KT285213.1
7	<i>Trichophyton equinum</i>	РКПГ 936	LSU	KT272001.1
8	<i>Trichophyton equinum</i>	РКПГ 936	BT2	KT272014.1
9	<i>Trichophyton eriotrephon</i>	CBS 220.25	LSU	KU205265.1
10	<i>Trichophyton eriotrephon</i>	CBS 220.25	BT2	KU378224.1
11	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Y1252	TEF1 α	MF966410.1
12	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Y2143	TEF1 α	MF966411.1
13	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Д15П2	ITS	KT253563.1
14	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Д15П2	LSU	KT271998.1
15	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Д15П2	BT2	KT272011.1
16	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Д15П5	ITS	KT253568.1
17	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Д15П5	LSU	KT271999.1
18	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Д15П5	BT2	KT272012.1
19	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Д15П90	TEF1 α	MF966409.1
20	<i>Trichophyton interdigitale</i>	РКПГ 1229	LSU	KC461912.2
21	<i>Trichophyton interdigitale</i>	РКПГ 1229	ITS	KT253561.1
22	<i>Trichophyton interdigitale</i>	РКПГ 1229	BT2	KU378229.1
23	<i>Trichophyton interdigitale</i>	РКПГ 1301	ITS	KP308373.1

24	<i>Trichophyton interdigitale</i>	PKIIГ 1301	BT2	KP308375.1
25	<i>Trichophyton interdigitale</i>	PKIIГ 1301	ITS	KT253562.1
26	<i>Trichophyton interdigitale</i>	PKIIГ 1394	BT2	KP308376.1
27	<i>Trichophyton interdigitale</i>	PKIIГ 1394	ITS	KT285209.2
28	<i>Trichophyton interdigitale</i>	PKIIГ 1394	LSU	KT271994.1
29	<i>Trichophyton interdigitale</i>	PKIIГ 1404	BT2	KP308377.1
30	<i>Trichophyton interdigitale</i>	PKIIГ 1404	ITS	KT253566.1
31	<i>Trichophyton interdigitale</i>	PKIIГ 1404	LSU	KT271995.1
32	<i>Trichophyton interdigitale</i>	PKIIГ 1459	BT2	KP308378.1
33	<i>Trichophyton interdigitale</i>	PKIIГ 1459	ITS	KT285211.1
34	<i>Trichophyton interdigitale</i>	PKIIГ 1459	LSU	KT271996.1
35	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	CBS 318.56	LSU	KU205264.1
36	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	CBS 318.56	BT2	KU378223.1
37	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Д15П127	ITS	MH708281.1
38	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Д15П135	ITS	KY761968.1
39	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Д15П152	ITS	MH708282.1
40	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Д15П156	ITS	MH708283.1
41	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	PKIIГ 1207	LSU	KC461921.2
42	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	PKIIГ 1207	ITS	KT253559.1
43	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	PKIIГ 1207	BT2	KU378227.1
44	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	PKIIГ 1207	<i>TEF1α</i>	MF966412.1
45	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	PKIIГ 1261	BT2	KP308374.1
46	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	PKIIГ 1261	ITS	KT285208.1
47	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	PKIIГ 1261	LSU	KT271993.1
48	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	PKIIГ 1278	ITS	KT253557.1
49	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	PKIIГ 1278	LSU	KU378211.1
50	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	PKIIГ 1278	BT2	KU378230.1
51	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	PKIIГ 1278	<i>TEF1α</i>	MF966413.1
52	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	PKIIГ 1425	ITS	KT285210.1

53	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	PKIIГ 1425	LSU	KT336431.1
54	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	PKIIГ 1425	BT2	KT336424.1
55	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	PKIIГ 1640	ITS	KT253558.1
56	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	PKIIГ 1640	LSU	KT271997.1
57	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	PKIIГ 1640	BT2	KT272010.1
58	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	PKIIГ 1640	<i>TEF1α</i>	MF966414.1
59	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	PKIIГ 265	ITS	KT253564.1
60	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	PKIIГ 266	ITS	KT253560.1
61	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	PKIIГ 266	LSU	KT271991.1
62	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	PKIIГ 266	BT2	KT272009.1
63	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	PKIIГ 267	ITS	KT253565.1
64	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	PKIIГ 267	LSU	KT271992.1
65	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	PKIIГ 267	BT2	KT336423.1
66	<i>Trichophyton quinckeanum</i>	PKIIГ 725	ITS	KU378219.1
67	<i>Trichophyton quinckeanum</i>	PKIIГ 725	LSU	KU378208.1
68	<i>Trichophyton quinckeanum</i>	PKIIГ 725	BT2	KT272017.1
69	<i>Trichophyton rubrum</i>	CBS 392.58	<i>TEF1α</i>	MF966403.1
70	<i>Trichophyton rubrum</i>	Д15П1	LSU	KT272006.1
71	<i>Trichophyton rubrum</i>	Д15П20	TERG_02941	KX852446.1
72	<i>Trichophyton rubrum</i>	Д15П20	TERG_03298	KX852448.1
73	<i>Trichophyton rubrum</i>	Д15П21	TERG_02941	KX852447.1
74	<i>Trichophyton rubrum</i>	Д15П21	TERG_03298	KX852449.1
75	<i>Trichophyton rubrum</i>	Д15П3	ITS	KT285225.1
76	<i>Trichophyton rubrum</i>	Д15П3	LSU	KT272007.1
77	<i>Trichophyton rubrum</i>	Д15П3	BT2	KT272018.1
78	<i>Trichophyton rubrum</i>	Д15П35	<i>TEF1α</i>	MF966404.1
79	<i>Trichophyton rubrum</i>	Д15П39	<i>TEF1α</i>	MF966405.1
80	<i>Trichophyton rubrum</i>	Д15П4	LSU	KT272008.1
81	<i>Trichophyton rubrum</i>	Д15П4	BT2	KT272019.1

82	<i>Trichophyton rubrum</i>	Д15П4	ITS	KU378222.1
83	<i>Trichophyton rubrum</i>	Д15П58	<i>TEF1α</i>	MF966406.1
84	<i>Trichophyton rubrum</i>	PKПГ 1280	BT2	KP308379.1
85	<i>Trichophyton rubrum</i>	PKПГ 1280	ITS	KT285221.1
86	<i>Trichophyton rubrum</i>	PKПГ 1280	LSU	KU378212.1
87	<i>Trichophyton rubrum</i>	PKПГ 1299	ITS	KT285222.1
88	<i>Trichophyton rubrum</i>	PKПГ 1299	LSU	KT272004.1
89	<i>Trichophyton rubrum</i>	PKПГ 1299	<i>BT2</i>	KP308380.1
90	<i>Trichophyton rubrum</i>	PKПГ 1393	ITS	KT285223.1
91	<i>Trichophyton rubrum</i>	PKПГ 1393	LSU	KU378213.1
92	<i>Trichophyton rubrum</i>	PKПГ 1393	BT2	KU378231.1
93	<i>Trichophyton rubrum</i>	PKПГ 1408	BT2	KP308381.1
94	<i>Trichophyton rubrum</i>	PKПГ 1408	ITS	KT285224.2
95	<i>Trichophyton rubrum</i>	PKПГ 1408	LSU	KT272005.2
96	<i>Trichophyton rubrum</i>	PKПГ 974	LSU	KC461908.2
97	<i>Trichophyton rubrum</i>	PKПГ 974	<i>BT2</i>	KU378226.1
98	<i>Trichophyton rubrum</i>	PKПГ 974	ITS	KT285220.1
99	<i>Trichophyton schoenleinii</i>	PKПГ 234	ITS	KT285219.1
100	<i>Trichophyton schoenleinii</i>	PKПГ 234	LSU	KT336430.1
101	<i>Trichophyton schoenleinii</i>	PKПГ 234	<i>BT2</i>	KT272016.1
102	<i>Trichophyton simii</i>	PKПГ 317	ITS	KT285218.1
103	<i>Trichophyton simii</i>	PKПГ 317	LSU	KT272003.1
104	<i>Trichophyton simii</i>	PKПГ 317	<i>BT2</i>	KT272015.1
105	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Д15П154	<i>TEF1α</i>	MF966415.1
106	<i>Trichophyton tonsurans</i>	PKПГ 1396	ITS	KT285214.1
107	<i>Trichophyton tonsurans</i>	PKПГ 1396	LSU	KU378214.1
108	<i>Trichophyton tonsurans</i>	PKПГ 1396	<i>BT2</i>	KT336425.1
109	<i>Trichophyton tonsurans</i>	PKПГ 1409	ITS	KT285215.1
110	<i>Trichophyton tonsurans</i>	PKПГ 1409	LSU	KT272002.1

111	<i>Trichophyton tonsurans</i>	PKIIГ 1409	BT2	KT336426.1
112	<i>Trichophyton tonsurans</i>	PKIIГ 1427	ITS	KT285216.1
113	<i>Trichophyton tonsurans</i>	PKIIГ 1427	LSU	KU378215.1
114	<i>Trichophyton tonsurans</i>	PKIIГ 1427	BT2	KU378232.1
115	<i>Trichophyton tonsurans</i>	PKIIГ 1458	ITS	KT285217.1
116	<i>Trichophyton tonsurans</i>	PKIIГ 1458	LSU	KU378217.1
117	<i>Trichophyton tonsurans</i>	PKIIГ 1458	BT2	KT336427.1
118	<i>Trichophyton tonsurans</i>	PKIIГ 209	LSU	KT272000.1
119	<i>Trichophyton tonsurans</i>	PKIIГ 212	LSU	KC461915.2
120	<i>Trichophyton tonsurans</i>	PKIIГ 212	ITS	KT285212.1
121	<i>Trichophyton tonsurans</i>	PKIIГ 212	BT2	KT272013.1
122	<i>Trichophyton tonsurans</i>	PKIIГ 212	<i>TEF1α</i>	MF966416.1
123	<i>Trichophyton verrucosum</i>	PKIIГ 937	ITS	KU378220.1
124	<i>Trichophyton verrucosum</i>	PKIIГ 937	LSU	KU378209.1
125	<i>Trichophyton verrucosum</i>	PKIIГ 937	BT2	KT336429.1
126	<i>Trichophyton violaceum</i>	PKIIГ 1211	ITS	KU378221.1
127	<i>Trichophyton violaceum</i>	PKIIГ 1211	LSU	KU378210.1
128	<i>Trichophyton violaceum</i>	PKIIГ 1211	BT2	KU378228.1
129	<i>Trichophyton violaceum</i>	PKIIГ 1770	<i>TEF1α</i>	MF966408.1
130	<i>Trichophyton violaceum</i>	PKIIГ 203	ITS	KU378218.1
131	<i>Trichophyton violaceum</i>	PKIIГ 203	LSU	KU378207.1
132	<i>Trichophyton violaceum</i>	PKIIГ 203	<i>TEF1α</i>	MF966407.1

Приложение Б
Скрипт puttorights.py

```
# The script uses test element to select sequences from infile.txt (Genbank format).
```

```
# Version 2019-01-19
```

```
# This defines test element to select sequences from the infile
```

```
testseq =
```

```
'TTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC  
AGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCC'
```

```
import re
```

```
import string
```

```
import sys
```

```
def complement(sequence):
```

```
    sequence = sequence.upper()
```

```
    c_sequence = sequence[::-1]
```

```
    c_sequence = c_sequence.replace('A', 'F').replace('T', 'A').replace('F', 'T')
```

```
    c_sequence = c_sequence.replace('G', 'F').replace('C', 'G').replace('F', 'C')
```

```
    c_sequence = c_sequence.replace('M', 'F').replace('K', 'M').replace('F', 'K')
```

```
    c_sequence = c_sequence.replace('R', 'F').replace('Y', 'R').replace('F', 'Y')
```

```
    c_sequence = c_sequence.replace('V', 'F').replace('B', 'V').replace('F', 'B')
```

```
    c_sequence = c_sequence.replace('H', 'F').replace('D', 'H').replace('F', 'D')
```

```
    return (c_sequence)
```

```
c_testseq = complement(testseq)
```

```
testseq = testseq.upper()
```

```
# Этот элемент принимает соглашение с условием отбора последовательностей
```

```
# или останавливает выполнение скрипта
print('\n')
print('Sequences with the following element will be included in the outfile:')
print('\n', testseq)
print('\n', 'y/n')
reply = str(input())
if reply.strip() == 'n':
    sys.exit()
elif 'y' not in reply:
    while 'n' or 'y' not in reply:
        print(' y or n can be read')
        reply = str(input())
        if reply.strip() == 'n':
            sys.exit()
        if reply.strip() == 'y':
            break

# Этот блок считает количество записей в исходном файле и проверяет формат
Genbank
n_Genbank_w = {} # инициация пустого словаря
text = open('infile.txt', 'r')
for word in re.findall(r'LOCUS', text.read()):
    count = n_Genbank_w.get('LOCUS', 0)
    n_Genbank_w[word] = count + 1
if n_Genbank_w != {}:
    ne = n_Genbank_w['LOCUS']
else:
    print('Error: cannot recognize file format')
    sys.exit()
```

Эта часть выписывает в множество accnos все номера из infile

with open('infile.txt') as inf:

accnos = set()

lines = inf.readlines()

i = 0

while i < len(lines):

if 'LOCUS' in lines[i]:

accno = re.findall(r'\S+', lines[i])[1]

accnos.add(accno)

i += 1

Выпишем в файл clean.fasta все уникальные последовательности,

попутно исправляя комплементарные.

transferredseqs = 0

excess = 0

waisted = 0

trash = set()

emptyaccnos = []

with open('infile.txt') as inf:

with open('clean.fasta', 'w') as outf:

line = inf.readline()

while line:

if 'LOCUS' in line[:5]:

accno = re.findall(r'\S+', line)[1]

skip = 0

if accno in accnos:

accnos.remove(accno)

applicant = "

```

while 'ORIGIN' not in line[:6] and '/' not in line[:2]:
    line = inf.readline()
if '/' in line:
    print('Empty entry:', accno)
    emptyaccnos.append(accno)
    skip = 1
if skip == 0:
    while line.strip() != '/':
        line = inf.readline()
        letts = line[10:100]
        letts = letts.replace(' ', '')
        letts = letts.strip()
        applicant = applicant + letts
    applicant = applicant.upper()
    if testseq in applicant:
        ouf.write('>')
        ouf.write(accno)
        ouf.write('\n')
        ouf.write(applicant)
        ouf.write('\n')
        transferredseqs += 1
    elif c_testseq in applicant:
        ouf.write('>')
        ouf.write(accno)
        ouf.write('\n')
        applicant = complement(applicant)
        ouf.write(applicant)
        ouf.write('\n')
        transferredseqs += 1

```

```

else:
    wasted += 1
    trash.add(accno)
else:
    excess += 1
line = inf.readline()

```

Создадим файл-помойку и выпишем туда отброшенные последовательности

```
if len(trash) != 0:
```

```
    with open('infile.txt') as inf:
```

```
        with open('abandoned.fasta', 'w') as outf:
```

```
            for line in inf:
```

```
                if 'LOCUS' in line[:5]:
```

```
                    accno = line[12:21].strip()
```

```
                    if accno in trash:
```

```
                        trash.remove(accno)
```

```
                        outf.write('>')
```

```
                        outf.write(accno)
```

```
                        outf.write('\n')
```

```
                    while 'ORIGIN' not in line[:6]:
```

```
                        line = inf.readline()
```

```
                    while line.strip() != '//':
```

```
                        line = inf.readline()
```

```
                        letts = line[10:100]
```

```
                        letts = letts.replace(' ', '')
```

```
                        outf.write(letts)
```

```
                line = line.strip()
```

```
# Выведем результаты подсчетов
```

```
print('\n', 'General number of entries =', ne)
if excess == 0:
    print(' Single copies throughout the sample', '\n')
else:
    print(' Initial number of unique entries =', ne - excess)
    print(' A total of', excess, 'excess sequences', '\n')
    # В исходнике ожидается не больше двух копий каждой записи
    if transferredseqs + waisted + excess != ne:
        print(' Unexpected number of copies in original file')
print(' Transferred to clean.fasta', transferredseqs, 'sequences')
print(' ', waisted, 'sequences waisted')
if len(accnos) > 0:
    print(accnos, 'wrong count of accessions')
print(' ', len(emptyaccnos), 'empty entries')
```


Приложение В
Скрипт compactor.py

```
# Version 2019-01-23

import re
import os.path
import sys

# Проверка дублирования номеров доступа
accnos = set()
excess = []
ne = 0
with open ('single.fasta') as inf:
    line = inf.readline()
    while line:
        if '>' in line:
            accno = re.findall(r'^\S+', line)[0][1:]
            if accno in accnos:
                print('Multiple entries of', accno)
                excess.append(accno)
            else:
                ne += 1
                accnos.add(accno)
        line = inf.readline()
print('\n A total of', ne, 'sequences', end='')
if excess != []:
    print(', excluding', len(excess), 'repeats')
```

```
# Этот блок спросит, отсеивать ли последовательности  
# с вырожденными нуклеотидами
```

```
print('\n')  
print(' Remove sequences with non-standard bases? y/n')  
reply = str(input())  
if reply.strip() == 'n':  
    decision_ns = 0  
elif reply.strip() == 'y':  
    decision_ns = 1  
elif 'y' or 'n' not in reply:  
    while 'n' or 'y' not in reply:  
        print(' y or n can be read')  
        reply = str(input())  
        if reply.strip() == 'n':  
            decision_ns = 0  
            break  
        if reply.strip() == 'y':  
            decision_ns = 1  
            break
```

```
# Этот блок спросит, отсеивать ли последовательности, депонированные  
# только из одной страны
```

```
print('\n Remove sequences, deposited less than three times ', end='')  
print('and/or from only one country? y/n')  
reply = str(input())  
if reply.strip() == 'n':  
    decision_oc = 0  
elif reply.strip() == 'y':  
    decision_oc = 1
```

```
elif 'y' or 'n' not in reply:
```

```
    while 'n' or 'y' not in reply:
```

```
        print(' y or n can be read')
```

```
        reply = str(input())
```

```
        if reply.strip() == 'n':
```

```
            decision_oc = 0
```

```
            break
```

```
        if reply.strip() == 'y':
```

```
            decision_oc = 1
```

```
            break
```

```
# Если выбрано удаление последовательностей, найденных только в одной стране,
```

```
# этот блок проверит, существует ли файл entry_origin.txt со странами
```

```
# происхождения записей Генбанка, и если его нет, то создает заново,
```

```
# открывая infile.txt с форматом GenBank
```

```
countries = []
```

```
if decision_oc == 1:
```

```
    useq = 0
```

```
    listed = set()
```

```
    if not os.path.exists('entry_origin.txt'):
```

```
        print(' The file infile.txt with Genbank entries is needed ', end="")
```

```
        print('to extract labs locations')
```

```
        with open ('infile.txt') as inf:
```

```
            with open ('entry_origin.txt', 'w') as outf:
```

```
                line = inf.readline()
```

```
                while line:
```

```
                    if 'LOCUS' in line[:5]:
```

```
                        accno = re.findall(r'\S+', line)[1]
```

```
                        if accno not in listed and accno in accnos:
```

```

ouf.write('>')
ouf.write(accno)
ouf.write('\n')
useq += 1
listed.add(accno)
while line.strip() != '//':
    if 'Direct Submission' in line:
        line = inf.readline()
        line = inf.readline()
        while not re.findall('\S', line[:5]):
            preline = line
            line = inf.readline()
            country = re.findall(r'\S+$', preline)[0]
        line = inf.readline()
    ouf.write(country)
    ouf.write('\n')
line = inf.readline()

```

Создадим список со строками из выровненного и обрезанного файла
с последовательностями. Он пригодится для проверки файла
с географией лабораторий и потом, в основном блоке. Перевод в 1 линию!

```

allseqs = []
lines = []
applicant = "
letts = "
d = 0
with open('single.fasta') as inf:
    rawlines = inf.readlines()
    for i in rawlines:

```

```

if '>' not in i:
    qwerty = i.replace('-', '')
else:
    qwerty = i
lines.append(qwerty)
for i in lines:
    if re.findall('\w', i):
        if '>' in i:
            if d != 0:
                allseqs.append(applicant.strip().upper())
                allseqs.append(letts)
                letts = ""
            applicant = i
            d += 1
        else:
            letts += i.strip().upper()
allseqs.append(applicant.strip().upper())
allseqs.append(letts)

# Если надо, заберем страны из файла entry_origin.txt в список, проверив,
# что в нем строки с угольными скобками чередуются со строками
# с непробельными символами
a = 0
check1 = 0
origins = []
if decision_oc == 1:
    with open('entry_origin.txt') as inf:
        line = inf.readline()
        while line:

```

```

if '>' in line:
    a += -1
    origins.append(line.strip().upper())
elif re.findall('\S', line):
    a += 1
    origins.append(line.strip().upper())
line = inf.readline()
for m in allseqs: # все строки из single
    if '>' in m:
        t = 0
        for n in origins: # все строки из entry_origin
            if m[:m.find('.')] in n:
                t = 1
        if t == 0:
            print (" 'no country for', m[1:])
            a += 1
    if a != 0:
        print (' Please correct the file entry_origin.txt')
        sys.exit()
    else:
        print (' List of country assignments successfully checked')

# Это основной блок, который выпишет последовательности по группам,
# укажет объем каждой группы в ее названии, укажет расшифровку групп
# после их названия. Здесь реализован выбор, включать или не включать
# в итоговый файл последовательности с вырожденными нуклеотидами
accnos = set()
group_origin = set()
group = 1

```

```

allrewseqs = 0
nonstandard = 0
runner = 0
with open('grouped.fasta', 'w') as outf:
    while runner <= len(allseqs)-1:
        line = allseqs[runner]
        if '>' in line:
            accno = line.strip().upper()
            if accno not in accnos:
                sample = allseqs[runner+1].strip().upper()
                allrewseqs += 1 # Это счетчик генотипов
                if re.findall('[^ATGC]', sample):
                    nonstandard += 1 # Счетчик нест. генотипов
                group_origin.add(accno)
                #print(accno)
                i = 0
                while i < len(allseqs)-1: # Этот цикл соберет список с номерами доступа
                    counterpart_no = allseqs[i].strip()
                    counterpart = allseqs[i + 1]
                    if sample in counterpart and counterpart_no not in accnos:
                        accnos.add(counterpart_no)
                        group_origin.add(counterpart_no)
                    i += 2
            if len(group_origin) > 1: # Этот цикл выпишет группы
                if decision_ns == 0:
                    outf.write('>')
                    outf.write('Group')
                    outf.write(str(group))
                    group += 1

```

```

ouf.write('-')
ouf.write(str(len(group_origin)))
ouf.write(' ')
for element in group_origin:
    element = element.replace('>', '')
    ouf.write(element.upper())
    ouf.write(' ')
elif decision_ns == 1:
    if not re.findall('[^ATGC]', sample):
        ouf.write('>')
        ouf.write('Group')
        ouf.write(str(group))
        group += 1
        ouf.write('-')
        ouf.write(str(len(group_origin)))
        ouf.write(' ')
        for element in group_origin:
            element = element.replace('>', '')
            ouf.write(element.upper())
            ouf.write(' ')
else: # Этот цикл выпишет уникальные последовательности
    if decision_ns == 0:
        smth = str(re.findall(r'\S+', str(group_origin))[0][2:])
        ouf.write(smth)
    elif decision_ns == 1:
        if not re.findall('[^ATGC]', sample):
            smth = str(re.findall(r'\S+', str(group_origin))[0][2:])
            ouf.write(smth)
if decision_ns == 0:

```



```

        ouf.write('\n')
        ouf.write(sample)
        ouf.write('\n')
    elif decision_ns == 1:
        if not re.findall('[^ATGC]', sample):
            ouf.write('\n')
            ouf.write(sample)
            ouf.write('\n')
        group_origin.clear()
    runner += 1

print(" ", len(allseqs)//2, 'sequences in total')
print(" ", allrewseqs, 'genotypes in the sample')
print(" ", nonstandard, 'genotypes with non-standard bases in the sample')

# Если указано принимать во внимание последовательности из не менее,
# чем двух стран, то этот блок обратится к файлу entry_origin.txt
# и перепишет в новый файл соответствующую часть содержания grouped.fasta
origins = set()
accorigins = []
if decision_oc == 1:
    with open ('entry_origin.txt') as inf:
        accorigins_raw = inf.readlines()
        for k in accorigins_raw:
            k = k.upper()
            accorigins.append(k)

print(' The list of countries is following: ', end="")
k = 1
displaycountries = set()
while k < len(accorigins):

```

```

displaycountries.add(accorigins[k])
k+=2
for q in displaycountries:
    print(q, end=")
with open ('grouped.fasta') as inf:
    with open ('grouped_nloc.fasta', 'w') as ouf:
        line = inf.readline()
        while line:
            if '>' in line:
                accessions = re.split(' ', line.strip())
                if len (accessions) > 2:
                    caption = accessions[0]
                    del accessions[0]
                    for unit in accessions:
                        i = 0
                        while i < len (accorigins):
                            if unit.upper() in accorigins[i]:
                                origins.add(accorigins[i+1].strip())
                                i += 1
                    if len (origins) > 1:
                        ouf.write(caption)
                        ouf.write(' ')
                        smth = str(re.findall(r'\w+', str(accessions))).replace('\n', ")
                        smth = smth.replace('[', ").replace(']', ")
                        ouf.write(smth)
                        ouf.write('\n')
                        line = inf.readline()
                        ouf.write(line)
                    origins.clear()

```

```

line = inf.readline()

# Это элемент выписывает номера доступа по группам
if decision_oc == 1:
    with open ('grouped_nloc.fasta') as inf:
        with open ('groups.txt', 'w') as outf:
            line = inf.readline()
            while line:
                if 'Group' in line:
                    elements = re.split(' ', line.strip())
                    outf.write(elements[0].replace('>', ''))
                    outf.write('\n')
                    k = 1
                    while k < len(elements):
                        outf.write(elements[k])
                        outf.write(' ')
                        k += 1
                    outf.write('\n')
            line = inf.readline()

# Этот скрипт посчитает объем выборки, сложив окончания заголовков
# в формате "GroupN-quant" например, "Group7-237" (how_many.py)
import re
groups = 0
quantity = 0
with open ('groups.txt') as inf:
    line = inf.readline()
    while line:
        if 'Group' in line:

```

```
groups += 1
fragments = re.findall(r'\w+', line)
quantity += int(fragments[1])
line = inf.readline()
print (quantity, 'accessions in', groups, 'groups.txt')
```

Приложение Г

Скрипт `countriestotable.py`

```

# Скрипт создает таблицу с распределением генотипов по странам
# Он берет классификацию последовательностей из tm-ti_groups.fasta
# И распределение последовательностей по странам geography_reviewed.fasta

# Посчитаем объем выборки, сложив окончания заголовков
# в формате "GroupN-quant" например, "Group7-237"
stypes = []
groups = 0
quantity = 0
import re
with open ('tm-ti_groups.txt') as inf:
    line = inf.readline()
    while line:
        if 'Group' in line:
            groups += 1
            twohalves = re.findall(r'\w+', line)
            quantity += int(twohalves[1])
            stypes.append(line.strip())
        line = inf.readline()
print ("", quantity, 'sequences in', groups, 'groups')

# Создадим список с названиями стран, которые нам выдал whethergeography
countries = []
with open ('countries_in_the_sample.txt') as inf:
    line = inf.readline().strip().upper()
    countries.append(line)

```

```
while line:
```

```
    line = inf.readline().strip().upper()
```

```
    if line != "":
```

```
        countries.append(line)
```

```
countries.sort()
```

```
with open ('geography_reviewed.fasta') as inf:
```

```
    gdata = inf.readlines()
```

```
# Выпишем генотипы и количество записей для каждой страны
```

```
grossam = 0
```

```
accnos = set()
```

```
current_accnos = set()
```

```
with open ('final.txt', 'w') as outf:
```

```
    with open ('tm-ti_groups.txt') as inf:
```

```
        allaboutgroups = inf.readlines()
```

```
        for i in countries: # Первая строка со странами
```

```
            outf.write('\t')
```

```
            outf.write(i)
```

```
        for g in stypes: # Последующие строки по числу генотипов
```

```
            outf.write('\n')
```

```
            outf.write(g) # начинаются с генотипа (группы)
```

```
            # соберем множество с номерами доступа данного генотипа
```

```
            number = 0
```

```
            while number < len(allaboutgroups):
```

```
                if g in allaboutgroups[number]:
```

```
                    number += 1
```

```
                    fragments = re.split(r',', allaboutgroups[number])
```

```
                    for k in fragments:
```

```

        current_accnos.add(k.strip())
        accnos.add(k.strip())
    number += 1
j = 0
while j < len(countries):
    givenc = countries[j]
    counter = 0
    runner = 0
    while runner < len(gdata):
        line = gdata[runner]
        if '>' in line:
            sample = line[1:].strip()
            if sample in current_accnos:
                line = gdata[runner+1].strip().upper()
                if givenc in line:
                    counter += 1
                    grossam += 1
            runner += 1
        ouf.write('\t')
        ouf.write(str(counter))
        j += 1
    current_accnos.clear()
print(" ", grossam, 'accessions in', len(stypes), 'groups in final file')

# Все ли номера доступа из groups были в geography_reviewed?
k = 0
missing = set()
for i in accnos:
    runner = 0

```

```
presence = 0
while runner < len(gdata):
    if i in gdata[runner]:
        k += 1
        presence = 1
    runner += 1
if presence == 0:
    missing.add(i)
if len(missing) > 0:
    print(" ", len(missing), 'sequences were not found in geography_reviewed.fasta')
with open ('missing.txt', 'w') as ouf:
    for i in missing:
        ouf.write('>')
        ouf.write(i)
        ouf.write('\n')
```


Приложение Д

Скрипт `attributetogenotypes.py`

```
# This script compares two fasta files: the dataset "single.fasta" and file
"referenceset.fasta"
# with reference sequences. The result is the file "attributed.txt", where sequences'
names
# from "single.fasta" are supplemented with relevant accessions from
"referenceset.fasta"

# Version 2019-01-18

# Этот блок переписывает изучаемые последовательности в одну линию
with open('single.fasta') as inf:
    with open('neat.fasta', 'w') as outf:
        applicant = ""
        k = 0
        line = inf.readline()
        while line:
            if '>' in line:
                applicant = applicant.replace('-', '').upper()
                outf.write(applicant)
                if k != 0:
                    outf.write('\n')
                k += 1
                applicant = ""
                outf.write(line)
            else:
                line = line.replace('\n', "")
                applicant = applicant + line
```

```

line = inf.readline()
if not line:
    applicant = applicant.replace('-', '').upper()
    ouf.write(applicant)

```

Этот блок переписывает референсные последовательности в одну линию
with open('referenceset.fasta') as inf:

with open('referenceset_plain.fasta', 'w') as ouf:

```

applicant = ""
k = 0
line = inf.readline()
while line:
    if '>' in line:
        applicant = applicant.replace('-', '').upper()
        ouf.write(applicant)
        if k != 0:
            ouf.write('\n')
        k += 1
        applicant = ""
        ouf.write(line)
    else:
        line = line.replace('\n', "")
        applicant = applicant + line
line = inf.readline()
if not line:
    applicant = applicant.replace('-', '').upper()
    ouf.write(applicant)

```

Этот блок ищет референсные последовательности

```

# из referenceset_plain.fasta в файле neat.fasta.
with open('referenceset_plain.fasta') as inf:
    references = inf.readlines()

import re
generalcount = 0
poolofnames = set()
accnos = set()
with open('neat.fasta') as inf:
    with open('attributed.txt', 'w') as ouf:
        line = inf.readline().strip()
        while line:
            if line[0] == '>':
                generalcount += 1
                elements = re.findall(r'\S+', line)
                if generalcount > 1:
                    ouf.write('\n')
                if (elements[0]) in poolofnames:
                    print('Multiple entries of', (elements[len(elements)-1]))
                    ouf.write(elements[0][1:]) # название последовательности
                    poolofnames.add(elements[0])
            else:
                runner = 0
                while runner < len(references):
                    if references[runner].strip() in line:
                        ouf.write('\t')
                        match = re.search(r'^\S+', references[runner-1])#
                        accno = references[runner-1][1:match.end()]
                        ouf.write(accno)

```



```
        currentvariants.add(rawseqs[runner])
    runner += 1
runner = 1
if len(currentvariants) > 1:
    switch = 1
    for i in currentvariants:
        ouf.write(caption)
        ouf.write(str(runner))
        ouf.write('\n')
        ouf.write(i)
        runner += 1
    line = inf.readline()

print('\n', generalcount, 'sequences analyzed')

# Удалим временные файлы
import os
os.remove('referenceset_plain.fasta')
os.remove('neat.fasta')
if switch == 0:
    os.remove('variants.fasta')
```

Приложение Е

Скрипт `snamestocoordinates.py`

```
# Этот скрипт принимает на вход таблицу со списками стран и таблицу с
долготами и широтами
# и преобразует их в список координат. Версия 2018-03-29.
import re

with open ("Country_coordinates.txt") as inf:
    rawcoordinates = inf.readlines()
coordinates=[]
for i in rawcoordinates:
    line = re.split('\t', i.strip())
    coordinates.append(line)

countries = set()
counter = 0
written = 0
with open("Transformed_data.txt") as inf:
    with open("Coordinates_by_genotypes.txt", 'w') as outf:
        line = inf.readline()
        while line:
            if '>' in line:
                localheader=line[1:].strip()
                line=inf.readline()
                rawelements=re.split(',', line)
                elements=[]
                for i in rawelements:
                    elements.append(i.strip())
```

```
countries.add(i.strip())
counter += 1
xcoordinates=[]
ycoordinates=[]
for i in elements:
    k=0
    while k < len (coordinates):
        if i in coordinates[k]:
            countries.remove(coordinates[k][0])
            xcoordinates.append(coordinates[k][1])
            ycoordinates.append(coordinates[k][2])
        k+=1
ouf.write(localheader)
ouf.write('.x <- c(')
ouf.write(xcoordinates[0])
written+=1

if len(xcoordinates) > 1:
    k=1
    while k < len(xcoordinates):
        ouf.write(',')
        ouf.write(xcoordinates[k])
        written+=1
    k+=1
ouf.write(')')
ouf.write('\n')
ouf.write(localheader)
ouf.write('.y <- c(')
ouf.write(ycoordinates[0])
```

```
if len(ycoordinates) > 1:
    k=1
    while k < len(ycoordinates):
        ouf.write(',')
        ouf.write(ycoordinates[k])
        k+=1
    ouf.write(')')
    ouf.write('\n')
    line = inf.readline()
else:
    line = inf.readline()
print(",counter,'datapoints in infile','\n',written,'datapoints in outfile')
for i in countries:
    print(", i)
```


Приложение Ж
Скрипт genotype_vs_tinea.py

```
# 2019-02-01
```

```
import re
```

```
generalcount=0
```

```
with open ('tm-ti_groups.txt') as inf:
```

```
    classification = inf.readlines()
```

```
with open ('genotype_vs_tinea.txt') as inf:
```

```
    with open ('summary.txt', 'w') as outf:
```

```
        outf.write('\ttinea pedis\ttinea unguium\ttinea corporis\ttinea cruris'  
                  +'\ttinea manuum\ttinea capitis\ttinea faciei\n')
```

```
    indata = inf.readlines()
```

```
    k = 0
```

```
    while k < len(classification):
```

```
        currentgenotype = classification[k].strip()
```

```
        print(currentgenotype)
```

```
        pedis = 0
```

```
        unguium = 0
```

```
        corporis = 0
```

```
        cruris = 0
```

```
        capitis = 0
```

```
        manuum = 0
```

```
        faciei = 0
```

```
        currentlist = re.findall(r'\w+', classification[k+1])
```

```
        for i in indata:
```

```

elements = re.findall(r'\S+', i)
if elements[2] in currentlist:
    if 'pedis' in elements[1]:
        pedis+=1
    if 'unguium' in elements[1]:
        unguium+=1
    if 'corporis' in elements[1]:
        corporis+=1
    if 'cruris' in elements[1]:
        cruris+=1
    if 'manuum' in elements[1]:
        manuum+=1
    if 'capitis' in elements[1]:
        capitis+=1
    if 'faciei' in elements[1]:
        faciei+=1

ouf.write(currentgenotype)
ouf.write('\t')
ouf.write(str(pedis))#####
ouf.write('\t')
generalcount+=pedis

ouf.write(str(unguium))#####
ouf.write('\t')
generalcount+=unguium

ouf.write(str(corporis))#####
ouf.write('\t')
generalcount+=corporis

```

```
ouf.write(str(cruris))#####
```

```
ouf.write('\t')
```

```
generalcount+=cruris
```

```
ouf.write(str(manuum))#####
```

```
ouf.write('\t')
```

```
generalcount+=manuum
```

```
ouf.write(str(capitis))#####
```

```
ouf.write('\t')
```

```
generalcount+=capitis
```

```
ouf.write(str(faciei))#####
```

```
ouf.write('\t')
```

```
generalcount+=faciei
```

```
ouf.write(str(pedis+unguium+corporis+cruris+manuum+capitis+faciei))
```

```
ouf.write('\n')
```

```
k+=2
```

```
print('A total of', generalcount, 'clinical annotations')
```

Приложение 3

Скрипт accnos.py

```
# Скрипт считает количество слов в комментариях файла FASTA
# и выписывает их в новый файл, каждое с новой строки, с угольной скобкой
import re
accnos = set()
with open ('grouped_nloc.fasta') as inf:
    with open ('clean.fasta', 'w') as ouf:
        lines = inf.readlines()
        for i in lines:
            if '>' in i:
                pieces = re.findall(r'\S+', i)[1:]
                for j in pieces:
                    accnos.add(j.replace(',',''))
print(len(accnos), 'accnos')
for i in accnos:
    ouf.write('>')
    ouf.write(i)
    ouf.write('\n')
```



```

# Соберем множество с локусами вносимых данных и проверим, что новых нет
extraloci = set()
basicisolates = set()
with open ('Addition.txt') as inf:
    line = inf.readline()
    while line:
        if re.findall('\S', line): # любой непробельный символ
            elements = re.split('\t', line)
            extraloci.add(elements[1])
        line = inf.readline()
# Заберем заголовок Mainfile в список
with open ('Mainfile.txt') as inf:
    line = inf.readline()
    elements = re.split('\t', line.strip())
basicloci = []
for i in elements:
    basicloci.append(i)
for i in extraloci: # это непосредственно цикл с проверкой
    if i not in basicloci:
        print('\n', i, '\n')
        print ('Please provide all loci in the starting line of Mainfile')
        sys.exit()
# Сначала перепишем все старые данные с добавлением новых в новый файл
with open ('Addition.txt') as inf:
    newdata = inf.readlines()
with open ('Appended.txt', 'w') as ouf:
    with open ('Mainfile.txt') as inf:
        for i in basicloci:
            ouf.write('\t')

