

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Медико-профилактический факультет с отделением микробиологии  
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии**

**Кинзябаева Гульназ Ильсуровна**

Применение метода полимеразной цепной реакции в  
лабораторной диагностике зооантропонозной трихофитии,  
вызванной *Trichophyton verrucosum*

Руководитель:

доцент, к.б.н.

Р.А. Фатхутдинова

Уфа – 2016

# ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений.....	3
Введение.....	4
Глава 1. Обзор литературы.....	7
1.1 Анатомическое строение здорового волоса.....	7
1.2 Фазы жизненного цикла волос.....	9
1.3 Дерматомикозы.....	11
1.4 Микроспория.....	10
1.5 Лабораторные исследования.....	13
1.6 Специальные исследования.....	14
1.7 Трихофития.....	14
1.8 Клиническая картина.....	15
1.9 Патогенез.....	16
1.10 Диагностика.....	17
1.10.1 КОН микроскопия.....	17
1.10.2 Выделение возбудителя в культуре.....	18
1.10.3 ПЦР.....	19
1.10.4 Электрофоретический метод детекции в агарозном геле...22	
1.11 Лечение.....	24
1.12 Противоэпидемические мероприятия.....	28
Глава 2. Материалы и методы.....	31
2.1 Объект исследования.....	31
2.2 КОН микроскопия.....	31
2.3 Культуральное исследование.....	32
2.4 Выделение ДНК.....	33
2.5 Постановка ПЦР.....	34
2.6 Электрофоретический метод детекции в агарозном геле.....	35
2.7 Статистическая обработка полученных результатов.....	39
Глава 3. Результаты исследования и их обсуждения.....	40
Заключение.....	48

Выводы.....	49
Список литературы.....	50
Приложение.....	55

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ЩФ – щелочная фосфатаза

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК – рибонуклеиновая кислота

рРНК – рибосомная рибонуклеиновая кислота

ТБЕ – трис-боратный буфер

УФ – ультрафиолет

# ВВЕДЕНИЕ

## Актуальность проблемы

На сегодняшний день в Республике Башкортостан наметилась тенденция к стабилизации показателей заболевания трихофитией, однако заболеваемость остается выше средних показателей по России. Основными возбудителями трихофитии в РБ являются зоофильные дерматофиты. По данным клинической лаборатории РКВД г. Уфа в этиологической структуре трихофитии преобладает *Trichophyton verrucosum*.

Большая роль в выявлении и идентификации вида патогенных грибов отводится лабораторным методам диагностики возбудителя. В настоящее время наиболее широко используется микроскопия неокрашенных препаратов с предварительной обработкой патологического материала раствором едкого калия (КОН-тест). При исследовании обнаруживаются нити мицелия и споры гриба, диаметром 4 – 6 мкм, которые располагаются внутри волоса продольными цепочками, полностью его заполняя. Микроскопия обычно не позволяет идентифицировать грибы до вида по их морфологии.

При проведении культурального исследования используют посев на среду Сабуро. Колонии являются медленнорастущими и формируются к концу первого месяца после посева. Культура похожа на диск с приподнимающимся, морщинистым центром серовато-желтоватого цвета и беловой зоной по периферии. Недостатком культурального метода являются большие временные затраты.

Вследствие с выше изложенным, метод ПЦР обладает более высокой чувствительностью и специфичностью, поэтому даже минимальные количества возбудителя могут быть обнаружены в клиническом материале.

Целью исследования является оценка эффективности использования метода полимеразной цепной реакции, по сравнению с микроскопическим и культуральным методами в лабораторной диагностике зооантропонозной

трихофитии на эпидемиологически обоснованных адекватных группах сравнения.

Задачи исследования:

1. Сбор клинического материала от пациентов с подозрением на трихофитию.
2. Исследование пораженных волос традиционными методами (микроскопия и культуральный метод).
3. Выделение ДНК из клинического материала.
4. Проведение ПЦР – анализа.

Материалы и методы исследования:

- Объект исследования – пациенты с подозрением на трихофитию.
- Клинический материал – волосы и чешуйки кожи.
- КОН- микроскопия.
- Посев материала на среду Сабуро.
- ПЦР.

Новизна исследования: Разработка метода экспресс-диагностики зооантропонозной трихофитии для надежной, высокоспецифичной и высокочувствительной детекции *T. verrucosum*.

Этапы исследования: 2014-2015 гг. – изучение и анализ литературы по теме курсовой и дипломной работы; сбор клинического материала, выделение ДНК грибов и проведение ПЦР.

2015-2016 гг. – обработка полученных данных, оформление и защита дипломной работы.

# ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Грибковые заболевания относятся к инфекционным болезням и составляют значительную их часть. Среди них встречаются острые и хронические (по течению), поверхностные и глубокие (по глубине поражения кожи и слизистых), локализованных и распространенных форм.

Имеется около 500 видов грибов, патогенных для человека. К этой группе относится большинство дерматофитов – возбудителей грибковых заболеваний. Они поражают главным образом кожу и ее придатки – волосы, ногти, в редких случаях другие органы и ткани. Местом их обитания является больной человек и патологический материал, выделяемый им. [Адаскевич В.П., 2006]

## **1.1 Анатомическое строение здорового волоса.**

Стержня - это часть волоса, выступающая над поверхностью кожи и корня - внутренней части, расположенной под кожи, заканчивающаяся волосяной луковицей. Корень волоса вместе с луковицей заключена в оболочку - фолликулу. Фолликул волоса снабжен пучком гладких мышц, обеспечивающая пилomotorную реакцию.

Волосяной фолликул представляет собой вместилище для корня волоса, который называют луковицей. Луковица представляет собой небольшое утолщение состоящее из клеток, которые усиленно делятся и образуют волос.

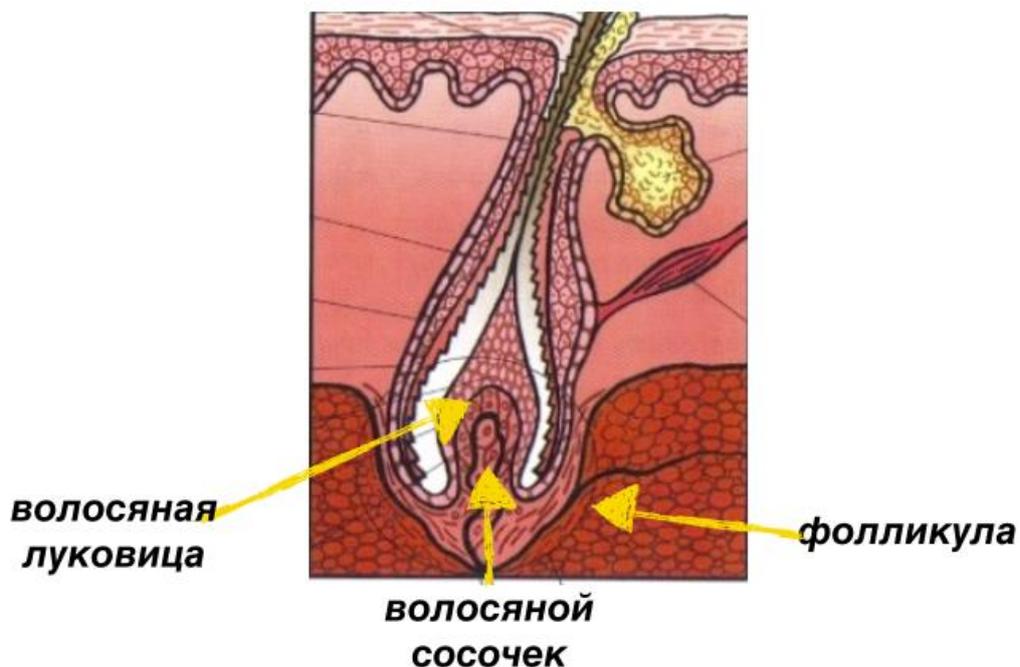


Рисунок 1 Волосяной фолликул.

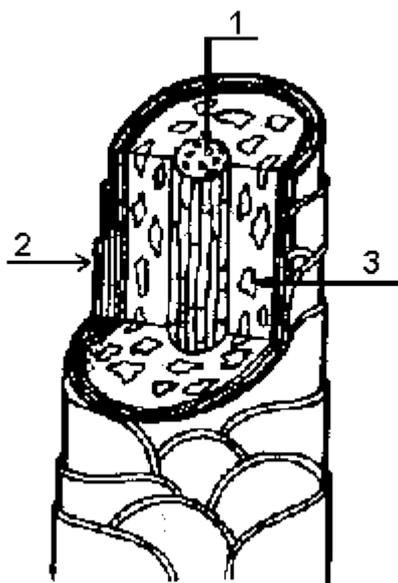


Рисунок 2 Стержень волоса.

1- мозговое вещество; 2 - кожа; 3 - корковое вещество

Стержень терминального волоса состоит:

- снаружи из толстого коркового слоя;
- внутри из слабо выраженной сердцевины (мозговой слой, расположенный внутри, составляет основу).

В основном волос состоит из рогового белкового вещества кератина, богатого серой и азотом. Стержень волоса всегда располагается под

разными углами над кожей, до 90 градусов. Маленький угол роста не позволяет сделать желаемую прическу, так как волосы из-за этого очень трудно уложить в другую сторону. Кроме того, при слишком маленьком угле роста волосы могут врастать в кожу головы и вызывать воспаление.

Снаружи волос покрывает кутикула - тонкий слой из роговых чешуек, которые покрывают корковый слой в виде черепицы. Пушковые волосы практически не содержат мозгового слоя.

Кутикула состоит из 6-9 слоев клеток и по структуре напоминает черепицу или чешуйки сосновой шишки, причем направлены эти чешуйки от корня волоса к концу. При воздействии на волос щелочной среды (обычное мыло) чешуйки раскрываются, при воздействии кислот - закрываются.

Как правило, при поражении волос извне первой страдает как раз кутикула. С другой стороны волосы являются одними из самых устойчивых к действию внешних факторов структур, уступая в этом только зубам.

Мозговое вещество (сердцевина) состоит из клеток, которые еще не до конца кератинизировались (ороговели).

Корковый слой состоит из ороговевших клеток и составляет около 90% от общей массы волоса. От этого слоя зависит прочность волоса. В клетках этого слоя находятся пигменты, придающие волосам цвет.

## **1.2 Фазы жизненного цикла волос.**

Фазы роста волос – это этапы жизненного цикла, которые проходит каждый волос с рождения до естественного выпадения.

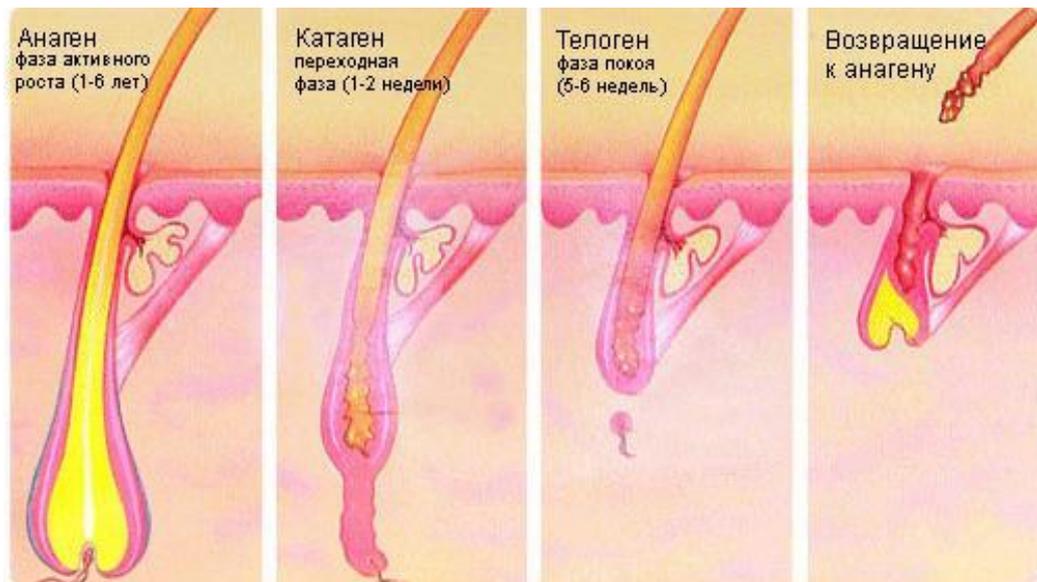


Рисунок 3 Фазы жизненного цикла волос.

Существует три фазы жизни волос:

Анаген (фаза роста) - период формирования нового волоса, а именно новой волосяной луковицы - корня будущего волоса. Это самая длинная фаза роста волос, она длится 1-6 лет. В течение всего этого периода происходит интенсивный рост волоса и клетки волосяного фолликула при этом интенсивно делятся.

