

**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**

Ханафина Джамиля Галимовна

**РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ ПРЕПАРАТИВНОГО
ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ГРИБОВ ИЗ НОГТЕВЫХ ПЛАСТИНОК**

Руководитель:

доцент, к.б.н

Фатхутдинова Р.А.

Уфа – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1. Эпидемиология	8
1.2. Лечение онихомикозов	10
1.3. Классификация	11
1.4. Этиология	13
1.5. Диагностика	17
1.5.1. Микроскопия материала	19
1.5.2. Культуральное исследование	21
1.5.3. Молекулярно-биологические методы	24
1.5.4. Гистологическое исследование	26
1.5.5. Иммунологические методы	27
1.5.6. Инструментальные методы	27
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	29
2.1. Взятие материала	29
2.2. Микроскопическое исследование	29
2.4. Выделение ДНК	32
2.4.1. Выделение при помощи 2-4М растворов щелочи	32
2.4.2. Выделение при помощи набора «Реамикс» фирмы НПФ «Гентех»	34
2.4.3. Выделение при помощи набора «ДНК-сорб С» фирмы «ИнтерЛабСервис»	34
2.4.4. Выделение препаратов ДНК грибов из клинического материала методом нуклеосорбции	35
2.4.4. Выделение ДНК проводят с использованием стандартного набора «ДНК-сорб-С» фирмы «Интерлабсервис»	35
2.4.5. Выделение с помощью набора «ДНК-сорб С» из образцов предварительно обработанных стеклянным порошком	37
2.5. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	38
2.6. Электрофорез	41

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	44
3.1. Микроскопическое исследование	44
3.2. Культуральное исследование	48
3.3. Результаты ПЦР	54
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	61
ВЫВОДЫ	62
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	63
ПРИЛОЖЕНИЕ	70

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

дНТФ – дезоксирибонуклеотидтрифосфаты

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ТБЕ – трис-боратный буфер

УФ – ультрафиолет

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Онихомикоз – грибковое поражение ногтя, вызываемое различными видами патогенных грибов. При этом поражаются ногтевые структуры, такие как, ногтевая пластина, кутикула, мезенхимальные ткани, ногтевые складки. Также грибковая инфекция может поражать ногтевые структуры по отдельности [Haley L., Daniel CR., 1990]. Практически всегда грибковое заболевание начинается между пальцев рук или ног, а затем уже переходит на ногтевую пластину. Онихомикозами страдают от 5 до 10% от всего населения.

Возбудителями онихомикозов являются первично патогенные кератофильные грибы – дерматомицеты. Также заболевание могут вызывать дрожжевые и плесневые грибы [Bonifaz A., Cruz-Agular P., 2007]. Основными возбудителями являются *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes var. interdigitale*. *Trichophyton rubrum* – антропофильный грибок, т.е. человек является естественным резервуаром [Файзуллина Е. В., 2014].

Классические методы диагностики онихомикозов, основанные на микроскопии патологического материала и выделении культуры возбудителя, достаточно трудоемки, требуют значительных временных затрат, отличаются невысокой чувствительностью. По данным отечественных и зарубежных исследователей чувствительность культурального метода составляет около 50 % [Лещенко В.М., 2006, Сергеев А.Ю., 2006].

Микроскопия позволяет проводить дифференциальную диагностику видов онихомикоза по морфологии спор и нитей. Однако такой способ не точен на начальной стадии и при запущенной форме заболевания.

Культуральный метод является «золотым стандартом» в микологии. При этом проводится выращивание грибов на специальных микробиологических средах. Идентификация производится по виду колонии и по чистой культуре

при ее микроскопировании. Недостаток такого способа заключается в долгом росте грибка.

Но ни один из классических методов не позволяет точно и быстро идентифицировать возбудителей онихомикоза.

В связи с этим, перспективным направлением в лабораторной диагностике онихомикозов представляется обнаружение генетических маркеров возбудителей с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Цель исследования

Выявление эффективности известных наборов для выделения ДНК патогенных грибов и сравнение их с другими модифицированными методами с целью разработки более усовершенствованного способа диагностики онихомикозов.

Задачи исследования

1. Выделение ДНК грибов при помощи:

- Набора «Реамикс» фирмы «ТрифАМ»;

- Набора «ДНК-Сорб-С» фирмы «ИнтерлабСервис»;

- Химический метод с использованием 2 М, 3 М, 4 М растворов щелочи КОН;

- Выделение с помощью набора «ДНК-сорб С» из образцов предварительно обработанных стеклянным порошком.

2. Проведение амплификации всех выделенных образцов при помощи набора «ТрифАМ» который предназначен для детекции двух дерматомицетов - *Trichophyton rubrum* и *T. mentagrophytes var. interdigitale*.

3. Выявление оптимальной методики посредством сравнения выхода продуктов ПЦР.

Научная новизна

Использование стандартных схем для получения ДНК и новых модифицированных методов с варьированием различных условий с целью разработки более эффективных методов позволят определить наиболее удобные схемы выделения ДНК.

Теоритическая и практическая значимость

Совершенствование способов диагностики ониомикозов весьма актуально в связи с высокой частотой заболеваемости среди населения всех возрастных групп. Стандартные схемы и модифицированные методики позволят определить более эффективные пути выделения ДНК грибов.

Материал исследования

Материалом исследования послужил биологический материал - ногтевые пластинки пациентов больных ониомикозом Республиканского кожно-венерологического диспансера г.Уфы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Эпидемиология

Онихомикоз – поражение ногтей грибковой инфекцией. Термин «онихомикоз» ввел *P. Вирхов* в 1854 году. В России клинику заболевания описал в 1861 году П.И. Матчерский в диссертационной работе «О страданиях кожи, обуславливаемых растительным паразитом *Trichophyton tonsurans* (*trichophytiasis*)» [Антонов В.Б. с соавт., 2005].

Распространенность заболевания у населения по данным эпидемиологических исследований составляет от 10 до 20% [Васенкова, В. Ю., 2006]. Эти сведения получают по статистике обращения людей в лечебные учреждения с изменениями ногтевой пластинки, либо по заболеваемости онихомикозами. По данным ВОЗ 1/5 часть населения Земли страдает грибковыми заболеваниями, из них на долю онихомикозов приходится 15-25% [Файзуллина Е.В. с соавт., 1999].

Вклад в изучение современной эпидемиологии онихомикозов внесло общеевропейское исследование “Ахиллес”, которое проводилось в 1997–1998 гг., в ходе которого обследовали более 19000 человек. Согласно данным проекта “Ахиллес”, распространенность онихомикоза по обращаемости к врачу составила 22%, к дерматологу – 30%. В России таких крупных исследований не проводилось [Сергеев А.Ю., 2001]. Согласно данным мониторинга возбудителей микозов у пациентов в республике Башкортостан в РКВД в этиологической структуре микозов доминировал *T. rubrum* (95-95,2%), являющийся основным возбудителем онихомикоза [Медведева Т.В. с соавт., 2006; Хисматуллина З.Р. с соавт., 2011].

Заболеваемость среди различных групп населения разная. Она зависит от географических и социальных условий, возраста, пола, воздействием

профессиональных [Капулер О.М., 2002; Файзуллина Е.В., 2014] и других факторов. Грибковая инфекция не передается непосредственно от человека к человеку [Сергеев Ю. В., Сергеев А. Ю., 1998]. Инфицирование происходит в общественных местах - банях, бассейнах, душевых кабинках, спортзалах; в семье, где есть больной человек. Отпадающие чешуйки с ногтевой пластины содержат тот самый грибок [Новоселов В.С., 2004]. Дезинфицирующие средства не могут подействовать на грибок, так как у него находится в плотной кератиновой оболочке [Федоров С.М., 1999]. Таким образом, в группу риска входят работники бань, саун, шахтеры, металлурги, обслуживающий персонал медицинских учреждений. Также ношение тесной, плотной и неудобной обуви создает благоприятные условия для развития грибка [Vokhari M.A. et al., 1999]. Активация грибка может произойти при таких сопутствующих заболеваниях как сахарный диабет, иммунодефицитных состояниях, поражениях сосудистой и нервной систем, ожирениях, деформациях стоп, псориазах [Новоселов, В. С., 2004].

Чаще всего заболевают люди среднего возраста и пожилые, у детей онихомикоз практически не встречается, так как риск инфицирования увеличивается с возрастом [Сергеев Ю. В., Сергеев А. Ю., 1998].

Инфицирование происходит следующим образом: при контакте с предметами-носителями грибов их клетки попадают на здоровую кожу и прикрепляются на ней, благодаря особому ферментативному механизму. Вначале грибок питается ороговевающим эпителием, далее переходит на ногтевое ложе и распространяется на саму ногтевую пластинку [Федоров С.М., 1999; Антонов В.Б. с соавт., 2005].

Онихомикоз снижает качество жизни больного и адаптацию в социуме. Заболеваемость остается на высоком уровне и широко распространяется в обществе [Файзуллина Е.В., 2001].

Грибковые инфекции являются опасными в эпидемическом плане, так как заражаются окружающее общество больного. Больного во время болезни

«изолируют» от контактов, он должен ограничивать себя в общении. Таким образом, заболевание порождает еще и этическую проблему [Файзуллина Е.В., 2014].

1.2. Лечение онихомикозов

Лечение грибка ногтей является актуальной проблемой в современной дерматологии [Буравкова А.Г. с соавт., 2008]. Терапия бывает двух видов: наружная и системная. Наружная терапия наиболее применима в случаях, когда грибок поразил не более трети ногтевой пластинки, т.е на начальном этапе развития заболевания. В остальных случаях применяется системная терапия. Существует также комбинированное лечение, включающее различные сочетания методик: применение наружных средств, назначение антимикотиков, хирургическое удаление ногтевых пластинок.

Наиболее часто используемыми препаратами для лечения онихомикозов у взрослых является тербинафин и итраконазол; у детей - флуконазол.

Трудности в лечении онихомикоза могут быть связаны с постоянным травмированием ногтевой пластинки, сочетанием онихомикоза с поражением ногтя другим микроорганизмом (например, при псориазе), замедлением роста ногтевой пластинки [Т. В. Медведева Л. М. Леина - Электронный ресурс]. Причиной неудач лечения по мнению врачей является вина пациента (51,6%), больные считают, что в неудачах лечения виноват сам дерматолог (50,1%) [Файзуллина Е.В., 2014].

В настоящее время продолжается создание новых эффективных препаратов лечения онихомикозов, разрабатываются схемы комбинированной терапии, описываются новые возбудители патологии ногтевых пластинок.

Проблема онихомикозов продолжает представлять интерес как для врачей дерматологов и косметологов, так и для представителей других специальностей.

1.3. Классификация

Современную классификацию предложил N. Zaias в 1972 году. Она основана на принципах проникновения и распространения возбудителя в ногте и на особенностях поражения ногтевой пластинки.

Строение ногтя:

- 1) Передний свободный край (дистальная часть) – это пространство между свободным краем ногтя и поверхностью кончика пальца. В этом кармане развиваются возбудители.
- 2) Проксимальная часть ногтя либо корень.
- 3) Тело ногтя либо матрикс. Начинается под проксимальным валиком. Край зоны матрикса, который выступает из-под проксимального валика является лункой ногтя.
- 4) Боковые края, окруженные двумя валиками кожи.
- 5) Кутикула, удаляющаяся при маникюре.

Выделяют следующие клинические формы онихомикоза:

- дистально-латеральная подногтевая форма;
- поверхностная белая форма;
- проксимальная подногтевая форма;
- тотальная дистрофическая форма.

- Дистальный вариант поражения встречается чаще всех. Основным возбудителем является *T.rubrum*. Все патологические процессы происходят в ложе ногтя, т.е от свободного края инфекция распространяется к корню [Иванов О.Л., Сергеев А.Ю.,2001]. При этом наблюдаются утолщение ногтя, появление белых, желтых пятен на поверхности ногтевой пластинки, край ногтя начинается крошиться и истончается [Новоселов, В. С., 2004].

- Поверхностный онихомикоз. Основным возбудителем является *Trichophyton mentagrophytes var. interdigitale*, так как в отличие от других дерматофитов приспособлен к поражению именно роговых структур, нежели окружающей ноготь кожи [Сергеев Ю. В., Сергеев А. Ю., 1998].

- Проксимально подногтевый онихомикоз является редкой формой. Вначале появляется белое пятно возле корня, которое двигается к свободному корню. Этот путь просмотренный через микроскоп напоминает сеть туннелей [Новоселов, В. С., 2004].

- Тотально дистрофический. Является следствием дистальной и проксимального онихомикоза [Самцов А.В., 1999]. При этом поражаются все анатомические структуры ногтя: ложе, матрикс и вся ногтевая пластинка [Кубасова, Н. Л., 2015].

На 90% случаев приходится дистальная форма, в 7% случаях – белый поверхностный тип, в 3% – проксимальный [Romano С. et al., 2005].

Формирование того или иного клинического типа онихомикоза определяется свойствами возбудителя и путем его инвазии в ноготь [Baran R., Nuy R., Haneke E. et al., 2006].

1.4. Этиология

Около 50 видов патогенных и условно-патогенных грибов могут вызывать онихомикоз. Доминирующее положение среди возбудителей занимают дерматофиты, на их долю приходится 90% случаев. Основными возбудителями являются *Trichophyton rubrum*, на его долю приходится 93-95% случаев и *Trichophyton mentagrophytes var. interdigitale* доля которого 3-4% [Самцов А.В., 1999].