```

```

    outf.write(i)
line = inf.readline()
line = inf.readline()
while line:
    outlist = [] # список на вывод в Appended
    inlist = re.split('\t', line.strip())
    isolate = re.findall(r'^\w+', line) # первое слово -- изолят
# код возьмет изолят из начала каждой отдельной строки и пробежит
# по всему Addition в поисках информации по каждому конкретному локусу
# определенного изолята
    if isolate:
        outlist[0] = isolate[0]
        basicisolates.add(isolate[0])
        position = 0
        while position < len(basicloci): # пробежим по столбцам
            # здесь position -- номер локуса в заголовке
            currentlocus = basicloci[position]
            currentcell = "
            # В ячейку запишем сначала инф. из Mainfile, затем из Addition
            if position+1 < len(inlist):
                # здесь position -- номер слова в списке, сдвиг вправо на 1
                if re.findall(r'\S', inlist[position+1]):
                    currentcell += inlist[position+1]
            for i in newdata:
                if re.findall('\S', i): # если строка не пуста
                    pieces = re.findall(r'\S+', i)
                    #Cropping
                    pos = re.search(r'_', pieces[0])
                    if '_' in pieces[0]:

```

```

        pieces[0] = pieces[0][:pos.span()[0]]
    if isolate[0] == pieces[0]:
        if currentlocus == pieces[1]:
            if re.findall(r'\S', currentcell):
                currentcell += '-'
            pieces[2] = round(float(pieces[2]))
            currentcell += str(pieces[2])
            counter+=1

        outlist.append(currentcell)
        position += 1
    outf.write('\n')
    for i in outlist:
        outf.write(str(i))
        outf.write('\t')
    line = inf.readline()

```

Теперь дозапишем файл теми изолятами, которых не было в таблице

with open ('Addition.txt') as inf:

with open ('Appended.txt', 'a') as outf:

line = inf.readline()

while line:

isolate = re.findall(r'\S+', line)

if isolate != []:

#Cropping

pos = re.search(r'_', isolate[0])

if '_' in isolate[0]:

isolate[0] = isolate[0][:pos.span()[0]]

if isolate[0] not in basicisolates:

basicisolates.add(isolate[0])

outlist = []


```

outlist[0] = isolate[0]
position = 0
while position < len(basicloci):
    currentlocus = basicloci[position]
    currentcell = "
    for i in newdata:
        if re.findall(r'\S', i):
            pieces = re.findall(r'\S+', i)
            #Cropping
            if '_' in pieces[0]:
                pos = re.search(r'_', pieces[0])
                pieces[0] = pieces[0][:pos.span()[0]]
            if isolate[0] == pieces[0]:
                if currentlocus == pieces[1]:
                    if len (pieces) > 2:
                        if re.findall(r'\S', currentcell):
                            currentcell += '-'
                        pieces[2] = round(float(pieces[2]))
                        currentcell += str(pieces[2])
                        counter+=1

                    outlist.append(currentcell)
                position += 1
    ouf.write('\n')
    for i in outlist:
        ouf.write(str(i))
        ouf.write('\t')

    line = inf.readline()
print('\n', counter, 'samples added')

```

Приложение К

Скрипт `tabletogenemapper.py`

```
# Этот скрипт преобразует таблицу с длинами локусов, выстроенными
# в виде последовательных столбцов, в формат GeneMapper.
# Версия 2019-01-16

# Соберем множество с локусами вносимых данных и проверим, что новых нет
import re
# Заберем заголовок infile в список
with open ('infile.txt') as inf:
    line = inf.readline()
    print(line)
    elements = re.findall(r'\S+', line.strip())
loci = []
for i in elements:
    loci.append(i)
with open ('infile.txt') as inf:
    data = inf.readlines()

with open ('GeneMapper.txt', 'w') as outf:
    switch = 0 # Переключатель по локусам
    while switch < len(loci):
        runner = 1
        while runner < len(data):
            elements = re.split('\t', data[runner])
            outf.write(elements[0])
            outf.write('\t')
            outf.write(loci[switch])
```

```
ouf.write('\t')
ouf.write(elements[switch+1].strip())
ouf.write('\n')
runner += 1
switch += 1
```

Приложение Л
Скрипт pondouble.py

```
# Удаление дублирующихся длин локусов. 2018-12-12
```

```
import re
```

```
with open ('File.txt') as inf:
```

```
    with open ('Result.xls','w') as ouf:
```

```
        line=inf.readline()
```

```
        ouf.write(line)
```

```
        line=inf.readline().strip()
```

```
    while line:
```

```
        words=re.split(r'\t', line)
```

```
        for i in words:
```

```
            if '-' in i:
```

```
                pos = re.search(r'-', i)
```

```
                i = i[:pos.span()[0]]
```

```
                ouf.write(i)
```

```
                ouf.write('\t')
```

```
            else:
```

```
                ouf.write(i)
```

```
                ouf.write('\t')
```

```
    ouf.write('\n')
```

```
    line=inf.readline().strip()
```

FEDERAL STATE BUDGETARY SCIENTIFIC INSTITUTION
INSTITUTE OF EXPERIMENTAL MEDICINE

as a manuscript

Pchelin Ivan Mikhailovich

MOLECULAR-GENETIC CHARACTERISTICS OF DERMATOPHYTES OF THE
GENUS *TRICHOPHYTON* — CAUSES OF ONYCHOMYCOSIS

1.5.11. Microbiology

Thesis for the degree of Candidate of Biological Sciences

Translation from Russian

Scientific supervisor:
Doctor of Medical Sciences
Sergeev Alexey Yurevich

Saint Petersburg, 2022

TABLE OF CONTENTS

Introduction	168
1 Literature review	174
1.1 Morphological and physiological characteristics of representatives of the genus <i>Trichophyton</i> ...	174
1.2 Classification of fungi of the genus <i>Trichophyton</i>	175
1.3 Genetic diversity of dermatophytes and methods of its description	180
1.4 Genetic diversity in the <i>Trichophyton mentagrophytes</i> / <i>T. interdigitale</i> species complex	185
1.5 Genetic diversity of the species <i>Trichophyton rubrum</i>	188
2 Materials and methods.....	197
2.1 Phenotypic methods	197
2.2 Molecular genetic methods	198
2.3 Statistical methods.....	209
3 Results and discussion.....	210
3.1 Phenotypic characteristics of <i>Trichophyton</i> spp.....	210
3.2 Reconstruction of phylogenetic relationships in the genus <i>Trichophyton</i>	212
3.3 Diversity and geography of ITS <i>Trichophyton mentagrophytes</i> and <i>T. interdigitale</i> genotypes ...	216
3.4 Analysis of interspecific boundaries in the <i>Trichophyton mentagrophytes</i> / <i>T. interdigitale</i> complex	222
3.5 Population structure of the fungus <i>Trichophyton rubrum</i>	229
3.6 Comparison of the resolution of typing methods for <i>Trichophyton rubrum</i> strains	243
4 Conclusions	245
5 Recommended practices	246
Closing word	247
List of abbreviations.....	248
References	249
Appendix A Nucleotide sequences obtained during the study	272
Appendix B Script puttorights.py.....	277
Appendix C Script compactor.py	283
Appendix D Script countriesortable.py	295
Appendix E Script attributetogenotypes.py.....	299
Appendix F Script cnamestocoordinates.py	304
Appendix G Script genotype_vs_tinea.py.....	307

Appendix H Script accnos.py	310
Appendix I Script incrustator.py	311
Appendix J Script tabletogenemapper.py	316
Appendix K Script nondouble.py	318

INTRODUCTION

Relevance of the research topic

Onychomycosis is a widespread mycotic disease, which affects up to 8-13% of the world's population, and an increase in the incidence is noted [1]. The problem of onychomycosis is especially typical for patients of the older age group, and affects 20% of the population in the population over 60 years old and up to 50% of people over 70 years old. *Trichophyton rubrum*, *T. interdigitale*, *T. mentagrophytes* are the main causative agents of onychomycosis in most territories (with the exception of Australia, Iran, and parts of African countries) [2-6]. In recent years, the treatment of dermatomycosis has been complicated by the emergence of dermatophyte strains resistant to antifungal agents [7, 8].

From the middle of the 19th century to the second half of the 20th century, on the basis of studying the morpho-biological properties of isolates, researchers proposed the name of the species group for the genus *Trichophyton* 151 [9]. The current stage in the development of microbiological research is associated with the widespread introduction of molecular genetic methods, which allow, inter alia, to obtain information about the structure of the biological diversity of micromycetes and the taxonomic affiliation of pathogenic fungi. Molecular studies carried out over the past two decades have made it possible to narrow the boundaries of the genus and synonymize a significant part of the previously described taxa, as a result of which the current composition of the genus *Trichophyton* is limited to 20 species [10-12]. The etiology of dermatomycosis on the territory of the Russian Federation remains unexplored by modern methods. In this regard, it is important to study the molecular genetic characteristics and genetic diversity of dermatophytes on the territory of the Russian Federation.

The results of DNA sequencing (according to Sanger and whole genome) of dermatophytes indicate that the current taxonomic scheme of this group is inherent in a number of problems. Among them is the absence of pronounced interspecific boundaries between *T. mentagrophytes* and *T. interdigitale*, which form a species

complex. The structure of the population of the fungus *T. rubrum*, the main causative agent of fungal infections of the feet and nails in the Russian Federation, is unknown [13, 14]. At the same time, there is a need for taxonomic schemes that reflect the real structure of genetic and functional diversity [15].

The degree of elaboration of the research topic

In the world literature, there is a small number of works devoted to the genetic diversity of the fungus *T. rubrum*, the genetic structure of the fungus population has not yet been described [16-19]. The problem of species boundaries between *T. mentagrophytes* and *T. interdigitale* was the subject of a fundamental study by Heidemann et al. [20]. In it, a link was found between genotypes and the origin of the isolates. However, the overall genetic diversity of the *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* complex remained undescribed. There is practically no information on the genotypes of dermatophytes present on the territory of the Russian Federation. Thus, the research topic is insufficiently developed all over the world, and is almost not touched upon by domestic authors.

Research goals and objectives

The aim of this study is to study the genetic diversity of fungi of the genus *Trichophyton*.

The objectives of this study are:

1. To carry out phylogenetic analysis of the genus *Trichophyton* based on the study of nucleotide polymorphism in the region of the internal transcribed spacer of rDNA and the 28S rRNA and beta-tubulin-coding genes.
2. To study the diversity and geography of the ITS *Trichophyton mentagrophytes* and *T. interdigitale* genotypes.
3. Establish phylogenetic relationships within the *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* complex based on genome-wide sequences.

4. To study the genetic polymorphism of the *T. rubrum* fungus using the example of isolates isolated from patients with dermatomycosis in St. Petersburg and Yekaterinburg.

5. To compare the typing resolution of *T. rubrum* isolates by loci of nontranscribed rDNA spacer and by microsatellite polymorphism.

Scientific novelty of research

For the first time, the reconstruction of phylogenetic relationships in the genus *Trichophyton* was carried out using domestic isolates. The polymorphism of protein-coding sequences of the fungus *T. rubrum* and intraspecific polymorphism of dermatophytes isolated on the territory of the Russian Federation were described for the first time. For the first time in the Russian Federation, sequences of the ITS region, *BT2* and *TEF1 α* loci of *T. mentagrophytes*, *T. interdigitale*, and *T. rubrum* were obtained and published. For the first time, the heterogeneity in the geographical distribution of the genotypes of the fungi *T. mentagrophytes* and *T. interdigitale* was discovered. The molecular genetic structure of the *T. rubrum* fungus population in the territory of St. Petersburg and Yekaterinburg was studied.

The theoretical and practical significance of the study

Determination of the nucleotide sequences of the genomes of strains of the *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* complex, obtaining data on the polymorphism of the lengths of microsatellite loci and single nucleotide polymorphism of the protein-coding genes of *T. rubrum* are important for the global epidemiology of dermatomycosis and population genetics.

New data on the impossibility of separating strains of *T. mentagrophytes* and *T. interdigitale* by phylogenetic analysis methods contribute to the establishment of their taxonomic status.

Based on a systematic analysis of the contents of the GenBank database, the genotypes of the fungus *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* with a limited geographic distribution have been identified, which is important for global epidemiological studies.

Ten developed universal scripts for the analysis of nucleotide sequences of fungi and formatting data files with the lengths of microsatellite loci can be used to process large amounts of information, contribute to the methodology of bioinformatics analysis.

Research methodology and methods

This dissertation work is based on a series of experimental studies carried out in accordance with hypothetical-deductive methodology and using analytical, synthetic and inductive logical techniques. Methods of medical microbiology, molecular genetics and bioinformatic approaches were used.

Implementation of research results

The results of the study were introduced into the educational process of the departments of medical microbiology and dermatovenerology, the work of the mycological clinic and the research laboratory "Russian collection of pathogenic fungi" of the N.N. I.I. Mechnikov.

Principal findings to be considered

1. The fungi *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton interdigitale* belong to the same phylogenetic species.

2. The population of the fungus *Trichophyton rubrum* in St. Petersburg and Yekaterinburg has a two-part structure.

3. On the territory of the Russian Federation, five genotypes of the *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* complex were found, having a European distribution - "FM986750", "KT285210", "MF926358", and global - "JX122216", "KP132819".

Degree of reliability and validation of results

The reliability of the research results is due to the solution of problems using representative samples of isolates and nucleotide sequences, as well as the use of adequate methods of statistical processing of the material. The results of the study were tested at the XVIII - XXI All-Russian Congresses on Medical Microbiology, Clinical Mycology and Immunology (Kashkinsky Readings), held in St. Petersburg in 2015 - 2018, as well as at the following international conferences:

1. Third China-Russia International Conference on Microbiology, Immunology and Related Diseases (CRICMID), September 1-6, 2016, Harbin and Beijing, China. Report "Molecular typing of *Trichophyton rubrum* isolates from Saint Petersburg, Russia".

2. ISHAM Workshop Developments in Clinical and Fundamental Aspects of Dermatophytes, October 29-30, 2016, Utrecht, The Netherlands. Report "New typing scheme for *Trichophyton rubrum* isolates, based on single nucleotide polymorphism".

3. Seminar of the International Society of Medical and Veterinary Mycology "Onygenales" (ISHAM Workshop "Onygenales") June 28-29, 2018, Amsterdam, Netherlands. Report "The known diversity of internal transcribed spacer region genotypes of *Trichophyton* spp."

4. International Conference on the Prevention and Control of Infectious Diseases (ICPCID) December 27-29, 2018, Harbin, China. Report "Causative agents of dermatophytoses on agenda: whole genome sequences shed light on the species problem in *Trichophyton mentagrophytes* and *T. interdigitale*."

Personal contribution of the author

The author planned, organized and conducted research, determined the scope and methods of research, conducted microbiological research, processed and digitized the research results, carried out statistical processing, performed an analysis, summarized and discussed the results, prepared publications on the topic of the dissertation. The share of participation in the collection of material is 70%, in the generalization of materials - 95%.

Publications

On the topic of the dissertation, 7 papers have been published. Including, 2 articles in the journal from the list recommended by the Higher Attestation Commission and 5 articles in journals indexed in the Scopus and Web of Science databases.

The structure and scope of the thesis

The work is presented on 164 pages (the Russian version), and consists of an introduction, a review of literature, materials and methods, research results and their discussion, conclusions, practical recommendations, a list of references, including 200 sources, of which 12 are domestic and 188 foreign, and eleven appendices.

1 LITERATURE REVIEW

1.1 Morphological and physiological characteristics of representatives of the genus *Trichophyton*

Species of the genus *Trichophyton* have a mycelial structure, and parasitize on the keratinized integuments of mammals, including humans. According to the characteristics of the genus, the colonies of representatives have a mainly fluffy structure, their color varies from white to yellowish. The color of the side of the colony facing the substrate, the reverse, can be cream, brown, red or purple. Hyphae are thin-walled, transparent. Macroconidia and microconidia, if present, are located at the ends or along undifferentiated hyphae. Macroconidia are two- or multicellular, thin-walled and smooth-walled, hyaline. They can be cylindrical, club-shaped or cigar-shaped. Microconidia are thin and smooth-walled, hyaline, unicellular, ovoid, pear-shaped to clavate [10]. Like most ascomycetes, *Trichophyton* spp. have a bipolar mating system. Mating types are conventionally designated (+) and (-), also sometimes (A) and (a). During co-cultivation of mycelium with opposite types of mating, fruiting bodies are formed - hymnothetia, containing asci with ascospores [21]. The description of the crossing of isolates of the *T. mentagrophytes* morphological complex, published by Aiello and Cheng in 1967, is possibly the first report on the perfect form of a fungus of the genus *Trichophyton*.

In studies of the second half XX century, it was found that the type of coupling is determined by two alternative embodiments sequence genomic locus *MAT*. Genes encoding a protein containing an alpha-boxing domain (*MAT1-1*) and a protein containing an HMG domain (*MAT1-2*) are flanked at the 5'-end by genes encoding a protein that controls assembly of the *SLA2* cytoskeleton, subunit VIa of cytochrome c oxidase *COX13*, a protein similar to DNA lyase *APN2*, and two hypothetical proteins [22].

Stockdale [23] noted that asexual isolates elicit a mating response indicative of their mating type when co-cultured with *T. simii* tester strains. Both the Stockdale test

and more recent molecular data have shown that most recognized asexual dermatophyte species involve only one mating type [24]. Since sexual reproduction is observed in almost all phylogenetic branches of dermatophytes, it is believed that clonal lines originated from a sexual ancestor, and another type of mating could be lost or extremely rare, or the species could be obtained from one type of mating [25].

In the genus *Trichophyton*, there is a multiple transition to clonal reproduction. For example, the *T. benhamiae* group of species contains 3 clonal lines (*T. concentricum*, *T. benhamiae*, *T. japonicum*), and one recombining species, *T. europaeum*, and the *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* group of species contains two clonal lines and one recombining one. In general, zoophilic and anthropophilic *Trichophyton* spp. unlike sapronous dermatophytes of other genera, they are characterized by less frequent sexual reproduction [26]. It is believed that the loss of one of the two types of mating, for example, in *T. rubrum*, is an adaptation to existence in a stable ecological niche - on human integuments [17, 19]. In populations that retain both idiomorphs of the *MAT* locus, they are distributed in unequal proportions. In a recent work by German authors, the number of identified isolates with the idiomorph MAT1-1 in the population of *T. mentagrophytes* related to the number of isolates with MAT1-2 as 6 to 24, and in the population of *T. benhamiae* - 15 to 8 [27].

Genome sizes of *Trichophyton* spp. vary from 22.2 (*T. europaeum*) to 24.2 (*T. equinum*) megabases. Dermatophytes are characterized by a small number of species-specific genes, probably reflecting their recent origin from a common ancestor [28]. In *T. rubrum*, the genome is distributed over five chromosomes [29]. There is no information on the structural organization of the genome in other members of the genus.

1.2 Classification of fungi of the genus *Trichophyton*

From a taxonomic point of view, the genus *Trichophyton* belongs to the Arthrodermataceae family of the ascomycete order Onygenales, which, among other fungi, also includes dimorphic primary pathogens – the causative agents of endemic deep mycoses *Blastomyces*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, and *Paracoccidioides*. The first

scientific description of a fungus of the genus *Trichophyton* dates back to 1848, when the Swedish physician Per Henrik Malmsten (1811-1883) described fungal spores inside hairs of ringworm patients and named the fungus *Trichophyton tonsurans* (from Greek: τρίχα = hair, φυτό = plant) [30].

Since then, the process of improvement of the taxonomic system of dermatophytes can be observed. It is possible to conditionally distinguish individual stages in it, each of which is characterized by the leading role of one of the research methods. Interestingly, under the conditions of constant change of paradigms, none of them lost their significance. In the most authoritative modern works, one can see their application in a single complex [31-33].

The period from the end of the 19th century to the middle of the 20th century can be designated as a pathogenetic stage in the development of the classification of dermatophytes [34]. The predominant method was the cultivation of dermatophytes on nutrient media, accompanied by a description of the micro- and macromorphology of colonies, as well as tissue forms of dermatophytes [35; 36]. The main diagnostic signs were the clinical manifestations of the disease, the structure of colonies and the morphology of conidia - asexual spores. Despite a certain variability in the form of spores and the regular appearance of non-spore-bearing crops, known as pleomorphism, these signs have not lost their significance at the present time. One of the most notable achievements of this stage is the system of Langeron and Vanbrezgem [37], in which dermatophytes included the following genera: *Ctenomyces*, *Sabouraudites*, *Trichophyton*, *Langeronia*, *Epidermophyton*. By this time, most of the pathogens of dermatomycosis, which were relevant at the beginning of the third decade of the 21st century, were described.

In the middle of the 20th century, it was discovered that some types of dermatophytes can be distinguished using physiological tests [38, 39]. For a long time, forms of dermatophytes that do not produce fruiting bodies and reproductive spores (anamorphs) were classified separately from the reproductive stages (teleomorphs). Therefore, an important step forward was the introduction of crossbreeding into

research practice, with the help of which a correspondence was established between the genera *Arthroderma* and *Trichophyton* [40-42]. However, the application of the biological concept of the species to the group under consideration gives rise to contradictions with the established division based on morphological signs and the clinical picture of the caused disease. The most striking example of these contradictions is presented in the work of Kawasaki and co-authors [43]. The Japanese researcher crossed strains *T. simii* (mating type +) and *T. mentagrophytes* (mating type -), the offspring from these crosses could also be crossed with *T. mentagrophytes* (+) and *T. benhamiae* (-). *Trichophyton simii* also crossed with *T. benhamiae* and *T. rubrum*, and the hybrid *T. simii* — *T. rubrum* with *T. benhamiae*, to form mature ascospores. Thus, in essence, it was shown that all the diversity of the genus potentially fits into one biological species. However, it should be noted that attempts by other researchers to cross genetically close *T. rubrum* and *T. megninii* with different mating types were unsuccessful, as well as experiments on crossing *T. rubrum* and *T. simii* were not reproduced [19].

Traditionally, the taxonomy of dermatophytes takes into account the clinical signs of the caused diseases and the host preferences of the fungus. For this preference, *Trichophyton* spp. are divided into anthropophilic and zoophilic species, while anthropophilic species are able to circulate only in the human population, and zoophilic ones – among animals, and the periodic chains of transmission of the pathogen to a nonspecific host are quickly cut off. *Trichophyton mentagrophytes* is an exception to this rule. It is able to circulate in both animal populations [44] and humans [45, 46]. The species *T. tonsurans* and *T. equinum* were divided on the basis of host preferences [47].

At the present stage of the development of science, molecular genetic methods are used to study the phylogeny of dermatophytes, with the predominance of DNA sequencing according to Sanger. Molecular techniques are more versatile and reproducible than phenotypic techniques. Early work was associated with obtaining RFLP profiles of mitochondrial DNA; during this period, the generic composition of dermatophytes was ordered [48], and the similarity of asexual *T. interdigitale* and

A. vanbreuseghemii was revealed [49]. There was a transition first to studies of single nucleotide sequences [50], and then to sets of loci [10, 51-53]. The studied loci include a fragment of the 28S rRNA gene of the large subunit of ribosomes [53], the ITS region [50], fragments of the protein-coding genes *ACT* [51], *BT2* [53, 54], *TEF1 α* [52], CaM [55]. The modern classification in general terms was formed by 2008 [24], and all subsequent changes [10, 56] were caused not by a deeper understanding of the structure of phylogenetic relationships, but rather by a subjective revision of some decisions.

Table 1 shows the synonymy of generic names from de Hoog et al. [10], the most recent taxonomic summary of dermatophytes for 2021. According to modern concepts, 22 species of the genus *Trichophyton* are distributed over three branches of the phylogenetic tree, named after the teleomorphs *T. mentagrophytes* / *T. simii*, *T. benhamiae*, and *T. rubrum* (Table 2). The branches of *T. rubrum* and *T. mentagrophytes* / *T. simii* are of the greatest importance for Russia. Despite the rather long history of the study of these fungi, the boundaries between the species in some cases remain insufficiently clearly delineated.

Table 1. Synonymy of generic names for dermatophytes [10].

<i>Achorion</i> 1845 = <i>Trichophyton</i> 1848 = <i>Trichomyces</i> 1848 = <i>Ectotrichophyton</i> 1919 = <i>Pinoyella</i> 1919 = <i>Megatrichophyton</i> 1921 = <i>Grubyella</i> 1923 = <i>Bodinia</i> 1923 = <i>Langeronia</i> 1950 = <i>Sabouraudiella</i> 1951 = <i>Kaufmannwolfia</i> 1962
<i>Epidermophyton</i> 1907 = <i>Epidermomyces</i> 1983
<i>Langeronites</i> 1957 (nom. inval.) = <i>Nannizzia</i> 1961 = <i>Favomicrosporion</i> 1967
<i>Microsporium</i> 1843 = <i>Closteroaaleurosporia</i> 1924
<i>Arthroderma</i> 1860 = <i>Keratinomyces</i> 1962 = <i>Ctenomyces</i> 1880

Table 2 - Species composition of the genus *Trichophyton*. 22 species are distributed over three phylogenetic clades.

<i>T. mentagrophytes</i> / <i>T. simii</i> clade
<i>Trichophyton equinum</i>
<i>Trichophyton interdigitale</i>
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
<i>Trichophyton quinckeanum</i>
<i>Trichophyton schoenleinii</i>
<i>Trichophyton simii</i>
<i>Trichophyton tonsurans</i>
<i>T. benhamiae</i> clade
<i>Trichophyton benhamiae</i>
<i>Trichophyton bullosum</i>
<i>Trichophyton concentricum</i>
<i>Trichophyton erinacei</i>
<i>Trichophyton eriotrephon</i>
<i>Trichophyton europaeum</i>
<i>Trichophyton japonicum</i>
<i>Trichophyton persicum</i>
<i>Trichophyton spiraliforme</i>
<i>Trichophyton verrucosum</i>
<i>T. rubrum</i> clade
<i>Trichophyton rubrum</i>
<i>Trichophyton soudanense</i>
<i>Trichophyton violaceum</i>
<i>Trichophyton yaoundei</i>

1.3 Genetic diversity of dermatophytes and methods of its description

The variety of signs of dermatophytes allows them to be combined into groups arranged in a hierarchical order [24]. This phenomenon is explained by the origin from a single common ancestor [57-60]. Moreover, the generator of diversity is a continuous mutational process [61]. The most common way to visualize the hierarchical structure of dermatophyte biodiversity is the construction of cladograms [24, 50, 52, 62]. Historically, this was done using a variety of methods, based on morphological and physiological characteristics, and since the end of the 20th century, phylogenetic reconstructions based on DNA sequences have been introduced into practice. Since the relationship between morphological, physiological, and proteomic characters and hereditary material is not rigid [31, 63-65], it is DNA sequences that are most suitable for studying the organization of biodiversity. For the same reasons, it is taxonomy based on genetic characteristics that is the most reliable basis for discussing the properties of fungi of the genus *Trichophyton* that are significant for practice. At the same time, properties of micromycetes that are significant from a practical point of view, such as pathogenicity, drug resistance, epidemiological source, often correlate with taxonomic affiliation. Detailed molecular genetic characterization aimed at isolating intraspecific genetic lines allows tracing the pathways of infection.

The genome of dermatophytes is a complex heterogeneous system, and consists of regions with different structures and different functions [28, 66]. The main functional classes of genomic regions include protein and RNA-coding genes, transposons, and the group of other genetic sequences, which, among other things, includes repeats of large segments and microsatellites, that is, repeats with 1-6 base pairs per unit [67]. Mutational changes accumulate in different areas at different rates. Exons of cytoskeletal proteins, ribosomal RNA genes change very slowly. Introns of protein-coding genes and internal transcribed rDNA spacers are moderately rapidly mutating sequences. Microsatellite loci are less conservative, their rate of mutation is estimated to be between 10^{-2} - 10^{-6} events per locus per cell division [67]. The rate of occurrence of

point mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* per averaged DNA region of 100 bp. is approximately from 3.3×10^{-6} to 1.7×10^{-8} mutational events per division [68-70]. Slowly evolving nucleotide sequences are used to reconstruct phylogenetic relationships between large taxa. Their variability may not be enough to distinguish between species, for which often mutating loci are used. Sometimes the latter are also suitable for typing strains. On the other hand, erosion of the phylogenetic signal occurs in rapidly evolving sequences due to successive nucleotide substitutions in the same positions [71].

The visualization of the genetic diversity of dermatophytes can be carried out based on the results of calculating the genetic distances. For example, when studying the structure of a population of micromycetes using microsatellite analysis, genetic distances can be expressed in terms of the sum of the differences in the lengths of PCR products for microsatellite loci, normalized to the total number of studied loci [72]. The disadvantage of this approach is the dependence of the contribution of individual loci on the number of nucleotides per repeat unit, since a single insertion or deletion of a locus with a longer repeat unit length will have a greater contribution to the resulting differences between alleles. Therefore, in our work, we used distances expressed in the probabilities of mutational events described using a stepwise mutation model [73].

An alternative approach to visualizing genetic diversity is based on calculating the probability of evolutionary scenarios using various models of nucleotide substitutions (maximum likelihood method). Among the best known models are the JC69 Jux-Cantor model [74], Kimura's two-parameter K2P model [75], and the generalized symmetric GTR model [76]. The JC69 model is based on the assumption that all four nucleotides occur in a nucleotide sequence with equal frequency, and that all types of nucleotide substitutions occur with the same probability. Kimura's two-parameter model distinguishes between the probabilities of transitions and transversions, the GTR model independently considers the rates of all six single-nucleotide substitutions, and takes into account the unequal representation of nucleotides in the sequences. When carrying out phylogenetic reconstruction by the

maximum likelihood method, the models of nucleotide substitutions are used to estimate the probability of trees. This method is widespread at present due to the high reliability of the results obtained, and therefore was used in this work to study the phylogeny of fungi belonging to the genus *Trichophyton*.

Cladograms have an innate property to represent the connection between two nodes in a single way. As a consequence, even if the nucleotide sequence alignment contains positions supporting different topologies, only one will be rendered. The bootstrap analysis method is widely used to assess the reliability of branching [77]. Its essence lies in the construction of a set of trees (usually 100 or 1000) on incomplete datasets. In this case, the branches of the tree built on the complete dataset appear in the resulting sample with a certain frequency, which is the level of support. However, the level of bootstrap support can be high even for unreliable branches [78]. To solve this problem, a method of phylogenetic networks was developed [79], which allows visualizing all connections between sequences in alignment. A promising direction for improving phylogenomic methods is the rejection of alignments of nucleotide sequences, which significantly reduces the computational time and labor intensity of the analysis [80].

One of the key problems in biology is the problem of the species [81-83]. In the era of the development of computational approaches in biology, methods have become widespread that allow, based on mathematical models, to break a sample of nucleotide sequences into species groups. An example is the method for constructing trees in the ASTRAL program, based on the coalescence model [84]. The defining property of this model is the assumption of a plurality of topologies. The ASTRAL program takes a sample of trees as input, and returns one final topology, which is often called "a species tree" [85]. So-called "computational species delineation" methods work with nucleotide sequence alignments. The approach for automatic determination of the barcode gap ABGD [86] includes calculating the distribution of genetic distances in the sample and dividing the sample based on the identified barcode gap. The PTP (Poisson Branching Processes) method is based on a speciation model that includes a mutational process.

The accumulation of mutations, including those entailing speciation events, occurs according to the Poisson distribution. Two classes of Poisson processes associated with the rate of speciation relative to the number of nucleotide substitutions and with the description of branching within species clusters are plotted on a cladogram; the analysis result is characterized by a log likelihood score [87].

The typing of micromycete strains using microsatellite analysis includes the amplification of tandem repeat loci with a repeat unit length of two to six base pairs, followed by determination of the lengths of these loci using capillary electrophoresis in the presence of molecular weight standards [88]. As a result, each isolate is characterized by a set of numbers, based on which genetic distances are calculated. The most advanced approach to calculating genetic distances was probably proposed by Bruvo et al. [73]. The proposed distance measure is a derivative of the probability and takes into account not only allelic matches, but also the distance between alleles of the same locus. Bruvo's distances between two alleles are calculated as $d = 1 - 2^{-|x|}$, where x is the number of repeats by which the alleles differ. The distances are calculated for all combinations of alleles of one locus, after which the minimum average distance between the combinations of alleles is taken as the distance for this locus. The distance between isolates is the average of the distances between the loci.

The association index was originally developed by Brown et al to analyze the population structure of wild barley [89]. It is widely used as a tool for detecting clonal reproduction in populations. Sexually reproducing populations produce gametes through meiosis and thus shuffle alleles. In clonal populations, reproduction occurs through mitosis, and the change in genotypes in this case is associated with a mutational process. The mutation rate varies from species to species, but is rarely high enough to come close to random shuffling of alleles. When calculating the association index, the ratio of the variance of the number of differences between individuals and the sum of these differences for each locus is determined.

The appointment of antimycotic therapy in most cases requires knowledge of the species of the pathogen, primarily due to differences in the profiles of the MIC of drugs

[90,91]. The possibility of direct detection of resistance mechanisms in micromycetes during routine diagnostics by molecular methods is more the exception than the rule. The fungus responds to the selective effect of antimycotics with mutations in many regions of the genome [92] and there are examples when the discovery of new resistance mechanisms [93] called into question the applicability of previously developed test systems focused on the direct detection of functional mutations [94]. However, often not only resistance, but a whole range of other interesting properties of a strain can be associated with its genotype, which makes it relevant to systematize knowledge in this area.

An epidemic of dermatomycosis caused by *Trichophyton mentagrophytes* is developing in South Asia [95]. This fungus can be simultaneously identified and typed by the sequences of the ITS region [96]. The problem of resistance has been registered in strains of one specific genotype, found exclusively in Asia and Oceania, which can potentially save the time required for testing for resistance using standard phenotypic methods. An alien case of the disease caused by a fungus of this genotype has been described in the Russian Federation [45]. In general, the genotype of *Trichophyton* sp. can be associated with the geographical source of the isolate (*T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*), drug resistance (*T. mentagrophytes*), epidemiological source of infection (*T. interdigitale*), clinical picture of the disease (*T. mentagrophytes*, *T. interdigitale*).

Thus, to date, enough data has been accumulated that testify in favor of the introduction of typing methods for micromycetes in routine diagnostics. Rapid identification of resistant genetic lines of pathogens can help in the appointment of effective therapy. It is also a way to improve understanding of the epidemiology of fungal diseases. Therefore, there are promising studies aimed at comparing the effectiveness of the use of various molecular methods of typing strains.

1.4 Genetic diversity in the *Trichophyton mentagrophytes* / *T. interdigitale* species complex

According to classical concepts, the morphological species *Trichophyton mentagrophytes* contains zoophilic and anthropophilic forms [97]. Studies using DNA sequencing have shown the heterogeneity of this group. Within the framework of the modern classification, zoophilic representatives of the morphological complex are assigned to the species *T. simii*, *T. benhamiae*, *T. quinckeanum*, *T. erinacei*, *T. europaeum*, *T. japonicum*, *T. mentagrophytes*, and anthropophilic ones - *T. interdigitale* [10, 32]. In this work, *T. mentagrophytes* and *T. interdigitale* were studied in the modern understanding, developed primarily from the results of studying the sequences of the region of the internal transcribed rDNA spacer, ITS. Analysis of the sequences of the ITS region of *T. mentagrophytes* and *T. interdigitale* deposited at the GenBank revealed a total of 17 genotypes represented by at least three records and deposited from at least two different countries [98]. For scientific communication, there is a classification of the genotypes of the ITS region, in which they are conventionally designated by Roman numerals and asterisks [96, 99]. The genotypes of both fungi form a continuous series of variability, and the species complex can be considered as a single phylogenetic species [98]. On the territory of the Russian Federation, the *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* complex is represented by at least five genotypes, some of which are associated with specific clinical manifestations and geographic regions [53, 96]. The most common are probably the isolates with the ITS Type II sequence, traditionally referred to as *T. interdigitale* [3].

The main factor influencing the structure of the population is the mode of reproduction. There are a number of serious obstacles to free crossing of *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* isolates. First, for the passage of the sexual process, soil is needed. Therefore, crossing is available primarily for fungi parasitizing animals leading a burrowing lifestyle [25]. Second, there are physiological barriers. Type II isolates are unable to breed with testers of the opposite mating type [100]. In general, there is no clear line between clonality, reproduction not accompanied by the

recombination of genetic material, and panmixia. When considering various types of fungi, one can see a gradient in the severity of barriers to recombination [101], in which the extreme states are practically not represented. Therefore, some authors propose to define clonality not as a complete absence of recombination, but as its insufficiency in order to disrupt the clonal pattern of the population structure [102]. Within the framework of this concept, a population is considered clonal if a phylogenetic signal is well expressed in it, and a nonrandom mutual distribution of alleles of different loci is observed, denoted by the term "linkage disequilibrium" [103, 104].

According to the modern concept, *T. mentagrophytes* is a zoophilic, sexual species. *Trichophyton interdigitale* is anthropophilic and asexual [10]. Obviously, this division implies an understanding of the structure of the *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* population. It is based on two landmark experimental works. In the first of them [20], polymorphism of the ITS region of isolates similar in morphology to *T. mentagrophytes* and their epidemiological source were associated. In the complex *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale*, designated according to the then accepted nomenclature as *T. interdigitale*, isolates Type I and II were the etiological agents of mycosis of the feet and onychomycosis in 88% and 97% of cases. The type *T. interdigitale* strain CBS 428.63 belonged to one of these anthropophilic genotypes. Type III isolates were mainly of veterinary origin or were associated with mycosis of human smooth skin. Thus, it was shown that mycosis of smooth skin and mycosis of the feet / onychomycosis are caused by strains of different epidemiological origin. Indeed, an analysis of the sequence annotations of the ITS region from the GenBank, carried out in early 2019, confirmed the association of Type II isolates with mycosis of the feet and onychomycosis [96]. In the same work, Type V isolates described in cats [105], sheep [106], horses [107] were associated with mycosis of smooth skin.

