

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

Кагарманова Алена Олеговна

**ДЕТЕКЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ДЕРМАТОМИКОЗОВ МЕТОДОМ
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ**

Научный руководитель:

доцент кафедры

фундаментальной

и прикладной микробиологии

 Т. Н. Титова

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	8
1.1. Актуальность	8
1.2. Распространённость дерматофитии, в частности заболевания трихофитии и ее возбудителей.	11
1.3. Методы лабораторной диагностики, применяемые при а диагностике дерматомикозов.	15
1.4. Рекомендованные методы лабораторной диагностики дерматофитозов животных, утвержденный главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства РФ 18 марта 2008 г.	20
1.5. Сравнительная оценка положительных и отрицательных сторон методов лабораторной диагностики дерматофитов.	23
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	35
2.1. Методики проведения методов исследования дерматофитов	36
2.1.1. Микроскопия патологического материала и мацерация	36
2.1.2. Культивирование на питательной среде	37
2.1.3. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени	36
2.1.4. Статистический анализ	41
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	45
1.1 Анализ литературы по методам исследования дерматомикозов	45
1.2. Результаты лабораторной диагностики грибов: микроскопия и культивировании на питательных средах, метод ПЦР на основе электрофореза и ПЦР в реальном времени	50
1.3 Статистический анализ	57
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	64
ВЫВОДЫ	66
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	67

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 – прогностичность отрицательного результата

PPV – прогностичность положительного результата

LPCB – лактофеноловый хлопковый синий

Se – чувствительность

Sp – специфичность

TBE – Трис-борат-ЭДТА

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день проблема грибковых заболеваний имеет большое значение. В эпидемиологической обстановке во всем мире из можно поставить в один ряд с вирусными и бактериальными агентами. В настоящее время известны более 180 видов болезнетворных грибов и 40 из них вызывают дерматомикозы. Главной проблемой грибковых заболеваний является сложность в их лечении, а при долгом пребывании их в организме возможны необратимые последствия: осложнение заболевания – переход в хроническую форму и повышение вероятности дополнительного инфицирования патогенами. Именно поэтому в наше время так важно быстро и точно выявить грибковое заболевание, ведь именно это и является одним из ключевых факторов в избавлении от чужеродного объекта. Сегодня самыми распространенными в применении диагностическими методами исследования при дерматомикозах являются культуральный метод и микроскопия бактериологического материала. Но стоит заметить, что данные методы достаточно прозаичными, так как во время микроскопии все зависит от односторонних ощущений исследователя, а метод культивирования очень трудоемкий, требует больших затрат времени на рост патогенных грибов. Также хочется заметить, что на данный момент обширно используется метод ПЦР, который в отличие от предыдущих методов, имеет высокую чувствительность и специфичность, что позволяет получить быструю и точную диагностику. Но данный метод нельзя считать идеальным. Экстремальная чувствительность ПЦР к загрязнению посторонними молекулами ДНК, они могут быть многократно копированы в процессе ПЦР, приводя к ложноположительному результату. Поэтому исходя из вышесказанного следует обратиться к методу ПЦР в реальном времени (qPCR), который может дать не только высокую специфичность и чувствительность, но также снизить риск получения ложноположительного результата.

Цель дипломной работы: дать оценку информативности применения полимеразной цепной реакции в реальном времени (qPCR) при лабораторной диагностике дерматомикозов.

Объект исследования:

Предмет исследования: Оценка эффективности выявления дерматофитов на примере рода *Trichophyton*, вида *Trichophyton verrucosum* методом полимеразной цепной реакции в реальном времени по отношению к распространённым методам диагностики дерматофитов.

Задачи:

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

Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Актуальность

Грибы встречаются во многих местах обитания и принадлежат к сообществам, отличным от других организмов [24]. Отношения между грибами и человеческим организмом также различны [37]. Инфекции, вызванные дерматофитами, являются одними из самых распространенных инфекций во всем мире. Согласно предыдущим данным, поверхностные грибковые инфекции поражают примерно 20–25% млекопитающих всего мира, и их частота растет.

Патогены, вызывающие грибковые заболевания у людей и животных, обычно делятся на три рода-*Trichophyton*, *Microsporum* и *Epidermophyton*, насчитывающие более 40 видов [48]. Наиболее важными видами для человека являются *T. rubrum* (в основном заражает людей), *T. verrucosum* (в основном заражает крупный рогатый скот) и *M. gypseum* (в основном заражает крыс и лошадей). Они считаются основными причинами дерматомикозов у людей [25].

Помимо заражения людей, дерматофития наносит значительный экономический ущерб, включая значительные финансовые потери животноводческой отрасли при заражении крупного рогатого скота [43]. Лечение животных, зараженных стригущим лишаем, проводится в изоляции, с соблюдением мер личной предосторожности [3]. Крупный рогатый скот и лошадей вакцинируют дважды в профилактической дозе, в тяжелых случаях – трижды, а специфическое лечение заключается в нанесении на струп успокаивающего средства (рыбий жир, петролатум или подсолнечное масло) [67].

Дерматомикоз поражает эпидермис, саму кожу и стержень волоса [15]. Во многих случаях грибок повреждает эпидермальный слой и проникает в

дерму, в других случаях он проникает в стержень волоса и попадает в волосяной фолликул, где начинает размножаться, поражая более здоровые участки кожи и волос [65].

Однако такая высокая частота дерматомикозов встречается не только у животных, но и у людей; *T. mentagrophytes* был культивирован у людей с клиническими симптомами стригущего лишая и у животных-хозяев без симптомов. Это создает терапевтические и диагностические проблемы [24]. Распространение и хроническое течение дерматомикоза как у людей, так и у животных связано с несвоевременным выявлением и неправильной диагностикой, что приводит к неправильному или запоздалому лечению, которое скорее контрпродуктивно, чем лечебно [1].

Животные, находящиеся рядом с человеком, также могут быть инфицированы. У домашних кошек большинство случаев заболевания вызывается *Microsporum canis* (микроспорум пушистый), который может передаваться другим животным и человеку через споры в суставах; заражение микроспорумом пушистым происходит у 80–85% кошек и реже у собак, а возбудитель передается при прямом контакте с больными животными или предметами, загрязненными шерстью животных [5]. Известно, что возбудитель сохраняет жизнеспособность в течение 10 лет в волосах вне тела больного и 7 лет в чешуйках кожи. Однако следует иметь в виду, что в некоторых случаях животные могут выступать в качестве носителей *Microsporum canis* даже при отсутствии прямых признаков заболевания. Помните, что передача этого возбудителя от человека к человеку крайне низка. Вакцинация домашних животных, две прививки в случае заражения и обработка пораженных участков кожи и шерсти также являются основополагающими в профилактике микроспориидоза [2].

Никто не может быть в полной безопасности, даже если у него нет домашних животных или собственного хозяйства; *Microsporum gypsum* или *M. gypsum* – это почвенный грибок, который паразитирует в почве на огородах и в теплицах, но может также заражать различных грызунов, лошадей и даже домашнюю птицу [8]. Чаще всего от этого патогена страдают садоводы, огородники и цветоводы [7].

Неправильно леченные или рецидивирующие поверхностные грибковые инфекции могут быть источником инфекции путем прямой или косвенной передачи другим животным или людям [59].

Поскольку существует множество серотипов дерматофитов, идентификация на основе морфологических характеристик очень трудна. Идентификация дерматофитов обычно проводится путем сравнения клинических симптомов инфекции с микроскопическим исследованием штамма [6]. Для полной видовой идентификации в дополнение к физиологическим тестам используются методы молекулярно-биологической дифференциации. В связи с большой таксономической изменчивостью дерматофитов и важностью идентификации на уровне видов с эпидемиологической точки зрения, "золотой стандарт" для идентификации дерматофитов является предметом постоянных дебатов и остается предметом споров среди микробиологов [4].

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

Дерматомикозы в основном вызываются дерматофитами. В частности, такие возбудители, как *Trychophyton*, *Microsporum* и *Epidermophyton*, могут поражать роговой слой кожи и ее придатки (волосы и ногтевые пластины) [72]. Эти инфекции обычно передаются непосредственно через контакт с зараженными людьми или животными и (косвенно) через контакт с загрязненной почвой или бытовыми продуктами. Распространенность грибковых инфекций зависит от социального, географического и экономического положения пациента и условий его жизни [62].

Высокая и растущая частота грибковых инфекций явно связана с улучшением диагностики и увеличением числа пациентов с ослабленным иммунитетом, что, как было установлено, в основном обусловлено преобладанием эндогенных факторов в развитии этих инфекционных заболеваний [64]. Несмотря на современные средства диагностики, по данным литературы, только 15–45% грибковых инфекций диагностируются адекватно. Нарост грибковых инфекций, несомненно, влияет широкое и бесконтрольное применение антибиотикотерапии.

На образование поражений у животных влияли такие факторы, как температура, влажность, метод дезинфекции и частота дезинфекции. Распространенность дерматофитов была значительно выше в районах с высокой температурой ($>20^{\circ}\text{C}$) и относительной влажностью 62–65% [51].

Возбудители дерматомикозов человека и животных в настоящее время классифицируются на три экологические группы: антропофильные, зоофильные и геофильные. Эти возбудители обладают высокой устойчивостью к факторам окружающей среды и поэтому могут длительное время сохраняться в шерсти тела больных животных и на различных

поверхностях. Существует значительное количество заболеваний животных, вызываемых этой группой грибов. Типичными примерами являются *T. rubrum*, *T. violaceum*, *T. tonsurans*, *T. Schoenleinii* и *Epidermophyton floccosum*. Зоофильные дерматофиты – это грибки, которые паразитируют в основном на животных и редко на людях. Основными видами являются: *T. verrucosum*, *T. mentagrophytes*, *T. equinum*, *T. gallinae*, *M. canis*, *M. equinum*. Группа почвообитающих дерматофитов включает кератинофилов, которые разлагаются в почве. Эта группа дерматофитов может быть патогенной для организмов при определенных условиях, например, *M. gypseum*, *M. nanum*, *M. cookei*, *T. ajelloi*, *T. terrestre*. [19]

A.R. Khosravi и M. Mahmoudi проанализировали в общей сложности 790 образцов волос, шерсти и кожи, взятых у различных животных с подозрением на дерматофитию в период с 1994 по 1998 год, и дерматофиты были обнаружены в 248 образцах (31,4%). Наиболее часто выделяемыми дерматофитами были *M. canis* (38,3%), *T. verrucosum* (31,8%), *T. mentagrophytes* (13,3%) и *M. gypseum* (7,7%). Уровень позитивности у кошек (54,8%) был намного выше, чем у собак (8,2%), при этом наиболее часто выделялся *M. canis* (87,2% и 50%, соответственно). *T. verrucosum* был наиболее распространенным возбудителем дерматофитии у жвачных животных, *M. equinum* у лошадей, *M. gypseum* у кроликов, *M. gallinae* у кур и *T. mentagrophytes* у домашних белок. [71]

В Иране в 2006–2007 годах было исследовано 6789 животных; проанализировано 6789 голов крупного рогатого скота и 130 пастухов. Образцы были взяты у 380 голов крупного рогатого скота и 43 пастухов с подозрением на дерматофитию; возбудитель был идентифицирован макроскопически и микроскопически путем исследования КОН и выделения культуры. Только 352 случая дерматофитии были выявлены у крупного рогатого скота, а *T. verrucosum* был единственным грибом, выделенным от

животных. Кроме того, было выявлено 27 случаев дерматофитии у людей, и *T. verrucosum* был основным грибом-возбудителем дерматофитии на теле, волосистой части головы, стопах, ногтях и в паху пациентов. Также было установлено, что *T. verrucosum* является преобладающим возбудителем дерматофитии у крупного рогатого скота и молочных ферм. Информация о выделении и идентификации поверхностной дерматофитии у крупного рогатого скота в Иране ограничена. Данное исследование демонстрирует наличие дерматофитии у людей и крупного рогатого скота и подтверждает, что дерматофития является важной причиной заболеваний у людей, контактирующих с крупным рогатым скотом. [59]

В последние годы некоторые авторы отмечают возрастающее эпидемиологическое значение зоофильных дерматофитов, вызываемых *T. mentagrophytes*, *T. verrucosum* и *M. canis*. [33]

Зоофильный дерматофит *T. verrucosum* в основном встречается в сельской местности, где содержится невакцинированный крупный рогатый скот, а переносчиком *T. mentagrophytes var. gypseum* являются грызуны семейства грызунов. [63]

Заболеваемость стригущим лишаем в разных регионах и странах неодинакова. Заболеваемость *T. mentagrophytes var. gypseum* значительно ниже, чем *T. microsporidiosis*. [18]

Трихофития, вызываемая зоофильными грибами, остается одной из актуальных проблем в Республике Башкортостан (РБ). Наш регион занимает девятое место по показателю заболеваемости среди субъектов Российской Федерации и первое в Приволжском Федеральном округе. Чаще зооантропонозная трихофития имеет инфильтративно нагноительную форму с локализацией на волосистой части головы, последствием которой является

стойкое облысение пораженных участков, что наносит психологическую травму пациенту. [14]

Каждый год врачи регистрируют до полутора случаев заболевания стригущим лишаем, в Уфе их более 600. По данным Центра гигиены и эпидемиологии в РБ, с начала года в Уфе и Уфимском районе лишаи были выявлены у 18 детей. В январе прошлого года специалисты зарегистрировали 29 случаев заболевания микроспорией. [17]

Дерматомикозы, такие как грибковые инфекции кожи, могут оказывать отрицательное влияние на психическое здоровье людей. Эта болезнь может привести к зуду, покраснениям, шелушению и другим дискомфортным симптомам, которые могут вызывать чувство стыда и неполноценности у инфицированных. Это может также привести к социальной изоляции и ухудшению качества жизни. [9]

Кроме того, некоторые формы дерматомикозов могут оказывать воздействие на нервную систему, вызывая головные боли, бессонницу, утомляемость и раздражительность. В некоторых случаях, поскольку заболевание может быть длительным и трудноизлечимым, оно может стать причиной депрессии и ухудшения психического состояния. Лечение и профилактика этой болезни может помочь поддерживать психическое здоровье и улучшить качество жизни и общее самочувствие. [20]

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

При подозрении на дерматомикоз использование различных методов лабораторной диагностики грибов является неотъемлемой частью дифференциально-диагностического процесса и диагностики: для диагностики используется микроскопия нативного препарата с КОН и культуральное исследование, ограниченно-люминесцентная микроскопия с окрашиванием флюорохромами. Российские исследовательские центры работают над обновлением и усовершенствованием лабораторных систем для ПЦР-диагностики и изучают возможности масс-спектрометрии для идентификации грибов. Для диагностики грибка стригущего лишая в основном используется естественная микроскопия, в то время как культуральная диагностика применяется менее широко; основными недостатками культуральной диагностики являются слишком длительное время выполнения и относительно низкая чувствительность. [63]

Как и в случае микроспории, диагностика трихофитии основывается на клинической картине заболевания, микроскопическом и культуральном исследовании, а также дополнительной флуоресцентной диагностике с использованием лампы Вуда. [63]

Инфекции из рода *Microsporum* освещаются только до 50% всех случаев, тогда как инфекции из рода *Trichophyton* – не светятся. [61]

Микроспория, вызванная *M. canis*, излучает характерный зеленый свет с помощью лампы Вуда, в то время как виды рода *Trichophyton* не излучают флуоресцентный свет, что на практике очень затрудняет диагностику, и в некоторых случаях трихомикоз не распознается. [69]

Наличие экссудативных очагов микроспории или трихофитии у больного является существенной объективной трудностью, которая может приводить к диагностической ошибке. Обнаружение спор, мицелия из заполненных слизью очагов и сбор биологического материала для дальнейшей микробиологической идентификации грибов нецелесообразно, так как снижает вероятность обнаружения возбудителя.