Видовые характеристики основных возбудителей:

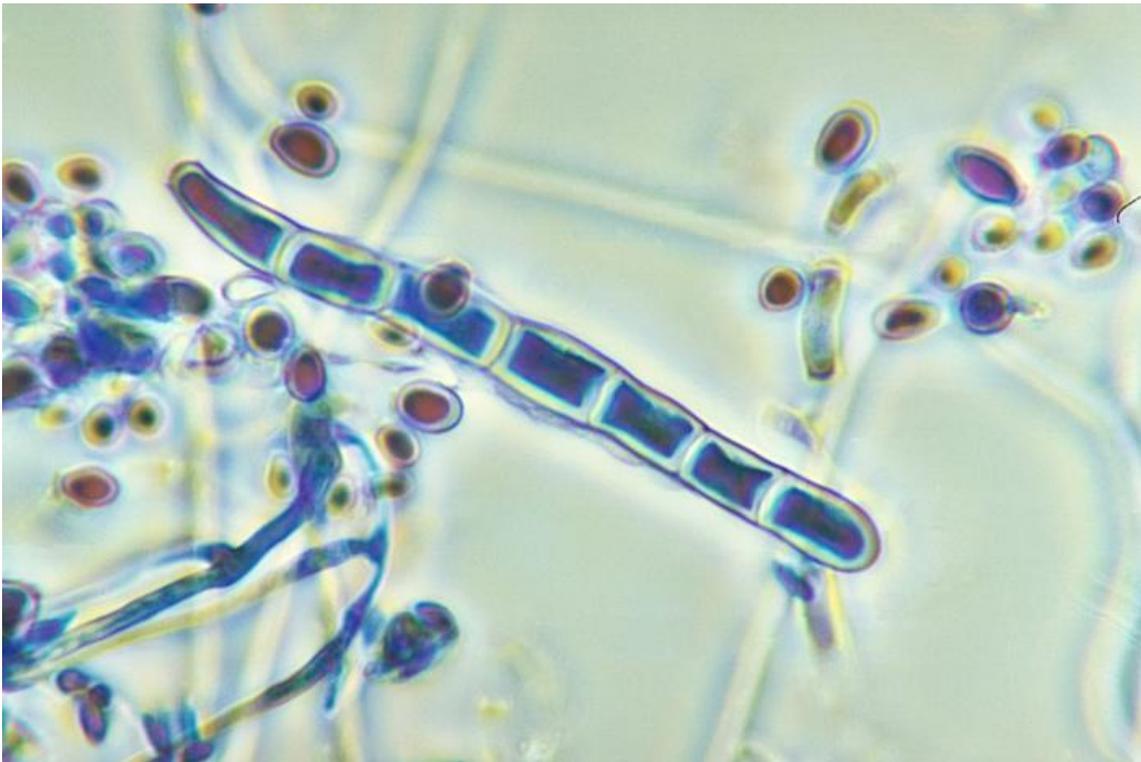


Рисунок 1. Микрофотография *Trichophyton rubrum*.

Trichophyton rubrum (рис.1)- антропофильный вид; основным резервуаром является человек. Является основным возбудителем онихомикоза. Уреазной активности нет [Саттон Д., 2001].

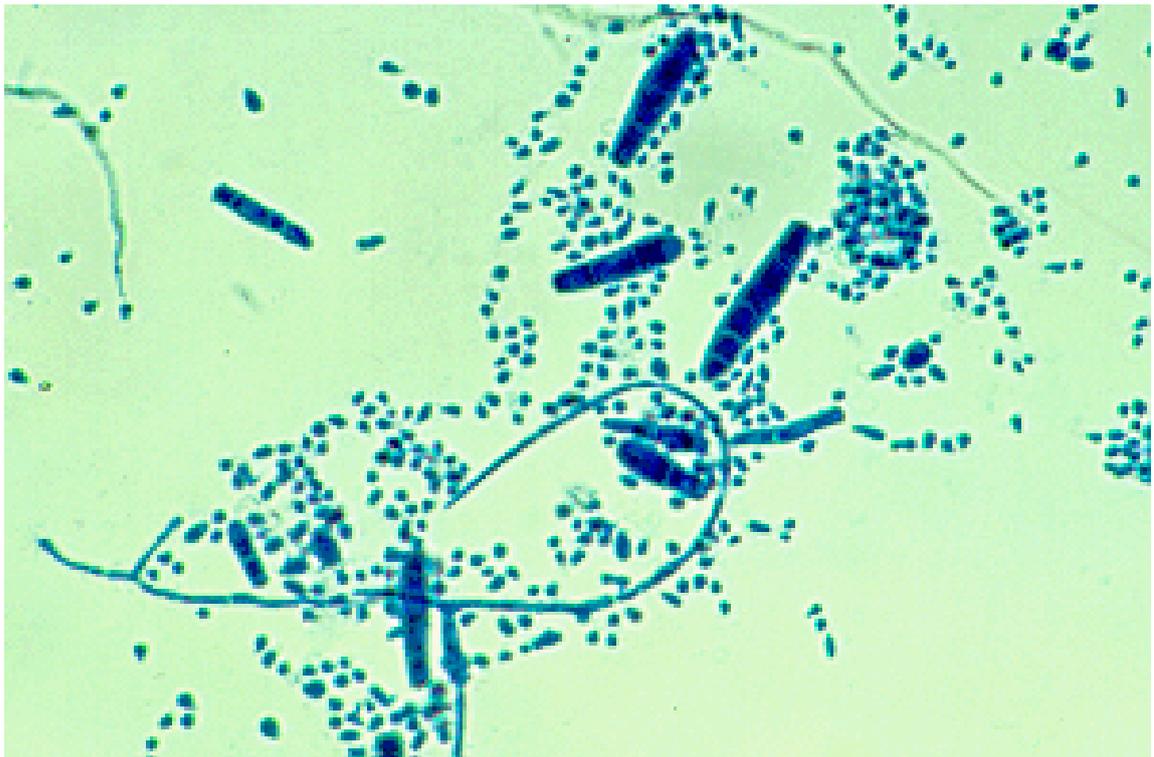


Рисунок 2. Микрофотография *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*.

Trichophyton mentagrophytes var. *interdigitale* (рис.2) - антропофильный вид. От *T.rubrum* отличается округлыми конидиями. Также дает положительный результат в тестах на уреазу и перфорацию волос [Саттон Д., 2001].

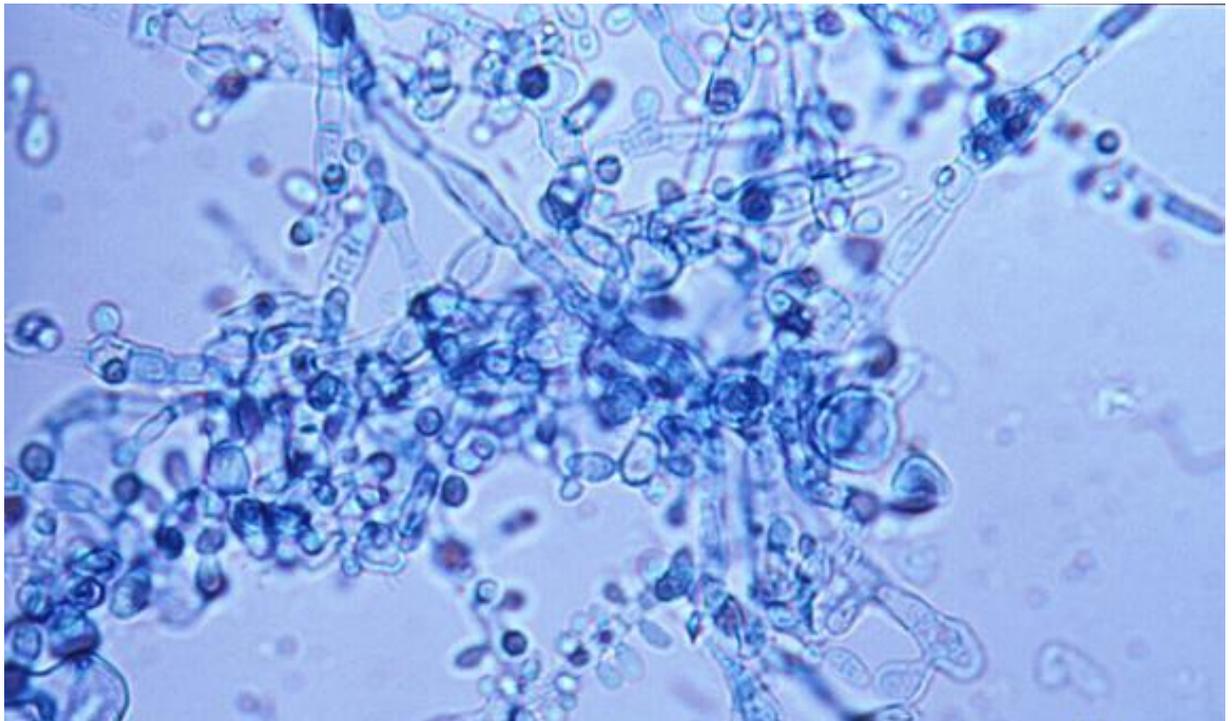


Рисунок 3. Микрофотография *Trichophyton tonsurans*.

Trichophyton tonsurans (рис.3) - антропофильный вид; передается от человека к человеку. От *T.rubrum* отличается уреазной активностью. Также у этого вида имеется большое разнообразие форм конидий. Отличием от *Trichophyton mentagrophytes var. interdigitale* является потребность в тиамине [Саттон Д., 2001].

В остальных случаях онихомикоз вызывают недерматофиты - дрожжевые грибы *Candida spp* и плесневые - *Aspergillus spp*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Scytalidium spp* [Bonifaz A., Cruz-Agular P., Ponce R.M., 2007].

На долю рода *Candida spp* приходится 5-10% . Основными видами являются *C. albicans*, вызывающие кандидоз ногтей в 90% случаев. Реже выделяются *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, и *C. guilliermondii*.

Плесневые грибы *Aspergillus spp.* выделяются в 5-11% случаях. Далее идут виды *Scopulariopsis brevicaulis*, реже - *Scytalidium spp.* Прочими представителями плесневой этиологии являются виды родов *Dematiaceae*, а также *Fusarium* и *Acremonium spp* [Сергеев А.Ю., 2001].

Встречается также инфекция смешанной этиологии, вызываемая в комплексе дерматофитов с плесневыми и дрожжевыми грибами. Такие сложные взаимоотношения еще до конца не изучены [Сергеев А.Ю., 2001].

Определение этиологии онихомикоза является главным при назначении лечения.

1.5. Диагностика

На данный момент известны методы разработанные несколько десятков лет назад, а также новейшие молекулярно-генетические, закрепившиеся в микологии в связи с введением в нее методов молекулярной биологии, что значительно облегчает диагностику заболеваний [Ebiharta M. et al., 2009].

Выделяют следующие методы выявления грибковой инфекции:

- 1) Микроскопия препаратов.
- 2) Культуральное исследование.
- 3) Молекулярно-биологические методы.
- 4) Гистологическое исследование.
- 5) Иммунологические методы.
- 6) Инструментальные методы.

Взятие патологического материала.

Берут материал непосредственно из очага поражения в асептических условиях [Сбойчаков В.Б., 2008]. Конкретный участок ногтя, из которого следует брать материал, определяется патогенетическим типом онихомикоза, проявляющимся клинической формой [Сергеев А.Ю. с соавт., 2002].

Правильное взятие материала из пораженных ногтей – залог успешного микробиологического исследования [А.Ю.Сергеев 2000; Герасимчук Е.В., Герасимчук М.Ю. 2011]. Ногти обрабатывают 70% медицинским спиртом и отбирают материал по всем слоям срезая скальпелем, кусачками либо маникюрными ножницами. Существует более эффективный метод взятия патологического материала. Для этого используются методы аппаратной обработки пораженных ногтевых пластин, также делаются соскобы из-под ногтевой пластики или с ее поверхности.

1) Аппарат «Podolog nova». В нем используются металлические фрезы с тонкой поперечной насечкой, частота вращения в котором составляет 10 000 оборотов в минуту. Аппарат оснащен пылесосом позволяющий избежать рассеивания взвеси кератина [Макова Г.Н. с соавт., 2006] , что является очень важным аспектом при работе с инфицированным материалом. При его использовании эффективно удаляются пораженные ногтевые пластины и подногтевой гиперкератоз [Цыкин, А.А., 2008].

2) Использование зубного бура [Сбойчаков В.Б., 2008]. Впервые опыт подобного удаления ногтя и сбора материала для микробиологического исследования был опробован А. М. Ариевичем, который использовал бормашину [А.Ю. Сергеев, 2003].

3)Использование совершенных моделей аппаратов, позволяющих большему удалению материала [А.Ю. Сергеев, 2003].

Метод аппаратной обработки повышает эффективность лечения, т. к захватывает все пораженные части ногтя [Цыкин, А.А., 2008], также позволяет получать материал в виде мелких частиц, в том числе с труднодоступных участков ногтя [Шикалов Р.Ю. с соавт., 2014].

Материал доставляют в пакетах во избежание подсыхания и контаминации посторонними агентами.

1.5.1. Микроскопия материала

Целью всякого микробиологического исследования является установление природы микроорганизма, далее идет установление рода и вида гриба – возбудителя.

Лабораторную диагностику микозов начинают с микроскопии патологического материала, его посева на питательные среды выделения гриба в чистой культуре [Иванова Ю.А., 2011].

Материал обрабатывают 10-30% раствором щелочи КОН в чистом виде для растворения ногтевого кератина и просветления (мацерации) препарата [Разнатовский К.И. с соавт., 2003]. Можно использовать различные добавочные растворы, такие как, NaOH, сульфида натрия, диметилсульфоксида, чернила

для контрастирования грибов. Покрывают покровным стеклом и нагревают над пламенем горелки [З. Р. Хисматуллина, Г. А. Терегулова, 2012]. После экспозиции нативные (неокрашенные) препараты микроскопируют в светооптическом микроскопе [Цыкин А.А., 2008]. При микроскопии обнаруживается мицелий – гифы гриба, а также почкующиеся клетки [Сергеев Ю. В., Сергеев А. Ю., 1998].

Такой способ микроскопического исследования носит название – метод висячей капли [Сергеев А. Ю., Сергеев Ю. В., 2003]. Для лучшей видимости грибов, в дополнении к щелочи используют различные красители (Шварца-Ламкинса, хлоразол черный Е) [Вулф К. с соавт., 2007].

Также проводят микроскопию окрашенных препаратов – делают фиксированные мазки, окрашенные по Граму, метиленовым синим, по цилю-Нильсену, по Романовскому-Гимзе [Сбойчаков В.Б., 2008].

Существует еще один метод микроскопии, используемый прямую иммунофлюоресценцию [Сергеев А. Ю., Сергеев Ю. В., 2003]. При этом препараты просматривать в люминесцентном микроскопе, добавляя к препарату с щелочью флюоресцентный маркер - калькофлюор белый [Пупкова М. А., 2010]. Краситель взаимодействует с полисахаридной клеточной стенкой гриба и дает флюоресцентное свечение под воздействием ультрафиолетовых лучей. Структуры гриба имеют голубую и зеленую окраску [Сбойчаков В.Б., 2008].