The second landmark study, the results of which formed the basis of the modern taxonomic scheme of the *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* complex, was devoted to the problem of the species belonging of zoophilic and anthropophilic anamorphs [100]. In order to answer this question, the authors carried out DNA sequencing for the ITS

region and the 28S rDNA locus of the collection of European isolates. Type II isolates, isolated from the pathogenic material of patients with mycosis of the feet and onychomycosis, were stimulated by Type III* testers, but the resulting hymenotations did not contain asci with spores. Three studied by Symoens et al. isolate Type II* belonged to both types of mating, when crossed with testers, they formed hymenotations with spores and were attributed to the "zoophilic form of *T. interdigitale*", which is interpreted as in the modern sense as *T. mentagrophytes*. Thus, the "anthropophilic *T. interdigitale*", all isolates of which were of the mating type (+), was characterized as a separate asexual species associated with humans, as opposed to the sexual "zoophilic *T. interdigitale*".

There is a lot of data that does not fit into the outlined scheme. Already in a study by Symoens et al. [100] two strains carrying the genotype ITS GU646879 not known from other studies, isolated in Switzerland from humans and from dogs, which were mating (+), did not form fertile hymenotations when mated with testers, which probably indicates the presence of physiological barriers for sexual reproduction. In Senegal, a Type II isolate was found that caused mycosis of the scalp [108]. In a Mexican series of 55 Type II isolates, only 5 were isolated from cases of mycosis of the feet and onychomycosis, which is 9%. The remaining 91% of isolates were found in cases of mycoses of the smooth skin and scalp [109]. The ITS Type II and Type II* sequences differ by the same nucleotide substitution, which may be sufficient to discuss their differences. For example, the same difference exists between the ITS of the fairly well delineated *T. tonsurans* and *T. equinum* [33, 110]. On phylogenomic trees, the sequences of isolates Type II and II* branch together and form a separate branch in the crown of the *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* clade [98]. Moreover, according to our unpublished data, isolates of the mentioned genotypes are practically indistinguishable by non-coding sequences. For basally branching isolates of the Indian genotype VIII, extremely low genetic diversity, one type of mating (+) [111], and effective anthropophilic transmission [45, 99] were shown. Thus, it is necessary to revise the

current understanding of the population structure of the *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* complex.

1.5 Genetic diversity of the species *Trichophyton rubrum*

The most common dermatophytes belong to the *Trichophyton rubrum* complex; it includes phenotypically diverse organisms with different clinical, cultural, morphological and physiological characteristics that were previously known by several names, such as *T. circonvolutum*, *T. fischeri*, *T. fluviomuniense*, *T. glabrum*, *T. gourvilii*, *T. kanei*, *T. kuryangei*, *T. megninii*, *T. pedis*, *T. raubitschekii*, *T. rodhainii*, *T. soudanense*, *T. violaceum*, and *T. yaoundei* [10]. Based on the insignificance of differences between taxa of anthropophilic dermatophytes at the molecular level, Gräser et al. synonymized most of these names with *T. rubrum* or *T. violaceum* [112]. *Trichophyton violaceum*, the main causative agent of mycosis of the scalp, is a slow-growing, poorly sporulating organism first described by Sabouraud in 1902. Eight years later, a fast-growing, abundantly sporulating *T. rubrum* was described, which is responsible for mycoses of the feet and smooth skin [113]. Most of the species names in the *T. rubrum* complex were subsequently introduced to describe phenotypic variation. De Hoog and colleagues presented an overview of dermatophytes based on the results of multilocus sequencing, including ribosomal DNA (rDNA) sequencing with internal transcribed spacer (ITS), a 28S RNA fragment of the large ribosome subunit (LSU), tubulin, and 60S L10 rDNA. The results obtained indicated that, from the point of view of molecular phylogeny, *T. violaceum* is practically indistinguishable from *T. rubrum* [10, 114]. Another study showed that *T. rubrum* and *T. violaceum* are in the same ITS1 homology group [115]. Gräser et al. [112] assessed the validity of all taxa in the *T. rubrum* group with existing type material. They used a combination of morphological, physiological and molecular techniques, including ITS region sequencing, PCR fingerprinting, and amplified fragment length polymorphism (AFLP). Based on the results of this work, it was proposed to consider the entire diversity of phenotypes and genotypes of the fungi of the complex within the framework of two

species, *T. rubrum* and *T. violaceum*. Analysis of *T. rubrum* diversity using the randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) method revealed 40 different patterns in 55 isolates [116]. For PCR fingerprinting, a primer (GACA)₄ was used, which made it possible to identify the species-specific profile of *T. rubrum*. However, this method was unable to detect differences in the *T. rubrum* complex [117]. In a study of 96 strains from four continents using PCR fingerprinting, AFLP, and random amplification of monomorphic DNA (RAMD), it was concluded that *T. rubrum* is clonal, which indicates the rapid global spread of the pathogen [118]. A recent study using genome-wide analysis has also illustrated the global clonal population structure of *T. rubrum* [19]. Ohst et al. [16] and Gräser et al. [17] found four polymorphic alleles in the microsatellite marker *T. violaceum* and *T. rubrum* T1, which were significantly associated with geographic origin. MALDI-TOF mass spectrometry has become popular for routine fungal identification and has an accuracy rate of 13.5 to 100% for dermatophytes [119]. *Trichophyton violaceum* and *T. rubrum* were also identified using MALDI-TOF MS [120]. Packeu et al. [11] included more strains of *T. soudanense* and allocated it to the third group according to MALDI-TOF mass spectrometry and sequencing of the ITS region. The data presented above demonstrate obvious molecular variability in the *T. rubrum* complex, largely consistent with clinical characteristics and geographic distribution [121].

ITS sequencing data of Su and co-authors [31] show the existence of three species in the *Trichophyton rubrum* complex. Although physiological, morphological, geographic data, MALDI-TOF mass spectrometry data, or AFLP data, collectively or separately, were not uniquely diagnostic, various statistically significant trends were found. In this study, a sample of isolates of the *T. rubrum* complex was divided into three groups containing the type strains *T. violaceum*, *T. soudanense*, and *T. rubrum*. The three names mentioned are the oldest epithets in the groups, which makes them valid names. Group 1 contained the type *T. yaoundei* strain from Congo. The authors of the article believe that additional research is needed to consider this group of strains as an independent species. Group 3 contained the type strains *T. fischeri*,

T. fluviomuniense, *T. kanei*, *T. raubitschekii* and *T. rodhainii*, which, therefore, can be considered as confirmed synonyms for *T. rubrum*. *T. violaceum* and *T. soudanense* are most commonly found on the scalp, while *T. rubrum* is most common in cases of mycosis of smooth skin. The geographical origin of the strains is quite difficult to trace due to the increase in travel and human migration. Disregarding isolates from western countries, *T. rubrum* and *T. violaceum* were found to have a global distribution, while *T. soudanense* is restricted to Africa. *T. soudanense* infections reported in the United States have also been observed in patients of African descent [122]. In general, colonies of *T. violaceum* and *T. soudanense* are smooth and grow more slowly than those of *T. rubrum*. Most isolates of *T. violaceum* lack the microconidia commonly found in *T. soudanense* and *T. rubrum*. Reflexive branching is another diagnostic marker, as it is very characteristic of *T. soudanense* and rarely or never occurs in the other two species. Macroconidia are found only in *T. rubrum*, but since they are easily lost after repeated reseeded, this phenotypic trait is of limited importance. Most colonies of *T. violaceum* are cream-colored, *T. soudanense* is yellow-orange, and *T. rubrum* is brown. A naphthaquinone derivative, xantomegnin, the main pigment synthesized by members of the *T. rubrum* complex, was first isolated from the strain identified as *T. megninii* and then from other strains of the complex [123-125]. It can also be found in human skin and nails infected with *T. rubrum* [126]. The pH-reversible pigment xantomegnin is the main pigment responsible for the observed colony colors. The darker shades of *T. rubrum* are possibly associated with higher metabolic activity, resulting in higher ammonium production and alkaline pH. Almost all analyzed strains were positive for urea hydrolysis at 24 °C, indicating urease gene expression. It has been reported that urea broth and agar are not useful for identifying species within the *T. rubrum* complex, although *T. rubrum* tends to hydrolyze urea more slowly than *T. mentagrophytes* [127]. Urease activity should not be considered as a differentiation criterion for *T. rubrum* var. *raubitschekii*, since both taxa showed positive results [128]. Hydrolysis of Tween 80 is used as an indicator of lipolytic enzyme production. Lipases can be associated with various types of dermatophyte penetration into the hair. *Trichophyton violaceum* and

T. soudanense mainly cause ringworm of the scalp. Smooth skin and scalp differ in the size and thickness of the hair, as well as the abundance of sebaceous glands, which secrete oily material into the hair follicles. According to the Tween 80 test, *T. violaceum* has a higher lipolytic capacity than other species. It is likely that *T. rubrum* on smooth skin is directly involved in the degradation of the skin epidermis, while *T. violaceum* and *T. soudanense* grow into the hair follicle through the sebaceous gland, entering the central layer of the hair, which is richer in lipids. This hypothesis is consistent with the fact that the most common type of hair infection caused by the latter species is endotrix, resulting in the short, broken hair that is clinically seen in scalp tinea. The reduced hydrolysis of Tween 80 in *T. soudanense* may be associated with the drier hair type prevalent in Africa; however, this assumption requires further experimental confirmation. *T. violaceum* is thought to be more likely to affect children than adults because of the possible fungistatic activity of long-chain fatty acids in sebum secreted by the sebaceous glands, which increase with age. In addition, a higher incidence of ringworm in children may also be associated with underdeveloped immunity. The dual function of sebum in fungal infections requires further study. Microscopic examination of hairs infected with *T. violaceum* reveals endotrix accompanied by multiple fungal spores within the hair, although this species does not usually sporulate in vitro. Negative results of the hair perforation test for all strains of *T. violaceum* studied indicate that in vitro these fungi are incapable of degradation of the keratinized hair cuticle in order to reach the softer core part [127]. *Trichophyton rubrum* showed the highest degradation of azure keratin, which was absent or weak in other species. The proteolysis test for keratin chemically modified with an azure dye was first performed on fungi by Scott and Unterainer [129], who reported that *T. rubrum* was able to induce a weak dye release after 6 weeks. Most *T. rubrum* strains showed blue dye release after 1 month of incubation, and almost half of *T. violaceum* strains and one third of *T. soudanense* strains showed limited ability to degrade keratin. It was confirmed that the nonspecific serine proteases subtilisin 3 (Sub3) and Sub4, found in *T. rubrum* culture supernatants [130], degrade azure keratin, and both were predicted to be expressed in *T. rubrum* and

T. violaceum using genome-wide analysis [131]. The expression of keratinases such as Sub3 and Sub4, and the accompanying degradation of keratin, appear to be quite different within the same species. MALDI-TOF mass spectrometry was able to separate the majority of *T. violaceum* strains from *T. rubrum* and *T. soudanense*, but had insufficient discriminatory ability to unambiguously distinguish *T. rubrum* from *T. soudanense* [31]. A study of dermatophyte identification using MALDI-TOF mass spectrometry showed that inclusion of *T. soudanense* in the database could potentially lead to incorrect identification of *T. rubrum* [132]. AFLP genotyping revealed a high degree of similarity between groups of sequences in the ITS region. Approximate AFLP groups have been identified based on common profiles sorted by UPGMA clustering of common profiles. *Trichophyton violaceum* contained strains segregated across all AFLP patterns, confirming the ancestral position, as noted in the ITS data, for *T. rubrum* and *T. soudanense*, which shared common profiles. The derived characteristics of *T. rubrum* may explain the low performance of MALDI-TOF mass spectrometry described above, with *T. rubrum* showing 43.9% discrepancy, while *T. soudanense* and *T. violaceum* are recognized in the vast majority of cases. Generally, *T. violaceum*, *T. soudanense* and *T. rubrum* show consistent differences in independent parameters of clinical signs, morphology, physiology, and genetics, although none of these parameters are strictly diagnostic. The combination of phenotypic differences and clinical predisposition in the absence of sexual reproduction indicates that these are separate entities undergoing sympatric speciation, but with a pronounced phenomenon of incomplete sorting of lines, as was also observed in other slightly divergent dermatophytes [33]. Species with a 90% confidence level cause various types of infections and exhibit excellent colony morphology and microscopic features. Physiological tests for keratin degradation and lipolysis indicate differences in ecological specialization, but are not suitable as identification criteria, and AFLP and MALDI-TOF mass spectrometry do not have sufficient discriminatory power to reliably distinguish all species. According to the conclusions of Su et al. [31], DNA sequencing in the ITS region is the gold standard of diagnosis. For laboratories without access to sequencing capabilities, clinical

manifestations can be combined with morphological characteristics of strains for identification. *Trichophyton violaceum* and *T. soudanense* are the most common causes of ringworm of the scalp. The difference between *T. violaceum* and *T. rubrum* by the ITS barcode marker is 6 bp. (1.06%), which exceeds the generally accepted limit that can be taken as different species. Genetic differences with *T. soudanense* are less, but its endemism in North Africa as the cause of mycoses of the scalp, supplemented by its phenotypic differences, makes this distinction clinically significant.

While *T. rubrum* is the predominant species causing skin and nail infections in Europe, others such as *T. violaceum* and *T. soudanense* are predominant in the arid climates of western China, Africa and the Middle East, mainly causing hairy mycosis. parts of the head [2]. Jean et al. [4] noted that molecular differences even between these major species were insignificant. However, there are significant differences in the clinical picture of infections, morphological characteristics, geographic origin and microsatellite markers, while phylogenetic analysis shows that the relationship between these species is more complex. In particular, the status of *T. soudanense* as a possible synonym for *T. violaceum* is discussed [26]. De Hoog et al. [10] accepted *T. soudanense* as a species and neotyped it (IHEM 19751), but also noted that this species may be indistinguishable from *T. violaceum*. Both species share the same common sites of isolation, i.e. scalp and hair, but show distinct differences in morphology and different geographic distribution. While *T. violaceum* is considered the main causative agent of tinea head disease in the Middle East and East Africa, *T. soudanense* is predominantly found in West African countries such as Mali and Senegal. Along with human migration, these two species are also responsible for outbreaks of mycosis of the scalp in several European countries [133].

Ohst et al. [16] questioned the previously proposed synonymy of *T. soudanense* and *T. violaceum* [112]. According to microsatellite data, *T. soudanense* and *T. gourvilii* isolates are grouped with *T. rubrum* rather than *T. violaceum*. In a later study, Gräser et al. [17] designated *T. soudanense* isolates as part of the African population of *T. rubrum*. In reports of cases of mycoses of the scalp from New Zealand [134], USA

[135], Mali [136] and Italy [137] *T. soudanense* and *T. violaceum* were (morphologically) identified as different pathogens. This illustrates their distinctive phenotypes and the widespread acceptance of the concept of both species in the medical community. Several studies have already confirmed that the ITS gene region provides sufficient phylogenetic resolution to support various clones within the genus *Trichophyton*. The addition of β -tubulin sequence data does not provide additional support [10, 114, 138, 139]. This was also the case in our results, where the β -tubulin partial sequence data provided insufficient resolution to be able to detect only two lines. The ITS sequence data obtained in this study show three main groups, which are interpreted as *T. rubrum*, *T. soudanense* and *T. violaceum*. One substitution and at least one indel separates the yaoundei strains from the *T. violaceum* clade. The *T. yaoundei* group shows a homogeneous phenotype (white colony front and very slow growth). Sequence clustering of the ITS region, carried out by the maximum likelihood method, does not allow distinguishing strains of the *T. soudanense* line depending on the presence of a 37 base pair deletion in ITS1, which is in agreement with the results of phenotypic analysis and the results of MALDI-TOF mass spectrometry. In contrast to the work of Gräser et al. [112], the strain previously identified as *T. circonvolutum* (CBS 286.30) was assigned by Su et al. to the *T. soudanense* lineage. Analysis of the haplotype network showed that *T. soudanense* occupies an intermediate position between *T. rubrum* and *T. violaceum*, each with its own specific phenotypic tendencies [31]. Most isolates of *T. soudanense* are yellowish-orange, produce microconidia, and have hyphae with reflexive branches; other strains exhibit at least a combination of two of these traits. The *T. violaceum* strains are characterized by purple or brown pigmentation after the initial cream color and the absence of microconidia. Reflexive hyphae may be present and sometimes the underside of the colony remains creamy. In this study, two strains of *T. violaceum* could be mistakenly identified as *T. soudanense* based on morphology: IHEM 25555 and IHEM 4887 produced microconidia and had reflex hyphae. All strains of the yaoundei clade grew extremely slowly and produced cultures with a white front and yellowish-orange whorl, in the absence of microconidia

and reflexive hyphae. None of these strains turned purple. Four strains of the *kuryangei* clade produced white cultures with a tan back and, like *T. rubrum*, reflexive hyphae were absent, while microconidia were often abundant. Morphologically, strains from the *kuryangei* clade are difficult to distinguish from some strains of *T. rubrum*. Four strains of the *kuryangei* clade have been isolated from cases of mycoses of the scalp, while *T. rubrum* is usually isolated from dermatophytosis of smooth skin such as tinea pedis or tinea corporis. Analysis by Su et al with a MALDI-TOF mass spectrometer identified these strains as *T. rubrum* or *T. soudanense*. De Hoog et al. [10] and Jean et al. [114] consider *T. kuryangei* to be a synonym for *T. violaceum*, but phylogenetic analysis, supplemented by the construction of haplotype networks in the work of Paque et al. [11], suggest a closer relationship with *T. soudanense*. Obviously, this issue should be investigated in more detail by adding more *T. kuryangei* reference spectra to the database. While Varshavsky and Aiello [140] considered *T. kuryangei* and *T. megninii* as synonyms, *T. megninii* is currently considered a synonym for *T. rubrum*, despite the absence of type material [10, 112]. In general, at the species level, the *T. rubrum* complex contains at least four genetic lines with a characteristic phenotype and identified by MALDI-TOF mass spectrometry, including *T. violaceum*, *T. rubrum* s. str., *T. soudanense* and *T. yaoundei*.

The bulk of the work on the intraspecific genetic diversity of the fungus *T. rubrum* was based on the PCR method for the TRS-1 and TRS-2 loci of ribosomal DNA containing secondary nucleotide repeats [141]. The method was initially tested on 101 fungal isolates from Europe, Africa and Asia. It was used to describe 21 patterns of distribution of PCR products at the TRS-1 locus and 11 PCR patterns at the TRS-2 locus. The combination of loci gave 23 types of strains [141]. At the same time, reports on subsequent studies using the method under consideration on a local sample of strains contain information about a much lower diversity. Thus, typing of 67 *T. rubrum* isolates from Brazil revealed three patterns of distribution of PCR products at the TRS-1 locus, two for TRS-2, and four in total [142]. A study of 30 strains from Poland found five, three, and seven patterns, respectively. The discriminatory typing power for TRS loci in

this study was 0.478 [143]. In St. Petersburg, a sample of 50 isolates was even less diverse, with a discriminatory power of 0.180. The clonal diversity index was 0.163 [144]. One of the important findings based on the study of the TRS loci polymorphism is the detection of up to three *T. rubrum* genotypes in seeding from one affected nail [145]. Only single strains were found in lesions of the skin of the feet caused by *T. rubrum* [146]. Also, no differences were found between strains isolated from different parts of the body of the same patient [142].

Work based on microsatellite analysis has contributed to the understanding of the distribution of the fungus *T. rubrum* across the globe. The typing scheme developed by Yvonne Gräser's group allowed us to identify two independent populations of the fungus in a global sample of 236 isolates and conclude that the supposed natural habitat of *T. rubrum* is in Africa, and the further path of the pathogen to Europe and North America lay through Southeast Asia [16.17]. However, if we pay attention to the sample studied by these authors, it turns out that the African isolates present in it belong to the *T. soudanense* species. Indeed, this typing scheme turned out to be ineffective for working with isolates of *T. rubrum* sensu stricto from China, for which it was necessary to select a new set of loci [18]. 234 Chinese isolates were distributed over two populations, members of which were found in all 11 cities studied. No correlation was found between the genotype and the disease caused. Interestingly, the discriminatory power of the used microsatellite markers was very high and amounted to 0.993.

Despite the presence of a significant body of work on the genetic diversity of *T. rubrum*, the question of the presence of genetic lines within the population of *T. rubrum* s. str., which could be identified by a set of independent typing methods, is still open.

2 MATERIALS AND METHODS

In the present work, a total of 151 dermatophyte isolates were studied by phenotypic and molecular genetic methods, including 26 strains of fungi of the *Trichophyton* genus from the Russian collection of pathogenic fungi, 105 clinical isolates isolated from patients with onychomycosis at the clinic of Kashkin research institute, St. Petersburg, as well as 20 clinical isolates obtained from patients with onychomycosis in the laboratory of the State Budgetary Healthcare Institution of the Sverdlovsk Regional KVD, Yekaterinburg. Clinical isolates of dermatophytes were obtained in 2015-2018 by sowing pathogenic material on Sabouraud agar with the addition of 2% glucose.

2.1 Phenotypic methods

Clinical isolates and collection strains of dermatophytes were incubated on Sabouraud agar with the addition of 2% glucose in dry air thermostats at 27 °C. The study of micro- and macromorphology was carried out on two-week cultures using an Axiostar Plus microscope (Carl Zeiss, Germany). Comparative results of phenotypic identification and DNA sequencing are shown in Figure 1.

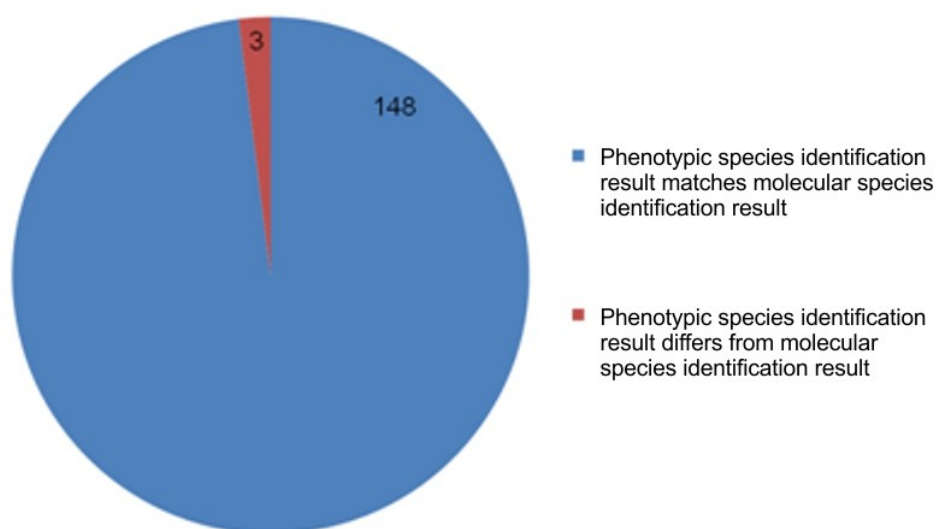


Figure 1. Comparative results of species identification by phenotypic and molecular genetic methods.

2.2 Molecular genetic methods

2.2.1 DNA isolation

Two methods were used to obtain gDNA preparations. The material was 1 mm 3 aerial mycelium of the fungus. The first method for DNA isolation is precipitation with a mixture of chloroform and isoamyl alcohol. In a 1.5-ml tube with 450 μ l of lysis buffer (20 mM Tris / HCl pH 8.0, 5 mM EDTA pH 8.0, 100 mM NaCl, 1% SDS) and two glass beads (5 mm) were introduced the material, then shaken on a homogenizer. Proteinase K was added to a concentration of 50 μ g / ml and incubated at 55 °C for two hours. To the lysate was added 450 μ l of a mixture of chloroform and isoamyl alcohol (24: 1), gently mixed and centrifuged for 10 minutes at 9000 g. The upper phase was transferred to a new tube containing 45 μ l of 3M sodium acetate and 1 ml of 96% ethanol. Gently stirred until a visible precipitate appeared, incubated for 2 hours at a temperature of -20 °C. Then it was centrifuged for 10 minutes at 20,000 g at + 4 °C, the precipitate was washed twice with 0.5 ml of 70% ethanol, dried and dissolved in 50 μ l of distilled water.

The second method is column selections. We used a proprietary GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, Lithuania). Air mycelium with spores was scraped with pipette tips into 1.5 ml tubes containing 350 μ l of lysis buffer A and shaken for 30 seconds on a homogenizer. Added 50 μ l of lysis buffer B and 20 μ l of RNase A. Incubated at 65 °C, shaking occasionally. 130 μ L of precipitating solution was added and mixed by inverting the tube 2-3 times. Centrifuged for 5 minutes at 20,000 g. The supernatant was transferred to a new microcentrifuge tube containing 400 μ l of binding solution and 400 μ l of 96% ethanol, and then vigorously shaken. The resulting mixture was passed through the columns in two stages, adding 600-700 microliters and centrifuging at 6000 g. Then, it was washed with solutions 1 and 2 intended for it, and DNA was eluted twice with 100 μ l of elution buffer. The concentration of the obtained DNA was measured on a Qubit fluorometer (Invitrogen, USA).

2.2.2 Polymerase chain reaction

The reactions were carried out in a volume of 50 μL , amplification of microsatellite loci was carried out in volumes of 25 μL . A standard set of reagents for DNA diagnostics (Syntol, Russia) was used. The reaction mixture consisted of 100 mM Tris / HCl (pH 9.0), 250 mM KCl, 10 mM Tween-20, 2.5 mM MgCl_2 , 250 μM each dNTP. 1 unit was used per 50 μl of the reaction mixture. Taq polymerase. The sequences of the oligonucleotides used in the work are shown in Table 3.

When amplifying microsatellite loci Tr001-Tr008, $\text{Tr}(\text{CT})_{20}$, $\text{Tr}(\text{GA})_{25}$, loci *BT2*, LSU (from primers NL1 and NL4), and the ITS region, 5 pM primers were added per reaction. The TRS-2 locus was amplified with the addition of 30 pM, and TRS-1 with 50 pM primers. When amplifying the TRS-1 and TRS-2 loci, 5 ng of gDNA was added to the reaction mixture; when amplifying the remaining loci, 1-2 μL of gDNA was taken without measuring the concentration. To obtain PCR products of the ITS region and LSU locus using a C1000 Touch thermal cycler (Bio-Rad, USA), after the initial stage of denaturation for 5 min at 95 $^{\circ}\text{C}$, 34 amplification cycles were performed under the following conditions: denaturation for 30 s at 95 $^{\circ}\text{C}$, annealing for 30 s at 56 $^{\circ}\text{C}$ and elongation for 1 min at 72 $^{\circ}\text{C}$. The final stage of elongation lasted 10 min at 72 $^{\circ}\text{C}$.

Table 3 - Oligonucleotides used in this study. Modifications are shown in bold.

Oligonucleotide	Sequence	Reference
ITS5	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'	[147]
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	[147]
NL1	5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'	[148]
NL4	5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'	[148]
BT2a	5'-GGTAACCAATCGGTGCTGCTTTC-3'	[149]
BT2b	5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3'	[149]
TrNTSF-2	5'-ACCGTATTAAGCTAGCGCTGC-3'	[141]
TrNTSR-4	5'-TGCCACTTCGATTAGGAGGC-3'	[141]
TrNTSR-1	5'-CTCAGTCGAACCGTGAGGC-3'	[141]
TrNTSC-1	5'-CGAGACCACGTGATACATGCG-3'	[141]
Tr001_F	5'- FAM -GTGGGCTCGAACCGAGACAAAC-3'	[18]
Tr001_R	5'-GGTGACTGGAGGGTGAAGGG-3'	[18]
Tr002_F	5'- HEX -CTCGCATTTGGCCTTGAGTGT-3'	[18]
Tr002_R	5'-CTGGCTGGTGGAAGGACATAG-3'	[18]
Tr003_F	5'- FAM -GCCAGTGATCCTGCATCGTCC-3'	[18]
Tr003_R	5'-CGGGCTTCTCGTCTTGCTCTTC-3'	[18]
Tr004_F	5'- HEX -CAGGAGGGTAGAAGACGAGAAG-3'	[18]
Tr004_R	5'-AAAGAAAAACAAAGTCAAGCACGC-3'	[18]
Tr005_F	5'- FAM -AAAGTACCTCCTGTTTACCATC-3'	[18]
Tr005_R	5'-GGCATTCCGGGCAGTTGAAGC-3'	[18]
Tr006_F	5'- HEX -TAAGACAGGGATCTCAGAATG-3'	[18]
Tr006_R	5'-CGGAACCGCTACAAGCAGAAT-3'	[18]
Tr007_F	5'- TAMRA -TGGGATACAGCCATGCCGTT-3'	[150]
Tr007_R	5'-CTCAGCCCTACCAGACGACC-3'	[150]
Tr008_F	5'- TAMRA -AGCCCCCAAGGTAGAGGAT-3'	[150]
Tr008_R	5'-GTGCCTGCGCGAAATACGAA-3'	[150]
Tr009_F	5'- HEX -ACGACGATACTGGCTGGACAA-3'	[150]
Tr009_R	5'-GTTATGACTTCCACGGTGTACG-3'	[150]
STR T_{r9} _F	5'- TAMRA -ACACTGCTCTTCGCATCTTGA-3'	[150]
STR T_{r9} _R	5'-GGCTGTTGTTGTTTCGCTGCT-3'	[150]
Tr(CT) $_{20}$ _F	5'- FAM -GCGGTGGCGTCTTCTATC-3'	[17]
Tr(CT) $_{20}$ _R	5'-CAGCAGACAACATAGCAGTCG-3'	[17]
Tr(GA) $_{25}$ _F	5'- HEX -GCGATGGTTGGAGGAGTTG-3'	[17]
Tr(GA) $_{25}$ _R	5'-GCCTGTGCTGCTTACTTG-3'	[17]
TERG_02941_F	5'-CGGCCTCGTTCTGCGTTAAC-3'	[144]
TERG_02941_R	5'-CTTGCCGGCTTCCAAGTCTTT-3'	[144]
TERG_03298_F	5'-GCGAGGAGGACTGGCTGAT-3'	[144]
TERG_03298_R	5'-AAGCACCAGAGCAACAGCAAT-3'	[144]
TERG_02941RT_F	5'-GGCTTACCACGCCCGTC-3'	[150]
TERG_02941RT_R	5'-CCACTTGTCTTGCCGGCTT-3'	[150]
TERG_02941_793A	5'- ROX -TCCGTTTCACTTTGCGAGTGGC- BHQ2 -3'	[150]
TERG_02941_793G	5'- FAM -TCCGTTTCACTTTGCGAGCGGC- BHQ1 -3'	[150]

Conditions of amplification locus *BT2* were as follows: initial denaturation for 5 min at 94 °C, 34 amplification cycles of denaturation for 15 sec at 94 °C, annealing 30 seconds at 60 °C and elongation for 30 sec at 68 °C and the final stage of elongation for 5 min at 68 °C. To amplify the TRS-1 and TRS-2 loci was programmed as follows: initial denaturation for 15 min. at 95 °C, 30 cycles consisting of 30 s at 94 °C, 30 s at either 52 °C (TRS-1) or 55 °C (TRS-2), and 3 min (TRS-1) or 2 min (TRS-2) at 72 °C, and final elongation 10 min at 72 °C. Reaction conditions for the TERG_02941 locus: 5 min at 95 °C, 39 cycles of 30 s at 95 °C, 1 min 5 s at 64 °C, and the final stage 5 min at 72 °C. The TERG_03298 locus was amplified according to a program that included the following steps: 5 min at 95 °C, 39 cycles 30 s at 95 °C, 30 s at 62 °C, 36 s at 72 °C, and the final stage 5 min at 72 °C. Microsatellite loci were amplified according to a program consisting of denaturation for 10 minutes at 95 °C, 30 cycles [50 with 95 °C, 1 min. 58 °C, 1 min. 72 °C] and the final stage of elongation - 10 min. at 72 °C.

For typing *T. rubrum* by SNP TERG_02941 A793G, we selected a pair of primers and probes using TaqMan technology (Table 1). To carry out typing by this method, the following program was used: 95 °C 3 min.; 39 × [95 °C 10 s; 55 °C 30 s]. Examples of the obtained curves of fluorescence signal accumulation are shown in Figures 2 and 3.

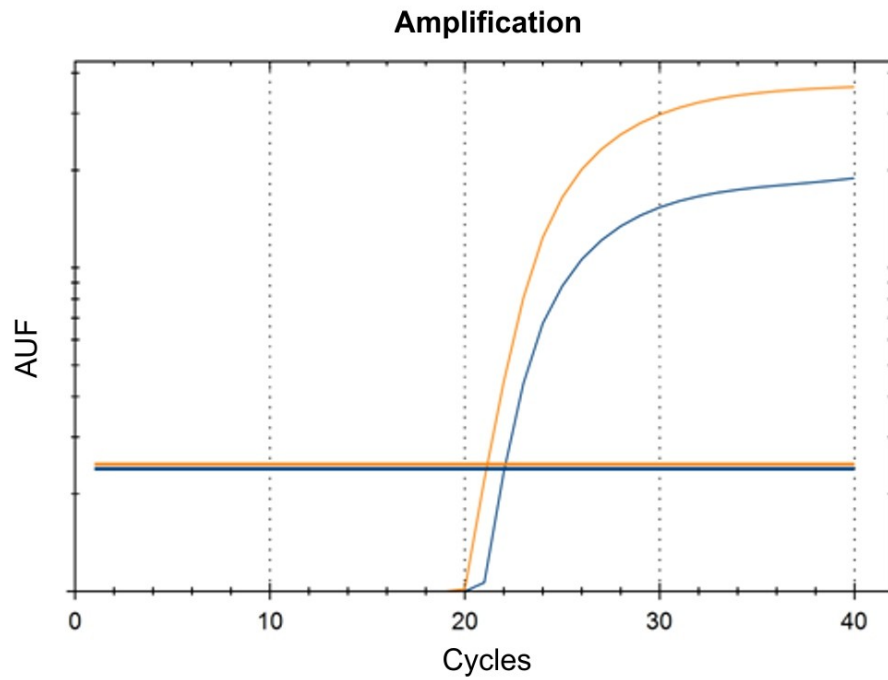


Figure 2. *Trichophyton rubrum*. An example of real-time amplification of the TERG_02941 locus, isolate with genotype 793A.

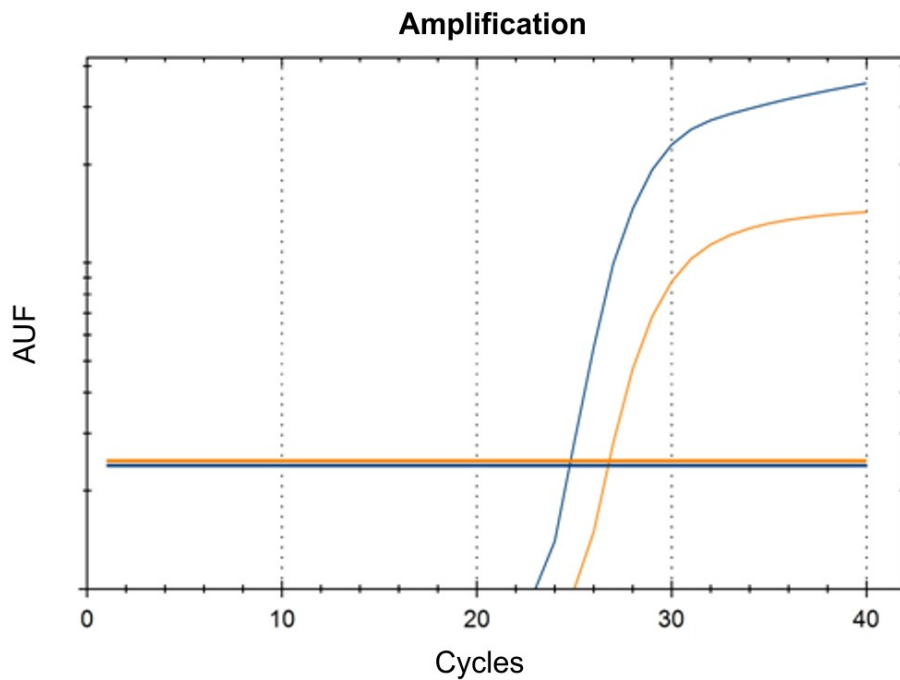


Figure 3. *Trichophyton rubrum*. An example of real-time amplification of the TERG_02941 locus, isolate with genotype 793G.

2.2.3 Sanger DNA sequencing

PCR products for loci *BT2*, *LSU*, *TERG_02941*, *TERG_03298* and the ITS region were purified by precipitation with isopropanol in the presence of glycogen in an acidic medium. The purified amplicons were used in reactions with terminator nucleotides supplied using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, and the products of which were purified by the sorbent method using the BigDye Xterminator Purification Kit (Applied Biosystems, United States). To determine the DNA sequence by the Sanger method, an ABI PRISM 3500 sequencer (Applied Biosystems, USA) was used. Nucleotide sequences were read in forward and backward directions. A list of nucleotide sequences obtained during the study is given in Appendix A.

2.2.4 Working with nucleotide sequences

The number of polymorphic sites was estimated using the SeaView 4.3.5 package [151]. To describe the polymorphism of the ITS region of the *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* (TMTISC) group of species, we used the scheme published by Ninet et al. [152] and developed in [20]. The polymorphism scheme included the reference sequences of the anthropophilic isolates Type I "AF506033" and Type II "AF506036". Zoophilic TMTISC isolates were represented by the following sequences: Type III "AF506034", Type III* "FM986758" and Type IV "AB246678". We used the nucleotide position numbers from the alignment work of Heidemann et al. When discussing nucleotide substitutions. To resolve the issue of the stability of mutations in the ITS region, we passaged the reference strains for six months (RCPF 1207 and RCPF 1278) or a year (strains RCPF 1301, 1261, 1425, 1640), after which DNA isolation and sequencing were performed again. In this case, the newly obtained sequences were identical to the original ones. We also searched for restriction sites in the ITS region of *T. interdigitale* using Genome Compiler 2.2.43 to find out if our typing scheme could be verified by PCR-RFLP and successfully verified the C139T and C460T polymorphisms using the MvaI and MboI restriction enzymes, respectively.