Оптические свойства экссудата затрудняют люминесцентную диагностику-экссудативный чесоточный лишай становится слегка опалесцирующим в свете лампы Вуда и создает впечатление зеленоватого свечения. Это ложное свечение может привести к недо-или пере диагностике грибковых инфекций. С увеличением частоты встречаемости экссудативных форм микроспории и трихофитии клиническая и лабораторная диагностика этих грибковых инфекций стала более трудной, что привело к увеличению числа ошибочных и запоздалых диагнозов. Также могут встречаться атипичные зоонозные формы, маскирующиеся под экзему, псориаз, красную волчанку и розовый лишай Жибера. Идентификация выделенных грибов является важной задачей, и для этой цели в лабораториях практического здравоохранения используются фенотипические методы. Рутинная ручная фенотипическая идентификация грибов трудна, занимает много времени, весьма субъективна, требует высокой квалификации персонала и не отвечает современным потребностям клинической практики.

Использование современных полуавтоматических и автоматических микробиологических анализаторов значительно повысило точность традиционной фенотипической идентификации (до 70–80%). [62]

Достижения в области молекулярно-генетической диагностики также оказали влияние на микологию. Выделение ДНК *Trichophyton rubrum*

позволило быстро установить этиологический диагноз, оценить эффективность терапии и микологическое излечение пациентов.

Следует отметить, что ПЦР и усовершенствованные методы (ПЦР в реальном времени) в настоящее время не используются государственными органами для диагностики дерматомикозов из-за отсутствия рутинных диагностических наборов. [62]

В России эти методы используются в основном в научных целях для накопления генетического материала в базах данных и совершенствования методов идентификации грибов. До настоящего времени ни в одном российском исследовании не была показана значительно более высокая диагностическая эффективность, чувствительность и специфичность методов ПЦР в реальном времени в лабораторной диагностике микроспории по сравнению с микроскопией и культуральными методами.

Для специфического молекулярно-генетического выявления *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes* ПЦР-амплификация фрагментов, содержащих участки ДНК, смежные с геном 5,8S рРНК (ITS1 и ITS2), является оптимальной и может быть использована для разработки диагностических тест-систем. [75]

В последние годы масс-спектрометрия все шире используется в лабораторной диагностике. Двумя методами идентификации микроорганизмов с помощью масс-спектрометрии являются: профилирование белков (MALDI-TOFMS) и идентификация клеточных липидов с помощью газовой хроматографии-масс-спектрометрии (GC-MS) и жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (LC-MS). [73]

Прямое профилирование белков с помощью матрично-ассистированной лазерной десорбции/ионизации времяпролетной масс-

спектрометрии (MALDI-TOFMS) – это быстрый, видоспецифичный метод идентификации патогенов. На современном этапе диагностики грибковых заболеваний масс-спектрометрия до сих пор использовалась только в научных целях. Основной проблемой этого метода является трудоемкое выделение культур грибов на питательных средах. [74]

Разработка современных методов лабораторной диагностики дерматофитии позволит повысить частоту выявления заболевания стригущим лишаем, более своевременно назначать рациональное лечение с учетом особенностей возбудителя, сократить длительность лечения. [72]

Молекулярно-биологические методы и масс-спектрометрия перспективны для диагностики трихомикоза кожи и придатков; методы ПЦР используются в небольшой части общих грибковых исследований в России, но во многих регионах нет лабораторных систем для ПЦР-диагностики трихомикоза. Масс-спектрометрия для диагностики грибковых заболеваний находится в стадии научного становления и не используется в медицинской практике. [75]

Внедрение методов ПЦР диагностики грибковых заболеваний в клиническую и лабораторную практику будет способствовать быстрому и эффективному выявлению возбудителя и соответствующему лечению трихомикоза. [68]

ПЦР в реальном времени (Real-time PCR) – это метод, который позволяет наблюдать результаты ПЦР в процессе амплификации ДНК. Это достигается благодаря введению специальных поглотителей, которые светятся при наличии ДНК фрагмента, что позволяет определять количество ампликонов в режиме реального времени.

Плюсы ПЦР в реальном времени:

1. Быстрота и точность анализа результатов;
2. Не требуется использование гель-электрофореза для визуализации ампликонов;
3. Минимальная загрязненность ДНК и, следовательно, меньше вероятность ошибок;
4. Возможность квантификации и анализа низкокопийных ДНК фрагментов;
5. Высокая специфичность и сохранение целостности ДНК фрагментов.

Минусы ПЦР в реальном времени:

1. Необходимость в специальном оборудовании, которое может быть достаточно дорогим;
2. Риск ошибок при использовании специфических зондов, так как они могут связываться с несовершенной матричной ДНК или другими сходными последовательностями;
3. Требуется четкой калибровки и качественной подготовки образцов;
4. Не может быть использован для секвенирования ДНК.

Отличие ПЦР от ПЦР в реальном времени:

ПЦР – это метод амплификации ДНК, который позволяет увеличить количество указанного участка ДНК в многократные разы. Однако, результаты ПЦР могут быть определены только после завершения анализа, в то время как ПЦР в реальном времени позволяет определить результаты анализа в процессе амплификации ДНК. Кроме того, для ПЦР в реальном времени необходимо использовать специальные зонды, которые обязательно должны быть мечены для обнаружения результатов в реальном времени. [67]

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

Согласно нормативным критериям, утвержденным Высшей ветеринарной академией Министерства сельского хозяйства Российской Федерации 18 марта 2008 года, диагноз на дерматофитию ставится на основании результатов лабораторных исследований, включая характерные клинические симптомы, эпидемиологические данные, оптическую микроскопию и люминесцентное исследование патологического материала, выделение и идентификацию культур грибов и, при необходимости, реакции агглютинации. Для этого используются.

1. Флуоресцентная микроскопия.

Материал собирают у животных с нелеченым дерматомикозом, помещают в чашки Петри, облучают ртутной лампой и наблюдают в темной комнате. Патологический материал следует наблюдать на расстоянии 20–25 см от светофильтра. Волосы и чешуйки кожи, зараженные возбудителями микроспоридий, имеют характерное изумрудно-зеленое свечение. Шерсть животных, обработанных бриллиантовой зеленью, также может давать неспецифическое изумрудно-зеленое свечение. Животные черной масти или зараженные штаммами, не вырабатывающими пиридиновый пигмент, могут не проявлять люминесценции. Поэтому, если люминесцентная диагностика отрицательна, следует провести микроскопию и культуру. При поражении *Trichophyton* люминесценция отсутствует в пораженных волосках. Для обследования животных, подозреваемых в заражении, в темной комнате можно использовать портативные ртутные лампы.

2. Микроскопическое исследование с помощью оптического микроскопа.

Используя препаровальную иглу и пипетку, выберите и срежьте толстую прикорневую часть волоса, покрытую белым налетом или чешуйками кожи. Длина участка волоса, подготовленного для микроскопии, должна составлять 1–2 мм. Затем несколько волосков и чешуек (8–10) помещают в каплю 20% NaOH или KOH на предметном стекле, осторожно нагревают пламенем горелки до появления белого ореола вокруг капли (не нагревать до температуры кипения), затем добавляют каплю теплого 50% водного стерильного раствора глицерина и накрывают покровным стеклом.

Микроскопическое исследование пораженных волос животных с дерматофитией показывает, что возбудитель, вызывающий тинеокапит, характеризуется наличием круглых спор (артроспор) гриба, которые образуют оболочку вокруг волосков. Их можно обнаружить как на поверхности, так и внутри волоса. Первоначально на чешуйках присутствуют разветвленные мицелии. Споры *T. verrucosum*, *T. verrucosum* var. *autotrophicum* и *T. equinum* крупнее (2,5–7–12 мкм), чем споры дерматофита *T. mentagrophytes* (2–4 мкм). Помимо спор, в волосах можно увидеть пузырьки воздуха в виде длинных черных полос. Также можно увидеть капельки масла. Возбудитель микроспориоза характеризуется наличием артроспор (1,5–3,5 мкм), которые случайно выстилают волосные фолликулы, а иногда образуют оболочки на поверхности волос. Споры резко преломляют свет и плотно прилегают друг к другу. Изгиб мицелия и его деление на споры приводит к мозаичному расположению спор, характерному для микроспориоза. В редких случаях мозаичное расположение спор может быть несколько слабее. Ветвистый мицелий также можно увидеть на чешуйках.

3. Изоляция чистых культур патогена

Для получения чистых культур гриба и определения вида корневые срезы волосков и чешуек проводят посевы на сусло-агар, агар Сабуро или пептоно-глицериновый агар (PGMA), содержащий 2% глюкозы. Культуры инокулируют в пробирки с вышеуказанными средами с помощью микологической иглы. Микологическая игла (мицелиальный крючок) вставляется в иглодержатель. Кончик иглы сгибают под прямым или тупым углом и расплющивают в форме лопаточки. Сплюснутую иглу осторожно погружают в питательную среду, охлаждают, кончиком иглы прикасаются к частице волоса или фрагменту кожи и переносят на поверхность питательной среды в две или три из 7–10 пробирок на расстоянии 1–1,5 см друг от друга. Зараженные пробирки инкубируются при 26–28°С до 30 дней, состояние инокулята контролируется каждые 3–5 дней. Зараженный патологический материал перед инокуляцией заливают небольшим количеством 70° этилового спирта и выдерживают в термостате до полного испарения. Появление колоний дерматофитов на пораженных волосах и чешуйках кожи в месте инокуляции можно наблюдать на 3–5 день. В некоторых случаях за культурами следует наблюдать в течение месяца, так как развитие патогена может быть распознано только на 20-й день. Образование колоний дерматофитов происходит в разное время. Так, типичный рост *T. mentagrophytes*, *T. equinum*, *M. canis* и *M. equinum* наблюдается на 10–14 день, а *T. verrucosum*, *T. verrucosum* var. *autotrophicum* – на 20–25 день. Поэтому культуры этих дерматофитов должны быть идентифицированы в это время. [76]

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

1. Световая микроскопия.

1. Микроскопия используется для диагностики дерматофитных инфекций с помощью различных методов диагностики. Для прямого микроскопического исследования кожи, волос, чешуек и соскобов ногтей используется яркопольный микроскоп с 40-кратным увеличением [44]. Иммуноокрашивание поликлональными антимикобактериями также используется при микроскопическом исследовании для гистологической идентификации микроорганизмов в образцах биопсии кожи от различных видов животных [54]. Такие методы направлены на то, чтобы показать различные структуры пораженных хартроспорами волосков. Были проведены различные исследования и эксперименты с использованием различных осветлителей во время влажной подготовки предметных стекол для получения более четких микроскопических изображений и сокращения времени, необходимого для подготовки и исследования предметных стекол [22]. Гидроксид калия (KOH), гидроксид натрия (NaOH), каллусфорический белый, синий, лактофеноловый хлопковый синий (LPCB), диметилсульфоксид (DMSO) и глицерин смешивали с NaOH или KOH [38].

2. Фазово-контрастная оптическая микроскопия.

Для улучшения видимости микроскопа в светлом поле можно регулировать контрастность и зазор. Это достигается путем уменьшения интенсивности света для достижения максимального контраста и максимальной четкости изображения. Поэтому фазово-контрастная микроскопия лучше, так как структуры отображаются более четко без потери света. Целифазово-контрастной микроскопии при 40-кратном увеличении используются для демонстрации характерных грибков-дерматофитов в

ссадинах кожи и образцах ногтей [21]. Основными недостатками фазово-контрастной микроскопии являются низкая контрастность получаемых изображений и наличие светящегося ореола вокруг объекта. Этот тип микроскопа так же не улучшает разрешающую способность микроскопа.

3. Флуоресцентная микроскопия.

Поскольку некоторые ткани, инфицированные дерматофитами, флуоресцируют при окрашивании гематоксилином и эозином (HandE) или ультрафиолетовом облучении, методы, связанные с флуоресценцией, могут быть включены в быструю диагностику дерматофитии [40]. В этом контексте было разработано использование ламп Вуда для клинического обследования поражений кожи. Диагностическая эффективность флуоресцентной микроскопии превосходит окрашивание по Шиффу [39]. Основным препятствием, с которым сталкиваются методы, основанные на флуоресценции, для обнаружения природных дерматофитов, является то, что их свойства не ограничиваются несколькими видами, что делает этот метод зависимым от других для идентификации дерматофитов [49]. С другой стороны, было установлено, что использование флуоресцентных красителей, таких как Calcofluor White, имеет значительные преимущества по сравнению с традиционным использованием влажного осаждения КОН.

Микроскопическое исследование имеет важное значение для диагностики дерматофитоза. Согласно документации, одним из самых простых и быстрых методов является использование яркогопольного микроскопа в сочетании с одним из осветляющих средств [26].

В дополнение к микроскопии, культуральные методы также являются важными диагностическими методами для выявления дерматофитов. Рассмотрим здесь культуральный метод [22].