Такое исследование позволяет определить грибковую природу инфекции, либо другими словами провести индикацию гриба – его наличие в материале.

Самым существенным недостатком микроскопии является то, что на просветление препарата щелочью (экспозицию), особенно фрагментов ногтя [Касихина Е. И. с соавт., 2012] требуется до нескольких часов. Такого недостатка лишен метод диагностики по изменению электросопротивления пластинки изобретенный С.А. Суворовым, по его методу если электросопротивление падает ниже указанной метки, то это свидетельствует о

наличии микотического поражения [Суворов С.А., 1994]. Преимуществами цитологического исследования служат: возможность забора патологического материала из очага поражения, быстрота подготовки препаратов на стекле, быстрая выдача результата [Сергеев А. Ю., Сергеев Ю. В., 2003] , также такой способ позволяет быстро провести ориентировочную дифференциальную диагностику основных видов онихомикоза по морфологии нитей и спор [Чухловин А.Б. с соавт., 2008].

1.5.2. Культуральное исследование

Культуральный метод исследования позволяет идентифицировать конкретного возбудителя [Самцов А.В., 1999]. Этот метод является «золотым стандартом» в медицинской микологии [Рукавишников В.М., 2003].

Посев материала.

На питательные среды засевают соскобы, чешуйки и ногтевые пластинки, предварительно измельченные до малых размеров. В стерильном ламинарном боксе бактериологической петлей или иглой предварительно простерилизованной в пламени горелки делают посев на среды [Сергеев А. Ю., 2001]. Материал может быть посеян на твердую и жидкую среду [Цыкин, А.А., 2008] , соответственно на скошенный агар в пробирке и на чашку Петри со средой. При посеве на чашку Петри необходимо среду разделить на сектора и провести засев фрагментами ногтей, также можно провести посев в заранее отмеченные точки [Сбойчаков В.Б., 2008]. Посев в точки объясняется тем, что рост гриба может наблюдаться не во всех случаях [Кашкин П.Н. с соавт., 1983] т.е можно сделать посев в 20 точек и при росте культуры в 5 точках результат можно объявить положительным, т.е для постановки диагноза необходим рост

культуры по процентному соотношению из 100% точек в не менее 25% от общего числа засеянного материала [English M.P., 1976; Свиридова К. В., 2009; Walshe M.M. et al., 2000].

Использование чашек Петри имеет преимущества и недостатки, по сравнению с флаконами. В чашки можно посеять много материала; в них быстрее, чем в пробирках формируются органы спороношения [Паулов О.И. с соавт., 2008]. Недостатком посева в чашку Петри является то, что это менее безопасно, так как при просмотре чашка может случайно открыться. Что касается флаконов, на них надеваются специальные крышечки либо ватно-марлевые пробки, которые плотно закупоривают флакон [Сергеев Ю. В., Сергеев А. Ю., 1998].

Культивирование и интерпретация результатов.

Для посева используются разнообразные питательные среды. Так как грибы обладают сахаролитической активностью, их выращивают на средах с углеводами, на таких как: стандартная среда Сабуро, Сабуро с добавкой 4% глюкозы, сусло-агар, картофельный агар (КА), картофельно-глюкозный агар (КГА) [Нетрусов А.И. с соавт., 2008].

Также в среды надо добавлять антибиотики, для подавления роста бактериальной флоры грибов-контаминантов, попадающих их воздуха [Сергеев Ю. В., Сергеев А. Ю., 1998]. Самые распространенные антибиотики это-левомицетин и циклогексимид, пенициллин, стрептомицин, тетрациклин [Сбойчаков В.Б., 2008]. Существует специальная техника посева, при которой материал сеют на две среды: с антибиотиком и одновременно на среду Сабуро без антибиотика. Преимуществом является то, что при большом числе посевов выше вероятность выделения культуры, что сокращает время на идентификацию [Бучинский О.И. с соавт., 2002]. Инкубация проводится при комнатной температуре, либо в термостате при 27° С, т.е оптимумом является температуры 25-28 ° С. Во избежания подсыхания культуры, в термостате

размещают емкости с водой. Инкубация должна проводиться в анаэробных условиях. Рост колоний дерматофитов определяется обычно на 7 – 10 день. Если через неделю после засева рост отсутствует, то делают второй посев оставшегося материала [Цыкин, А.А., 2008; Паулов О.И с соавт., 2008]. Обычно колония вырастает течение 2-3-х недель [Родионов А.Н.,1998; Чухловин А.Б., 2008; Кубасова, Н. Л., 2015]. При отсутствии роста колоний в течение четырех недель выдается отрицательный результат [Сергеев Ю. В., Сергеев А. Ю., 1998].

В ходе роста проводят микроскопию первичной культуры. Таким образом, определяют род, а иногда и вид возбудителя. Микроскопию проводят несколько раз по мере роста культуры, начиная со дня появления первых колоний, затем через 3-4 дня повторяя исследование [Иванова Ю.А. с соавт., 2011].

Учет результатов осуществляют по морфологическим свойствам в соответствии с определителем грибов [De Hoog S. et al., 2011; Кубасова, Н. Л., 2015]. Сначала определяют колонию: ее размер, структуру, характер поверхности, профиль, ее цвет, консистенцию, край. Далее определяют микроморфологию, т.е. делают микроскопический анализ на наличие перегородок, почкующихся клеток, артроспор; смотрят строение конидионосцев, формы конидий и др.

Диагноз онихомикоза считают установленным если удастся выделить культуру дерматомицета из патологического материала и если подтверждается положительный результат прямой микроскопии соскобов с ногтевых пластинок [Иванов О.Л., Сергеев А.Ю.,2001; Summerbell R. et al., 2005; Gupta A. et al., 2012].

Регламентированные методы лабораторной диагностики онихомикоза (микроскопический, культуральный) имеют недостаточно высокую чувствительность, а значит установление вида возбудителя является очень сложным делом. По данным отечественных и зарубежных ученых, выделяется

культура гриба не более, чем в 30-50% случаев. Точность этих методов неоднократно подвергалась критике, в связи с тем, что проводят исследования различных выборок больных и это из-за этого появляются различные расхождения в результатах [Feuilhade de Chauvin M., 2005; Gupta A. et al., 2012]. Также эти методы трудоемки, требуют временных затрат. Это обусловлено сложностью забора материала с глубоких участков ногтя, а также неодинаковым размером фрагментов, что влияет на время экспозиции в растворе щелочи. Что касается посева, то его чувствительность намного ниже чем микроскопия, т.е. рост происходит только в половине случаев из результатов подтвержденных микроскопией [Kane J., 1997; Foulet F. et al., 2003].

В связи с этим в лабораторную диагностику онихомикозов ввели более чувствительный метод обнаружения генетических маркеров возбудителей с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) [Лещенко В.М, 2006; Цыкин, А.А., 2008; Шикалов Р.Ю., 2014].

1.5.3 Молекулярно-биологические методы

В настоящее время в России и за рубежом активно разрабатываются молекулярно-генетические методы диагностики различных заболеваний, в том числе и микозов [Лавникевич Д.М., 2012].

При помощи метода полимеразно-цепной реакции можно определить род возбудителя онихомикоза [Захарченко Н.В. с соавт., 2007]. Этот метод обладает высокой чувствительностью по сравнению с микроскопией и посевом; обеспечивая существенный прирост выявляемости грибковой инфекции [Сергеев, В. Ю., 2008]. Метод дает возможность провести полный анализ в

течение 24 часов, т.е имеет место быстрота исследования [Сергеев В.Ю., Сергеев А.Ю., 2006; Руденко А. В., 2007].

Также чувствительность ПЦР не зависит от способа забора материала [Шикалов Р.Ю., 2014].

Однако ПЦР не может заменить другие методы исследования, так как разработанные тест-системы не охватывают весь спектр возбудителей.

Впервые японские ученые [Kambe Т. и соавт., 2003] в 2003 году предложили использовать в идентификации видов *Trichophyton*, *Microsporium* и *Epidemophyton* ген ДНК – топоизомеразы [Иванова Ю.А., Емельянова И.В., 2011]. Что касается дерматофитов, то для их анализа в качестве праймера используют последовательности ДНК-топоизомеразы II, которые обладают специфичностью для некоторых видов дерматофитов [Цыкин, А.А., 2008].

В 2004 году в России были впервые разработаны зонд-системы для прямой диагностики дерматофитий [Сергеев А.Ю. и соавт., 2004]. Сначала были созданы зонды для самого распространенного возбудителя - *Trichophyton rubrum*, далее в исследование включили зонды для обнаружения *Trichophyton mentagrophytes var. interdigitale* [Сергеев А. Ю., Сергеев Ю. В., 2003].

В России широкое распространение получил набор «ТрифАм» ООО НПФ «Гентех» (Москва, Россия) [Кубасова, Н. Л., 2015]. Он является мультипраймерным набором, так как он позволяет выявлять двух представителей дерматомицетов *Trichophyton rubrum* и *Trichophyton var. interdigitale* в одной пробе. Разработчики утверждают, что при их исследовании более 200 клинических образцов соскобов ногтевых пластинок тремя методами: микроскопией, культуральным и ПЦР методом на наборе «ТрифАм» совпадение результатов, полученных на наборе, с результатами культуральных исследований составило более 98% [Щербо С. Н., 2005]. Эта ПЦР-система применялась и за рубежом и уже оправдала себя и не уступает им в чувствительности и претендует на роль золотого стандарта [Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В., Сергеев В.Ю., 2007].

Недостатком таких тест-систем является их узкая специфичность, направленная на одновременное выявление нескольких видов возбудителей. Таким образом, регламентированные методы (микроскопический, культуральный) вместе с молекулярно-генетическими определяют общую картину заболевания и позволяют дать точный диагноз больному [Сергеев, В. Ю., 2008; Ebiharta M. et al., 2009].

Наиболее полный спектр патогенных грибов-возбудителей онихомикоза позволяет выявлять коммерческая ПЦР тест-система Mentype Mycoderm PCR Amplification Kit (Biotype Diagnostic) [L. Mehlig, C. Garve, A. Ritschel et al., 2014].

Анализ трех методов – микроскопического, культурального и ПЦР показал, что наибольшая выявляемость онихомикоза обеспечивается двумя из этих методов: микроскопией и ПЦР, что значительно сокращает время на исследование. Проведение ПЦР повышает выявляемость заболевания на 18% по сравнению с однократной микроскопией. При этом ПЦР в одиночной выборке повышает выявляемость на 50% независимо от типа выделенного гриба. ПЦР на данный момент показал высокую степень соответствия результатов. Чувствительность ПЦР предусматривает не более 1000 копий/мл ДНК возбудителей, т.е. играет роль количественная оценка копий ДНК возбудителей в материале [Иванов О. Л. и соавт., 2009].

1.5.4 Гистологическое исследование

Гистологическое исследование ногтевых пластинок является высокочувствительным методом диагностики и выявляет онихомикоз в 98% случаев [R. Baran, R. Nuy, E. Haneke et al., 2006]. Для этого препараты окрашивают гематоксилин-эозином, который позволяет определить распространенность заболевания, также возможную сопутствующую

инфекцию. Существуют также различные модификации окраски по Граму, окраска по Гомори-Грокотту, по Мейеру и другие [Меньшиков В.В., 2009].

Существенным недостатком гистологического исследования является то, что он не позволяет определить видовую принадлежность возбудителя. К тому же это дорогостоящий, трудоемкий метод исследования, чем прямая микроскопия препарата [M Karimzadegan-Nia., A. Mir-Amin-Mohammadi, N. Bouzari et al., 2007].

1.5.5. Иммунологические методы

Для диагностики грибковых заболеваний применяют чаще такие методы, как: реакция связывания комплемента (РСК), реакция иммунодиффузии (РИД), иммуноэлектрофорез (ИЭФ). Иммунодиагностика позволяет осуществить мониторинг за текущим лечением по снижению титра антител. Недостатками таких методов является то, что их чувствительность и специфичность зависят от качества антигенных препаратов [Меньшиков В.В., 2009]. Также возможно наличие перекрестных положительных результатов, в связи с одинаковым антигенным составом многих грибов [Кашкин П.Н. с соавт., 1983].

1.5.6. Инструментальные методы

Основными методами радиологической диагностики являются компьютерная томография (КТ) и магнитно-резонансная томография (МРТ). Исследованию подвергаются головной мозг, легкие, т.е. те внутренние органы, которые могут поражать грибки. Эти методы позволяют определить место

пораженного очага, также помогают отследить эффективность лечения. Их необходимо использовать вместе с другими методами, т.к. они не позволяют верифицировать возбудителя грибковой инфекции [Меньшиков В.В., 2009].

Существует также метод оптической когерентной томографии (ОКТ), с помощью которого неинвазивно исследуют внутреннюю структуру ногтевой пластинки. ОКТ-изображение здоровой ногтевой пластинки включает 4 слоя. При онихомикозе наблюдают следующие признаки: исчезновение слоистой структуры ногтя, утолщение ногтевой пластинки, нарушение слоев. Этот метод увеличивает эффективность диагностики микозов и используется как дополнительный [Фирсова М.С. с соавт., 2008].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Взятие материала

Материалом исследования послужил биологический материал взятый от пациентов больных онихомикозом Республиканского кожно-венерологического диспансера г.Уфы.

Необходимый патологический материал, а именно чешуйки с кожи и ногтей, ногтевые пластинки, отбирали в нужном количестве с помощью скальпеля (лезвие №15) или ножниц в стерильные емкости (контейнеры, эппендорфы). Для этого кожу обрабатывали 70% медицинским спиртом во избежание контаминации, чешуйки аккуратно соскребали в нужные емкости, а ногтевые пластинки состригали с помощью ножниц. Материал помещали в пакетики и далее доставляли в лабораторию кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии, соблюдая все правила транспортировки. В направлении указывали фамилию, имя, отчество больного, год рождения, пол, а так же наличие других сопутствующих заболеваний.

2.2. Микроскопическое исследование

Целью всякого микробиологического исследования является установление природы микроорганизма, далее идет установление рода и вида гриба – возбудителя.

Лабораторную диагностику микозов начинают с микроскопии патологического материала и далее его посева на питательные среды выделения гриба в чистой культуре.