Катаген (промежуточная фаза) - называют периодом покоя волоса, это конец роста волоса. Некоторые процессы могут еще продолжаться, но фактически волос уже не растет. Это самая короткая фаза роста волос, она длится 1-2 недели. Рост волоса в фолликуле прекращается, пигмент не образуется, фолликул сокращается, а его основание перемещается по направлению к поверхности кожи.

Телоген (отдых или фаза выпадения) - во время которой волос может выпасть или быть удален легким усилием. Телоген продолжается в среднем 2 месяца. Волос выпадает в тот момент, когда под ним начинается рост нового волоса.

### 1.3 Дерматомикозы

Дерматомикозы (син. дерматофитии) – обусловленных дерматофитами родов *Microsporum*, *Trichophyton*, *Epidermophyton*, паразитирующих на человеке и животных. [Соколовский Е.В., 2008]

### 1.4 Микроспория

Микроспория – инфекционное заболевание кожи и волос (редко ногтей), обусловленное различными видами грибов рода *Microsporum* (*M. canis*, *M. ferrugineum*, *M. audouinii*, *M. gypseum*).

Заболеваемость микроспорией занимает 2-е место среди дерматомикозов в мире и в России. На протяжении последних 30 лет в России основным возбудителем является зоофильный грибок *M. canis* (до 99%); антропофильный грибок *M. ferrugineum* регистрируется не более чем в 1% случаев. В других странах *M. canis* регистрируется в 23,5% (Польша) – 97% (Греция) случаев. *M. audouinii* в России не встречается. Другие виды микроспорумов эпидемиологического значения не имеют. *M. canis* паразитирует на коже животных, чаще кошек или собак. Заражение происходит в основном при контакте с больным животным или через предметы, инфицированные их шерстью. Заражение от человека возможно не более чем в 3–4% случаев. Инкубационный период при микроспории, вызванной *M. canis*, 5–7 дней, при микроспории, вызванной *M. ferrugineum*, 4–6 нед. Зооантропонозной микроспорией болеют преимущественно дети (80–90%), чаще старшего и младшего школьного, реже раннего возраста, новорожденные; заболевание встречается у взрослых и пожилых людей. Для заболевания характерна сезонность.

- Необходимо выявить предположительно источник инфекции (животное, человек, почва).
- Выяснить, болен ли кто-либо в семье или в коллективе.
- Необходимо установить время, прошедшее после контакта с предполагаемым источником инфекции. Следует выяснить время появления первых высыпаний и жалоб на наличие очагов

на гладкой коже, очагов выпадения волос на голове и участках кожи, покрытых щетинистыми волосами. Необходимо обращать внимание на наличие следующих высыпаний.

- При поражении волосистой части головы, вызванном *M. canis*, 1 или 2 крупных очага диаметром от 3 до 5 см и несколько мелких от 0,3 до 1 см, с четкими границами, наслоением серовато-белых чешуек, волосы все обломаны и выступают над уровнем кожи на 4–5 мм.
- Очаги с острыми воспалительными явлениями: инфильтрацией, гиперемией, отделением гноя, наслоением корок желтого цвета, увеличением регионарных лимфатических узлов.

Атипичные проявления на голове:

- Мелкие очаги без воспаления, с незначительным мелкопластинчатым шелушением.
- Очаги в краевых зонах головы, сходные с микроспорией, вызванной *M. ferrugineum*.
- При поражении ресничного края век: гиперемия и шелушение кожи по краю век, ресницы обломаны.
- При поражении гладкой кожи: очаги округлых или овальных очертаний, диаметром от 1 до 2 см, с возвышающимся валиком по периферии, покрытые пузырьками и тонкими корочками, с шелушением в центре, единичные или множественные, склонные к слиянию. У 80–85% больных в процесс вовлекаются пушковые волосы.

При микроспории, вызванной антропофильным грибом *M. ferrugineum*, необходимо обращать внимание на следующие высыпания:

- на голове очаги мелкие, множественные, неправильных очертаний, склонные к слиянию, с гиперемией, незначительным шелушением, располагаются в краевых зонах с переходом на

прилежащие участки гладкой кожи, границы нечеткие, волосы обломаны на уровне 6–8 мм и выше, но не все;

- на коже туловища и конечностей очаги округлых, реже овальных очертаний, с четкими границами, незначительной гиперемией, более выраженной по краю, чаще очаги представляют собой кольца, как бы вписанные одно в другое.

При микроспории, вызванной геофильным грибом *M. gypseum*, следует обращать внимание на следующие высыпания:

- на гладкой коже очаги располагаются на открытых участках (кисть, предплечье); по клиническим проявлениям аналогичны очагам при микроспории, вызванной *M. canis*;
- на голове очаги, аналогичные очагам при микроспории, вызванной *M. canis*.

#### **1.4 Лабораторные исследования**

Микроскопическое исследование на грибы следует проводить при первом обращении для установления диагноза, затем дважды в первые 10 дней лечения в связи с возможным развитием поражения участков кожи, покрытой длинными и щетинистыми волосами; через 14 дней от начала лечения системными антимикотиками с периодичностью 4 дня до получения первого отрицательного анализа, 3 раза через каждые 3–4 дня при единичных очагах на гладкой коже без поражения пушковых волос или 5–7 дней при поражении длинных, щетинистых и пушковых волос после первого отрицательного результата.

Культуральное исследование для установления вида возбудителя и адекватного проведения противоэпидемических мероприятий.

Клинический анализ крови и мочи, биохимическое исследование функции печени (кровь на билирубин, АСТ, АЛТ, щелочную фосфатазу) следует проводить до лечения и после окончания лечения системным антибиотиком или антимикотиком.

## 1.6 Специальные исследования

Осмотр под люминесцентной лампой (Вуда) для подтверждения диагноза и далее в процессе лечения одновременно с микроскопическим исследованием. Волосы, пораженные *M. canis*, дают бледно-зеленоватое свечение, а антропофильным возбудителем – ярко-зеленое (изумрудное) свечение.

Измерение массы тела для расчета дозы системного антимикотика.  
[Кубанова А.А., 2010]

## 1.7 Трихофития

Трихофития – контагиозное заболевание человека и животных, которое вызывается различными видами грибов рода *Trichophyton* и поражает кожу, волосы и ногти. По частоте этот микоз занимает второе место после микроспории. Возбудители трихофитии подразделяются на группы в зависимости от типа поражения волос. Выделяют две основные группы: *endothrix* (эндотрикс) – грибы, поражающие внутреннюю часть волоса, и *ectothrix* (эктотрикс) – вегетирующие преимущественно в наружных слоях волоса. Все трихофитоны эндотриксы – антропофилы, передающиеся только от человека к человеку и вызывающие поверхностные поражения кожи. Эктотриксы – зооантропофилы, паразитирующие преимущественно на животных, но способные поражать также и человека. По сравнению с грибами группы эндотрикс, они вызывают у человека более выраженную воспалительную реакцию кожи с нагноением.

По клиническим проявлениям трихофитию принято разделять на три формы: поверхностную, хроническую и инфильтративно-нагноительную.

Поверхностная форма трихофитии чаще вызывается *Trichophyton violaceum* и *Trichophyton tonsurans*. В большинстве случаев поражение

происходит в дошкольном и школьном возрасте в результате прямого контакта с больными детьми в детских учреждениях, а также в семье от взрослых, страдающих хронической формой трихофитии. Передача заболевания может осуществляться и косвенно – через предметы и вещи, бывшие в соприкосновении с больными. Различают поверхностную трихофитию волосистой части головы и гладкой кожи.

### **1.8 Клиническая картина.**

При поражении волосистой части головы первым, заметным для окружающих признаком являются очаги прорежения волос в результате их обламывания. Очаги круглой или овальной формы, один из них более крупный (материнский очаг). В пределах очагов волосы обламывается низко (2-3 мм), на разных уровнях, но не все. Пораженные волосы изменяют цвет (серые, тусклые). В очагах обнаруживают длинные, внешне не измененные волосы. В устьях некоторых волосяных фолликулов видны низко обломанные волосы темно- серого цвета (так называемые «пеньки», или «черные точки»). Чаще они локализируются в височной и затылочной областях. Границы очагов нечеткие. Поверхность очага покрыта рыхлыми отрубевидными чешуйками, которые скрывают гиперемиию кожи. Субъективные ощущения обычно отсутствуют или наблюдается легкий зуд. Без лечения очаги постепенно увеличиваются в размерах и могут занять обширные участки.

При поверхностной трихофитии гладкой кожи обнаруживают эритематосквамозные очаги, локализующиеся чаще всего на открытых участках кожного покрова.

Ногтевые пластинки при поверхностной трихофитии поражаются редко.

Без лечения трихофития у некоторых детей может продолжаться годами. Заболевание, как правило, спонтанно излечивается лишь при наступлении полового созревания. У части больных, по преимуществу

женщин, не излеченная трихофития проявляется уже иначе, переходя в хроническую форму. В ее патогенезе существенную роль играют нарушения вегетативной и нервной систем, эндокринные расстройства. При хронической трихофитии на волосистой коже головы, чаще в затылочной и височных областях, можно обнаружить единичные обломанные в устьях волосяных фолликулов волосы в виде черных точек («черноточечная» трихофития), мелкие круглые атрофические рубчики (диаметром 1-2 мм) и незначительное мелкопластинчатое шелушение. Эти скудные, с трудом выявляемые изменения субъективно не беспокоят.

На гладкой коже очаги поражения обычно располагаются на местах, подвергающихся трению (на разгибательных поверхностях локтевых и коленных суставов, на ягодицах, голених, реже на туловище), где определяются нечетко отграниченные эритематосквамозные очаги со слабо выраженной эритемой и мелкопластинчатым шелушением.

Одновременно можно обнаружить третий характерный признак хронической трихофитии – поражение ногтей пластинок кистей и стоп (онихомикоз). Хроническая форма трихофитии часто имеет ограниченные клинические проявления, которые трудно выявляются. Поэтому заболевание длится долгие годы, 69 редко диагностируется и играет большую роль в распространении инфекции, прежде всего среди детей. [Соколовский Е.В., 2008]

### **1.9 Патогенез**

В патогенезе трихофитии большую роль играют разные повреждения рогового слоя кожи, повышенная влажность и температура окружающей среды способствуют проникновению и развитию гриба. Проникнув в роговой слой кожи, грибок распространяется лучеобразными нитями мицелия. Степень воспалительной реакции кожи определяется как видом трихофитона, так и состоянием организма. Изредка наблюдается гранулематозный характер реакции на проникновение гриба. При

поражении волосистой части головы или участка бороды, усов и ногтей трихофитон проникают сначала в кожу, а затем распространяются на волосы и ногтевую пластину. Установлена возможность распространения гриба гематогенным путем. При этом развивается генерализованная трихофития с поражением всего кожного покрова (эритродермия) ногтей, слизистых оболочек, лимфатических узлов с образованием резин и холодных абсцессов.

У большинства детей, больных поверхностная трихофития волосистой части головы, до периода полового созревания происходит самолечение в результате гормональной перестройки организма, изменения секрета сальных, потовых желез. При хронической трихофитии гладкой кожи наблюдается: разрыхление рогового слоя, расширение устьев волосяных луковиц, воспалительные изменения в эпителиальных ножках, уплотнения и утолщение соединительнотканых сумок, отсутствие сальных желез. [Потоцкий И.И., 1985]

## **1.10 Диагностика**

Диагностика складывается из оценки клинической картины, обязательного проведения микологического исследования, включающее в себя микроскопию кожных чешуек и волос из очага поражения и посев на соответствующие питательные среды. Однако их диагностическая эффективность оценивается неоднозначно. В связи с этим перспективным является внедрение в практику метода полимеразной цепной реакции, характеризующейся исключительно высокой чувствительностью и специфичностью.

### **1.10.1 КОН микроскопия**

Микроскопия клинического материала – является методом предварительной диагностики заболевания. При микроскопии нативных препаратов грибок в пораженном волосе встречается в виде спор и мицелия.

Размеры и расположение спор является важным моментом в дифференциации различных видов гриба.

По отношению к волосу трихофитоны подразделяют на 3 группы:

*endothrix* (обычно антропофильные трихофитоны, вызывающие поверхностную трихофитию) - крупные круглые споры располагаются только внутри волоса, напоминая пробирку, заполненную горохом;

*ectothrix* (обычно зоофильные трихофитоны, вызывающие глубокую трихофитию) - крупные или мелкие споры несколькими слоями окружающие волос и его основание, создавая чехол;

*neoendothrix*, когда гриб располагается и внутри волоса, и снаружи.

Наряду со спорами, в пораженном волосе встречаются цепочки из округлых спор, изредка – нити мицелия.

### **1.10.2 Выделение возбудителя в культуре**

Получение культуры гриба из клинического материала часто является надежным подтверждением диагноза, а иногда и основанием для него. По внешнему виду колоний на чашках Петри можно составить представление о роде возбудителя (*Trichophyton*), его виде (*T. verrucosum*).

