

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАНИЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Медико-профилактический факультет с отделением биологии
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

На правах рукописи



Нагуманов Тимур Альбертович

**ДЕТЕКЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЗООНОЗНОЙ ТРИХОФИТИИ
МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

Научный руководитель:
доцент кафедры
фундаментальной
и прикладной микробиологии



Т.Н. Титова

Уфа – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений и условных обозначений	3
ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	7
1.1. Актуальность	7
1.2. Распространённость дерматофитии, в частности заболевания трихофитии и ее возбудителей.	9
1.3. Методы лабораторной диагностики, применяемые при а диагностике дерматомикозов.	13
1.4. Рекомендованные методы лабораторной диагностики дерматофитозов животных, утвержденый главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства РФ 18 марта 2008 г.	17
1.5. Сравнительная оценка положительных и отрицательных сторон методов лабораторной диагностики дерматофитов.	20
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	31
2.1. Методики проведения методов исследования дерматофитов	32
2.1.1. Микроскопия патологического материала и мацерация	32
2.1.2. Культивирование на питательной среде	33
2.1.3. Полимеразная цепная реакция	36
2.1.4. Статистический анализ	43
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	46
1.1. Анализ литературы по методам исследования трихофитии.	46
1.2. Результаты лабораторной диагностики грибов: микроскопия и культивировании на питательных средах, а также методом ПЦР на основе электрофореза.	51
1.3. Статистический анализ полученных результатов.	59
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	65
ВЫВОДЫ	67
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	68

Список сокращений и условных обозначений

ВКО – внутренний контрольный образец

ГХ-МС – газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией

ДМСО – смесь диметилсульфоксида

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖХ-МС – жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией

ИФА – иммуноферментный анализ

КПЦР – полимеразная цепная реакция в реальном времени

НК – нуклеиновая кислота

ОКО – отрицательный контрольный образец

ПААГ – полиакриламидный агарозный гель

ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

ПКО – положительный контрольный образец

ПЦР – полимеразная цепная реакция

рРНК – рибосомная рибонуклеиновая кислота

ФБ – фосфатный буфер

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

Асс – диагностическая эффективность

ELISA – иммуноферментный анализ

DIM – Среда для идентификации дерматофитов

DTM – тестовая среда для дерматофитов

ILFA – иммунохроматографический анализ бокового потока

ITS – внутренний транскрибируемый спейсер

MALDI-TOF – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

MALDI-TOF MS – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с времяпролетным разделением

NALFA – анализ бокового потока нуклеиновых кислот

NALFIA – иммунохроматографический анализ бокового потока нуклеиновых кислот

NDM – недерматофитные формы

NPV – рогностичность отрицательного результата

PPV – прогностичность положительного результата

LPCB – лактофеноловый хлопковый синий

Se – чувствительность

Sp – специфичность

TBE – Трис-борат-ЭДТА

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время грибковые заболевания имеют достаточно высокое распространение. Они наряду с вирусными и бактериальными агентами занимают не последнее место в эпидемиологической обстановке во всем мире. На сегодняшний день известны более 180 видов болезнетворных грибов и из них около 40 вызывающие дерматомикозы. Грибковые заболевания с трудом поддаются терапии, а долгое их пребывание в теле носителя может привести к необратимым последствиям, осложнениям в виде хронической форме течения заболевания, а также дополнительного инфицирования патогенами. Поэтому на сегодняшний день вопрос о безошибочном и быстром выявлении грибковых заболеваний является актуальным, так как это один из основополагающих факторов в избавлении от чужеродного агента. На данный момент самыми распространёнными диагностическими методами исследования при дерматомикозах являются микроскопия патологического материала и культуральный метод. Тем не менее эти методы можно отнести к рутинным так как во время микроскопии многое зависит от субъективных ощущений исследователя, а культивирование достаточно трудоемкое занятие и имеет большие затраты времени на непосредственный рост грибов. Поэтому исходя из вышесказанного, обратимся к молекулярно-генетическим методам для получения быстрой и точной диагностики, которые имеют высокую чувствительность и специфичность.

Цель дипломной работы: дать оценку информативности применения полимеразной цепной реакции (ПЦР) при лабораторной диагностике зоонозной трихофитии.

Объект исследования: Дерматофиты рода *Trichophyton*, вида *Trichophyton verrucosum*.

Предмет исследования: Оценка эффективности выявления дерматофитов рода *Trichophyton*, вида *T. verrucosum* методом

полимеразной цепной реакции по отношению к распространённым методам диагностики дерматофитов.

Задачи:

1. Провести анализ литературы.
2. Выявить возбудителя трихофитии с помощью регламентированных методов лабораторной диагностики (микроскопия патологического материала и культуральный метод), а также методом ПЦР.
3. Сравнить показатели чувствительности, специфичности и диагностической эффективности метода ПЦР и регламентированных методов лабораторной диагностики (микроскопия патологического материала и культуральный метод).

Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Актуальность

Инфекции вызванные дерматофитами чрезвычайно распространены во всем мире, а их эпидемиологические особенности и распространение делают их одной из самых распространенных инфекций во всем мире [53]. По оценкам, поверхностные микозы поражают более 20–25% млекопитающих мира, и частота инфицирования постоянно растет [40]. Патогены, вызывающие микозы у людей и животных, обычно подразделяются на три рода: *Trichophyton*, *Microsporum* и *Epidermophyton* с более чем 40 различными видами [29]. В настоящее время наиболее важными видами, изолированными в Европе, являются *T. rubrum* (заражает в основном людей), *T. verrucosum* (заражает в основном крупный рогатый скот) и *T. mentagrophytes* с широким кругом хозяев. Они считаются второй основной причиной зоонозной дерматофитии в человеческой популяции [52]. Считается, что большинство дерматофитов распространились из стран Средиземноморья [34]. Также трихофития крупного рогатого скота часто выявляется в хозяйствах и животноводческих комплексах и наносит значительный экономический ущерб животноводству. К основным мероприятиям по борьбе с трихофитией относятся качественное кормление животных, проведение регулярных вакцинаций телят 7–14-дневного возраста, вновь поступившего молодняка и взрослых животных из других хозяйств, а также строгое выполнение санитарно-гигиенических условий содержания и эксплуатации животных [10].

Дерматофиты в основном растут на поверхности кожи, то есть на волосах, или глубже в волосяных фолликулах [62]. Чаще всего грибок попадает в толщу дермы через поврежденный эпидермальный слой, в других случаях – грибок проникает в волосяной фолликул по стержню волоса и начинает размножаться, поражая все большее количество волос и

захватывая все большие участки здоровой кожи. Поражение волос происходит по типу – Ectothrix и Endothrix [12].

Такой высокой частоте инфицирования *T. mentagrophytes* способствует легкое распространение поверхностного грибкового заболевания не только среди животных, но и среди людей. Его культивировали как от людей с клиническими проявлениями стригущего лишая, так и от животных – носителей без симптомов [47]. Это создает диагностические и терапевтические проблемы. Инфекции трихофитии у животных часто неправильно диагностируются при первичном обращении и поэтому неправильно лечатся, например, стероидами, изменяющими клинические данные и вызывающими трудности в дальнейшей диагностике [24]. Неправильное лечение или повторяющиеся поверхностные микозы являются потенциальным источником инфекции путем прямой или косвенной передачи другим животным и людям [4].

Дерматофиты серотипа *T. mentagrophytes* особенно трудно идентифицировать на основе их морфологических особенностей, и межвидовые взаимоотношения внутри этой группы неясны [49]. Последнее генетическое типирование идентифицировало *T. mentagrophytes* как один морфологически неотличимый комплекс *T. interdigitale* и *Trichophyton sp.* из *Arthroderma benhamiae*, но эта таксономия бесполезна в клинической практике и, следовательно, необязательна. Идентификация штаммов дерматофитов традиционно проводится путем сопоставления клинических проявлений инфекции с микроскопическим исследованием штаммов. Для полного подтверждения видовой принадлежности используются методы молекулярной дифференциации, возможно, обогащенные физиологическими тестами. Учитывая огромное количество таксономических различий между дерматофитами и важность идентификации на уровне видов с эпидемиологической точки зрения, «золотой стандарт» в качестве идентификации дерматофитов стал

предметом постоянных споров, и мнение микробиологов по-прежнему противоречиво [36].

1.2. Распространённость дерматофитии, в частности заболевания трихофитии и ее возбудителей.

Кожные грибковые инфекции главным образом обусловлены дерматофитами. В частности, такие возбудители, как *Trichophyton*, *Microsporum* и *Epidermophyton*, могут проникать в роговой слой кожных покровов и в придатки кожи (волосы и ногтевые пластинки) [5]. Эти инфекции, как правило, передаются непосредственно при контакте с инфицированными людьми или животными, а также (косвенно) – при воздействии загрязненной почвы и предметов обихода. Распространенность грибковой инфекции различается по социальному, географическому, экономическому статусу и жизненной среде пациентов [15].

Высокий уровень и рост заболеваемости микозов, очевидно, связаны с улучшением качества диагностики и увеличением числа больных с ослабленным иммунитетом и во многом обусловлены ростом распространенности эндогенных факторов развития данных инфекционных нозологий. Несмотря на современные диагностические возможности, адекватный диагноз микотической инфекции, по данным литературы, удается поставить в 15–45% случаев [13]. Также, несомненно, на рост грибковых инфекций влияет широкое и бесконтрольное применение антибиотикотерапии.

На возникновения поражений животных влияют такие факторы как температура, влажность, методы и частота дезинфекции. Распространенность дерматофитов была значительно выше в районах с более высокой температурой ($> 20\text{ }^{\circ}\text{C}$) и относительной влажностью от 62 до 65%. [26]

Распространенность *T. mentagrophytes* у собак в пять раз выше, чем у кошек. Связи между распространенностью инфекции и провинцией, а

также полом собак и кошек не выявлено. Единственным фактором риска, который, как было установлено, в значительной степени был связан с инфекцией, был возраст. Собаки и кошки моложе одного года показали статистически значимо более высокую распространенность дерматофитов, чем другие возрастные группы. Уровень изоляции дерматофитов был относительно высоким весной и зимой для собак и весной, летом и осенью для кошек. Тем не менее, связь сезона и распространенности оказалась несущественной [58].

В результате лабораторной диагностики патологического материала, взятых от больных трихофитией верблюдов установлено, что 3 % из 97 проб относится к возбудителю *Microsporium canis*, а остальные к возбудителям трихофитии. [6]

В настоящее время возбудителей дерматомикозов человека и животных делят на три экологические группы – антропофильные, зоофильные и геофильные [17]. Их возбудители обладают очень высокой устойчивостью к факторам внешней среды и поэтому могут длительное время сохраняться как в шерсти больных животных, так и на различных поверхностях [7]. Отмечено значительное количество случаев заболеваний животных, вызванные грибами этой группы. Наиболее распространены *T. rubrum*, *T. violaceum*, *T. tonsurans*, *T. schoenleinii*, *Epidermophyton floccosum*. Зоофильные дерматофиты объединяют виды грибов, паразитирующие главным образом на животных и редко поражающие людей. Основные виды: *T. verrucosum*, *T. mentagrophytes*, *T. equinum*, *T. gallinae*, *M. canis*, *M. equinum*. В группу геофильных дерматофитов входят почвенные сапрофитные кератинофильные грибы. При определенных условиях дерматофиты этой группы могут быть патогенными для живых организмов. К ним относится *M. gypseum*, *M. nanum*, *M. cookei*, *T. ajelloi*, *T. terrestre* [17].

В исследовании А.Р. Khosravi, М. Mahmoudi в период с 1994 по 1998 года было изучено в общей сложности 790 образцов перьев, волос и кожи

от различных животных с подозрением на дерматофитозы, из которых 248 (31,4%) дали дерматофиты. Наиболее частыми выделенными дерматофитами были *M. canis* (38,3%), *T. verrucosum* (31,8%), *T. mentagrophytes* (13,3%) и *M. gypseum* (7,7%). Доля положительных культур от кошек (54,8%) была значительно выше, чем от собак (8,2%), и *M. canis* были наиболее частыми изолированными видами (87,2 и 50% соответственно). *T. verrucosum* был наиболее частым возбудителем дерматофитозов у жвачных животных, *M. equinum* у лошадей, *M. gypseum* у кроликов, *M. gallinae* у кур и *T. mentagrophytes* у домашних белок. [44]

В Иране, в течение 2006–2007 гг. Было проведено исследование на 6789 голов коров и 130 пастухах. Образцы были взяты у 380 голов крупного рогатого скота и 43 пастухов с подозрением на дерматофитию. Возбудители были идентифицированы макроскопически и микроскопически путем исследования КОН и выделения культур. Только 352 случая дерматофитии были выявлены у крупного рогатого скота, и *T. verrucosum* был единственным грибом, выделенным от животных. Более того, было выявлено 27 случаев дерматофитии человека, и *T. verrucosum* был преобладающим возбудителем дерматофитии тела, волосистой части головы, стопы, ногтя и паха пациентов. Полученные результаты показали, что *T. verrucosum* была преобладающей причиной дерматофитоза у животноводов и молочных фермеров. Информация о выделении и идентификации эпизоонозов дерматофитозов крупного рогатого скота в Иране ограничена. Это исследование показало наличие дерматофитии у людей и крупного рогатого скота и подтверждает, что дерматозоозы являются причиной преобладающих форм болезни у людей, контактировавших с крупным рогатым скотом. [18]

По данным некоторых авторов, в последние годы возрастает эпидемиологическое значение зоофильных дерматофитов, причиной которых были *T. mentagrophytes*, *T. verrucosum*, *M. canis* [17].

Зоофильные грибы *T. verrucosum* в основном встречается в сельской местности, где содержится не вакцинированный крупнорогатый скот, и *T. mentagrophytes var. gypseum*, его переносчиками чаще всего являются мышевидные грызуны [14].

Заболеваемость трихофитией неодинакова и в разных регионах мира, и в отдельных областях конкретной страны [59]. Заболеваемость трихофитией значительно уступает микроспории [11].

1.3. Методы лабораторной диагностики, применяемые при а диагностике дерматомикозов.

Применение различных методов лабораторного выявления грибов является неотъемлемой частью дифференциально-диагностического процесса при подозрении на дерматомикоз и при постановке диагноза. Для диагностики применяются микроскопию нативного препарата с КОН и культуральное исследование, ограниченно-люминесцентная микроскопия с окрашиванием флюорохромами. В научных центрах России ведутся работы по обновлению и совершенствованию тест-систем для ПЦР-диагностики и изучение возможностей масс-спектрометрии для идентификации грибов [14].

Для диагностики трихомикозов преимущественно используется микроскопию нативного препарата; значительно меньшее применение находит культуральная диагностика, основными недостатками которой являются значительно большая длительность исполнения и относительно невысокая чувствительность. [14].

Диагностика трихофитии, а также микроспории основана на клинических проявлениях заболевания, микроскопическом и культуральном исследовании, дополнительно используют аппаратную люминесцентную диагностику с помощью лампы Вуда [16].

Свечение в ультрафиолетовых лучах наблюдается лишь в 50% случаев при заражении грибом вида *Microsporum*, а грибы вида *Trichophyton* не светятся [8].