Ход работы:

1. Материал обработали 10-30% раствором щелочи КОН для растворения ногтевого кератина и просветления (мацерации) препарата. Можно использовать различные добавочные растворы, такие, как, NaOH, сульфида натрия, диметилсульфоксида, чернила для контрастирования грибов.

2. Покрыли покровным стеклом и нагрели над пламенем горелки и оставили для мацерации.

3. После экспозиции нативные (неокрашенные) препараты микроскопировали в светооптическом микроскопе под иммерсией (увеличение $\times 1000$) на микроскопе Люмам-Р8 (ЛОМО, г. Санкт-Петербург).

2.3. Культуральное исследование

Культуральный метод исследования позволяет идентифицировать конкретного возбудителя. Этот метод является «золотым стандартом» в медицинской микологии.

Посев сделали на несколько питательных сред: Сабуро, картофельно-глюкозный агар (КГА) по методике.

- Питательная среда Сабуро состоит из веществ органической и неорганической природы и предназначена для исследования биоматериала на контаминацию грибами, дрожжами.

1) 20 г микробиологического агара заливают 1000 см³ дистиллированной воды;

2) Нагревают на водяной бане до полного расплавления агара;

3) Добавляют 40 г глюкозы и 10 г пептона;

4) Среду разливают в чашки Петри и / или пробирки.

- Картофельно-глюкозный агар (КГА).

Углеводы и картофельный отвар [Beever et al., 1970] ускоряют рост грибов, а низкий уровень значения рН частично подавляет рост сопутствующей бактериальной флоры.

1) клубни картофеля тщательно моют, очищают от кожуры, глазков и снова моют. 200 г мелко-нарезанного картофеля заливают 1 л. водопроводной воды и отваривают 30 минут. Добавляют 30 г агара и подогревают до полного растворения. После растворения агара жидкость фильтруют через вату, доводят объем фильтрата до 1 л и разливают в сосуды для культивирования.

2) Готовят раствор глюкозы 2% (20-30г растворить в 10-15мл воды). Ее стерилизуют отдельно и добавляют в картофельный агар перед разливом среды в чашки.

3)Среду и раствор глюкозы стерилизуют 1 ч, при 1 атм или 30 минут при 1,5 атм [Нетрусов А.И. с соавт., 2006].

4)Среду разливают в чашки Петри и / или пробирки. При разливе в пробирку ее надо наклонить для получения скошенной среды.

Посев материала осуществляли так, чтобы на каждую пробу засев был произведен на 2 чашки / 2 флакона.

1) Техника посева на чашку Петри:

На питательные среды засеяли соскобы, чешуйки и ногтевые пластинки, предварительно измельченные до малых размеров. В стерильном ламинарном боксе бактериологической петлей или иглой предварительно простерилизованной в пламени горелки сделать посев на среду [Сергеев А. Ю., 2001].

Провести засев патологического материала в заранее отмеченные точки на среде [Сбойчаков В.Б., 2008]. Их количество составило 5 в каждой чашке. По известной схеме, в которой говорится, что рост из 100% засеянного материала должен проявиться в не менее в 25% [English M.P., 1976; Walshe M.M. et al.,

2000; Scher P.K. et al., 2007; Свиридова К. В., 2009]. Значит у нас рост материала должен произойти как минимум в 1 точке.

2) Техника посева в пробирку:

Посев на скошенный агар в пробирках надо провести следующим образом: в стерильном ламинарном боксе простерилизовать бактериологическую петлю в пламени горелки, отобрать материал на петлю, ввести в пробирку и слегка прикасаясь петлей к поверхности среды, провести от дна вверх зигзагообразную или прямую черту штрих.

Культивирование проводить при комнатной температуре 23-24°C; либо в термостате, только во избежания подсыхания культуры, в термостате надо разместить емкости с водой. Контрольные измерения роста колоний необходимо выполнять каждые 7 дней.

2.4. Выделение ДНК

2.4.1. Выделение при помощи 2-4М растворов щелочи

В патенте «Способ диагностики онихомикоза кистей и стоп» для выделения ДНК из образца кожи или ногтевых пластинок образцы инкубировали в 2-4 М растворе щелочи, нейтрализовали раствор кислотой, переосадили образец в этанола и высушили [Чухловин А.Б., 2008].

В моей модификации метода применили различные концентрации растворов щелочи: 2, 3, 4 М растворов щелочи КОН.

1) Приготовление разных концентраций щелочи из порошка:

- Стандартная 1М концентрация щелочи соответствует 57000 мг порошка (т.к. в 1л воды – 1000мл), значит нужно брать 570 мг порошка на 10мл воды.
- 2М щелочи соответствует 1140 мг порошка на 10 мл воды.
- 3М щелочи соответствует 2280 мг порошка на 10 мл воды.
- 4М щелочи соответствует 4560 мг порошка на 10 мл воды.

2) Материал необходимо инкубировать в 2, 3, 4 М растворах щелочи не менее 1 часа при температуре 50-65°C.

3) Нейтрализовать раствор 30%-ной соляной кислотой. Объемы должны быть равны.

4) Переосадить образец в 50%-ном растворе этанола при температуре минус 10 - минус 20°C.

Приготовление 50% этанола:

70% C₂H₅OH -70 мл 96% этанола. Добавляем 26 мл H₂O.

60% C₂H₅OH- 50 мл 96% этанола. Добавляем 46 мл H₂O.

50% C₂H₅OH- 10 мл 96% этанола. Добавляем 9 мл H₂O.

Получили нужную концентрацию этанола.

5) Высушить пробирки с открытыми крышками в термошейкере при температуре 50-65°C.

6) Сухой остаток (выделенная ДНК), оставшийся в пробирке использовали для проведения ПЦР.

2.4.2. Выделение при помощи набора «Реамикс» фирмы НПФ «Гентех»

- 1) В пробирку эппендорф внести образцы ногтей (в сухом виде).
- 2) К образцам добавить по 150 мкл. Перед каждым внесением реактива его необходимо перемешивать пипетированием для того, чтобы в каждую пробу попало одинаковое количество сорбента.
- 3) Тщательно перемешать содержимое пробирок на вортексе.
- 4) Инкубировать пробирки при 56 °С в течение 30 мин, перемешать на вортексе 5 сек, а затем переставить на 10 мин на 99 °С.
- 5) Тщательно перемешать содержимое пробирок на вортексе и центрифугировать при 10000 об/мин 30 сек.

Пробы готовы для проведения амплификации. Их можно хранить при минус 18 °С в течение двух недель. В реакцию амплификации использовать 5 мкл супернатанта проб.

2.4.3. Выделение при помощи набора «ДНК-сорб С» серии «АмплиПрайм» фирмы «ИнтерЛабСервис»

Наиболее эффективной методикой очистки ДНК из различных биологических материалов является метод, предложенный R.Boom.

Принцип метода BOOM -обработка биологического материала хаотропными агентами - высококонцентрированными растворами в присутствии суспензии двуокиси кремния.

При действии хаотропного агента на материал ДНК выходит в раствор и далее сорбируется на поверхность двуокиси кремния (силики). Далее при

центрифугировании ингибиторы и другие вещества, мешающие проведению выделения ДНК остаются в растворе, а ДНК выпадает в осадок. После этого ДНК с осадком остается, а супернатант с ингибиторами ПЦР удаляют. Серия последующих отмывок обеспечивает получение высокоочищенного препарата ДНК, который растворяют в буфере и в дальнейшем используют в реакции ПЦР.

В настоящее время используются следующие наборы серии «ДНК-сорб»:

1. «ДНК-сорб-АМ» – выделение ДНК из соскобов и мазков слизистых оболочек урогенитального тракта, прямой кишки, ротовой полости, образцов мочи, секрета предстательной железы;
2. «ДНК-сорб-В» – выделение ДНК из цельной крови, плазмы, фекалий, секрета предстательной железы, эякулята;
3. «ДНК-сорб-С» – выделение ДНК из образцов гомогенизированных тканей, ногтевых пластинок.

2.4.4. Выделение препаратов ДНК грибов из клинического материала методом нуклеосорбции

Выделение ДНК проводят с использованием стандартного набора «ДНК-сорб-С» серии «АмплиПрайм» фирмы «Интерлабсервис».

Ход работы:

1. Подготовить и расставить в штативе пробирки с клиническим материалом, необходимое количество одноразовых стерильных пробирок объемом 1.5 мл и промаркировать их.
2. **Буфер для лизирующего реагента и раствор для отмывки 1** (если они хранились при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 60-64 °С до полного растворения кристаллов.

3. В каждую пробирку с биоптатом или 50 % гомогенатом отдельными наконечниками с аэрозольным барьером внести по **400 мкл буфера** для лизирующего реагента и по **17 мл лизирующего реагента**. Тщательно перемешать содержимое пробирок.

4. Инкубировать пробирки при температуре 60°C 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.

5. Осадить нерастворенные частицы образцов центрифугированием при (12—14) тыс об/ мин в течение 5 мин.

6. Надосадочную жидкость в объеме 200-350 мкл очень аккуратно (так, чтобы не попали взвешенные частицы и капли жира) отобрать отдельными наконечниками с аэрозольными барьерами и перенести в новые пробирки.

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

8. Тщательно ресуспендировать **сорбент универсальный** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **25 мкл** ресуспендированного сорбента универсального. Перемешать на вортексе, оставить на штативе на 10—15 мин, перемешивая через каждые 2 мин.

9. Осадить сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при 5 тыс об/мин в течение 1 мин. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

10. Добавить в пробы по **300 мкл раствора для отмывки 1**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального. Осадить сорбент универсальный центрифугированием при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге в течение 1 мин. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

11. Добавить в пробы по **500 мкл раствора для отмывки 2**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального процентрифугировать 1 мин при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Отобрать

надосадочную жидкость. Используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

12. Повторить процедуру отмывки, следуя пункту 10, отобрать надосадочную жидкость полностью.

13. Поместить пробирки в термостат при температуре 64-65 °C на 5-10 мин для подсушивания сорбента универсального. При этом крышки пробирок должны быть открыты.

14. В пробирки добавить по **50-100 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК** (в зависимости от размера образца 10—25 ммз). Перемешать на вортексе, Поместить в термостат при температуре 64-65 °C на 5—10 мин, периодически (1 раз в мин) встряхивая на вортекс.

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

Полученные пробы можно хранить в течение 1 недели при температуре 2-8°C или в течении года при температуре не выше -16°C. Для этого рекомендуется перенести надосадочную жидкость в чистую микропробирку.

2.4.5. Выделение с помощью набора «ДНК-сорб С» из образцов предварительно обработанных стеклянным порошком

Клеточная стенка гриба довольно устойчива к разрушению, для этого необходимо предварительное высвобождение гриба из его клеточной мембраны. Для этого рекомендуется предварительное растирание пестиком биоматериала в стерильной фарфоровой ступке [Нетрусов А.И., Котова И.Б., 2006]. После этого из материала можно выделить ДНК.

Ход работы:

1) В фарфоровую ступку поместить 1-2г материала и равное количество стеклянной крошки.

2) Тщательно растереть в ступке.

3) Далее содержимое ступки пипеткой перенести в центрифужную пробирку, уравновесить с другой пробиркой с водой и центрифугировать (15 минут при 3000 об/мин).

4) Объем надосадочной жидкости замерить цилиндром, затем поместить ее в стакан. К полученному раствору медленно прилить шестикратный объем дистиллированной воды.

5) Образовавшиеся комки использовать для выделения набором «ДНК-сорб С».

2.5. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Аmplификацию участков ДНК осуществляли с использованием мультипраймерного диагностического набора «ТрифАм» для диагностики *T. rubrum* и *T. interdigitale* на амплификаторе «Герцик МС-2» (г. Москва).

Мультипраймерный диагностический ПЦР набор «ТрифАм» фирмы ООО «ГЕНТЕХ». для диагностики *T. rubrum* и *T. mentagrophytes var. interdigitale* в одной пробе используется для выделения различных культур дерматофитов, в том числе *Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton violaceum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagrophytes var. gypseum* и др.

Постановка реакций проводилась в соответствии с инструкцией по применению набора реагентов для определения ДНК *Trichophyton rubrum* и *Trichophyton*

mentagrophytes var.interdigitale методом полимеразной цепной реакции «ТрифАм» [Некрасова Е.Г., 2012].

В состав набора «ТрифАм» входят:

- реакционная смесь;
- Taq-полимераза;
- буфер для разведения полимеразы;
- ДНК-контроль положительный; верхняя полоса соответствует фрагменту *T. rubrum* (размер 925 п.н.); нижняя – фрагменту *T. mentagrophytes var.interdigitale* (размер 392 п.н.);
- вазелиновое масло.

1. Разморозить буфер Taq-полимеразы, dNTP, растворы праймеров и ресуспендировать на вортексе. Taq-полимеразу хранить в морозильнике, долго на столе не держать, пользоваться холодным штативом!

2. Пронумеровать пробирки для проведения амплификации и расположить их соответствующим образом в штатив.

3. Приготовить амплификационную смесь для общего количества анализируемых проб в пробирке на 1,5 мл и разлить по 28 мкл в каждую пробирку для амплификации на 0,6 мл.

Состав реакционной смеси для 1 пробирки: 2 мкл 2× Taq – буфера, 0,5 мкл Taq-полимеразы, 25,5 мкл реакционной смеси.

4. В первую пробирку добавить 1 мкл отрицательного контрольного образца (ОК), во вторую пробирку добавить 1 мкл внутреннего контрольного образца (ВКО). Во все пронумерованные пробирки добавить по 1 мкл соответствующего исследуемого образца ДНК.

5. Для предотвращения испарения реакционной смеси в процессе реакции амплификации в каждую пробирку добавить по одной капле вазелинового масла.

6. Смесь аккуратно перемешать на вортексе и осадить содержимое на дно пробирок.

7. Установить пробирки в блок амплификатора в симметричной ориентации, плотно закрыть крышку блока.

8. Запустить программу амплификации последовательностью команд: <ПУСК>, <БЛОК №>, ввести нужную программу <ПРОГРАММА №>, объем реакционной смеси без масла <28 МКЛ>, алгоритм регулирования <ТОЧНЫЙ>, <ПУСК>.

9. Амплификацию ДНК полученных образцов следует проводить, руководствуясь инструкцией по проведению ПЦР анализа.