1. Питательная среда для культуры патогенных грибов, среда Сабуро

Среда Сабуро является селективной средой для грибов из-за высокой концентрации глюкозы и низкого значения pH. Добавление трех антибиотиков к этой среде значительно улучшает выделение патогенных грибов из сильно загрязненного тестового материала. Для приготовления селективной среды добавьте в стерильных условиях следующие антибиотики: 0,4 г циклогексимида, 20 ЕД пенициллина, 40 мг стрептомицина. Инкубируйте посуду при 30°C в течение 3-7 дней. Используется для культивирования патогенных грибов, особенно тех, которые связаны с кожными инфекциями. Среда также подходит для количественного определения микроорганизмов и грибов в косметике и для микологической оценки пищевых продуктов. Однако эта среда предназначена для культивирования широкого спектра патогенных грибов и не обеспечивает биохимического выражения для различения видовой принадлежности отдельных колоний.

2. Среда для выделения дерматофитов (DTM)

В дополнение к традиционному выделению дерматофитов с помощью сред, специфичных для микологии, усовершенствованные среды могут обеспечить инференциальную идентификацию дерматофитов относительно быстро (две недели) по сравнению со стандартной культурой [9]. Дерматофитная тестовая среда (DTM) была одной из первых сред, разработанных для быстрой инференциальной идентификации дерматофитов [20]. К сожалению, некоторые недерматофитные дерматофиты (НДМ) являются патогенными или гнилостными и могут выживать независимо от типа и концентрации используемых противогрибковых препаратов; НДМ могут также продуцировать щелочные продукты, которые изменяют цвет среды с соломенного на красный. Получаемый красный цвет такой же или более

интенсивный, чем цвет самой группы дерматофитов. Более того, некоторые NDM имеют одну и ту же группу дерматофитов по форме, месту поражения и типу образца. [20]

3. Среда для идентификации дерматофитов (DIM)

Чтобы избежать недостатков DTM, таких как неспецифические реакции ложноположительные результаты, была разработана относительно быстрая среда предположительной идентификации дерматофитов, которая является усовершенствованной DTM с инкубацией при 37°C и увеличением концентрации циклогексимида. Этот улучшенный DTM является средой для идентификации дерматофитов (DIM). DIM использовался в безусловно разработанных протоколах идентификации и показывает значительные преимущества перед DTM в плане чувствительности и специфичности. К сожалению, DIM имеет большое количество ложноотрицательных и ложноположительных результатов, что ограничивает его полезность и применение. [57]

4. Протоколы, основанные на использовании нескольких хромогенных сред

Был разработан двухдневный протокол для быстрого и легкого различения двух очень похожих видов дерматофитов. Разработанный протокол был составлен следующим образом: 2-20 – дневные первичные изоляты инокулируются на четырех коммерческих хромогенных средах при различных температурах 4, 20, 25 и 30°C, с максимальной температурой ниже 37°C, поскольку температура выше 37°C не подходит для роста большинства видов дерматофитов [29]. Стратегия чтения этих инокулированных сред заключалась в регулярном наблюдении за ними от 2 часов до 7 дней после инкубации. Это исследование показало, что Candiselect является перспективным кандидатом для быстрой и точной (в течение

нескольких часов) дискриминации двух изученных видов дерматофитов. Несмотря на перспективность, этот метод может различать только два вышеупомянутых вида дерматофитов. В случае присутствия других дерматофитов требуется дополнительная диагностика, которая может занять еще больше времени, чем обычная культура. [29]

5. Метод скрининговой культуры.

Тонкий слой DTM наносится на прозрачное пластиковое предметное стекло. Это, по сути, аналогично методу быстрой микрокультуры, когда берется образец и наносится на тонкий культуральный слой с помощью прозрачной клейкой ленты. Идентификация дерматофитов зависит от сочетания микроморфологических изменений и некоторых макроморфологических цветовых характеристик, когда культуры на предметных стеклах ежедневно рассматриваются под микроскопом [42].

Культуральные методы быстрой идентификации дерматофитов были разработаны для выявления широкого разнообразия дерматофитов или только ограниченного числа видов, оба варианта требуют много времени и делают невозможным практическое применение этих исследований для рутинной диагностики дерматофитии [27].

Технология матрично-ассистированной лазерной десорбции/ионизации время пролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF) – Этот метод получения и оценки спектра считается эволюцией лабораторной диагностики, поскольку он надежен, точен, прост в использовании и легко интегрируется в рутинные лабораторные рабочие процессы. В то же время он преодолевает недостатки молекулярных методов, такие как высокая стоимость, опыт, необходимый при применении и анализе результатов, или длительное время использования и низкая специфичность традиционных методов [10]. MALDI-TOF MS был впервые внедрен и применен в масштабах свежих культур, которые

рассматриваются как целые клетки, т. е. колонии микроорганизмов. К тому времени в систему были включены культуры крови и другие приложения, что улучшило ее способность выполнять широкий спектр и микробных панелей и позволило ей напрямую обрабатывать различные типы культур из твердых агаровых блюд. [27]

Все системы, установленные для MOLDI-TOF, обнаруживают широкий спектр различных видов бактерий и дрожжей. Было проведено несколько испытаний по применению метода к различным протоколам идентификации плесневых грибов, включая дерматофиты [14]. Все они показали неэффективные результаты, в основном только при привязке к базам данных, созданным в лаборатории, что требует больших затрат труда и времени. В исследовании по расширению существующей информационной базы данных MOLDI-TOF грибов для более надежной идентификации клинически значимых дерматофитов, несколько исследований показали широкий диапазон точности от 13,5% до 100% из-за несоответствия основным этапам стандартного процесса перед лабораторного тестирования. Согласно этим результатам, несколько исследований показали, что MOLDI-TOF является отличным дополнением к обычной культуре в рутинной диагностике дерматофитов [34].

Видовая идентификация дерматофитов на основе морфологических характеристик грибковых структур трудна и ненадежна из-за значительных различий между отдельными изолятами одного вида на макро-и микроуровнях [50]. Кроме того, изоляты со сходными морфологическими характеристиками могут на самом деле принадлежать к совершенно разным видам.

Теперь давайте рассмотрим некоторые типичные методы молекулярной диагностики.

1. ПЦР на основе электрофореза (ПЦР на основе электрофореза)

ПЦР на основе электрофореза является простейшей формой полимеразной цепной реакции (ПЦР) и обладает высокой специфичностью, чувствительностью и диагностической точностью. В диагностике дерматофитов ПЦР достигает диагностического уровня для обнаружения дерматофитов или идентификации видов дерматофитов с использованием общегрибковых, дерматофитных праймеров или видоспецифичных праймеров, соответственно. Внутренний транскрибируемый спейсер (ITS) и 28s рибосомальная ДНК являются наиболее часто используемыми праймерами для тестирования дерматофитов. Они также определяют размер ампликона с помощью гель-электрофореза. Несмотря на размер образца, условия и подготовку перед применением реакции ПЦР, даже смешанные культуры показывают более высокие показатели идентификации, чем другие традиционные методы [17]. Это объясняется тем, что различия в поведении животных влияют на нагрузку нуклеиновых кислот дерматофитов во взятых образцах, что в свою очередь влияет на результаты. Хотя традиционная ПЦР относительно недорого по сравнению с другими молекулярными методами, она требует процесса пост-амплификации и не дает количественного показателя инфекционного статуса. [52]

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

Количественное определение содержания грибов в инфицированных образцах может быть достигнуто с помощью количественной ПЦР, которая отличается высокой точностью, чувствительностью и специфичностью. ПЦР в реальном времени основана на использовании пары праймеров и меченых зондов, нацеленных на частичные или видоспецифичные гены. Он также может указывать на уязвимую стадию инфекции из-за небольшого количества манипуляций после амплификации [31]. Несмотря на его

высокую стоимость, было показано, что он относительно подходит для рутинных лабораторий с высокой пропускной способностью, тестирующих несколько образцов за цикл. ПЦР является полезным диагностическим методом в таких ситуациях, как мониторинг эффективности лечения, различение клинической инфекции и заражения путем установления порога заражения дерматофитами. КПЦР – полезный диагностический метод в случае отслеживания эффекта лечения, дифференциации клинической инфекции и контаминации путем установления порога инфицирования дерматофитами [58]. Он показал более высокую чувствительность и специфичность по сравнению с традиционными методами. В целом, количественные методы ПЦР показали значительно более высокую чувствительность в диагностике дерматофитов и в идентификации видов грибов и могут различать другие кератофильные виды NDM, даже если они присутствуют в одном и том же месте инфекции. Согласно результатам исследований, ПЦР показывает как ложноположительные, так и ложноотрицательные результаты, поскольку на нее влияют различные факторы, такие как качество образца, различия в молекулярных мишенях, используемые методы амплификации и протоколы выделения ДНК, и на нее нельзя полностью полагаться как на отличную альтернативу методу золотого стандарта. [55]

3. Вложенная ПЦР

Для повышения специфичности ПЦР в диагностике дерматофитии были созданы различные целевые вложенные ПЦР, особенно при использовании пан-праймеров. Первичные ампликоны, полученные в цикле амплификации с первой парой праймеров, подвергаются еще одному циклу с другой парой праймеров [12]. Во втором цикле полученные первичные ампликоны служат матрицей для второй пары праймеров. Во многих предыдущих исследованиях, включая общие протоколы ПЦР для

диагностики дерматофитов, результаты, полученные при использовании предметных стекол с КОН-фиксацией и обычных культур, очень высоки, особенно когда речь идет о культурах, неприводящих к макроскопическому росту. Однако частота заражения и требуемое время по сравнению с установленными ПЦР являются существенными недостатками в их применении.

4. Мультиплексная ПЦР.

Это метод ПЦР, целью которого является проведение одной и той же ПЦР-реакции с использованием двух или более наборов праймеров, когда объем образца ограничен, а из одного и того же образца необходимо выявить более одного патогена. Нуклеотидные последовательности прямого и обратного праймеров каждого выбранного набора должны быть проверены на димеризацию, которая может привести к неспецифической амплификации. Было разработано и неоднократно испытано несколько мультиплексных/дуплексных ПЦР, показавших конкурентную чувствительность и специфичность на образцах культуры и влажного КОН с наивысшей точностью в случаях онихомикоза и *T. rubrum*. [23]

5. Метод ПЦР-ИФА.

Это гибридный метод, основанный как на ПЦР, так и на иммуноферментном анализе (ИФА), с использованием меченых ампликонов нуклеиновых кислот вместо целевого анализируемого белка в микрокультуре на планшетах ИФА [32]. Для повышения чувствительности перед проведением ИФА проводилась гибридизация специфических зондов; были разработаны два формата гибридизации: формат гибридизации на основе одного зонда, используемого для гибридизации целевого анализируемого белка на планшете ИФА, и формат гибридизации на основе одного зонда, используемого для гибридизации анализируемого белка на планшете ИФА

[56]. Либо с помощью дигоксигенина и амплификации целевых генов в присутствии меченных биотином нуклеотидных зондов для получения меченных биотином ПЦР-ампликонов. Ампликоны, зафиксированные на микротитровальных планшетах, выявлялись с помощью антидигоксигенин-пероксидазы. Однако этот метод не считается наиболее подходящим для рутинной диагностики дерматофитов из-за его трудоемкости и длительности по сравнению с другими широко используемыми методами. [16]

6. Метод ПЦР-полиморфизма длины рестрикционного фрагмента (ПЦР-ПДФ)

ПЦР-ПДФ-еще один гибридный метод, основанный на этапе полиморфизма длины рестрикционных фрагментов с использованием ПЦР и ферментов рестрикции [52]. Он может выявлять различные виды дерматофитов и различные виды NDM при многопричинном онихомикозе, но в некоторой степени напоминает более дешевую альтернативу гнездовой ПЦР, поскольку не может выявлять мутации в пределах одного вида [46]. По сути, этот анализ основан на амплификации целевых последовательностей, указывающих на видоспецифические мутации, затем ампликоны обрабатываются специфическими ферментами рестрикции, наконец, проводится секвенирование или гель-электрофорез ампликонов, что позволяет сравнить молекулярный вес полос со стандартной лестницей. Однако этот метод представляется относительно недорогим, простым в реализации и более чувствительным, чем обычные культуральные методы. Этот метод был исключен из стандартных программ диагностики дерматофитов, поскольку он трудоемкий, утомительный и занимает много времени и требует ферментов рестрикции. [18]

7. Методы на основе бокового потока.

В последние несколько лет для быстрого обнаружения различных инфекционных и аналитических агентов были разработаны методы на основе бокового потока, которые соответствуют таким параметрам, как доступность, чувствительность, специфичность, удобство использования, скорость и надежность. Было разработано множество анализов на основе бокового потока с различной точностью, специфичностью и чувствительностью [36]. Существует три основных типа латеральных проточных анализов: иммунохроматографический латеральный проточный анализ (ILFA), иммунохроматографический латеральный проточный анализ нуклеиновых кислот (NALFIA) и латеральный проточный анализ нуклеиновых кислот (NALFA); NALFA – метод гетеротермической амплификации (PCR-NALFA) или метод изотермической амплификации (RPA-NALFA) – метод изотермической амплификации (PCR-NALFA) или метод латерального проточного анализа нуклеиновых кислот (RPA-NALFA) и перспективный кластеризованный регулярно перемежающийся короткий палиндромный повтор /cas12 анализ бокового потока (CRISPR/cas 12-LFA) могут быть разработаны для диагностики дерматофитов; CRISPR/cas12-LFA может быть разработан с использованием системы DETECTR или системы SHERLOCK. Каждый анализ бокового потока может быть разработан в различных форматах, таких как типичный сэндвич, конкурентный и мультиплексный. Несколько исследований, проведенных в качестве предварительного шага к методам на основе латерального потока, изучили этот анализ как метод быстрой идентификации дерматофитов.

В сравнительном исследовании, в котором дерматофиты были обнаружены в 222 образцах, для диагностики онихомикоза сравнивались обычная прямая микроскопия, высокоспецифичная ПЦР и недавно разработанный латеральный поток на основе моноклональных антител. Показатель точности, полученный с помощью трех сравниваемых методов, составил 90,5%, 76,6% и 92,5%, соответственно. В противоположность этому,

в 45 образцах, которые полагались на результаты ПЦР в качестве окончательного суждения, точность между тремя сравниваемыми методами была разной [13].

Таким образом, существует несколько успешно разработанных методов, которые могут заменить традиционные методы диагностики дерматофитии. Многие из этих методов являются более надежными и менее эффективными в диагностике дерматофитии. Некоторые из них показали дорогостоящие и специализированные исследования; другие – адекватную чувствительность, специфичность и быстроту; третьи – требуют длительного обучения перед тестированием. Методы на основе латерального потока в настоящее время признаны перспективной альтернативой как традиционной лабораторной диагностике, так и передовой молекулярной диагностике. Улучшение диагностической точности, чувствительности и специфичности латерального потока является новым вызовом и ожиданием в диагностике дерматофитии.