При микроспории, вызванной *M. canis*, появляется характерное зеленоватое свечение в лучах лампы Вуда, тогда как при трихофитии люминесцентного свечения не наблюдается, что на практике существенно

затрудняет ее диагностику, и в ряде случаев трихомикоз может остаться нераспознанным.

Наличие экссудативных очагов микроспории или трихофитии у больного является существенной объективной трудностью, которая может приводить к диагностической ошибке. Взятие биологического материала для обнаружения спор, мицелия и дальнейшей микробиологической идентификации грибов из очага, сопровождающегося мокнутием, не рационально из-за снижения вероятности обнаружения возбудителя [15].

Оптические свойства экссудата осложняют люминесцентную диагностику – в свете лампы Вуда экссудативные корочечушки слегка опалесцируют, создавая впечатление зеленоватого свечения. Такое ложное свечение может приводить как к гиподиагностике, так и к гипердиагностике микозов.

С увеличением частоты встречаемости экссудативных форм микроспории и трихофитии отмечено и увеличение числа трудностей в клинико-лабораторной диагностике этих микозов, ошибок в диагностике, поздней диагностике. Могут также наблюдаться и атипичные формы зооантропонозной трихофитии, при которых она маскируется под экзему, псориаз, красную волчанку, розовый лишай Жибера [15].

Значительную сложность представляет идентификация выделенных грибов, с этой целью в лабораториях практического здравоохранения используются фенотипические методы. Рутинная ручная фенотипическая идентификация грибов сложна, продолжительна, достаточно субъективна, требует высокой квалификации персонала и не соответствует современным потребностям клинической практики.

Существенно повышает точность классической фенотипической идентификации (до 70–80 %) использование современных полуавтоматических и автоматических микробиологических анализаторов [2].

Развитие молекулярно-генетической диагностики затронуло в том числе и микологию. Выделение ДНК возбудителей трихомикозов дает возможность достаточно быстро устанавливать этиологический диагноз, оценивать эффективность терапии и микологическую излеченность пациента.

Следует отметить, что в настоящее время в государственных учреждениях ПЦР и ее модификации для диагностики микозов не применяются, ввиду отсутствия наборов для рутинной диагностики. [4]

Данные методы в России преимущественно используются в научных целях для накопления в базах данных генетического материала и совершенствования методик идентификации грибов. Пока только отдельные российские исследования свидетельствуют о существенно более высокой диагностической эффективности, чувствительности и специфичности метода ПЦР в лабораторной диагностике микроспории, по сравнению с микроскопическим и культуральным методами [3].

Для специфичной молекулярно-генетической детекции *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes* оптимальной является амплификация методом ПЦР фрагментов, включающих участки ДНК (ITS1, ITS2), прилегающие к гену 5.8S рРНК, что может использоваться для разработки диагностических тест-систем [5].

В последние годы все шире в лабораторной диагностике применяется метод масс-спектрометрии. Масс-спектрометрическая идентификация микроорганизмов может быть осуществлена двумя способами: по спектру белков возбудителей – белковое профилирование (MALDI-TOF MS) и по клеточным липидам – метод газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ГХ-МС) и жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ЖХ-МС) [2].

Прямое белковое профилирование с помощью времяпролетной массспектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS от англ. matrix-assisted laser

desorption/ionization time-of-flight mass-spectrometry) является методом быстрой видовой идентификации патогенных микроорганизмов [9].

На данном этапе развития диагностики микозов масс-спектрометрия пока используется только в научных целях. Основной проблемой этого метода является выделение культур исследуемых грибов на питательных средах, что требует определенных временных затрат. [14].

Развитие современных методов лабораторной диагностики дерматофитий позволит улучшить выявляемость трихомикозов, более своевременно назначать рациональную терапию с учетом особенности возбудителя, сократить сроки лечения.

Перспективными для диагностики трихомикозов кожи и ее придатков являются молекулярно-биологические и масс-спектрометрические методы. ПЦР используется в малом проценте от общей массы исследований на грибы в России, однако во многих регионах тест-системы для ПЦР-диагностики трихомикозов отсутствуют. Масс-спектрометрия для диагностики микозов пока находится в научных разработках и в обычной практике ЛПУ не применяется.

Внедрение в клиническую и лабораторную практику ПЦР-диагностики для идентификации грибов будет способствовать быстрому эффективному выявлению возбудителей и проведению адекватной терапии трихомикозов. [14].

1.4. Рекомендованные методы лабораторной диагностики дерматофитозов животных, утвержденный главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства РФ 18 марта 2008 г.

По регламентированным стандартам утверждённым главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства РФ 18 марта 2008 г., диагноз на дерматофитозы ставят на основании характерных клинических признаков, эпизоотологических данных и результатов лабораторных исследований, включающих световую микроскопию и люминесцентное исследование патологического материала, выделение культуры гриба и его идентификацию, при необходимости постановку реакции агглютинации.

1. Микроскопия в люминесцентном микроскопе.

Материал отбирают от больных дерматофитозом животных, не подвергавшихся лечению, и помещают в чашки Петри, облучают ртутно-кварцевой лампой и просматривают в затемненном помещении. Патологический материал просматривают на расстоянии 20–25 см от светофильтра. Волосы, кожные чешуйки, инфицированные возбудителем микроспории, дают характерное изумрудно-зеленое свечение. Шерстный покров животных, обработанных бриллиантовой зеленью, также может давать неспецифическое изумрудно-зеленое свечение. Свечение может отсутствовать у животных черной масти, а также при инфицировании животных штаммами, не продуцирующими пигмент птеридин. Поэтому при отрицательных результатах люминесцентной диагностики необходимо провести микроскопическое и культуральное исследования. При поражении трихофитом пораженные волосы не имеют такого свечения. С помощью переносной ртутно-кварцевой установки можно исследовать в затемненном помещении животных подозрительных в заболевании.

2. Микроскопия в световом микроскопе.

С помощью препаровальной иглы и глазного скальпеля отбирают и отрезают утолщенные корневые части волос, покрытые белым налетом и кожные чешуйки. Длина отрезков волос, подготовленных к микроскопии, должна составлять 1–2 мм. Затем несколько отрезков волос и чешуек (8–10) помещают на предметное стекло в каплю 20% NaOH или KOH, слегка подогревают над пламенем горелки до появления белого ореола вокруг капли (подогревать до кипячения не следует), после чего добавляют 1 каплю теплого 50% водного стерильного раствора глицерина и покрывают покровным стеклом.

При микроскопии пораженных волос от животных, больных дерматофитозами устанавливают, что возбудителям трихофитии присуще наличие округлых спор (артроспор) гриба образующих вокруг волоса чехол. Они могут располагаться как на поверхности, так и внутри волоса. В чешуйках, на ранних стадиях встречается ветвящийся мицелий. Споры грибов *T. verrucosum*, *T. verrucosum* var. *autotrophicum*, *T. equinum* более крупные (2,5–7 до 12 мкм), чем споры дерматофита *T. mentagrophytes* (2–4 мкм). Наряду со спорами в волосе обнаруживают пузырьки воздуха в виде черных длинных тяжей. Видны и капельки жира. Для возбудителей микроспории характерно то, что артроспоры (1,5–3,5 мкм) беспорядочно располагаются у основания волоса, а иногда образуют чехлы на его поверхности. Споры резко преломляют свет и плотно прилегают друг к другу. Искривление мицелия и распад его на споры обуславливают характерное для микроспории мозаичное расположение спор. В редких случаях мозаичность расположения спор выражена несколько слабее. Кроме того, в чешуйках встречается ветвящийся мицелий.

3. Выделение чистой культуры возбудителя.

С целью получения чистой культуры гриба и определения его вида проводят посевы корневых частей волос и кожных чешуек на сусло-агар, агар Сабуро или мясо-пептонно-глицериновый агар с 2% глюкозы (МПГ А). Посев производят микологической иглой на пробирки с указанными

средами. Микологическая игла (микологический крючок) вставляется в иглодержатель. Конец иглы загнут под прямым углом или тупым углом и сплюснут в виде лопаточки. Прокаленную иглу слегка погружают в питательную среду для охлаждения, а затем концом иглы прикасаются к частице волоса или чешуйке кожи и переносят их по одному на поверхность косяка питательной среды на расстоянии 1–1,5 см друг от друга в 2–3 точки на 7–10 пробирок. Зараженные пробирки инкубируют при 26–28 °С до 30 дней, просматривая посевы каждые 3–5 дней. Загрязненный патологический материал перед посевом заливают небольшим количеством 70° этилового спирта и выдерживают в термостате до его полного испарения.

Появление роста колоний дерматофитов на месте посева пораженных волос или кожных чешуек можно отметить на 3–5 день. В отдельных случаях развитие возбудителя заметно только на 20-й день, в связи с чем, наблюдения за посевами надо вести в течение месяца. Формирование колоний дерматофитов наступает в различные сроки. Так, характерный для *T. mentagrophytes*, *T. equinum*, *M. canis*, *M. equinum* рост отмечают на 10–14-й день и на 20–25-й день для *T. verrucosum*, *T. verrucosum var. autotrophicum*. В связи с чем, описание культур данных дерматофитов следует проводить именно в этот период. [1]

1.5. Сравнительная оценка положительных и отрицательных сторон методов лабораторной диагностики дерматофитов.

1. Световая микроскопия.

Микроскопическое исследование при диагностике дерматофитных инфекций используется с помощью различных диагностических методов. Используют прямое микроскопическое исследование соскобов кожи, волос, чешуек и ногтей с использованием осветляющего агента, исследуемого при 40-кратном увеличении яркочувствительного микроскопа [33]. Также для микрокопии используется иммуноокрашивание поликлональными антимикобактериями для гистологической идентификации микроорганизмов в биоптатах кожи различных ветеринарных видов [23]. Такие методы нацелены на демонстрацию различных структур артростор, пораженных волос [55]. Несколько исследований и экспериментов были опробованы с другим осветляющим агентом во время приготовления влажного предметного стекла, чтобы получить более четкое микроскопическое изображение и сократить время на подготовку предметного стекла и исследование. Гидроксид калия (KOH), гидроксид натрия (NaOH), калькофтористый белый [51], голубой [39], лактофеноловый хлопковый синий (LPCB) и смесь диметилсульфоксида (ДМСО) и глицерина с NaOH или KOH.

2. Фазово-контрастная световая микроскопия

Улучшенный микроскопический обзор в светлом поле достигается за счет регулировки контраста и зазора. Это достигается за счет снижения интенсивности света для достижения максимальной контрастности и максимальной четкости изображения. Таким образом, фазово-контрастный микроскоп будет лучше, потому что структуры будут более четко очерчены без потери света. Линза объектива фазово-контрастного микроскопа с 40-кратным увеличением использовалась для демонстрации

характерных грибковых элементов дерматофитов в соскобах кожи и образцах ногтей [56]. Существенными недостатками фазовой контрастной микроскопии являются низкий контраст полученных изображений и наличие светящихся ореолов вокруг объектов. Также данный тип микроскопии не увеличивает разрешающей способности микроскопа.

3. Флуоресцентная микроскопия

Включение методов, связанных с флуоресценцией, в быструю диагностику дерматофитии основано на том факте, что ткань, инфицированная дерматофитами определенных видов, производит флуоресценцию при окрашивании гематоксилином / эозином (Н и Е) [37] или при воздействии ультрафиолетового света. На этой же основе было разработано использование лампы Вуда при клиническом обследовании поражения кожи [38]. Диагностическая эффективность флуоресцентной микроскопии лучше, чем у окрашивания по Шиффу [28]. Основное препятствие, с которым сталкивается метод выявления естественных дерматофитов, основанный на флуоресценции, заключается в том, что их природа не ограничена несколькими видами, что приводит к зависимости этого метода от других при диагностике дерматофитов. С другой стороны, использование флуоресцентного красителя в качестве калькофлюорового белого цвета продемонстрировало значительные преимущества в использовании обычного мокрого покрытия КОН [51].

Микроскопическое исследование является классическим в диагностике дерматофитии. Основываясь на источниках одним из самых несложных и быстрых методов это использование светлопольного микроскопа в сочетании с одним из осветляющих средств. [55].

На ряду с микроскопией одним из важных диагностических методов детекции дерматофитов является культивирование. Рассмотрим методы культивирования.

1. Среда Сабуро для культивирования патогенных грибов.

Исходя из инструкции «Готовая питательная среда, Среда Сабуро» среда Сабуро имеет высокую концентрацию декстрозы и низкое значение рН, что делают эту среду селективной для грибов. Данный агар с добавлением трех антибиотиков существенно улучшает выделение патогенных грибов из сильно контаминированных исследуемых материалов. Для приготовления селективной среды добавить в стерильных условиях следующие антибиотики: 0,4 г циклогексимида, 20 единиц пенициллина, 40 мг стрептомицин. Инкубировать чашки в течение 3–7 дней при 30 °С. Он применяется для культивирования патогенных грибов, в особенности тех, которые связаны с кожными инфекциями. Эта среда подходит также для определения содержания микроорганизмов и грибов в косметике и для микологической оценки пищевых продуктов. Однако среда предназначена для культивирования патогенных грибов широкого спектра, и не предусматривает биохимических проявлений в дифференциации видовой принадлежности отдельных колоний.

2. Тестовая среда дерматофитов (DTM)

Помимо традиционного выделения дерматофитов на микологических специфических средах, модифицированные культуральные среды могут обеспечить относительно быструю (2 недели) предполагаемую идентификацию дерматофитов по сравнению с традиционным культивированием [68]. Тестовая среда для дерматофитов (DTM) – одна из первых разработанных сред для быстрой предполагаемой идентификации дерматофитов [57]. К сожалению, некоторые недерматофитные плесени (NDM), патогенные или сапрофитные, могут выжить при типе и концентрации используемых противогрибковых средств. NDM также может производить щелочные продукты, которые меняют цвет среды с соломенно-желтого на красный. Образовавшийся красный цвет равен или даже более интенсивен, чем сама группа дерматофитов. Более того, некоторые из NDM могут иметь одну и ту же группу дерматофитов по форме, месту поражения и типу образца. [57].

3. Среда для идентификации дерматофитов (DIM)

Относительно быстрая среда для предположительной идентификации дерматофитов была разработана как модификация DTM, позволяющая избежать такого недостатка DTM, как неспецифические и ложноположительные реакции NDM. Модификации DTM включали инкубацию при 37 °C и повышенную концентрацию циклогексимида [37]. Этот модифицированный DTM является средой для идентификации дерматофитов (DIM). DIM использовался с помощью безусловно разработанного протокола идентификации, который показал большое преимущество перед DTM в смысле чувствительности и специфичности. К сожалению, DIM имеет большое количество ложноотрицательных и ложных срабатываний, что ограничивает его полезность и использование [20].

4. Протокол, зависящий от мультихромогенных сред

Двухдневный протокол разработан для быстрой и простой дифференциации двух очень похожих видов дерматофитов [48]. Разработанный протокол был разработан следующим образом; первичные изоляты возрастом 2–20 дней субкультивировали на четырех различных коммерчески доступных хромогенных средах при разных температурах 4, 20, 25, 30 °C с максимальной температурой, не достигающей 37 °C, поскольку температуры выше 37 °C не подходят для роста большинства дерматофитов. Стратегия считывания этих инокулированных сред заключалась в регулярном контроле от 2 часов до 7 дней после инкубации. Это исследование [48] показало, что Candiselect является многообещающим кандидатом для быстрого и точного различения двух изученных видов дерматофитов (в течение нескольких часов). Несмотря на многообещающие результаты, этот метод позволяет различать только два дерматофита, упомянутых выше. Если присутствует другой дерматофит, его необходимо дополнительно диагностировать, что может занять даже больше времени, чем традиционная культура [48].