При проведении культурального исследования в России наиболее часто используют посев на среду Сабуро. За рубежом, наряду с последним, применяют микобиотик (Микосел) агар, содержащий хлорамфеникол и циклогексимид, подавляющие рост бактериальной микробиоты. Культуры обычно инкубируются при 25-30 °С в течение 4-5 недель. Культура представляется в виде диска с возвышающимся центром серовато-желтого цвета и порошковатой беловатой периферической зоной. [Медведева Т. В., 2007].

Даже при соблюдении всех правил сбора материала, при наличии оборудования и высоком профессионализме сотрудников лаборатории число выявляемых положительных результатов культурального исследования весьма невелико. Культуральный метод - это специфический

диагностический тест, который требует большое количество времени, прежде чем результат будет получен. Однако при этом, по данным зарубежной литературы, доля положительного культурального исследования едва достигает 50%, в отечественных исследованиях возбудитель не удается выделить и в 64% случаев. Это обусловлено техническими погрешностями (нарушение правил забора материала, его транспортировки и т.д.)

Среда Сабуро – основная, наиболее простая и самая распространенная среда, применяемая для получения первичной культуры большинства патогенных грибов.

### **1.10.3 ПЦР**

Принцип метода полимеразной цепной реакции (Polymerase Chain Reaction, PCR) был разработан Кэри Мюллисом в 1983 г., удостоенным за это Нобелевской премии в области химии в 1993 г. Патент на реакции был продан в 1992 г. Cetus Corporation за 300 млн долларов Roche Diagnostics Systems Inc.

#### **Принцип**

В основе метода полимеразной цепной реакции лежит многоступенчатый циклический процесс репликации ДНК, включающий ряд последовательных стадий (этапов), составляющих трехступенчатый цикл амплификации ДНК: денатурацию (расплетение двойной спирали и расхождение нитей ДНК), отжиг праймеров и полимеризацию (элонгацию) цепей ДНК, протекающих при различных температурных режимах. Переход от одной стадии реакции к другой достигается изменением температуры в инкубируемой смеси. Данный метод обеспечивает многократное увеличение числа копий (амплификация) специфического участка ДНК, катализируемое ферментом ДНК-полимеразой в условиях *in vitro*. Данный процесс происходит в пробирке в циклическом режиме контролируемого молекулярного копирования участков нуклеиновых

кислот. Каждый цикл амплификации состоит из 3 этапов, протекающих при различных температурных и временных режимах. Вначале при нагревании амплификационной смеси до 93-95°C происходит термическая денатурация ДНК, в результате которой двухнитевые сегменты ДНК разделяются на отдельные цепи.

Следующий этап - комплементарное присоединение (отжиг, гибридизация) праймеров к комплементарным последовательностям на противоположных цепях ДНК, на границах специфического участка (мишени).

Отжиг протекает в соответствии с правилом комплементарности Чаргаффа, означающим, что в двухцепочечной молекуле ДНК напротив аденина всегда находится тимин, а напротив гуанина - цитозин. Если данное условие не соблюдено, то отжига праймеров не происходит. Для каждой пары праймеров существует своя температура отжига, значения которой располагаются в интервале 37-65 °С.

Третий этап (элонгация) - комплементарное достраивание цепей ДНК, которое происходит от 5'-конца к 3'-концу цепи в противоположных направлениях, начиная с участков присоединения праймеров. Материалом для синтеза новых цепей ДНК служат добавляемые в раствор дезоксирибонуклеозидтрифосфаты. Процесс синтеза катализируется ферментом ДНК – полимеразой и проходит при температуре 70 – 72 °С. Образовавшиеся в первом цикле амплификации новые цепи ДНК служат матрицами для второго цикла амплификации, в котором происходит образование специфического фрагмента ДНК – ампликона, размер которого ограничен праймерами. В последующих циклах амплификации ампликоны служат матрицей для синтеза новых цепей. Таким образом, в результате постановки полимеразной цепной реакции происходит экспоненциальное (в геометрической прогрессии) накопление специфических ампликонов в растворе по формуле  $A = M \cdot (2^n - 1) \sim 2^n$ , где А – количество специфических (ограниченных праймерами) продуктов

реакции амплификации;  $M$  – начальное количество ДНК – мишеней, а  $n$  – число циклов амплификации. Теоретически, в результате 20 циклов образуется миллион копий, в результате 30 циклов – 1 миллиард копий. Следует отметить, что во время первого цикла удлинение новой цепочки от праймера заканчивается произвольно. Однако со второго цикла в смеси начинают накапливаться специфические продукты амплификации – ампликоны, которые ограничены по длине двумя праймерами. На самом деле эффективность каждого цикла может быть менее 100% (до 78-97%), поэтому в действительности  $P \sim (1 + E)^n$ , где  $P$  - количество специфических ампликонов,  $E$  - средняя эффективность цикла. Рост в геометрической прогрессии ограничен количеством реагентов, присутствием ингибиторов, образованием побочных продуктов амплификации. На последних циклах реакции рост замедляется, это называют «эффектом плато». В зависимости от условий и количества циклов реакции амплификации, на момент достижения «эффекта плато» влияют: утилизация субстратов (дНТФ и праймеров); стабильность реагентов (дНТФ и фермента); количество ингибиторов, включая пирофосфаты и ДНК-дуплексы; неспецифические продукты или праймердимеры, конкурирующие за праймеры, дНТФ и полимеразу; концентрация специфического продукта и неполная денатурация при высокой концентрации продуктов амплификации. Чем меньше начальная концентрация ДНК-мишени, тем выше риск выхода реакции на плато. Этот момент может наступить до того, как количество специфических продуктов амплификации будет достаточно, чтобы их можно было проанализировать. Избежать этого позволяют оптимизация условий протекания реакции амплификации. Описанный выше механизм стандартной полимеразной цепной реакции, разработанной Мюллисом, как правило, дает хорошие результаты при амплификации коротких нуклеотидных последовательностей (не более 3 т.н.н.). [Меньшиков В.В., 2009]

#### **1.10.4 Электрофоретический метод детекции в агарозном (полиакриламидном) геле.**

Электрофорез – метод разделения заряженных молекул в пористом геле в зависимости от их размера под действием электрического поля. В основе электрофореза лежат два физических явления: ДНК (фрагмент амплификации – ампликон) имеет отрицательный заряд, следовательно, в электрическом поле движется от «-» к «+», размер молекулы ДНК определяет ее подвижность в агарозном геле.

Различают следующие типы электрофоретического разделения ДНК:

1. Горизонтальный электрофорез в агарозном геле, предел детекции 20 нг ДНК, разрешение – 100 п.н. (генотипирующий – 25 – 50 п.н.).

2. Ветрикальный электрофорез в полиакриламидном геле, разрешение – 10 пн, предел детекции – 1 нг при окраске серебром, который проводится в специальной камере. Электрофорез в полиакриламидном геле, позволяет различать молекулы ДНК и по сравнению с агарозным электрофорезом имеет большую разрешающую способность. Полиакриламидный гель в приготовление сложнее агарозного. Акриламид – токсичное вещество. В лабораторной практике данный метод практически не используется.

3. Капиллярный электрофорез – с флуоресцентной меткой, предел детекции – < 1нг, разрешение – 1 п.н.

В клинической лабораторной практике амплифицированный специфический фрагмент ДНК наиболее часто выявляют методом горизонтального электрофореза в агарозном геле в присутствии интеркалирующего с ДНК флуоресцентного красителя (например, бромистого этидия). ДНК поглощает в области 260 нм, бромистый этидий поглощает в области 300-360 нм и испускает в красно-оранжевой области видимого спектра (590 нм). Данный краситель образует с фрагментами ДНК устойчивое соединение внедрения, проявляющееся в виде светящихся полос при облучении геля УФ-излучением с длиной волны 290-330 нм. В зависимости от размера ампликонов используют гель с

содержанием агарозы от 1,5 до 2,5 %. Учет результатов в ультрафиолетовом свете с использованием трансиллюминатора. Размер ампликона оценивают, сравнивая его пробег с пробегом молекул ДНК известной длины, которые входят в состав маркера. Поэтому при проведении электрофоретической детекции рекомендуется параллельно с контрольными и опытными пробами проводить электрофорез смеси маркеров длин фрагментов ДНК. Обычно такая смесь содержит десять фрагментов ДНК длиной 100, 200, 300 и более пар оснований. Постановка такой пробы позволяет верифицировать длину ампликонов в контрольных и опытных пробах.

Для регистрации результатов гель фотографируют на пленку типа Микрат 300 или регистрируют с помощью видеосистемы, соединенной с компьютером, находящимся в локальной сети, что позволяет сохранять изображение геля в электронном виде (файлы в формате tiff, jpg) и передавать их на компьютеры в чистой зоне, для исключения риска контаминации лаборатории. Последняя должна удовлетворять определенным требованиям: ее аппаратная часть должна работать с любым трансиллюминатором, иметь 2 режима работы (обычный режим – формирование изображения за 100 мс и режим накопления для многократного повышения чувствительности); возможность сохранения видеоизображения в различных форматах tiff, jpg, bmp, tga. Наличие специального светофильтра позволяет снизить требования к трансиллюминатору. Желательно наличие функций графического редактора: преобразование яркости и контрастности, гамма коррекция, поворот изображения на любой угол, масштабирование, печать (для исследовательских целей - получение линейного профиля любой части изображения в координатах светимости). Кроме этого, необходимо наличие и других функций: спецрежим (быстрая обработка участков изображения и занесения результатов в базу данных), автоматическое определение положительного или отрицательного результата при

использовании эталонной пробы, присвоение уникального имени и ряда отдельных характеристик (инфекция, клиент, поставщик) каждой пробе.

Данный способ прост в исполнении и обладает достаточной чувствительностью. К недостаткам данного метода может быть причислена субъективность результатов, недостаточное разрешение, ограничения по определению ДНК различных микроорганизмов в одной реакции, возможность контаминации, отсутствие автоматизации.

Для разделения продуктов ПЦР, различающихся всего на несколько пар в длину, используют 6-10 % не денатурирующий полиакриламидный гель. Для разделения продуктов амплификации, различающихся не менее чем на 5 п.н., но не более чем 45 п.н. рекомендуют использовать денатурирующий полиакриламидный гель. [Меньшиков В.В., 2009]

### **1.11 Лечение**

Виды лечения зооантропонозных дерматофитий, можно подразделить на этиотропную терапию антимикотическими средствами, патогенетическое лечение и локальную (наружную) терапию. Патогенетическое лечение включает в себя использование системных иммуномодулирующих, противовоспалительных, пробиотических и других препаратов, корректирующих в организме больного различные нарушения, вызываемые микотической инфекцией либо проводимой антимикотической терапией. Объем лечебных мероприятий зависит от клинической формы заболевания.

В настоящее время ведущими препаратами используемыми в этиотропной терапии зооантропонозных дерматофитий являются системные антимикотики – гризеофульвин (препарат выбора) и тербинафин (альтернативная схема) [Кубанова А.А., 2005]

Гризеофульвин – это антибиотик-антимикотик, обладающий активностью в отношении трихофитов, эпидермофитов, а также кератинофильных плесневых грибов рода *Microsporum*.

При лечении микроспории гризеофульвин назначается из расчета 22 мг на кг массы тела, при трихофитии – 18 мг на кг массы тела, но не более 1 г в день. Для улучшения всасывания и большего накопления препарата рекомендуют применять его с растительным маслом, разделяя суточную дозу на 3 – 4 приема [Кашкин П.Н., Шеклаков Н.Д., 1978]. С учетом высокой эффективности, общедоступности и относительной дешевизны гризеофульвин является основным системным антимикотическим препаратом, применяемым при лечении зооантропонозных трихомикозов. Однако наличие побочных явлений и серьезных противопоказаний к назначению препарата зачастую ограничивает его применение. В процессе лечения у некоторых больных могут появиться побочные явления в виде кратковременной головной боли, головокружения, желудочно-кишечных расстройств, аллергических высыпаний на коже в виде папулезной, везикулезной или уртикарной сыпей. После проводимой терапии гризеофульвином у ряда больных наблюдается кишечный дисбиоз, изменения со стороны гепатобилиарной системы [Мухамадеева О.Р., 2005]. Также, гризеофульвин обладает иммунодепрессивным действием вследствие угнетения дифференцировки стволовых клеток, нарушения взаимодействия Т- и В- лимфоцитов, снижения числа антителосинтезирующих клеток [Степанова Ж.В., 2003, Хисматуллина З.Р., 1995].

Альтернативным препаратом в лечении является тербинафин. При лечении трихофитии он применяется в дозе 62,5 мг в сутки при весе менее 20 кг (начиная с двухлетнего возраста), при весе от 20 до 40 кг суточная доза составляет 125 мг в сутки, при весе 40 кг и выше суточная доза – 250 мг [Кубанова А., 2005].