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 118 экземпляров, среди которых 74 подтверждённых на трихофитию возбудителя *T. verrucosum* (52 – двумя регламентированными методами; 22 – одним из регламентированных методов) и 44 образцов от животных с кожными заболеваниями не грибкового происхождения (группа сравнения).

Методы исследования дерматофитов:

1. Микроскопия патологического материала.
2. Культивирование на питательной среде.
3. ПЦР.
4. ПЦР в реальном времени

2.1. Методики проведения методов исследования дерматофитов

2.1.1. Микроскопия патологического материала и мацерация

Измельченный патологический материал помещали в центр предметного стекла с каплей 10-20% раствора КОН и осторожно нагревали спиртовым пламенем до получения беловатого ободка у края капли. Затем предметное стекло закрывали и оставляли на 5–10 мин (прямая мацерация).

После мацерации капли микроскопировали под оптическим микроскопом, сначала при малом увеличении, а затем при большем увеличении.

Хотя микроскопическое исследование мацерированного патологического материала не позволяет идентифицировать виды грибов или охарактеризовать профили восприимчивости, этот вид микроскопии используется как быстрый метод подтверждения диагноза дерматофитии. Такая микроскопия позволяет выявить три типа возможной инфекции: Ectotrix – крупные и мелкие членистоногие, образующие "оболочку" вокруг стержня волоса; Endotrix – членистоногие внутри стержня волоса (рис. 1); или Favus – мицелий и воздушное пространство внутри стержня волоса.

Поскольку дерматофиты относятся к группе патогенности 3, натуральные препараты готовились в боксе с ламинарным потоком воздуха, чтобы минимизировать передачу инфекции воздушно – капельным путем.



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

2.1.2. Культивирование на питательной среде

Метод культивирования проводился в два этапа.

Этап 1, культура в плотной среде Сабуро.

В качестве среды использовалась плотная среда «Biomedia», селективная среда, подходящая для роста патогенных грибов Сабуро. А также использовалась концентрированная среда Сабуро, к которой был добавлен левомецетин для подавления роста бактерий, ингибирующих рост грибов.

Приготовление концентрированной среды Сабуро. 54 г сухой среды разбавляли 1 л дистиллированной воды. Среду кипятили до растворения.

Затем среду переливали в стерильную бутылку и стерилизовали в автоклаве при температуре 112°C. После автоклавирования готовую среду разливали в чашки Петри.

При приготовлении питательной плотной среды Сабуро, содержащей левомицетин, антибиотики добавляют перед автоклавированием.

Поскольку дерматофиты относятся к группе патогенности 3, процедуры культивирования дерматофитов проводили в боксе с ламинарным потоком для минимизации факторов загрязнения воздуха.

Инокулированный патологический материал (чешуйки/волосы/корки) измельчали на предметных стеклах в физиологическом растворе NaCl и инокулировали в подготовленную среду Сабуро.

Затем его инкубировали при 27°C в течение 2 недель.

После инкубации определяли морфологические характеристики растущих макрокультур.

T. verrucosum имеет следующие макроскопические признаки: небольшой размер колоний, "сгруппированные" колонии, иногда уплощенные колонии. Цвет варьирует от белого до желтовато-серого. Пигментация от нейтральной (отсутствует) до желтой.

Этап 2, микроскопическое исследование чистых культур.

Поместите каплю дистиллированной воды в центр предметного стекла. Перед сбором культуры микробиологическое кольцо/крючок вставляют в спиртовую палочку. Микробиологическое кольцо/крючок традиционно охлаждали в пустом пространстве от культуры в чашке Петри и собирали

культуру для натурального препарата. Эту культуру добавляли в каплю дистиллированной воды на предметном стекле. Затем микробное кольцо/крючок стерилизовали на спиртовой рамке. На мазок добавлялась капля раствора Люголя. Затем закрывали предметное стекло.

Поскольку дерматофиты относятся к группе патогенности 3, естественное приготовление чистых культур также проводилось в боксе с ламинарным потоком, чтобы минимизировать фактор загрязнения из-за передачи по воздуху.

Затем культуры наблюдали под оптическим микроскопом, сначала при малом увеличении, а затем при большем увеличении.

Морфологические характеристики микрокультур определялись при микроскопии (Рисунок2)

Микроскопические признаки *T. verrucosum*: разветвленный мицелий. Мицелий разделенный, бесцветный, с редкими палочковидными (яйцевидными/ланцетными) микроспорами (4-7x2-3 мкм). Плодовые тела 35-45x4-7 мкм, "бусоподобные", многоклеточные, 4-7 – клеточные, гладкие и тонкостенные. Могут образовывать цепочки хламидоконидий (хламидоспоры) на агаровой среде Сабуро с декстрозой (обычно $t = 37^{\circ}\text{C}$).

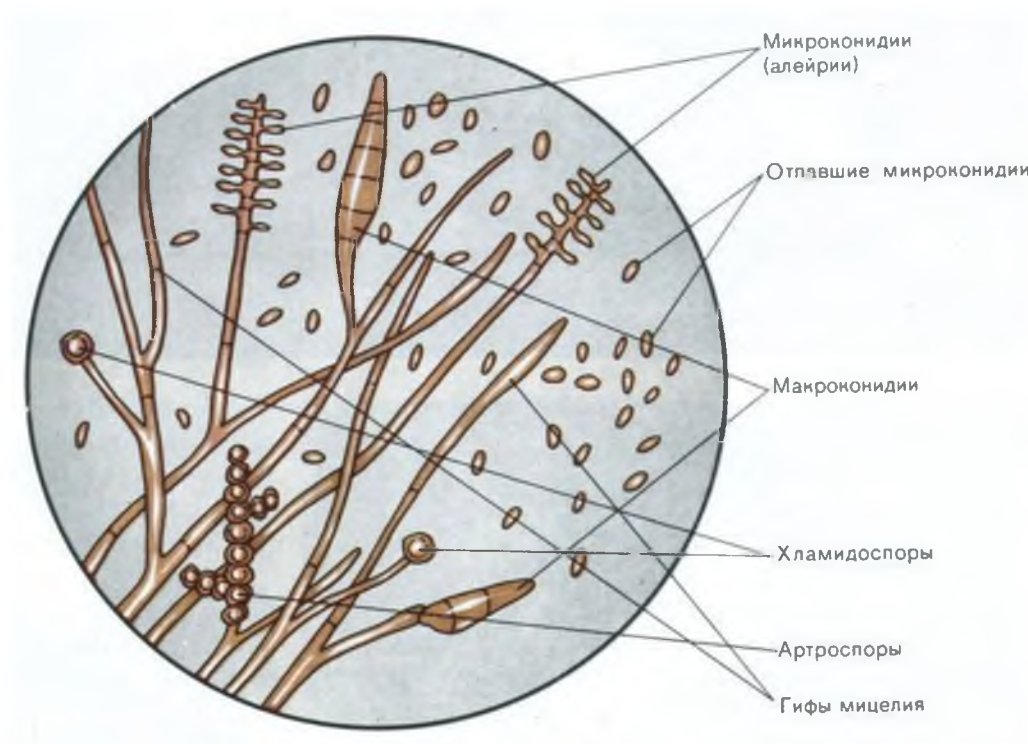


Рисунок 2 – *T. verrucosum*, микрокультура при микроскопии.

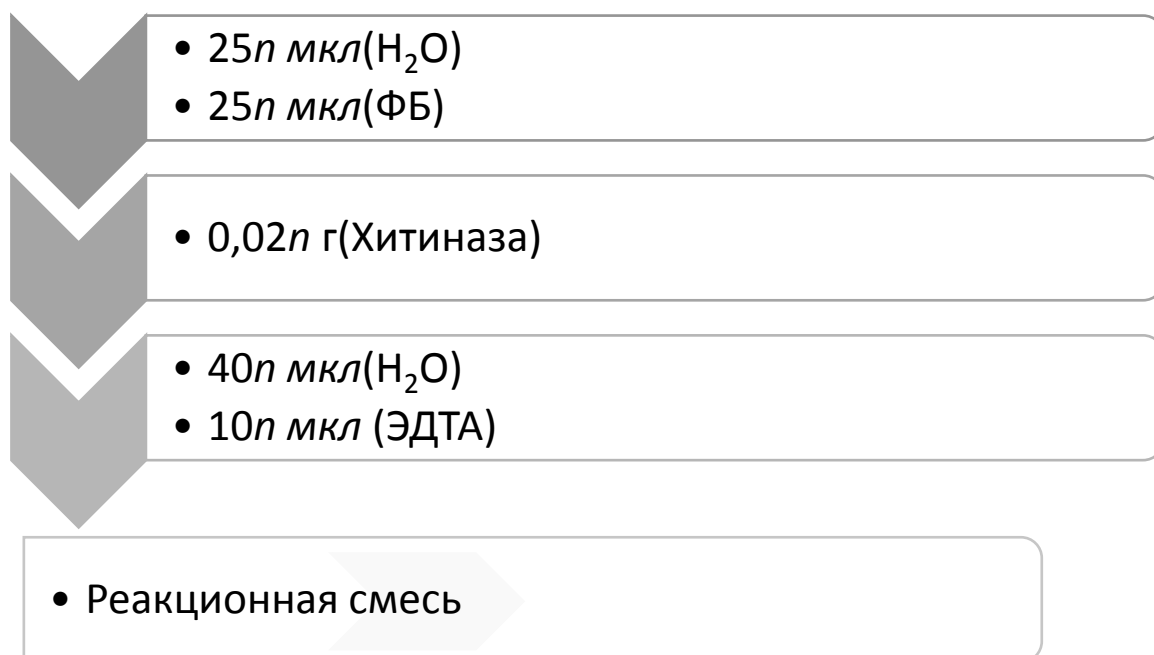
2.1.3. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

Этап 1, подготовка образца перед выделением ДНК грибов.

Грибы имеют хитиновую клеточную стенку, которая препятствует выделению ДНК. Поэтому было необходимо обработать биоматериал буферным раствором, содержащим основной активный ингредиент – фермент хитиназу. Для приготовления реакционной смеси использовалась следующая формула:

100 мкл (буфер на образец) * n (количество образцов).

Реакционная смесь состояла из фосфатного буфера (PBS), этилендиамина тетрауксусной кислоты (ЭДТА), хитиназы и дистиллированной воды. Приготовление всех буферов показано ниже (схема 1). Фосфатный буфер разбавляли 1:1 дистиллированной водой до половины рассчитанного общего объема буфера 100 нмкл; ЭДТА разбавляли 1:4 дистиллированной водой до второй половины рассчитанного общего объема



буфера 100 нмкл; хитиназу разбавляли 1:4 дистиллированной водой до второй половины рассчитанного общего объема буфера 100 нмкл.

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

Этап 2, выделение ДНК.

Процедура выделения ДНК с помощью набора DNA-sorb-AM выглядит следующим образом:

1. Заполнить подготовленные одноразовые стерильные полипропиленовые пробирки эппендорф10 мл ВКО.

2. Ресуспендируйте сорбент и добавьте 20 мкл универсального сорбента в каждую пробирку, а затем 300 мкл раствора для лизиса с помощью аэрозольного барьерного наконечника.

3. 100 мкл клинического образца добавляли с помощью отдельного фильтрующего наконечника для каждого анализа. В пробирки для экстракции отрицательного контроля добавляли 100 мкл ОКО.

4. Пробирки плотно закрывали, содержимое тщательно перемешивали вихревым методом и инкубировали в инкубаторе при 65°C в течение 5 мин. После инкубации содержимое повторно перемешивали вихревым методом и давали постоять при комнатной температуре в течение 2 мин.

5. Центрифугирование при 10000 об/мин в течение 30 с использовалось для осаждения адсорбента в пробирках. Не задерживая адсорбент, надосадочную жидкость удаляли в колбу-ловушку с помощью вакуумного аспиратора и нефильтрованного наконечника для каждого образца.

6. 1 мл промывочного раствора добавляли к каждому образцу и перемешивали вихревым методом до полного ресуспендирования адсорбента.

7. Осадить сорбент в пробирке центрифугированием при 10000 об/мин в течение 30 секунд. Не задерживая адсорбент, надосадочную жидкость удаляли в колбу-ловушку с помощью вакуумного аспиратора с наконечником без фильтра для каждого образца.

8. Пробирки помещали в термостатическую баню при 65 °C на 5–10 мин и адсорбент высушивали с открытой крышкой.

9. В пробирки для элюции ДНК добавляли по 100 мкл ТЕ-буфера (буфер Трис и ЭДТА) с помощью фильтрующего наконечника. Адсорбент перемешивали вихрем до полного ресуспендирования. Адсорбент помещали в термостатическую баню при 65 °C на 5 мин.

10. Центрифугировали в микроцентрифуге при 12000 об/мин в течение 1 мин. Полученный супернатант содержит очищенную ДНК.

Клинические образцы (клинический материал в транспортной среде) обрабатываются лизатом в присутствии частиц силико-сорбента. Это приводит к деградации клеточной мембраны, вирусной оболочки и других биополимерных комплексов, высвобождая ДНК. ДНК, растворенная в присутствии лизата, связывается с частицами адсорбента, а другие компоненты растворенного клинического материала остаются в растворе и удаляются при центрифугировании и последующей промывке для осаждения адсорбента. При добавлении элюата ДНК к адсорбенту ДНК переносится с поверхности кремнезема в раствор и отделяется от частиц адсорбента центрифугированием. Эта процедура позволяет получить высокоочищенный

препарат ДНК, свободный от ингибиторов амплификации, и обеспечивает высокую аналитическую чувствительность ПЦР-анализа.

Образцы, полученные после экстракции с помощью набора реагентов DNA-sorb-AM, могут храниться в течение одного года при температуре 2–8 °С или 16 °С.

Этап 3, амплификация.

Перед амплификацией ПЦР праймеры, соответствующие специфическим патогенным видам *Trichophyton*, были повторно разведены для амплификации. Праймеры TriM130F/TriM311R использовались для ПЦР-идентификации видов *T. mentagrophytes*; Ver76F/Ver366R использовались для ПЦР-идентификации *T. verrucosum*. Протокол проведения амплификации требовал, чтобы конечная концентрация прямого и обратного праймеров составляла 0,2–0,4, а не 100 мкМ после первого разведения. В результате расчетов праймеры были разведены деионизированной водой в соотношении 1:24.