5. Скрининговый культуральный метод

Тонкий слой DTM покрывает прозрачное пластиковое предметное стекло. Это принципиально напоминает технику быстрого микрокультивирования, при которой образцы собирают и наносят на тонкослойный носитель с помощью прозрачной липкой ленты. Идентификация дерматофитов зависит от микроморфологических изменений во время ежедневного микроскопического исследования культур на предметных стеклах в сочетании с некоторыми макроморфологическими цветовыми характеристиками [35].

Все основанные на культивировании методы быстрой идентификации дерматофитов, разработанные либо для идентификации широкого круга дерматофитов, либо только для ограниченного числа видов, требуют длительного времени, которое фактически препятствует реальному применению упомянутых исследований в рутинной диагностике дерматофитии [50].

Матричные методы лазерной десорбции / ионизации-времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF) – этот метод генерации и оценки спектра считается эволюционным шагом в лабораторной диагностике как высоконадежный, точный, простой в обращении и легко включаемый в обычный лабораторный рабочий процесс. В то же время он преодолевает недостатки молекулярных методов, такие как высокая стоимость, опыт, необходимый во время применения и анализ результатов, или недостатки традиционных методов, такие как длительное потребление и низкая специфичность [67]. MALDI-TOF MS был впервые применен в масштабе целых клеток, свежая культура предполагаемых микробных колоний. К тому времени он стал способен напрямую работать с другим типом культур, нежели чашки с твердым агаром, поскольку в его систему были включены культуры крови и другие приложения, чтобы улучшить его способность выполнять широкую антимикробную панель [50].

Все системы, установленные для MALDI-TOF, выявляют широкий спектр различных видов бактерий и дрожжей [63]. Было проведено несколько испытаний для применения такого метода в различных протоколах идентификации плесневых грибов, включая дерматофиты [43]. Все они показали неэффективные результаты только тогда, когда они связали созданную в лаборатории базу данных, которая в большинстве случаев трудоемка и требует много времени [27], с испытанием по расширению существующей базы данных знаний о грибах MALDI-TOF, чтобы обеспечить более надежную идентификацию клинически соответствующие дерматофиты [30], различные исследования показали широкий диапазон точности от 13,5% до 100% из-за несоответствий, касающихся критических этапов стандартного лабораторного процесса предварительной подготовки к анализу. Согласно полученным результатам, некоторые исследования показали, что MALDI-TOF является отличным дополнением к традиционному культивированию при рутинной диагностике дерматофитов.

Видовая идентификация дерматофитов на основе морфологических свойств грибных структур трудна и не надежна из-за значительных различий на макро- и микроскопическом уровне между отдельными изолятами одного и того же вида. Также изоляты со сходными морфотинкторальными свойствами могут на самом деле принадлежать полностью отдельным видам.

Рассмотрим наиболее популярны методы молекулярной диагностики.

1. ПЦР на основе электрофореза

ПЦР на основе электрофореза — это наиболее простой формат полимеразной цепной реакции (ПЦР) для высокоспецифической, чувствительной и точной диагностики. ПЦР в диагностике дерматофитов позволяет достичь диагностического уровня обнаружения дерматофитов или идентификации видов дерматофитов с помощью пангрибковых,

дерматофитных праймеров или видоспецифичных праймеров соответственно. Внутренний транскрибируемый спейсер (ITS) и рибосомная ДНК 28s являются наиболее часто используемыми праймерами для исследования дерматофитов. За ними следует дальнейшее определение размера ампликона с использованием гель-электрофореза. Несмотря на размер образца, состояние и подготовку перед применением реакции ПЦР, даже в смешанных культурах, она показала более высокую скорость идентификации, чем другие традиционные методы. На результаты ПЦР повлиял вид животных, у которых был взят образец, поскольку различия в поведении животных влияют на нагрузку нуклеиновых кислот дерматофитов в собранном образце, что, по своей роли, отражается на результатах [60]. Несмотря на относительно низкую стоимость традиционной ПЦР по сравнению с другими молекулярными методами, она требует постаmplификационных этапов и не может количественно проиллюстрировать ситуацию с инфекцией [25].

2. Количественная ПЦР / ПЦР в реальном времени (qPCR)

Количественная оценка грибковой нагрузки инфицированного образца может быть достигнута с помощью высокоточной, чувствительной и специфической количественной ПЦР. ПЦР в реальном времени зависит от пары праймеров и меченых зондов, нацеленных на частичные или видоспецифичные гены. Кроме того, он показал менее уязвимые этапы заражения из-за меньшего количества операций после амплификации. Несмотря на свою высокую стоимость, он показал относительно доступную стоимость в случае высокопроизводительных рутинных лабораторий, которые исследуют несколько образцов за цикл [46]. КПЦР – полезный диагностический метод в случае отслеживания эффекта лечения, дифференциации клинической инфекции и контаминации путем установления порога инфицирования дерматофитами. Он показал более высокие характеристики чувствительности и специфичности по сравнению с традиционными методами [19]. В целом, количественная ПЦР

показывает значительно более высокую чувствительность при диагностике дерматофитов и идентификации видов, и дифференцировка даже в присутствии других кератинофильных видов NDM в том же месте инфекции. Исходя из исследований, нельзя полностью полагаться на КПЦР как на полную замену методов золотого стандарта, поскольку он показал, как ложноположительные, так и ложноотрицательные результаты, так как на него влияют несколько факторов, таких как качество образца, различия в молекулярных мишенях, используемая методология амплификации, и протоколы выделения ДНК [22].

3. Вложенная ПЦР

Стремясь повысить специфичность ПЦР в диагностике дерматофитоза, созданы несколько целевых вложенных ПЦР, особенно при использовании пан-праймеров. Первичный ампликон, полученный в результате цикла амплификации первой пары праймеров, будет подвергнут другому циклу с другой парой праймеров. Во втором цикле полученный первичный ампликон будет действовать как матрица для второй пары праймеров. Общая чувствительность набора вложенных ПЦР была очень высокой в нескольких предыдущих исследованиях [65], включающих общий протокол ПЦР для диагностики дерматофитов, а также по сравнению с результатами, полученными на слайде с креплением КОН и традиционное культивирование, особенно в случае тех культур, которые не достигают макроскопического роста. Однако частота заражения и затраты времени по сравнению с установленной ПЦР выступают в качестве основного недостатка при ее применении.

4. Мультиплексная ПЦР

Один из тех методов ПЦР, разработанный для использования в случае ограничения образца с необходимостью обнаружения нескольких возбудителей в одном образце с использованием одной и той же реакции ПЦР с использованием двух или более наборов праймеров. Нуклеотидные последовательности каждого прямого и обратного праймера в каждом

выбранном наборе следует проверять на димеризацию, которая может привести к неспецифической амплификации. Было разработано несколько мультиплексных / дуплексных ПЦР, которые были опробованы несколько раз, и они показали конкурентоспособную чувствительность и специфичность, чем культивирование и мокрые образцы КОН, с наивысшей точностью в случаях онихомикозов и *T. Rubrum* [54].

5. ПЦР-ИФА

Гибридный метод, основанный как на ПЦР, так и на иммуноферментном анализе (ELISA), в котором меченый ампликон нуклеиновой кислоты используется вместо целевого анализируемого белка в микрокультурах ELISA-планшетов [45]. Для повышения его чувствительности перед применением ELISA проводили гибридизацию специфических зондов. Были разработаны два формата гибридизации. Либо амплификация генов-мишеней в присутствии дигоксигенина и биотин-меченного нуклеотидного зонда с образованием биотинилированного ПЦР-ампликона [21]. Фиксированный ампликон на микротитровальном планшете выявляли с помощью антидигоксигенинпероксидазы [61]. Однако он не считается наиболее применимым методом рутинной диагностики дерматофитов из-за его трудоемкости и затрат времени по сравнению с другими общепринятыми методами.

6. ПЦР-полиморфизм длины рестрикционного фрагмента (ПЦР-ПДРФ)

ПЦР-ПДРФ – еще один гибридный метод, основанный на ПЦР и дальнейшей стадии полиморфизма ограниченных длин фрагментов с использованием рестрикционных ферментов. В определенной степени он напоминает недорогую замену вложенной ПЦР, поскольку он может обнаруживать различные виды дерматофитов и даже разные виды NDM в случаях онихомикоза с множеством причин, но не может обнаружить вариации в пределах того же вида [32]. В основном, этот анализ зависит от

амплификации целевых последовательностей, которая показывает видоспецифичные вариации; затем ампликон обрабатывали специфическими рестрикционными ферментами; наконец, была проведена стадия секвенирования ампликона или гель-электрофореза для сравнения молекулярной массы полос со стандартной лестницей. Тем не менее, это кажется относительно невысокой стоимостью, простым в выполнении дизайном и более высокой чувствительностью, чем традиционные методы культивирования [31]. Из-за трудоемкости, утомительности и длительности этого метода, а также из-за потребности в рестрикционных ферментах, он исключен из стандартной схемы диагностики дерматофитов [59].

7. Методы, основанные на боковом потоке.

В течение последних нескольких лет [41] были разработаны методы, основанные на боковом потоке, для быстрого обнаружения различных инфекционных и аналитических агентов, которые соответствуют доступным, чувствительным, специфическим, удобным для пользователя, быстрым и надежным. Было разработано множество анализов бокового кровотока с разной точностью, специфичностью и чувствительностью. Иммунохроматографический анализ бокового потока (ILFA), иммунохроматографический анализ бокового потока нуклеиновых кислот (NALFIA) и анализ бокового потока нуклеиновых кислот (NALFA). NALFA может быть основан либо на гетеротермической амплификации (ПЦР-NALFA), либо на изотермической амплификации (RPA-NALFA). Перспективно кластеризованные регулярно чередующиеся короткие палиндромные повторы / анализ бокового потока cas 12 (CRISPR / cas 12-LFA) могут быть разработаны для диагностики дерматофитов. CRISPR / КАС 12-МАФ разработана либо с использованием системы DETECTR или систему SHERLOCK. Каждый анализ бокового потока может быть разработан в различных форматах: типичный сэндвич, конкурентный и мультиплексный. Несколько исследований, которые были проведены в

качестве предварительного шага к применению метода, основанного на боковом потоке, рассматривали этот анализ как быстрый метод идентификации дерматофитов.

В одном сравнительном исследовании, в ходе которого дерматофит был обнаружен в 222 образцах, для диагностики онихомикоза было проведено сравнение между обычным прямым микроскопическим исследованием, высокоспецифической ПЦР и недавно разработанным боковым потоком на основе моноклональных антител. Точность, полученная с помощью трех сравниваемых методов, была следующей последовательно; 90,5%, 76,6% и 92,5%, в то время как 45 образцов показали разницу в точности полученных результатов между тремя сравниваемыми методами, были основаны на результате ПЦР в качестве окончательного суждения [64].

Таким образом, в настоящее время доступны несколько успешно разработанных диагностических методов дерматофитии, которые могут заменить традиционные методы. Многие из этих методов более надежны и менее эффективны для диагностики дерматофитии. Некоторые показали дорогостоящие задачи или требования специалистов; другие показали достаточно чувствительность, специфичность или быстроту, третьи нуждались в длительной предэкзамеменной подготовке. В настоящее время методы, основанные на боковом потоке, считаются многообещающим конкурентом как традиционных лабораторных методов диагностики, так и передовых молекулярных методов диагностики. Повышение диагностической точности, чувствительности и специфичности боковых потоков является недавней проблемой и перспективой в диагностике дерматофитоза.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве основного материала для проведения исследования было использовано образцы волос и корковых образований поражённых участков кожи крупнорогатого скота в количестве 141 экземпляров, среди которых 98 подтверждённых на трихофитию возбудителя *T. verrucosum* (62 – двумя регламентированными методами; 32 – одним из регламентированных методов) и 43 образца от животных с кожными заболеваниями не грибкового происхождения (группа сравнения).

Методы исследования дерматофитов:

1. Микроскопия патологического материала.
2. Культивирование на питательной среде.
3. ПЦР.

2.1. Методики проведения методов исследования дерматофитов

2.1.1. Микроскопия патологического материала и мацерация

Микроскопия патологического материала и мацерация. Помещали измельченный патологический материал на середину предметного стекла в каплю раствора 10–20% раствора КОН и слегка подогревали над пламенем спиртовки до получения белесоватого ободка по краю капли. Далее накрывали покровным стеклом и оставляли на 5–10 минут (непосредственно мацерация).

После микроскопировали в световом микроскопе сначала под малым, затем под большим увеличением.

Микроскопия мацерированного патологического материала не позволяет определить видовую принадлежность гриба или охарактеризовать профиль восприимчивости, однако такой тип микроскопии применяется как быстрый метод для подтверждения диагноза дерматофитии. Данная микроскопия позволяет выявить три возможных типа инфекций: Экотрикс – небольшие или крупные артроконидии, образующие «футляр» вокруг волосяного стержня, Эндотрикс – артроконидии внутри волосяного стержня (рис. 1) или Фавус — гифы и воздушные пространства внутри волосяного стержня.

Манипуляции по подготовке нативных препаратов проводили в ламинарном боксе для минимизирования фактора аэрогенного заражения т.к. дерматофиты относятся к 3 группе патогенности.



Рисунок 1 – Схема поверхностного (эктотрикс) и внутреннего (эндотрикс) поражения волосяного стержня. (Голдсмит, Кац, Джилкрест: Дерматология Фицпатрика в клинической практике)

2.1.2. Культивирование на питательной среде

Культуральный метод исследования проводили в 2 этапа.

1-й этап, культивирование на плотной питательной среде Сабуро.

В качестве среды использовали селективную среду для выращивания патогенных грибов Сабуро, плотная питательная среда, производства «BioMedia». Также плотную питательную среду Сабуро с добавлением левомицетина для подавления роста бактерий препятствующих росту грибов.

Приготовление плотной питательной среды Сабуро. Сухую среду 54 г. Разводили в 1 л. дистиллированной воды. Далее кипятили до полного

растворения среды. Далее разливали в стерильные колбы и стерилизовали в автоклаве при температуре 112 °С. После автоклавирования готовой питательной среды, разливали ее по чашкам Петри.

При приготовлении плотной питательной среды Сабуро с левомицетином, антибиотик добавляется перед этапом автоклавирования.

Манипуляции культивирования культур дерматофитов проводили в ламинарном боксе для минимизирования фактора аэрогенного заражения т.к. дерматофиты относятся к 3 группе патогенности.

Засеваемый патологический материал (чешуйки/волосы/корковые образования) измельчали на предметном стекле в физиологическом растворе NaCl и засевали на готовую среду Сабуро.

Далее посев инкубировали при температуре 27 °С в течении 2 недель.

После инкубации определяли морфологические особенности выросших макрокультур.