For phylogenetic analysis, the sequences were manually aligned using the SeaView 4.3.5 package. Maximum likelihood cladograms and bootstrap analysis were performed using RaxML 8.1.11. [153], and Bayesian analysis was carried out using MrBayes 3.2.3. [154], distributions of GTR + Γ and 1569 uniquely aligned positions for 50 isolates. The number of gamma rate categories was 25 for RaxML. The best tree produced by two independent RaxML runs with random start trees was rated 1000 bootstrap repetitions. Bayesian analysis was performed with 2 independent runs of 4 MCMC circuits for 10 million generations; the burn in value was 25%. The average standard deviation of the crossover frequencies reached 0.001472 at the end of the launch.

Phylogenetic networks were constructed using the SplitsTree 4.14.6 program [155]. A description of the multilocus datasets used to analyze the interspecies boundaries in the *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* species complex is shown in Table 4.

Table 4 - Description of three multilocus datasets, on the basis of which phylogenetic networks were built.

No.	Reference	Number of isolates	Locus							Length of the alignment, b.p.
			<i>ACT</i>	<i>BT2</i>	<i>CaM</i>	<i>GPD</i>	ITS	LSU	<i>TEF1α</i>	
1	Kawasaki et al. [51]	36	+			+	+		+	1668
2	Rezaei-Matehkolaei et al. [54], Mirhendi et al. [52], Ahmadi et al. [55]	17*		+	+		+		+	2834
3	Pchelin et al. [53]	49		+			+	+		1493

* including additional sequences extracted from the genomes of *Trichophyton* sp. CBS 112371 ABSU00000000, *T. equinum* CBS 127.97 ABWI00000000, *T. mentagrophytes* M8436 FUFL00000000, *T. soudanense* CBS 452.61 AOKW01000000, *T. verrucosum* HKI 0517 ACYE00000000 and *Trichophyton* sp. H6 AOKS00000000.

To obtain detailed information on the known genetic diversity of the genotypes of the ITS region of the fungi of the *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* complex, 16 text searches were performed in the GenBank database, according to the number of described species according to the latest taxonomic scheme [10]. Each search query consisted of a binomen of one particular species of the genus *Trichophyton* and the phrase "internal transcribed spacer". Searches for all species of the genus were carried out with the aim of capturing sequences with erroneously identified species. In order to supplement the sample with records with sequences of the ITS region that do not contain the full phrase "internal transcribed spacer", the Blast tool was searched in the GenBank database for previously selected genotypes of *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* fungi, excluding the results containing the phrase в "internal transcribed spacer". Next, using the puttorights script written in Python (Appendix B), unique database records containing the complete sequence of the 5,8S rRNA gene were selected. after which the alignment and trimming of the nucleotide sequences was carried out (Figure 4). Sequences that did not contain the full ITS region were removed from the sample. Using the compactor script (Appendix C), identical sequences were combined into groups.

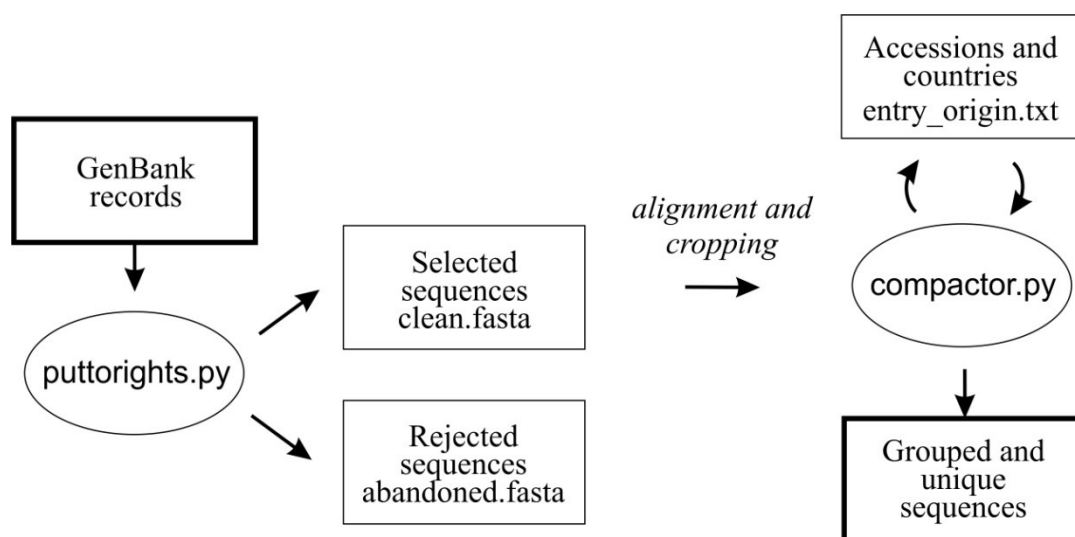


Figure 4. Scheme of preparing nucleotide sequences for analysis using the developed program code. Ovals represent scripts, working files are shown by rectangles. The compactor.py script uses infile.txt to retrieve information about the countries where the laboratories that have deposited the database records are located.

To screen out unreliable genotypes, only those sequences were selected that had been deposited at least three times and at least by laboratories from two different countries. Based on the resulting sample in the PhyML v3.0 program of the SeaView 4.5.3 package, a cladogram was constructed using the maximum likelihood method. The `countriestotable.py` script (Appendix D) was used to bring geographic data into the table. Using the `clinical.py` script, the contents of the `\note`, `\isolation_source` and `\host` fields were written out from the original file with database records in GenBank format. The programming language Python was used to write scripts. The code was typed manually in the Sublime Text 3.1 editor. The correctness of the scripts was checked by viewing the alignments of nucleotide sequences, processing test samples, and searches for representative sequences using the blast tool in the GenBank database. To run the scripts, they were placed together with the necessary working files in separate directories, the `cmd` command was entered into the address bar of the folder, calling the command line, and then the command `"python script_name"` was entered into it, for example, `"python incrustator.py"`. We used Python 3.6.4 for work.

A separate analysis of the GenBank contents was carried out to build a map of the geographical distribution of the *T. mentagrophytes* and *T. interdigitale* genotypes. We searched the GenBank database for the keywords "*Trichophyton* internal transcribed spacer". We also performed a search using the megablast algorithm in GenBank, using the sequence MF926358 [10] as a query. The found sequences were checked for the presence of the conserved sequence of the 5.8S rRNA gene and aligned. Entries that did not contain the full sequence of the ITS region were deleted. When distributing the sequences of the ITS region of dermatophytes *T. mentagrophytes* and *T. interdigitale* by genotypes, we took into account all, without exception, insertions, deletions, and point mutations that are strictly within the boundaries of this region. To designate the genotypes of the ITS region of the fungi *T. mentagrophytes* and *T. interdigitale*, we used the GenBank accession numbers in quotation marks. We accepted the boundaries of the ITS region in the same way as they were deposited in record KT354634 [156],

but did not take into account the conservative CAGG motif at the 3' end of the sequences to expand the sample.

2.2.5 Microsatellite Analysis

The fluorescent products of amplification of microsatellite loci were diluted 25 times with water, subjected to denaturation in 20 µl of formamide with the addition of 0.25 µl of molecular weight standards Red DNA Size Standard (MCLAB, USA) and analyzed by capillary electrophoresis on an ABI PRISM 3500 instrument (Applied Biosystems, USA). Allele sizes were determined using GeneMapper 4.1 software. Based on the lengths of microsatellite loci in the polysat 1.7 package [157] for R 3.4.3 using the method of Bruvo et al. [73], paired genetic distances were calculated, which were then used in principal component analysis. Principal component analysis and visualization of its results were also carried out in the polysat 1.7 package for R.

To expand the panel of loci for microsatellite analysis in the genomic contigs of the CMCC(F)T1i strain, text searches for motifs (GA)₇ and (CT)₇ were performed. A total of 170 loci were found containing data and other types of repeats. The sequences of these loci for 12 strains of *T. rubrum* were aligned in the SeaView 4. When differences of 9 or more repeat units were found between the strains, the sequences of the loci were used for the selection of primers using the Primer-BLAST on-line tool [158].

2.2.6 Whole genome sequencing

For whole genome sequencing, the quality and quantity of DNA was assessed with a Quantus Fluorometer, dsDNA (Promega, Madison, WI, USA). Fragmentation of gDNA to an average length of 500 bp. was performed by ultrasound on an S2 instrument (Covaris, Woburn, MA, USA), according to the manufacturer's protocol. The quality of the obtained gDNA fragments was assessed on a TapeStation 2200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). DNA libraries were prepared using the Kapa HTP Library Preparation Kit (Roche, Wilmington, MA, USA) and sequenced on a MiSeq instrument (Illumina, San Diego, CA, USA) to obtain 250 bp pair reads.

The quality control of the initial readings was carried out with the FastQC program [159]. Low quality reads and TruSeq2 adapters were removed in the Trimmomatic software [160]. The assembly of genomic sequences was carried out de novo in the SPAdes 3.9.0 assembler [161]. Phylogenomic reconstruction was performed using the coalescence model in the ASTRAL-III program [162], as well as by the maximum likelihood method for point mutations in the FastTree2 program of the Harvest package [163]. Information on isolates of *T. mentagrophytes* studied by phylogenomic methods is given in Table 5.

Table 5 - Isolates of *Trichophyton mentagrophytes*, for which whole genome sequences were obtained during the work.

Isolate	Year of isolation	Origin	Clinical picture	ITS region	Whole genome sequence
D15P152	2017	Russia	tinea capitis	MH708282	QQSP00000000
D15P127	2016	Russia	tinea capitis	MH708281	QQSR00000000
D15P156	2017	Moldova	tinea capitis	MH708283	QQSO00000000
D15P135	2016	India	tinea cruris & corporis	KY761968	QQSQ00000000

Also, six whole genome sequences of *T. rubrum* were obtained (Table 6).

Table 6 - Isolates of *Trichophyton rubrum*, for which whole genome sequences were obtained during the work.

Изолят	Year of isolation	Origin	Clinical picture	SRA accession
D15P33	2015	St. Petersburg	Onychomycosis, tinea pedis	SRX6389058
D15P44	2015	St. Petersburg	Onychomycosis	SRX6389060
D15P50	2016	St. Petersburg	Onychomycosis	SRX6389057
D15P62	2016	St. Petersburg	Onychomycosis	SRX6389059
D15P71	2016	St. Petersburg	Onychomycosis	SRX6389062
Y1013	2017	Yekaterinburg	Onychomycosis	SRX6389061

To develop a typing scheme for *T. rubrum* by DNA sequencing and RT-PCR based on single nucleotide polymorphism, we aligned 12 published genomes of the *T. rubrum* fungus using the MUMmer 3.0 software [164] using the NUCmer algorithm. GenBank record for the genome of strain CMCC (F) T1i LHPM00000000, strain CBS

202.88 AOKX00000000, CBS 288.86 AOKU00000000, CBS 289.86 AOKV00000000, CBS 735.88 JHQM00000000, CBS 100081 AOKT00000000, CBS0000 AOKT00000000, CBS0000 AOKV00000000, CBS 100081 AOKT00000000, CBS0000 AOKV00000000 MR1448 AOKZ00000000, MR1459 AOLC00000000. Localization of single mutations at protein-coding loci was carried out using the genomic assembly GCA_001651445.1 of the CMCC(F)T1i strain as a reference. Polymorphic nucleotide positions were annotated in the SnpEff program [165]. Based on the results of verification of the detected polymorphism on local alignments in the SeaView 4 program, the TERG_02941 and TERG_03298 loci were subjectively selected for further study. Primers for amplification of these genomic regions were selected manually, with the calculation of the melting temperature according to Wallace's method: $T_m = 2(A + T) + 4(G + C) + 4$ [166].

2.2.7 Comparison of the resolution of typing methods for *T. rubrum* strains

The resolving power of *T. rubrum* typing methods for the loci of the nontranscribed rDNA spacer and microsatellite analysis was expressed through the ratio of the number of individual genotypes to the sample size. We compared the resolution of the methods using the formula for the clonal diversity index $R = (G - 1) / (N - 1)$, where G is the number of individual genotypes and N is the number of isolates [167].

2.3 Statistical methods

The null hypothesis that there is no relationship between the genotypes of the *T. rubrum* fungus and the locations of lesions on patient's bodies was tested using the chi square test. The calculation was carried out in the R 4.1.2 software environment on a sample of 67 isolates with a unambiguously known localization [150].

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Phenotypic characteristics of *Trichophyton* spp.

To study phylogenetic relationships in the genus *Trichophyton*, we studied 55 strains, including 28 strains from the Russian collection of pathogenic fungi. Their phenotypic characteristics are presented in Table 7.

Table 7 - Phenotypic characteristics of the studied strains of *Trichophyton* spp.

No.	Strain	Upper side of colony, texture	Upper side of colony, color	Lower side of colony, color	Microconidia	Macroconidia
<i>Trichophyton benhamiae</i>						
1	RCPF 1457	Velvety	Whitish-creamy	Brown	Round, pear-shaped	Absent
<i>Trichophyton interdigitale</i>						
2	RCPF 1229	Velvety-fluffy	Whitish-creamy	Light-brown	Round	Absent
3	RCPF 1301	Velvety-fluffy	Whitish-creamy	Cherry-brown	Tear-shaped, pear-shaped	Absent
4	RCPF 1394	Velvety-fluffy	Whitish-creamy	Dark-brown	Round, pear-shaped	Absent
5	RCPF 1404	Powdery	Whitish-creamy	Light-brown	Round	Absent
6	RCPF 1459	Powdery, velvety	Beige	Dark-brown	Round	Absent
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>						
7	RCPF 266	Velvety-fluffy	White	Dark-brown	Pear-shaped, round	Absent
8	RCPF 267	Velvety-powdery	Whitish-creamy	Light-brown	Round, pear-shaped	Absent
9	RCPF 1207	Velvety-powdery	Yellow-whitish	Brown	Round, pear-shaped	Absent
10	RCPF 1261	Powdery	Whitish-creamy	Brown	Round	Absent
11	RCPF 1278	Velvety-powdery	Whitish-creamy	Light-brown	Round	Absent
12	RCPF 1425	Powdery	Yellow-whitish	Dark-brown	Round	Absent
13	RCPF 1640	Powdery	Whitish-creamy	Dark-brown	Round	Thin-walled, smooth
<i>Trichophyton rubrum</i>						
14	RCPF 1280	Velvety	Whitish-creamy	Light-brown	Tear-shaped	Absent
15	RCPF 1393	Coriaceous, velvety	Yellow-whitish	Yellowish-brown	Absent	Absent
16	RCPF 1408	Velvety	Pinky-white	Dark-brown	Pear-shaped, tear-shaped	Absent
17	RCPF 1864	Fluffy	White	Yellow	Clavate, tear-shaped	Absent

18	RCPF 1865	Fluffy	White	Yellow	Clavate, tear-shaped	Absent
19	RCPF 1866	Velvety	Pink-whitish	Dark-cherry	Clavate, tear-shaped	Thin-walled, cigar-shaped
20	RCPF 1867	Velvety	White	Yellow, cherry	Clavate, tear-shaped	Absent
21	RCPF 1868	Velvety	Yellow	Yellow	Clavate, tear-shaped	Absent
22	RCPF 1869	Velvety	White	Yellow	Clavate, tear-shaped	Absent
23	RCPF 1870	Velvety	White	Yellow, red	Clavate, tear-shaped	Absent
<i>Trichophyton schoenleinii</i>						
24	RCPF 234	Powdery	White-greyish	Orange-brownish	Absent	Absent
<i>Trichophyton simii</i>						
25	RCPF 317	Velvety	White	Brown	Round	Absent
<i>Trichophyton tonsurans</i>						
26	RCPF 212	Powdery	White	Yellow-brownish	Pear-shaped	Absent
27	RCPF 1458	Powdery	Red-orange-brown	Red-brown	Round, tear-shaped, clavate	Thin-walled elongated
<i>Trichophyton violaceum</i>						
28	RCPF 1211	Velvety	Light violet	Brown-violet	Absent	Absent

In the species *T. interdigitale*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. tonsurans*, for which three or more strains were studied, the studied morphological characters varied. For example, *T. interdigitale* microconidia were round, drop-shaped, and pear-shaped. We observed the same spectrum of microconidial forms in *T. mentagrophytes*. Microconidia of *T. rubrum* were clavate, tear-shaped, and pear-shaped. In general, the four studied characters did not have any species-specific conditions, with one exception: colonies of *T. violaceum* RCPF 1211 had a pale purple color on the upper side and a brownish purple color on the back side. Other *Trichophyton* spp. did not show similar coloration. It should also be noted that a feature of the mycelium of strain *T. schoenleinii* RCPF 234 was the presence of branching in the form of "deer horns", which are characteristic of this particular species [168].

3.2 Reconstruction of phylogenetic relationships in the genus *Trichophyton*

Using phylogenetic analysis of the concatenated sequences of the ITS region and LSU locus of ribosomal DNA, as well as the beta-tubulin gene *BT2*, we obtained three well-supported main branches corresponding to groups of species *T. mentagrophytes* / *T. simii*, *T. benhamiae* and *T. rubrum* (Figure 5). The *T. mentagrophytes* group contained genetically homogeneous anthropophilic isolates of *T. interdigitale*, grouped together. The second cluster in the *T. mentagrophytes* complex belonged to the strains *T. tonsurans* and *T. equinum*. The isolates of *T. mentagrophytes* were not localized in any particular branch and occupied a basal position in relation to the isolates of *T. interdigitale*, *T. tonsurans* and *T. equinum*. *Trichophyton schoenleinii* was grouped with the sequences of *T. simii* and *T. quinckeanum*, forming a basal clade for the rest of the complex *T. mentagrophytes* / *T. simii*. The *T. benhamiae* branch was represented by the *T. verrucosum* + *T. erinacei* and *T. benhamiae* + *T. concentricum* groups. The *T. rubrum* complex contained genetically homogeneous *T. rubrum* isolates and one *T. violaceum* strain. Trees built exclusively on the ITS and *BT2* sequences provided satisfactory resolution, while the branches of *T. interdigitale* and *T. tonsurans* were missing from the LSU tree.

We compared polymorphism at three loci in three species of the genus *Trichophyton*, using an equal number of sequences for each locus. The *T. interdigitale* set contained 11 sequences, and we found six polymorphic sites in the LSU, 12 polymorphic sites in the ITS, and 11 sites in *BT2*. The *T. tonsurans* set contained three sequences. We found only one polymorphic site in the ITS, and the other two loci did not contain polymorphic positions. The sequences of *T. rubrum*, seven for each locus, were also very homogeneous. Seven LSUs as well as seven *BT2* sequences were identical. Of the seven *T. rubrum* ITS sequences, we found only one variation in the number of TA motifs at the 3'-ends of the sequences.

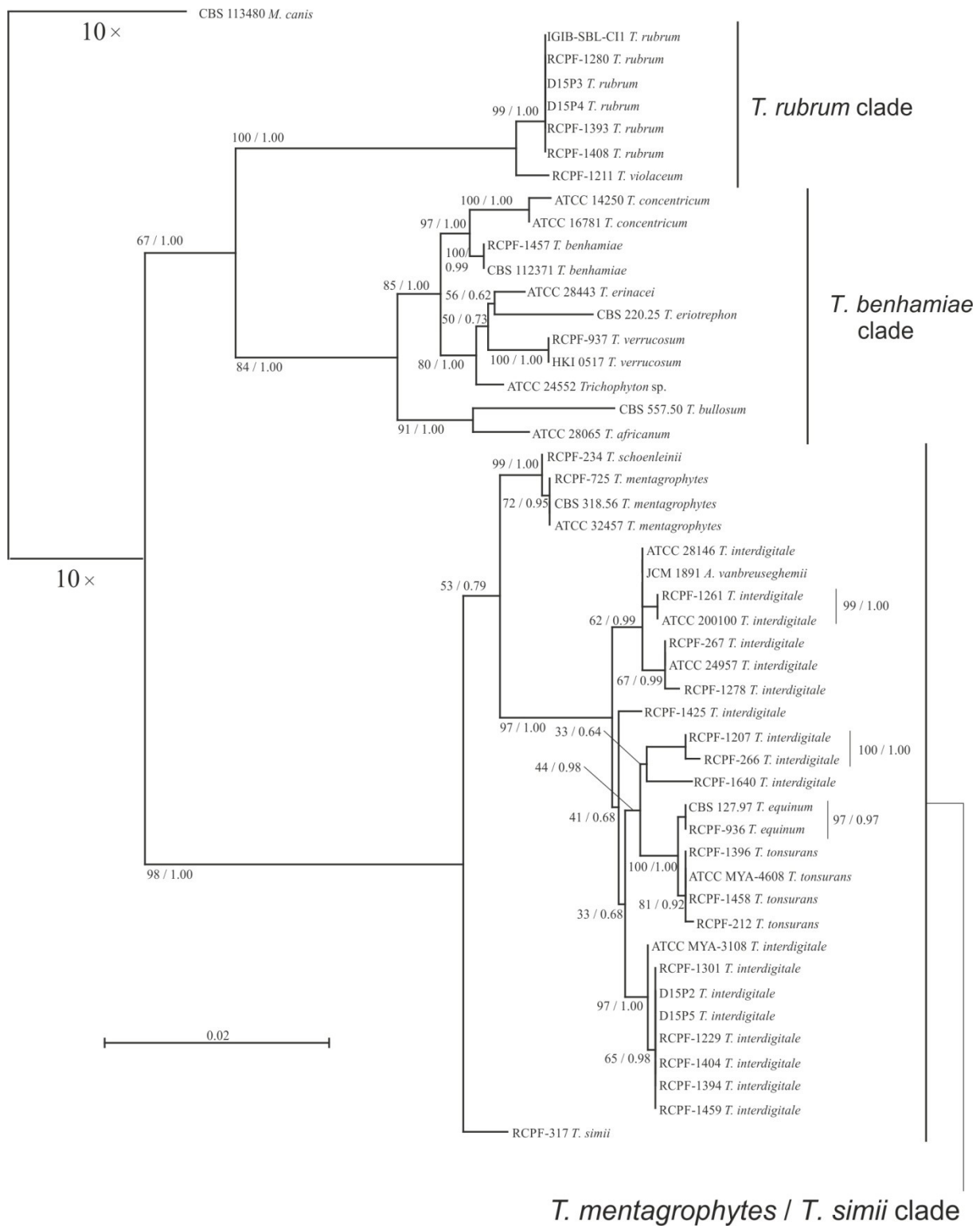


Figure 5. Phylogenetic tree of the genus *Trichophyton*, reconstructed by the maximum likelihood method from the nucleotide sequences of the LSU, *BT2* loci and the ITS region.

In the literature, there is no consensus about the basal phylogenetic branch of the genus *Trichophyton*. Therefore, for each of the three datasets described in [98], or multilocus alignments (Table 4), in the PAUP* program we calculated 100 likelihood trees, and estimated them by the Shimodaira's approximately unbiased test. This test calculates the probability of each tree in the sample, after which, using the level of significance, only trees are left in it that do not significantly differ from the best. For dataset 1, 93% of the trees were not rejected by the test. Of this number, in 86 cases, the basal position was occupied by the branch of *T. benhamiae*, in 4 cases by *T. rubrum*, and in 2 cases by *T. mentagrophytes* / *T. simii*. In dataset 2, 37% of trees were not significantly different from the best; the ratio of basal branches was 0: 3: 34. For dataset 3 with 84% of trees not rejected, the ratio was 0: 0: 84.

Thus, we reconstructed the phylogenetic relationships in the genus *Trichophyton* and identified three main phylogenetic branches, as well as analyzed the historical sequence of their origin. Comparison of the reproduction biology and phylogenetic patterns of dermatophytes reveals the direction of the historical development of the group in the transition from the sapronous ecological type to the zoophilic and anthropophilic. In classical studies on dermatophytes, the comparison of species using different ecological strategies included signs of sporulation, adaptive features of mycelium morphology, urease activity, and release of secondary metabolites [25]. In the last two decades, the arsenal of methods for studying the diversity of dermatophytes has been supplemented by sequencing of barcode DNA loci and methods of accurate typing of strains - MLST, microsatellite analysis.

The main three-part structure of phylogenetic relationships in the genus *Trichophyton* was identified in 1999 [115]. Further work was accompanied by the publication of conflicting topologies based on new, previously not studied in dermatophytes, loci and adding uncertainty to the overall picture. Therefore, to determine the basal branch of the *Trichophyton* phylogenetic tree, we used the approximately unbiased Shimodaira test. However, an unambiguous result was not obtained, for one dataset the basal location of the *T. benhamiae* branch was shown, for

two - *T. mentagrophytes* / *T. simii*. Probably, the group *T. mentagrophytes* is the basal branch of the genus *Trichophyton*, as can be seen on the tree built on the basis of whole genome sequences [28], but something more definite about more terminal branching cannot be said due to the fact that in the cited work only five of the 21 known dermatophyte species.

Over the past 20 years, changes have been regularly made to the taxonomy of dermatophytes. Further steps to revise the group classification have been discussed in the literature, but there is no general concept of how they should be taken. Most taxonomic decisions are based on the following species concepts: biological, phylogenetic, ecological and morphological. The *T. rubrum* population has a well-defined two-part structure, which is revealed when studying the polymorphism of protein-coding sequences, loci of secondary repeats of rDNA, and microsatellites. This allows them to be considered as independent species within the phylogenetic concept of the species. Together with the currently recognized species *T. soudanense* and *T. violaceum*, well distinguishable in morphology, *T. rubrum* forms a compact branch on the phylogenetic tree of the genus *Trichophyton*. The genome of *T. rubrum* contains two protein-coding sequences for which there are no orthologues in the genome of *T. violaceum*. The genome of *T. violaceum*, in turn, contains 15 such sequences. The species have pronounced differences in the clinical picture of the diseases caused: if *T. rubrum* mainly infects the nails and skin of the feet, then *T. violaceum* infects mainly the scalp. It is believed that these differences can be explained by the different repertoire of adhesins. However, the sequence similarity of the genomes of *T. rubrum* and *T. violaceum* reaches 99%, in connection with which the synonymy of these taxa, which have pronounced ecological differences, is discussed. On multilocus phylogenetic trees, *T. interdigitale* and related isolates form a well-defined group. Also, *T. interdigitale* causes disease with different clinical manifestations compared to *T. mentagrophytes*. However, the independent status of *T. interdigitale* is not confirmed by phylogenetic analysis. The genotypes of the ITS region *T. mentagrophytes* and *T. interdigitale* form a continuous row; in phylogenetic networks built according to

multilocus alignments, noise prevails over the signal. This can serve as the basis for combining the two types. Finally, in the literature, you can find a description of the production of fertile hybrids of *T. mentagrophytes* and *T. simii*, capable of interbreeding, including with *T. benhamiae*, with the formation of fertile offspring. *Trichophyton simii* also crossed with *T. benhamiae*, also with the formation of fertile offspring, which testifies in favor of combining the branches of *T. mentagrophytes* and *T. benhamiae* into a single species, based on the biological concept. The genetic diversity of the genus *Trichophyton* has a multilevel structure, and is divided into species rather fractionally, due to their importance for medicine. With relatively good knowledge of biodiversity, there are conceptual foundations for both the fusion of existing species and their further separation. Since there is no single correct approach to interpreting genetic diversity, any changes to taxonomy should only be made when absolutely necessary.

3.3 Diversity and geography of ITS *Trichophyton mentagrophytes* and *T. interdigitale* genotypes

The study of the diversity and distribution of the ITS genotypes of *T. mentagrophytes* and *T. interdigitale* was carried out using sequences from the GenBank database. This required writing scripts that would select database records and sort sequences by genotype. The `puttorights.py` script is designed to select nucleotide sequences based on the presence of a specific test element. The code is presented in Appendix B. The test item is specified at the beginning of the script, followed by the definition of the "complement" function, which converts the nucleotide sequences into their complementary form. This is followed by a block that displays the test item sequence in the terminal window and asks for agreement with the sequence selection condition or stops the script execution. After that, all unique sequences in the 5'-3' direction are written to the `clean.fasta` file. A separate block writes out sequences that do not meet the selection criteria to the `abandoned.fasta` file. When the script finishes, the following indicators are displayed on the screen: the total number of analyzed records,

the number of single-copy records. If there are records with the same access numbers, their number is displayed. It also lists the number of records written to the clean.fasta file and the number of sequences discarded.

The compactor.py script (Appendix C) is designed to combine identical sequences into groups (genotypes). It accepts a file with sequences in FASTA format as input. For the script to work correctly, these sequences must be aligned and trimmed in any suitable program, for example, SeaView 4. The first function block of code (lines 15-33) checks for duplicate access numbers in the source file and displays the number of unique sequences, as well as the number of repeating sequences. The second and third blocks (lines 35-73) ask for a decision to delete sequences containing degenerate nucleotides and to use the 3/2 rule for sequence selection. One must enter the lowercase letters y and n, and the results are written as variable values. Block 4 (lines 76-112) starts if there is a positive decision on the 3/2 rule for the selection of sequences, if there is no "entry_origin.txt" file in the working directory containing information on the location of the laboratories that deposited a particular sequence. During the execution of block 4, the file "entry_origin.txt" is created, in which genotypes are rewritten from the file infile.txt with entries in the GenBank format. In the names of genotypes, the number of occurrences of this sequence in the source file is indicated with a hyphen. The puttorights.py and compactor.py scripts used to work with nucleotide sequences have been posted at <https://github.com/Ivan-Pchelin/genotyping-by-sequencing>.

At various stages of the work, it was required to write small auxiliary scripts for them. The attributetogenotypes.py script (Appendix E) is designed to compare two FASTA files: the "single.fasta" dataset and the "referenceset.fasta" file with reference sequences. The result of the script's work is the "attributed.txt" table, the first column of which contains the names of sequences from "single.fasta", and the second column contains the access numbers of identical sequences from "referenceset.fasta". The cnamestocoordinates.py script (Appendix F) takes as input a table with lists of countries and a table with longitudes and latitudes and converts them into a list of coordinates. The genotype_vs_tinea.py script (Appendix G) summarizes the contents of the

genotype_vs_tinea.txt file in the form of a summary.txt table, where the columns correspond to the types of dermatomycosis: mycosis of the feet, onychomycosis, mycosis of smooth skin, large folds, arms, scalp, face. The lines contain the names of genotypes from the tm-ti_groups.txt file, and the number of records in which a certain pathology is caused by a certain genotype is entered into the cells. The accnos.py script (Appendix H) counts the number of words in the FASTA file comments and writes them out to a new file, each on a new line, with an angle bracket.

To analyze the data accumulated by the world scientific community on the genetic diversity and biography of *T. mentagrophytes* and *T. interdigitale*, we selected sequences that were placed in the database at least three times by laboratories from at least two countries [98]. This yielded a total of 1205 records containing 17 genotypes of *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale*. Of these, 971 entries were annotated geographically or could have been annotated based on searches in the online databases ATCC, IHEM and CBS, or in the original literature. Ten genotypes had at least 10 geographic annotations and were mapped using the R software [169, 170] (Figure 6). The Americas contributed only 2% of the sequences to the total and did not have unique genotypes and were therefore not shown. Africa contributed less than 1% of the sequences to the global dataset. We have divided the well-annotated genotypes into three groups. Genotypes "FM986750", "KT285210" were found only in European countries. Isolates with genotype "MF926358" were found in 18% of all European records and 1% of records from Asia and Oceania. Genotypes "KT192500" and "KU315316" were found only in Asia and Oceania, isolates with genotype "KU496915" were found in 27% of records from Asia and Oceania and were absent from European records. Genotypes "JX122216", "FM986691", "AF170453", "KP132819" were presented in both Europe and Asia. Therefore, the genotypes "FM986750", "KT285210" and "MF926358" were considered European, and the genotypes "KT192500", "KU315316" and "KU496915" - Asian-Oceanic. Another four well-annotated genotypes were designated cosmopolitan. In Russia, five genotypes of the *T. mentagrophytes* /

T. interdigitale complex were found, having a European distribution - "FM986750", "KT285210" and "MF926358", global - "JX122216" and "KP132819" [96].

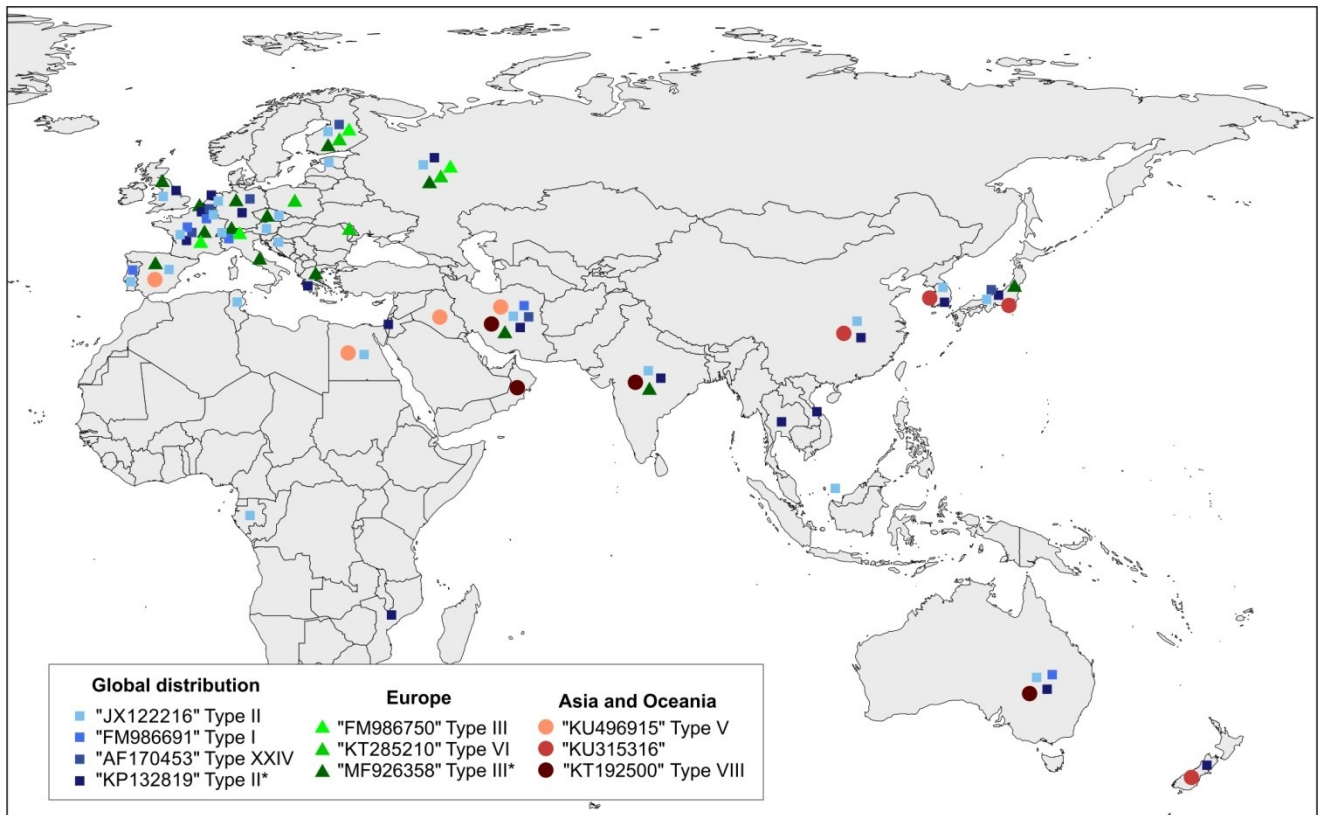


Figure 6. Geographic distribution of genotypes of fungi *Trichophyton mentagrophytes* / *T. interdigitale*, for which at least 10 geographic annotations are available (n = 971). The contribution of the sample of isolates from the Americas to the total number of geographic annotations was 2%, in the absence of unique genotypes. Therefore, these continents are not shown in the illustration.

Thus, we carried out a bioinformatic analysis of the nucleotide sequences and annotations to them for *T. mentagrophytes* and *T. interdigitale*, which made it possible to assess the diversity and distribution of ITS genotypes. The study of the structure of the population of pathogenic microorganisms and the delineation of genetic lines is a necessary aspect of research aimed at explaining their functional diversity. Historically, it was believed that the small size, the presence of dormant stages and the rapid reproduction of living organisms less than 2 millimeters in size allow them to spread globally, regardless of geographic barriers and distances. The individuality of the species composition of specific biotopes was explained by different environmental

conditions, which was expressed in the well-known formula "Everything is everywhere, but, the environment selects" [171]. Research in recent decades has refuted this point of view, providing theoretical and empirical evidence to support the existence of spatial patterns of microbial distribution at different scales and associated biogeographic processes [172-174].

Geographically limited distribution of certain genetic lines of fungi of significant importance for medicine is a common phenomenon [101]. In many cases, this makes it possible, using DNA sequencing, to trace the origin of the infectious agent [175]. Diseases caused by specific geographical races of pathogens can be accompanied by specific clinical manifestations and drug resistance [176]. Using the complete sample of sequences from the ITS region of the *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* group from the GenBank, supplemented by original data, we were able to demonstrate that more than half of the observed genetic diversity within the species complex belongs to genotypes with geographically limited ranges.

Our analysis showed that at least six genotypes of *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* have a limited geographic distribution. In this regard, several hypotheses can be proposed. First, is there a connection between microevolutionary processes in the *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* complex with historical human migrations? Such a relationship has been shown, for example, for lice [177] and hepatitis B virus [178]. This hypothesis can be tested by checking the divergence time in phylogenomic datasets with known dates of events in human evolution and migration [179]. Second, was there an independent transfer of fungi of the *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* group from different animals to humans? This scenario implies a relatively long evolutionary history of the complex compared to the spread of man across the globe, which happened relatively recently - only about 60 thousand years ago [179]. Answering this question will require a closer look at the genetic diversity of the group in wild animals. Until now, *T. mentagrophytes* have been found in dogs, cats, ferrets, horses, antelopes, rabbits, mice, rats, squirrels, hamsters, chinchillas, and guinea pigs. Cases of the disease have been described in such exotic animals as the giant panda and the snow leopard

[180]. Third, does the climatic factor contribute to the prevalence of infections caused by *T. mentagrophytes* and *T. interdigitale* with certain genotypes? This could be tested by simulating infection in experimental animals at controlled temperature and humidity.