Амплификатор «Герцик МС-2» относится к прибору с регулированием температуры по блоку, значит реакцию амплификации надо проводить по второй программе из таблицы со следующими параметрами:

На начальном этапе проводилась денатурация ДНК при 95°C в течение 2 мин, после чего следовали 45 циклов амплификации, каждый из которых включал стадию денатурации ДНК в течение 42 сек при 95°C, стадию отжига праймеров продолжительностью 42 сек при температуре 64°C и стадию элонгации в течение 80 сек при температуре 72°C, которая оптимальна для активности Таq-полимеразы.

Таблица 1. Режим амплификации

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	

2.6. Электрофорез

Электрофоретический анализ продуктов ПЦР осуществляли на оборудовании (Биоком, г. Москва) в 1,7% горизонтальном агарозном геле. В качестве электролита для электрофореза применяли 1х-ный ТБЕ буфер. Параметры электрофореза: сила тока 400 мА, мощность 80Вт, напряжение 120 В. Электрофорез проводили в течение 20 минут.

Детекцию результатов проводят путем окрашивания агарозного геля бромистым этидием с последующей визуализацией при освещении УФ на трансиллюминаторе «УВТ-1» (Биоком, Россия). Документирование результатов проводят с использованием системы для фотодокументации: цифровой видеокамеры «Mintron» и программы «Biotest-D» (Биоком, Россия). Продукты амплификации проявляются в виде светящейся оранжево-красной полосы.

Для контроля длин продуктов амплификации используются соответствующий маркер длин ДНК 100+ bp DNA Ladder (ЕвроГен), состоящий

из 9 фрагментов ДНК в диапазоне 100 – 1000 п.н. и дополнительного фрагмента 1500 п.н.

Агарозный гель-электрофорез проводили по следующей схеме:

1. Приготовили 1 л 1х-ного ТБЕ буфера путем разбавления 50х-ного ТБЕ буфера в дистиллированной воде. К 20 мл 50х-ного ТБЕ буфера добавили 980 мл дистиллированной воды. Тщательно перемешали.

2. Взвесили 1,7 г агарозы.

3. Перенесли агарозу в термостойкую стеклянную посуду на 250 мл , добавили 100 мл 1х-ного ТБЕ буфера и хорошо перемешали стеклянной палочкой.

4. Подготовили форму для геля и установили подготовленную форму горизонтально на стол.

5. Поставили гребенки в форму так, чтобы расстояние от дна формы до зубцов гребенки составляло 2 – 3 мм.

6. Нагревали агарозу в микроволновой печи в течение 2-3 минут при регулярном помешивании. Довели до кипения (надо дождаться образования крупных пузырей), но не допускали кипения более 10 секунд. Достали колбу и остудили до температуры 55°– 60°С.

7. Разлили агарозу в форму и не дожидаясь застывания геля поставили гребенки для формирования лунок. Оставили гель для остывания на 30 минут.

8. Налили в камеру для электрофореза необходимое количество 1х-ного ТБЕ буфера, аккуратно поместили в нее застывший гель. Буфер должен покрывать гель сверху на 10 мм.

9. Краска не понадобилась, т.к. она была в составе реакционной смеси.

10. Внесли автоматической пипеткой пробу ДНК в лунку геля в последовательности, соответствующей нумерации проб. Пробы не всплывали благодаря глицерину в составе реакционной смеси.

11. Подключили клеммы прибора к источнику питания так, чтобы (–) находился на старте, а (+) – на финише, ошибочное подключение не даст

результата, т.к. отрицательно заряженная ДНК движется к положительному полюсу.

12. Запустили электрофорез при помощи источника питания (Эльф-4, ДНК-Технология). Контроль за электрофоретическим разделением осуществляется визуально по движению полосы красителя.

13. Электрофорез проводили в течение 20 минут, затем достали гель и поместили в форму для окрашивания. Работать в перчатках, т.к бромисты этидий является сильным мутагеном! Налили в форму раствор бромистый этидий. Окрашивали в течение 10-15 мин.

14. Вынули гель из красителя и промыли проточной водой. Поместили его на на рабочее стекло УФ-трансиллюминатора, закрыли крышку. Включили трансиллюминатор и просмотрели результаты через программу.

15. Фрагменты анализируемой ДНК проявлялись в виде светящихся оранжево-красных полос при облучении УФ-излучением с длинами волн 392нм для *T. interdigitale* и 925нм для *T. rubrum* соответственно.

16. Сфотографировали полученные спектры ДНК с помощью системы геле-документации и сохранили результаты в памяти компьютера.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Микроскопическое исследование

Препараты исследовали методом световой микроскопии под иммерсией (увеличение $\times 1000$) на микроскопе Люмам-Р8 (ЛОМО, г. Санкт-Петербург).

Микроскопию считали положительной, если в препарате обнаруживали фрагменты мицелия- гифы гриба, и/или конидии грибов.

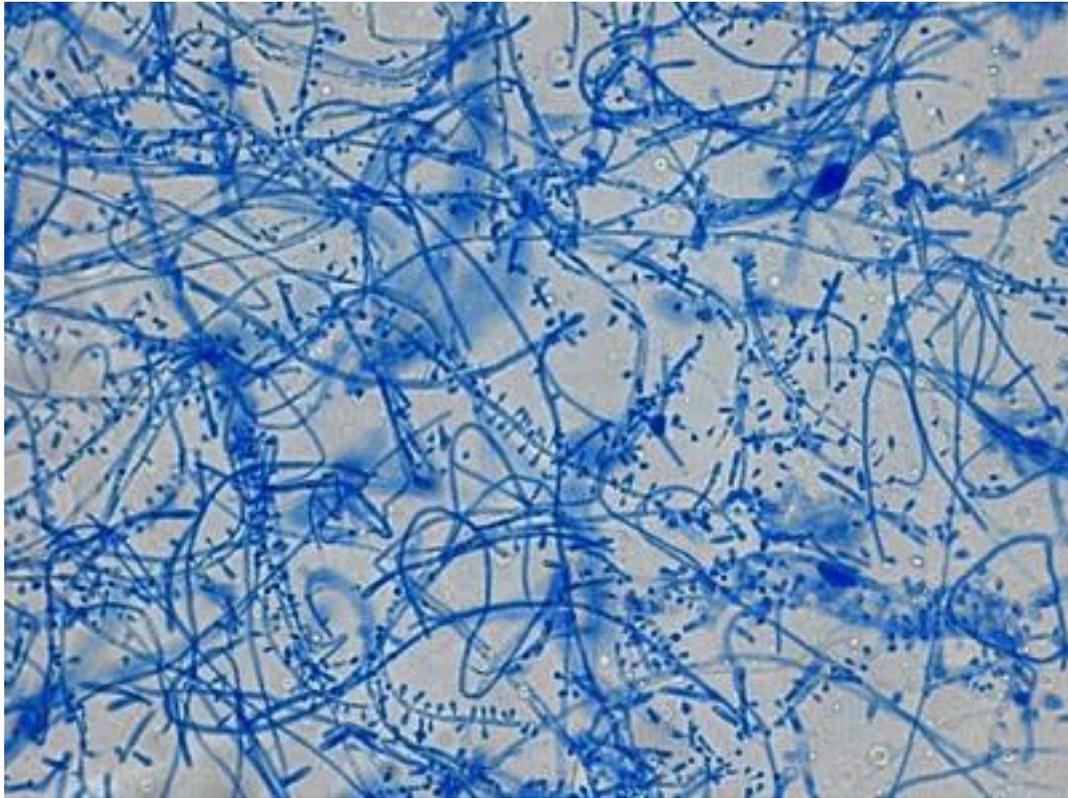


Рисунок 4. Микроскопия соскоба с ногтей, пораженных *T. rubrum*.

Видны гифы с септами. Большое количество микроконидий удлиненной, булавовидной, пальцевидной форм, расположенных по бокам мицелия. Макроконидий тоже много, они 5-6 –клеточные, септированные. Можно увидеть хламидиоспоры.

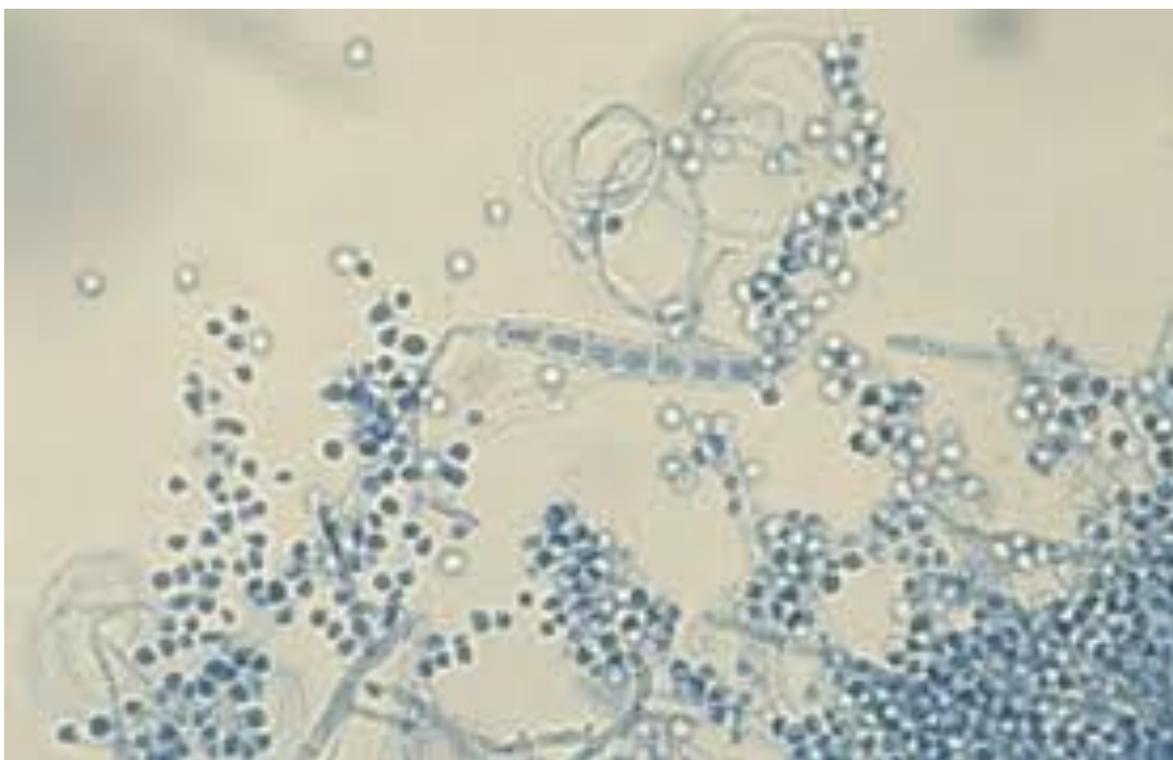


Рисунок 5. Микроскопия соскоба с ногтей, пораженных *T. mentagrophytes interdigitale*.

Видны гифы с септами, бесцветные, с завитками и спиральями. Микроконидии шаровидные, расположенные по бокам мицелия одиночно или гроздьями. Макроконидии сигарообразные, иногда с закрученным кончиком. Имеются интеркалярные хламидиоспоры.

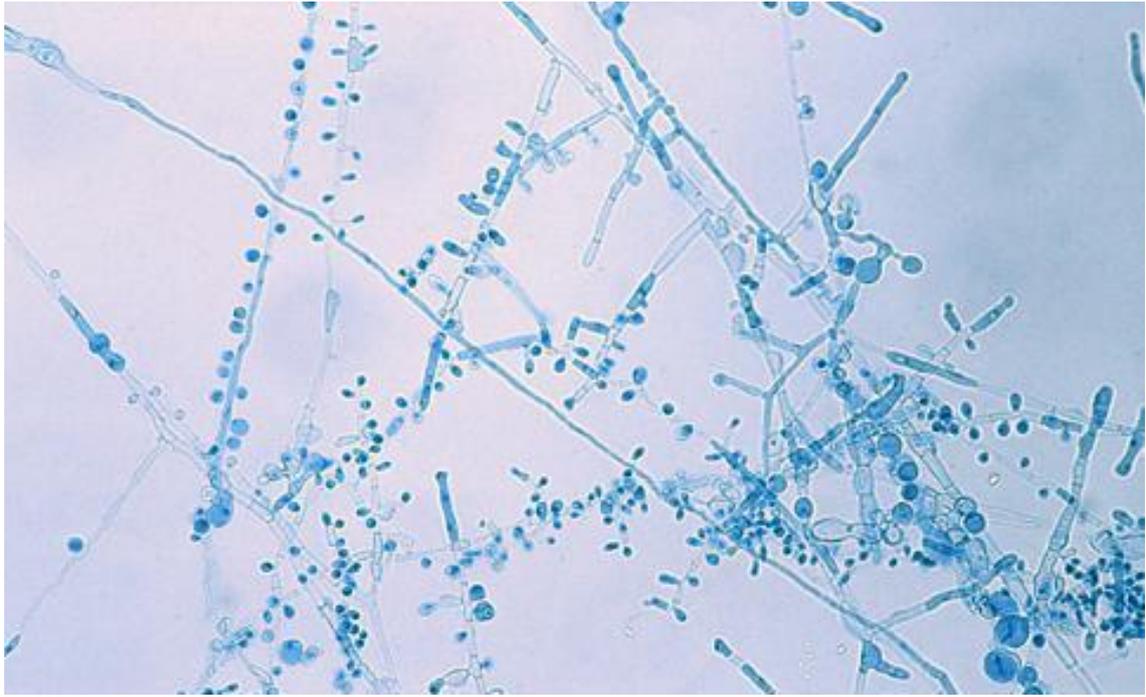


Рисунок 6. Микроскопия соскоба с ногтей, пораженных *T. tonsurans*.

Видны гифы с септами. Микроконидии овальные, расположенные по бокам мицелия скоплениями. Макроконидии колбовидные, встречаются редко. Имеются интеркалярные хламидиоспоры.

3.2. Культуральное исследование

Результаты исследований:

Появление роста дерматомицетов отмечали с 7-го по 28-й день инкубации. При отсутствии роста в течение 30 дней результаты культивирования считались отрицательными. Идентификацию полученных культур проводили с учетом роста колоний и по микроморфологическим признакам.