T. verrucosum имеет следующие макроскопические характеристики: колонии малого размера, «собранная в кучу» колония, иногда встречаются и плоские колонии. Цвет – от белого до желтовато-серого. Пигментация – от нейтрального (отсутств.) до желтого.

2-й этап, микроскопия чистой культуры.

На центр предметного стекла вносили каплю дистиллированной воды. Перед взятием культуры микробиологической петлей/крючком ее прокалывали над спиртовкой. Остужали микробиологическую петлю/крючок в условно свободном месте от культуры на чашке петри и затем производили забор культуры для нативного препарата. В каплю дистиллированной воды на предметном стекле вносили культуру. Далее стерилизовали микробиологическую петлю/крючок над пламенем

спиртовки. Добавляли в мазок каплю раствора Люголя. После накрывали покровным стеклом.

Манипуляции по подготовке нативных препаратов чистой культуры также проводили в ламинарном боксе для минимизирования фактора аэрогенного заражения т.к. дерматофиты относятся к 3 группе патогенности.

После микроскопировали в световом микроскопе с начала под малым затем под большим увеличением.

Во время микроскопии определяли морфологические особенности микрокультур (рис. 2).

T. verrucosum имеет следующие микроскопические характеристики: ветвящийся мицелий. Гифы септированные, бесцветные, с редкими булавовидными (овоидными/грушевидными) микроконидиями (4–7 х 2–3 мкм). Макроконидии, если присутствуют, 35–45 х 4–7 мкм, многоклеточные в виде «ниток бус», 4–7 клеточные, гладко- и тонкостенные. Могут образовывать цепочки хламидоконидий (хламидоспор) на декстрозном агаре Сабуро (обычно при $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$).

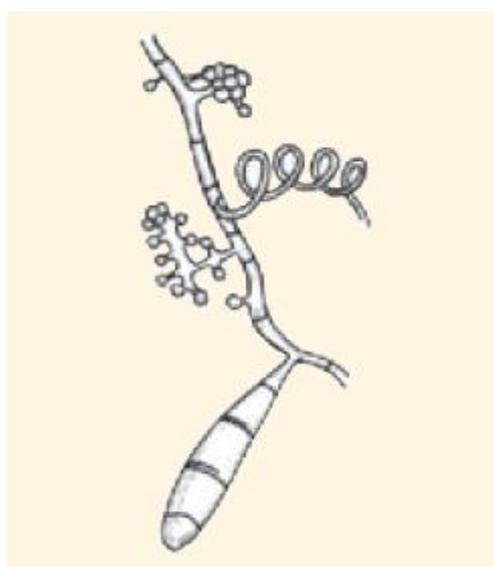


Рисунок 2 – *T. verrucosum*, микрокультура при микроскопии.
(Голдсмит, Кац, Джилкрест: Дерматология Фицпатрика в клинической
практике)

2.1.3. Полимеразная цепная реакция

1-й этап, пробподготовка перед экстракцией ДНК гриба. Грибы имеют хитиновую клеточную стенку, которая препятствует выделению ДНК. Требовалось для этого обработать биоматериал буферным раствором с ключевым действующим веществом, ферментом хитиназа. Для приготовления реакционной смеси мы руководствовались формулой:

*100 мкл (буферного раствора на 1 образец) * n (количества образцов).*

Реакционная смесь слагается из фосфатного буфера (ФБ), этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), хитиназы и дистиллированной воды. Приготовление общего буферного раствора описан ниже (схема 1). Фосфатный буфер разводили с дистиллированной водой в соотношении 1:1 по отношению к половине объёма от 100n мкл рассчитанного общего буферного раствора. ЭДТА разводили с дистиллированной водой в соотношении 1:4 по отношению ко второй половине объёма от 100n мкл рассчитанного общего буферного раствора.

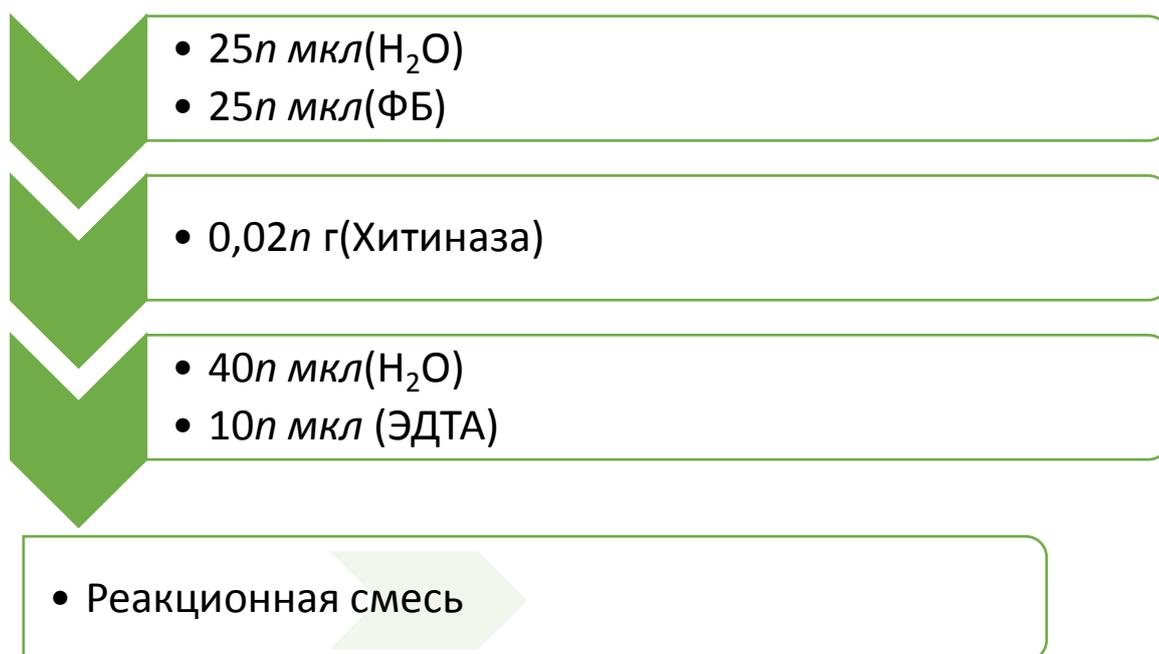


Схема 1 – Приготовление общего буферного раствора для пробподготовка перед экстракцией ДНК гриба.

После приготовления реакционной смеси, вносили его в пробирки типа эппендорф объемом 1,5 мл с биоматериалом. Далее инкубировали при 25 °С в течении 2 часов. В течении инкубации каждый 30 минут эппендорфы с образцами смешивали на вортексе.

2-й этап, экстракция ДНК.

Экстракцию ДНК в разных опытах проводили с помощью наборов реагентов ДНК-сорб-АМ производителя «AmpliSens» и РеалБест экстракция 1000 производителя «Вектор-Бест».

Проведение экстракции ДНК с помощью набора РеалБест экстракция 1000:

1. Отбирали и подписывали необходимое для работы количество пробирок типа эппендорф объемом 2 мл (по количеству исследуемых образцов, включая необходимые контрольные образцы).
2. В каждую пробирку вносили по 30 мкл раствора ВКО (внутренний контрольный образец).

3. В пробирку, маркированную «ОКО», вносили 1,0 мл ОКО (отрицательный контрольный образец).

4. В пробирку, маркированную «ПКО», вносили 970 мкл ОКО и 30 мкл ПКО (положительный контрольный образец).

5. В остальные пробирки вносили по 1,0 мл исследуемых образцов.

6. В каждую пробирку, не задевая стенок, вносили по 1,0 мл концентрирующего раствора.

7. Пробирки закрывали крышками и содержимое пробирок тщательно перемешивали переворачиванием 5 раз и выдерживали в течение 10–15 минут при комнатной температуре. Затем центрифугировали при 3000 об/мин при температуре (18–25) °С в течение 5 минут.

8. Из каждой пробирки с помощью специального отсасывателя с отдельными наконечниками максимально полно удаляли надосадочную жидкость.

9. В каждую пробирку к полученному осадку добавляли по 200 мкл лизирующего раствора № 1. Перемешивали содержимое пробирок на вортсксе в течение 10–15 секунд, чтобы осадок отслоился от дна пробирки. Выдерживали при температуре (18–25) °С 5 минут. Коротким центрифугированием сбрасывали капли со стенок пробирки.

10. В каждую пробирку с лизирующим раствором № 1 добавляли по 500 мкл лизирующего раствора № 2 с сорбентом. Перемешивали содержимое пробирок на вортсксе в течение 10–15 секунд. Выдерживали в термошейкере с частотой вращения 1300 об/мин при 56 °С в течение 10 минут. Коротким центрифугированием сбросили капли со стенок пробирок.

11. В каждую пробирку с анализируемыми образцами вносили по 750 мкл осадителя НК.

12. Перемешивали содержимое пробирок на вортексе в течение 10–15 секунд. Оставляли образцы при температуре (18–25) °С на 3–5 минут. Центрифугировали при 13000 об/мин в течение 5 минут.

13. Не взбалтывая осадок, устанавливали пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки специальным отсасывателем с отдельными наконечниками убирали надосадочную жидкость, не задевая осадок.

14. В каждую пробирку к осадку добавляли 500 мкл раствора для отмывки № 1. Перемешивали содержимое пробирок на вортексе в течение 10–15 секунд. Центрифугировали на микроцентрифуге при 13000 об/мин в течение 5 минут.

15. Не взбалтывая осадок, устанавливали пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки убирали надосадочную жидкость специальным отсасывателем с отдельными наконечниками не задевая осадок.

16. В каждую пробирку к осадку добавляли по 300 мкл раствора для отмывки № 2. Перемешивали содержимое пробирок на вортексе в течение 10–15 секунд. Центрифугировали на микроцентрифуге при 13000 об/мин в течение 5 минут.

17. Не взбалтывая осадок, устанавливали пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки убирали надосадочную жидкость специальным отсасывателем с отдельными наконечниками, не задевая осадок.

18. Высушивали осадок при открытых пробирках при температуре (18–25) °С в течение 2–3 минут.

19. В каждую пробирку к осадку добавляли по 200 мкл элюирующего раствора. Тщательно ресуспендировали осадок на вортексе. Инкубировали в термошейкере с частотой вращения 1300 об/мин при 56 °С в течение 10 минут. Центрифугировали на микроцентрифуге при 13000 об/мин 1 минуту. После пробы были готовы к постановке ПЦР анализа.

Технология этого способа экстракции основана на связывании нуклеиновой кислоты с веществом, покрывающим магнитные частицы. К лизированному образцу добавляют такие магнитные частицы и перемешивают для связывания НК с ними. После этого пробирку ставят в магнитный штатив или подносят к магниту, фиксируя таким образом твердую фазу. После отбора супернатанта нуклеиновые кислоты на частицах промывают и элюируют.

Данный набор имеет особенность в том, что выделенная НК хранению не подлежит и экстракция производится в день постановки ПЦР.

Процедура проведения экстракции ДНК с помощью набора ДНК-сорб-АМ:

1. В подготовленные одноразовые стерильные полипропиленовые пробирки типа эппендорф вносили по 10 мл ВКО.

2. Ресуспендировали сорбент и вносили в каждую пробирку по 20 мкл сорбента универсального, после чего вносили по 300 мкл лизирующего раствора, используя наконечники с аэрозольным барьером.

3. Вносили по 100 мкл клинического образца, используя для каждой пробы отдельный наконечник с фильтром. В пробирку отрицательного контроля выделения вносили 100 мкл ОКО.

4. Пробирки плотно закрывали, содержимое тщательно перемешивали на вортексе и инкубировали 5 минут при 65 °С в термостате. После окончания инкубации содержимое повторно перемешивали на вортексе и оставляли при комнатной температуре на 2 минуты.

5. Осаждали сорбент в пробирках центрифугированием при 10 тыс об/мин в течение 30 сек. Не захватывая сорбент, удаляли надосадочную жидкость в колбу-ловушку с помощью вакуумного отсасывателя, используя для каждой пробы отдельный наконечник без фильтра.

6. Добавить в пробы по 1 мл отмывочного раствора, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента.

7. Осаждали сорбент в пробирках центрифугированием при 10 тыс об/мин в течение 30 сек. Не захватывая сорбент, удаляли надосадочную жидкость в колбу-ловушку с помощью вакуумного отсасывателя, используя для каждой пробы отдельный наконечник без фильтра.

8. Помещали пробирки в термостат с температурой 65 °С на 5–10 минут для подсушивания сорбента, при этом крышки должны быть открыты.

9. В пробирки добавляли по 100 мкл ТЕ-буфера (буферного вещества Трис и ЭДТА) для элюции ДНК, используя наконечник с фильтром. Перемешивали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Помещали в термостат с температурой 65 °С на 5 минут.

10. Центрифугировали пробирки при 12 тыс об/мин в течение 1 минуты на микроцентрифуге. В полученной надосадочной жидкости содержится очищенная ДНК.

Клинический образец, (клинический материал, помещенный в транспортную среду) обрабатывается лизирующим раствором в присутствие частиц силико-сорбента. В результате происходит деструкция клеточных мембран, вирусных оболочек и других биополимерных комплексов и высвобождение ДНК. Растворенная ДНК в присутствие лизирующего раствора связывается с частицами сорбента, в то время как другие компоненты лизированного клинического материала остаются в растворе и удаляются при осаждении сорбента центрифугированием и последующей отмывкой. При добавлении раствора для элюции ДНК к сорбенту происходит переход ДНК с поверхности силики в раствор, который отделяется от частичек сорбента центрифугированием. В результате указанной процедуры получается высокоочищенный препарат ДНК, свободный от ингибиторов реакции амплификации, что обеспечивает высокую аналитическую чувствительность ПЦР-исследования.

Полученные пробы после экстракцией с помощью набора реагентов ДНК-сорб-АМ можно хранить при температуре от 2 до 8 °С или в течение года при температуре не выше 16 °С.

3-й этап, амплификация. Перед постановкой ПЦР праймеры соответствующие определенным видам возбудителя трихофитии вторично разводились для амплификации. Для ПЦР-идентификации вида *T. mentagrophytes* использовались праймеры TriM130F/TriM311R. Для ПЦР-идентификации вида *T. verrucosum* использовались Ver76F/Ver366R. По протоколу выполнения амплификации требовалось, чтобы конечная концентрация прямого и обратного праймеров составляла не 100 мкМ, после первичного разведения, а от 0,2–0,4. После расчетов было получено разведение праймеров с деионизированной водой 1:24.

Амплификацию проводили с помощью готовой смеси для ПЦР ScreenMix-HS от компании «Евроген». Компоненты реакции вносили в пробирки типа эппендорф объёмом 0,2 мл в следующей последовательности: стерильная вода, ScreenMix-HS, праймеры, ДНК-матрица. После ставили амплифицироваться в специальном амплификаторе.

Для ПЦР – идентификации вида *T. mentagrophytes* были использованы данные условия реакции:

1. Начальная денатурация 94 °С – 2 минуты.
2. 30 циклов – денатурация 94 °С – 20 секунд, отжиг праймеров 58 °С – 20 секунд, элонгация 72 °С 15 секунд.
3. Терминальная элонгация – 72 °С 1 минута.