Амплификацию проводили с использованием готовой к применению ПЦР-смеси «Евроген» Screen Mix-HS. Компоненты реакции добавляли в пробирки эппендорф объемом 0,2 мл в следующем порядке: стерильная вода, Screen Mix-HS, праймеры и ДНК-матрица. Затем амплификация проводилась в специальном амплификаторе.

Используя эти условия реакции, виды *T. mentagrophytes* были идентифицированы методом ПЦР:

1. Начальная денатурация при 94 °С – 2 мин.

2. 30 циклов – денатурация при 94 °С – 20 с, отжиг праймера при 58°С – 20 с, удлинение при 72 °С – 15 с.

3. Окончание элонгации – 72 °С, 1 мин.

Для идентификации видов *T. verrucosum* методом ПЦР были использованы такие условия реакции:

1. Начальная денатурация при 94 °С – 2 мин.

2. 30 циклов – денатурация при 94 °С – 20 с, отжиг праймера при 61 °С – 20 с, удлинение при 72 °С – 20 с.

3. Окончание элонгации – 72 °С, 1 мин.

Этап 4, флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке».

Детекция проводится с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора «iCycler iQ» Bio Rad путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по используемым каналам.

Анализ результатов ПЦР-исследования проводили с учетом результатов контрольных образцов. Для контроля качества экстракции нуклеиновых кислот в каждый образец разведения добавляли внутренний контрольный образец (ВКО) — рекомбинантный препарат ДНК, продукт амплификации которого служил маркером эффективности исследования конкретного образца разведения. Результаты ПЦР-анализа считали положительными при наличии флуоресцентного сигнала, пересекающего пороговую линию.

2.1.4. Статистический анализ

Для статистического анализа использовался четырехпольный табличный метод.

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

1. Чувствительность (Se) (мера специфичности) измеряет долю правильно выявленных положительных результатов (т.е. долю людей, правильно идентифицированных как имеющие заболевание (пораженные лица)). Формула для расчета чувствительности такова:

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

TP-истинно положительный результат;

FN-ложноотрицательный результат.

2. Специфичность (Sp) (истинно отрицательный результат) измеряет долю правильно идентифицированных отрицательных результатов (т. е. долю людей, правильно идентифицированных как не имеющие (непораженные) заболеванием). Формула для расчета специфичности выглядит следующим образом.

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

TN – количество истинно отрицательных результатов;

FP – количество ложноположительных результатов.

3. Диагностическая эффективность или точность (Асс) – определяется как вероятность того, что пациент правильно классифицирован, и доля всех тестов, дающих правильный результат.

Формула, используемая для измерения диагностической эффективности, выглядит следующим образом:

$$\text{Асс} = (\text{ТР} + \text{ТН}) / (\text{ТР} + \text{ТН} + \text{ФР} + \text{ФН}), \text{ где}$$

ТР – количество истинно положительных результатов;

ТН – количество истинных отрицательных результатов; где;

ФР – количество ложноположительных результатов;

ФН – количество ложноотрицательных результатов.

4. Прогностическая ценность положительных и отрицательных результатов (PPV и NPV, соответственно) – это доля положительных и отрицательных результатов статистического или диагностического теста, которые являются истинно положительными и истинно отрицательными, соответственно.

Прогностическая ценность положительного результата определяется как частота, с которой он соответствует заболеванию, и, таким образом, вероятность того, что заболевание (синдром, симптом) присутствует при положительном результате теста.

Она измеряется по формуле: $\text{PPV} = \text{ТР} / (\text{ТР} + \text{ФР})$, где

ТР – истинно положительные результаты;

FP – количество ложноположительных результатов.

Прогностическая ценность отрицательного результата определяется как частота, с которой он согласуется с отсутствием заболевания. Этот критерий показывает, насколько вероятно, что пациент здоров, если результат теста отрицательный. Он измеряется по формуле: $NPV = TN / (TN + FN)$, где

TN – количество истинно отрицательных результатов;

FN – ложные отрицательные результаты.

5. Коэффициент правдоподобия – это оценка степени согласованности двух конкурирующих статистических моделей на основе их коэффициентов правдоподобия, в частности, максимизированных по всему пространству параметров и после применения некоторых ограничений.

Отношение правдоподобия положительного результата теста – это отношение вероятности положительного результата теста при наличии заболевания к вероятности положительного результата теста при отсутствии заболевания.

Он измеряется по формуле: $Se / (1 - Sp)$, где.

Sp – специфичность;

Se – чувствительность.

Отношение вероятности отрицательного результата теста – это отношение вероятности отрицательного результата теста при наличии заболевания к вероятности отрицательного результата теста при отсутствии заболевания.

Он измеряется по формуле: $(1-Se)/Sp$, где.

Sp – специфичность;

Se – чувствительность.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

1.1 Анализ литературы по методам исследования дерматомикозов

Грибковые инфекции кожи, волос и ногтей, несомненно, занимают первое место среди всех грибковых инфекций. Дерматофиты – самые древние микроорганизмы, но их таксономическое положение долгое время оставалось неустойчивым. С диагностической точки зрения идентификация видов дерматофитов до сих пор является серьезной проблемой и часто приводит к ошибкам в лечении. Рост числа инфекций, включая зоонозы, отсутствие таксономической стабильности и неясная клиническая картина всех случаев дерматофитии обуславливают необходимость поиска новых видоспецифичных методов идентификации этих грибов.

Методы диагностики дерматофитов.

1. Препарат гидроксида калия – метод, предназначенный для исследования спор на чешуйках и волосках, обработанных 10% раствором КОН.

2. Древесные лампы – ультрафиолетовые лампы – лампы, излучающие только самую длинную ("мягкую") часть ультрафиолетового излучения, используемые для диагностики кожных заболеваний.

3. MALDI-TOF – десорбционный метод "мягкой" ионизации, основанный на воздействии импульсов лазерного излучения на матрицу, содержащую анализируемое вещество.

4. Подвижная фаза – газ (газоноситель), а неподвижная фаза – инертный твердый носитель или твердый сорбент, или жидкость, нанесенная на внутреннюю стенку колонки.

5. Жидкостная хроматография – физико-химический метод, разделяющий вещества на основе распределения компонентов анализируемой смеси между двумя несмешивающимися и взаимно подвижными фазами, где подвижная фаза – жидкость, а неподвижная фаза – инертный твердый носитель или твердый сорбент, или жидкость, нанесенная на внутреннюю стенку колонки.

6. Культуральный анализ – это метод лабораторной диагностики заболеваний, при котором биологический материал пациента помещается в специальную среду для роста микроорганизмов с целью ускоренной идентификации патогенов. Для исследования на дерматофиты используются специализированные среды, такие как среда Сабуро, среда для тестирования дерматофитов (DTM), среда для идентификации дерматофитов (DIM) и хромогенные среды.

7. Микроскопия – это метод исследования объекта с помощью микроскопа. При исследовании дерматофитов используются оптические, фазово – контрастные и флуоресцентные микроскопы.

8. ILFA – иммунохроматографический латеральный проточный анализ.

Последнее десятилетие ознаменовалось прорывом в развитии молекулярно – биологических методов диагностики грибковых инфекций и надежного определения типа этиологии, ответственной за эти дерматомикозы.

1. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – это молекулярно – биологический метод, который позволяет значительно увеличить следовую концентрацию специфических фрагментов нуклеиновых кислот (ДНК или РНК) в биологическом материале (образцах).

2. Метод полимеразной цепной реакции в реальном времени – экспериментальный метод, основанный на методе полимеразной цепной реакции, который не только определяет наличие целевой последовательности нуклеиновой кислоты в образце, но и измеряет ее копийное число.

3. Вложенная ПЦР – вариант двухстадийной ПЦР, используемый для уменьшения количества неспецифических продуктов реакции.

4. Мультиплексная ПЦР – мультиплексная полимеразная цепная реакция (мультиплексная ПЦР) означает одновременную амплификацию нескольких различных последовательностей ДНК с помощью одной полимеразной цепной реакции (как если бы несколько отдельных реакций ПЦР были проведены вместе в одной реакции) (как если бы несколько отдельных реакций ПЦР были проведены вместе в одной реакции).

5. ПЦР-ИФА – гибридный метод, основанный на ПЦР и иммуноферментном анализе (ИФА), в котором вместо анализируемого белка в микрокультуре ИФА используется меченый ампликон нуклеиновой кислоты.

6. ПЦР-ПДФ – гибридный метод, основанный на полиморфизме длины рестрикционных фрагментов с использованием ПЦР плюс ферменты рестрикции.

7. HRM-анализ – относительно новый аналитический метод, позволяющий выявлять новые генетические варианты, скринировать образцы ДНК на наличие однонуклеотидных полиморфизмов, обнаруживать вставки/делеции и другие неизвестные мутации, а также определять процент метилированной ДНК в образце.

8. NALFIA – иммунохроматографический анализ боковых токов нуклеиновых кислот).

9. NALFA – анализ боковых токов нуклеиновых кислот.

10. ПЦР-NALFA – метод гетеротермальной амплификации,

11. RPA-NALFA – анализ бокового тока нуклеиновых кислот, основанный на изотермической амплификации.

Дерматофития животных является важной проблемой общественного здравоохранения и ветеринарии и распространена среди крупного рогатого скота во всем мире. Для определения возбудителя и географического распространения дерматофитов, вызывающих стригущий лишай у крупного рогатого скота, было проведено исследование 6789 голов крупного рогатого скота в Иране. Образцы были взяты у 380 голов крупного рогатого скота с подозрением на дерматофитию, и возбудитель был идентифицирован макроскопически и микроскопически путем исследования КОН и выделения культуры. Только 352 (92%) случая дерматофитии были выявлены у крупного рогатого скота, и *T. verrucosum* был единственным грибом, выделенным от животных.

Используя тот же метод, от различных животных (домашних и сельскохозяйственных) с подозрением на дерматофитию было отобрано в общей сложности 790 проб волос, шерсти и кожи, из которых 248 (31,4%) содержали дерматофиты. Наиболее часто выделяемыми дерматофитами были *M. canis* (38,3%), *T. verrucosum* (31,8%), *T. mentagrophytes* (13,3%) и *M. gypseum* (7,7%). Наиболее распространенными возбудителями были *T. verrucosum* при дерматофитии жвачных животных, *M. equinum* у лошадей, *M. gypseum* у кроликов, *M. gallinae* у кур и *T. mentagrophytes* у домашних белок. Уровень позитивности у кошек был значительно выше, чем у собак (8,2%), а

M. canis был наиболее часто выделяемым видом (87,2% и 50%, соответственно).

Таким образом, поданным литературы, правильный диагноз грибковой инфекции может быть поставлен в 15–45% случаев.

Результаты многих исследований показывают, что прямая идентификация грибов из дерматологических образцов с помощью молекулярных методов гораздо надежнее и намного быстрее, чем не молекулярные методы диагностики.

Однако в настоящее время в лабораторной диагностике ветеринарных дерматофитий в России по – прежнему используется метод "золотого стандарта" для поиска и обнаружения дерматофитов. К методам "золотого стандарта" идентификации дерматофитов относятся микроскопия и исследование культур клеток на питательных средах. Сегодня сельскохозяйственные учреждения и ветеринарные клиники по всей России опираются на Положение о методах лабораторной диагностики дерматофитии животных, утвержденное директором Департамента ветеринарии Министерства сельского хозяйства Российской Федерации 18 марта 2008 года.

Молекулярные методы выявления этиологии дерматофитии непосредственно из дерматологических образцов являются более привлекательными и имеют множество преимуществ, начиная от высокой специфичности и чувствительности и заканчивая меньшими затратами времени.

1.2. Результаты лабораторной диагностики грибов: микроскопия и культивировании на питательных средах, метод ПЦР на основе электрофореза и ПЦР в реальном времени

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

В качестве биологического материала использовали волосы, взятые у пораженных животных. После погружения пораженные волосы были исследованы под микроскопом для обнаружения экзоспор как индикатора возможного присутствия дерматофита *T. verrucosum* и других грибов с экзоспорами.

Микроскопическое исследование зафиксировало наличие большого количества спор, которые были расположены неравномерно и легко отделялись при нажатии на состав.

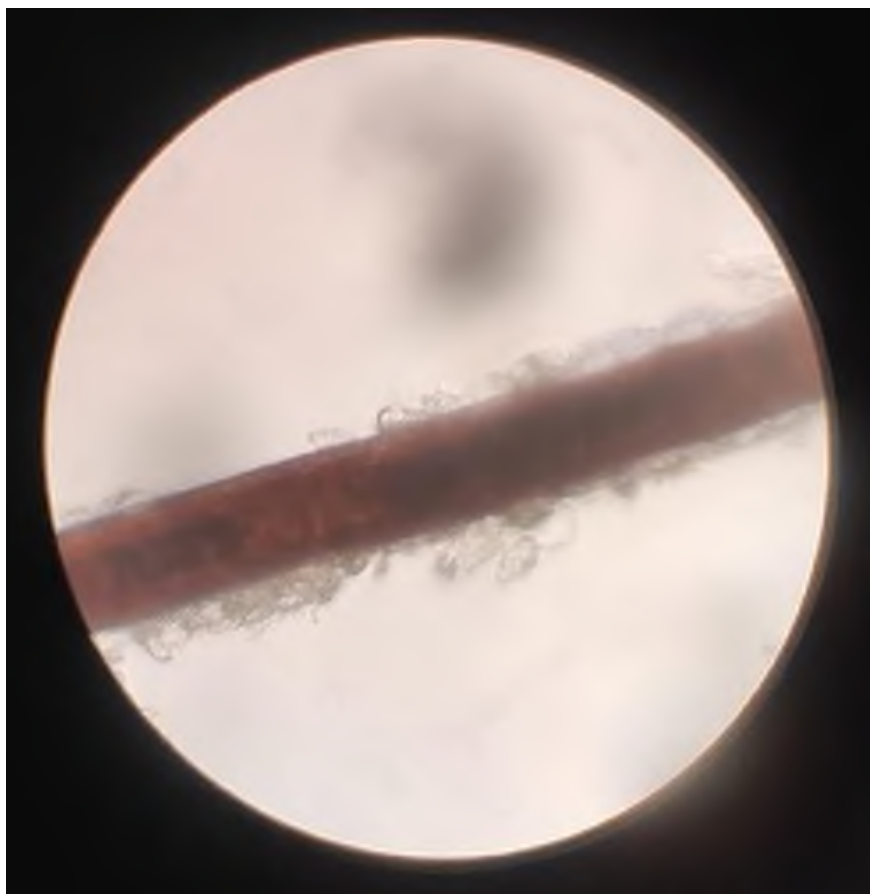


Рисунок 3 – Микроскопическая картина волоса, пораженного грибами рода *Trichophyton*, эктотрикс (увеличение x20).