Если через неделю рост гриба отсутствует, то надо сделать повторный посев оставшегося материала. В случае зарастания среды грибами-контаминантами, также делают второй такой же посев, но материала сеют меньше. В этом случае посев производят также на катрофельно-глюкозный агар с антибиотиками.

В работе для определения культурально-морфологических признаков использовали «Определитель патогенных и условно-патогенных грибов» (пер. с англ.: Саттон Д., Фоторгилл А., Ринальди М., 2001 г.).

В ходе роста провели микроскопию первичной культуры и по микроморфологии определили, что на среде Сабуро выросла колония *T. rubrum*. Микроскопию проводили несколько раз по мере роста культуры, начиная со дня появления первых колоний, затем через 7-8 дня повторяя исследование. Далее подтвердили результат по выросшей колонии по ее структуре, характеру поверхности, профилю, ее цвета и другим параметрам, указанных в определителе грибов.

Рост *T. rubrum* на плотной агаровой среде начинался с 5-7 суток, активный рост отмечали на 10-15 сутки и сформировавшуюся колонию – к 25-30 суткам. Параллельно проводили посев на скошенный агар Сабуро в пробирки.



Рисунок 7. Микрофотография *Trichophyton rubrum* через неделю после посева.

В центре чашки выросла белая, пушистая колония.



Рисунок 8. Микрофотография *Trichophyton rubrum* через 2 недели после посева.

На 10-15 сутки колония разрослась, приобрела кремовый оттенок и возвысилась на 5мм. Видны радиальные бороздки. Обратная сторона приобрела розоватую окраску.



Рисунок 9. Микрофотография *Trichophyton rubrum* через 4 недели после посева.

На 26-28 сутки колония постарела и с лицевой стороны приобрела коричневый оттенок. Обратная сторона окрасилась в пурпурно-красную окраску. Сохранилась исчерченная зональность.



Рисунок 10. Микрофотография *Trichophyton rubrum*.

Через 20 дней выросла белая, бархатистая колония. Заметна мучнистость колонии по периферии. Центр серого цвета. Обратная сторона вишнево-красного цвета. Видна зональность.

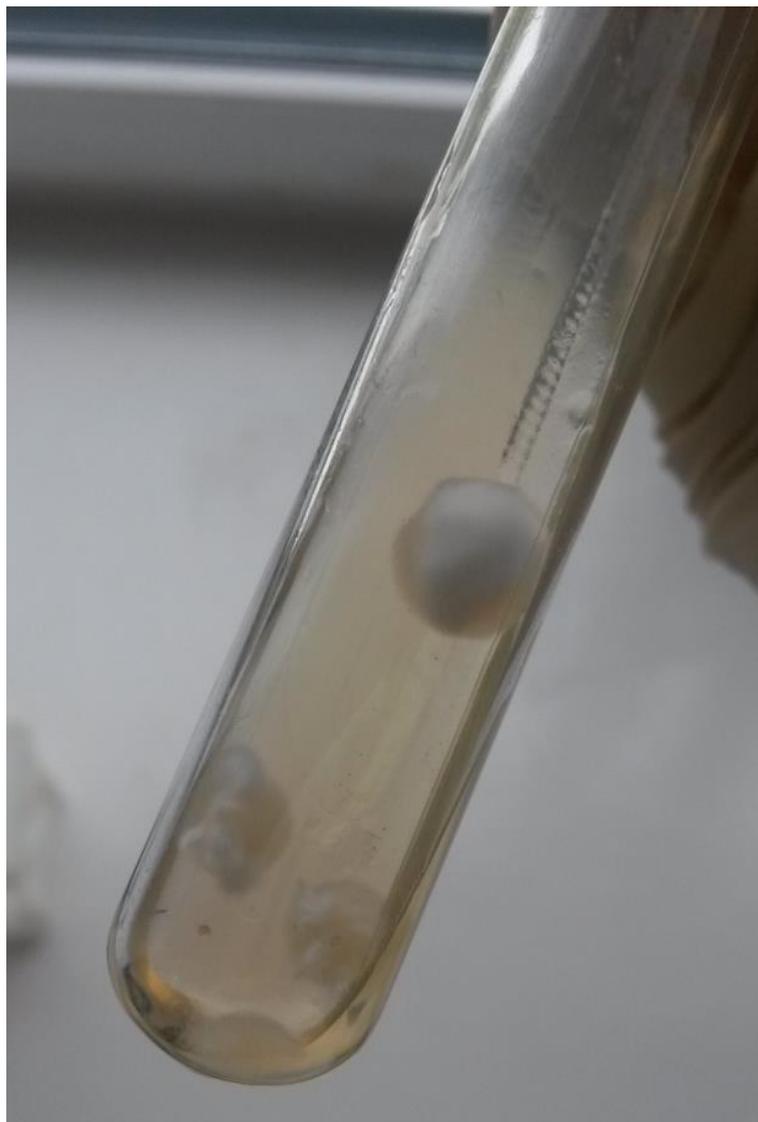


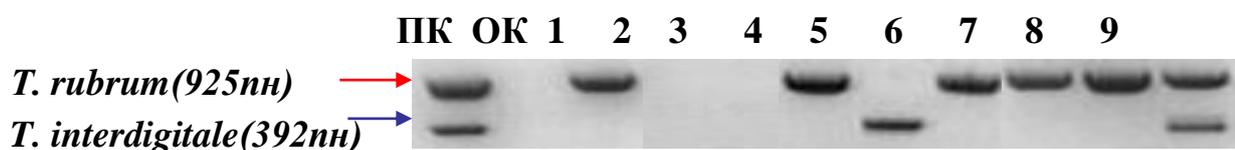
Рисунок 11. Микрофотография *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*.

Через 20 дней выросла пушистая, белая колония. Обратная сторона бесцветная.

3.3. Результаты ПЦР

Амплификацию участков ДНК осуществляли с использованием мультипраймерного диагностического набора «ТрифАм» для диагностики *T. rubrum* и *T. mentagrophytes var.interdigitale* на амплификаторе «Терцик МС-2» (г. Москва).

Учет результатов должен проводиться следующим образом:



ПК - положительный контроль:

- верхняя полоса (размер 925 п.н.) соответствует фрагменту *T. rubrum*;
- нижняя полоса фрагменту (размер 392 п.н.) соответствует фрагменту *T. mentagrophytes var.interdigitale*.

ОК - отрицательный контроль: появление в нем полосы свечения свидетельствует о контаминации.

Треки № 1, 4, 6, 7, 8 - интенсивность свечения фрагмента на уровне 925 п.н. указывает на положительный ответ на *T. rubrum*.

Трек № 5 - интенсивность свечения фрагмента на уровне 392 п.н. указывает на положительный ответ на *T. mentagrophytes var.interdigitale*.

Треки № 2, 3 – ДНК *T. rubrum* и *T.mentagrophytes var.interdigitale* не обнаружены – отрицательный ответ.

Трек № 9 - интенсивность свечения фрагментов на уровне 392 п.н. и 925 п.н. указывает на положительные ответы на *T. rubrum* и *T. mentagrophytes var.interdigitale*.

Электрофорез амплифицированных образцов выделенных при помощи набора «Реамикс» фирмы ООО «ГЕНТЕХ»:

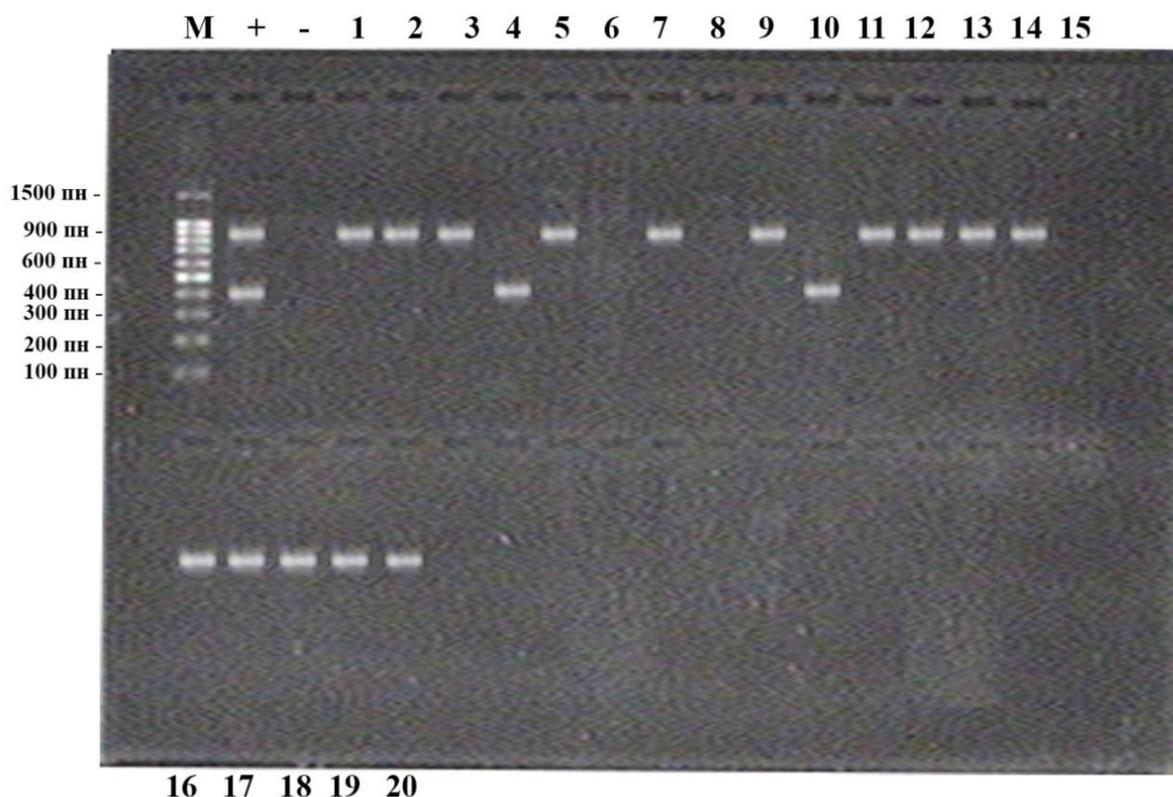


Рисунок 12. Выделение ДНК набором «Реамикс»

При выделении набором «Реамикс» из 20 образцов ногтевых пластинок число положительных результатов ПЦР-анализа составило 17, число отрицательных – 3. Из 17 положительных на долю *Trichophyton rubrum* соответствует 15 образцов и на долю *T.mentagrophytes var. interdigitale* – 2.

Электрофорез амплифицированных образцов выделенных при помощи набора «ДНК-сорб С» фирмы «ИнтерЛабСервис»:

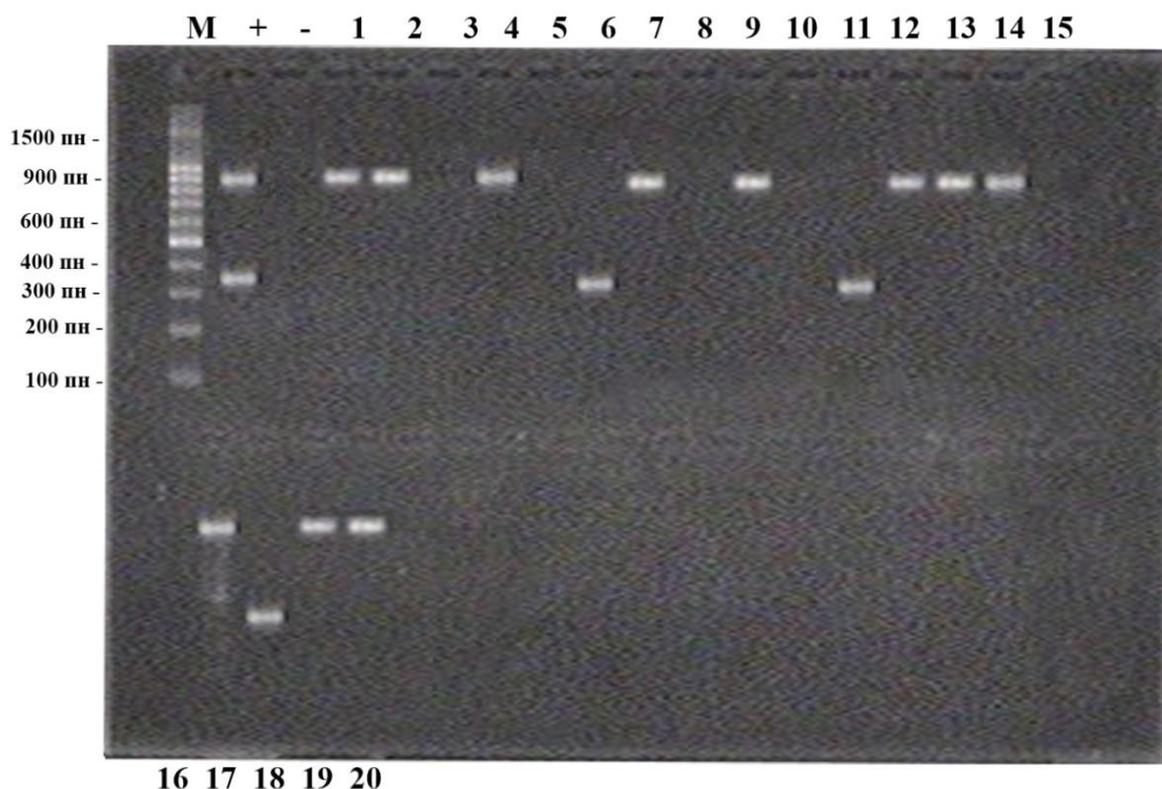


Рисунок 13. Выделение ДНК набором «ДНК-сорб С»

При выделении набором «ДНК- сорб С» из 20 образцов ногтевых пластинок число положительных результатов ПЦР-анализа составило 14, число отрицательных – 6. Из 14 положительных на долю *Trichophyton rubrum* соответствует 11 образцов и на долю *T.mentagrophytes var. interdigitale* – 3.