Interestingly, *T. mentagrophytes* with genotype "KT192500" Type VIII is associated with problems with terbinafine therapy [45, 181]. This relationship was explained by the presence of a mutation in the squalene epoxidase gene [181]. Since there is no direct relationship between the ITS genotype and the nucleotide sequence of the enzyme, it can be assumed that resistance to therapy and effective anthroponotic transfer of isolates led to the spread of a stable part of the pool of isolates of the genotype "KT192500". This may be supported by a recent national study in Iran that examined 397 strains of *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale*. The sequences of the ITS region of the isolates were determined, and the sensitivity to terbinafine was determined. Five resistant strains were identified, with MIC > 32 µg / ml. All resistant strains had the "KT192500" genotype. The total number of strains of this genotype was 35. Accordingly, 6/7 of the number of KT192500 isolates were not resistant to the action of the drug [96].

The knowledge gained about the biogeographic patterns of the distribution of *T. mentagrophytes* and *T. interdigitale* genotypes can be used for epidemiological investigations. So, in 2016, we confirmed the exotic origin of the infection caused by the strain with the genotype "KT192500" [45]. At the same time, four genotypes of *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* are distributed globally. This may indicate a significant contribution of population migration, tourism and trade to the formation of local populations of dermatophytes. The applicability of sequencing of the ITS region for the purpose of studying the epidemiology of infections caused by Trichophyton spp. May be limited by migration flows leading to changes in the etiological structure of dermatophytosis [182].

The geographical pattern of the distribution of genotypes of the *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* group revealed by us is similar to the previously obtained results for *T. tonsurans* [62]. In the aforementioned work, a global sample of

198 strains was studied by DNA sequencing for 13 genes. 4 branches were obtained, two of which were found mainly in North America, one in South America, and one in Europe.

The spatial structure of the distribution of free-living fungi is explained by the differences in climatic conditions of different territories and the historical transformation of the land [183]. The sibling species *Heterobasidion annosum* and *H. irregulare* are an interesting example of allopatric speciation. These are economically significant coniferous pathogens, one common in Europe and the other in North America. Most likely, speciation in this group was caused by the movement of lithospheric plates. Currently, there are differences between them in preferences for host plants and certain environmental conditions. Genetic studies reveal fixed mutations [184]. Despite this, at the place where *H. irregulare* was introduced into Italy, an exchange of genetic material occurs between the two species [185].

Thus, our analysis of the geographical annotations of the records of the GenBank database containing the sequences of the ribosomal region ITS of the fungi *T. mentagrophytes* and *T. interdigitale* showed that they belong to the species of the genus with genotypes with limited distribution. In the future, it is necessary to answer the question about the possible factors that led to the formation of these patterns.

3.4 Analysis of interspecific boundaries in the *Trichophyton mentagrophytes* / *T. interdigitale* complex

Since the most significant contribution to the question of species boundaries in the *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* complex was made using sequences of the ITS region of ribosomal DNA, we studied the diversity of ITS sequences of fungi of the genus *Trichophyton* from the GenBank database. A total of 1396 records were identified, containing 44 distinct genotypes. Of this number, 15 belonged to *T. mentagrophytes* and *T. interdigitale* (34%). The type and reference sequences used for species identification are shown in Table 8.

Table 8 - Sequences of the ITS region of the type and authentic *Trichophyton* spp. by de Hoog et al. [10], used for species identification.

Species	Strain	GenBank accession
<i>T. equinum</i>	CBS 270.66	KT155643
<i>T. interdigitale</i>	CBS 428.63	JX122216
<i>T. mentagrophytes</i>	IHEM 4268	MF926358
<i>T. quinckeanum</i>	IHEM 13697	NR_144899
<i>T. schoenleinii</i>	CBS 458.59	LC375549
<i>T. simii</i>	CBS 417.65*	KT155890
<i>T. tonsurans</i>	CBS 496.48	KT155650

* authentic strain

The distribution of genetic distances in the sample had a pronounced barcode gap. The ML tree was divided into three main groups of species, which contained 12 PTP hypotheses and 15 ABGD hypotheses. Three PTP hypotheses and four ABGD species belonged to the branch *T. mentagrophytes* / *T. simii*. ABGD analysis combined *T. mentagrophytes* with *T. interdigitale*, *T. equinum* with *T. tonsurans*, and *T. quinckeanum* with *T. schoenleinii*. The first two pairs of species were combined into one PTP hypothesis (Figure 7).

Multilocus datasets are limited by the number of isolates, nevertheless allow a deeper understanding of the phylogenetic process in comparison with single-locus analyzes. In addition, the original publications did not raise the question of the presence of a phylogenetic signal. To fill this gap, we used the method of constructing phylogenetic networks.

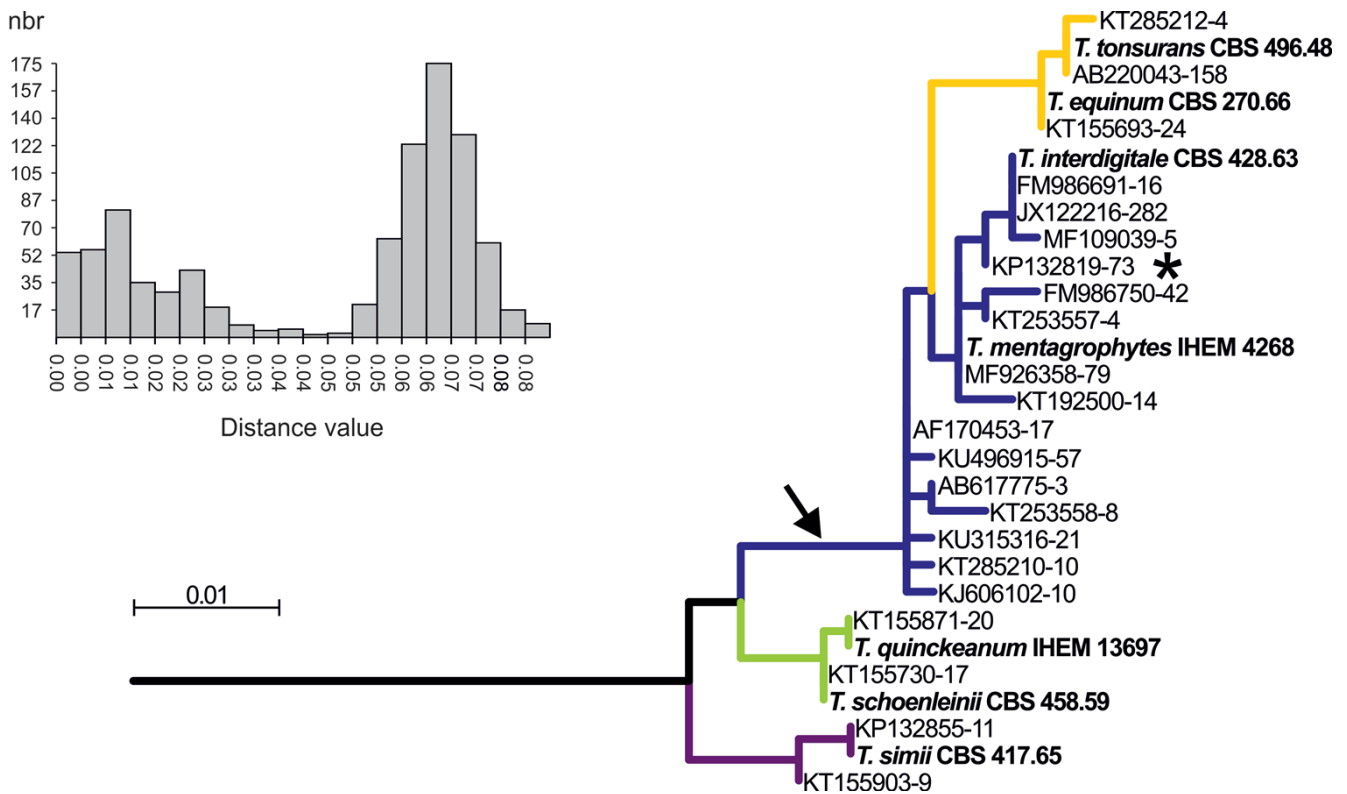


Figure 7. Computational analysis of species boundaries in the branch *Trichophyton mentagrophytes* / *T. simii* by ABGD and PTP methods based on the alignment of the ITS region sequences. The results are plotted on a plausible tree of the genus *Trichophyton*, also built on the basis of sequences from the ITS region. The ABGD results contained four color coded species hypotheses. Three species hypotheses were obtained using the PTP method. The arrow marks the branch represented by one species hypothesis in the PTP results. The numbers after the hyphens indicate the number of GenBank records containing the given genotype. *Trichophyton mentagrophytes* and *T. interdigitale* belong to the same species hypothesis in the results of both analyzes. The intermediate ITS genotype is marked with an asterisk. Inset: distribution of Jux-Cantor distances between 44 known sequence variants of the ITS region of *Trichophyton* spp. The barcode gap is visible.

The general structure of phylogenetic networks based on three multilocus datasets was similar. In the *T. mentagrophytes* / *T. simii* clade, *T. quinckeanum* and *T. simii* (dataset 1) or *T. quinckeanum* and *T. schoenleinii* (dataset 2) or all three (dataset 3) occupied basal position, while the group of strains *T. mentagrophytes*, *T. interdigitale*, *T. tonsurans* and *T. equinum* formed one terminal cluster without visible branches (Figure 8).

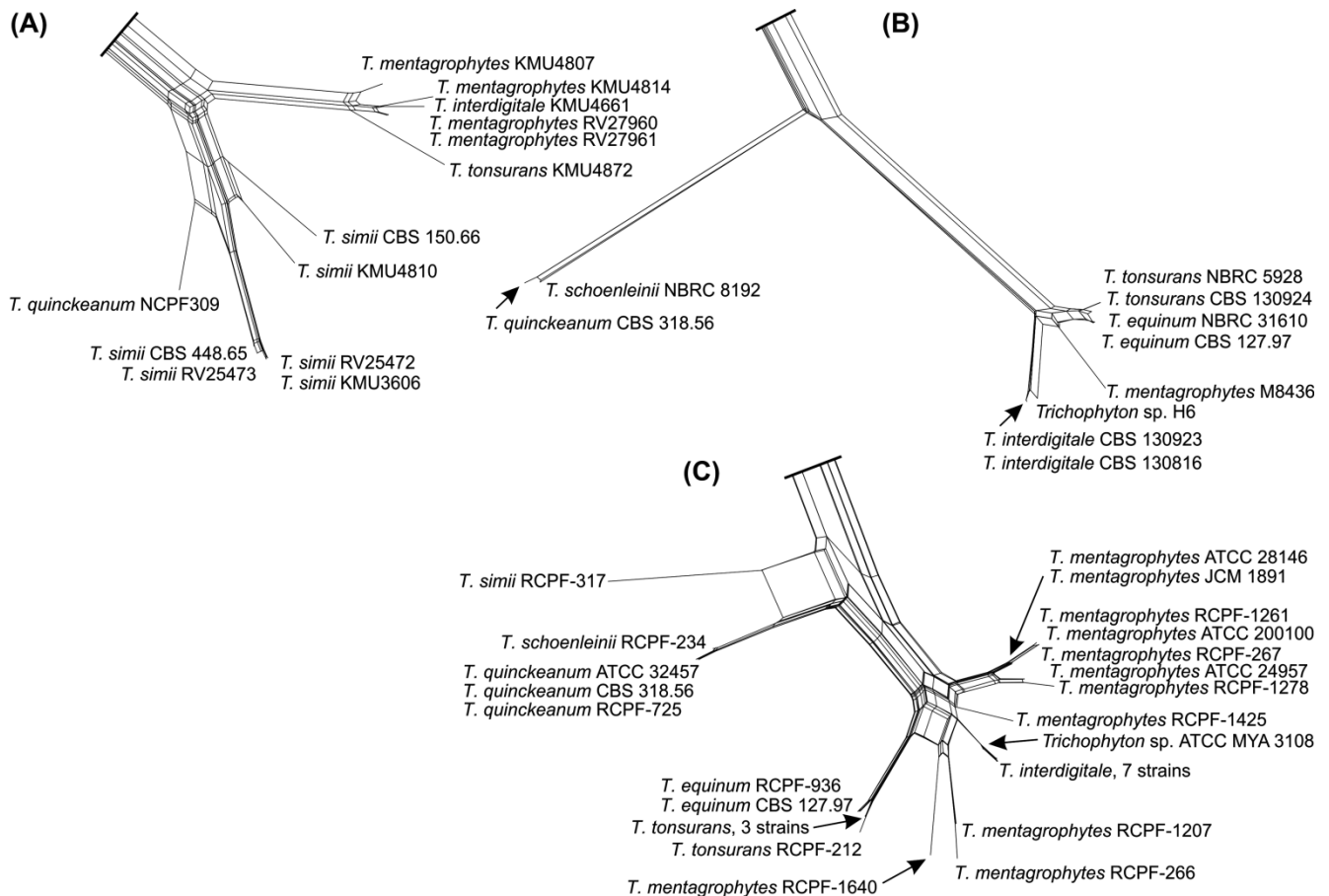


Figure 8. Phylogenetic network structure alignments based upon concatenated sequences from publications: *A* [51]; *B* [52, 54, 55]; *C* [53]. For all three networks, only the parts with isolates of the *T. mentagrophytes* / *T. simii* clade is shown. Strains with an intermediate genotype "KP132819", which cannot be unambiguously identified as *T. mentagrophytes* or *T. interdigitale*, are labelled as "*Trichophyton* sp." The alignments do not contain specific nucleotide patterns confirming the independence of *T. mentagrophytes* and *T. interdigitale*, as well as the general group of both species.

Since we wanted to solve the problem of *T. mentarophytes* polyphyly, for whole genome sequencing we chose isolates with ITS genotypes branching up to *T. tonsurans* / *T. equinum* on the ITS tree (D15P156) and after them (D15P127, D15P135, D15P152). On phylogenetic trees *T. tonsurans* and *T. equinum* occupied basic position relatively complex *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* and genomes of *T. interdigitale* and isolates with an intermediary between *T. mentagrophytes* and *T. interdigitale*. Two isolates with the intermediary genotype ITS and *T. interdigitale* occupied a terminal position on the tree and were separated from each other by no more than 64337 point

mutations (*T. interdigitale* MR816 and *Trichophyton* sp. D15P152). This number was less than the smallest distance between any *T. mentagrophytes* isolates (89566 SNP between isolates D15P127 and M8436) and the smallest distance from any *T. interdigitale* or intermediate isolate to any *T. mentagrophytes* isolate (163623 SNP between isolates *Trichophyton* sp. H6 and *T. mentagrophytes* TIMM 2789). While the coalescent phylogenetic tree contained a separate *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* branch (Figure 9), it was absent in the SNP tree (Figure 10).

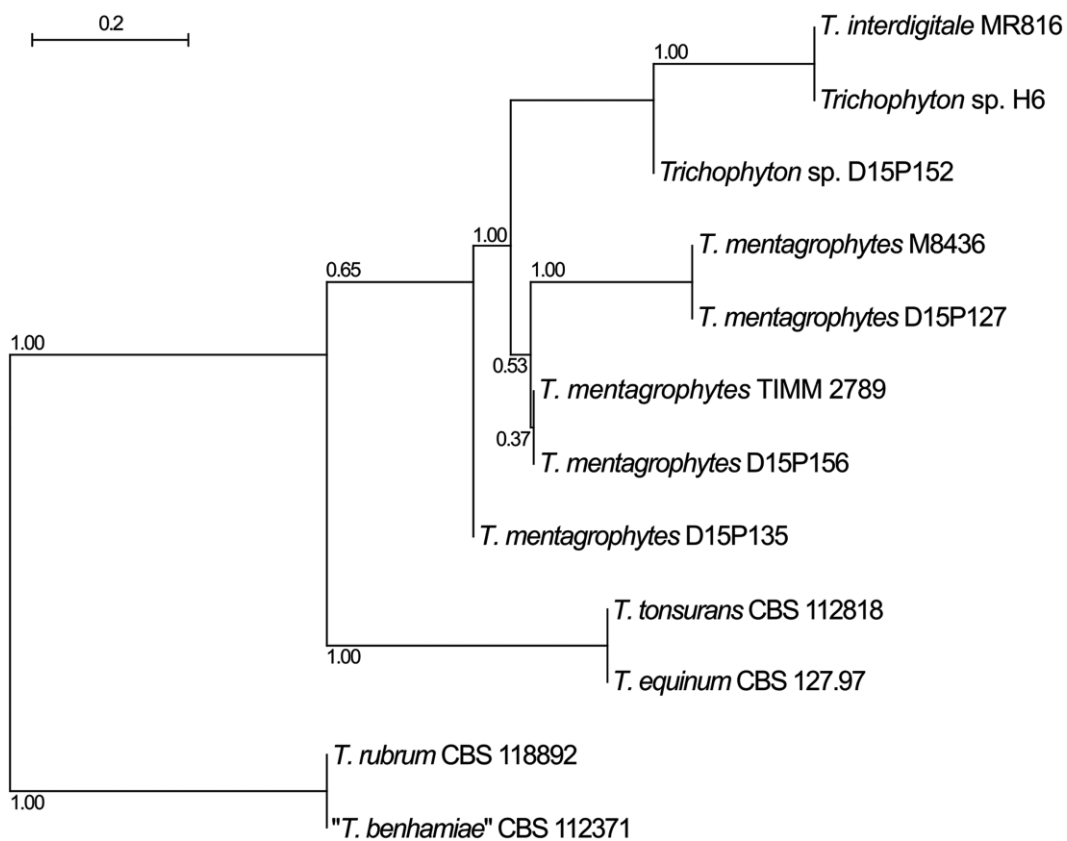


Figure 9. *Trichophyton mentagrophytes* / *T. interdigitale* species complex. Coalescent phylogenetic tree built in the ASTRAL III program. Isolate *T. interdigitale* MR816 terminal branches with intermediate strains H6 and D15P152. There is no separate branch for *T. mentagrophytes* isolates.

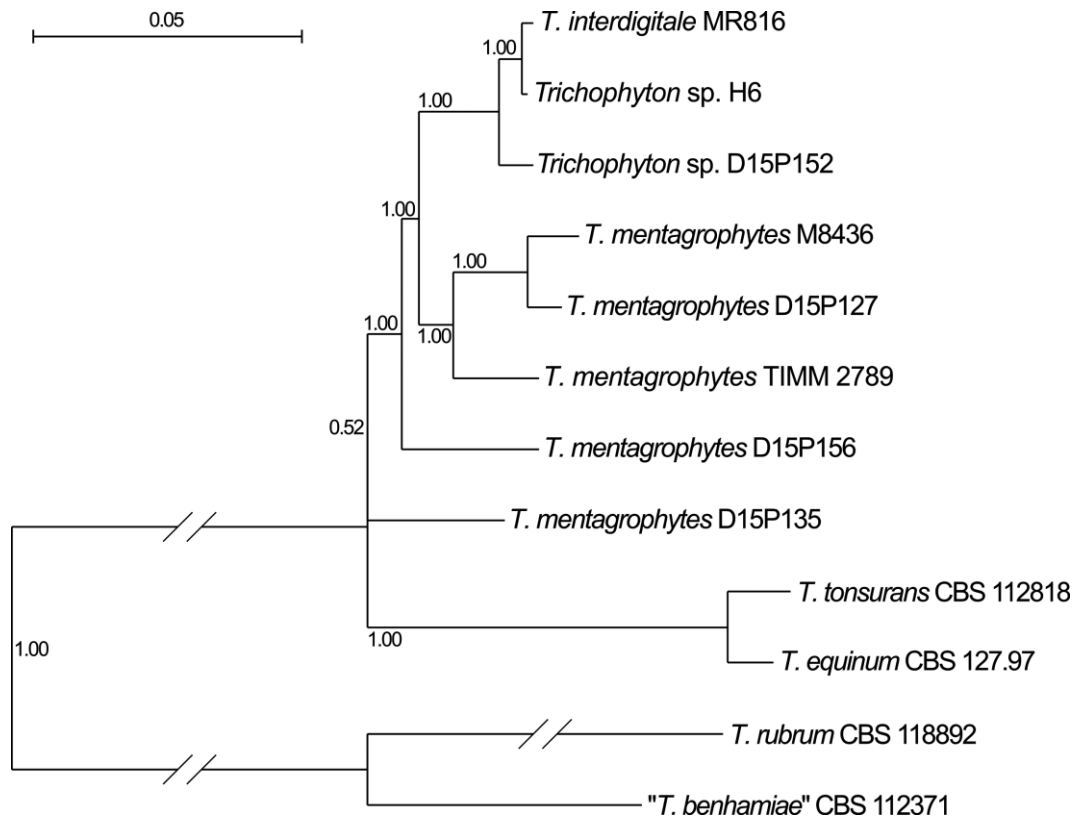


Figure 10. *Trichophyton mentagrophytes* / *T. interdigitale* species complex. Maximum Likelihood SNP-based phylogenetic tree. Isolate *T. interdigitale* MR816 terminal branches with intermediate strains H6 and D15P152. There is no separate branch for *T. mentagrophytes* isolates. The common branch of *T. mentagrophytes* and *T. interdigitale* is not resolved.

Clinical and epidemiological data are the cornerstone of the discussion of the species boundaries of *T. mentagrophytes* and *T. interdigitale*. We decided not to rely on a limited number of our own strains, but rather on a generalization of the information available in sequence annotations from the GenBank. For *T. mentagrophytes*, 154 clinical abstracts were available. For the ITS sequence type *T. interdigitale*, we found 90 annotations, "*T. interdigitale* sequence type I" did not have such annotations. In the discussion that follows, we rely on data from Heidemann et al. For 10 such isolates, all of which originate from cases of mycosis of the feet and onychomycosis. In addition, clinical data were available for 29 GenBank records with an intermediate genotype. In total, 43% of the records with sequences of the ITS region of the *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* species group had clinical annotations. Clinical isolates of

T. mentagrophytes originated mainly from cases of tinea corporis (77%), while *T. interdigitale* and intermediate genotypes were found mainly in cases of onychomycosis and mycosis of the feet (59%). *Trichophyton mentagrophytes* and intermediate genotypes were derived from mammals (31% and 26%, respectively), but *T. interdigitale* was of strictly human origin. Strictly speaking, all types of phylogenetic analyzes used here: computational analysis of species boundaries based on sequences of the ITS region, phylogenetic networks based on multilocus alignments, whole genome phylogeny, indicate the existence of only one species instead of two, *T. mentagrophytes* and *T. interdigitale*. Since taxonomic stability is a fundamental principle, it may be prudent to maintain the independent status of *T. interdigitale*. To fill the taxonomy with epidemiological meaning, we must consider the strains with the intermediate genotype "KP132819" as *T. mentagrophytes*. Therefore, *T. interdigitale* is essentially limited to two genotypes: "FM986691" and "JX122216" [98].

Thus, we determined the sequences of four genomes of the fungus *T. mentagrophytes* and supplemented the sample with the genomes of fungi of the genus *Trichophyton* from the GenBank. Cladograms were constructed based on the distribution of point mutations, as well as using the coalescence model to a sample of 300 individual trees obtained by the neighbor joining method. These cladograms, on the one hand, showed the isolation of the *T. tonsurans* / *T. equinum* branch relative to the *T. mentagrophytes* / *T. simii* branch, and the terminal position of *T. interdigitale* in it. On the other hand, the *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* branch was not resolved on the point mutation tree. In addition, the computational method for distinguishing ABGD species, applied to a complete sample of sequences from the ITS region of fungi of the genus *Trichophyton* from the GenBank, did not confirm the separation of *T. mentagrophytes* and *T. interdigitale* into separate species. Moreover, using the PTP method, he assigned four species to a single species hypothesis - *T. mentagrophytes*, *T. interdigitale*, *T. tonsurans* and *T. equinum*. Three phylogenetic networks built for previously published multilocus nucleotide alignments did not contain a phylogenetic signal in their parts belonging to the same four species. All these data allowed us to

support the point of view previously expressed in the literature that *T. mentagrophytes* and *T. interdigitale* belong to the same phylogenetic species [98].

A classic work considering the genetic diversity of the *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* complex is the article by Heidemann et al. [20]. Based on the study of a sample of 124 Western European and 6 Chinese isolates, it describes three genotypes of *T. mentagrophytes* (FM986750 - III, Europe; MF926358 - III*, cosmopolitan; KJ606102 - IV, distribution features are not known) and two genotypes of *T. interdigitale*. It is concluded that the genotypes of *T. mentagrophytes* are anthropophilic, while those of *T. interdigitale* are zoophilic. However, any, even the most detailed research conducted in a limited area cannot be all-encompassing. Therefore, our results are a logical development of this line of research. Analysis of the database showed that by now 17 genotypes of the fungus *T. mentagrophytes* are known, and at least three of them are limited in their distribution to Asia and Oceania. At present, the degree of annotation of the GenBank records does not allow any conclusions to be drawn regarding the host preferences of individual genotypes of the complex. It turned out to be possible to make such a comparison for the genotypes of *T. mentagrophytes*, *T. interdigitale*, and the intermediate genotype taken together. Our analysis confirmed Heidemann's conclusion about the anthropophilic origin of isolates of *T. interdigitale*. Interestingly, if the intermediate genotype for this trait was more similar to *T. mentagrophytes*, then in the clinical picture of the induced lesions it was closer to *T. interdigitale*. Clinical aspects are of great importance in the taxonomy of dermatophytes, and at this stage of research we were unable to unambiguously resolve the question of the species of the intermediate genotype. Reports on the isolation of these isolates can be found in the literature [186], but the question is still open.

3.5 Population structure of the fungus *Trichophyton rubrum*

The work on the characterization of the *T. rubrum* population on the territory of St. Petersburg and Yekaterinburg by molecular genetic methods was carried out in two stages. At the first stage, a sample of 50 St. Petersburg isolates was typed according to

the electrophoretic patterns of the TRS-1 and TRS-2 loci in the NTS region. The results of amplification of the TRS-1 element were represented by six electrophoretic patterns, the TRS-2 element was represented by four variants (Figure 11A). The patterns of amplification products of the TRS-1 locus nos. 5 and 6 were represented by several bands. Type 5 profiles showed slight polymorphism, but differed well from type 6 profile (Figure 11B).

We have set ourselves the task of expanding the arsenal of typing methods for fungi. A list of single nucleotide substitutions was compiled by aligning the 12 published genome sequences, and protein-coding loci TERG_02941 and TERG_03298 were subjectively selected for Sanger sequencing. These two loci were used for DNA sequencing of the same sample of 50 *T. rubrum* isolates. A single polymorphic nucleotide position was identified at both loci. Mutations at two loci were synchronous in all isolates.

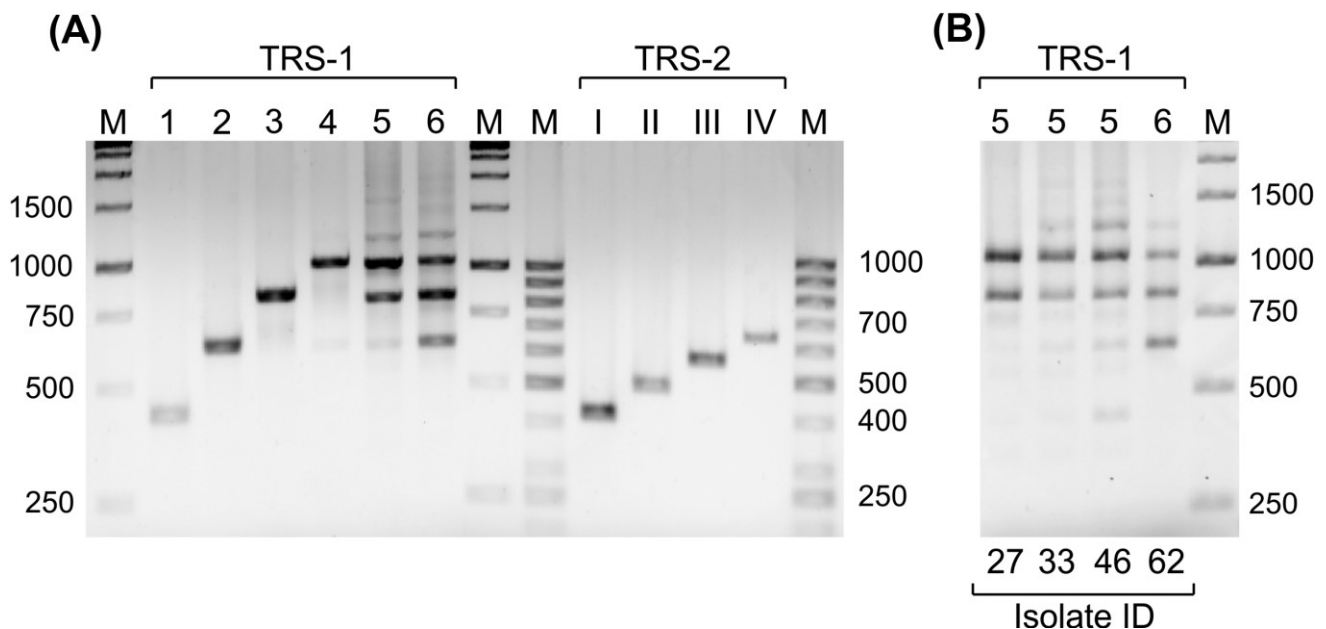


Figure 11. *Trichophyton rubrum*. A, The result of amplification of the TRS-1 and TRS-2 secondary repeat loci of the nontranscribed rDNA spacer. B, Electrophoretic patterns of amplification products of the TRS-1 locus of the fifth type in comparison with the pattern of the sixth type.

The most common genotype TERG_02941 793A / TERG_03298 247T was designated as "sequence type 1" (ST1), and the second genotype TERG_02941 793G / TERG_03298 247C was designated as "sequence type 2" (ST2). It is important that the results of DNA sequencing at the TERG_02941 / 03298 loci coincided with the results of typing at the TRS-1 locus. The amplification product of the TRS-1 locus of TP1 isolates was represented by a single band, approximately 450 bp in length, with only one exception. Thus, the studied population had a two-part structure, revealed by two independent methods (Figure 12).

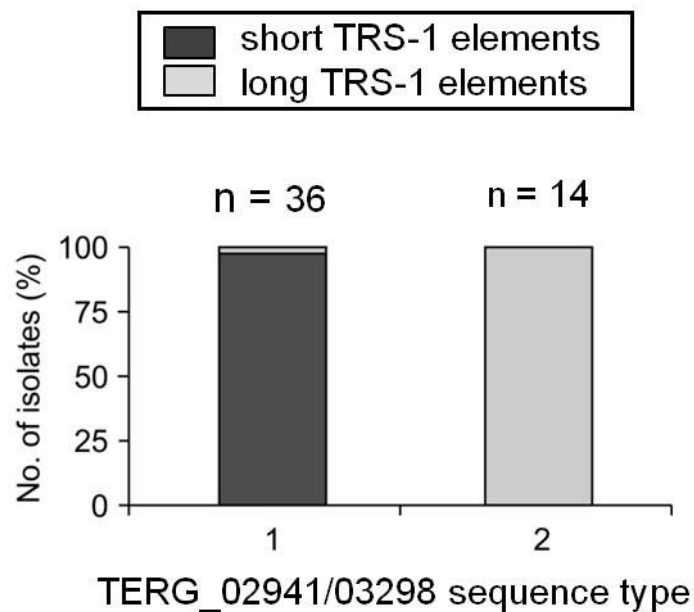


Figure 12. *Trichophyton rubrum*. Distribution of short (approx. 450 bp) and long TRS-1 elements depending on the genotype of the TERG_02941 / 03298 isolate.

Since mutations in protein-coding loci in the studied sample were observed synchronously, it was decided to carry out further typing with this approach only at the TERG_02941 locus.

At the second stage of studying the structure of the *T. rubrum* population in St. Petersburg and Yekaterinburg, we used microsatellite analysis. A sample of 59 isolates was studied, of which 18 were common with the first stage sample. The

frequency distribution of paired genetic distances, calculated from the analysis of the lengths of 12 microsatellite loci, was bimodal (Figure 13).

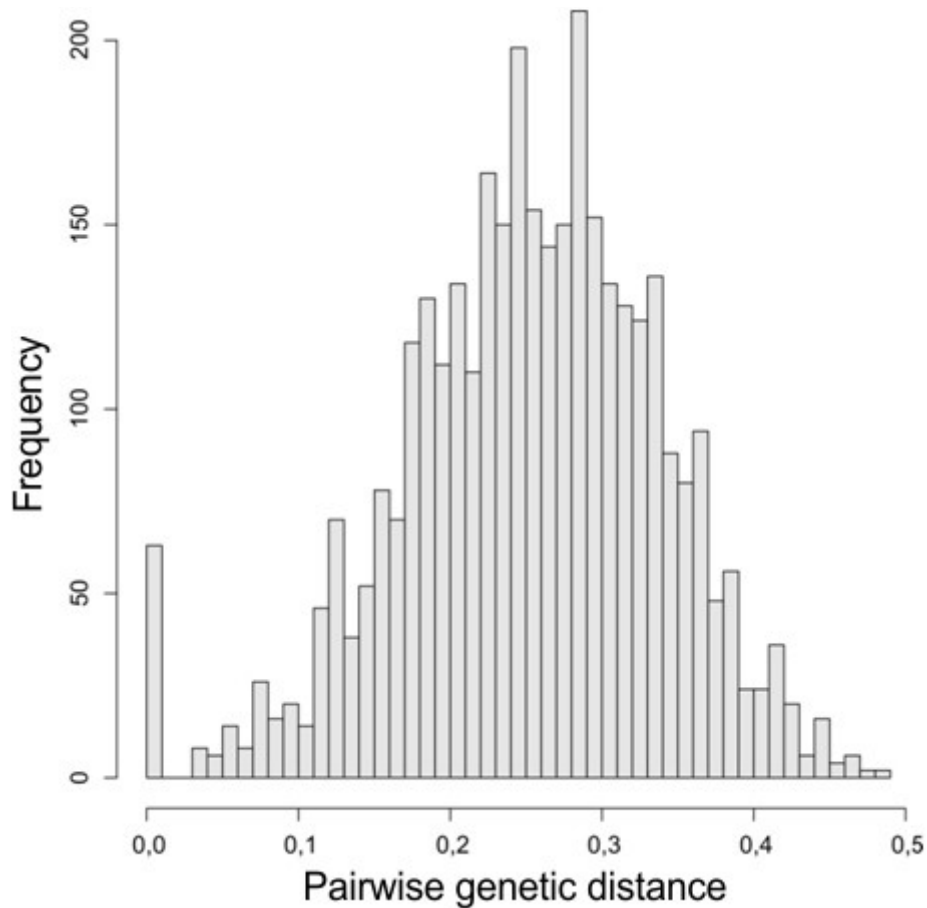


Figure 13. *Trichophyton rubrum*, n = 59. Distribution of genetic distances calculated by Bruvo's method based on the results of amplification of 12 microsatellite loci.

The results of the analysis of the lengths of microsatellite loci of *T. rubrum* are shown in Figure 14A. When superimposed on the obtained scattering diagram of the genotypes of the locus TERG_02941, a two-part structure of the sample was revealed. One of the point clouds was formed by isolates TERG_02941 793A, the other - 793G (Figure 14B). Both *T. rubrum* genetic lines were found in two cities (Figure 14B). In Figure 16D, isolates are labeled according to clinical data.

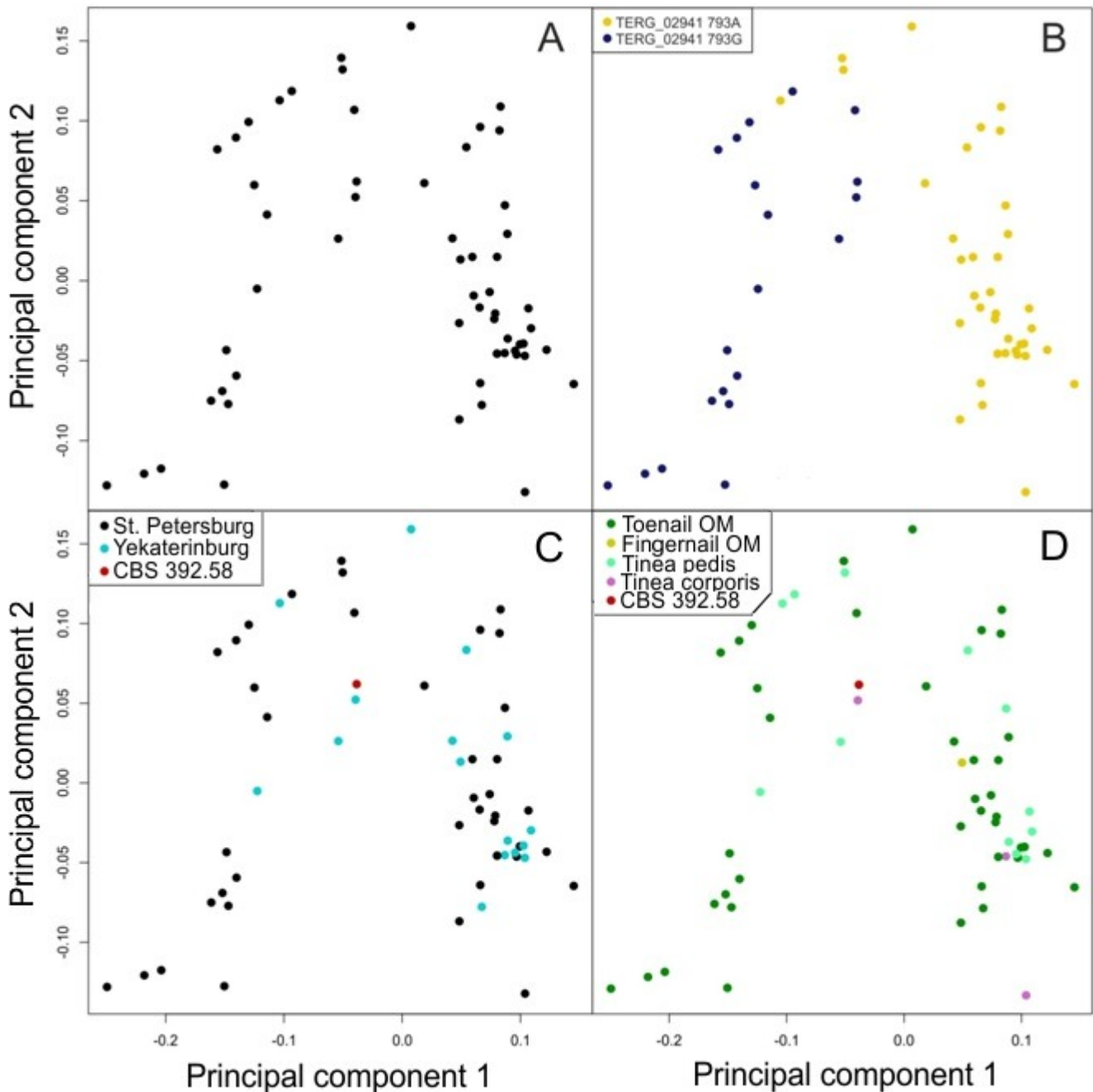


Figure 14. *Trichophyton rubrum*, $n = 59$. Scatter plot based on the results of analysis of the length polymorphism of 12 microsatellite loci by the principal component method. *A*, starting graph; *B*, color according to TERG_02941 genotype; *C*, color according to cities of origin; *D*, color according to the clinical manifestations of the disease. OM, onychomycosis.