Для ПЦР – идентификации вида *T. verrucosum* были использованы данные условия реакции:

1. Начальная денатурация 94 °С – 2 минуты.
2. 30 циклов – денатурация 94 °С – 20 секунд, отжиг праймеров 61 °С – 20 секунд, элонгация 72 °С 20 секунд.
3. Терминальная элонгация – 72 °С 1 минута.

4-й этап, электрофорез. После амплификации образцы вносили в ПААГ (полиакриламидный агарозный гель) агарозный гель.

Для приготовления ПААГ предварительно готовился 30% раствор акриламида с метиленбисакриламидом в соотношении 29:1 с дистиллированной водой. Гель заливали между двумя стеклами, разделенным спейсерами. При заливке геля важно было избегать образования пузырей воздуха между стеклами. Вставляется гребенка для формирования лунок. Время застывания геля – 15 минут.

После гель помещали в камеру для проведения горизонтального электрофореза. Электрофорез проводили в TBE \times 1 (Трис-борат-ЭДТА) буфере, полученным путем разведения TBE \times 10 дистиллированной водой (100 мл TBE \times 10 + 900 мл H $_2$ O), при напряжении 300 В. Далее проводили непосредственно электрофорез в течении 50 минут.

Для оценки скорости миграции образцов в геле перед нанесением на гель пробы смешивали в соотношении 5:1 с краской, содержащей 0,25% бромфенолового синего, 0,25% ксиленцианола и 15% фикола. Бромфеноловый синий мигрирует в геле в том же направлении, что и пробы, обладает известной электрофоретической подвижностью и не взаимодействует с исследуемыми веществами.

После окончания электрофореза гель окрашивали слабым раствором бромистого этидия в течении 10–15 минут и визуализируют в проходящем ультрафиолете с использованием гель-документирующей системы. Затем считывали электрофореграмму на трансиллюминаторе.

2.1.4. Статистический анализ

В качестве статистического анализа использовался метод четырехпольной таблицы.

Для статистической обработки данных были выбраны следующие показатели информативности диагностических методов.

1. Чувствительность (Se) (показатель истинно положительных результатов) измеряет долю правильно идентифицированных

положительных результатов (т. е. Долю тех, у кого есть какое-либо заболевание (затронуты), которые правильно идентифицированы как имеющие это заболевание). Формулы для расчета чувствительности:

$$Se = TP / (TP + FN) * 100\%, \text{ где}$$

TP – истинно положительные результаты;

FN – ложноотрицательные результаты.

2. Специфичность (Sp) (истинно отрицательный показатель) измеряет долю правильно идентифицированных отрицательных результатов (то есть долю тех, у кого нет заболевания (незатронутых), которые правильно идентифицированы как не страдающие этим заболеванием). Формулы для расчета Специфичности:

$$Sp = TN / (TN + FP) * 100\%, \text{ где}$$

TN – количество истинно отрицательных результатов;

FP – количество ложноположительных результатов.

3. Проверка диагностической эффективности или точности (Acc) – общая вероятность того, что пациент будет классифицирован правильно, что определяется как доля всех тестов, дающих правильный результат.

Формула для измерения диагностической эффективности:

$$Acc = (TP + TN) / (TP + TN + FP + FN), \text{ где}$$

TP – истинно положительные результаты;

TN – количество истинно отрицательных результатов;

FP – количество ложноположительных результатов;

FN – ложноотрицательные результаты.

4. Прогностические значения положительные и отрицательные (PPV и NPV соответственно) представляют собой пропорции положительных и отрицательных результатов в статистических и диагностических тестах, которые являются истинно положительными и истинно отрицательными результатами, соответственно.

Прогностичность положительного результата определяется как частота его совпадения с заболеванием и, таким образом, показывает,

насколько велика вероятность наличия болезни (синдрома, симптома) при положительных результатах исследования.

Измеряется по формуле: $PPV = TP / (TP + FP)$, где

TP – истинно положительные результаты;

FP – количество ложноположительных результатов.

Прогностичность отрицательного результата определяется как частота его совпадения с отсутствием заболевания. Данный критерий, таким образом, показывает, насколько велика вероятность того, что пациент здоров, если результаты исследования отрицательные.

Измеряется по формуле: $NPV = TN / (TN + FN)$, где

TN – количество истинно отрицательных результатов;

FN – ложноотрицательные результаты.

5. Отношения правдоподобия оценивает степень соответствия двух конкурирующих статистических моделей на основе отношения их правдоподобия, в частности, одной, найденной путем максимизации по всему пространству параметров, а другой – после наложения некоторого ограничения.

Отношение правдоподобия положительного результата теста – отношение между вероятностью положительного результата теста при наличии заболевания и вероятностью положительного результата теста при отсутствии заболевания.

Измеряется по формуле: $Se / (1 - Sp)$, где

Sp – специфичность;

Se – чувствительность.

Отношение правдоподобия отрицательного результата теста – отношение вероятности отрицательного результата теста при наличии заболевания и вероятности отрицательного результата теста при отсутствии заболевания.

Измеряется по формуле: $(1 - Se) / Sp$, где

Sp – специфичность;

Se – чувствительность.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

1.1. Анализ литературы по методам исследования трихофитии.

Грибковые инфекции кожи, волос и ногтей, несомненно, доминируют среди всех видов грибковых инфекций. Дерматофиты хотя и являются древнейшими микроорганизмами, долгое время нестабильны в таксономическом положении. С диагностической точки зрения видовая идентификация дерматофитов по-прежнему представляет собой серьезную проблему, часто приводящую к терапевтическим ошибкам. Растущее число инфекций, в том числе зоонозов, отсутствие таксономической стабильности и неоднозначная клиническая картина всех случаев дерматомикоза побуждают искать новые, методы видовой идентификации этих грибов.

Методы диагностики дерматофитов.

1. Препарат с гидроксидом калия – метод нацеленный на исследования спор в или на чешуйках/волосах, обработанные 10% раствором КОН.

2. Лампа Вуда – лампа ультрафиолетового света – лампа, излучающая почти исключительно в наиболее длинноволновой («мягкой») части ультрафиолетового диапазона используется для диагностики дерматологических заболеваний.

3. MALDI-TOF – десорбционный метод «мягкой» ионизации, обусловленной воздействием импульсами лазерного излучения на матрицу с анализируемым веществом.

4. Газовая хроматография – физико-химический метод разделения веществ, основанный на распределении компонентов анализируемой смеси между двумя несмешивающимися и движущимися относительно друг друга фазами, где в качестве подвижной фазы выступает газ (газ – носитель), а в качестве неподвижной фазы – твердый сорбент или жидкость, нанесенная на инертный твердый носитель или внутренние стенки колонки.

5. Жидкостная хроматография – физико-химический метод разделения веществ, основанный на распределении компонентов анализируемой смеси между двумя несмешивающимися и движущимися относительно друг друга фазами, где в качестве подвижной фазы выступает жидкость, а в качестве неподвижной фазы – твердый сорбент или жидкость, нанесенная на инертный твердый носитель или внутренние стенки колонки.

6. Культуральное исследование – это метод лабораторной диагностики заболеваний, при котором биоматериал пациента помещается в специальную среду для размножения микроорганизмов с целью дальнейшего выявления патогенов. При исследовании дерматофитов используют специализированные среды: Сабуро, тестовая среда дерматофитов (DTM), среда для идентификации дерматофитов (DIM), хромогенные среды.

7. Микроскопия – метод изучения объектов с использованием микроскопа. При исследовании дерматофитов

используют: световую микроскопию, фазово-контрастную микроскопию, флуоресцентную микроскопию.

8. ILFA – иммунохроматографический анализ бокового потока.

В последнее десятилетие наблюдается революционный прогресс в разработке молекулярных методов диагностики грибковых инфекций и надежного определения видов этиологических факторов, вызывающих эти дерматомикозы.

1. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) в биологическом материале (пробе).

2. Полимеразная цепная реакция в реальном времени – лабораторный метод, основанный на методе полимеразной цепной реакции, позволяющий определять не только присутствие целевой нуклеотидной последовательности в образце, но и измерять количество её копий.

3. Вложенная ПЦР – двухстадийная вариация ПЦР, используемая для снижения количества неспецифичных продуктов реакции.

4. Мультикомплексная ПЦР – мультиплексная полимеразная цепная реакция (Мультиплексная ПЦР) относится к использованию полимеразной цепной реакции для одновременной амплификации нескольких различных последовательностей ДНК (как если бы выполнялось несколько отдельных реакций ПЦР вместе в одной реакции).

5. ПЦР-ИФА – гибридный метод, основанный как на ПЦР, так и на иммуноферментном анализе (ELISA), в котором меченый ампликон нуклеиновой кислоты используется вместо целевого анализируемого белка в микрокультурах ELISA-планшетов.

6. ПЦР-ПДРФ – еще один гибридный метод, основанный на ПЦР и дальнейшей стадии полиморфизма ограниченных длин фрагментов с использованием рестрикционных ферментов.

7. HRM-анализ – относительно новый метод анализа, позволяющий выявлять новые варианты генов, делать скрининг образцов ДНК на однонуклеотидные полиморфизмы, выявлять вставки/делеции и другие неизвестные мутации, и определять процент метилированной ДНК в образцах.

8. NALFIA – иммунохроматографический анализ бокового потока нуклеиновых кислот).

9. NALFA – анализ бокового потока нуклеиновых кислот.

10. ПЦР-NALFA – на гетеротермической амплификации, RPA-NALFA – анализ бокового потока нуклеиновых кислот, основанный на изотермической амплификации.

Зоофильный дерматофитоз является одной из основных проблем общественного и ветеринарного здравоохранения, широко распространенной во всем мире среди крупного рогатого скота. Для выявления возбудителя и географического распределения дерматофитов, обуславливающий стригущий лишай крупного рогатого скота в Иране было проведено исследование на 6789 головах коров. Образцы были взяты у 380 голов крупного рогатого скота с подозрением на дерматофитоз. Возбудители были идентифицированы макроскопически и микроскопически путем исследования КОН и выделения культуры. Только 352 (92%) случая дерматофитоза были выявлены у крупного рогатого скота, и *T. verrucosum* был единственным грибом, выделенным от животных.

Этими же методами в общей сложности 790 образцов перьев, волос и кожи различных животных (домашних и сельскохозяйственных) с подозрением на дерматофитоз, из которых 248 (31,4%) дали дерматофиты. Наиболее часто выделялись дерматофиты *M. canis* (38,3%), *T. verrucosum* (31,8%), *T. mentagrophytes* (13,3%) и *M. gypsum* (7,7%). *T. verrucosum* был наиболее частым возбудителем дерматофитозов у жвачных животных, *M. equinum* у лошадей, *M. gypsum* у кроликов,

M. gallinae у кур и *T. mentagrophytes* у домашних белок. Доля положительных культур от кошек была значительно выше (54,8%), чем от собак (8,2%), и *M. canis* был наиболее распространенным изолированным видом (87,2 и 50% соответственно).

Таким образом адекватный диагноз микотической инфекции, по данным литературы, удается поставить в 15–45% случаев.

Результаты многих исследований показывают, что прямая идентификация грибов из дерматологических образцов на основе молекулярных методов намного надежнее и намного быстрее по сравнению с не молекулярно-диагностическими методами.

Однако в современной практике Российской лабораторной диагностике дерматофитозов животных по-прежнему используется «золотой стандарт» методов исследования и выявления дерматофитов. К золотому стандарту методов идентификации дерматофитов относятся микроскопия и исследования культуры клеток на питательной среде. Сегодня повсеместно в России сельскохозяйственные учреждения и ветеринарные клиники опираются на положение по методам лабораторной диагностики дерматофитозов животных, утвержденный главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства РФ 18 марта 2008 г.

Молекулярные методы выявления этиологических факторов дерматомикозов непосредственно из дерматологических образцов намного привлекательнее и имеют много преимуществ начиная от высокой специфичности и чувствительности заканчивая меньшими затратами времени.

1.2. Результаты лабораторной диагностики грибов: микроскопия и культивировании на питательных средах, а также методом ПЦР на основе электрофореза.

Результаты микроскопии патологического материала и мацерация с помощью 10–20% раствора КОН.

В качестве биоматериала использовался волос больного животного. После мацерации проводилась микроскопия для выявления эктотрикса как показатель возможного наличия дерматофита вида, *T. verrucosum* или других грибов с внешнем расположением спор на пораженном волосе.

В ходе микроскопии было зарегистрировано наличие множества хаотично расположенных спор, при надавливании на препарат легко отделялись.

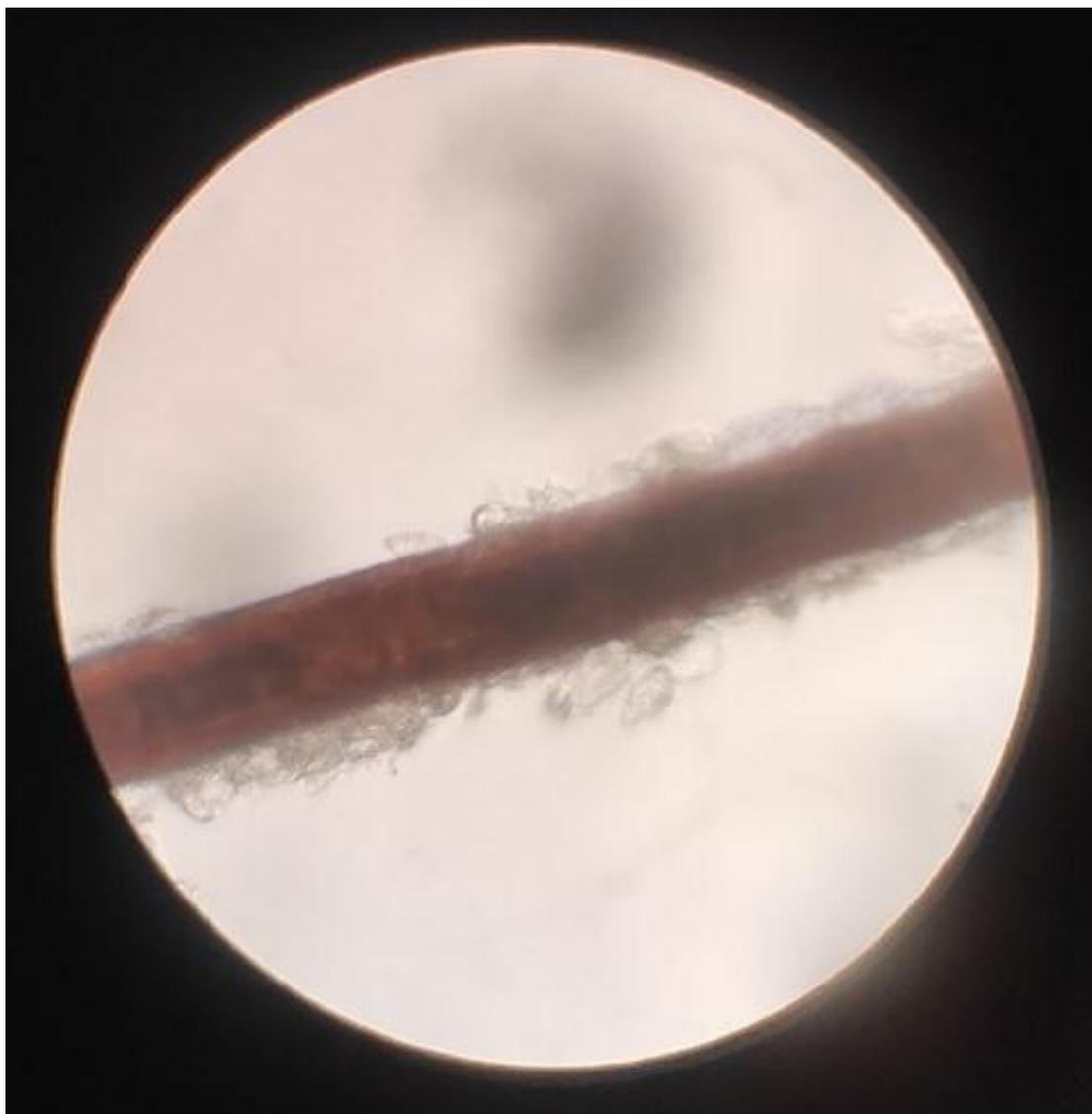


Рисунок 3 – Микроскопическая картина волоса, пораженного грибами рода *Trichophyton*, эктотрикс (увеличение x20).