Электрофорез амплифицированных образцов выделенных при помощи 2М раствора щелочи:

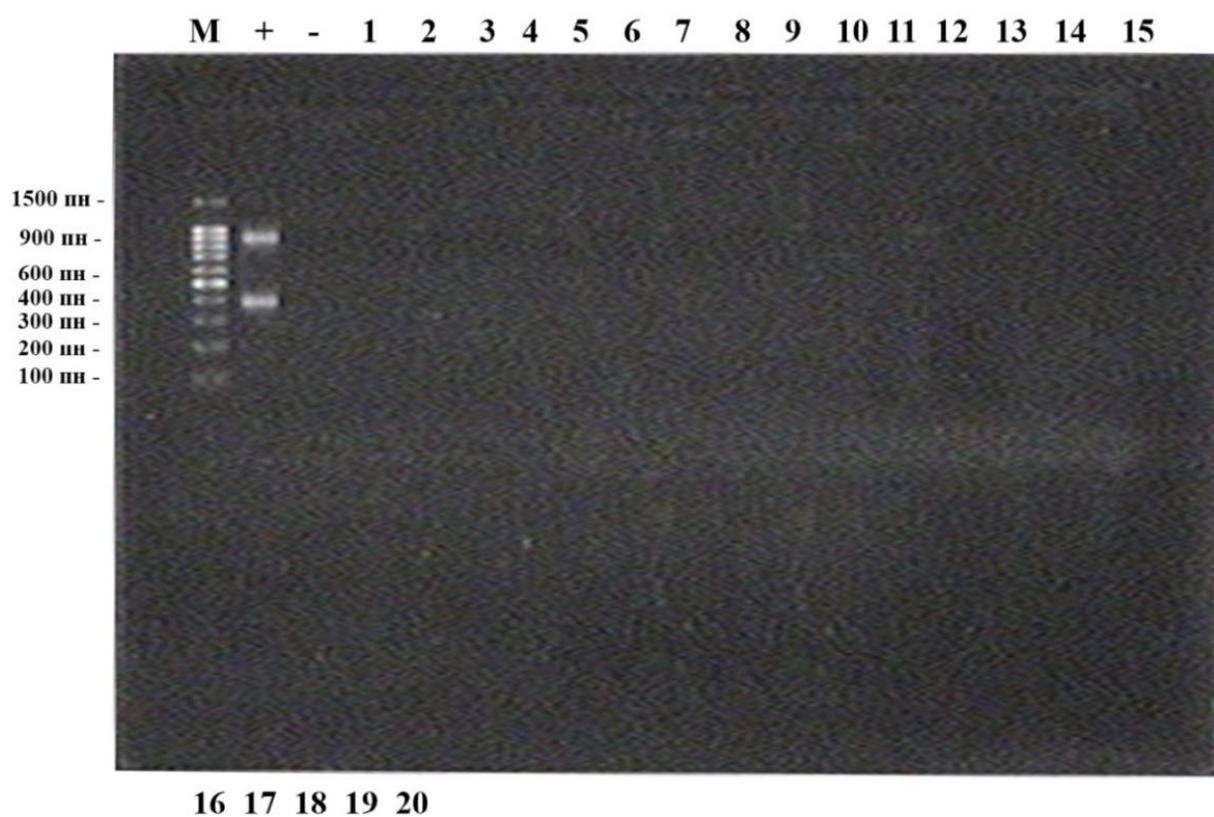


Рисунок 14. Выделение ДНК с применением 2М раствора щелочи.

Выделение ДНК 2М щелочью не дало результатов.

Электрофорез амплифицированных образцов выделенных при помощи 3М раствора щелочи:

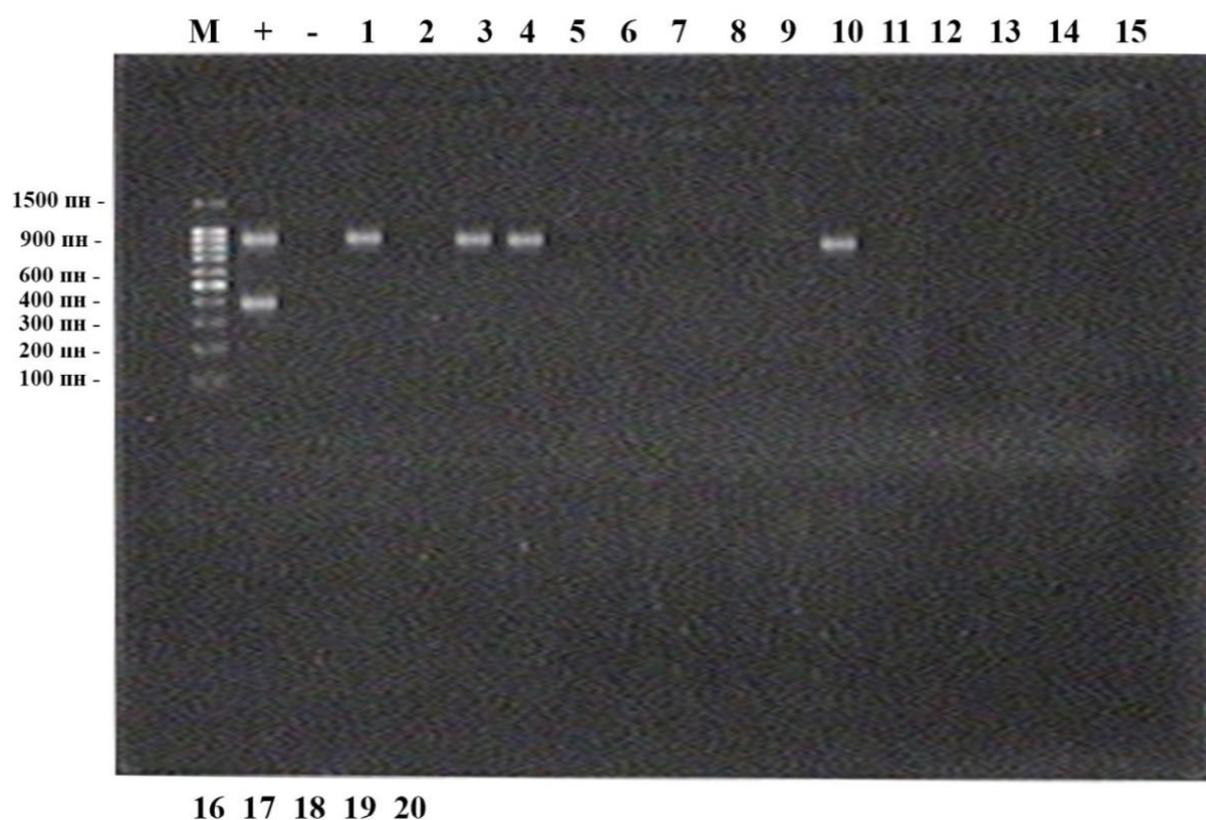


Рисунок 15. Выделение ДНК с применением 3М раствора щелочи.

При использовании 3М щелочи из 20 образцов выделились только 4, все образцы соответствовали грибку *Trichophyton rubrum*.

Электрофорез амплифицированных образцов выделенных при помощи 4М раствора щелочи:

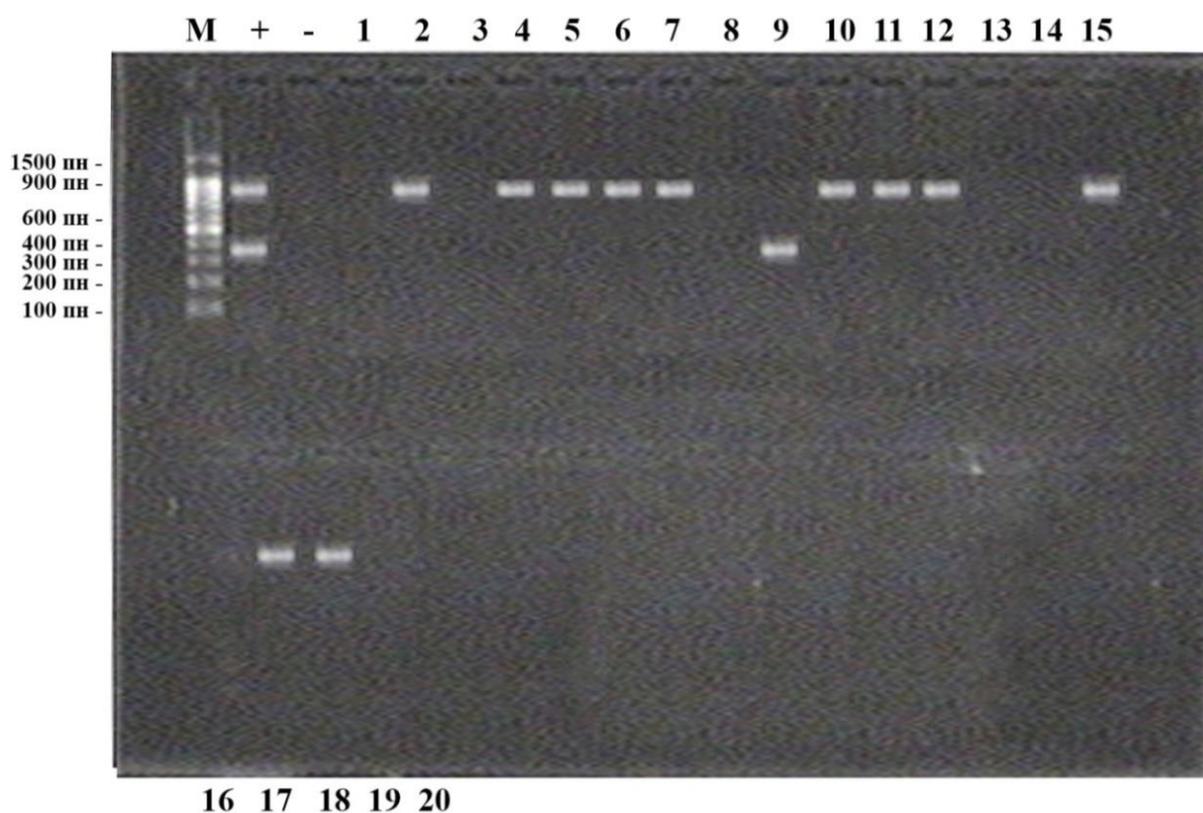


Рисунок 16. Выделение ДНК с применением 4М раствора щелочи.

Через 20 дней выросла пушистая, белая колония. Обратная сторона бесцветная.

Электрофорез амплифицированных образцов выделенных с помощью набора «ДНК-сорб С» предварительно обработанных стеклянным порошком»:



Рисунок 17. Выделение ДНК из образцов предварительно обработанных стеклянным порошком.

Выделение из образцов предварительно обработанных стеклянным порошком для разрушения клеток грибов не дало результатов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема диагностики онихомикозов весьма актуальна в связи с высокой частотой заболеваемости среди населения всех возрастных групп. Необходимость дифференциальной диагностики и идентификации грибковых поражений ногтей приобретает особую важность в целях своевременного начала лечения.

В настоящее время применяются различные способы диагностики грибковых заболеваний. Внедрение новых методов, претендующих на роль золотого стандарта в диагностике онихомикозов, требует тщательной оценки таких показателей как: точность, чувствительность и специфичность. Перспективным направлением в лабораторной диагностике онихомикозов представляется обнаружение генетических маркеров возбудителей с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Выделение набором «Реамикс» фирмы «ГЕНТЕХ» показало высокий результат чувствительности, который составил 85%. Это значительно выше чувствительности аналогичных ПЦР систем.

Чувствительность выделение набором «ДНК-сорб С» фирмы «ИнтерЛабСервис» оказалась ниже чем у предыдущего и составила 70 %.

Выделение ДНК 2М раствором щелочи не дало результатов, зато при использовании 3М раствора щелочи чувствительность составила 20%, а при выделении 4М раствором щелочи чувствительность соответствовала 60%.

К сожалению, выделение ДНК патогенных грибов из образцов предварительно обработанных стеклянным порошком для разрушения клеток грибов не дало результатов.

По частоте положительных результатов лучше всего выделение ДНК прошло при помощи наборов «Реамикс», «ДНК-сорб С» и 4М раствором щелочи.

ВЫВОДЫ

1) Положительные результаты ПЦР-анализа при выделении ДНК возбудителя 2М, 3М, 4М растворов щелочи показали, что использование большей концентрации (4М раствора КОН) является эффективным для выделения ДНК грибов. Проведенные исследования послужили основой нового алгоритма лабораторной диагностики онихомикозов.

2) Положительные результаты ПЦР-анализа при выделении ДНК возбудителя набором «Реамикс» показывают, что такой способ действен и он послужил контролем. Были использованы наборы одной фирмы: и для выделения и для амплификации. Чувствительность такого метода составила 85%.

3) Положительные результаты ПЦР-анализа при выделении ДНК возбудителя набором «ДНК-сорб С» показали, что сочетание наборов двух фирм тоже дает положительный результат, но уже с меньшей чувствительностью. Его чувствительность составила 70 %.

4) Выделение ДНК возбудителя из образцов предварительно обработанных стеклянным порошком дали отрицательные результаты. Такая схема не позволила выполнить исследование и в дальнейшем требует усовершенствования.

Учитывая перечисленные выше факты, можно сделать вывод о необходимости разработки и внедрения новых современных методов диагностики. Решение будет способствовать эффективному выявлению, повышению качества микологических исследований и совершенствованию терапии онихомикозов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1) Александрова С. М. Полимеразная цепная реакция как современный метод диагностики онихомикозов / С. М. Александрова, С. Г. Лыкова, А. В. Карпов // Проблемы медицинской микологии. - 2006. - Т. 8, № 2. - С. 16
- 2) Антонов В.Б., Медведева Т.В., Разнатовский К.И. Все о ногтях : Профилактика и лечение грибковых болезней - « Диалект» Санкт-Петербург. 2005. 252с.
- 3) Буравкова А.Г. Современные подходы к лечению онихомикозов у больных сахарным диабетом / Буравкова А.Г., Новикова Л.А., Бахметьева Т.М., Бялик Л.Р., Демьянова О.Б., Полуэктова Т.Е. // Проблемы медицинской микологии, 2008.- Т.10.- №2.- С.29.
- 4) Бучинский О.И., Сергеев А.Ю., Мокина Е.В., Сергеев Ю.В. Современная эпидемиология грибковой инфекции – результаты проекта «Горячая линия» Тезисы докладов симпозиума «Новое в эпидемиологии, терапии и профилактике грибковых заболеваний человека» в рамках Медико-фармацевтического форума. – М.: 2002. С. 75–76.
- 5) Васенкова, В. Ю. Онихомикозы // Медицинская сестра: научно-практический и публицистический журнал. - М.: Медицина, 2006. - N5. - С. 3-4.
- 6) Вулф К., Джонсон Р., Сюрмонд Д. Дерматология по Томасу Фицпатрику: Атлас справочник. — М.: Практика, 2007. — 1312 с.
- 7) Герасимчук Е.В. Мониторинг известных и необходимость новых высокотехнологичных методов диагностики заболеваний ногтей / Герасимчук Е.В., Герасимчук М.Ю. // Проблемы медицинской микологии. - 2011. - Т. 13, N 2. - С. 70.
- 8) Захарченко Н.В. Опыт обследования и лечения микозов стоп и онихомикозов у военнослужащих / Захарченко Н.В., Пестерев П.Н., Климов В.В., Денисов А.А. // Сибирский медицинский журнал.- 2007.- Т. 22.- № 3.- С. 100-105.
- 9) Иванов О. Л., Сергеев В. Ю., Сергеев А. Ю., Щербо С. Н. Совершенствование лабораторной диагностики онихомикозов на основе метода полимеразной цепной реакции // Российский журнал кожных и венерических болезней.- 2009. №4.-С. 22-24.
- 10) Иванов О.Л., Сергеев А.Ю. Диагностика и лечение микозов кожи, волос и ногтей. Лечащий врач.– 2001.– № 4.–С.12–15.