The value of the Simpson index calculated for equal samples did not differ significantly for different genotypes TERG_02941. This index measures the probability that two isolates randomly selected from a sample will belong to the same genetic line.

The association index, $\bar{r}_d = 0.02483$, was calculated in the poppr 2.8.1 package for R by the Multilocus Style Permutation method after removing one uninformative locus and performing clonal correction. The value of the association index was beyond the right border of the expected frequency distribution. The probability of \bar{r}_d was estimated at 0.002, which allowed rejecting the null hypothesis of the absence of links between markers, which indicates a significant deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium in the fungus population and the clonal mode of reproduction of its members. The calculated p-value for the χ^2 criterion was 0.4956, with a criterion value of 3.3851, and four degrees of freedom, which does not allow rejecting the null hypothesis that there is no relationship between the TERG_02941 genotype of the isolate and the localization of the lesion on the patient's body at a significance level of 0.05 [150].

In order to test the possibility of differentiating *T. rubrum* isolates belonging to different genetic lines based on the macromorphology of the isolates, we studied a sample of 41 strains with the known genotype TERG_02941. Since the upper side of the colonies in most of the isolates showed white, fluffy growth, we settled on the study of the color of the reversum when cultivated on Sabouraud's medium. In 11 isolates, a one-color reversum was identified: D15P38, D15P49, D15P51, D15P58, D15P71, D15P121, D15P122, D15P134, Y1484, Y1573 Y1766. Eight isolates were found to have scalloped reversum coloration: D15P50, D15P125, D15P128, D15P131, D15P136, Y1694, Y1696, Y1781. In 22 isolates, a ring-shaped arrangement of the pigmented areas of the reversum was found: D15P45, D15P46, D15P48, D15P62, D15P133, D15P137, D15P138, D15P37, D15P61, D15P123, D15P130, D15P132, D15P13918, Y17010, Y17238, Y1864, Y1932. Isolates of both genetic lines showed similar phenotypic traits, as illustrated in Figure 15.

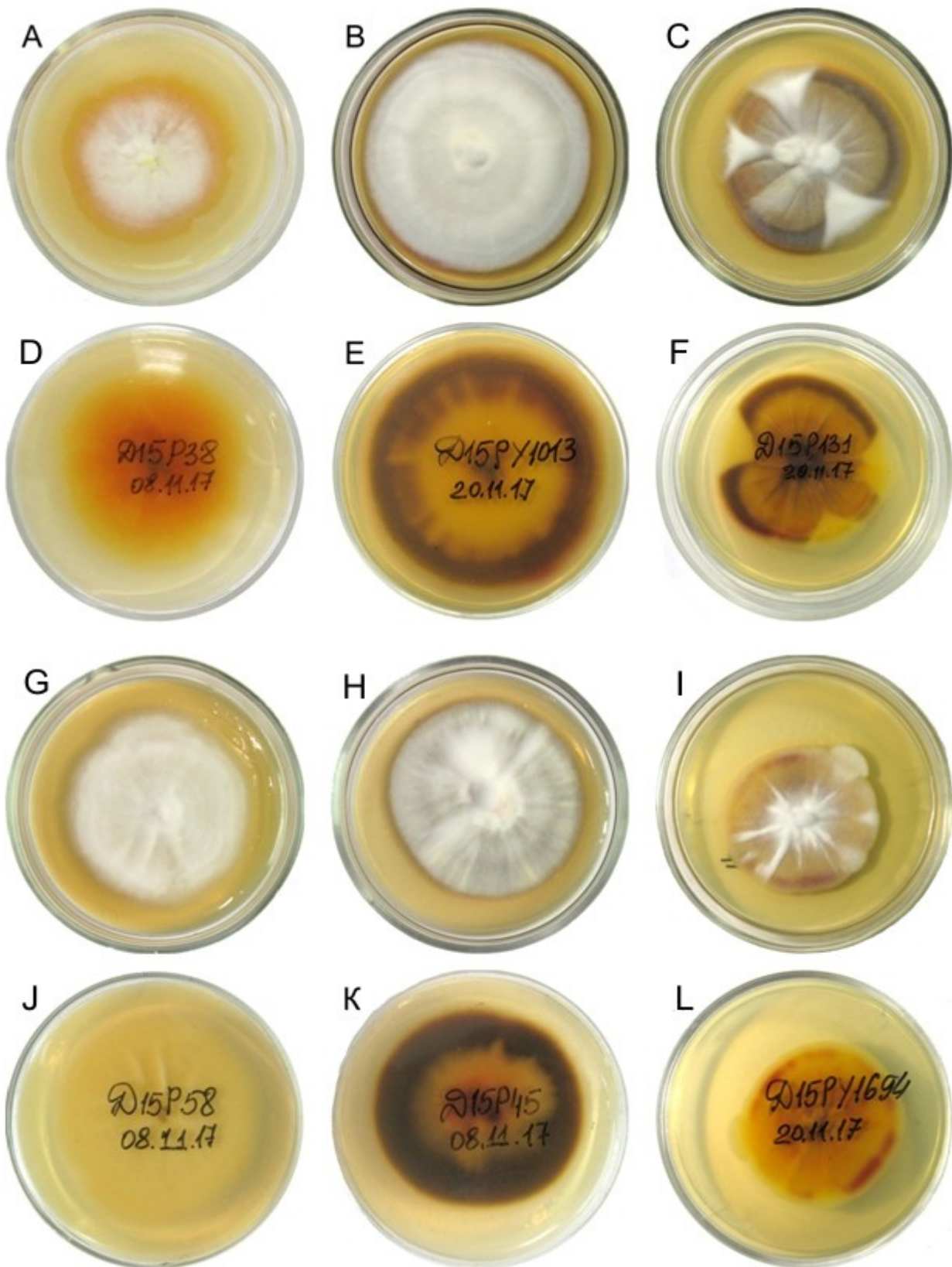


Figure 15. *Trichophyton rubrum* colonies. A-F, isolates with genotype TERG_02941 793A. G-L, isolates with genotype TERG_02941 793G.

We evaluated the possibility of infection of patients with *T. rubrum* polymorphic mycelium, for which we obtained serial isolates from six patients with onychomycosis and mycosis of the feet. In each case of the disease, the unique multilocus genotypes of the fungus were identified by microsatellite analysis. Paired isolates from five patients had the same microsatellite profiles. The D15P100I isolate from the nails of a patient with combined lesion differed from the second isolate from the D15P100II nails and from both isolates from the skin of the feet of this patient along the length of the Tr002 locus. In order to find out whether the isolates in a series are independent or belong to the same clonal lineage, it was necessary to answer two questions: 1) whether all replicates of one multilocus genotype belong to one clone and 2) whether each separate multilocus genotype belongs to a separate clone. The answer to the first question was given through the analysis of the dependence of the distribution of the number of detected multilocus genotypes in the sample on the number of loci used. The second question required an analysis of the frequency distribution of paired genetic distances in order to detect possible somatic mutations or errors of the method, which lead to the assignment of different samples of the same clone of different multilocus genotypes. The distribution of the number of detected microsatellite profiles obtained by us depending on the number of loci used indicates that the applied typing scheme was sufficient to consider the replicates of each multilocus genotype as belonging to the same clone (Fig. 16).

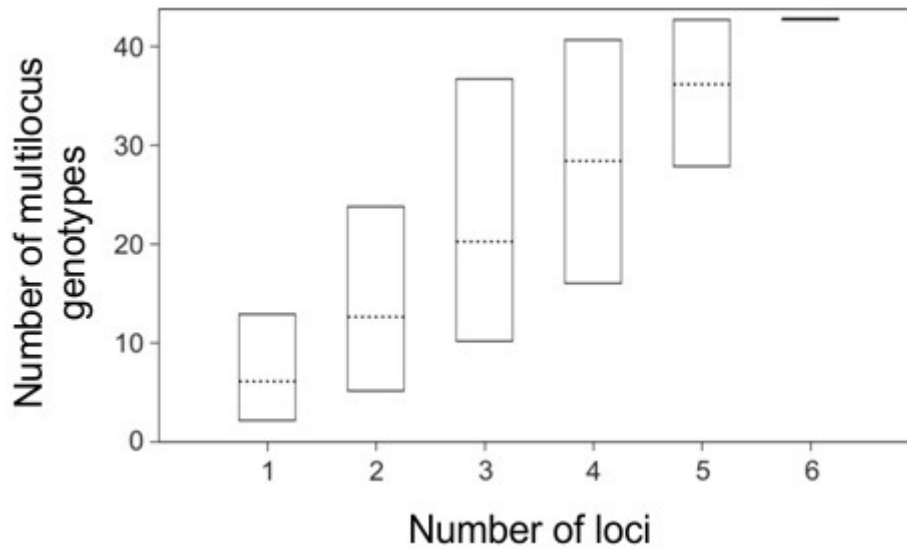


Figure 16. Resolution of six microsatellite loci used for typing a sample of *Trichophyton rubrum* isolates, n = 50.

In the studied sample of *T. rubrum* isolates, the distribution of Bruvo's paired genetic distances was unimodal, with a local maximum in the representation of minimum distances. The values were within the range from 0.000 to 0.620. The genetic distance between isolates D15P100I and D15P100II was 0.059 and was in the leftmost part of the distribution. In other words, it had a near-zero value (Figure 17).

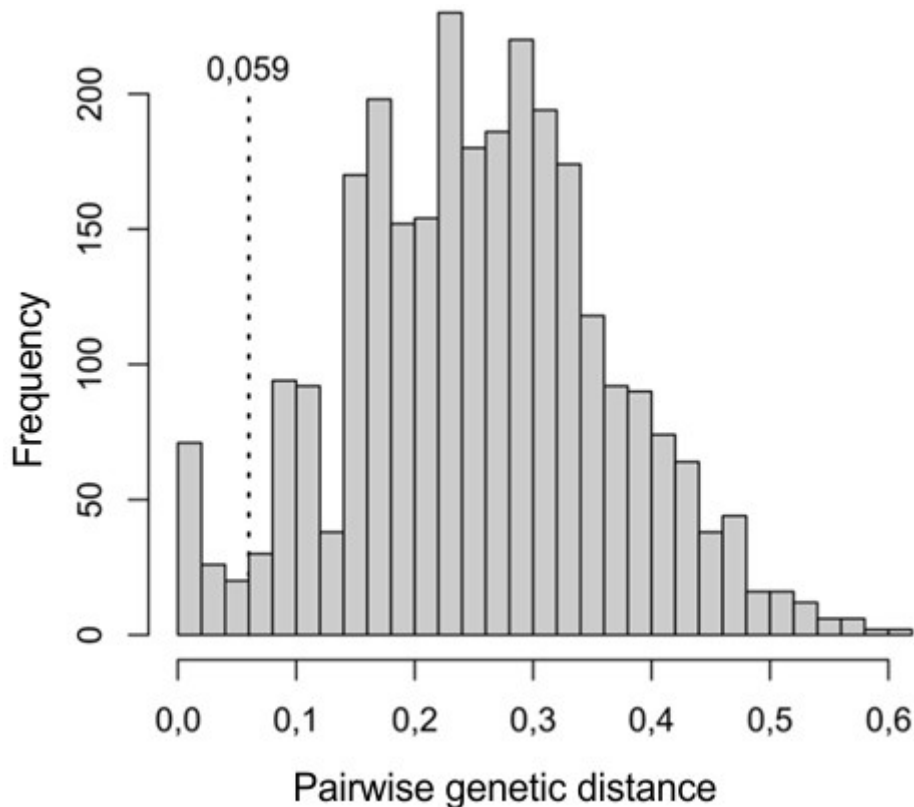


Figure 17. *Trichophyton rubrum*. Distribution of genetic distances calculated by Bruvo's method based on the results of amplification of six microsatellite loci. The genetic distance between isolates D15P100I and D15P100II was noted.

Since the set of eight microsatellite loci for typing *T. rubrum* known in the literature did not allow us to repeat the clustering that we performed earlier based on the polymorphism of the protein-coding sequences TERG_02941 and TERG_03298 (published as A7C99_6411 and A7C99_6714) and the rDNA secondary repeat locus for TRS-1 verification previously drawn conclusions about the two-part structure of the *T. rubrum* population, we selected and tested two pairs of primers for amplification of the protein-coding loci A7C99_6946 and A7C99_7080. By temporary A7C99_6946 locus amplification products were visualized as two bands, and the locus A7C99_7080 - the four strips, which excluded the possibility of direct sequencing. Attempts to vary the primer annealing temperature, the number of amplification cycles, and the addition of DMSO were also unsuccessful. Ultimately, for a mixed sample of 10 isolates TERG_02941 793A and 793G, it was possible to obtain the sequences of the locus A7C99_6946, but the mutation predicted based on the genome-wide alignment was not

found. Since primers were needed for typing *T. rubrum* isolates, further attempts to obtain sequences for these loci were abandoned.

The fragment analysis results are exported from the proprietary program of the ABI 3500 sequencer manufacturer, GeneMapper 4.1, as a file with the original format. For each measurement in this format, a separate line is provided, consisting of three elements: the name of the isolate, the name of the locus and the length of the locus, separated by tabs. The same format is used for files intended for processing in the polysat package for R. However, it is obvious that such a record is not suitable for reviewing the received data. Therefore, we created two scripts: `incrustator.py` (Appendix I), which re-writes the file from the GeneMapper format to the summary table, and `tabletogenemapper.py` (Appendix J), re-writing the data from the table back to the GeneMapper format.

The `incrustator.py` script accepts as input the file "Addition.txt" with new data in the GeneMapper format and the main table "Mainfile.txt" consisting of a header with the names of the loci and subsequent lines starting with the name of the locus and containing the values of the lengths of the loci. In both working files, the columns are separated by tabs. The `incrustator.py` script consists of three main blocks. The first block, on lines 1 through 48, checks the format of the Addition file and checks the completeness of the Mainfile header. The lines of the Addition file are split into blocks of non-whitespace characters. The first elements of lines containing less than three blocks are written to a separate set and then displayed along with an error message. When three blocks are found, the presence of TAB characters between them is checked. If their number is not equal to two, then an error message is also displayed. The set with the names of the loci is collected from the Addition file and checked for their presence in the header of the main table Mainfile. Missing loci are displayed with an error message. The second block of code is 49 to 99 lines long and writes the isolates listed in the Mainfile to a new Appended text file. The first line of the Appended file is written out the contents of the list containing the names of the microsatellite loci. Then a loop is started over all lines of the Mainfile. The string intended for writing to Appended is

collected in the form of a list from the name of the isolate from the Mainfile. The nested loop sequentially adds to it the lengths of the loci from Mainfile and Addition. When several values for one locus are found, they are separated by a hyphen. Appendix K contains an auxiliary script nondouble.py for removing multiple measurements from the table of microsatellite loci lengths. During the rewriting of data on isolates from the Mainfile, a set with names of isolates is collected. The third block from lines 100 to 141 opens the Addition file for reading and the Appended file for the addition. If the name of the isolate is absent in the previously collected set, then the procedure for assembling the list with the lengths of the loci is carried out, after which it is written out in Appended. When blocks 2 and 3 work, each act of adding a number to the line intended for writing to the final file is counted. The resulting amount is displayed on the screen when the script finishes executing.

To expand the capabilities of the microsatellite analysis scheme, we searched for new loci. Alignments of 170 candidate loci were constructed and reviewed. Primers were ordered and tested for 9 loci, and polymorphism was found at 4 loci. Primers for non-polymorphic loci were tested for the following number of isolates: 14-6, 43 pcs.; Bac, 56 pcs.; A9-11 and A14-5 - 21 pcs.; A14-11 - 19 pcs. The range of polymorphism at the new loci Tr007 and Tr008 was within 1 repeat unit, Tr009 – 9 units, Tr010 - 2 units.

The effectiveness of different methods for calculating genetic distances was assessed. We assumed that since the sample of *T. rubrum* isolates was previously divided into two parts by two completely independent methods, the best method for calculating genetic distances from the lengths of microsatellite loci should give similar results. Length data for 10 microsatellite loci were obtained for 50 *T. rubrum* isolates. Genetic distances, with the exception of Bruvo's distances, were calculated using the Populations 1.2.32 program. Bruvo's distances were obtained in the polysat 1.7 package for the R 3.4.3 software environment. Clustering was carried out by the method of joining neighbors. If we imagine that a true cladogram contains a separate branch of isolates with the TERG_02941 793G genotype, then the best indicator for the method of

calculating genetic distances will be characterized by the smallest number of isolates separated from the main group, scattered over the rest of the cladogram. The following results were obtained: Zhivotovsky distances [187]: 6 grouping + 8 scattered isolates of TERG_02941 793G. Cavalli-Sforza and Edwards [188]: 6 + 8. Ney's standard genetic distance [189]: 7 + 7. Bruvo et al. [73]: 9 + 5. Thus, the use of Bruvo distances for microsatellite analysis was found to be optimal. We tried to verify the separate clustering of 6-9 isolates of the TERG_02941 793G genotype, that is, to substantiate a more fractional division of the studied population of *T. rubrum* s. str. for genetic lines, for which the TRS-1 locus was amplified. It was not possible to find a correspondence between the type of electrophoretic profile of PCR products according to TRS-1 and the position of the isolate on the microsatellite tree.

In general, according to the results of our studies, the *T. rubrum* population in the territory of St. Petersburg and Yekaterinburg can be characterized as clonal, represented by two genetic lines, polymorphic in the macromorphology of the isolates. Moreover, phenotypic polymorphism is not associated with the genetic structure of the population.

Our data indicate the presence of two genetic lines of *T. rubrum* on the territory of St. Petersburg and Yekaterinburg. Gong et al. Also find two populations in China, but they get these data in the Structure program. At the same time, this program is applicable only for samples with unlinked loci, and the *T. rubrum* fungus reproduces exclusively clonally. Within the framework of this project, we obtained a true division of the sample of *T. rubrum* isolates into two parts, based on the results of typing by PCR of the TRS-1 rDNA locus and sequencing at two protein-coding loci proposed for this purpose for the first time. Our own experience has shown that under certain settings, the Structure program gives a false division of the sample of isolates processed according to the microsatellite typing scheme of Gong et al. Into two parts, which does not coincide with the typing results according to our proposed scheme. Accurate processing of microsatellite analysis data in specialized software showed that the most advanced typing scheme proposed by the Chinese authors also does not provide an opportunity to identify intraspecific genetic lines within the *T. rubrum* taxon. Thus, the results obtained

within the framework of this project make a significant contribution to the methodological foundations of molecular typing of *T. rubrum*.

As a rule, the proportion of the most common genotype when using the TRS loci typing method exceeds 50%, which requires caution when interpreting negative results obtained by this approach. In addition, our experience shows that the TRS-1 and TRS-2 loci are difficult to amplify. A certain proportion of isolates cannot be typed using this method [141]. However, an important advantage of the method is the comparability of the results obtained by different laboratories. Morphological characters show no correlation with genotypes obtained by PCR at the loci of the nontranscribed rDNA spacer [143].

The serial isolates of *T. rubrum* studied by us belonged to the same clone, being part of the same polymorphic mycelium, since the differences between them were negligible. The phenomenon of genetic polymorphism among the nuclei of a single mycelium is known for a number of fungal species. Thus, 3.2% of nuclei isolated from laboratory strains of the fungus *Neurospora crassa*, had mutations associated with changes in the morphology of the mycelium [190]. Chen J. et al. [191] studied the distribution of genotypes of the ITS region in the nuclei of the *Agaricus subrufescens* fungus strain. Three variants of the sequence of the ITS region were found, two of them were allelic, and the third was located at a special, unrelated locus. This third variant was present only in one of the two constitutive haploid nuclei of mycelium cells. It is believed that the greatest contribution to the formation of genetic diversity is made by the mutational process, but genetically different nuclei can also be obtained by fusion of hyphae and genetic exchange with other mycelium [192]. Genetic polymorphism of micromycetes at the intraspecific level is associated with a number of properties that are important from a practical point of view [193, 194]. In the cases of invasive aspergillosis caused by *Aspergillus fumigatus* studied in [195], all non-respiratory isolates had the same genotype, and the lung isolates exhibited polymorphism. In the original article, this is considered as evidence that the lung cavity is colonized by many isolates of *A. fumigatus*, but only a few isolates acquire the ability to disseminate into

other tissues. Some authors also believe that this phenomenon may be due to the fact that conidial sporulation takes place in the lung cavity, which is accompanied by the occurrence of a significant number of mutations due to a large number of mitotic divisions. In tissues, the reproduction of the fungus occurs only due to the proliferation of the mycelium, and genetic diversity is not generated [196]. Recent studies have linked the type of mating of the *A. fumigatus* isolate and the lethality of the disease it causes [197]. *Candida auris* is another example of the clonal Ascomycete species. One of the genetic lines of this fungus exhibits limited contagiousness, occurring almost exclusively in the auricles. On the contrary, isolates of other lines can cause nosocomial outbreaks of the disease [198]. Despite the fact that the correlation between the phenotypic properties of the *T. rubrum* fungus and its genotypic affiliation has not been revealed at the present time, the above examples suggest that such data will appear over time.

The mycelium polymorphism that we discovered was related to the colonies isolated from the nails, and not from the skin of the feet. This is in agreement with the results of other authors [145, 199], who found various isolates in cases of onychomycosis, not mycosis of the feet. Since it is more logical to expect a greater genetic diversity in the source of infection, and not in secondary foci of the disease, all these observations call into question the understanding of onychomycosis of the feet expressed in [1] as a secondary phenomenon in comparison with fungal skin lesions.

3.6 Comparison of the resolution of typing methods for *Trichophyton rubrum* strains

A comparison was made of the efficiency of two molecular genetic methods for typing *T. rubrum* strains: microsatellite analysis for six microsatellite loci and amplification of loci of secondary repeats of the nontranscribed rDNA spacer. For a sample of 50 strains, 43 individual microsatellite profiles were obtained, which gave a clonal diversity index of 0.86. For the same sample of 50 *T. rubrum* isolates, typing at the loci of the nontranscribed rDNA spacer yielded 10 multilocus genotypes and a much

lower $R = 0.18$, which reflects the higher resolution of the microsatellite analysis method compared to typing at the loci of the nontranscribed rDNA spacer [200].

4 CONCLUSIONS

1. The genus *Trichophyton* is represented by three main clades of the phylogenetic tree: *T. mentagrophytes* / *T. simii*, *T. benhamiae*, *T. rubrum*.

2. The complex *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* includes 10 genotypes: "FM986750", "KT285210" and "MF926358" are common in Europe, genotypes "KT192500", "KU315316" and "KU496915" - in Asia and Oceania. Genotypes "JX122216", "FM986691", "AF170453" and "KP132819" are distributed globally.

3. *Trichophyton mentagrophytes* and *T. interdigitale* belong to the same phylogenetic species based on the results of the analysis of whole genome sequences, sequences of the ITS, LSU, *BT2* loci.

4. The population of *T. rubrum* on the territory of St. Petersburg and Yekaterinburg is represented by two genetic lines identified by typing the fungus strains by three independent molecular genetic methods: DNA sequencing at the TERG_02941 and TERG_03298 loci, PCR at the TRS-1 locus, and microsatellite analysis.

5. Microsatellite analysis of *T. rubrum* has a higher resolution as compared to typing by the secondary repeat loci of the nontranscribed rDNA spacer.

5 RECOMMENDED PRACTICES

1. In view of the detection of the fungus *T. benhamiae* on the territory of the Russian Federation, which is indistinguishable from *T. mentagrophytes* in morphological characteristics, the study of the etiology of dermatomycosis must be carried out by molecular genetic methods.

2. For typing *T. rubrum* fungi, it is preferable to use the method of microsatellite analysis in comparison with PCR at the TRS-1 and TRS-2 loci of the nontranscribed rDNA spacer.

3. When carrying out routine identification of dermatophytes by DNA sequencing, the genotype "KP132819", which occupies an intermediate position between the species *T. mentagrophytes* and *T. interdigitale*, should be referred to the species *T. mentagrophytes*.

CLOSING WORD

Dermatophytes of the genus *Trichophyton* are the main causative agents of onychomycosis in the Russian Federation and other countries of the world. At the same time, there was practically no information about the genotypes of dermatophytes found on the territory of the Russian Federation. In the course of this study, we reconstructed the phylogenetic relationships between species of the genus, for which we used domestic strains for the first time. We got a cladogram reflecting phylogenetic relationships in the genus. It consisted of three main branches: *T. mentagrophytes* / *T. simii*, *T. benhamiae* and *T. rubrum*. We obtained four complete sequences of *T. mentagrophytes* genomes. Their analysis together with the genomes of *T. mentagrophytes* and *T. interdigitale* from the GenBank and a significant amount of nucleotide sequences from the GenBank made it possible to clarify the species boundaries in the *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale* species complex. The results obtained can be used for routine diagnostics of dermatomycosis using Sanger DNA sequencing.

LIST OF ABBREVIATIONS

ABGD — automatic barcode gap discovery

BT2 — a fragment of the gene encoding β -tubulin

DMSO — dimethyl sulfoxide

dNTP — deoxynucleotide triphosphate

EDTA — ethylenediaminetetraacetic acid

GTR — Generalized Symmetric Model of Nucleotide Substitutions

ITS — internal transcribed rDNA spacer

JC69 — Jux-Cantor model of nucleotide substitutions

K2P — Kimura's two-parameter model of nucleotide substitutions

LSU — gene encoding 28S RNA of the large ribosome subunit

ML — maximum likelihood method

MLST — multilocus sequence typing

NJ — neighbor joining method

PCR — polymerase chain reaction

PTP — Poisson Branching Processes

RFLP — restriction fragment length polymorphism

RFU — relative units of fluorescence

SDS — sodium dodecyl sulfate

UPGMA — unweighted pairwise average method

REFERENCES

1. Ameen M., Lear J. T., Madan V., Mohd Mustapa M. F., Richardson M. British Association of Dermatologists' guidelines for the management of onychomycosis 2014 // Br. J. Dermatol. 2014. Vol. 171. P. 937—958.
2. Sergeev A. Y. Modern epidemiology and etiology of onychomycosis, the concept of pathogenesis and new approaches to diagnosis, treatment and prevention: dis. ... doct. med. sciences. M., 2002. 281 p.
3. Vasilyeva N. V., Raznatovsky K. I., Kotrekhova L. P., et al. Etiology of onychomycosis of the feet in St. Petersburg and Moscow. Results of a prospective open multicenter study // Probl. Med. Mikol. 2009. T. 11, No. 2. P. 14—18.
4. Kozhichkina N. V. Etiology of mycoses of feet and onychomycosis // Vestn. dermatol. venerol. 2013. No. 1. P. 9—13.
5. Sigurgeirsson B., Baran R. The prevalence of onychomycosis in the global population: a literature study // J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 2014. Vol. 28. P. 1480—1491.
6. Hainsworth S., Hubka V., Lawrie A. C., Carter D., Vanniasinkam T., Grando D. Predominance of *Trichophyton interdigitale* revealed in podiatric nail dust collections in Eastern Australia // Mycopathologia. 2020. Vol. 185, No. 1. P. 175—185.
7. Mulvaney P. M., Telang G. H., Jellinek N. *Trichophyton rubrum* endonyx onychomycosis resistant to standard oral and topical therapies // Dermatol Online J. 2015. Vol. 21, No. 9. pii: 13030/qt3jb3t80q.
8. Singh A., Masih A., Khurana A., et al. High terbinafine resistance in *Trichophyton interdigitale* isolates in Delhi, India harbouring mutations in the squalene epoxidase gene // Mycoses. 2018. Vol. 61, No. 7. P. 477—484.

9. Index Fungorum [Electronic resource]. URL: www.indexfungorum.org (access date: 23.04.2019).
10. de Hoog G. S., Dukik K., Monod M., et al. Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes // *Mycopathologia*. 2017. Vol. 182, No 1-2. P. 5—31.
11. Packeu A., Stubbe D., Roesems S., et al. Lineages within the *Trichophyton rubrum* complex // *Mycopathologia*. 2020. Vol. 185, No. 1. P. 123—136.
12. Čmoková A., Rezaei-Matehkolaei A., Kuklová I., et al. Discovery of new *Trichophyton* members, *T. persicum* and *T. spiraliforme* spp. nov., as a cause of highly inflammatory tinea cases in Iran and Czechia // *Microbiol. Spectr.* 2021. Vol. 9, No. 2. e0028421.
13. Pupkova M. A. Diagnostic value of various micromycetes isolated from nail plates: dis. ... cand. med. sciences. SPb., 2010. 107 p.
14. Kubasova N. L. Features of diagnosis and treatment of onychomycosis caused by non-dermatophytes: dis. ... cand. med. sciences. SPb., 2015. 121 p.
15. Hagen F., Lumbsch H. T., Arsic Arsenijevic V., et al. Importance of resolving fungal nomenclature: the case of multiple pathogenic species in the *Cryptococcus* genus // *mSphere*. 2017. Vol. 2, No. 4. pii: e00238-17.
16. Ohst T., de Hoog S., Presber W., Stavrakieva V., Gräser Y. Origins of microsatellite diversity in the *Trichophyton rubrum*-*T. violaceum* clade (Dermatophytes) // *J. Clin. Microbiol.* 2004. Vol. 42. P. 4444—4448.
17. Gräser Y., Fröhlich J., Presber W., de Hoog S. Microsatellite markers reveal geographic population differentiation in *Trichophyton rubrum* // *J. Med. Microbiol.* 2007. Vol. 56. P. 1058—1065.

18. Gong J., Wu W., Ran M., et al. Population differentiation and genetic diversity of *Trichophyton rubrum* as revealed by highly discriminatory microsatellites // Fungal Genet. Biol. 2016. Vol. 95. P. 24—29.
19. Persinoti G. F., Martinez D. A., Li W., et al. Whole genome analysis illustrates global clonal population structure of the ubiquitous dermatophyte pathogen *Trichophyton rubrum* // Genetics. 2018. Vol. 208. P. 1657—1669.
20. Heidemann S., Monod M., Gräser Y. Signature polymorphisms in the internal transcribed spacer region relevant for the differentiation of zoophilic and anthropophilic strains of *Trichophyton interdigitale* and other species of *T. mentagrophytes* sensu lato // Br. J. Dermatol. 2010. Vol. 162. P. 282—295.
21. Takashio M. Une nouvelle forme sexuee du complexe *Trichophyton mentagrophytes*, *Arthroderma vanbreuseghemii* sp. nov. // Annales de Parasitologie. 1973. Vol. 48. P. 713—732.
22. Li W., Metin B., White T. C., Heitman J. Organization and evolutionary trajectory of the mating type (*MAT*) locus in dermatophyte and dimorphic fungal pathogens // Eukaryot. Cell. 2010. Vol. 9. P. 46—58.
23. Stockdale P. M. Sexual stimulation between *Arthroderma simii* Stockd., Mackenzie and Austwick and related species // Sabouraudia. 1968. Vol. 6. P. 176—181.
24. Gräser Y., Scott J., Summerbell R. The new species concept in dermatophytes—a polyphasic approach // Mycopathologia. 2008. Vol. 166, No. 5-6. P. 239—256.
25. Summerbell R. C. Form and function in the evolution of dermatophytes / R. K. S. Kushwaha and J. Guarro (ed.), Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi. Revista Iberoamericana de Micologia. Bilbao, Spain, 2000. P. 30—43.
26. Metin B., Heitman J. Sexual reproduction in dermatophytes // Mycopathologia. 2017. Vol. 182. P. 45—55.

27. Kosanke S., Hamann L., Kupsch C., Moreno Garcia S., Chopra A., Gräser Y. Unequal distribution of the mating type (*MAT*) locus idiomorphs in dermatophyte species // *Fungal Genet Biol.* 2018. Vol. 118. P. 45—53.
28. Martinez D. A., Oliver B. G., Gräser Y., et al. Comparative genome analysis of *Trichophyton rubrum* and related dermatophytes reveals candidate genes involved in infection // *mBio.* 2012. Vol. 3, No. 5. e00259–12.
29. Cervelatti E. P., Ferreira-Nozama M. S., Aquino-Ferreira R., Fachin A. L., Martinez-Rossi N. M. Electrophoretic molecular karyotype of the dermatophyte, *Trichophyton rubrum* // *Genetics and Molecular Biology.* 2004. Vol. 27. P. 99—102.
30. Malmsten P. H. *Trichophyton tonsurans*, der haarscheerende Schimmel: Ein Beitrag zur Auseinandersetzung der Krankheiten, welche das Abfallen der Haare bewirken // *Arch. Anat. Physiol. Wiss. Med.* 1848. S. 1—19.
31. Su H., Packeu A., Ahmed S. A., et al. Species distinction in the *Trichophyton rubrum* complex // *J. Clin. Microbiol.* 2019. Vol. 57, No. 9. e00352-19.
32. Čmoková A., Kolařík M., Dobiáš R., et al. Resolving the taxonomy of emerging zoophilic pathogens in the *Trichophyton benhamiae* complex // *Fungal Diversity.* 2020. Vol. 104, No. 1. P. 333—387.
33. Kandemir H., Dukik K., Hagen F., Ilkit M., Gräser Y., de Hoog G. S. Polyphasic discrimination of *Trichophyton tonsurans* and *T. equinum* from humans and horses // *Mycopathologia.* 2020. Vol. 185, No. 1. P. 113—122.
34. Kashkin P. N. *Dermatomycoosis. L. : Medgiz, 1950. 226 p.*
35. Sabouraud R. *Maladies du Cuir Chevelu. III. Les Cryptogamiques. Les Teignes.* Paris, France : Atlas, Masson, 1910. 855 p.
36. Kane J., Summerbell R., Sigler L., Kraijden S., Land G. *Laboratory Handbook of Dermatophytes.* Belmont, USA : Star Publishing, 1997. 344 p.

37. Langeron M., Vanbreuseghem E. Précis de Mycologie, 2e édition. Paris : Masson et Cie, 1952. 703 p.
38. Georg L. K. The nutritional requirements of the faviform *Trichophyton* // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1950. Vol. 50. P. 1315—1347.
39. Shadomy H. J., Philpot C. M. Utilization of standard laboratory methods in the laboratory diagnosis of problem dermatophytes // Am. J. Clin. Pathol. 1980. Vol. 74. P. 197—201.
40. Dawson C. O., Gentles J. C. The perfect states of *Keratinomyces ajelloi* Vanbreuseghem, *Trichophyton terrestre* Durie and Frey and *Microsporum nanum* Fuentes // Sabouraudia. 1961. Vol. 1. P. 49—57.
41. Currah R. S. Taxonomy of the Onygenales. Arthrodermataceae, Myxotrichaceae and Onygenaceae // Mycotaxon. 1985. Vol. 24. P. 1—216.
42. Weitzman I., McGinnis M. R., Padhye A. A., Ajello L. The genus *Arthroderma* and its synonym *Nannizzia* // Mycotaxon. 1986. Vol. 25. P. 505—518.
43. Kawasaki M. Verification of a taxonomy of dermatophytes based on mating results and phylogenetic analyses // Med. Mycol. J. 2011. Vol. 52. P. 291—295.
44. Cafarchia C., Weigl S., Figueredo L. A., Otranto D. Molecular identification and phylogenesis of dermatophytes isolated from rabbit farms and rabbit farm workers // Vet. Microbiol. 2012. Vol. 154, No. 3-4. P. 395—402.
45. Larionov M. D., Chilina G. A., Bogdanova T. V., Pchelin I. M. A rare clinical case of dermatomycosis of smooth skin and large folds caused by the fungus *Trichophyton mentagrophytes* of exotic genotype // Problems of medical mycology. 2017. Vol. 19, No. 2. P. 95.
46. Chowdhary A., Singh A., Singh P. K., Khurana A., Meis J. F. Perspectives on misidentification of *Trichophyton interdigitale*/*Trichophyton mentagrophytes* using

internal transcribed spacer region sequencing: Urgent need to update the sequence database // *Mycoses*. 2019. Vol. 62, No. 1. P. 11—15.

47. Woodgyer A. The curious adventures of *Trichophyton equinum* in the realm of molecular biology: a modern fairy tale // *Med. Mycol.* 2004. Vol. 42, No. 5. P. 397—403.

48. Kawasaki M., Aoki M., Ishizaki H., Nishio K., Mochizuki T., Watanabe S. Phylogenetic relationships of the genera *Arthroderma* and *Nannizzia* inferred from mitochondrial DNA analysis // *Mycopathologia*. 1992. Vol. 118, No. 2. P. 95—102.

49. Mochizuki T., Takada K., Watanabe S., Kawasaki M., Ishizaki H. Taxonomy of *Trichophyton interdigitale* (*Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*) by restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA // *J. Med. Vet. Mycol.* 1990. Vol. 28. P. 191—196.

50. Gräser Y., El Fari M., Vilgalys R., et al. Phylogeny and taxonomy of the family Arthrodermataceae (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region // *Med. Mycol.* 1999. Vol. 37, No. 2. P. 105—114.

51. Kawasaki M., Anzawa K., Ushigami T., Kawanishi J., Mochizuki T. Multiple gene analyses are necessary to understand accurate phylogenetic relationships among *Trichophyton* species // *Med. Mycol. J.* 2011. Vol. 52, No. 3. P. 245—254.