Особое место в лечении зооантропонозной трихофитии занимает патогенетическая терапия. Ее применение обусловлено необходимостью коррекции нарушений, вызванных проводимой системной антифунгальной терапией, самой микотической инфекцией, сопровождающейся

нарушениями на разных этапах иммунного ответа [Давыдова И.Р., 2002]. Больные трихофитией в 12 % случаев страдают гастродуоденитом, в 20 % - дискинезией желчевыводящих путей [Хисматуллина З.Р., 1983]. При данной патологии, преимущественно проявляющейся в нарушении функции желудочно-кишечного тракта, наблюдается относительная резистентность к терапии гризеофульвином, обусловленная нарушениями белкового, липидного и ферментного обмена [Тарануха Н.Н., 1990].

Наружная терапия всегда являлась важной составной частью комплексного лечения всех форм дерматофитий. Наружное лечение нагноительной формы зооантропонозной трихофитии должно сопровождаться эпиляцией волос в очаге поражения. Для упрощения процедуры эпиляции применяются повязки с кератолитическими мазями с салициловой или молочной кислотами, которые способствуют отхождению гнойных корок в очаге. Однако их применение в малых концентрациях не позволяет обеспечить быстрое отторжение некротических тканей, а использование кератолитических мазей в больших концентрациях на волосистой части головы может привести к интоксикации вследствие всасывания этих препаратов. Поэтому применение данных лекарственных средств должно быть ограничено по площади нанесения и времени экспозиции [Кубанова А.А., 2005; Степанова Ж.В., 2005].

При инфильтративной и поверхностной формах трихофитии волосистой части головы волосы в очагах и вокруг них еженедельно сбривают. Для наружной терапии данных форм чаще всего используются противомикотические средства смешанных групп действия. Как правило, утром очаги поражения смазывают анилиновыми красителями – 5-7 дней до снятия воспалительных явлений, а вечером применяют фунгицидные мази – серную 10%, 20%, 33% и серно-дегтярную 5%, а по показаниям – другие серосодержащие мази (серно-салициловая мазь, сульфодекортэм, мазь Вилькинсона) [Хисматуллина З.Р., 2007].

## **Требования к результатам лечения**

–разрешение клинических проявлений;

–три отрицательных контрольных результата микроскопического исследования (трихофития волосистой части головы - 1 раз в 7-10 дней, трихофития гладкой кожи 1 раз в 5-7 дней). В виду возможности рецидивов, после окончания лечения, пациент должен находиться на диспансерном наблюдении: при трихофитии волосистой части головы - 3 месяца, при трихофитии гладкой кожи - 1 месяц. Контрольные микроскопические исследования при диспансерном наблюдении необходимо проводить: при трихофитии волосистой части головы - 1 раз в месяц, при трихофитии гладкой кожи - 1 раз в 10 дней.

## **Показания для госпитализации**

Показаниями для госпитализации являются:

–отсутствие эффекта от амбулаторного лечения;

–инфильтративно-нагноительная форма;

–тяжелая сопутствующая патология.

–по эпидемиологическим показаниям: больные из организованных коллективов при отсутствии возможности изоляции их от здоровых лиц (например, при наличии трихофитии у лиц, проживающих в интернатах, детских домах, общежитиях, дети из многодетных и асоциальных семей).

## **Профилактика**

Профилактические мероприятия при трихофитии включают санитарно-гигиенические, в т. ч. соблюдение мер личной гигиены, и дезинфекционные (профилактическая и очаговая дезинфекция).

Очаговая (текущая и заключительная) дезинфекция проводится в местах выявления и лечения больного: на дому, в детских учреждениях и учреждениях здравоохранения и др.

## **1.12 Противозидемические мероприятия**

1. На больного трихофитией, выявленного впервые, в 3-х дневный срок подается извещение в отделение учета и регистрации инфекционных заболеваний ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» и его филиалов, в территориальные кожно-венерологические диспансеры (№089/у-кв).

Каждое новое заболевание следует рассматривать, как впервые диагностированное, и подавать на него извещение.

2. При регистрации заболевания в учреждениях здравоохранения, организованных коллективах и других учреждениях сведения о заболевшем вносятся в журнал учета инфекционных заболеваний (форма №060/у).

Журнал ведется во всех учреждениях здравоохранения, медицинских кабинетах школ, детских дошкольных учреждений и других организованных коллективах. Служит для персонального учета больных инфекционными заболеваниями и регистрации обмена информацией между учреждениями здравоохранения и органами государственного санитарно-эпидемиологического надзора.

3. Проводится изоляция больного.

При обнаружении в детских учреждениях больного трихофитией немедленно изолируют и до перевода в больницу или домой проводят текущую дезинфекцию.

До выздоровления больного трихофитией ребенка не допускают в дошкольное образовательное учреждение, школу; взрослого больного не допускают к работе в детские и коммунальные учреждения. Больному запрещается посещение бани, бассейна.

В целях максимальной изоляции больному выделяют отдельную комнату или ее часть, предметы индивидуального пользования (белье, полотенце, мочалку, расческу и др.). Ограничивают число предметов, с которыми он может соприкасаться.

4. В первые 3 дня после выявления больного в дошкольных образовательных учреждениях, школах, высших и средних специальных образовательных учреждениях и других организованных коллективах медицинским персоналом данных учреждений проводится осмотр контактных лиц. Осмотр контактных лиц в семье проводится врачом-дерматовенерологом или врачом, на которого возложена обязанность врача дерматовенеролога. Осмотр проводится до проведения заключительной дезинфекции.

Дальнейшее медицинское наблюдение с обязательным осмотром кожных покровов и волосистой части головы производится 1-2 раза в неделю в течение 21 дня с отметкой в документации (ведется лист наблюдения).

5. Текущую дезинфекцию в очагах организует учреждение здравоохранения, установившее заболевание. Текущую дезинфекцию до госпитализации, выздоровления проводит либо сам больной, либо ухаживающее за ним лицо.

Ответственность за выполнение текущей дезинфекции в организованных коллективах и учреждениях здравоохранения возлагается на его медперсонал. Текущая дезинфекция считается своевременно организованной, если население начинает выполнять ее не позднее, чем через 3 часа с момента выявления больного.

6. Заключительная дезинфекция проводится в очагах трихофитии после выбытия больного из очага для госпитализации или после выздоровления больного, лечившегося дома не зависимо от сроков госпитализации или выздоровления.

В некоторых случаях заключительную дезинфекцию проводят дважды (например, в случае изоляции и лечения больного ребенка в изоляторе школы интерната: после изоляции – в помещениях, где находился больной и после выздоровления – в изоляторе). Если заболевает ребенок, посещающий детское дошкольное учреждение или школу,

заключительную дезинфекцию проводят в детском дошкольном учреждении (или школе) и дома. В общеобразовательной школе заключительную дезинфекцию проводят по эпидемиологическим показаниям. Заклучительную дезинфекцию в очагах проводит дезинфекционная станция. Камерной дезинфекции подлежат постельные принадлежности, верхняя одежда, обувь, головные уборы, ковры, мягкие игрушки, книги и др.

7. Заявка на заключительную дезинфекцию в домашних очагах и единичных случаях в организованных коллективах подается медицинским работником медицинской организации дерматовенерологического профиля.

8. При регистрации 3 и более случаев в организованных коллективах, а также по эпидемиологическим показаниям, организуется выход медицинского работника медицинской организации дерматовенерологического профиля и эпидемиолога органов государственного санитарно-эпидемиологического надзора. По указанию эпидемиолога назначается заключительная дезинфекция, определяется объем дезинфекции.

9. При зооантропонозной трихофитии медицинским работником, установившим заболевание, проводится работа по выявлению источника заражения (наличие контакта с больными животными). Принимаются меры по выявлению инфекции на фермах и личных хозяйствах среди крупного рогатого скота совместно с ветеринарной службой. Животных обследуют в учреждениях ветеринарии с последующим представлением справки по месту лечения и наблюдения за больным трихофитией.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Объект исследования

Объектом исследования были дети в возрасте 5 – 14 лет, находящиеся на лечении в кожно-венерологическом диспансере г. Уфы. с диагнозом трихофития. Клинической базой служил инфицированный материал из кожно-венерологического диспансера.

Сбор инфицированных волос проводился у 105 пациентов в возрасте от 5 до 14 лет в кожвендиспансере г.Уфы.

При исследовании волос внимательно осматривали всю поверхность головы, брали макроскопически измененные волосы (изогнутые в виде знака вопроса), чешуйки с короткими обломками волос. Они обычно утолщены, окутаны белым или серым чехлом, состоящим из спор гриба. Волосы забирали пинцетом.

Транспортировку в лабораторию взятого материала проводили в адекватном температурном режиме (20 – 37 °С), в максимально короткие сроки (не более 1 – 1,5 часов).

Практическая часть эксперимента была выполнена на базе Башкирского Государственного Медицинского университета (кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии).

### 2.2 КОН микроскопия

Исследуемый волос помещали на предметное стекло. Кожные чешуйки размельчали на нем, а длинные волосы делили на несколько коротких сегментов (прикосновением ребра нагретого скальпеля). Затем 3-4 подозрительных волоска или достаточное количество чешуек помещали на середину предметного стекла, наносили 1—2 капли 10% раствора КОН. Материал, слегка подогревали над пламенем горелки до появления белого ободка кристаллов щелочи по периферии. Наложив покровное стекло,

приступали к микроскопии сначала под малым увеличением, а затем под большим.

### **2.3 Культуральное исследование**

Биологический вид гриба определяли при культуральном исследовании.

Для идентификации возбудителя исследуемый материал засеивали на среду Сабуро.

Приготовление питательной среды Сабуро: Развели 65,9 г среды Сабуро в 1 литре дистиллированной воды. Тщательно перемешали и нагрели. Часто помешивая, довели до кипения. Кипятили в течение минуты до полного растворения. Разлили и стерилизовали автоклавированием 15 минут при 118–121°C. Это способствует гидролизу компонентов среды и препятствует ее затвердеванию. Среду охладили до температуры 45-50° С, разлили в стерильные чашки Петри и, после застывания, подсушили в течение (40±5) мин и оставили остывать. Готовая среда имеет янтарную окраску, слегка опалесцирует, должна храниться при 8–15°C.

Проводился посев пораженных волос больных детей. Взятый патологический материал находился в эппендорфах, пронумерованных в соответствии с временем взятия пробы и принятым лечением.

Посев осуществляли в ламинарном боксе, предварительно обработанном дезинфектантами и кварцеванием.

Инфицированные волосы поместили на поверхность среды: в каждую чашку Петри по 1 волосу от двух больных детей. Инкубировали в термостате в течение 48 ч при температуре 28 °С.

## 2.4 Выделение ДНК

Чешуйки кожи и волосы погружали в 4 М КОН, ставили в термошейкер при 65 °С на 40 минут. После добавляли 10 мкл HCL и охлажденный этанол.

Проведение анализа.

1. Буфер для лизирующего раствора реагента и раствор для отмывки 1 прогревали при температуре 60-64°С до полного растворения кристаллов.

2. В каждую пробирку с биоптатом или 50 % гомогенатом отдельными наконечниками с аэрозольным барьером вносили по 400 мкл буфера для лизирующего реагента и по 17 мкл лизирующего реагента. Тщательно перемешивали содержимое пробирок.

3. Инкубировали пробирки при температуре 60 °С в течение 1 ч, периодически встряхивая на вортексе (5 раз через каждые 10-12 мин). Допускается инкубация в течение 12 ч при температуре 60 °С.

4. Осаждали нерастворенные частицы образцов центрифугированием при (12-14) тыс об/мин в течение 5 мин.

5. Надосадочную жидкость в объеме 200-350 мкл очень аккуратно (так, чтобы не попали взвешанные частицы и капли жира) отбирали отдельными наконечниками с аэрозольными барьерами и перенесли в новые пробирки

6. Пробы центрифугировали в течение 5 с при 5 тыс.об/мин на микроцентрифуге для сброса капель с крышки пробирок.

7. Тщательно ресуспендировали сорбент универсальный на вортексе .В каждую пробирку отдельным наконечником добавили по 25 мкл ресуспендированного сорбента универсального. Перемешали на вортексе, оставили в штативе на 10-15 мин, перемешивая через каждые 2 мин.

8. Осадили сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при 5 тыс об/мин в течение 1 мин. Удалили надосадочную

жидкость,используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

9. Добавили в пробы по 300 мкл раствора для отмывки 1, перемешали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального. Осадили сорбент универсальный центрифугированием при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге в течение 1 мин. Удалили надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

10. Добавили в пробы по 500 мк раствора для отмывки 2, перемешали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального, центрифугируем 1 мин при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Отобрали надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

11. Повторяли процедуру отмывки, следуя пункту 10, отобрали надосадочную жидкость полностью.

12. Поместили пробирки в термостат при температуре 64-65 °С на 5-10 мин для подсушивания сорбента универсального. При этом крышки должны быть открыты.

13.В пробирки добавили по 50-100 мкл ТЕ-буфера. Перемешали на вортексе. Ставим в термосат при температуре 64-65 °С на 5-10 мин, периодически (1 раз в мин) встряхивая на вортексе.