В результате просмотрено образцов в количестве 141 экземпляров. Из 98 образцов выявлено 86 (69%) образцов с эктотриксом и 12 (12%) образца с отрицательным результатом, которые не смотря на надежные критерии морфологической детекции при микроскопии патологического материала, не позволили дифференцировать дерматофиты в клиническом образце.

В исследовании выявляли именно эктотрикс т.к. у паразитических грибов дерматофитов вида *T. verrucosum* наблюдается данный тип расположения спор.

Результаты культивирования на питательной среде.

При посеве на питательную среду Сабуро в качестве биоматериала использовались корковые образования пораженных участков кожи, чешуйки и волосы больных животных.

После культивирования проводилось идентификация возбудителей на основе морфологических характеристик макрокультуры (культура клеток на питательной среде) и микрокультуры (микроскопия чистой культуры клеток).



Рисунок 4 – Колония культуры *T. verrucosum* (среда Сабуро, температура 37 °С, 4 неделя культивирования).

При культуральном исследовании было выявлено колонии малого размера, слегка сморщенные по центру, с приподнятой верхушкой (73 образца), иногда встречались и плоские (12 образцов). Цвет – от белого до желтовато-серого. С отчетливо белой окраской встречались в количестве 27 образцов. Пигментация была от нейтральной (отсутствие) до легкого пожелтения. С желтой пигментацией было больше, чем наличия нейтральной пигментации – 58 образцов.



Рисунок 5 – Микроскопическая картина культуры *T. verrucosum*, (увеличение x100).

Микроскопия чистой культуры показала ветвящийся мицелий с септированными гифами, бесцветного цвета. Редкими овоидные микроконидии и крайне редкие макроконидии в виде «ниток бус». Всего подтверждённых микроскопически было идентифицировано 79 образцов из 85 выявленных макроскопически.

В результате просмотрено образцов в количестве 141 экземпляров. Из 98 образцов выявлено, что в 79 (81%) наблюдаются характерные морфологические черты *T. verrucosum* и 19 (19%) с морфологическими особенностями не позволяющие отнести к характерным чертам характеризующие вид как *T. verrucosum*.

Результаты ПЦР.

Для постановки ПЦР использовались пробы, экстрагированные с помощью наборов реагентов ДНК-сорб-АМ производителя «AmpliSens». Набор реагентов РеалБест экстракция 1000 производителя «Вектор-Бест» не подходил нашим исследованиям так как данный набор имеет особенность в том, что выделенная НК хранению не подлежит и экстракция производится в день постановки ПЦР. В то время как полученные пробы после экстракцией с помощью набора реагентов ДНК-сорб-АМ можно хранить при температуре от 2 до 8 °С или в течение года при температуре не выше 16 °С.

Детекция результатов производилась на основе электрофореза.

При проведении полимеразной цепной реакции были использованы специализированные праймеры для детекции *T. mentagrophytes* (TriM130F/TriM311R) и *T. verrucosum* (Ver76F/Ver366R).

При постановке ПЦР в качестве проб использовались:

1. В качестве положительного контроля использовался лиофелизат чистой культуры *T. verrucosum*. Для определения работоспособности праймеров.
2. В качестве отрицательного контроля использовались лиофелизат чистой культуры *T. mentagrophytes* и *M. canis* – чистая культура, взятая с питательной среды среды. Данные пробы необходимы не только для отрицательного контроля, но и одновременно для проверки метода ПЦР на специфичность.
3. Корковые образования пораженных участков кожи и волосы больных животных.

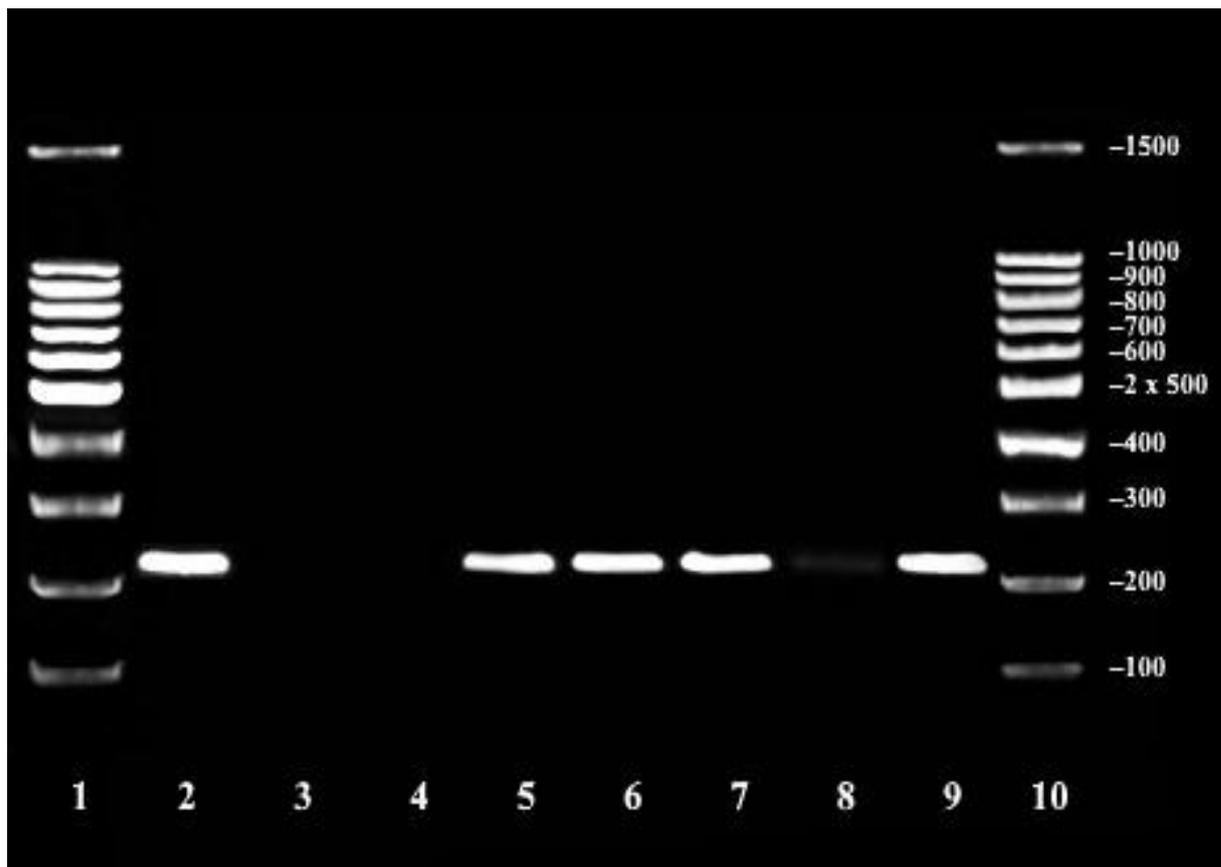


Рисунок 6 – Электрофореграмма амплификатов на праймерах Ver76F/Ver366R для идентификации *T. verrucosum*. 1, 10 – маркер молекулярного веса (1Кб маркер, «СибЭнзим», Россия); 2 – положительный контроль (ДНК– *T. verrucosum*); 3 – Отрицательный контроль 1 (ДНК – *T. mentagrophytes*); 4 – Отрицательный контроль 2 (ДНК – *M. Canis*); 5–9 – ДНК с клинических образцов.

На данной электрофореграмме показано, что в образце 2 прошел отжиг праймеров Ver76F/Ver366R *T. verrucosum* (положительный контроль). В образцах 3 и 4 прослеживается, что праймеры не отождились на *M. canis* и *T. mentagrophytes*, что является показателем специфичности. В образцах с 5 по 9 праймеры на *T. verrucosum* отождились на амплификатах больных животных, что говорит нам о присутствии возбудителя в образцах 5, 6, 7, 8, 9.

В результате просмотрено образцов в количестве 141 экземпляров. Из 98 образцов методом ПЦР выявлено 96 (98%) дерматофитов вида *T. verrucosum* и 2 образца не давший результат во время электрофореза

1.3. Статистический анализ полученных результатов.

В общей сложности было проанализировано 141 образец.

В результате проделанной работы было проведено статистический анализ методом четырехпольной таблицы по параметрам чувствительности, специфичности, диагностической эффективности, прогностическая ценность и отношения правдоподобия.

Таблица 1 – Сравнительная оценка чувствительности (Se), специфичности (Sp) и диагностической эффективности (Acc) микроскопии патологического материала, культурального метода и ПЦР в диагностике трихофитии.

Метод	Результат	Больные (n=98)	Группа сравнения (n=43)	Se, %	Sp, %	Acc, %
микроскопия	+	86	5	87,75	88,37	87,94
	–	12	38			
Культуральный метод	+	79	9	80,61	79,06	80,14
	–	19	34			
ПЦР	+	96	1	97,95	97,67	97,87
	–	2	42			

Таблица 2 – Доверительные интервалы чувствительности, специфичности и диагностической эффективности микроскопии патологического материала (МК), культурального метода (КМ) и ПЦР в диагностике трихофитии.

Метод	МК	КМ	ПЦР
Чувствительность	3,31	3,99	1,43
Специфичность	3,24	4,11	1,52
Диагностическая эффективность	3,29	4,03	1,46

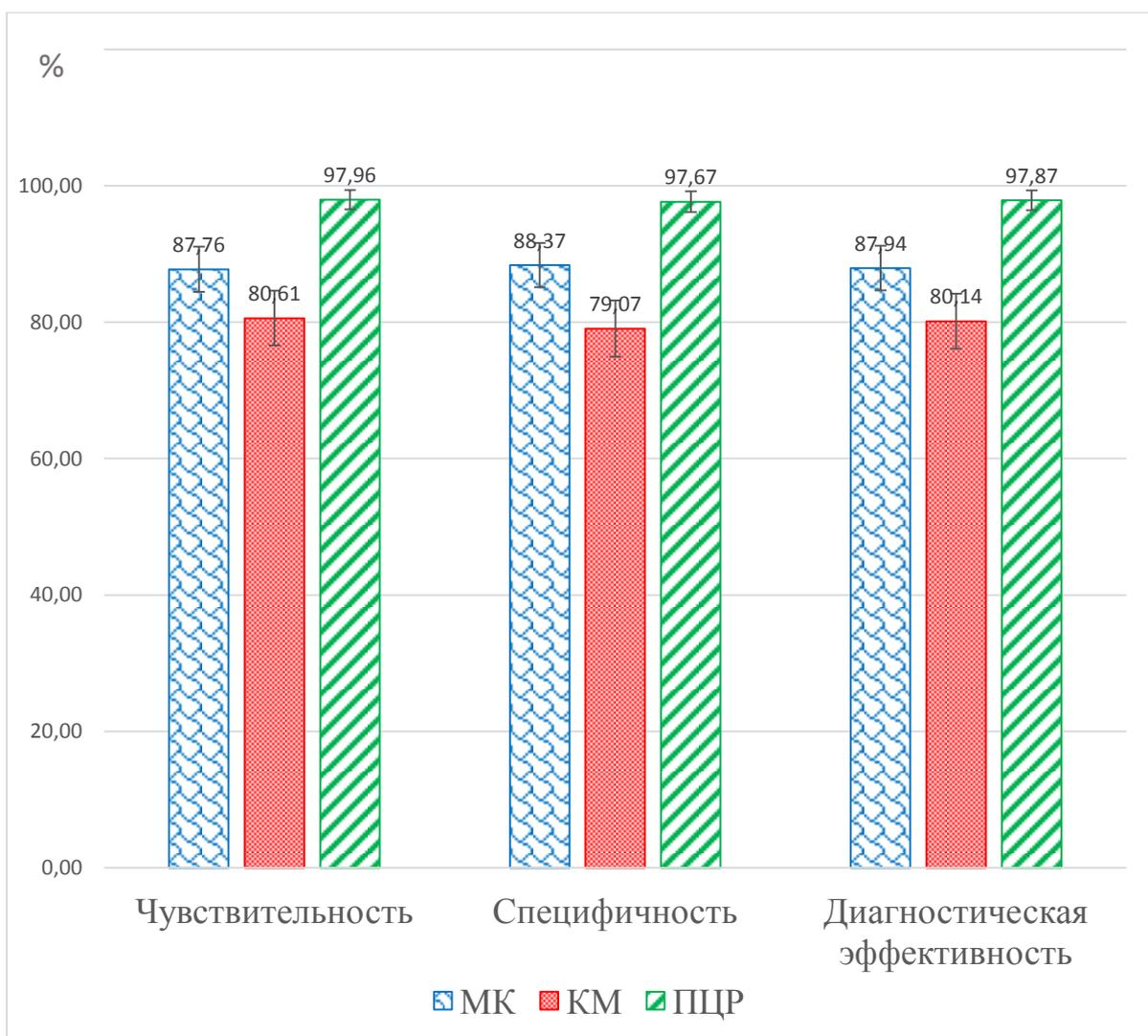


Рисунок 7 – Сравнительная оценка чувствительности, специфичности и диагностической эффективности микроскопии патологического материала (МК), культурального метода (КМ) и ПЦР в диагностике трихофитии.

При проведении статистического анализа параметров характеризующие методы лабораторной диагностики было получено, что ПЦР имеет наивысшую чувствительность (97,96%), специфичность (97,67%), диагностическую эффективность (97,87%) по сравнению с регламентированными методами. На втором месте стоит метод микроскопии патологического материала с значениями чувствительности (87,76%), специфичности (88,37%), диагностическую эффективность (87,94%), культурального метода (80,61%), специфичности (79,07%), диагностическую эффективность (80,14%).

(87,94%). И самые низкие показатели у культурального метода: чувствительность (80,61%), специфичность (79,07%), диагностическую эффективность (80,14%).

По результатам статистического анализа методом четырёхпольной таблицы с параметрами чувствительности, специфичности и диагностической эффективности, можно с уверенностью сделать итог того, что метод лабораторной диагностики ПЦР на основе электрофореза превышает по всем трем параметрам другие методы диагностики, рассматриваемые в исследовательской работе примерно на 10–16%.