В результате было исследовано 118 образцов; эктотрихи были обнаружены в 63 (85,1%) из 74 образцов, а 11 (14,9%) были отрицательными, что свидетельствует о том, что морфологические критерии обнаружения надежны для микроскопического исследования патологического материала, в то время как дерматофиты невозможно различить в клинических образцах.

В данном исследовании эктотрикс был обнаружен у *T. verrucosum*, паразитического дерматофита, поскольку такое расположение спор наблюдается у этого вида.

Результаты культивирования на питательной среде.

Корковые образования кожи, чешуи и волос пораженных животных культивировали на питательной среде Сабуро в качестве биологического материала.

После инкубации патогены были идентифицированы на основании морфологических характеристик макрокультур (культур клеток на питательной среде) и микрокультур (микроскопических наблюдений чистых культур клеток).



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

При исследовании культуры были обнаружены мелкие колонии (59) со слегка морщинистым центром и вздернутой вершиной, а иногда плоские колонии (10). Цвет варьировался от белого до желтовато – серого. 22 образца были явно белыми. Пигментация варьировалась от нейтральной (отсутствует) до бледно – желтоватой. Было 47 экземпляров с желтой пигментацией, что превышает число экземпляров с нейтральной пигментацией.



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

Микроскопическое исследование чистых культур выявило разветвленный мицелий с бесцветными, прозрачными разделенными мицеллами. Редко встречались овальные микроконидии и очень редко макроконидии в виде "ниток бус". Из 70 макроскопически идентифицированных образцов 64 образцов были идентифицированы микроскопически.

Всего было исследовано 118 образцов; из 74 исследованных образцов 53 (81%) имели морфологические признаки, характерные для *T. verrucosum*, а 21 (19%) имели морфологические признаки, которые не могли быть идентифицированы как *T. verrucosum*.

Результаты ПЦР в реальном времени.

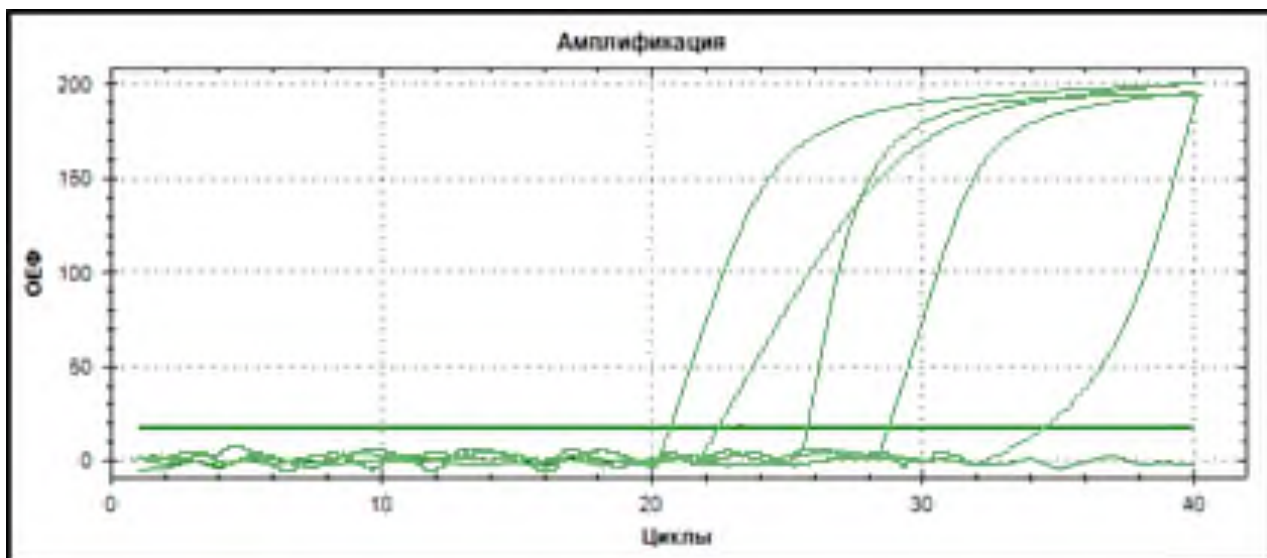
Обнаружение было основано на графиках амплификации участков генов ДНК вида *T. verrucosum*.

Полимеразные цепные реакции проводились с использованием специфических праймеров для выявления *T. mentagrophytes* (TriM130F/TriM311R) и *T. verrucosum* (Ver76F/Ver366R).

ПЦР-тест использовался следующим образом:

1. В качестве положительного контроля использовалась лиофилизированная чистая культура *T. verrucosum*. Для определения эффективности праймера.

2. Лيوфилизированная чистая культура *T. mentagrophytes* была использована в качестве отрицательного контроля. Этот образец был необходим не только в качестве отрицательных контролей, но и для подтверждения специфичности метода ПЦР.



3. Корковые образования в коже и шерсти пораженных животных.

Рисунок 6 – График амплификации участков генов ДНК вида *T. verrucosum*, А – ПК (ДНК *T. verrucosum*), Б – ОК (ДНК *T. mentagrophytes*), 1–4 – ДНК клинических образцов

На графике видно, что праймер Ver76F/Ver366R отжигался на *T. verrucosum* в образце А (положительный контроль). В образце Б видно, что праймеры не отжигались на *T. mentagrophytes*, что указывает на специфичность. В образцах 1–4 праймеры для *T. verrucosum* отжигались с амплифицированным материалом от больных животных, что указывает на присутствие патогена в образцах 1, 2, 3 и 4.

В результате был протестирован 118 образец; дерматофиты *T. verrucosum* были обнаружены методом ПЦР в 72 из 74 образцов (98%) и в двух образцах, где на графике не было видно результата.

1.3 Статистический анализ

В общей сложности было проанализировано 118 образцов.

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 реальном времени в диагностике дерматомикоза.

Метод	Результат	Больные (n=74)	Группа сравнения (n=44)	Se, %	Sp, %	Acc, %
Микроскопия	+	63	5	87,14	88,64	88,44
	–	11	39			
Культуральный метод	+	55	9	74,32	79,55	76,27
	–	19	34			
ПЦР	+	72	1	97,23	97,72	97,46
	–	2	43			

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

Метод	МК	КМ	ПЦР
Чувствительность	3,24	3,11	1,46
Специфичность	3,29	4,03	1,53
Диагностическая эффективность	3,44	4,14	1,47

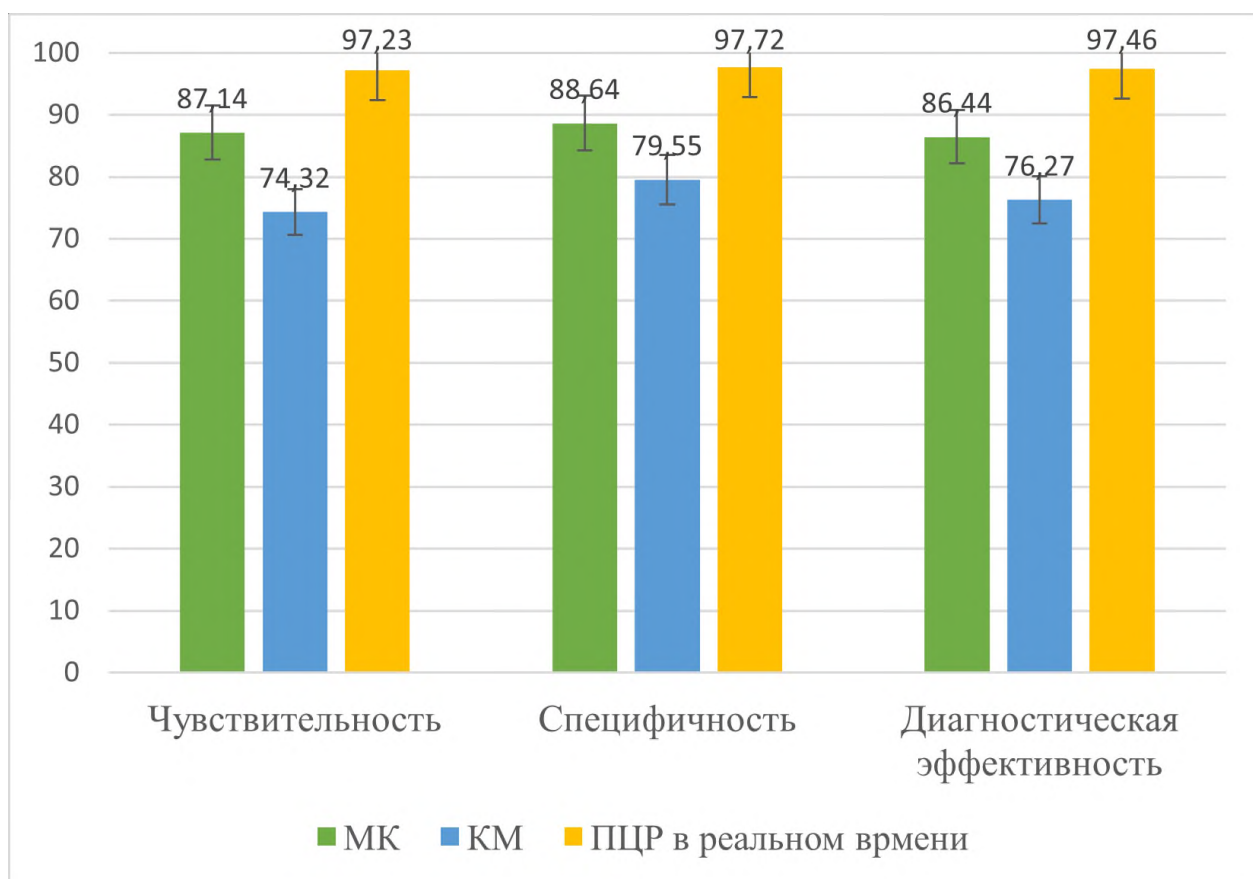


Рисунок 7 – Сравнительная оценка чувствительности, специфичности и диагностической эффективности микроскопии патологического материала (МК), культурального метода (КМ) и ПЦР в реальном времени в диагностике дерматомикоза.

При проведении статистического анализа параметров характеризующие методы лабораторной диагностики было получено, что ПЦР в реальном времени имеет наивысшую чувствительность (97,23%), специфичность (97,72%), диагностическую эффективность (97,46%) по сравнению с регламентированными методами. На втором месте стоит метод микроскопии патологического материала со значениями чувствительности (87,14%), специфичности (88,64%), диагностическую эффективность (87,44%). И самые низкие показатели у культурального метода: чувствительность (74,32%), специфичность (79,55%), диагностическую эффективность (76,27%).

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 в реальном времени превышает по всем трем параметрам другие методы диагностики, рассматриваемые в исследовательской работе примерно на 10–22%.

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

Метод	Результат	Больные (n=74)	Группа сравнения (n=44)	ПЦ+, %	ПЦ–, %
Микроскопия	+	63	5	92,65	78
	–	11	39		
Культуральный метод	+	55	9	85,94	64,15
	–	19	34		
ПЦР	+	72	1	98,63	95,56
	–	2	43		

При проведении статистического анализа параметров предсказательной ценности положительного и отрицательного результатов характеризующие методы лабораторной диагностики было получено, что ПЦР в реальном времени имеет наибольшую предсказательную ценность как положительных (98,63%) так и отрицательных (95,56%) результатов. Культуральный метод и микроскопия патологического материала имеют высокие параметров предсказательной ценности положительных результатов (85,94% и 92,65% соответственно). Однако Культуральный метод и микроскопия патологического материала имеют низкие значения предсказательной

ценности отрицательных результатов (64,15% и 78% соответственно). Все это еще раз подтверждает, что ПЦР имеет высокую специфичность.

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

Метод	Результат	Больные (n=74)	Группа сравнения (n=44)	ОП+	ОП–
Микроскопия	+	63	5	6,52	0,1 4
	–	11	39		
Культуральный метод	+	55	9	3,85	0,2 5
	–	19	34		
ПЦР	+	72	1	42,1 2	0,0 2
	–	2	43		

Результаты всех методов лабораторной диагностики дерматофитозов. Были проанализированы параметром отношения 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

Микоз – одно из самых сложных для лечения заболеваний, и качество лечения во многом зависит от качества лабораторной диагностики.

В нашем исследовании полимеразная цепная реакция оказалась более полезной, чем микроскопия или культура на среде. Кроме того, полимеразная цепная реакция требует значительно меньше времени для получения результатов, чем культура. Микроскопия выполняется быстрее, чем полимеразная цепная реакция, но микроскопия не дает надежных предварительных результатов. Чувствительность полимеразной цепной реакции примерно на 10–17% выше, чем у других методов диагностики. Полимеразная цепная реакция так же обладает самой высокой специфичностью, на 9–18% выше, чем у других методов, проанализированных здесь. Диагностическая достоверность метода полимеразной цепной реакции составляет 97,87%, что является самым высоким значением для этого показателя по сравнению с регламентированными методами. Прогностическая ценность положительного результата полимеразной цепной реакции на 4–9% выше, чем у других методов. Также прогностическая ценность отрицательного метода полимеразной цепной реакции на 16–31% выше, чем у регламентированных методов. Более того, отношение положительной (42,12) полимеразной цепной реакции к отрицательной (0,02) полимеразной цепной реакции значительно выше, чем у культурального метода и микроскопического исследования патологического материала.

Таким образом, молекулярно-генетические методы в лабораторной диагностике стригущего лишая и других поверхностных грибковых инфекций могут существенно дополнить, если не заменить, "золотой стандарт" в идентификации дерматофитов животных и могут быть использованы в ветеринарных клиниках и сельскохозяйственных предприятиях.