14. Процентрифугировали пробирки при (12-14) тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге . Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

## **2.5 Постановка ПЦР**

### **Состав набора ТрифАм:**

- Реакционная смесь – 4 пробирки, 645 мкл, готова к применению;
- Таг-полимераза – 1 пробирка, 30мкл;
- буфер для разведения полимеразы – 1 пробирка, 200мкл;

-ДНК-контроль положительный – 1 пробирка, 70 мкл; верхняя полоса соответствует фрагменту *Trichophyton rubrum* (размер 925п.н.) в количестве  $10^3$  копий/мл; нижняя – фрагменту *Trichophyton interdigitale* (размер 392 п.н.) в количестве  $10^3$  копий/мл

- вазелиновое масло–1 пробирка, 5мл.

-Таг-полимераза – 0,5 мкл,  
 -Буфер 2 мкл,  
 - Реакц смесь- 25,5 мкл

} x 4

} 2 мкл  
 } 8 мкл  
 } 102мкл

Разлили в пробирки по 25 мкл; + по 1 мкл ДНК исследуемого образца,+ вазелиновое масло;

Поставили в терцик на 2 часа;

Приборы с активным регулированием температуры	Приборы с регулированием температуры по блоку
95°C -2' 1 цикл	95°C -2'
95°C -40" } 62°C -40" } 45 циклов 72°C -50" }	95°C -42" } 64°C -42" } 45 циклов 72°C -80" }
72°C -4' 1 цикл	

Детекцию результатов проводили методом электрофореза в агарозном геле.

## 2.6 Электрофоретический метод детекции в агарозном геле.

Для приготовления агарозного геля в СВЧ-печи или на водяной бане расплавляют смесь агарозы, буфера и воды. Охлажденную до 50-60оС смесь тонким слоем заливают в форму и с помощью специальных гребенок делают в геле лунки для нанесения образца. Исследуемый препарат (раствор белка, ДНК или РНК) вносят в лунку, расположенную у края геля - полужидкой среды с сетчатой пространственной структурой (обычно для

электрофореза используют тонкие пластины геля). Находящиеся в буферном растворе макромолекулы обладают некоторым суммарным электрическим зарядом, и когда через гель пропускают электрический ток, они перемещаются в электрическом поле. Молекулы одинакового размера (и одинакового заряда) движутся единым фронтом, образуя в геле дискретные невидимые полосы. Чем меньше размер молекул, тем быстрее они движутся. Постепенно исходный препарат, состоящий из разных макромолекул, разделяется на зоны, распределенные по длине пластинки. За ходом электрофореза следят по перемещению в геле красителя - заряженного низкомолекулярного вещества, которое вносят в каждую лунку перед началом электрофореза. Когда краситель достигает конца пластины, электрофорез останавливают, а гель окрашивают красителем, прочно связывающимся с белками или нуклеиновыми кислотами. Если образец представляет собой дискретный набор макромолекул разного размера, то после электрофореза получается набор четких полос, расположенных одна под другой. Если же распределение молекул по размеру более или менее непрерывно, то получается смазанная картина. По интенсивности окраски полос можно судить о концентрации макромолекул в образце. Чтобы определить относительную молекулярную массу разделенных фрагментов, одновременно проводят электрофорез маркерных макромолекул с известными молекулярными массами. Набор маркеров 11 должен охватывать весь диапазон молекулярных масс в данной системе. Образец маркерных молекул вносят в отдельную лунку, расположенную вблизи одного из краев пластинки (или в две лунки у двух разных краев). Логарифм относительной молекулярной массы маркера линейно связан с его электрофоретической подвижностью  $R_f$  величиной, равной отношению расстояний, пройденных маркерной молекулой и красителем (фронтом растворителя). Построив график зависимости логарифма относительных молекулярных масс маркеров от  $R_f$ , можно найти относительную молекулярную массу каждого компонента образца.

Относительная молекулярная масса белков измеряется в дальтонах, двухцепочечных нуклеиновых кислот - в числе пар нуклеотидов, одноцепочечных - в числе нуклеотидов.

Для регистрации продуктов реакции амплификации ДНК используют электрофорез в агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Бромистый этидий образует с фрагментами ДНК устойчивое соединение внедрения, проявляющееся в виде светящихся полос при облучении геля УФ-излучением с длиной волны 290-330 нм. В лунки геля наносится амплификат, уже содержащий лизирующий краситель. Форму с гелем, содержащим нанесенные образцы переносят в камеру для электрофореза, заполненную буфером, камеру подключают к источнику питания (напряжение 10-15 В/см длины геля), и проводят электрофоретическое разделение продуктов амплификации в направлении от катода к аноду. Контроль за электрофоретическим разделением осуществляется визуально по движению полосы красителя. По окончании электрофоретического разделения вынимают гель из формы и просматривают в ультрафиолетовом свете с помощью УФ- трансиллюминатора (желательно фотографируют). Фрагменты анализируемой ДНК проявляются в виде светящихся оранжево-красных полос. [Westermeier, R., 1997]

Агарозный гель-электрофорез проводили по следующей схеме:

1. Приготовить 1 л 1х-ного ТБЕ буфера путем разбавления 50х-ного ТБЕ буфера в дистиллированной воде. К 20 мл 50х-ного ТБЕ буфера добавить 980 мл дистиллированной воды. Тщательно перемешать.
2. Взвесить 1,7 г агарозы и добавить 100 мл 1х-ного ТБЕ буфера, перемешать и расплавить смесь в микроволновой печи в течение 2-3 минут. Периодически помешивать. Довести до кипения, но не допускать кипения более 10 секунд. Смесь в колбе должна стать прозрачного цвета.
3. Разлить агарозу на ровной поверхности в специальную форму (заливка) с одной или двумя пластиковыми гребенками, при этом

- толщина геля не должна быть менее 2 мм и не более 5 мм. Гель полностью застывает и может быть использован после 15-20 минут.
4. Налить в камеру для электрофореза необходимое количество 1х-ного ТБЕ буфера, поместить в него застывший гель. Буфер должен полностью покрывать гель сверху на 2-10 мм.
  5. В пробирки с выделенными образцами ДНК добавить 3 мкл смеси красителей (бромфеноловый синий, ксиленцианол, 30% глицерин).
  6. Медленно нанести автоматической пипеткой пробу ДНК с красителем в лунку геля в последовательности, соответствующей нумерации проб. Благодаря глицерину раствор ДНК не будет всплывать из лунки.
  7. Подключить клеммы прибора к источнику питания так, чтобы (-) находился на старте, а (+) – на финише (от черного к красному).
  8. Запустить электрофорез при помощи источника питания (Эльф-4, ДНК-Технология) при следующих параметрах: сила тока 400 мА, мощность 80Вт, напряжение 120 В. На старте пузырей должно быть больше, чем на финише. Контроль за электрофоретическим разделением осуществляется визуально по движению полосы красителя.
  9. Электрофорез проводить в течение 20-50 минут, затем вынуть гель из формы и поместить в кювету для окрашивания. Налить в кювету слабый раствор бромистого этидия. Окрашивать в течение 10-15 мин.
  10. Слить краситель в колбу. Промыть гель проточной водой. Поместить его на стекло УФ-трансиллюминатора. Включить трансиллюминатор и проанализировать результаты анализа. Сфотографировать гель при помощи цифрового фотоаппарата. Фрагменты анализируемой ДНК проявляются в виде светящихся оранжево-красных полос при облучении УФ-излучением с длиной волны 310 нм.

Гель электрофорез помогает выделить и разделить фрагменты дезоксирибонуклеиновой кислоты. За счет трений материалов, образующих гель, формируется «молекулярное сито», что помогает дифференцировать молекулы в соответствии с размером и зарядом. Скорость движения заряженных частиц ДНК через образованные поры в электрическом поле зависят от нескольких факторов:

- Силы образованного электрического поля;
- Диаметра и форм молекул;
- Относительной степени «боязни» воды образцов;
- Температурной кривой буфера и ионной силы.

## **2.7 Статистическая обработка полученных результатов**

Статистический анализ результатов проводили с использованием пакета программного обеспечения Statistica 6.0. для определения статистической значимости различий между используемыми нами методами рассчитывали критерий хи квадрат с поправкой Йетса. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При изучении амбулаторных карт было установлено, что в группу инфицированных больных входили дети в возрасте от 5 до 14 лет. У всех детей были выявлены сопутствующие инфекционные заболевания, наиболее часто диагностировалась ОРВИ.

Больных трихофитией мальчиков было зарегистрировано больше чем девочек (75% и 25% соответственно). Количество детей из сельской местности (65%) преобладало над количеством больных проживающих в городе (35 %).

У большинства пациентов была поражена волосистая часть головы.

Очаг поражения характеризуется округлыми и/или овальными пятнами с хорошо очерченными границами. Пятна бледно-розового цвета, с выраженным шелушащимся центром располагаются на открытых участках кожи. По краям очагового поражения могут располагаться розовые узелки, корочки. Нередко сопровождается зудом.

При исследовании волос КОН микроскопией мы видели крупноспоровые грибы от 5 до 8 мкм, волос снаружи окутан спорами, лежащими параллельными цепочками, споровой чехол находится у основания волоса и хорошо выражен, что соответствует поражению грибами по типу *Trichophyton ectothrix*.

При поражении грибами по типу *Trichophyton endothrix* волос сплошь заполнен цепочками из круглых или квадратных спор, расположенных параллельными рядами. Границы волоса четкие. Цепочки из спор находятся по краю волоса (Рисунок 4).



Рисунок 4 Цитологический препарат волоса, пораженного по типу *Trichophyton endothrix* .

Таким образом методом КОН микроскопии было обследовано 105 пациентов с патологией волос. Результат КОН микроскопии оказался положительным у 78 человек (что соответствует 74 %), отрицательный результат у 27 человек (что соответствует 26%) (Рисунок 6).

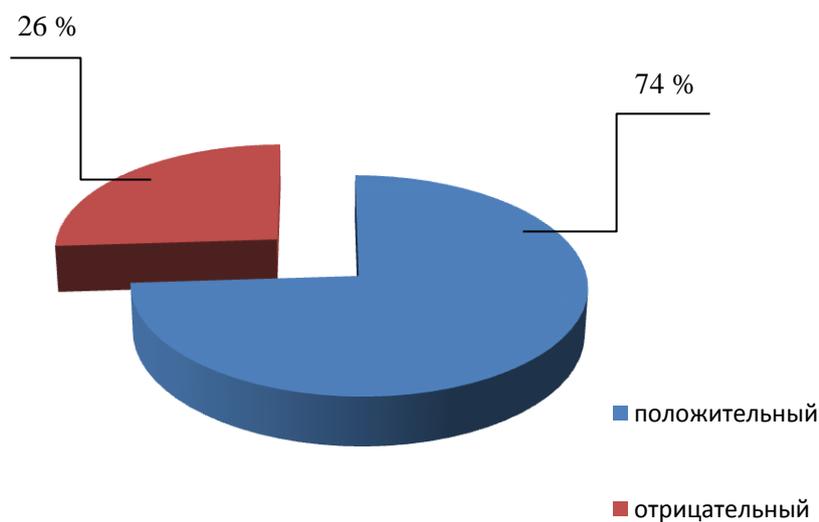


Рисунок 6 Результат КОН микроскопии.

При культуральном исследовании мы видели белые колонии, возвышающиеся и бугристые, растущий край ровный, лучистый, паутинистый. При микроскопии видели мицелий ветвящийся, микроконидии (алеирии) овальные, артроспоры округлой формы. Микроконидии удлинённые (Рисунок 8).

Грибы растут медленно на сусло-агаре или агаре Сабуро. Зрелые колонии появились на 28 день (Рисунок 7).