Таблица 3 – Сравнительная оценка предсказательной ценности положительного и отрицательного результатов (ПЦ ±) микроскопии патологического материала (МК), культурального метода (КМ) и ПЦР в диагностике трихофитии.

Метод	Результат	Больные (n=98)	Группа сравнения (n=98)	ПЦ+, %	ПЦ-, %
МК	+	86	5	94,50	76
	–	12	38		
КМ	+	79	9	89,77	64,15
	–	19	34		
ПЦР	+	96	1	98,96	95,45
	–	2	42		

При проведении статистического анализа параметров предсказательной ценности положительного и отрицательного результатов характеризующие методы лабораторной диагностики было получено, что ПЦР имеет наибольшую предсказательную ценность как положительных (98,96%) так и отрицательных (95,45%) результатов. Культуральный метод и микроскопия патологического материала имеют высокие параметров предсказательной ценности положительных результатов (89,77% и 94,50% соответственно). Однако Культуральный метод и микроскопия патологического материала имеют низкие значения предсказательной ценности отрицательных результатов (64,15% и 76% соответственно). Все это еще раз подтверждает, что ПЦР имеет высокую специфичность.

Таблица 4 – Оценка отношение правдоподобия положительного и отрицательного результата (ОП±) микроскопии патологического материала (МК), культурального метода (КМ) и ПЦР в диагностике трихофитии.

Метод	Результат	Больные (n=98)	Группа сравнения (n=98)	ОП+	ОП–
МК	+	86	5	7,55	0,14
	–	12	38		
КМ	+	79	9	3,85	0,25
	–	19	34		
ПЦР	+	96	1	42,12	0,02
	–	2	42		

Результаты всех методов лабораторной диагностики дерматофитозов. Были проанализированы параметром отношение правдоподобия положительного и отрицательного результата. Значения отношения правдоподобия методов микроскопии, культивирования на питательных средах и полимеразной цепной реакции стремятся к 1, что говорит нам о значительном основании достоверности диагностических решений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Грибковые заболевания относятся к числу трудноизлечимых болезней и качество терапии во многом зависит от качества лабораторной диагностики.

В работе мы убедились в том, что показатели информативности полимеразной цепной реакции превышает микроскопию и культивирование на питательных средах. Также время, затраченное на получение результатов, полимеразная цепная реакция значительно меньше по сравнению с культивированием. Метод микроскопии по сравнению с полимеразной цепной реакцией выполняется быстрее, однако микроскопия не дает достоверный результат до вида. Показатель чувствительности полимеразной цепной реакции превышает другие методы диагностики примерно на 10–17%. Также по результатам исследования полимеразная цепная реакция имеет наивысший показатель специфичности, на 9–18% больше, чем показатели других методов, рассматриваемые в исследовательской работе. Диагностическая эффективность метода полимеразная цепная реакция составляет 97,87%, что является наивысшим значением этого показателя по сравнению с регламентированными методами. Показатель предсказательной ценности положительного результата полимеразной цепной реакции превышает другие методы на 4–9%. Кроме того, предсказательная ценность отрицательного результата полимеразной цепной реакции выше регламентированных методов на 16–31%. Также полимеразная цепная реакция имеет показатель отношения правдоподобия как положительных (42,12), так и отрицательных (0,02) результатов значительно превышающие показатели отношения правдоподобия метода культивирования и микроскопии патологического материала.

Так молекулярно-генетические методы лабораторной диагностики трихофитии и других поверхностных микозов могут существенно если не

заменить, то дополнить «золотой стандарт» идентификации дерматофитов животных и использоваться в ветеринарных клиниках и сельскохозяйственных учреждениях.

ВЫВОДЫ

1. Согласно литературным данным, процент выявления возбудителя зоонозной трихофитии с помощью регламентированных методов лабораторной диагностики составляет 15–45%. Молекулярно-генетические методы выявления дерматофитов имеют много преимуществ. Однако на сегодняшний день в России и странах СНГ при диагностике дерматофитозов животных по-прежнему используются методы, рекомендованные главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства РФ в 2008 году.

2. В ходе исследования установлено, что наименьший процент (81%) подтверждения диагноза трихофития у животных приходится на культуральный метод, что связано со сложностью культивирования *T. verrucosum*. Детекция возбудителя с помощью ПЦР показала положительный результат в 98% случаев. Это показывает, что прямая идентификация возбудителя в клинических образцах на основе молекулярно-генетических методов намного надежнее и намного быстрее по сравнению с регламентированными методами.

3. Показатели чувствительности, специфичности и диагностической эффективности метода ПЦР в диагностике зоонозной трихофитии составили 97,96%, 97,67% и 97,87% соответственно, что превышает значения перечисленных показателей, полученные для микроскопии клинического материала на 10,2%, 9,3% и 9,9% соответственно и значения этих же показателей, рассчитанных для культурального метода на 17,4%, 18,6% и 17,7% соответственно.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алешкевич, В.Н. Методические указания по лабораторной диагностике дерматофитозов животных / Алешкевич В.Н., Прудников В.С., Красочко П.А., Егоров В.М. / Витебск, 2008.
2. Глушанова, Н.А. Масс-спектрометрическая идентификация микроорганизмов / Глушанова Н.А., Блинов А.И., Алексеева Н.Б. // Медицина в Кузбассе. 2015; 2: 36–41.
3. Ефимов, Г.Е. Эпидемиологически обоснованная сравнительная оценка информативности методов лабораторной диагностики зооантропонозной трихофитии / Ефимов Г.Е., Мавзютов А.Р., Титова Т.Н., Мухамадиева Р.Р.// Клиническая лабораторная диагностика. 2015; 60(7): 58–62.
4. Сергеев, А.Ю. Дерматофитии: новое в диагностике, терапии и профилактике наиболее распространенных микозов человека / Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. // Дерматология. Прил. к Consilium Medicum. 2008; 1: 30–35
5. Титова, Т.Н. Разработка и оценка информативности нового способа детекции *Microsporum canis*, *Trichophyton verrucosum* и *Trichophyton mentagrophytes* в клиническом материале: диссертация кандидата Биологических наук / Титова Т.Н. 2017. 159 с.
6. Токеев, Ш.О. Лабораторная диагностика возбудителей трихофитии верблюдов / Токеев Ш.О., Акматова Э.К. // Вестник Кыргызского национального аграрного университета им. К.И. Скрябина. 2018. № 2 (47). С. 228–231.
7. Пестерев, М.А. Дерматофитозы морских свинок / Пестерев М.А., Абрамов А.В. // Молодежь и наука. 2017. № 6. С. 44.
8. Пестерев, М.А. Опыт применения питательных сред для диагностики дерматофитозов морских свинок / Пестерев М.А., Абрамов А.В. // Молодежь и наука. 2017. № 6. С. 87.

9. Полищук, А.Г. MALDI-TOF масс-спектрометрическая идентификация медицински значимых микромицетов / Полищук А.Г. // Проблемы медицинской микологии. 2011; 13(4): 8–11.
10. Прудников, В.С. Трихофития крупного рогатого скота / Прудников В.С., Герман С.П., Ханис А.Ю., Гафурова А.М. // Наше сельское хозяйство. 2020. № 10 (234). С. 42–44
11. Уфимцева, М.А. Дерматомикозы у детей: учебное пособие для врачей / под ред. М. А. Уфимцевой. – Екатеринбург: УГМУ, 2017. – 116 с.
12. Ханис, А.Ю. Трихофития крупного рогатого скота / Ханис А.Ю., Гафурова А. М. // Успехи медицинской микологии. 2019. Т. 20. С. 699–705.
13. Хисматуллина, З.Р. Клинические проявления зооантропонозной трихофитии / Хисматуллина З.Р., Альхашаш Субхи М.С., Айдыбаева М.Г., Дагхамин Исмаил Х.М.// Современные проблемы науки и образования. – 2020. – № 5.
14. Шевченко, А.Г. Параллели в лабораторной диагностике и выявляемости трихомикозов (микроспории и трихофитии) в крупном южном регионе РФ / Шевченко А.Г., Егорова Е.В., Глузмин М.И. // National Health Выпуск. №4, 2020 г.
15. Яковлев, А.Б. Микроспория. Трихофития. Фавус / Яковлев А.Б. – Москва: Новик, 2013. 135 с.
16. Яковлев, А.Б. Особенности клинико-лабораторной диагностики экссудативных форм микроспории и трихофитии / Яковлев А.Б. // Успехи медицинской микологии. 2013; 11: 157–159.
17. Abou-Gabal, M. Comparative studies on *Trichophyton verrucosum* (Bodin 1902) strains of human and animal origin / Abou-Gabal M, el-Rehim DA. // Mykosen. 1974 Jun 1; 17(6):129–133.
18. Aghamirian, MR. Dermatophytes as a cause of epizoonoses in dairy cattle and humans in Iran: epidemiological and clinical aspects / Aghamirian MR, Ghiasian SA. // Mycoses. 2011 Jul;54(4): e52–6.

19. Arabatzis, M. Diagnosis of common dermatophyte infections by a novel multiplex real-time polymerase chain reaction detection/identification scheme / Arabatzis M, Bruijnesteijn van Coppenraet LE, Kuijper EJ, de Hoog GS, Lavrijsen AP, Templeton K, van der Raaij-Helmer EM, Velegriaki A, Gräser Y, Summerbell RC. // *Br J Dermatol*. 2007 Oct;157(4):681–689.
20. Banerjee, U. Evaluation of modified dermatophyte test medium for isolation of dermatophytes: A preliminary report: bewertung eines modifizierten Dermatophyten- Testmediums zur Isolierung von Dermatophyten Eine vorläufige Mitteilung / Banerjee U, Talwar V. // *Mycoses*. 1984;27(9):465–469.
21. Beifuss, B. Direct detection of five common dermatophyte species in clinical samples using a rapid and sensitive 24-h PCR-ELISA technique open to protocol transfer / Beifuss B, Bezold G, Gottlöber P, Borelli C, Wagener J, Schaller M, Korting HC. // *Mycoses*. 2009 Mar;54(2):137–145.
22. Bergman, A. Fast and specific dermatophyte detection by automated DNA extraction and real-time PCR / Bergman A, Heimer D, Kondori N, Enroth H.// *Clin Microbiol Infect*. 2013 Apr;19(4): E205- E211.
23. Bonenberger, TE. Rapid identification of tissue micro-organisms in skin biopsy specimens from domestic animals using polyclonal BCG antibody / Bonenberger TE, Ihrke PJ, Naydan DK. // *Vet Dermatol*. 2001;12(1):41–47.
24. Brillowska-Dąbrowska, A. Five-Hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of *Trichophyton rubrum* / Brillowska-Dąbrowska A, Saunte DM, Arendrup MC. *J Clin Microbiol*. 2007; 45: 1200 – 1204.
25. Cafarchia, C. An improved molecular diagnostic assay for canine and feline dermatophytosis / Cafarchia C, Gasser RB, Figueredo LA, Weigl S, Danesi P, Capelli G, Otranto D. // *Med Mycol*. 2013 Feb;51(2):136–143.
26. Cafarchia, C. Epidemiology and risk factors for dermatophytoses in rabbit farms / Cafarchia C, Camarda A, Coccioli C, Figueredo LA, Circella E, Danesi P, Capelli G, Otranto D. // *Med Mycol*. 2010 Nov;48(7):975–80.

27. Cassagne, C. Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification / Cassagne C, Normand A-C, L'Ollivier C. // *Mycoses*. 2016;59(11):678–690.
28. Cubells, JR. Fluorescence microscopy as a diagnostic tool for dermatophytosis / Cubells JR, Martínez AM, Leboráns LM. // *Am J Dermatopathol*. 2016;38(3):208–210.
29. de Hoog, GS. Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes / de Hoog GS, Dukik K, Monod M, Packeu A, Stubbe D, Hendrickx M, Kupsch C, Stielow JB, Freeke J, Göker M, Rezaei-Matehkolaei A, Mirhendi H, Gräser Y. // *Mycopathologia*. 2017 Feb;182(1–2):5–31.
30. De Respini, S. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry using the Vitek MS system for rapid and accurate identification of dermatophytes on solid cultures / De Respini S, Monnin V, Girard V, Welker M, Arsac M, Cellière B, Durand G, Bosshard PP, Farina C, Passera M, Van Belkum A, Petrini O, Tonolla M. // *J Clin Microbiol*. 2014 Dec;52(12):4286–4292.
31. Elavarashi, E. Optimization of PCR – RFLP directly from the skin and nails in cases of dermatophytosis, targeting the ITS and the 18S ribosomal DNA regions / Elavarashi E, Kindo AJ, Kalyani J. // *J Clin Microbiol*. 2013;7(4):646–651.
32. El Damaty, H. Species identification, strain differentiation, and antifungal susceptibility of dermatophyte species isolated from clinically infected arabian horses / El Damaty H, Tartor Y, Mahmmod Y. // *J Equine Vet Sci*. 2017; 59:26–33.
33. Gianni, C. Usefulness of histological examination for the diagnosis of onychomycosis / Gianni C, Cerri A. // *Dermatology*. 2001;202(4):283–288.
34. Ginter-Hanselmayer, G. Epidemiology of tinea capitis in Europe: current state and changing patterns / Ginter-Hanselmayer G, Weger W, Ilkit A. // *Mycoses*. 2007; 50: 6–13.

35. Gip, L. A rapid screening method for the detection of pathogenic fungi on the skin / Gip L. // *Mycoses*. 1981;24(1):17–26.
36. Gnat, S. Multiple-strain Trichophyton mentagrophytes infection in a silver fox (*Vulpes vulpes*) from a breeding farm / Gnat S, Nowakiewicz A, Lagowski D, Troscianczyk A, Zieba P. // *Med Mycol*. 2019 Feb 1;57(2):171–180.
37. Gromadzki, S. Evaluation of new medium for identification of dermatophytes and primary dimorphic pathogens / Gromadzki S, Ramani R, Chaturvedi V. // *J Clin Microbiol*. 2003;41(1):467–468.
38. Gupta, LK. Wood's lamp / Gupta LK, Singhi MK. // *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2004; 70:131–135.
39. Haldane, DJ. A comparison of calcofluor white, potassium hydroxide, and culture for the laboratory diagnosis of superficial fungal infection / Haldane DJ, Robert E. // *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1990;13(4):337–339.
40. Havlickova, B. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide / Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. // *Mycoses*. 2008 Sep;51 Suppl 4:2–15.
41. Huang, Y. Lateral flow biosensors based on the use of micro- and nanomaterials: a review on recent developments / Huang Y, Xu T, Wang W, Wen Y, Li K, Qian L, Zhang X, Liu G. // *Mikrochim Acta*. 2019 Dec 18;187(1):70.
42. Idriss, MH. The diagnostic value of fungal fluorescence in onychomycosis / Idriss MH, Elston D. // *J Cutan Pathol*. 2013;40(4):385–390.
43. Intra, J. Genus-level identification of dermatophytes by MALDI-TOF MS after 2 days of colony growth / Intra J, Sarto C, Tiberti N. // *Lett Appl Microbiol*. 2018;67(2):136–143.
44. Khosravi, AR. Dermatophytes isolated from domestic animals in Iran / Khosravi AR, Mahmoudi M. // *Mycoses*. 2003 Jun;46(5–6):222–5.
45. Kondori, N. Comparison of a new commercial test, Dermatophyte-PCR kit, with conventional methods for rapid detection and identification of

Trichophyton rubrum in nail specimens / Kondori N, Abrahamsson AL, Ataollahy N, Wennerås C. // *Med Mycol*. 2010 Nov;48(7):1005–1008.