ВЫВОДЫ

1. Согласно литературным данным, процент выявления возбудителя дерматомикозов с помощью регламентированных методов лабораторной диагностики составляет 15–45%. Молекулярно-генетические методы выявления дерматофитов имеют много преимуществ. Однако на сегодняшний день в России 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 (72%) подтверждения диагноза трихофития у животных приходится на культуральный метод, что связано со сложностью культивирования *T. verrucosum*. Детекция возбудителя с помощью ПЦР в реальном времени показала положительный результат в 97% 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 реальном времени в диагностике дерматомикозов составили 97,23%, 97,72% и 97,46% соответственно, что превышает значения перечисленных показателей, полученные для микроскопии клинического материала на 10,09%, 9,08% и 11,02% соответственно и значения этих же показателей, рассчитанных для культурального метода на 22,91%, 18,17% и 21,19% 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. Пестерев, М.А. Дерматофитозы морских свинок / Пестерев М.А., Абрамов А.В. // Молодежь и наука. 2017. № 6. С. 44.
5. 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.
6. Полищук, А.Г. MALDI-TOF масс-спектрометрическая идентификация медицински значимых микромицетов / Полищук А.Г. // Проблемы медицинской микологии. 2011; 13(4): 8–11.
7. 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
8. 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.
9. Уфимцева, М.А. Дерматомикозы у детей: учебное пособие для врачей / под ред. М. А. Уфимцевой. – Екатеринбург: УГМУ, 2017. – 116 с.

10. Ханис, А.Ю. Трихофития крупного рогатого скота / Ханис А.Ю., Гафурова А. М. // Успехи медицинской микологии. 2019. Т. 20. С. 699–705.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Яковлев, А.Б. Микроспория. Трихофития. Фавус / Яковлев А.Б. – Москва: Новик, 2013. 135 с.
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. Яковлев, А.Б. Особенности клинико-лабораторной диагностики экссудативных форм микроспории и трихофитии / Яковлев А.Б. // Успехи медицинской микологии. 2013; 11: 157–159.
18. A multicentric clinical and epidemiological study of chronic and recurrent dermatophytosis in India. Shenoy MM, Rengasamy M, Dogra S, Kaur T, Asokan N, Sarveswari KN, Poojary S, Arora D, Patil S, Das A, Srivastava A, Katakam BK, Mahajan V Mycoses. 65(1):13-23, 2022 Jan.

19. 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.
20. 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.
21. 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, Velegraki A, Gräser Y, Summerbell RC. // Br J Dermatol. 2007 Oct;157(4):681–689.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.

27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. Cubells, JR. Fluorescence microscopy as a diagnostic tool for dermatophytosis / Cubells JR, Martínez AM, Leboráns LM. // *Am J Dermatopathol.* 2016;38(3):208–210.
31. 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.
32. De Respinis, 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 Respinis 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.
33. Deep dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum* in immunocompromised patients. Silva L, Sousa J, Toscano C, Viana I *Anais Brasileiros de Dermatologia.* 97(2):223-227, 2022 Mar-Apr
34. El Damaty, H. Species identification, strain differentiation, and antifungal susceptibility of dermatophyte species isolated from clinically infected arabian horses / El Damaty H, Tartor Y, Mahmmoud Y. // *J Equine Vet Sci.* 2017; 59:26–33.

35. 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.
36. Gianni, C. Usefulness of histological examination for the diagnosis of onychomycosis / Gianni C, Cerri A. // Dermatology. 2001;202(4):283–288.
37. 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.
38. Gip, L. A rapid screening method for the detection of pathogenic fungi on the skin / Gip L. // Mycoses. 1981;24(1):17–26.
39. 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.
40. 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.
41. Gupta, LK. Wood's lamp / Gupta LK, Singhi MK. // Indian J Dermatol Venereol Leprol. 2004; 70:131–135.
42. 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.
43. Havlickova, B. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide / Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. // Mycoses. 2008 Sep;51 Suppl 4:2–15.
44. 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.
45. Idriss, MH. The diagnostic value of fungal fluorescence in onychomycosis / Idriss MH, Elston D. // J Cutan Pathol. 2013;40(4):385–390.

46. 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.
47. Khosravi, AR. Dermatophytes isolated from domestic animals in Iran / Khosravi AR, Mahmoudi M. // *Mycoses.* 2003 Jun;46(5–6):222–5.
48. 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.
49. 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.
50. Lakshmipathy, DT. Review on dermatomycosis: pathogenesis and treatment / Lakshmipathy DT, Kannabiran K. // *Nat Sci.* 2010; 2: 726 – 731.
51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. 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.

55. Nenoff, P. Mycology – an update. Part 1: Dermatophytes: causative agents, epidemiology and pathogenesis / Nenoff P, Krüger C, Ginter-Hanselmayer G, Tietz HJ. // J Dtsch Dermatol Ges. 2014; 12: 188 – 210.
56. Nweze, EI. Dermatophytes in northern Africa / Nweze EI, Eke I. // Mycoses 2016; 59: 137 – 144.
57. Petinaud, D. Molecular diagnosis of onychomycosis / Petinaud D, Berger S, Contet-audonneau N. // J Mycol Med. 2014;24(4):287–295.
58. Petinaud, D. Molecular diagnosis of onychomycosis / Petinaud D, Berger S, Contet-audonneau N. // J Mycol Med. 2014;24(4):287–295.
59. Phylogeny, Antifungal Susceptibility, and Point Mutations of SQLE Gene in Major Pathogenic Dermatophytes Isolated From Clinical Dermatophytosis. Pashootan N, Shams-Ghahfarokhi M, Chaichi Nusrati A, Salehi Z, Asmar M, Razzaghi-Abyaneh M Frontiers in Cellular & Infection Microbiology. 12:851769, 2022
60. Quinn, PJ. Clinical veterinary microbiology, section 3: mycology, The dermatophytes / Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, et al.// Wolfe publishing. 1994; 67:381–390.
61. Re-discovery of *Trichophyton bullosum* in North Africa as a cause of severe dermatophytosis in donkeys. Peano A, Arnoldi S, Cmokova A, Hubka V Folia Microbiologica. 67(2):265-275, 2022 Apr.
62. Roberts, GD. Detection of fungi in clinical specimens by phase-contrast microscopy / Roberts GD. // J Clin Microbiol. 1975;2(3):261–265.
63. Routine laboratory test enabling the detection of dermatophytes and the identification of *Trichophyton rubrum* by means of in-house duplex real-time PCR. Pablo T, Mzabi A, Meo M, Decruyenaere F, Perrin M Journal of Microbiological Methods. 185:106229, 2021 06.
64. Salkin, IF. A new medium for the presumptive identification of dermatophytes / Salkin IF, Padhye AA. // J Clin Microbiol. 1997;35(10):2660–2662.

65. 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.
66. 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.
67. 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.
68. Sue, MJ. Application of PCR-ELISA in molecular diagnosis / Sue MJ, Yeap SK, Omar AR, Tan SW.// *Biomed Res Int.* 2014; 2014:653014.
69. 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.
70. 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.
71. 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.
72. Two novel species of *Arthroderma* isolated from domestic cats with dermatophytosis in the United States. Moskaluk A, VandeWoude S *Medical Mycology* 60(2), 2022 Feb 02
73. 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.

74. 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.

75. Wjst, M. Time-of-flight mass spectrometry / Wjst M, Van Den BD. // Methods Mol Biol. 2013; 1015:71–85.

76. 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.

Отчет о проверке на заимствования №1



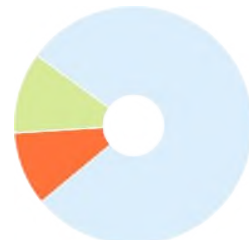
Автор: Кагарманова Алена Олеговна
Проверяющий: Кобзева Наталья Рудольфовна
Организация: Башкирский государственный медицинский университет
Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <http://bashgmu.antiplagiat.ru>

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 11662
Начало загрузки: 23.06.2023 15:25:35
Длительность загрузки: 00:00:07
Имя исходного файла: КагармановаА.О. ВКР.docx
Название документа: КагармановаА.О. ВКР
Размер текста: 95 кБ
Тип документа: Выпускная квалификационная работа
Символов в тексте: 96989
Слов в тексте: 11462
Число предложений: 842

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Начало проверки: 23.06.2023 15:25:43
Длительность проверки: 00:00:40
Корректировка от 23.06.2023 15:28:35
Комментарии: [Автосохраненная версия]
Поиск с учетом редактирования: да
Проверенные разделы: титульный лист с. 1, основная часть с. 2-52, библиография с. 53-59
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, eLIBRARY.RU, СПС ГАРАНТ: аналитика, СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация, Медицина, Диссертации НББ, Коллекция НБУ, Перефразирования по eLIBRARY.RU, Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика*, Перефразирования по Интернету, Перефразирования по Интернету (EN), Перефразирования по коллекции издательства Wiley, Патенты СССР, РФ, СНГ, СМИ России и СНГ, Шаблонные фразы, Кольцо вузов, Издательство Wiley, Переводные заимствования



СОВПАДЕНИЯ	САМОЦИТИРОВАНИЯ	ЦИТИРОВАНИЯ	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ
10,18%	0%	10,71%	79,11%

Совпадения — фрагменты проверяемого текста, полностью или частично сходные с найденными источниками, за исключением фрагментов, которые система отнесла к цитированию или самоцитированию. Показатель «Совпадения» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к совпадениям, в общем объеме текста.

Самоцитирования — фрагменты проверяемого текста, совпадающие или почти совпадающие с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа. Показатель «Самоцитирования» — это доля фрагментов текста, отнесенных к самоцитированию, в общем объеме текста.

Цитирования — фрагменты проверяемого текста, которые не являются авторскими, но которые система отнесла к корректно оформленным. К цитированиям относятся также шаблонные фразы; библиография; фрагменты текста, найденные модулем поиска «СПС Гарант: нормативно-правовая документация». Показатель «Цитирования» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к цитированию, в общем объеме текста.

Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.

Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.

Оригинальный текст — фрагменты проверяемого текста, не обнаруженные ни в одном источнике и не отмеченные ни одним из модулей поиска. Показатель «Оригинальность» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к оригинальному тексту, в общем объеме текста.

«Совпадения», «Цитирования», «Самоцитирования», «Оригинальность» являются отдельными показателями, отображаются в процентах и в сумме дают 100%, что соответствует полному тексту проверяемого документа.

Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые совпадения проверяемого документа с проиндексированными в системе источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности совпадений или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в тексте	Доля в отчете	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Блоков в отчете	Блоков в тексте	Комментарии
[01]	7,64%	7,64%	не указано	29 Сен 2022	Библиография	2	2	
[02]	3,36%	0,74%	Лабораторная диагностика дерматиф... http://studfiles.ru	01 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	8	5	
[03]	3,33%	0%	Диагностика дерматофитозов живот... http://bibliofond.ru	08 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	0	5	
[04]	3,07%	3,07%	Методические указания по лаборато... http://ivo.garant.ru	16 Ноя 2020	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	8	8	
[05]	2,66%	0,66%	Recent advances in the diagnosis of der... https://doi.org	30 Апр 2020	Издательство Wiley	3	14	
[06]	2,26%	0%	Диагноз http://studopedia.org	05 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	0	4	
[07]	2,25%	0%	ДИАГНОСТИКА ТРИХОФИТИИ КРУПН... http://elibrary.ru	30 Авг 2014	Перефразирования по eLIBRARY.RU	0	4	
[08]	1,9%	0,62%	1. Диссертация http://obolensk.org	10 Сен 2017	Интернет Плюс*	11	26	
[09]	1,89%	0,2%	MOLECULAR METHODS FOR DIAGNOST... https://exeley.com	23 Июн 2023	Интернет Плюс*	6	25	
[10]	1,87%	0%	1. Диссертация https://obolensk.org	23 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	25	
[11]	1,84%	0%	https://esu.citis.ru/dissertation/SYA9QX... https://esu.citis.ru	10 Мая 2018	Интернет Плюс*	0	25	

[12]	1,77%	0,47%	Recent advances in the diagnosis of der... https://doi.org	30 Апр 2020	Перефразирования по коллекции издательства Wiley	3	8	
[13]	1,63%	0,22%	https://viev.ru/wordpress/wp-content/... https://viev.ru	25 Авг 2022	Интернет Плюс*	6	15	
[14]	1,57%	0,45%	Альхашаш, Субхи М С Прогнозирована... http://dlib.rsl.ru	27 Июн 2022	Сводная коллекция РГБ	1	7	
[15]	1,5%	0,35%	Major challenges and perspectives in th... https://doi.org	31 Авг 2020	Издательство Wiley	2	10	
[16]	1,48%	0%	КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИ... http://elibrary.ru	15 Фев 2018	Перефразирования по eLIBRARY.RU	0	3	
[17]	1,34%	0,73%	Титова, Татьяна Николаевна Разрабо... http://dlib.rsl.ru	19 Фев 2018	Сводная коллекция РГБ	5	8	
[18]	1,3%	1,3%	ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОВ ПАТОГЕННОСТИ, ... http://elibrary.ru	25 Дек 2013	Перефразирования по eLIBRARY.RU	1	1	
[19]	1,3%	0,01%	Evaluation of multiplex real-time PCR f... https://doi.org	28 Фев 2018	Издательство Wiley	1	8	
[20]	1,28%	0%	Optimising the diagnostic strategy for o... https://doi.org	31 Мая 2016	Издательство Wiley	0	7	
[21]	1,26%	0,12%	Диссертация http://urnidvi.ru	23 Июн 2023	Интернет Плюс*	3	17	
[22]	1,18%	0,28%	Detection and identification of dermato... https://doi.org	31 Янв 2021	Издательство Wiley	1	6	
[23]	1,07%	0,05%	Методические рекомендации по про... http://pandia.ru	28 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	1	1	
[24]	0,98%	0%	Диагностика дерматофитозов живот... http://biofile.ru	24 Июн 2021	Интернет Плюс*	0	23	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[25]	0,81%	0%	ДИАГНОСТИКА ТРИХОФИТИИ КРУПН... http://elibrary.ru	30 Авг 2014	eLIBRARY.RU	0	3	
[26]	0,76%	0%	https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/... https://colibri.udelar.edu.uy	23 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	10	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[27]	0,75%	0%	КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИ... http://elibrary.ru	15 Фев 2018	eLIBRARY.RU	0	3	
[28]	0,74%	0%	A Pilot Study for the Evaluation of PCR a... https://journals.lww.com	23 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	8	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[29]	0,74%	0%	ПРОФИЛАКТИКА И ЛЕЧЕНИЕ ТРИХОФ... http://elibrary.ru	23 Янв 2017	Перефразирования по eLIBRARY.RU	1	2	
[30]	0,73%	0,73%	Боголюбский, Юрий Андреевич Диаг... http://dlib.rsl.ru	22 Окт 2020	Сводная коллекция РГБ	4	4	
[31]	0,7%	0%	не указано	29 Сен 2022	Шаблонные фразы	0	20	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[32]	0,67%	0%	https://www.volgmed.ru/uploads/dsov... https://volgmed.ru	25 Фев 2020	Интернет Плюс*	0	16	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[33]	0,64%	0%	Диссертация на тему «Разработка и о... https://dissercat.com	01 Июн 2022	Интернет Плюс*	0	5	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[34]	0,62%	0%	https://pdfs.semanticscholar.org/22eb/... https://pdfs.semanticscholar.org	24 Июн 2021	Интернет Плюс*	0	8	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[35]	0,61%	0%	Пупкова, Марианна Андреевна диссе... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[36]	0,59%	0%	Методические указания по лаборато... https://standartgost.ru	27 Мар 2023	Интернет Плюс*	0	10	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[37]	0,59%	0%	https://files.stroyinf.ru/Data2/1/429372... https://files.stroyinf.ru	11 Янв 2022	Интернет Плюс*	0	10	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[38]	0,58%	0%	Совершенствование лабораторной д... http://medical-diss.com	28 Мая 2021	Интернет Плюс*	0	10	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[39]	0,58%	0,51%	Скачать в Pdf https://mediasphera.ru	23 Июн 2023	Интернет Плюс*	2	3	
[40]	0,58%	0%	Публикации https://interlabservice.ru	24 Янв 2023	Интернет Плюс*	0	3	
[41]	0,58%	0%	Публикации https://interlabservice.ru	23 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	3	
[42]	0,58%	0%	https://www.dna-technology.ru/files/im... https://dna-technology.ru	30 Ноя 2020	Интернет Плюс*	0	11	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[43]	0,57%	0%	Прогнозирование функциональной с... http://emll.ru	20 Дек 2016	Медицина	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[44]	0,56%	0,06%	Плеханов, Антон Андреевич Определ... http://dlib.rsl.ru	27 Июн 2022	Сводная коллекция РГБ	2	3	
[45]	0,53%	0,53%	ОПЫТ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ДИНАМИ... http://cyberleninka.ru	08 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	1	1	
[46]	0,53%	0%	ОПЫТ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ДИНАМИ... http://elibrary.ru	17 Дек 2016	Перефразирования по eLIBRARY.RU	0	1	