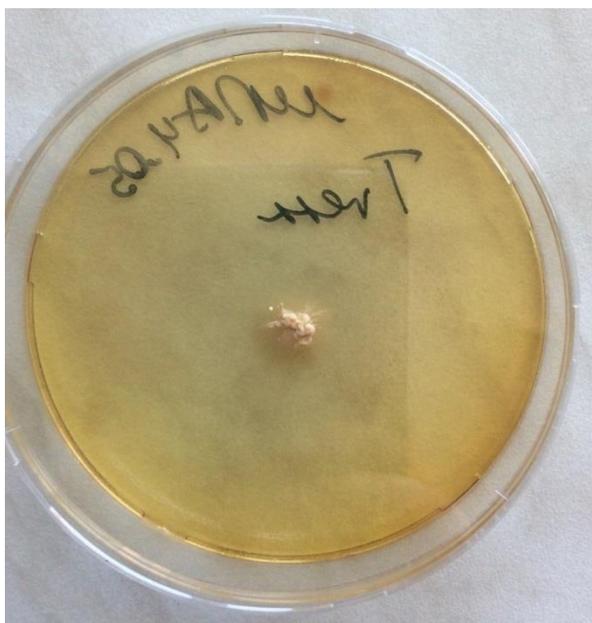
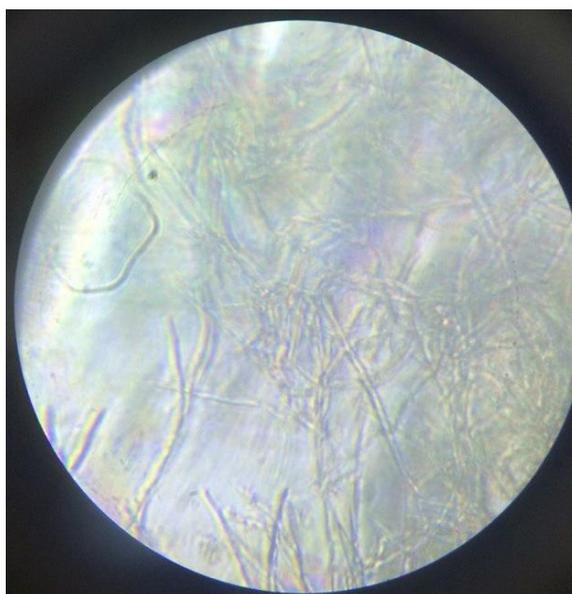


Рисунок 7 Рост колонии *T. verrucosum* на среде Сабуро.



Рисинок 8 Микроскопическая картина при идентификации *T. verrucosum*.

Таким образом при культуральном исследовании у 105 пациентов с заболеванием волос, положительный результат был у 38 человек (что соответствует 36%), отрицательный результат у 67 человек (что соответствует 64%) (Рисунок 9).

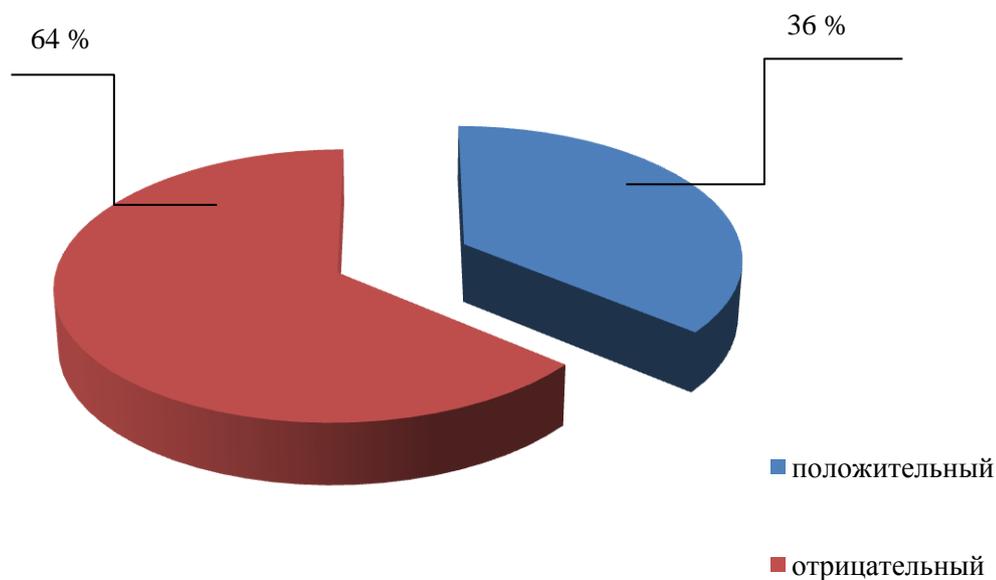


Рисунок 9 Результаты культурального исследования.

По полученным нами данным наиболее распространенным возбудителем зоантропонозной трихофитии оказался *T. verrucosum*. Второе место занял *T. mentagrophytes v. mentagrophytes* (Рисунок 10).

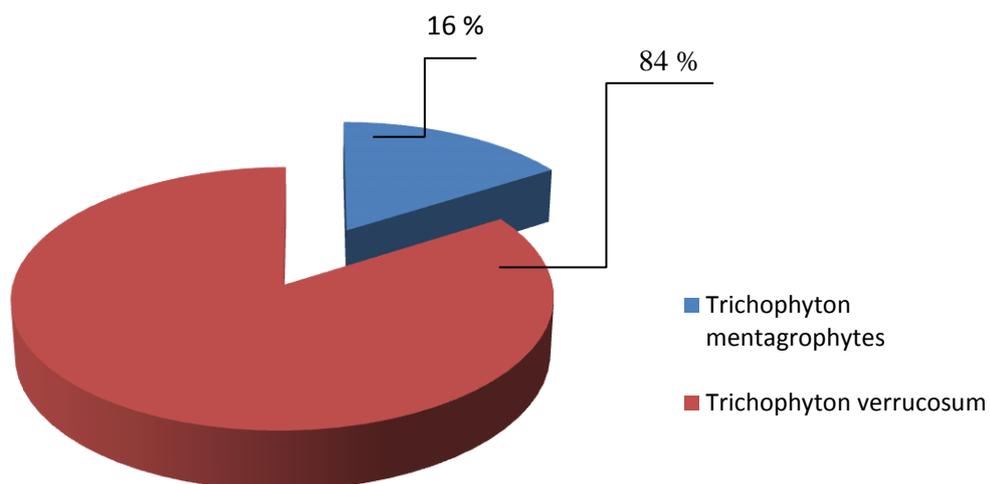


Рисунок 10 Частота встречаемости *T. verrucosum*. и *T. mentagrophytes v. mentagrophytes*.

При электрофоретической детекции были обнаружены продукты амплификации размером 320 п.н. (Рисунок 9; результаты 1,2,4,5), что констатирует факт присутствия *T. verrucosum*. Напротив, у 3-го образца после проведения ПЦР продукт амплификации не определялся (Рисунок 9; результат 3).

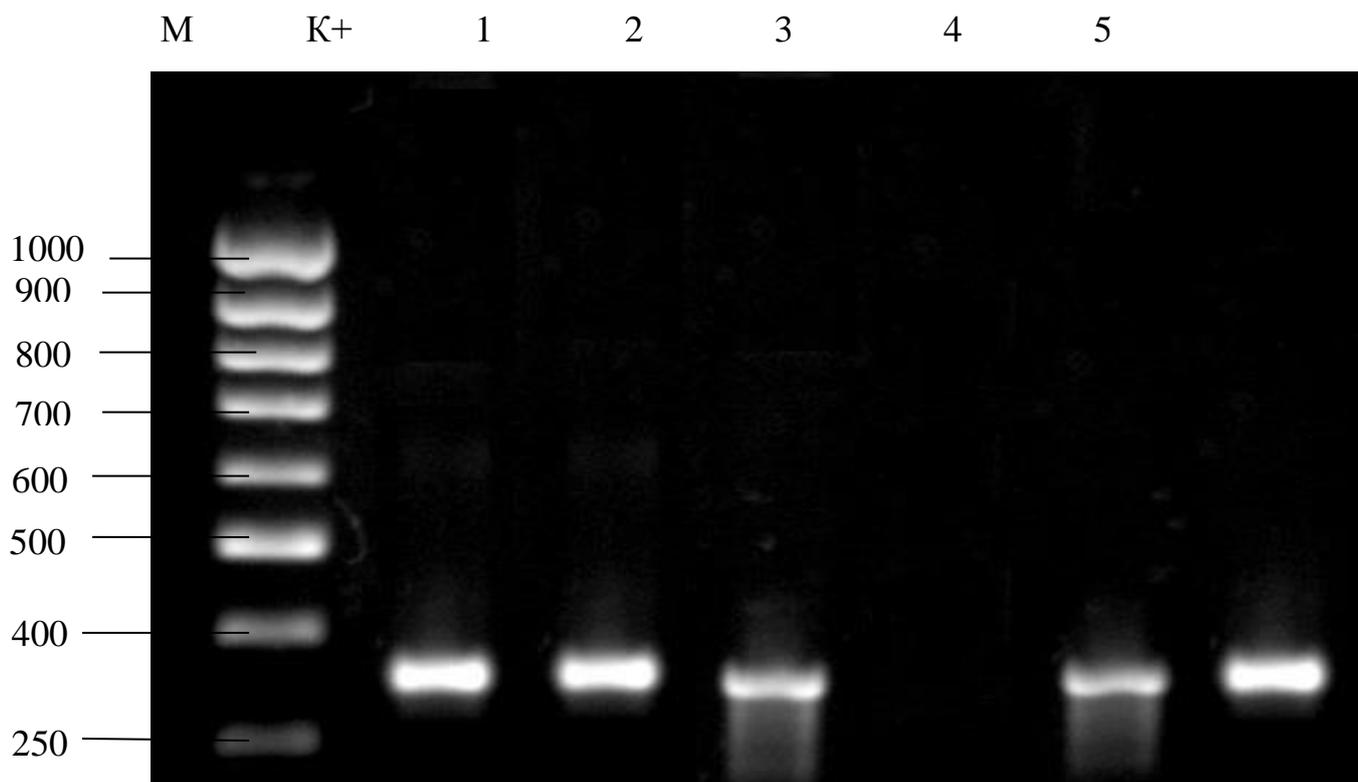


Рисунок 11 Электрофореграмма результатов ПЦР участка гена *T. verrucosum*.

Таким образом при ПЦР-диагностике у 105 пациентов, положительный результат был получен у 89 человек (что соответствует 85%), отрицательный результат у 16 человек (что соответствует 15%) (Рисунок 12).

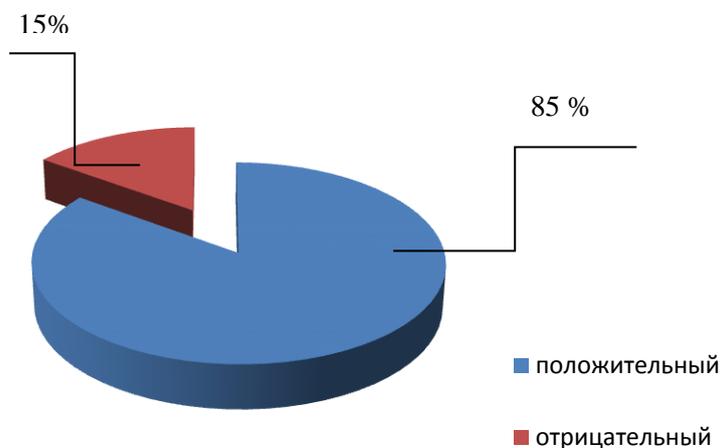


Рисунок 12 Результат ПЦР диагностики.

Статистическую значимость различий между методами исследования определяли в таблицах 1,2,3.

Таблица 1

	+	-	всего
Микроскопия	78	27	105
Культуральный метод	38	67	105
всего	116	94	210

Таблица 2

	+	-	всего
Микроскопия	78	27	105
ПЦР	89	16	105
всего	167	43	210

Таблица 3

	+	-	всего
Культуральный метод	38	67	105
ПЦР	89	16	105
всего	127	83	210

Находили значение критерия хи-квадрат с поправкой Йетса.

При сравнении используемых нами методов установили, что статистически значимые различия были между микроскопическим методом и ПЦР ( $\chi^2=3,536$ ;  $p<0,05$ ), между микроскопическим методом и культуральным ( $\chi^2=30,812$ ;  $p<0,05$ ) и между культуральным методом и ПЦР ( $\chi^2=51,816$ ;  $p<0,05$ ).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что наибольшие различия имеются между ПЦР -методом и культуральным. Это доказывает,

что частота обнаружения в клиническом материале возбудителя (*T. verrucosum*) методом ПЦР значительно выше по сравнению с культуральным методом, который на сегодняшний является основным при идентификации возбудителя до вида.

Следует отметить, что по сравнению с микроскопическим методом, который достаточно быстро позволяет обнаружить присутствие дерматофитов в клиническом материале, ПЦР также является наиболее эффективным (Рисунок 13).