52. Mirhendi H., Makimura K., de Hoog G. S., et al. Translation elongation factor 1- α gene as a potential taxonomic and identification marker in dermatophytes // *Med. Mycol.* 2015. Vol. 53. P. 215—224.

53. Pchelin I. M., Zlatogursky V. V., Rudneva M. V., et al. Reconstruction of phylogenetic relationships in dermatomycete genus *Trichophyton* Malmsten 1848 based on ribosomal internal transcribed spacer region, partial 28S rRNA and beta-tubulin genes sequences // *Mycoses*. 2016. Vol. 59, No. 9. P. 566—575.

54. Rezaei-Matehkolaei A., Mirhendi H., Makimura K., et al. Nucleotide sequence analysis of beta tubulin gene in a wide range of dermatophytes // *Med. Mycol.* 2014. Vol. 52. P. 674—688.
55. Ahmadi B., Mirhendi H., Makimura K., et al. Phylogenetic analysis of dermatophyte species using DNA sequence polymorphism in calmodulin gene // *Med. Mycol.* 2016. Vol. 54. P. 500—514.
56. Beguin H., Pyck N., Hendrickx M., Planard C., Stubbe D., Detandt M. The taxonomic status of *Trichophyton quinckeanum* and *T. interdigitale* revisited: a multigene phylogenetic approach // *Med. Mycol.* 2012. Vol. 50. P. 871—882.
57. Pavlinov I. Y., Lyubarskiy G. Y. Biological systematics: the evolution of ideas. M.: Partnership of scientific publications KMK, 2011. 667 p.
58. Kartavtsev Y. F. Genetic divergence of species and other taxa. Geographic speciation and the genetic paradigm of neo-Darwinism in action // *Adv. mod. biology.* 2013. T. 133, No. 5. P. 419-451.
59. Koumandou V. L., Wickstead B., Ginger M. L., van der Giezen M., Dacks J. B., Field M. C. Molecular paleontology and complexity in the last eukaryotic common ancestor // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2013. Vol. 48, No. 4. P. 373—396.
60. Weiss M. C., Sousa F. L., Mrnjavac N., et al. The physiology and habitat of the last universal common ancestor // *Nat. Microbiol.* 2016. Vol. 1, No. 9. P. 16116.
61. Abilev S. K., Glazer V. M., Aslanyan M. M. Fundamentals of mutagenesis and genotoxicology. Lectures: study guide. M. ; SPb. : Nestor-History, 2012. 148 p.
62. Abdel-Rahman S. M., Sugita T., González G. M., et al. Divergence among an international population of *Trichophyton tonsurans* isolates // *Mycopathologia.* 2010. Vol. 169, No. 1. P. 1—13.

63. Pozdnyakov I. R., Sokolova A. M., Ereskovsky A. V., Karpov S. A. Kinetid structure of choanoflagellates and choanocytes of sponges does not support their close relationship // *Protistology*. 2017. Vol. 11, No. 4. P. 248—264.

64. Hubka V., Peano A., Cmokova A., Guillot J. Common and emerging dermatophytoses in animals: well-known and new threats. In: Seyedmousavi S, de Hoog G, Guillot J, Verweij P, eds. *Emerging and epizootic fungal infections in animals*. Cham: Springer; 2018. P. 31—79.

65. Tang C., Kong X., Ahmed S. A., et al. Taxonomy of the *Trichophyton mentagrophytes*/*T. interdigitale* species complex harboring the highly virulent, multiresistant genotype *T. indotineae* // *Mycopathologia*. 2021. Vol. 186, No. 3. P. 315—326.

66. Tran V. D. T., De Coi N., Feuermann M., et al. RNA sequencing-based genome reannotation of the dermatophyte *Arthroderma benhamiae* and characterization of its secretome and whole gene expression profile during infection // *mSystems*. 2016. Vol. 1, No. 4. e00036-16.

67. Li Y. C., Korol A. B., Fahima T., Beiles A., Nevo E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review // *Mol. Ecol.* 2002. Vol. 11, No. 12. P. 2453—2465.

68. Lynch M., Sung W., Morris K., et al. A genome-wide view of the spectrum of spontaneous mutations in yeast // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008. Vol. 105. P. 9272—9277.

69. Lynch M. Evolution of the mutation rate // *Trends Genet.* 2010. Vol. 26, No. 8. P. 345—352.

70. Zhu Y.O., Siegal M. L., Hall D. W., Petrov D. A. Precise estimates of mutation rate and spectrum in yeast // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014. Vol. 111, No. 22. P. E2310—E2318.

71. Misof B., Rickert A. M., Buckley T. R., Fleck G., Sauer K. P. Phylogenetic signal and its decay in mitochondrial SSU and LSU rRNA gene fragments of Anisoptera // *Mol. Biol. Evol.* 2001. Vol. 18. P. 27—37.
72. Rozenfeld A. F., Arnaud-Haond S., Hernández-García E., et al. Spectrum of genetic diversity and networks of clonal organisms // *J. R. Soc. Interface.* 2007. Vol. 4, No. 17. P. 1093—1102.
73. Bruvo R., Michiels N. K., D'Souza T. G., Schulenburg H. A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level // *Mol. Ecol.* 2004. Vol. 13, No. 7. P. 2101—2106.
74. Jukes T. H., Cantor C. R. Evolution of protein molecules // *Mammalian Protein Metabolism* / H.N. Munro, ed. New York : Academic Press, 1969. P. 21—123.
75. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // *J. Mol. Evol.* 1980. Vol. 16, No. 2. P. 111—120.
76. Tavaré S. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences // *Lectures on Mathematics in the Life Sciences.* 1986. Vol. 17. P. 57—86.
77. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // *Evolution.* 1985. Vol. 39. P. 783—791.
78. Wägele J. W., Letsch H., Klussmann-Kolb A., Mayer C., Misof B., Wägele H. Phylogenetic support values are not necessarily informative: the case of the Serialia hypothesis (a mollusk phylogeny) // *Frontiers in Zoology.* 2009. Vol. 6. 12.
79. Wägele J. W., Mayer C. Visualizing differences in phylogenetic information content of alignments and distinction of three classes of long-branch effects // *BMC Evol. Biol.* 2007. Vol. 7. 147.

80. Yu X., Reva O. N. SWPhylo – a novel tool for phylogenomic inferences by comparison of oligonucleotide patterns and integration of genome-based and gene-based phylogenetic trees // *Evol. Bioinform. Online*. 2018. Vol. 14. 1176934318759299.
81. Kohn L. M. Mechanisms of fungal speciation // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2005. Vol. 43. P. 279—308.
82. Giraud T., Refrégier G., Le Gac M., de Vienne D. M., Hood M. E. Speciation in fungi // *Fungal Genetics and Biology*. 2008. Vol. 45. P. 791—802.
83. Restrepo S., Tabima J. F., Mideros M. F., Grünwald N. J., Matute D. R. Speciation in fungal and oomycete plant pathogens // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2014. Vol. 52. P. 289—316.
84. Mirarab S., Reaz R., Bayzid M. S., Zimmermann T., Swenson M. S., Warnow T. ASTRAL: Genome-scale coalescent-based species tree estimation // *Bioinformatics*. 2014. Vol. 30. P. i541—i548.
85. Rannala B. The art and science of species delimitation // *Curr. Zool.* 2015. Vol. 61. P. 846—853.
86. Puillandre N., Lambert A., Brouillet S., Achaz G. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation // *Mol. Ecol.* 2012. Vol. 21, No. 8. P. 1864—1877.
87. Zhang J., Kapli P., Pavlidis P., Stamatakis A. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements // *Bioinformatics*. 2013. Vol. 29, No. 22. P. 2869—2876.
88. de Valk H. Exact molecular typing of *Aspergillus fumigatus*. Methods and applications. Wageningen, the Netherlands : Ponsen & Looijen, 2008. 205 p.
89. Brown A. H. D., Feldman M. W., Nevo E. Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum* // *Genetics*. 1980. Vol. 96. P. 523—536.

90. Sergeev A. Y., Sergeev Y. V. Fungal infections. A guide for doctors. 2nd ed. M. : Publishing house BINOM, 2008. 480 p.
91. Diagnosis and treatment of mycoses in the intensive care and intensive care units: Russian recommendations / Otv. ed. N.N. Klimko. 2nd ed. add. and revised M.: Pharmtek, 2015.96 p.
92. Ford C. B., Funt J. M., Abbey D., et al. The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans* // Elife. 2015. Vol. 4. e00662.
93. Sharma C., Nelson-Sathi S., Singh A., Radhakrishna Pillai M., Chowdhary A. Genomic perspective of triazole resistance in clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates without *cyp51A* mutations // Fungal Genetics and Biology. 2019. Vol. 132. 103265.
94. Mahmoudi S, Badali H, Rezaie S, et al. A simple and low cost tetra-primer ARMS-PCR method for detection triazole-resistant *Aspergillus fumigatus*. Molecular Biology Reports. 2019. Vol. 46, No. 4. P. 4537—4543.
95. Verma S. B., Panda S., Nenoff P., et al. The unprecedented epidemic-like scenario of dermatophytosis in India: I. Epidemiology, risk factors and clinical features // Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol. 2021. Vol. 87, No. 2. P. 154—175.
96. Taghipour S., Pchelin I. M., Zarei Mahmoudabadi A., et al. *Trichophyton mentagrophytes* and *T. interdigitale* genotypes are associated with particular geographic areas and clinical manifestations // Mycoses. 2019. Vol. 62, No. 11. P. 1084—1091.
97. Kwon-Chung K. J., Bennett E. J. Dermatophytosis: medical mycology. Philadelphia : Lea & Febiger, 1992. P. 136—161.
98. Pchelin I. M., Azarov D. V., Churina M. A., et al. Species boundaries in the *Trichophyton mentagrophytes* / *T. interdigitale* species complex // Med. Mycol. 2019. Vol. 57, No. 6. P. 781—789.

99. Nenoff P., Verma S. B., Ebert A., et al. Spread of terbinafine-resistant *Trichophyton mentagrophytes* Type VIII (India) in Germany-"The tip of the iceberg?" // *J. Fungi (Basel)*. 2020. Vol. 6, No. 4. 207.
100. Symoens F., Jousson O., Planard C., et al. Molecular analysis and mating behaviour of the *Trichophyton mentagrophytes* species complex // *Int. J. Med. Microbiol.* 2011. Vol. 301, No. 3. P. 260—266.
101. Taylor J. W. Evolutionary perspectives on human fungal pathogens // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2015. Vol. 5, No. 9. a019588.
102. Tibayrenc M., Ayala F. J. Reproductive clonality of pathogens: a perspective on pathogenic viruses, bacteria, fungi, and parasitic protozoa // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012. Vol. 109, No. 48. E3305-13.
103. Smith J. M., Smith N. H., O'Rourke M., Spratt B. G. How clonal are bacteria? // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993. Vol. 90, No. 10. P. 4384—4388.
104. Tibayrenc M., Ayala F. J. Models in parasite and pathogen evolution: Genomic analysis reveals predominant clonality and progressive evolution at all evolutionary scales in parasitic protozoa, yeasts and bacteria // *Adv. Parasitol.* 2021. Vol. 111. P. 75—117.
105. Moosavi A, Ghazvini RD, Ahmadikia K, et al. The frequency of fungi isolated from the skin and hair of asymptomatic cats in rural area of Meshkin-shahr-Iran // *J. Mycol. Med.* 2019. Vol. 29, No. 1. P. 14—18.
106. Pérez-Laguna V., Rezusta A., Ramos J. J., et al. Daylight photodynamic therapy using methylene blue to treat sheep with dermatophytosis caused by *Arthroderma vanbreuseghemii* // *Small Ruminant Research*. 2017. Vol. 150. P. 97—101.

107. Tartor Y. H., El Damaty H. M., Mahmmod Y. S. Diagnostic performance of molecular and conventional methods for identification of dermatophyte species from clinically infected Arabian horses in Egypt // *Veterinary dermatology*. 2016. Vol. 27, No. 5. P. 401—e102.
108. Diongue K., Brécharde L., Diallo M. A., et al. A comparative study on phenotypic versus ITS-based molecular identification of dermatophytes isolated in Dakar, Senegal // *Int. J. Microbiol.* 2019. Vol. 2019. P. 1—6.
109. Frías-De-León M. G., Martínez-Herrera E., Atoche-Diéguez C. E., et al. Molecular identification of isolates of the *Trichophyton mentagrophytes* complex // *Int. J. Med. Sci.* 2020. Vol. 17, No. 1. P. 45—52.
110. Summerbell R. C., Moore M. K., Starink-Willemse M., Van Iperen A. ITS barcodes for *Trichophyton tonsurans* and *T. equinum* // *Med. Mycol.* 2007. Vol. 45, No. 3. P. 193—200.
111. Singh A., Masih A., Monroy-Nieto J., et al. A unique multidrug-resistant clonal *Trichophyton* population distinct from *Trichophyton mentagrophytes/Trichophyton interdigitale* complex causing an ongoing alarming dermatophytosis outbreak in India: Genomic insights and resistance profile // *Fungal Genet. Biol.* 2019. Vol. 133. 103266.
112. Gräser Y., Kuijpers A. F., Presber W., de Hoog G. S. Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* complex // *J. Clin. Microbiol.* 2000. Vol. 38. P. 3329—3336.
113. Castellani A. Observation on a new species of *Epidermophyton* found in tinea cruris // *Br. J. Dermatol.* 1910. Vol. 5. P. 148—150.
114. Zhan P., Dukik K., Li D., et al. Phylogeny of dermatophytes with genomic character evaluation of clinically distinct *Trichophyton rubrum* and *T. violaceum* // *Studies in Mycology*. 2018. Vol. 89. P. 153—175.

115. Makimura K., Tamura Y., Mochizuki T., et al. Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions // J. Clin. Microbiol. 1999. Vol. 37, No. 4. No. 920—924.

116. Hryniewicz-Gwóźdź A., Jagielski T., Dobrowolska A., Szepietowski J. C., Baran E. Identification and differentiation of *Trichophyton rubrum* clinical isolates using PCR-RFLP and RAPD methods // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2011. Vol. 30, No. 6. P. 727—731.

117. Faggi E., Pini G., Campisi E., Bertellini C., Difonzo E., Mancianti F. Application of PCR to distinguish common species of dermatophytes // J. Clin. Microbiol. 2001. Vol. 39. P. 3382—3385.

118. Gräser Y., Kühnisch J., Presber W. Molecular markers reveal exclusively clonal reproduction in *Trichophyton rubrum* // J. Clin. Microbiol. 1999. Vol. 37, No. 11. P. 3713—3717.

119. L'Ollivier C., Ranque S. MALDI-TOF-based dermatophyte identification // Mycopathologia. 2017. Vol. 182. P. 183—192.

120. Nenoff P., Erhard M., Simon J. C., et al. MALDI-TOF mass spectrometry—a rapid method for the identification of dermatophyte species // Med. Mycol. 2013. Vol. 51. P. 17—24.

121. Liu D., Pearce L., Lilley G., Coloe S., Baird R., Pedersen J. PCR identification of dermatophyte fungi *Trichophyton rubrum*, *T. soudanense* and *T. gourvilii* // J. Med. Microbiol. 2002. Vol. 51. P. 117—122.

122. Grigoryan K. V., Tollefson M. M., Olson M. A., Newman C. C. Pediatric tinea capitis caused by *Trichophyton violaceum* and *Trichophyton soudanense* in Rochester, Minnesota, United States // Int. J. Dermatol. 2019. Vol. 58, No. 8. P. 912—915.

123. Blank F., Day W., Just G. The isolation of xanthomegnin from *Trichophyton megninii* // J. Invest. Dermatol. 1963. Vol. 40. P. 133—137.
124. Wirth J. C., Beesley T. E., Anand S. R.. The isolation of xanthomegnin from several strains of the dermatophyte, *Trichophyton rubrum* // Phytochemistry. 1965. Vol. 4. P. 505—509.
125. Blank F., Ng A., Just G. Isolation and tentative structures of vioxanthin and viopurpurin, two colored metabolites of *Trichophyton violaceum* // Can. J. Chem. 1966. Vol. 44. P. 2873—2879.
126. Gupta A. K., Ahmad I., Borst I., Summerbell R. C. Detection of xanthomegnin in epidermal materials infected with *Trichophyton rubrum*. J. Invest. Dermatol. 2000. Vol. 115. P. 901—905.
127. Ates A., Ozcan K., Ilkit M. Diagnostic value of morphological, physiological and biochemical tests in distinguishing *Trichophyton rubrum* from *Trichophyton mentagrophytes* complex // Med. Mycol. 2008. Vol. 46. P. 811—822.
128. Adamski Z., Kowalczyk M. J., Adamska K., et al. The first non-African case of *Trichophyton rubrum* var. *raubitschekii* or a urease-positive *Trichophyton rubrum* in Central Europe? // Mycopathologia. 2014. Vol. 178, No. 1-2. P. 91—96.
129. Scott J. A., Untereiner W. A. Determination of keratin degradation by fungi using keratin azure // Med. Mycol. 2004. Vol. 42. P. 239—246.
130. Jousson O., Lechenne B., Bontems O., et al. Secreted subtilisin gene family in *Trichophyton rubrum* // Gene. 2004. Vol. 339. P. 79—88.
131. Mercer D. K., Stewart C.S. Keratin hydrolysis by dermatophytes // Med. Mycol. 2018. Vol. 57. P. 13—22.
132. Theel E. S., Hall L., Mandrekar J., Wengenack N. L. Dermatophyte identification using matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry // J. Clin. Microbiol. 2011. Vol. 49. P. 4067—4071.

133. Kieliger S., Glatz M., Cozzio A., Bosshard P. P. Tinea capitis and tinea faciei in the Zurich area - an 8-year survey of trends in the epidemiology and treatment patterns // *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2015. Vol. 29, No. 8. P. 1524—1529.
134. Lamb S. R., Rademaker M. Tinea due to *Trichophyton violaceum* and *Trichophyton soudanense* in Hamilton // *N. Z. Aust. J. Dermatol.* 2001. Vol. 42, No. 4. P. 260—263.
135. Magill S. S., Manfredi L., Swiderski A., Cohen B., Merz W. G. Isolation of *Trichophyton violaceum* and *Trichophyton soudanense* in Baltimore // *Md. J. Clin. Microbiol.* 2007. Vol. 45, No. 2. P. 461—465.
136. Coulibaly O., Kone A. K., Niaré-Doumbo S., et al. Dermatophytosis among schoolchildren in three ecoclimatic zones of Mali // *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016. Vol. 10, No. 4. e0004675.
137. Farina C., Fazii P., Imberti G., Lombardi G., Passera M., Andreoni S. *Trichophyton violaceum* and *T. soudanense*: reemerging pathogens in Italy, 2005–2013 // *New Micobiol.* 2015. Vol. 38, No. 3. P. 409—415.
138. Irinyi L., Lackner M., de Hoog G. S., Meyer W. DNA barcoding of fungi causing infections in humans and animals // *Fungal Biol.* 2016. Vol. 120, No. 2. P. 125—136.
139. Kong F., Tong Z., Chen X., et al. Rapid identification and differentiation of *Trichophyton* species, based on sequence polymorphisms of the ribosomal internal transcribed spacer regions, by rolling-circle amplification // *J. Clin. Microbiol.* 2008. Vol. 46, No. 4. P. 1192—1199.
140. Varsavsky E., Ajello L. The perfect and imperfect forms of a new keratinophilic fungus *Arthroderma ciferrii* sp. nov.: *Trichophyton georgii* sp. nov. // *Riv. Patol. Veg.* 1964. Vol. 4. P. 351—364.

141. Jackson C. J., Barton R. C., Kelly S. L., Evans E. G. Strain identification of *Trichophyton rubrum* by specific amplification of subrepeat elements in the ribosomal DNA nontranscribed spacer // J. Clin. Microbiol. 2000. Vol. 38. P. 4527—4534.
142. Baeza L. C., Matsumoto M. T., Almeida A. M., Mendes-Giannini M. J. Strain differentiation of *Trichophyton rubrum* by randomly amplified polymorphic DNA and analysis of rDNA nontranscribed spacer // J. Med. Microbiol. 2006. Vol. 55. P. 429—436.
143. Hryniewicz-Gwóźdź A., Jagielski T., Sadakierska-Chudy A., et al. Molecular typing of *Trichophyton rubrum* clinical isolates from Poland // Mycoses. 2011. Vol. 54, No. 6. P. e726—e736.
144. Pchelin I. M., Azarov D. V., Chilina G. A., Dmitriev K. A., Vasilyeva N. V., Taraskina A. E. Single nucleotide polymorphism in a local population of *Trichophyton rubrum* // Med. Mycol. 2018. Vol. 56. P. 125—128.
145. Yazdanparast A., Jackson C. J., Barton R. C., Evans E. G. Molecular strain typing of *Trichophyton rubrum* indicates multiple strain involvement in onychomycosis // Br. J. Dermatol. 2003. Vol. 148, No. 1. P. 51—54.
146. Rad M. M., Jackson C., Barton R. C., Evans E. G. Single strains of *Trichophyton rubrum* in cases of tinea pedis // J. Med. Microbiol. 2005. Vol. 54. P. 725—726.
147. White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J, White T (eds), PCR protocols: A guide to methods and applications. Orlando, FL : Academic Press, 1990. P. 315—322.
148. O'Donnell K. *Fusarium* and its near relatives. In: Reynolds DR, Taylor JW (eds), The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics. Wallingford, UK : CAB International, 1993. P. 225—233.

149. Glass N. L., Donaldson G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes // *Appl. Environ. Microbiol.* 1995. Vol. 61. P. 1323—1330.
150. Pchelin I. M., Mochalov Y. V., Azarov D. V., et al. Genotyping of Russian isolates of *Trichophyton rubrum*, based on simple sequence repeat and single nucleotide polymorphism // *Mycoses.* 2020. Vol. 63. P. 1244—1254.
151. Gouy M., Guindon S., Gascuel O. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building // *Mol. Biol. Evol.* 2010. Vol. 27. P. 221—224.
152. Ninet B., Jan I., Bontems O., et al. Identification of dermatophyte species by 28S ribosomal DNA sequencing with a commercial kit // *J. Clin. Microbiol.* 2003. Vol. 41, No. 2. P. 826—830.
153. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies // *Bioinformatics.* 2014. Vol. 30. P. 1312—1313.
154. Ronquist F., Huelsenbeck J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // *Bioinformatics.* 2003. Vol. 19. P. 1572—1574.
155. Huson D. H., Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies // *Mol. Biol. Evol.* 2006. Vol. 23, No. 2. P. 254—267.
156. Garcia Garces H., Hrycyk M. F., Giacobino J., et al. Molecular identification and phylogenetical analysis of dermatophyte fungi from Latin America. *Mycoses.* 2016; 59(12): 787–797.
157. Clark L., Jasieniuk M. Polysat: an R package for polyploid microsatellite analysis // *Mol. Ecol. Resour.* 2011. Vol. 11, № 3. P. 562—566.
158. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T. L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction // *BMC Bioinformatics.* 2012. Vol. 13. P. 134.

159. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data [Electronic resource]. URL: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc> (дата обращения: 2010).
160. Bolger A. M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // *Bioinformatics*. 2014. Vol. 30. P. 2114—2120.
161. Nurk S., Bankevich A., Antipov D., et al. Assembling genomes and minimetagenomes from highly chimeric reads. In: Deng M, Jiang R, Sun F, Zhang X, eds. *Research in Computational Molecular Biology. RECOMB 2013. Lecture Notes in Computer Science*, vol 7821. Berlin : Springer, 2013. P. 158—170.
162. Mirarab S., Reaz R., Bayzid M. S., Zimmermann T., Swenson M. S., Warnow T. ASTRAL: Genome-scale coalescent-based species tree estimation // *Bioinformatics*. 2014. Vol. 30. P. i541—i548.
163. Treangen T. J., Ondov B. D., Koren S., Phillippy A. M. The Harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes // *Genome Biol*. 2014. Vol. 15. P. 524.
164. Kurtz S., Phillippy A., Delcher A. L., et al. Versatile and open software for comparing large genomes // *Genome Biol*. 2004. Vol. 5, No. 2. R12.
165. Cingolani P., Platts A., Wang le L., et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3 // *Fly (Austin)*. 2012. Vol. 6, No. 2. P. 80—92.
166. PCR in real time / D. V. Rebrikov [and others]; ed. d. b. n. D. V. Rebrikov. 5th ed. M. : BINOM. Knowledge Laboratory, 2014. 223 p.
167. Arnaud-Haond S., Duarte C. M., Alberto F., Serrão E. A. Standardizing methods to address clonality in population studies // *Mol. Ecol*. 2007. Vol. 16, No. 24. P. 5115—5139.

168. Elinov N. P. Dermatophytes (Lecture). Tutorial. SPb. : KOSTA, 2010. 48 p.
169. Brownrigg R., Becker R. A., Wilks A. R., Minka T. P., Deckmyn A. Maps: Draw Geographical Maps. R package version 3.1.0 [Электронный ресурс]. URL: <https://CRAN.Rproject.org/package=maps> (дата обращения: 2018).
170. Kahle D., Wickham H. Ggmap: Spatial visualization with ggplot2 // The R Journal. 2013. Vol. 5, No. 304. P. 144—161.
171. Baas Becking L. G. M. Geobiologie of inleiding tot de milieukunde. The Hague, the Netherlands : W.P. Van Stockum & Zoon, 1934. 263 p.
172. Foissner W. Biogeography and dispersal of micro-organisms: A review emphasizing protists // Acta Protozool. 2006. Vol. 45. P. 111—136.
173. Van der Gast C. J. Microbial biogeography: the end of the ubiquitous dispersal hypothesis? // Environmental Microbiology. 2014. Vol. 17, No. 3. P. 544—546.
174. Jean K., Burnside W. R., Carlson L., Smith K., Guegan J.-F. An equilibrium theory signature in the island biogeography of human parasites and pathogens // Global Ecol. Biogeogr. 2016. Vol. 25. P. 107—116.
175. Pchelin I. M., Azarov D. V., Churina M. A., et al. Whole genome sequence of first *Candida auris* strain, isolated in Russia // Med. Mycol. 2020. Vol. 58, No. 3. P. 414—416.
176. Ropars J., Maufrais C., Diogo D., et al. Gene flow contributes to diversification of the major fungal pathogen *Candida albicans* // Nat Commun. 2018. Vol. 9, No. 1. 2253.
177. Boutellis A., Abi-Rached L., Raoult D. The origin and distribution of human lice in the world // Infect. Genet. Evol. 2014. Vol. 23. P. 209—217.

178. Yuen L. K. W., Littlejohn M., Duchêne S., et al. Tracing ancient human migrations into Sahul using hepatitis B virus genomes // *Mol. Biol. Evol.* 2019. Vol. 36, No. 5. P. 942—954.

179. Vyas D. N., Kitchen A., Miró-Herrans A. T., Pearson L. N., Al-Meerri A., Mulligan C. J. Bayesian analyses of Yemeni mitochondrial genomes suggest multiple migration events with Africa and Western Eurasia // *Am. J. Phys. Anthropol.* 2016. Vol. 159, No. 3. P. 382—393.

180. Grob H., Wyss F., Wenker C., et al. *Trichophyton mentagrophytes*-from snow leopard to man: A molecular approach for uncovering the chain of infection // *Hautarzt.* 2018. Vol. 69, No. 12. P. 1021—1032.

181. Süß A., Uhrlaß S., Ludes A., et al. Extensive tinea corporis due to a terbinafine-resistant *Trichophyton mentagrophytes* isolate of the Indian genotype in a young infant from Bahrain in Germany // *Hautarzt.* 2019. Vol. 70, No. 11. P. 888—896.

182. Medvedeva T. V., Leina L. M., Petunova Y. G., Chilina G. A., Pchelin I. M. Anthropophilic trichophytosis: understanding of etiology, epidemiology, differential diagnosis. Clinical cases and literature review // *Probl. Med. Mikol.* 2021. Vol. 23, No. 3. P. 29—37.

183. Peay K. G., Kennedy P. G., Talbot J. M. Dimensions of biodiversity in the Earth mycobiome // *Nat. Rev. Microbiol.* 2016. Vol. 14, No. 7. P. 434—447.

184. Dalman K., Olson Å., Stenlid J. Evolutionary history of the conifer root rot fungus *Heterobasidion annosum* sensu lato // *Molecular Ecology.* 2010. Vol. 19. P. 4979—4993.

185. Gonthier P., Garbelotto M. Amplified fragment length polymorphism and sequence analyses reveal massive gene introgression from the European fungal pathogen *Heterobasidion annosum* into its introduced congener *H. irregulare* // *Mol. Ecol.* 2011. Vol. 20. P. 2756—2770.

186. Kim W. J., Kim J. G., Choi J. H., et al. Classification and typing of *Trichophyton mentagrophytes* isolated from a Korean population // Korean J. Med. Mycol. 2017. Vol. 22. P. 1—14.
187. Zhivotovsky L. A. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers // Mol. Ecol. 1999. Vol. 8, No. 6. P. 907—913.
188. Cavalli-Sforza L. L., Edwards A. W. F. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures // Am. J. Hum. Genet. 1967. Vol. 19. P. 233—257.
189. Nei M. 1972. Genetic distance between populations // Am. Nat. Vol. 106. P. 283—292.
190. Maheshwari R. Nuclear behavior in fungal hyphae // FEMS Microbiol. Lett. 2005. Vol. 249. P. 7—14.
191. Chen J., Moinard M., Xu J., et al. Genetic analyses of the internal transcribed spacer sequences suggest introgression and duplication in the medicinal mushroom *Agaricus subrufescens* // PLoS One. 2016. Vol. 11. e0156250.
192. Caten C. E., Jinks J. L. Heterokaryosis: its significance in wild homothallic ascomycetes and fungi imperfecti // Trans. Br. Mycol. Soc. 1966. Vol. 49. P. 81—93.
193. Rep M., Kistler H. C. The genomic organization of plant pathogenicity in *Fusarium* species // Curr. Opin. Plant Biol. 2010. Vol. 13. P. 420—426.
194. Ma L. J., van der Does H. C., Borkovich K. A., et al. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium* // Nature. 2010. Vol. 464. P. 367—373.
195. de Valk H. A., Meis J. F., de Pauw B. E., et al. Comparison of two highly discriminatory molecular fingerprinting assays for analysis of multiple *Aspergillus fumigatus* isolates from patients with invasive aspergillosis // J. Clin. Microbiol. 2007. Vol. 45. P. 1415—1419.

196. Verweij P. E., Zhang J., Debets A. J. M., et al. In-host adaptation and acquired triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a dilemma for clinical management // *Lancet Infect. Dis.* 2016. Vol. 16. P. e251—e260.
197. Monteiro M. C., Garcia-Rubio R., Alcazar-Fuoli L., et al. Could the determination of *Aspergillus fumigatus* mating type have prognostic value in invasive aspergillosis? // *Mycoses.* 2018. Vol. 61. P. 172—178.
198. Schelenz S., Hagen F., Rhodes J. L., et al. First hospital outbreak of the globally emerging *Candida auris* in a European hospital // *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 2016. Vol. 5. P. 35.
199. de Assis Santos D., de Carvalho Araújo R. A., Kohler L. M., Machado-Pinto J., Hamdan J. S., Cisalpino P. S. Molecular typing and antifungal susceptibility of *Trichophyton rubrum* isolates from patients with onychomycosis pre- and post-treatment // *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2007. Vol. 29, No. 5. P. 563—569.
200. Pchelin I. M., Kryuchkova M. A., Chilina G. A., et al. Genetic polymorphism of *Trichophyton rubrum* (Castellani) — a causative agent of onychomycosis and tinea pedis // *Probl. Med. Mikol.* 2018. Vol. 20, No. 2. P. 35—39.

Appendix A

Nucleotide sequences obtained during the study

No.	Species	Isolate or strain	Locus	Accession no.
1	<i>Trichophyton benhamiae</i>	RCPF 1457	ITS	KT253567.2
2	<i>Trichophyton benhamiae</i>	RCPF 1457	LSU	KU378216.1
3	<i>Trichophyton benhamiae</i>	RCPF 1457	<i>BT2</i>	KT336428.1
4	<i>Trichophyton bullosum</i>	CBS 557.50	LSU	KU205266.1
5	<i>Trichophyton bullosum</i>	CBS 557.50	<i>BT2</i>	KU378225.1
6	<i>Trichophyton equinum</i>	RCPF 936	ITS	KT285213.1
7	<i>Trichophyton equinum</i>	RCPF 936	LSU	KT272001.1
8	<i>Trichophyton equinum</i>	RCPF 936	<i>BT2</i>	KT272014.1
9	<i>Trichophyton eriotrephon</i>	CBS 220.25	LSU	KU205265.1
10	<i>Trichophyton eriotrephon</i>	CBS 220.25	<i>BT2</i>	KU378224.1
11	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Y1252	<i>TEF1α</i>	MF966410.1
12	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Y2143	<i>TEF1α</i>	MF966411.1
13	<i>Trichophyton interdigitale</i>	D15P2	ITS	KT253563.1
14	<i>Trichophyton interdigitale</i>	D15P2	LSU	KT271998.1
15	<i>Trichophyton interdigitale</i>	D15P2	<i>BT2</i>	KT272011.1
16	<i>Trichophyton interdigitale</i>	D15P5	ITS	KT253568.1
17	<i>Trichophyton interdigitale</i>	D15P5	LSU	KT271999.1
18	<i>Trichophyton interdigitale</i>	D15P5	<i>BT2</i>	KT272012.1
19	<i>Trichophyton interdigitale</i>	D15P90	<i>TEF1α</i>	MF966409.1
20	<i>Trichophyton interdigitale</i>	RCPF 1229	LSU	KC461912.2
21	<i>Trichophyton interdigitale</i>	RCPF 1229	ITS	KT253561.1
22	<i>Trichophyton interdigitale</i>	RCPF 1229	<i>BT2</i>	KU378229.1
23	<i>Trichophyton interdigitale</i>	RCPF 1301	ITS	KP308373.1
24	<i>Trichophyton interdigitale</i>	RCPF 1301	<i>BT2</i>	KP308375.1

25	<i>Trichophyton interdigitale</i>	RCPF 1301	ITS	KT253562.1
26	<i>Trichophyton interdigitale</i>	RCPF 1394	BT2	KP308376.1
27	<i>Trichophyton interdigitale</i>	RCPF 1394	ITS	KT285209.2
28	<i>Trichophyton interdigitale</i>	RCPF 1394	LSU	KT271994.1
29	<i>Trichophyton interdigitale</i>	RCPF 1404	BT2	KP308377.1
30	<i>Trichophyton interdigitale</i>	RCPF 1404	ITS	KT253566.1
31	<i>Trichophyton interdigitale</i>	RCPF 1404	LSU	KT271995.1
32	<i>Trichophyton interdigitale</i>	RCPF 1459	BT2	KP308378.1
33	<i>Trichophyton interdigitale</i>	RCPF 1459	ITS	KT285211.1
34	<i>Trichophyton interdigitale</i>	RCPF 1459	LSU	KT271996.1
35	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	CBS 318.56	LSU	KU205264.1
36	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	CBS 318.56	BT2	KU378223.1
37	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	D15P127	ITS	MH708281.1
38	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	D15P135	ITS	KY761968.1
39	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	D15P152	ITS	MH708282.1
40	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	D15P156	ITS	MH708283.1
41	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	RCPF 1207	LSU	KC461921.2
42	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	RCPF 1207	ITS	KT253559.1
43	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	RCPF 1207	BT2	KU378227.1
44	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	RCPF 1207	<i>TEF1α</i>	MF966412.1
45	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	RCPF 1261	BT2	KP308374.1
46	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	RCPF 1261	ITS	KT285208.1
47	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	RCPF 1261	LSU	KT271993.1
48	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	RCPF 1278	ITS	KT253557.1
49	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	RCPF 1278	LSU	KU378211.1
50	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	RCPF 1278	BT2	KU378230.1
51	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	RCPF 1278	<i>TEF1α</i>	MF966413.1
52	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	RCPF 1425	ITS	KT285210.1
53	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	RCPF 1425	LSU	KT336431.1

54	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	RCPF 1425	BT2	KT336424.1
55	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	RCPF 1640	ITS	KT253558.1
56	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	RCPF 1640	LSU	KT271997.1
57	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	RCPF 1640	BT2	KT272010.1
58	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	RCPF 1640	TEF1 α	MF966414.1
59	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	RCPF 265	ITS	KT253564.1
60	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	RCPF 266	ITS	KT253560.1
61	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	RCPF 266	LSU	KT271991.1
62	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	RCPF 266	BT2	KT272009.1
63	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	RCPF 267	ITS	KT253565.1
64	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	RCPF 267	LSU	KT271992.1
65	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	RCPF 267	BT2	KT336423.1
66	<i>Trichophyton quinckeanum</i>	RCPF 725	ITS	KU378219.1
67	<i>Trichophyton quinckeanum</i>	RCPF 725	LSU	KU378208.1
68	<i>Trichophyton quinckeanum</i>	RCPF 725	BT2	KT272017.1
69	<i>Trichophyton rubrum</i>	CBS 392.58	TEF1 α	MF966403.1
70	<i>Trichophyton rubrum</i>	D15P1	LSU	KT272006.1
71	<i>Trichophyton rubrum</i>	D15P20	TERG_02941	KX852446.1
72	<i>Trichophyton rubrum</i>	D15P20	TERG_03298	KX852448.1
73	<i>Trichophyton rubrum</i>	D15P21	TERG_02941	KX852447.1
74	<i>Trichophyton rubrum</i>	D15P21	TERG_03298	KX852449.1
75	<i>Trichophyton rubrum</i>	D15P3	ITS	KT285225.1
76	<i>Trichophyton rubrum</i>	D15P3	LSU	KT272007.1
77	<i>Trichophyton rubrum</i>	D15P3	BT2	KT272018.1
78	<i>Trichophyton rubrum</i>	D15P35	TEF1 α	MF966404.1
79	<i>Trichophyton rubrum</i>	D15P39	TEF1 α	MF966405.1
80	<i>Trichophyton rubrum</i>	D15P4	LSU	KT272008.1
81	<i>Trichophyton rubrum</i>	D15P4	BT2	KT272019.1
82	<i>Trichophyton rubrum</i>	D15P4	ITS	KU378222.1