[47]	0,52%	0%	Государственная фармакопея Россий... http://ivo.garant.ru	21 Апр 2020	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[48]	0,5%	0%	ОПЫТ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ДИНАМИ... http://elibrary.ru	17 Дек 2016	eLIBRARY.RU	0	1	
[49]	0,5%	0%	Опыт прогнозирования динамики за... https://cyberleninka.ru	18 Авг 2021	Интернет Плюс*	0	2	
[50]	0,48%	0,48%	Марзанова, Саида Нурбиевна диссерт... http://dlib.rsl.ru	07 Мар 2013	Сводная коллекция РГБ	1	1	
[51]	0,48%	0,25%	021025651254_рус_В050_Несипбаева_...	23 Мая 2023	Кольцо вузов	1	2	
[52]	0,48%	0%	Сравнительная оценка аналитическо... https://mediasphera.ru	23 Янв 2023	Интернет Плюс*	0	1	
[53]	0,48%	0%	Сравнительная оценка аналитическо... https://mediasphera.ru	24 Янв 2023	Интернет Плюс*	0	1	
[54]	0,48%	0,3%	Molecular diagnosis of dermatophyte is... https://doi.org	31 Мар 2022	Издательство Wiley	1	3	
[55]	0,44%	0%	Evaluation of growth conditions and D... https://doi.org	31 Мая 2017	Издательство Wiley	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[56]	0,41%	0%	Оценка психометрических качеств м...	28 Фев 2023	Кольцо вузов	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[57]	0,4%	0%	ДЕРМАТОСКОПИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА В Р... http://elibrary.ru	30 Авг 2013	eLIBRARY.RU	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[58]	0,4%	0%	Кристаллическая структура, магнитн... http://dep.nlb.by	11 Ноя 2016	Диссертации НББ	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[59]	0,38%	0%	Identification of Zoophilic Dermatophyt... https://frontiersin.org	07 Фев 2022	СМИ России и СНГ	0	2	
[60]	0,37%	0%	Диссертация на тему «Особенности д... https://dissercat.com	22 Июн 2022	Интернет Плюс*	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[61]	0,36%	0%	Кубасова, Наталья Леонидовна Особ... http://dlib.rsl.ru	12 Окт 2017	Сводная коллекция РГБ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[62]	0,36%	0%	МР 3.1.0117-17 Лабораторная диагнос... https://files.stroyinf.ru	28 Мая 2021	Интернет Плюс*	0	5	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[63]	0,36%	0%	СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ЛАБОРАТОРН... http://elibrary.ru	28 Янв 2014	ПЕРЕФРАЗИРОВАНИЯ ПО eLIBRARY.RU	0	1	
[64]	0,35%	0%	https://rsmu.ru/fileadmin/templates/D... https://rsmu.ru	23 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[65]	0,35%	0%	Незнахина, Мария Сергеевна диссерт... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[66]	0,34%	0%	Живая сухая вакцина "Триховак-Стим... http://dep.nlb.by	11 Ноя 2016	Диссертации НББ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[67]	0,33%	0%	Human and Zoonotic Dermatophytose... https://ncbi.nlm.nih.gov	23 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[68]	0,32%	0,32%	Лабораторная диагностика гриппа и ... http://elibrary.ru	27 Мая 2019	ПЕРЕФРАЗИРОВАНИЯ ПО eLIBRARY.RU	1	1	
[69]	0,31%	0,31%	В Роспотребнадзоре РБ рассказали о ... http://ufacitynews.ru	16 Авг 2019	СМИ России и СНГ	1	1	
[70]	0,31%	0%	http://www.ksma.ru/cms/files/gribkovy... http://ksma.ru	01 Мар 2022	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[71]	0,31%	0%	Особенности клинико-лабораторной ... http://elibrary.ru	27 Фев 2013	eLIBRARY.RU	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[72]	0,3%	0%	КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ЗООАН... https://science-education.ru	23 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[73]	0,29%	0%	Антонова, Светлана Борисовна Совре... http://dlib.rsl.ru	05 Авг 2019	Сводная коллекция РГБ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[74]	0,29%	0%	Кублинский, Константин Сергеевич ... http://dlib.rsl.ru	25 Окт 2019	Сводная коллекция РГБ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[75]	0,29%	0%	Моделирование биопленки у бактер... http://emil.ru	08 Июл 2017	Медицина	0	1	
[76]	0,29%	0%	Методические рекомендации МР 3.1.... http://ivo.garant.ru	10 Апр 2018	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[77]	0,29%	0%	https://www.amplisens.ru/upload/ibloc... https://amplisens.ru	02 Июн 2022	Интернет Плюс*	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[78]	0,28%	0%	Никифоров, Виктор Сергеевич диссе... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[79]	0,26%	0%	Contents https://doi.org	31 Дек 2007	Издательство Wiley	0	1	
[80]	0,26%	0%	64323 http://e.lanbook.com	09 Мар 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[81]	0,26%	0%	Микологическая диагностика онихо... https://xn--c1adaabpkjuc13c3c.xn--p1ai	23 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[82]	0,25%	0%	Дифференциальная диагностика эпи... http://dep.nlm.by	11 Ноя 2016	Диссертации НББ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[83]	0,25%	0%	Колхир, Павел Владимирович Разраб... http://dlib.rsl.ru	27 Дек 2019	Сводная коллекция РГБ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[84]	0,25%	0%	Разработка эндотипической классиф... http://emll.ru	28 Апр 2017	Медицина	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[85]	0,24%	0,24%	Макарова, Мария Александровна Аф... http://dlib.rsl.ru	05 Апр 2022	Сводная коллекция РГБ	1	1	
[86]	0,24%	0%	Population differentiation, antifungal su... https://ncbi.nlm.nih.gov	15 Ноя 2022	Интернет Плюс*	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[87]	0,24%	0%	Diagnosis of Onychomycosis: From Con... https://frontiersin.org	07 Фев 2022	СМИ России и СНГ	0	1	
[88]	0,24%	0%	Сергеев, Василий Юрьевич диссертаци... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[89]	0,23%	0,23%	Трысова.Е.Г.docx	19 Мая 2023	Кольцо вузов	1	1	
[90]	0,23%	0%	The clinical significance of fungi in atopi... https://doi.org	31 Авг 2020	Издательство Wiley	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[91]	0,23%	0%	970126450039_рус_В050_Кравцова_Ка...	22 Мая 2023	Кольцо вузов	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[92]	0,21%	0%	Зиннатов, Фарит Фатихович диссертаци... http://dlib.rsl.ru	20 Янв 2010	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[93]	0,21%	0%	https://entru.org/files/preview/2020/01... https://entru.org	04 Мая 2023	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[94]	0,21%	0%	https://entru.org/files/preview/2020/01... https://entru.org	30 Мая 2022	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[95]	0,2%	0%	Эффективность вакцинации телят пр... http://dep.nlm.by	06 Дек 2018	Диссертации НББ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[96]	0,19%	0%	БаймухаметовИ.Р.doc	14 Апр 2018	Модуль поиска "БГМУ"	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[97]	0,19%	0%	Прошло заседания межведомственно... https://ufa.bezformata.com	21 Дек 2022	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[98]	0,19%	0%	Коронавирус COVID-19 http://ivo.garant.ru	08 Фев 2020	СПС ГАРАНТ: аналитика	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[99]	0,19%	0%	не указано http://ivo.garant.ru	05 Авг 2022	СПС ГАРАНТ: аналитика	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[100]	0,19%	0%	Менеджмент и Бизнес-Администриро... http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[101]	0,19%	0%	Финансовая жизнь: научно-практиче... http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[102]	0,19%	0%	Магнитно-резонансная томография в... http://emll.ru	08 Июл 2017	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[103]	0,19%	0%	Монтес, Росель Ксения Васильевна Д... http://dlib.rsl.ru	16 Июн 2021	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[104]	0,18%	0%	https://mycology.szgmu.ru/images/files... https://mycology.szgmu.ru	29 Янв 2023	Интернет Плюс*	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[105]	0,18%	0%	Результаты поиска по "уровни забол... https://rucont.ru	17 Ноя 2022	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[106]	0,18%	0%	Прогнозирование преждевременных... http://dep.nlm.by	04 Июл 2017	Диссертации НББ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[107]	0,18%	0%	ОЦЕНКА ПСИХОЛОГИЧЕСКОГО СОСТ... https://e.lanbook.com	22 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[108]	0,18%	0%	T. 2 http://emll.ru	08 Июл 2017	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[109]	0,17%	0%	Структурно-функциональная характе... http://dep.nlb.by	16 Янв 2020	Диссертации НББ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[110]	0,17%	0%	262354 http://e.lanbook.com	10 Мар 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[111]	0,17%	0%	№ 7, июль http://emll.ru	21 Дек 2016	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[112]	0,17%	0%	Лабораторная медицинская техника: ... http://studentlibrary.ru	19 Дек 2016	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[113]	0,16%	0%	Evaluation of the Bruker Biotyper Matri... https://frontiersin.org	03 Apr 2020	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[114]	0,16%	0%	Комплексное лечение острого герпет... http://diss.natlib.uz	07 Окт 2021	Коллекция НБУ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[115]	0,15%	0%	Закономерности внутрисистемной р... http://diss.natlib.uz	28 Окт 2016	Коллекция НБУ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[116]	0,15%	0%	Is Nanotechnology Helping in the Fight ... https://frontiersin.org	10 Ноя 2020	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[117]	0,15%	0%	Припутневич, Татьяна Валерьевна О... http://dlib.rsl.ru	12 Окт 2017	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[118]	0,15%	0%	Назначение и клиническая интерпре... http://studentlibrary.ru	26 Янв 2018	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[119]	0,14%	0%	Государственная фармакопея Россий... http://ivo.garant.ru	28 Мая 2019	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[120]	0,14%	0%	Государственная фармакопея Россий... http://ivo.garant.ru	28 Мая 2019	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[121]	0,14%	0%	Стимуляция биологической активнос... http://dep.nlb.by	16 Янв 2020	Диссертации НББ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[122]	0,14%	0%	104939 http://biblioclub.ru	13 Apr 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[123]	0,14%	0%	Файзулина Рената Ринатовна Диссе... http://dlib.rsl.ru	11 Окт 2018	Модуль поиска "БГМУ"	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[124]	0,14%	0%	https://www.tsenovik.ru/archive/b-p%2... https://tsenovik.ru	31 Окт 2020	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[125]	0,14%	0%	Skin Immunity to Dermatophytes: Fro... https://frontiersin.org	12 Фев 2020	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[126]	0,13%	0%	Modern Tools for Rapid Diagnostics of A... https://frontiersin.org	15 Июл 2020	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[127]	0,13%	0%	Идентификация микроорганизмов ... http://bankpatentov.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[128]	0,13%	0%	Идентификация микроорганизмов. П... http://findpatent.ru	24 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[129]	0,13%	0%	Accelerated immunopathological respo... https://doi.org	31 Мая 2007	Издательство Wiley	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[130]	0,13%	0%	Ростовщикова, Мария Владимировна... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[131]	0,12%	0%	Тезисы III Российского конгресса лаб... http://elibrary.ru	27 Мая 2019	eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[132]	0,12%	0%	Тотолян, Наталья Агафоновна диссер... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[133]	0,12%	0%	Мацакова А.Ц. Диагностика, лечение ...	02 Мая 2023	Кольцо вузов	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[134]	0,12%	0%	Комплексная оценка эффективности ... http://dep.nlb.by	20 Дек 2016	Диссертации НББ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[135]	0,12%	0%	Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 5... http://ivo.garant.ru	15 Сен 2012	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[136]	0,11%	0%	Диагностика инфекций урогенитальн... http://dep.nlb.by	11 Ноя 2016	Диссертации НББ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[137]	0,11%	0%	Rapid identification of tissue micro-orga... http://elibrary.ru	24 Авг 2001	eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[138]	0,1%	0%	https://kpfu.ru/staff_files/F1634184337/... https://kpfu.ru	03 Авг 2022	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[139]	0,1%	0%	№ 4 http://emll.ru	21 Дек 2016	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[140]	0,09%	0%	Щербачова, Виктория Артуровна Ана... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2018	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[141]	0,09%	0%	Human molecular biology http://emll.ru	08 Июл 2017	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[142]	0,06%	0%	bactec system compared: Topics by Scie... https://science.gov	27 Дек 2021	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.