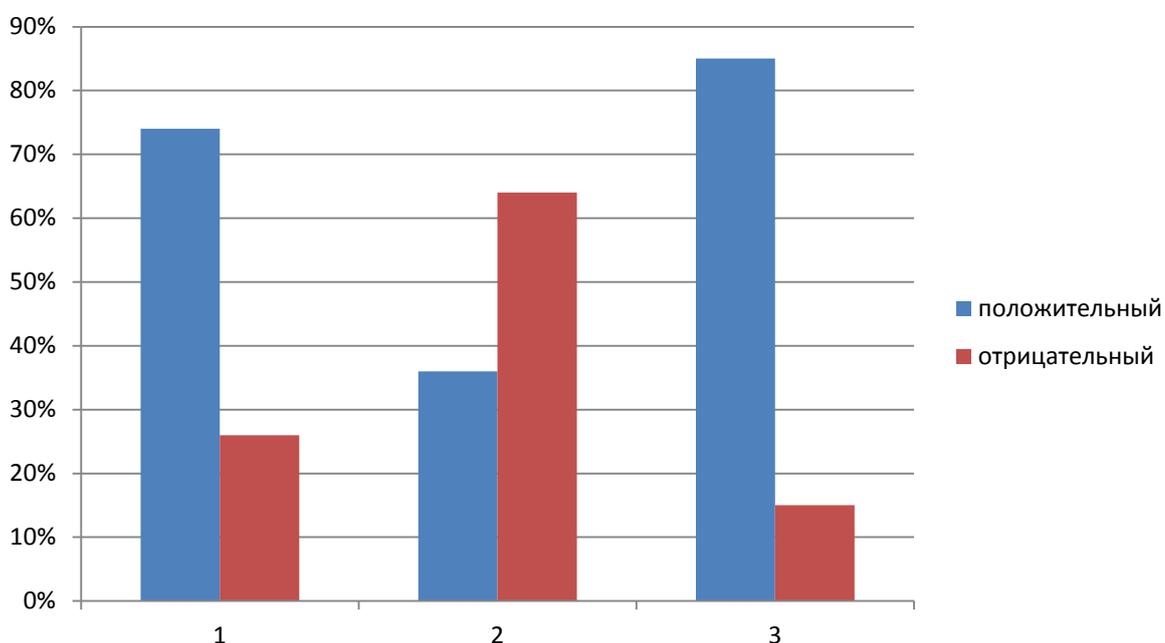


Рисунок 13 Сравнение эффективности методов диагностики трихофитии (в процентах). 1- КОН микроскопия; 2- Культуральный метод; 3- ПЦР анализ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Микроскопический метод является простым в работе и не требует высоких экономических затрат, но не может определить возбудитель до вида.

Культуральный метод - это специфический диагностический тест, при котором возможно определить возбудителя до вида, но требуются высокие экономические и временные затраты, прежде чем результат будет получен.

Полимеразная цепная реакция является высокочувствительным и высокоспецифичным методом, который имеет единственный недостаток – это высокие экономические затраты.

Таким образом, ПЦР анализ отличается самым высоким процентом выявляемости, по сравнению с микроскопическим и культуральным методами, в лабораторной диагностике зооантропонозной трихофитии.

## ВЫВОДЫ

1. Возрастная группа больных трихофитией пациентов состояла из детей 5 – 14 лет, отягощенных различными заболеваниями.

2. При исследовании клинического материала от больных с подозрением на трихофитию традиционными методами (микроскопия и культуральный метод) наиболее частым возбудителем среди зоофильных дерматофитов является *T. verrucosum*.

3. Сравнительная характеристика методов установления грибковой природы заболевания, показала, что метод ПЦР является более диагностически эффективным, по сравнению с культуральным методом и КОН микроскопией.

4. Применение метода ПЦР для детекции *T. verrucosum* в клиническом материале позволяет сократить время, затраченное на исследования от 30 дней до 1 суток.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абек Д., Бургдорф В., Кремер Х. Болезни кожи у детей, 2007. - 347с.
2. Адаскевич В.П. Кожные и венерические болезни, 2006.-686 с.
3. Антонов В.Б., Медведева Т.В., Леина Л.М. и др. К вопросу об инфльтративно-нагноительной трихофитии // Успехи медицинской микологии. Т. 8. - М.: Национальная академия микологии, 2006. - С. 185 - 187.
4. Азаров В.Н. Основы микробиологии и санитарии. - М.: Экономика, 1996. - 205 с.
5. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология.- М.: Медицинское информтагенство, 2005.- 735 с.
6. Воробьев А.А. Медицинская и санитарная микробиология.- М.: Академия, 2003.- 462 с.
7. Воробьев А.А. Микробиология и иммунология. / Под ред..- М.: Медицина, 2005.- 492 с.
8. Гарибова Л.В. Выращивание грибов. М. Изд. Вече. 2005. 96 с.
9. Гусев М.В. Микробиология. - М.: Академия, 2009. - 464 с.
10. Давыдова И.Р., Норманнская Т.М. Комплексный подход к лечению больных микроспорией в стационаре областного КВД // Современные проблемы детской дерматовенерологии и микологии: Мат. Всерос. конф. – М., 2002. – С. 34-35.
11. Ерзина Е.И., Позднякова О.Н. Современные особенности эпидемиологии микроспории и трихофитии у детей. Медицинские науки №1-2012г.
12. Кашкин П.Н., Шеклаков Н.Д. Руководство по медицинской микологии. – М.: Медицина, 1978. – 325 с.

13. Кашкин П. Н, Лисин В. В. Практическое руководство по медицинской микологии. - Л.: Медицина, 1990. -195 с.
14. Королюка А.М., Стойчакова С.Б. Медицинская микробиология. / Под ред.. - СПб.: ЭЛБИ, 2002.- 267 с.
15. Корсунская И. М. Дерматофитии с поражением волос у детей (клиника и лечение)/И. М. Корсунская, О. Б. Тамразова. М.—, 2004. —31 с.
16. Кривошеина Ю.С. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии. / Под ред..- М.: Высшая школа, 2001.- 224 с.
17. Кубанова А.А., Кисина В.И., Блатун., Л.А., Вавилов А.М. и др.; под общ. ред. А.А. Кубановой, В.И. Кисиной. М.: Литтерра. Рациональная фармакотерапия заболеваний кожи и инфекций, передаваемых половым путем: Рук. для практикующих врачей / 2005; 882 с.
18. Кубанова А.А. Дерматовенерология, 2010. – 311 с.
19. Кутасевич Я.Ф., Кадыгроб И.В., Сербин И.В. Трихомикозы – проблема не только детей // Клиническая иммунология. Аллергология. Инфектология. – 2008. – №12. – С.45-48.
20. Лещенко П. Н. Лабораторная диагностика грибковых заболеваний. - М.: Медицина, 1987. – 146 с.
21. Лысак В.В. Микробиология. - Минск: БГУ, 2007. - 426 с.
22. Медведева Г. В., Антонов В. Б., Леина Л. М. и др. Трихофития: современные представления об этиологии, клинической картине, особенностях диагностики и терапии // Клин. дерматол. и венерол. - 2007. - Т. 4. - С. 70 - 74.
23. Медведева Е.А., Чистякова Э.В., Выговская Т.Л., Фахретдинова Х.С. Особенности эпидемиологии, клиники, терапии и профилактики зоонозной трихофитии: методические рекомендации для студентов медицинских институтов и врачей-интернов. – Уфа: Изд-во БГМИ, 1989. – 17 с.

24. Медведева Т.В., Леина Л.М., Богомолова Т.С. Ошибки в диагностике и лечении трихомикозов // Клиническая дерматология и венерология – 2010. – №3. – С. 87-92.
25. Минеева Л.А. Микробиология. - М.: Академия, 2010. - 464 с.
26. Мухамадеева О.Р. Антимикотическая активность препарата-пробиотика «Бактиспорин» *in vitro* и его использование в комплексном лечении зооантропонозной трихофитии: дис. ... канд. мед. наук. – Уфа, 2005. –134с.
27. Нурматов У.В., Туляганов А.Р. VIII Всероссийский съезд дерматовенерологов: Тезисы научных работ. Ч 1. // Дерматология. – М, 2001. С.154–155.
28. Потоцкий И.И. Справочник дерматовенеролога, 1985. – 224 с.
29. Райкис Б. Общая микробиология с вирусологией и иммунологией. - М.: Триада - Х, 2002.- 347 с.
30. Сергеев, Ю. В. Гены, молекулярные методы и новые концепции в диагностике грибковых заболеваний / Ю. В. Сергеев, А. Ю. Сергеев // Проблемы медицинской микологии. – 2006. – Т. 8, № 2. – С. 85.
31. Скрипкин Ю.К. Руководство по детской дерматовенерологии. – М.: «Медицина», 1983. С. 135–143.
32. Соколовский Е.В. Кожные и венерические болезни, 2008. – 520 с.
33. Степанова Ж.В. Современные методы терапии микозов у детей // Материалы Первого Всероссийского конгресса по медицинской микологии. – М., 2003. – С. 178-179.
34. Степанова Ж.В. Грибковые заболевания. – М.: Миклом – 2005. –124 с.
35. Суворова К. Н. Куклин В. Т., Рукавишникова В. М. Детская дерматовенерология: Руководство для врачей-курсантов последипломного образования. Казань, 1996. 441 с.

36. Тарануха Н.Н. Комплексное лечение больных зооантропонозной микроспорией волосистой части головы гризеофульвином и гепатопротекторами (клинико-экспериментальное исследование): Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 1990. – 24 с.
37. Хамзина О.Ш. Ферментативная активность нейтрофилов у больных дерматофитиями // Вестн. дерматол. – 1996. – №1. – С. 36-37.
38. Хисматуллина З.Р. Клинико-иммунологическое своеобразие трихофитии, обусловленной *T.verrucosum*, *T.mentagrophytes* var. *gypseum*, *T.quinckeanum*: дис. ... канд. мед. наук. – Уфа, 1995. – 124с.
39. Хисматуллина З.Р., Фахретдинова Х. С, Мухамадеева О.Р. Зооантропонозная трихофития. - Уфа: Башкириздат, 2004. – 125 с.
40. Хисматуллина З. Р. Мухамадеева О. Р. Способ выделения дерматофитов//Вестн. дерматол. - 2006. - Т. 2. - С. 25-27.
41. Хисматуллина З.Р. Зооантропонозная трихофития в Республике Башкортостан (этиология, клиника, диагностика, лечение): дис. ... д-ра мед. наук. - Уфа, 2007. - 158с.
42. Хисматуллина З.Р., Мухамадеева О.Р. Функциональная активность нейтрофилов у детей больных зооантропонозной трихофитией при комплексном лечении с использованием препарата Имунофан // Практическая медицина. – 2012. – №5 (60). – С. 205-207.
43. Цой М. Р., Алаева М. Д. // Тез. докл. VII Росс. съезда дерматологов и венерологов. Казань, 1996. Ч. 2. С. 96
44. Чеботарёв В.В, Тамразова О.Б, Чеботарёва Н.В, Одинец А.В. Дерматовенерология, 2013. – 453 с.
45. Atlas of clinical fungi, 2nd edtion. G.S. de Hoog, J. Guarro, J. Gene, M.J. Figueras. Universitet Rovire i Virgili, Reus. Spain, 2000.
46. Chen A.W., Kuo J.W., Chen J.S. et al. Dermatophyte pseudomycetoma: a case report. Br J Derm 1993; 129: 729–732.
47. De Hoog G.S., Guarro J., Gene J., Figueras M.J. Atlas of clinical fungi. 2 ed.Spain: Reus 2000; 1126.

48. King R.D. Nutritional immunity in cutaneous fungous infection // Int. J. Dermatol. – 1986. – Vol. 15, №5. – P. 358-359.
49. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. Gel electrophoresis of DNA. In: Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (Eds.) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, chapter 6. 1989
50. Westermeier, R. *Electrophoresis in Practice: a Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separation*, VCH, Weinheim. 1997.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

# СЕРТИФИКАТ

Настоящим удостоверяется, что

**Кинзябаева Гульназ Ильсуровна**

приняла(а) участие в научно-практической конференции

"Актуальные вопросы бактериологической диагностики инфекционных заболеваний"

Директор ФБУН ГНЦ ПИБ  
член-корреспондент РАН  
доктор медицинских наук  
профессор



И.А. ДЯТЛОВ

4 марта 2015г., Уфа

Московский государственный университет  
имени М.В.Ломоносова



**ЛОМОНОСОВ**

МЕЖДУНАРОДНЫЙ МОЛОДЕЖНЫЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ

# СЕРТИФИКАТ

НАСТОЯЩИМ ПОДТВЕРЖДАЕТСЯ, ЧТО

*Кинзябаева*

*Тулъмаз Ильсуровна*

ПРИНЯЛ(А) УЧАСТИЕ  
В XXII МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ  
СТУДЕНТОВ, АСПИРАНТОВ И МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ  
«ЛОМОНОСОВ»

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ  
МЕЖДУНАРОДНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ  
«ЛОМОНОСОВ»,  
КАНДИДАТ ЭКОНОМИЧЕСКИХ НАУК

И.А.АЛЕШКОВСКИЙ



МИНИСТЕРСТВО  
ОБРАЗОВАНИЯ  
И НАУКИ РФ



МОСКОВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА



Координационный совет  
по делам молодежи  
в научной и образовательной сферах  
при Совете при Президенте РФ  
по науке и образованию

13 – 17 апреля 2015 г.



# iВолга

Молодёжный форум ПФО **2015**

## СВИДЕТЕЛЬСТВО

настоящее свидетельство подтверждает, что Кинзябаева  
(фамилия, имя, отчество)

Гульназ Ильсуровна

с 17 июня по 27 июня 2015 года освоил(а) тренинговую программу  
смены «Инновации и техническое творчество»  
(наименование программы)

Молодежного форума Приволжского федерального округа «iВолга - 2015».