46. Kupsch, C. The agony of choice in dermatophyte diagnostics-performance of different molecular tests and culture in the detection of Trichophyton rubrum and Trichophyton interdigitale / Kupsch C, Ohst T, Pankewitz F, Nenoff P, Uhrlaß S, Winter I, Gräser Y. // *Clin Microbiol Infect*. 2016 Aug;22(8): 735.e11-17.

47. Lakshmipathy, DT. Review on dermatomycosis: pathogenesis and treatment / Lakshmipathy DT, Kannabiran K.// *Nat Sci*. 2010; 2: 726 – 731.

48. Mayser, P. A simple and rapid method to differentiate Arthroderma benhamiae from Microsporum canis / Mayser P. // *J Dtsch Dermatol Ges*. 2013;11(4):322–327.

49. Mesquita, JR. Epizootic and epidemic dermatophytose outbreaks caused by Trichophyton mentagrophytes from rabbits in Portugal, 2015 / Mesquita JR, Vasconcelos-Nóbrega C, Oliveira J, Coelho C, Vala H, Fratti M, Arabatzis M, Velegraki A, Michel M. // *Mycoses*. 2016 Oct;59(10):668–673.

50. Mimica, MJ. MALDI-TOF MS in the clinical microbiology laboratory / Mimica MJ, Martino MDV, Pasternak J, et al. // *J Bras Patol Med Lab*. 2013;49(4):256–259.

51. Mourad, B. Evaluation of the efficacy of fluorescent staining and chicago sky blue staining as methods for diagnosis of dermatophytosis in hair and nails / Mourad B, Ismail M, Hawwam S. // *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2019; 12:751–758.

52. Nenoff, P. Mycology – an update. Part 1: Dermatomycoses: causative agents, epidemiology and pathogenesis / Nenoff P, Krüger C, Ginter-Hanselmayer G, Tietz HJ. // *J Dtsch Dermatol Ges*. 2014; 12: 188 – 210.

53. Nweze, EI. Dermatophytes in northern Africa / Nweze EI, Eke I. // *Mycoses* 2016; 59: 137 – 144.

54. Petinataud, D. Molecular diagnosis of onychomycosis / Petinataud D, Berger S, Contet-audonneau N. // *J Mycol Med*. 2014;24(4):287–295.

55. Quinn, PJ. Clinical veterinary microbiology, section 3: mycology, The dermatophytes / Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, et al.// Wolfe publishing. 1994; 67:381–390.
56. Roberts, GD. Detection of fungi in clinical specimens by phase-contrast microscopy / Roberts GD. // J Clin Microbiol. 1975;2(3):261–265.
57. Salkin, IF. A new medium for the presumptive identification of dermatophytes / Salkin IF, Padhye AA. // J Clin Microbiol. 1997;35(10):2660–2662.
58. Seker, E. Isolation of dermatophytes from dogs and cats with suspected dermatophytosis in Western Turkey / Seker E, Dogan N. // Prev Vet Med. 2011 Jan 1;98(1):46–51.
59. Silva-Rocha, WP. Epidemiology and fungal species distribution of superficial mycoses in Northeast Brazil / Silva-Rocha WP, de Azevedo MF, Chaves GM. // J Mycol Med. 2017 Mar;27(1):57–64.
60. Spiliopoulou, A. Evaluation of a commercial PCR test for the diagnosis of dermatophyte nail infections / Spiliopoulou A, Bartzavali C, Jelastopulu E, Anastassiou ED, Christofidou M.// J Med Microbiol. 2015 Jan;64(Pt 1):25–31.
61. Sue, MJ. Application of PCR-ELISA in molecular diagnosis / Sue MJ, Yeap SK, Omar AR, Tan SW.// Biomed Res Int. 2014; 2014:653014.
62. Takeda, K. Polyclonality of *Trichophyton rubrum* isolates in a dermatophytosis patient with multiple lesions / Takeda K, Mochizuki J, Izumi K et al. // Med Mycol J. 2016; 57: 17–20.
63. Tartor, Y. Yeast species associated with diseased fish: occurrence, identification, experimental challenges, and antifungal susceptibility testing / Tartor Y, Taha M, Mahboub H, et al. // Aquaculture. 2018; 488:134–144.
64. Tsunemi, Y. Clinical study of Dermatophyte Test Strip, an immunochromatographic method, to detect tinea unguium dermatophytes / Tsunemi Y, Hiruma M. // J Dermatol. 2016 Dec;43(12):1417–1423.

65. Uchida, T. Comparative study of direct polymerase chain reaction, microscopic examination and culture-based morphological methods for detection and identification of dermatophytes in nail and skin samples / Uchida T, Makimura K, Ishihara K, Goto H, Tajiri Y, Okuma M, Fujisaki R, Uchida K, Abe S, Iijima M. // *J Dermatol*. 2009 Apr;36(4):202–208.
66. Verrier, J. Identification of infectious agents in onychomycoses by PCR-terminal restriction fragment length polymorphism / Verrier J, Pronina M, Peter C, Bontems O, Fratti M, Salamin K, Schürch S, Gindro K, Wolfender JL, Harshman K, Monod M. // *J Clin Microbiol*. 2012 Mar;50(3):553–561.
67. Wjst, M. Time-of-flight mass spectrometry / Wjst M, Van Den BD. // *Methods Mol Biol*. 2013; 1015:71–85.
68. Xiao-Fang, Li. A new medium for diagnosis of dermatophyte infection / Li, Xiao-Fang & Shen, Yong-Nian & Chen, Wei & Chen, Hui & Lv, Gui-Xia & Liu, Wei-Da. // *European journal of dermatology: EJD*. 2009;19(1):34–37.

СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

Башкирский государственный медицинский
университет

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.ВУЗ

Автор работы: Нагуманов Тимур Альбертович
Самоцитирование
рассчитано для: Нагуманов Тимур Альбертович
Название работы: ДЕТЕКЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЗООНОЗНОЙ ТРИХОФИТИИ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ
Тип работы: Выпускная квалификационная работа
Подразделение: ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет МЗ РФ

РЕЗУЛЬТАТЫ

■ ОТЧЕТ О ПРОВЕРКЕ КОРРЕКТИРОВАЛСЯ: НИЖЕ ПРЕДСТАВЛЕНЫ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ ДО КОРРЕКТИРОВКИ

ЗАИМСТВОВАНИЯ	26.93%	ЗАИМСТВОВАНИЯ	26.93%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	58.69%	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	72.27%
ЦИТИРОВАНИЯ	14.39%	ЦИТИРОВАНИЯ	0.8%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%	САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%

ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 24.06.2021

ДАТА И ВРЕМЯ КОРРЕКТИРОВКИ: 24.06.2021 13:18

Модули поиска: ИПС Адилет; Модуль поиска "БГМУ"; Библиография; Сводная коллекция ЭБС; Интернет Плюс; Сводная коллекция РГБ; Цитирование; Переводные заимствования (RuEn); Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu); Переводные заимствования по Интернету (EnRu); Переводные заимствования издательства Wiley (RuEn); eLIBRARY.RU; СПС ГАРАНТ; Медицина; Диссертации НББ; Перефразирования по eLIBRARY.RU; Перефразирования по Интернету; Патенты СССР, РФ, СНГ; Шаблонные фразы; Кольцо вузов; Издательство Wiley; Переводные заимствования

Справка выдана с отключенными модулями библиографических записей

Работу проверил: Кобзева Наталья Рудольфовна

ФИО проверяющего

Дата подписи: 24.06.2021



Чтобы убедиться в подлинности справки, используйте QR-код, который содержит ссылку на отчет.

Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего. Предоставленная информация не подлежит использованию в коммерческих целях.

ОТЗЫВ

на выпускную квалификационную работу студента группы Б-401А
Нагуманова Тимура Альбертовича

на тему: Детекция возбудителя зоонозной трихофитии методом полимеразной цепной реакции

1 Объем текстовой части (пояснительной записки) и графического материала, соответствие работы заданию.

Полностью соответствует

2 Актуальность темы выпускной квалификационной работы (ВКР).

Тема работы актуальна, молекулярно-генетические методы имеют большую значимость в лабораторной диагностике дерматомикозов.

3 Умение самостоятельно и творчески решать задачи, поставленные в задании на выполнение ВКР, подготовленность к выполнению профессиональных задач.

Выпускник проявил отличное умение самостоятельно и творчески решать поставленные задачи, практическая и теоретическая подготовленность на отличном уровне, выпускник готов к выполнению профессиональных задач.

4 Использование современных информационных технологий при выполнении и оформлении ВКР.
При написании работы использовались следующие программы: Microsoft Word, Microsoft Excel, Microsoft PowerPoint.

5 Умение пользоваться справочной, научной, научно-технической и патентной литературой, в том числе зарубежной.

Выпускник показал отличное умение использовать справочную, научную, научно-техническую и патентную литературу. В работе использовано 13 источников отечественной и 48 источников зарубежной литературы.

6 Соблюдение календарного графика подготовки ВКР.

График выполнения проекта соблюдался.

7 Качество оформления текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала ВКР в соответствии с требованиями действующих стандартов и регламентов.

Работа оформлена в соответствии с требованиями оформления, предъявляемыми к оформлению содержания выпускных квалификационных работ студентов выпускных курсов.

8 Дополнительные сведения о ВКР и работе студента в период ее подготовки (при необходимости).

Работа выполнена в соответствии с требованиями (дополнительные сведения представлены на 17 листах приложения).

9 Апробация и реализация результатов, полученных в ВКР: патенты, внедрения, публикации, сообщения на конференциях и др.

Тема глубоко проработана и изучена, заслуживают внимания результаты и обсуждения.

10 Возможность использования результатов, полученных в ВКР, в учебном процессе и в производстве, а также возможность опубликования в открытой печати результатов, полученных в ВКР или другое.

Результаты могут быть опубликованы в открытой печати.

11 Оценка выпускной квалификационной работы ("отлично", "хорошо", "удовлетворительно") и рекомендация о присвоении квалификации.

Выпускная квалификационная работа заслуживает оценки «отлично» и рекомендуется к защите.

Руководитель выпускной квалификационной работы
доцент кафедры фундаментальной
и прикладной микробиологии, к.б.н.,

Ирина Викторовна
Иванова
Член комиссии управления кадров
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России

« » 20 г.

 Т.Н. Титова

РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную работу студента группы Б-401 А группы
(Форма выпускной квалификационной работы) (Шифр группы)

Нагуманова Тимура Альбертовича
(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: «Детекция возбудителя зоонозной трихофитии методом полимеразной цепной реакции»

1 Объем текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала, соответствие наименования и содержания разделов работы заданию, выданному кафедрой.
Полностью соответствует

2 Актуальность тематики проблемы, решаемой в выпускной квалификационной работе, и качество ее решения Молекулярно-генетические методы детекции возбудителя трихофитии по сравнению с методами «золотого стандарта»

3 Основные достоинства и недостатки выпускной квалификационной работы. выпускная квалификационная работа выполнена в соответствии с требованиями, проведен большой анализ литературных источников по заявленной тематике

4 Технично-экономические, социально-экономические, экологические обоснования, обоснования вопросов безопасности жизнедеятельности, разработанные в выпускной квалификационной работе.

5 Уровень использования вычислительной техники и программных средств. Освоены методы планирования и анализа

6 Апробация и реализация результатов, полученных в выпускной квалификационной работе: патенты, внедрения, публикации, сообщения на конференциях и др.

7 Практическая и теоретическая подготовленность выпускника к выполнению профессиональных задач. Хороший уровень подготовки

8 Качество оформления текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала в соответствии с требованиями действующих стандартов и регламентов. Работа оформлена в соответствии с требованиями

9 Обоснованность выводов и предложений Автором тема глубоко изучена и проработана, заслуживает внимания результаты и обсуждение

10 Замечания по усмотрению рецензента

(дополнительные замечания представлены на листах приложения)

11 Возможность использования результатов, полученных в выпускной квалификационной работе, для публикации, реализации в учебном процессе, рекомендуемых к внедрению или др. Результаты могут быть использованы в дальнейшем в учебном процессе и для публикаций

12 Оценка выпускной квалификационной работы ("отлично", "хорошо", "удовлетворительно", "неудовлетворительно") и рекомендация о присвоении (не присвоении) студенту-выпускнику квалификации (степени). Выпускная квалификационная работа заслуживает оценки хорошо и студенту выпускнику рекомендуется присвоить квалификацию бакалавр

Рецензент
к.б.н доцент кафедры ФПМ
Борцова Ю.Л.
(Место работы, занимаемая должность)

Ю.Л. Борцова
(Инициалы и фамилия)



РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную работу студента группы Б-401 А группы
(Форма выпускной квалификационной работы) (Шифр группы)

Нагуманова Тимура Альбертовича
(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: «Детекция возбудителя зоонозной трихофитии методом полимеразной цепной реакции»

1 Объем текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала, соответствие наименования и содержания разделов работы заданию, выданному кафедрой.
Полностью соответствует

2 Актуальность тематики проблемы, решаемой в выпускной квалификационной работе, и качество ее решения Молекулярно-генетические методы детекции возбудителя трихофитии по сравнению с методами «золотого стандарта»

3 Основные достоинства и недостатки выпускной квалификационной работы. выпускная квалификационная работа выполнена в соответствии с требованиями, проведен большой анализ литературных источников по заявленной тематике

4 Технично-экономические, социально-экономические, экологические обоснования, обоснования вопросов безопасности жизнедеятельности, разработанные в выпускной квалификационной работе.

5 Уровень использования вычислительной техники и программных средств.

Освоены методы планирования и анализа

6 Апробация и реализация результатов, полученных в выпускной квалификационной работе: патенты, внедрения, публикации, сообщения на конференциях и др.

7 Практическая и теоретическая подготовленность выпускника к выполнению профессиональных задач. Хороший уровень подготовки

8 Качество оформления текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала в соответствии с требованиями действующих стандартов и регламентов.

Работа оформлена в соответствии с требованиями

9 Обоснованность выводов и предложений

Автором тема глубоко изучена и проработана, заслуживает внимания результаты и обсуждение

10 Замечания по усмотрению рецензента

(дополнительные замечания представлены на _____ листах приложения)

11 Возможность использования результатов, полученных в выпускной квалификационной работе, для публикации, реализации в учебном процессе, рекомендуемых к внедрению или др.

Результаты могут быть использованы в дальнейшем в учебном процессе и для публикаций

12 Оценка выпускной квалификационной работы ("отлично", "хорошо", "удовлетворительно", "неудовлетворительно") и рекомендация о присвоении (не присвоении) студенту-выпускнику квалификации (степени).

Выпускная квалификационная работа заслуживает оценки хорошо и студенту выпускнику рекомендуется присвоить квалификацию бакалавр

Рецензент

Зав. лабораторией генетики растений
(Место работы, занимаемая должность) г.С.Н.

Куш

Кушнев Б.Р.
(Инициалы и фамилия)