83	<i>Trichophyton rubrum</i>	D15P58	<i>TEF1α</i>	MF966406.1
84	<i>Trichophyton rubrum</i>	RCPF 1280	BT2	KP308379.1
85	<i>Trichophyton rubrum</i>	RCPF 1280	ITS	KT285221.1
86	<i>Trichophyton rubrum</i>	RCPF 1280	LSU	KU378212.1
87	<i>Trichophyton rubrum</i>	RCPF 1299	ITS	KT285222.1
88	<i>Trichophyton rubrum</i>	RCPF 1299	LSU	KT272004.1
89	<i>Trichophyton rubrum</i>	RCPF 1299	<i>BT2</i>	KP308380.1
90	<i>Trichophyton rubrum</i>	RCPF 1393	ITS	KT285223.1
91	<i>Trichophyton rubrum</i>	RCPF 1393	LSU	KU378213.1
92	<i>Trichophyton rubrum</i>	RCPF 1393	BT2	KU378231.1
93	<i>Trichophyton rubrum</i>	RCPF 1408	BT2	KP308381.1
94	<i>Trichophyton rubrum</i>	RCPF 1408	ITS	KT285224.2
95	<i>Trichophyton rubrum</i>	RCPF 1408	LSU	KT272005.2
96	<i>Trichophyton rubrum</i>	RCPF 974	LSU	KC461908.2
97	<i>Trichophyton rubrum</i>	RCPF 974	<i>BT2</i>	KU378226.1
98	<i>Trichophyton rubrum</i>	RCPF 974	ITS	KT285220.1
99	<i>Trichophyton schoenleinii</i>	RCPF 234	ITS	KT285219.1
100	<i>Trichophyton schoenleinii</i>	RCPF 234	LSU	KT336430.1
101	<i>Trichophyton schoenleinii</i>	RCPF 234	<i>BT2</i>	KT272016.1
102	<i>Trichophyton simii</i>	RCPF 317	ITS	KT285218.1
103	<i>Trichophyton simii</i>	RCPF 317	LSU	KT272003.1
104	<i>Trichophyton simii</i>	RCPF 317	<i>BT2</i>	KT272015.1
105	<i>Trichophyton tonsurans</i>	D15P154	<i>TEF1α</i>	MF966415.1
106	<i>Trichophyton tonsurans</i>	RCPF 1396	ITS	KT285214.1
107	<i>Trichophyton tonsurans</i>	RCPF 1396	LSU	KU378214.1
108	<i>Trichophyton tonsurans</i>	RCPF 1396	<i>BT2</i>	KT336425.1
109	<i>Trichophyton tonsurans</i>	RCPF 1409	ITS	KT285215.1
110	<i>Trichophyton tonsurans</i>	RCPF 1409	LSU	KT272002.1
111	<i>Trichophyton tonsurans</i>	RCPF 1409	<i>BT2</i>	KT336426.1

112	<i>Trichophyton tonsurans</i>	RCPF 1427	ITS	KT285216.1
113	<i>Trichophyton tonsurans</i>	RCPF 1427	LSU	KU378215.1
114	<i>Trichophyton tonsurans</i>	RCPF 1427	BT2	KU378232.1
115	<i>Trichophyton tonsurans</i>	RCPF 1458	ITS	KT285217.1
116	<i>Trichophyton tonsurans</i>	RCPF 1458	LSU	KU378217.1
117	<i>Trichophyton tonsurans</i>	RCPF 1458	BT2	KT336427.1
118	<i>Trichophyton tonsurans</i>	RCPF 209	LSU	KT272000.1
119	<i>Trichophyton tonsurans</i>	RCPF 212	LSU	KC461915.2
120	<i>Trichophyton tonsurans</i>	RCPF 212	ITS	KT285212.1
121	<i>Trichophyton tonsurans</i>	RCPF 212	BT2	KT272013.1
122	<i>Trichophyton tonsurans</i>	RCPF 212	TEF1 α	MF966416.1
123	<i>Trichophyton verrucosum</i>	RCPF 937	ITS	KU378220.1
124	<i>Trichophyton verrucosum</i>	RCPF 937	LSU	KU378209.1
125	<i>Trichophyton verrucosum</i>	RCPF 937	BT2	KT336429.1
126	<i>Trichophyton violaceum</i>	RCPF 1211	ITS	KU378221.1
127	<i>Trichophyton violaceum</i>	RCPF 1211	LSU	KU378210.1
128	<i>Trichophyton violaceum</i>	RCPF 1211	BT2	KU378228.1
129	<i>Trichophyton violaceum</i>	RCPF 1770	TEF1 α	MF966408.1
130	<i>Trichophyton violaceum</i>	RCPF 203	ITS	KU378218.1
131	<i>Trichophyton violaceum</i>	RCPF 203	LSU	KU378207.1
132	<i>Trichophyton violaceum</i>	RCPF 203	TEF1 α	MF966407.1

Appendix B

Script `puttorights.py`

```
# The script uses test element to select sequences from infile.txt (GenBank format).
```

```
# Version 2019-01-19
```

```
# This defines test element to select sequences from the infile
```

```
testseq =
```

```
'TTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC  
AGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCC'
```

```
import re
```

```
import string
```

```
import sys
```

```
def complement(sequence):
```

```
    sequence = sequence.upper()
```

```
    c_sequence = sequence[::-1]
```

```
    c_sequence = c_sequence.replace('A', 'F').replace('T', 'A').replace('F', 'T')
```

```
    c_sequence = c_sequence.replace('G', 'F').replace('C', 'G').replace('F', 'C')
```

```
    c_sequence = c_sequence.replace('M', 'F').replace('K', 'M').replace('F', 'K')
```

```
    c_sequence = c_sequence.replace('R', 'F').replace('Y', 'R').replace('F', 'Y')
```

```
    c_sequence = c_sequence.replace('V', 'F').replace('B', 'V').replace('F', 'B')
```

```
    c_sequence = c_sequence.replace('H', 'F').replace('D', 'H').replace('F', 'D')
```

```
    return (c_sequence)
```

```
c_testseq = complement(testseq)
```

```
testseq = testseq.upper()
```

```
# Этот элемент принимает соглашение с условием отбора последовательностей
```

```

# или останавливает выполнение скрипта
print('\n')
print('Sequences with the following element will be included in the outfile:')
print('\n', testseq)
print('\n', 'y/n')
reply = str(input())
if reply.strip() == 'n':
    sys.exit()
elif 'y' not in reply:
    while 'n' or 'y' not in reply:
        print(' y or n can be read')
        reply = str(input())
        if reply.strip() == 'n':
            sys.exit()
        if reply.strip() == 'y':
            break

# Этот блок считает количество записей в исходном файле и проверяет формат
GenBank
n_GenBank_w = {} # инициация пустого словаря
text = open('infile.txt', 'r')
for word in re.findall(r'LOCUS', text.read()):
    count = n_GenBank_w.get('LOCUS', 0)
    n_GenBank_w[word] = count + 1
if n_GenBank_w != {}:
    ne = n_GenBank_w['LOCUS']
else:
    print('Error: cannot recognize file format')
    sys.exit()

```

Эта часть выписывает в множество accnos все номера из infile

with open('infile.txt') as inf:

accnos = set()

lines = inf.readlines()

i = 0

while i < len(lines):

if 'LOCUS' in lines[i]:

accno = re.findall(r'\S+', lines[i])[1]

accnos.add(accno)

i += 1

Выпишем в файл clean.fasta все уникальные последовательности,

попутно исправляя комплементарные.

transferredseqs = 0

excess = 0

waisted = 0

trash = set()

emptyaccnos = []

with open('infile.txt') as inf:

with open('clean.fasta', 'w') as outf:

line = inf.readline()

while line:

if 'LOCUS' in line[:5]:

accno = re.findall(r'\S+', line)[1]

skip = 0

if accno in accnos:

accnos.remove(accno)

applicant = "

```

while 'ORIGIN' not in line[:6] and '/' not in line[:2]:
    line = inf.readline()
if '/' in line:
    print('Empty entry:', accno)
    emptyaccnos.append(accno)
    skip = 1
if skip == 0:
    while line.strip() != '/':
        line = inf.readline()
        letts = line[10:100]
        letts = letts.replace(' ', '')
        letts = letts.strip()
        applicant = applicant + letts
    applicant = applicant.upper()
    if testseq in applicant:
        outf.write('>')
        outf.write(accno)
        outf.write('\n')
        outf.write(applicant)
        outf.write('\n')
        transferredseqs += 1
    elif c_testseq in applicant:
        outf.write('>')
        outf.write(accno)
        outf.write('\n')
        applicant = complement(applicant)
        outf.write(applicant)
        outf.write('\n')
        transferredseqs += 1

```



```

        else:
            waisted += 1
            trash.add(accno)
    else:
        excess += 1
line = inf.readline()

```

Создадим файл-помойку и выпишем туда отброшенные последовательности

```
if len(trash) != 0:
```

```
    with open('infile.txt') as inf:
```

```
        with open('abandoned.fasta', 'w') as outf:
```

```
            for line in inf:
```

```
                if 'LOCUS' in line[:5]:
```

```
                    accno = line[12:21].strip()
```

```
                    if accno in trash:
```

```
                        trash.remove(accno)
```

```
                        outf.write('>')
```

```
                        outf.write(accno)
```

```
                        outf.write('\n')
```

```
                        while 'ORIGIN' not in line[:6]:
```

```
                            line = inf.readline()
```

```
                        while line.strip() != '//':
```

```
                            line = inf.readline()
```

```
                            letts = line[10:100]
```

```
                            letts = letts.replace(' ', '')
```

```
                            outf.write(letts)
```

```
                    line = line.strip()
```

Выведем результаты подсчетов

```
print('\n', 'General number of entries =', ne)
if excess == 0:
    print(' Single copies throughout the sample', '\n')
else:
    print(' Initial number of unique entries =', ne - excess)
    print(' A total of', excess, 'excess sequences', '\n')
    # В исходнике ожидается не больше двух копий каждой записи
    if transferredseqs + waisted + excess != ne:
        print(' Unexpected number of copies in original file')
print(' Transferred to clean.fasta', transferredseqs, 'sequences')
print(' ', waisted, 'sequences waisted')
if len(accnos) > 0:
    print(accnos, 'wrong count of accessions')
print(' ', len(emptyaccnos), 'empty entries')
```

Appendix C

Script compactor.py

```
# Version 2019-01-23

import re
import os.path
import sys

# Проверка дублирования номеров доступа
accnos = set()
excess = []
ne = 0
with open ('single.fasta') as inf:
    line = inf.readline()
    while line:
        if '>' in line:
            accno = re.findall(r'^\S+', line)[0][1:]
            if accno in accnos:
                print('Multiple entries of', accno)
                excess.append(accno)
            else:
                ne += 1
                accnos.add(accno)
        line = inf.readline()
print('\n A total of', ne, 'sequences', end='')
if excess != []:
    print(', excluding', len(excess), 'repeats')
```

```
# Этот блок спросит, отсеивать ли последовательности
# с вырожденными нуклеотидами
print('\n')
print(' Remove sequences with non-standard bases? y/n')
reply = str(input())
if reply.strip() == 'n':
    decision_ns = 0
elif reply.strip() == 'y':
    decision_ns = 1
elif 'y' or 'n' not in reply:
    while 'n' or 'y' not in reply:
        print(' y or n can be read')
        reply = str(input())
        if reply.strip() == 'n':
            decision_ns = 0
            break
        if reply.strip() == 'y':
            decision_ns = 1
            break

# Этот блок спросит, отсеивать ли последовательности, депонированные
# только из одной страны
print('\n Remove sequences, deposited less than three times ', end='')
print('and/or from only one country? y/n')
reply = str(input())
if reply.strip() == 'n':
    decision_oc = 0
elif reply.strip() == 'y':
    decision_oc = 1
```

```
elif 'y' or 'n' not in reply:
```

```
    while 'n' or 'y' not in reply:
```

```
        print(' y or n can be read')
```

```
        reply = str(input())
```

```
        if reply.strip() == 'n':
```

```
            decision_oc = 0
```

```
            break
```

```
        if reply.strip() == 'y':
```

```
            decision_oc = 1
```

```
            break
```

```
# Если выбрано удаление последовательностей, найденных только в одной стране,
```

```
# этот блок проверит, существует ли файл entry_origin.txt со странами
```

```
# происхождения записей Генбанка, и если его нет, то создает заново,
```

```
# открывая infile.txt с форматом GenBank
```

```
countries = []
```

```
if decision_oc == 1:
```

```
    useq = 0
```

```
    listed = set()
```

```
    if not os.path.exists('entry_origin.txt'):
```

```
        print(' The file infile.txt with GenBank entries is needed ', end='')
```

```
        print('to extract labs locations')
```

```
        with open ('infile.txt') as inf:
```

```
            with open ('entry_origin.txt', 'w') as outf:
```

```
                line = inf.readline()
```

```
                while line:
```

```
                    if 'LOCUS' in line[:5]:
```

```
                        accno = re.findall(r'\S+', line)[1]
```

```
                        if accno not in listed and accno in accnos:
```

```

ouf.write('>')
ouf.write(accno)
ouf.write('\n')
useq += 1
listed.add(accno)
while line.strip() != '//':
    if 'Direct Submission' in line:
        line = inf.readline()
        line = inf.readline()
        while not re.findall('\S', line[:5]):
            preline = line
            line = inf.readline()
            country = re.findall(r'\S+$', preline)[0]
        line = inf.readline()
    ouf.write(country)
    ouf.write('\n')
line = inf.readline()

```

Создадим список со строками из выровненного и обрезанного файла
с последовательностями. Он пригодится для проверки файла
с географией лабораторий и потом, в основном блоке. Перевод в 1 линию!

```

allseqs = []
lines = []
applicant = "
letts = "
d = 0
with open('single.fasta') as inf:
    rawlines = inf.readlines()
    for i in rawlines:

```

```

if '>' not in i:
    qwerty = i.replace('-', '')
else:
    qwerty = i
lines.append(qwerty)
for i in lines:
    if re.findall('\w', i):
        if '>' in i:
            if d != 0:
                allseqs.append(applicant.strip().upper())
                allseqs.append(letts)
                letts = ""
            applicant = i
            d += 1
        else:
            letts += i.strip().upper()
allseqs.append(applicant.strip().upper())
allseqs.append(letts)

# Если надо, заберем страны из файла entry_origin.txt в список, проверив,
# что в нем строки с угольными скобками чередуются со строками
# с непробельными символами
a = 0
check1 = 0
origins = []
if decision_oc == 1:
    with open('entry_origin.txt') as inf:
        line = inf.readline()
        while line:

```

```

if '>' in line:
    a += -1
    origins.append(line.strip().upper())
elif re.findall('\S', line):
    a += 1
    origins.append(line.strip().upper())
line = inf.readline()
for m in allseqs: # все строки из single
    if '>' in m:
        t = 0
        for n in origins: # все строки из entry_origin
            if m[:m.find('.')] in n:
                t = 1
        if t == 0:
            print (" 'no country for', m[1:])
            a += 1
    if a != 0:
        print (' Please correct the file entry_origin.txt')
        sys.exit()
    else:
        print (' List of country assignments successfully checked')

# Это основной блок, который выпишет последовательности по группам,
# укажет объем каждой группы в ее названии, укажет расшифровку групп
# после их названия. Здесь реализован выбор, включать или не включать
# в итоговый файл последовательности с вырожденными нуклеотидами
accnos = set()
group_origin = set()
group = 1

```



```

allrewseqs = 0
nonstandard = 0
runner = 0
with open('grouped.fasta', 'w') as ouf:
    while runner <= len(allseqs)-1:
        line = allseqs[runner]
        if '>' in line:
            accno = line.strip().upper()
            if accno not in accnos:
                sample = allseqs[runner+1].strip().upper()
                allrewseqs += 1 # Это счетчик генотипов
                if re.findall('[^ATGC]', sample):
                    nonstandard += 1 # Счетчик нест. генотипов
                group_origin.add(accno)
                #print(accno)
                i = 0
                while i < len(allseqs)-1: # Этот цикл соберет список с номерами доступа
                    counterpart_no = allseqs[i].strip()
                    counterpart = allseqs[i + 1]
                    if sample in counterpart and counterpart_no not in accnos:
                        accnos.add(counterpart_no)
                        group_origin.add(counterpart_no)
                    i += 2
            if len(group_origin) > 1: # Этот цикл выпишет группы
                if decision_ns == 0:
                    ouf.write('>')
                    ouf.write('Group')
                    ouf.write(str(group))
                    group += 1

```

```

ouf.write('-')
ouf.write(str(len(group_origin)))
ouf.write(' ')
for element in group_origin:
    element = element.replace('>', '')
    ouf.write(element.upper())
    ouf.write(' ')
elif decision_ns == 1:
    if not re.findall('[^ATGC]', sample):
        ouf.write('>')
        ouf.write('Group')
        ouf.write(str(group))
        group += 1
        ouf.write('-')
        ouf.write(str(len(group_origin)))
        ouf.write(' ')
        for element in group_origin:
            element = element.replace('>', '')
            ouf.write(element.upper())
            ouf.write(' ')
else: # Этот цикл выпишет уникальные последовательности
    if decision_ns == 0:
        smth = str(re.findall(r'\S+', str(group_origin))[0][2:])
        ouf.write(smth)
    elif decision_ns == 1:
        if not re.findall('[^ATGC]', sample):
            smth = str(re.findall(r'\S+', str(group_origin))[0][2:])
            ouf.write(smth)
if decision_ns == 0:

```

```

    ouf.write('\n')
    ouf.write(sample)
    ouf.write('\n')
elif decision_ns == 1:
    if not re.findall('[^ATGC]', sample):
        ouf.write('\n')
        ouf.write(sample)
        ouf.write('\n')
    group_origin.clear()
runner += 1
print(" ", len(allseqs)//2, 'sequences in total')
print(" ", allrewseqs, 'genotypes in the sample')
print(" ", nonstandard, 'genotypes with non-standard bases in the sample')

# Если указано принимать во внимание последовательности из не менее,
# чем двух стран, то этот блок обратится к файлу entry_origin.txt
# и перепишет в новый файл соответствующую часть содержания grouped.fasta
origins = set()
accorigins = []
if decision_oc == 1:
    with open ('entry_origin.txt') as inf:
        accorigins_raw = inf.readlines()
        for k in accorigins_raw:
            k = k.upper()
            accorigins.append(k)
print(' The list of countries is following: ', end=")
k = 1
displaycountries = set()
while k < len(accorigins):

```

```

displaycountries.add(accorigins[k])
k+=2
for q in displaycountries:
    print(q, end=")
with open ('grouped.fasta') as inf:
    with open ('grouped_nloc.fasta', 'w') as ouf:
        line = inf.readline()
        while line:
            if '>' in line:
                accessions = re.split(' ', line.strip())
                if len (accessions) > 2:
                    caption = accessions[0]
                    del accessions[0]
                    for unit in accessions:
                        i = 0
                        while i < len (accorigins):
                            if unit.upper() in accorigins[i]:
                                origins.add(accorigins[i+1].strip())
                                i += 1
                    if len (origins) > 1:
                        ouf.write(caption)
                        ouf.write(' ')
                        smth = str(re.findall(r'\w+', str(accessions))).replace('\n', ")
                        smth = smth.replace('[', ").replace(']', ")
                        ouf.write(smth)
                        ouf.write('\n')
                        line = inf.readline()
                        ouf.write(line)
                    origins.clear()

```

```

line = inf.readline()

# Это элемент выписывает номера доступа по группам
if decision_oc == 1:
    with open ('grouped_nloc.fasta') as inf:
        with open ('groups.txt', 'w') as outf:
            line = inf.readline()
            while line:
                if 'Group' in line:
                    elements = re.split(' ', line.strip())
                    outf.write(elements[0].replace('>', ''))
                    outf.write('\n')
                    k = 1
                    while k < len(elements):
                        outf.write(elements[k])
                        outf.write(' ')
                        k += 1
                    outf.write('\n')
            line = inf.readline()

# Этот скрипт посчитает объем выборки, сложив окончания заголовков
# в формате "GroupN-quant" например, "Group7-237" (how_many.py)
import re
groups = 0
quantity = 0
with open ('groups.txt') as inf:
    line = inf.readline()
    while line:
        if 'Group' in line:

```

```
groups += 1
fragments = re.findall(r'\w+', line)
quantity += int(fragments[1])
line = inf.readline()
print (quantity, 'accessions in', groups, 'groups.txt')
```

Appendix D

Script `countriestotable.py`

```

# Скрипт создает таблицу с распределением генотипов по странам
# Он берет классификацию последовательностей из tm-ti_groups.fasta
# И распределение последовательностей по странам geography_reviewed.fasta

# Посчитаем объем выборки, сложив окончания заголовков
# в формате "GroupN-quant" например, "Group7-237"
stypes = []
groups = 0
quantity = 0
import re
with open ('tm-ti_groups.txt') as inf:
    line = inf.readline()
    while line:
        if 'Group' in line:
            groups += 1
            twohalves = re.findall(r'\w+', line)
            quantity += int(twohalves[1])
            stypes.append(line.strip())
        line = inf.readline()
print ("", quantity, 'sequences in', groups, 'groups')

# Создадим список с названиями стран, которые нам выдал whethergeography
countries = []
with open ('countries_in_the_sample.txt') as inf:
    line = inf.readline().strip().upper()
    countries.append(line)

```

```
while line:
```

```
    line = inf.readline().strip().upper()
```

```
    if line != "":
```

```
        countries.append(line)
```

```
countries.sort()
```

```
with open ('geography_reviewed.fasta') as inf:
```

```
    gdata = inf.readlines()
```

```
# Выпишем генотипы и количество записей для каждой страны
```

```
grossam = 0
```

```
accnos = set()
```

```
current_accnos = set()
```

```
with open ('final.txt', 'w') as outf:
```

```
    with open ('tm-ti_groups.txt') as inf:
```

```
        allaboutgroups = inf.readlines()
```

```
        for i in countries: # Первая строка со странами
```

```
            outf.write('\t')
```

```
            outf.write(i)
```

```
        for g in stypes: # Последующие строки по числу генотипов
```

```
            outf.write('\n')
```

```
            outf.write(g) # начинаются с генотипа (группы)
```

```
            # соберем множество с номерами доступа данного генотипа
```

```
            number = 0
```

```
            while number < len(allaboutgroups):
```

```
                if g in allaboutgroups[number]:
```

```
                    number += 1
```

```
                    fragments = re.split(r',', allaboutgroups[number])
```

```
                    for k in fragments:
```



```

        current_accnos.add(k.strip())
        accnos.add(k.strip())
    number += 1
j = 0
while j < len(countries):
    givenc = countries[j]
    counter = 0
    runner = 0
    while runner < len(gdata):
        line = gdata[runner]
        if '>' in line:
            sample = line[1:].strip()
            if sample in current_accnos:
                line = gdata[runner+1].strip().upper()
                if givenc in line:
                    counter += 1
                    grossam += 1
            runner += 1
        ouf.write('\t')
        ouf.write(str(counter))
        j += 1
    current_accnos.clear()
print(" ", grossam, 'accessions in', len(stypes), 'groups in final file')

# Все ли номера доступа из groups были в geography_reviewed?
k = 0
missing = set()
for i in accnos:
    runner = 0

```

```
presence = 0
while runner < len(gdata):
    if i in gdata[runner]:
        k += 1
        presence = 1
    runner += 1
if presence == 0:
    missing.add(i)
if len(missing) > 0:
    print(" ", len(missing), 'sequences were not found in geography_reviewed.fasta')
with open ('missing.txt', 'w') as ouf:
    for i in missing:
        ouf.write('>')
        ouf.write(i)
        ouf.write('\n')
```

Appendix E

Script `attributetogenotypes.py`

```

# This script compares two fasta files: the dataset "single.fasta" and file
"referenceset.fasta"
# with reference sequences. The result is the file "attributed.txt", where sequences'
names
# from "single.fasta" are supplemented with relevant accessions from
"referenceset.fasta"

# Version 2019-01-18

# Этот блок переписывает изучаемые последовательности в одну линию
with open('single.fasta') as inf:
    with open('neat.fasta', 'w') as ouf:
        applicant = ""
        k = 0
        line = inf.readline()
        while line:
            if '>' in line:
                applicant = applicant.replace('-', '').upper()
                ouf.write(applicant)
                if k != 0:
                    ouf.write('\n')
                k += 1
                applicant = ""
                ouf.write(line)
            else:
                line = line.replace('\n', "")
                applicant = applicant + line

```

```

line = inf.readline()
if not line:
    applicant = applicant.replace('-', '').upper()
    ouf.write(applicant)

```

Этот блок переписывает референсные последовательности в одну линию
with open('referenceset.fasta') as inf:

with open('referenceset_plain.fasta', 'w') as ouf:

```

applicant = ""
k = 0
line = inf.readline()
while line:
    if '>' in line:
        applicant = applicant.replace('-', '').upper()
        ouf.write(applicant)
        if k != 0:
            ouf.write('\n')
        k += 1
        applicant = ""
        ouf.write(line)
    else:
        line = line.replace('\n', "")
        applicant = applicant + line
line = inf.readline()
if not line:
    applicant = applicant.replace('-', '').upper()
    ouf.write(applicant)

```

Этот блок ищет референсные последовательности

```

# из referenceset_plain.fasta в файле neat.fasta.
with open('referenceset_plain.fasta') as inf:
    references = inf.readlines()

import re
generalcount = 0
poolofnames = set()
accnos = set()
with open('neat.fasta') as inf:
    with open('attributed.txt', 'w') as ouf:
        line = inf.readline().strip()
        while line:
            if line[0] == '>':
                generalcount += 1
                elements = re.findall(r'\S+', line)
                if generalcount > 1:
                    ouf.write('\n')
                    if (elements[0]) in poolofnames:
                        print('Multiple entries of', (elements[len(elements)-1]))
                        ouf.write(elements[0][1:]) # название последовательности
                        poolofnames.add(elements[0])
            else:
                runner = 0
                while runner < len(references):
                    if references[runner].strip() in line:
                        ouf.write('\t')
                        match = re.search(r'^\S+', references[runner-1])#
                        accno = references[runner-1][1:match.end()]
                        ouf.write(accno)

```



```
        currentvariants.add(rawseqs[runner])
    runner += 1
runner = 1
if len(currentvariants) > 1:
    switch = 1
    for i in currentvariants:
        ouf.write(caption)
        ouf.write(str(runner))
        ouf.write('\n')
        ouf.write(i)
        runner += 1
    line = inf.readline()

print('\n', generalcount, 'sequences analyzed')

# Удалим временные файлы
import os
os.remove('referenceset_plain.fasta')
os.remove('neat.fasta')
if switch == 0:
    os.remove('variants.fasta')
```

Appendix F

Script cnamestocoordinates.py

Этот скрипт принимает на вход таблицу со списками стран и таблицу с долготами и широтами

и преобразует их в список координат. Версия 2018-03-29.

```
import re
```

```
with open ("Country_coordinates.txt") as inf:
```

```
    rawcoordinates = inf.readlines()
```

```
coordinates=[]
```

```
for i in rawcoordinates:
```

```
    line = re.split('\t', i.strip())
```

```
    coordinates.append(line)
```

```
countries = set()
```

```
counter = 0
```

```
written = 0
```

```
with open("Transformed_data.txt") as inf:
```

```
    with open("Coordinates_by_genotypes.txt", 'w') as outf:
```

```
        line = inf.readline()
```

```
        while line:
```

```
            if '>' in line:
```

```
                localheader=line[1:].strip()
```

```
                line=inf.readline()
```

```
                rawelements=re.split(',', line)
```

```
                elements=[]
```

```
                for i in rawelements:
```

```
                    elements.append(i.strip())
```



```
    countries.add(i.strip())
    counter += 1
xcoordinates=[]
ycoordinates=[]
for i in elements:
    k=0
    while k < len (coordinates):
        if i in coordinates[k]:
            countries.remove(coordinates[k][0])
            xcoordinates.append(coordinates[k][1])
            ycoordinates.append(coordinates[k][2])
        k+=1
ouf.write(localheader)
ouf.write('.x <- c(')
ouf.write(xcoordinates[0])
written+=1

if len(xcoordinates) > 1:
    k=1
    while k < len(xcoordinates):
        ouf.write(',')
        ouf.write(xcoordinates[k])
        written+=1
        k+=1
ouf.write(')')
ouf.write('\n')
ouf.write(localheader)
ouf.write('.y <- c(')
ouf.write(ycoordinates[0])
```

```
if len(ycoordinates) > 1:
    k=1
    while k < len(ycoordinates):
        ouf.write(',')
        ouf.write(ycoordinates[k])
        k+=1
    ouf.write(')')
    ouf.write('\n')
    line = inf.readline()
else:
    line = inf.readline()
print(",counter,'datapoints in infile','\n',written,'datapoints in outfile')
for i in countries:
    print(", i)
```

Appendix G

Script genotype_vs_tinea.py

```
# 2019-02-01

import re
generalcount=0

with open ('tm-ti_groups.txt') as inf:
    classification = inf.readlines()

with open ('genotype_vs_tinea.txt') as inf:
    with open ('summary.txt', 'w') as outf:
        outf.write('\ttinea pedis\ttinea unguium\ttinea corporis\ttinea cruris'
            +'\ttinea manuum\ttinea capitis\ttinea faciei\n')
        indata = inf.readlines()
        k = 0
        while k < len(classification):
            currentgenotype = classification[k].strip()
            print(currentgenotype)
            pedis = 0
            unguium = 0
            corporis = 0
            cruris = 0
            capitis = 0
            manuum = 0
            faciei = 0
            currentlist = re.findall(r'\w+', classification[k+1])
            for i in indata:
```

```

elements = re.findall(r'\S+', i)
if elements[2] in currentlist:
    if 'pedis' in elements[1]:
        pedis+=1
    if 'unguium' in elements[1]:
        unguium+=1
    if 'corporis' in elements[1]:
        corporis+=1
    if 'cruris' in elements[1]:
        cruris+=1
    if 'manuum' in elements[1]:
        manuum+=1
    if 'capitis' in elements[1]:
        capitis+=1
    if 'faciei' in elements[1]:
        faciei+=1

ouf.write(currentgenotype)
ouf.write('\t')
ouf.write(str(pedis))#####
ouf.write('\t')
generalcount+=pedis

ouf.write(str(unguium))#####
ouf.write('\t')
generalcount+=unguium

ouf.write(str(corporis))#####
ouf.write('\t')
generalcount+=corporis

```

```
ouf.write(str(cruris))#####
```

```
ouf.write('\t')
```

```
generalcount+=cruris
```

```
ouf.write(str(manuum))#####
```

```
ouf.write('\t')
```

```
generalcount+=manuum
```

```
ouf.write(str(capitis))#####
```

```
ouf.write('\t')
```

```
generalcount+=capitis
```

```
ouf.write(str(faciei))#####
```

```
ouf.write('\t')
```

```
generalcount+=faciei
```

```
ouf.write(str(pedis+unguium+corporis+cruris+manuum+capitis+faciei))
```

```
ouf.write('\n')
```

```
k+=2
```

```
print('A total of', generalcount, 'clinical annotations')
```

Appendix H

Script accnos.py

```
# The script counts the number of words in the comments of the FASTA file  
# and writes them out to a new file, each on a new line, with an angle bracket
```

```
import re  
accnos = set()  
with open ('grouped_nloc.fasta') as inf:  
    with open ('clean.fasta', 'w') as outf:  
        lines = inf.readlines()  
        for i in lines:  
            if '>' in i:  
                pieces = re.findall(r'\S+', i)[1:]  
                for j in pieces:  
                    accnos.add(j.replace(',',''))  
print(len(accnos), 'accnos')  
for i in accnos:  
    outf.write('>')  
    outf.write(i)  
    outf.write('\n')
```

Appendix I

Script `incrustator.py`

```
print('\n', 'Version 1.3 2018-11-16', '\n')

counter = 0 # счетчик добавленных образцов
import re
import sys

# Проверим, чтобы все строки содержали три элемента,
# разделенные табуляцией
dross = set()

with open('Addition.txt') as inf:
    line = inf.readline()
    while line:
        words = re.findall(r'\S+', line)
        if words != []:
            if len(words) < 3:
                dross.add(words[0])
            if len(words) == 3:
                evenmorewords = re.findall(r'\S+.\S+.\S+', line)
                if len(re.findall(r'\t', evenmorewords[0])) != 2:
                    print('Error: incorrect format. Columns must be separated by TAB
characters')
                    sys.exit()
            line = inf.readline()
if dross != set():
    print('Error: missing data')
    for i in dross:
        print(", i)
    sys.exit()
```

```

# Соберем множество с локусами вносимых данных и проверим, что новых нет
extraloci = set()
basicisolates = set()
with open ('Addition.txt') as inf:
    line = inf.readline()
    while line:
        if re.findall('\S', line): # любой непробельный символ
            elements = re.split('\t', line)
            extraloci.add(elements[1])
        line = inf.readline()
# Заберем заголовок Mainfile в список
with open ('Mainfile.txt') as inf:
    line = inf.readline()
    elements = re.split('\t', line.strip())
basicloci = []
for i in elements:
    basicloci.append(i)
for i in extraloci: # это непосредственно цикл с проверкой
    if i not in basicloci:
        print('\n', i, '\n')
        print ('Please provide all loci in the starting line of Mainfile')
        sys.exit()
# Сначала перепишем все старые данные с добавлением новых в новый файл
with open ('Addition.txt') as inf:
    newdata = inf.readlines()
with open ('Appended.txt', 'w') as ouf:
    with open ('Mainfile.txt') as inf:
        for i in basicloci:
            ouf.write('\t')

```



```

    outf.write(i)
line = inf.readline()
line = inf.readline()
while line:
    outlist = [] # список на вывод в Appended
    inlist = re.split('\t', line.strip())
    isolate = re.findall(r'^\w+', line) # первое слово -- изолят
# код возьмет изолят из начала каждой отдельной строки и пробежит
# по всему Addition в поисках информации по каждому конкретному локусу
# определенного изолята
    if isolate:
        outlist[0] = isolate[0]
        basicisolates.add(isolate[0])
        position = 0
        while position < len(basicloci): # пробежим по столбцам
            # здесь position -- номер локуса в заголовке
            currentlocus = basicloci[position]
            currentcell = "
            # В ячейку запишем сначала инф. из Mainfile, затем из Addition
            if position+1 < len(inlist):
                # здесь position -- номер слова в списке, сдвиг вправо на 1
                if re.findall(r'\S', inlist[position+1]):
                    currentcell += inlist[position+1]
            for i in newdata:
                if re.findall('\S', i): # если строка не пуста
                    pieces = re.findall(r'\S+', i)
                    #Cropping
                    pos = re.search(r'_ ', pieces[0])
                    if '_ ' in pieces[0]:

```

```

        pieces[0] = pieces[0][:pos.span()[0]]
    if isolate[0] == pieces[0]:
        if currentlocus == pieces[1]:
            if re.findall(r'\S', currentcell):
                currentcell += '-'
            pieces[2] = round(float(pieces[2]))
            currentcell += str(pieces[2])
            counter+=1

        outlist.append(currentcell)
        position += 1
    outf.write('\n')
    for i in outlist:
        outf.write(str(i))
        outf.write('\t')
    line = inf.readline()

```

Теперь дозапишем файл теми изолятами, которых не было в таблице

with open ('Addition.txt') as inf:

with open ('Appended.txt', 'a') as outf:

line = inf.readline()

while line:

isolate = re.findall(r'\S+', line)

if isolate != []:

#Cropping

pos = re.search(r'_', isolate[0])

if '_' in isolate[0]:

isolate[0] = isolate[0][:pos.span()[0]]

if isolate[0] not in basicisolates:

basicisolates.add(isolate[0])

outlist = []

```

outlist[0] = isolate[0]
position = 0
while position < len(basicloci):
    currentlocus = basicloci[position]
    currentcell = "
    for i in newdata:
        if re.findall(r'\S', i):
            pieces = re.findall(r'\S+', i)
            #Cropping
            if '_' in pieces[0]:
                pos = re.search(r'_', pieces[0])
                pieces[0] = pieces[0][:pos.span()[0]]
            if isolate[0] == pieces[0]:
                if currentlocus == pieces[1]:
                    if len (pieces) > 2:
                        if re.findall(r'\S', currentcell):
                            currentcell += '-'
                        pieces[2] = round(float(pieces[2]))
                        currentcell += str(pieces[2])
                        counter+=1
                    outlist.append(currentcell)
                position += 1
    ouf.write('\n')
    for i in outlist:
        ouf.write(str(i))
        ouf.write('\t')
    line = inf.readline()
print('\n', counter, 'samples added')

```

Appendix J

Script `tabletogenemapper.py`

```
# Этот скрипт преобразует таблицу с длинами локусов, выстроенными
# в виде последовательных столбцов, в формат GeneMapper.
# Версия 2019-01-16

# Соберем множество с локусами вносимых данных и проверим, что новых нет
import re
# Заберем заголовок infile в список
with open ('infile.txt') as inf:
    line = inf.readline()
    print(line)
    elements = re.findall(r'\S+', line.strip())
loci = []
for i in elements:
    loci.append(i)
with open ('infile.txt') as inf:
    data = inf.readlines()

with open ('GeneMapper.txt', 'w') as outf:
    switch = 0 # Переключатель по локусам
    while switch < len(loci):
        runner = 1
        while runner < len(data):
            elements = re.split('\t', data[runner])
            outf.write(elements[0])
            outf.write('\t')
            outf.write(loci[switch])
```

```
ouf.write('\t')  
ouf.write(elements[switch+1].strip())  
ouf.write('\n')  
runner += 1  
switch += 1
```

Appendix K

Script nondouble.py

```
# Удаление дублирующихся длин локусов. 2018-12-12
```

```
import re
```

```
with open ('File.txt') as inf:
```

```
    with open ('Result.xls','w') as ouf:
```

```
        line=inf.readline()
```

```
        ouf.write(line)
```

```
        line=inf.readline().strip()
```

```
    while line:
```

```
        words=re.split(r'\t', line)
```

```
        for i in words:
```

```
            if '-' in i:
```

```
                pos = re.search(r'-', i)
```

```
                i = i[:pos.span()[0]]
```

```
                ouf.write(i)
```

```
                ouf.write('\t')
```

```
            else:
```

```
                ouf.write(i)
```

```
                ouf.write('\t')
```

```
    ouf.write('\n')
```

```
    line=inf.readline().strip()
```