Вице-губернатор -  
руководитель Администрации  
Губернатора Самарской области

Д.Е.Овчинников

Самарская область,  
17-27 июня 2015 года



Полномочный представитель  
Президента Российской Федерации  
в Приволжском федеральном округе

# ДИПЛОМ

награждается

Кинзябаева Гульназ Инсуровна ,

ставший(ая) лауреатом в конкурсе проектов  
Молодежного форума  
Приволжского федерального округа  
«iВолга - 2015»  
(федеральный этап)



**iВолга**  
Молодежный  
форум ПФО **2015**

М.Бабич

**Проект заявки на форум «iВолга – 2015»  
от кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии  
ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России**

**1. Набор для ПЦР-детекции возбудителя зооантропонозной трихофитии (*Trichophyton verrucosum*) в клиническом материале:**

1.1. Габаритные размеры 12×12×10 см, 12×12×10 см, 12×7×7 см

1.2. Требования к энергетическому обеспечению –нет.

Фотографии экспоната:



Фото 1.



Фото 2.

### 1.3. Краткое описание экспоната.

Набор для ПЦР-детекции возбудителя зооантропонозной трихофитии (*Trichophyton verrucosum*) в клиническом материале разработан сотрудниками кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России. Площадка для организации и масштабирования производства - ООО МИП «Биоскрин».

Дерматомикозы относятся к числу наиболее распространенных инфекций человека. Среди них особенно для Республики Башкортостан актуальна зооантропонозная трихофития, которая занимает третье место после микозов стоп и микроспории. По данным клинической лаборатории РКВД г. Уфа в этиологической структуре трихофитии преобладает *Trichophyton verrucosum*.

При подозрении на зооантропонозную трихофитию основным методом лабораторной диагностики, как и при других дерматофитиях, является обнаружение возбудителя в исследуемом материале (частицы

кожи и волосы). Для этого в настоящее время применяются следующие методики:

1. Микроскопия клинического материала
2. Культуральный метод

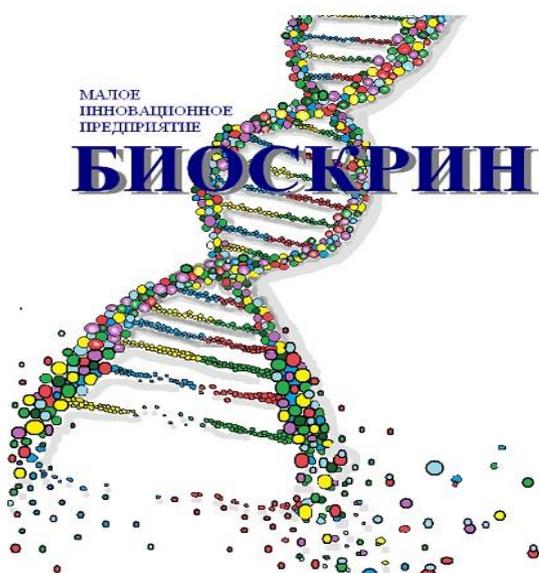
Однако используемые методы имеют ряд существенных недостатков:

1. Микроскопия клинического материала не позволяет идентифицировать грибы в патологическом материале до вида по их морфологии. Кроме того чувствительность этого метода недостаточна.

2. Культуральный метод исследования является очень трудоемким и занимает от 5 до 30 дней. Несмотря на то, что специфичность этого метода значительно выше, чем при микроскопии клинического материала, чувствительность этого метода тоже не достаточна. Стоимость бактериологического исследования 800-1000 руб.

Благодаря использованию ПЦР, время, необходимое для постановки диагноза и начала лечения сокращается до 3-4 часов. Стоимость набора существенно ниже - до 1500 – 2000 руб. на 100 образцов. Следует отметить, что диагностическая эффективность метода ПЦР выше на 9,8% по сравнению с микроскопическим методом и на 17,1% - культуральным.

**2. Логотип компании, контактные данные**



ООО МИП «БИОСКРИН», 450054, г. Уфа, Проспект Октября, 71

### **3. Иные материалы.**

Набор реагентов полной комплектации предназначен для полного анализа, включая выделение ДНК из клинического материала, проведении мультиплексной ПЦР и детекции результатов методом электрофореза в агарозном геле.

Комплекты реагентов для ПЦР с амплификацией ДНК *Trichophyton verrucosum* выпускаются в различных форматах в зависимости от количества реакций и степени их готовности к постановке реакции.

- реакционная смесь - требуется предварительное смешение компонентов (фото 1)

- готовая реакционная смесь для амплификации под слоем масла - полностью готовые к применению смеси расфасованные в индивидуальные пробирки, требуется только добавить анализируемую пробу (фото 2).

**4. Сведения о выставочных конструкциях** – стенд, ноутбук и кабель питания (для презентации диагностического набора).

#### **Исполнители:**

студентка группы МБ-301Б медико-профилактического факультета с отделением микробиологии БГМУ Кинзябаева Гульназ Ильсуровна;

студентка группы Л-112А лечебного факультета БГМУ Титова Анастасия Аркадьевна;

студентка группы МПФ 402А медико-профилактического факультета БГМУ Абдуллина Айгуль Миграновна;

зав. кафедрой фундаментальной и прикладной микробиологии, профессор, д.м.н. Мавзютов Айрат Радикович;

старший преподаватель кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии Титова Татьяна Николаевна.



**XXII Международная  
научная  
конференция  
студентов,  
аспирантов  
и молодых ученых**

# **ЛОМОНОСОВ-2015**

**Секция «Биология»**

13-17 апреля

**ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ**

Москва  
МАКС Пресс  
2015

Применение метода полимеразной цепной реакции в лабораторной диагностике

зооантропонозной трихофитии, вызванной *Trichophyton verrucosum*

Кинзябаева Гульназ Ильсуровна, Титова Анастасия Аркадьевна,  
Абдуллина Айгуль Миграновна

Башкирский Государственный Медицинский Университет, г.Уфа

Кинзябаева Гульназ Ильсуровна, 89871097293, Gulnaz1104@yandex.ru

Целью исследования являлась оценка эффективности использования метода ПЦР, по сравнению с микроскопическим и культуральным методами в лабораторной диагностике зооантропонозной трихофитии, вызванной *T.verrucosum*.

За период 2011-2014 гг. было обследовано 214 пациентов с подозрением на зооантропонозную трихофитию и 169 пациентов с другими кожными заболеваниями (псориазом, экземой). Клинический материал подвергался микроскопическому и культуральному исследованию, а также детекции возбудителя методом ПЦР. Для проведения сравнительного анализа информативности используемых методов детекции рассчитывали показатели специфичности, чувствительности, диагностической эффективности и прогностической ценности.

Результаты исследований выявили более высокие значения указанных показателей во всех группах обследуемых для метода ПЦР. В группе детей 3-6 лет чувствительность ПЦР составила – 95,6% (91,3-99,9;  $p<0,05$ ), специфичность – 95,4% (90,9-99,9;  $p<0,05$ ), а диагностическая эффективность – 95,5% (92,4-98,6;  $p<0,05$ ), а в группе детей 1-2 лет чувствительность – 88,9% (78,9-98,9;  $p<0,05$ ), специфичность – 94,4% (89-99,8;  $p<0,05$ ) и диагностическая эффективность – 92,6% (87,6-97,6;  $p<0,05$ ). В группе обследуемых от 15 лет и старше чувствительность метода ПЦР составила – 97,8% (96,3-99,3;  $p<0,05$ ), специфичность – 97% (95,2-98,8;  $p<0,05$ ), диагностическая эффективность – 97,5% (95,9-99,1;

$p < 0,05$ ). Вместе с тем статистически значимые различия между изучаемыми методами наблюдались лишь в группе детей 7-14 лет, где чувствительность составила – 98,2% (97-99,4;  $p < 0,05$ ), специфичность – 97,5% (95,8-99,2;  $p < 0,05$ ), а диагностическая эффективность – 97,9% (96,9-98,9;  $p < 0,05$ ). При этом прогностическая ценность положительного результата (ПЦ<sup>+</sup>) в этой группе обследуемых оказалась также наибольшей (98,2%).

Полученные данные свидетельствуют о высокой диагностической эффективности, чувствительности и специфичности метода ПЦР в лабораторной диагностике зооантропонозной трихофитии, по сравнению с микроскопическим и культуральным методами и обосновывают необходимость внедрения молекулярно-генетических исследований в практическое здравоохранение при диагностике дерматомикозов.

**Уважаемый пользователь!**  
Обращаем ваше внимание, что система Антиплагиат отвечает на вопрос, является ли тот или иной фрагмент текста заимствованным или нет. Ответ на вопрос, является ли заимствованный фрагмент именно плагиатом, а не законной цитатой, система оставляет на ваше усмотрение. Также важно отметить, что система находит источник заимствования, но не определяет, является ли он первоисточником.

Информация о документе:	
Имя исходного файла:	Антиплагиат.docx
Имя компании:	Башкирский государственный медицинский университет
Тип документа:	Прочее
Имя документа:	Диплом Кинзябаевой
Дата проверки:	28.06.2016 12:45:00
Модули поиска:	Интернет (Антиплагиат), Диссертации и авторефераты РГБ, Модуль поиска ЭБС "Лань", Башкирский государственный медицинский университет, Кольцо вузов
Текстовые статистики:	
Индекс читаемости:	сложный
Неизвестные слова:	в пределах нормы
Макс. длина слова:	в пределах нормы
Большие слова:	в пределах нормы
Оригинальные блоки:	78.02%
Заимствованные блоки:	21.98%
Заимствование из "белых" источников:	0%
Итоговая оценка оригинальности:	<b>78.02%</b>

28.06. 2016

450077, г. Уфа, ул. Пушкина, 96/98 ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА	
---	---

**Отзыв научного руководителя**

**о прохождении дипломной практики**

студентки 4 курса обучения

медико-профилактического факультета с отделением микробиологии

ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России

Кинзябаевой Гульназ Ильсуровны по теме:

«ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В  
ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ЗООАНТРОПОНОЗНОЙ  
ТРИХОФИТИИ, ВЫЗВАННОЙ *TRICHOPHYTON VERRUCOSUM*».

Студентка Кинзябаева Г.И. проходила дипломную практику в Башкирском государственном медицинском университете, на кафедре фундаментальной и прикладной микробиологии.

Впечатление и общая оценка данного дипломного проекта положительные. В процессе работы над дипломной работой Кинзябаева Г.И. умело систематизировала теоретические аспекты рассматриваемой темы и применила их на практике. Она владеет основными молекулярно-биологическими методами исследований и имеет хорошую теоретическую подготовку.

Научный руководитель:  
к.б.н., доцент кафедры фундаментальной  
и прикладной микробиологии

*Раши* — Р.А. Фатхутдинова

## РЕЦЕНЗИЯ

на дипломную работу студентки 4 курса обучения  
медико-профилактического факультета с отделением микробиологии

ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России

Кинзябаевой Гульназ Ильсуровны.

На рецензию представлена дипломная работа на тему «Применение метода полимеразной цепной реакции в лабораторной диагностике зооантропонозной трихофитии, вызванной *Trichophyton verrucosum*».

Дипломная работа состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов и приложений.

Студентом обработано большое количество теоретического материала, на достаточно высоком теоретическом и методологическом уровне проведено исследование методов диагностики зооантропонозной трихофитии. Материал в работе изложен с соблюдением внутренней логики, между разделами существует логическая взаимосвязь.

Содержание работы говорит о том, что автор проявил себя грамотным специалистом, умеющим самостоятельно работать со специальной литературой, способным конкретизировать и формализовать поставленную задачу и решить ее практически.

Дипломный проект написан на хорошем теоретическом и практическом уровне. При его написании автор умело трансформирует полученные теоретические навыки в область практической деятельности.

к.б.н., ст. преподаватель кафедры фундаментальной  
и прикладной микробиологии



Ю.Л. Баймурзина

## РЕЦЕНЗИЯ

на дипломную работу студентки 4 курса обучения  
медико-профилактического факультета с отделением микробиологии

ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России

Кинзябаевой Гульназ Ильсуровны.

На рецензию представлена дипломная работа на тему «Применение метода полимеразной цепной реакции в лабораторной диагностике зооантропонозной трихофитии, вызванной *Trichophyton verrucosum*»

Работа построена по традиционной схеме, включает такие разделы, как введение, литературный обзор, описание объектов и методов исследований, предоставление собственных данных и их обсуждения, заключение, выводы, список литературы, приложения. Использованный практический материал достоверен, сделанные выводы обоснованы, рекомендации имеют практическую значимость. Дипломная работа имеет теоретическое значение, в ней реализована методика оценки эффективности метода ПЦР с учетом особенностей лабораторной диагностики.

Дипломная работа Кинзябаевой Г.И. удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым к дипломным работам, может быть допущена к защите и заслуживает оценки отлично.

к.б.н., доцент кафедры фундаментальной  
и прикладной микробиологии



Б.Р. Кулуев