- 11) Иванова Ю.А. Лабораторная диагностика микозов кожи и ее придатков у пациентов на фоне сопутствующей эндокринной патологии и заболеваний соединительной ткани по данным ГУЗ Алтайской краевой клинической больницы г. Барнаул / Иванова Ю.А., Емельянова И.В. // Проблемы медицинской микологии.- 2011.- Т.13.- № 2.
- 12) Касихина, Е. И. Онихомикозы / Е. И. Касихина, А. Б. Яковлев // Лечащий врач. 2012. № 5. С. 49-52.
- 13) Кашкин П.Н., Лисин В.В. Практическое руководство по медицинской микологии М.: Медицина, 1983. - 192 с.
- 14) Капулер О. М. *Trichophyton rubrum*, как возбудитель микозов и онихомикозов стоп: этиологические и клинико-иммунологические особенности [Текст] : автореферат дис. ... канд. мед. наук : 03.00.07, 14.00.11 / О.М.Капулер ; Регион. дис. совет при президиуме АН Республ. Башкортостан. - Уфа, 2002. - 24 с. - Библиогр.: с. 22 - 23.
- 15) Кубасова, Н. Л. Особенности диагностики и лечения онихомикоза, обусловленного недерматомицетами [Текст] : автореф. дис... канд. мед. наук / Н. Л. Кубасова ; науч. рук. работы : Н. В. Васильева ; офиц. опон. : А. Ю. Сергеев, В. В. Дубенский ; С-ЗГМУ им. Мечникова РФ. - Душанбе, 2015. - 25 с.
- 16) Лавникевич Д.М., Медведева Т.В. ПЦР-метод для обнаружения и идентификации патогенных грибов у пациентов с онихомикозом. СПб.: - 2012, 150 с.
- 17) Макова Г.Н. Онихомикозы и аппаратная обработка ногтей: организация и показания к назначению / Макова Г.Н., Мокина Е.В., Савченко Н.В., Сергеев А.Ю., Кудрявцева Е.В., Сергеев Ю.В. // Успехи медицинской микологии. - 2006 - Т. 8.- С. 245-247
- 18) Медведева Т.В. Этиологические агенты при онихомикозах / Медведева Т.В., Богомолова Т.С., Митрофанов В.С. // Проблемы медицинской микологии.-2006.- т.8.- №2
- 19) Медведева Т. В., Леина Л. М. Онихомикозы: современные представления об этиологии, эпидемиологии, методах терапии (обзор литературы) [Электронный ресурс] . – Режим доступа: <http://www.rusmedserv.com/mycology/html/onihomic.html>.
- 20) Меньшиков В.В. Методики клинических лабораторных исследований: Справочное пособие. Том 3. Клиническая микробиология. М.: Лабора. 2009. 880с.

- 21) Мэшфорд М.Л., Фишер Г., Маркс Р. и др.; Пер.с англ. А.Н.Редькин Справ.практикующего врача; Науч.ред.рус.изд.Н.Н.Потекаев. - М. : Литтерра., 2005. - 469 с.
- 22) Некрасова Е.Г. Заболеваемость в различных соматовозрастных группах населения и оптимизация лечения больных микозами кожи с учетом комплексной оценки состояния кровеносных сосудов. Автореферат Москва — 2012.
- 23) Нетрусов А.И., Котова И.Б. Микробиология. М.: Академия, 2006. 356с.
- 24) Новоселов В.С. Онихомикозы: состояние проблемы и принципы современной терапии//В.С. Новоселов, Л.Р. Плиева // Русский медицинский журнал, 2004. т.№ 4.-С.167-170
- 25) Паулов О.И. О стандарте на культуральные исследования при онихомикозах / Паулов О.И., Кулагина Л.М.// Проблемы медицинской микологии.- 2008.- Т.10.- №2.
- 26) Пупкова М. А. Определение кератинолитической активности некоторых микромицетов // Проблемы медицинской микологии. - 2010. - Т. 12.- N 2. - С. 53-58
- 27) Разнатовский К.И., Родионов А.Н., Котрехова Л.П. Дерматомикозы (руководство для врачей). СПб.: Изд. дом СПбМАПО, 2003, 159 стр.
- 28) Родионов А.Н. Грибковые заболевания кожи. СПб.: Питер. - 1998, 288 с.
- 29) Руденко А. В., Коваль Э. З., Рыжко П. П., Заплавская Е. А. Онихомикоз. Диагностика, этиология, эпидемиология, лечение, Киев, 2007 г., 285 с.
- 30) Рукавишникова В.М.. Микозы стоп (2-е издание). М.: ЭликсКом, 2003, 332 с.
- 31) Самцов А.В. Онихомикозы — новые подходы к терапии. //Военно-медицинский журнал. 1999. - №3. - С. 34-36.
- 32) Саттон Д. Определитель патогенных и условно патогенных грибов [Text] / Саттон Д.Фотергилл А.Ринальди М. - М. : Мир, 2001. - 486 с.
- 33) Сбойчаков В.Б. Медицинская микология: руководство для врачей. Изд: ГЭОТАР-Медиа, 2008 год, 208 стр.
- 34) Свиридова К. В. Особенности диагностики и лечения онихомикоза при псориазе : диссертация ... кандидата медицинских наук : 03.00.24; [Место защиты: ГОУДПО "Санкт-Петербургская медицинская академия последипломного образования"]. - Санкт-Петербург, 2009. - 134 с.

- 35) Сергеев А. Ю. Грибковые заболевания ногтей. М.: Национальная академия микологии – Медицина для всех. 2001, 164 С. 2-е издание в 2009 г.
- 36) Сергеев А. Ю., Сергеев Ю. В. Грибковые инфекции. Руководство для врачей. М.: Бином-пресс. 2003, 440 с.
- 37) Сергеев А.Ю. Местная и комбинированная терапия онихомикозов. Пособие для врачей. (под редакцией Сергеева Ю.В.) М.: 2003: 32 С.
- 38) Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В., Сергеев В.Ю. Новые концепции патогенеза, диагностики и терапии онихомикозов. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2007; 3: 15.
- 39) Сергеев Ю. В., Сергеев А. Ю. Онихомикозы. Грибковые инфекции ногтей. М.: Гэотар медицина. 1998, 126 с.
- 40) Сергеев А.Ю. Опыт изучения онихомикозов, подходы к их терапии и профилактике // Русский Медицинский Журнал.– 2001.– Том 9.– № 11.– С.461–467.
- 41) Сергеев А. Ю. (ред.) Руководство по лабораторной диагностике онихомикозов. М.: Гэотар медицина. 2000, 154 с.
- 42) Сергеев А.Ю. Этиология онихомикозов и принципы оценки данных лабораторной диагностики. Иммунопатология, аллергология, инфектология.– 2001.– № 2.– С.79–85.
- 43) Сергеев А. Ю., Дьяков Ю. Т., Шнырева А. В. Современное состояние геномных исследований главных возбудителей оппортунистических микозов человека. Сборник трудов Пятой Всероссийской научно-практической конференции. Т. 1. М.: 2004. С.107-111
- 44) Сергеев А.Ю., Мокина Е.В., Сергеев Ю.В., Бучинский О.И. Современные эпидемиологические особенности онихомикозов: данные проекта «Горячая линия» Тез. докл. Научно-практической конференции «Актуальные вопросы терапии инфекций, передаваемых половым путем, и хронических дерматозов».– М.: 2002.– С. 39.
- 45) Сергеев В.Ю., Сергеев А.Ю. Гены, молекулярные методы и новые концепции в диагностике грибковых заболеваний. // Проблемы медицинской микологии.- 2006 – Т. 8 – № 2 – с. 85
- 46) Сергеев, В. Ю. Совершенствование лабораторной диагностики онихомикозов на основе метода полимеразной цепной реакции [Текст] : автореф. Дис. на соиск. уч. степ. канд. мед. наук / В. Ю. Сергеев ; Моск. мед. акад., Москва. - Москва, 2008. - 24 с.

- 47) Сергеев В.Ю., Шербо С.Н., Богуш П.Г., Сергеев А.Ю., Кудрявцева Е.В., Савченко Н.В., Мокина Е.В., Чернявская М.Г., Лещенко В.М., Макова Г.Н. Чувствительность и специфичность российской системы ПЦР-диагностики онихомикозов. Материалы IV Научно-практической конференции памяти профессора Машкиллейсона А.Л. 2006. 164-165
- 48) Суворов С.А. Новый способ диагностики онихомикозов // Актуальные вопросы медицины.- 1994. - Ч. 2. - С. 127-129.
- 49) Файзуллина Е.В., Гурьянов В.В. Некоторые аспекты проблемы эпидемиологии грибковых болезней ногтей - онихомикозов // Каз. мед. журнал. -1999.-№4.-С.298-299.
- 50) Файзуллина Е. В. Комплексное социально-гигиеническое исследование онихомикоза: (Распространенность, факторы риска, оптимизация медицинской помощи): Автореф. дис. на соиск. учен. степ. д.м.н.: Спец. 14.00.33: Спец. 14.00.11 / [Казан. гос. мед. ун-т]. - Казань: 2001. - 40 с.: ил.; 21 см.
- 51) Файзуллина Е. В. Современные тенденции эпидемиологии онихомикоза // Проблемы медицинской микологии. 2014.- № 1.- Т. 16.- С. 18–22.
- 52) Федоров С.М. Онихомикоз стоп: новые сведения о старой проблеме // Клинич. фармакология и терапия, 1999. Т.8, № 4Г. - С.85-87.
- 53) Фирсова М.С. Оптическая когерентная томография в диагностике онихомикозов / Фирсова М.С., Петрова Г.А., Шливно И.Л., Чекалкина О.Е., Зорькина М.В., Эллинский Д.О. // Проблемы медицинской микологии.- 2008.- Т.10.- №2
- 54) Хисматуллина З.Р. Эпидемиологический мониторинг возбудителей микозов стоп у пациентов в республике Башкортостан / Хисматуллина З.Р., Петрасюк О.А., Рафикова Г.Р. // Проблемы медицинской микологии. 2011.- № 2.- Т. 13.- С. 116.
- 55) Хисматуллина З. Р., Терегулова Г. А.. Грибковые заболевания [Текст] : учебное пособие / ГБОУ ВПО "Башкирский государственный медицинский университет МЗ и социального развития РФ" ; сост. - Уфа : Изд-во ГБОУ ВПО БГМУ Минздравсоцразвития России, 2012. - 110 с.
- 56) Цыкин А. А. К диагностике онихомикозов / Цыкин А. А. Иванов О. Л. Ломоносов К. М. // Альманах клинической медицины.- 2007 .- № 15.- С.45-48.
- 57) Цыкин, А.А. Онихомикозы: ДНК-диагностика, совершенствование комбинированной терапии: автореф. дис. . канд. мед. наук / А.А. Цыкин - М., 2008. [Цыкин, А.А., 2008].

- 58) Чухловин А.Б., Кузнецов А.В., Соколовский Е.В., Аравийская Е.Р., Соколов Г.Н., Тотолян А.А. Способ диагностики онихомикоза кистей и стоп. Патент РФ № 2319962 от 20.03.08
- 59) Щербо С.Н. Разработка и применение гибридизационных и ПЦР технологий для молекулярного анализа геномов микроорганизмов : автореферат дис. ... доктора биологических наук : 03.00.15 / Рос. ун-т дружбы народов (РУДН). - Москва, 2005. - 31 с.
- 60) Шикалов Р.Ю. Влияние способа забора материала на чувствительность и специфичность методов лабораторной диагностики онихомикоза / Шикалов Р.Ю., Панкратов О.В., Барабанов А.Л., Крумкачев Д.Н. // Успехи медицинской микологии. – 2014.- Т.13- С.184-187.
- 61) Baran R., Nay R., Haneke E. et al. Onychomycosis // Informa. – 2006. – P. 150-152.
- 62) Beever, R. E.; Bollard, E. G. 1970: The nature of the stimulation of fungal growth by potato extract. *Journal of General Microbiology* 60: 273–279.
- 63) Bokhari MA, Hussain I, Jahangir M, Haroon TS, Aman S, Khurshid K. Onychomycosis in Lahore, Pakistan. *Int J Dermatol* 1999;38:591-5.
- 64) Bonifaz A., Cruz-Agular P., Ponce R.M. Onychomycosis by moulds // *Eur. J. Dermatol.* – 2007. – Vol. 17. – P. 70-72.
- 65) Ebihara M. Makimura K., Sato K. et al.. Molecular detection of dermatophytes and nondermatophytes in onychomycosis by nested polymerase chain reaction based on 28S ribosomal RNA gene. // *British Journal of Dermatoljgy.* 2009.-№ 161.-P. 1038-1044.
- 66) English M.P. Nails and fungi // *Br. J. Dermatol.* -1976.- Vol. 94.- P. 697-701.
- 67) De Hoog S., Shemer A., Davidovici B., Grunwald M.H. et al.. New criteria for the laboratory diagnosis of nondermatophyte moulds in onychomycosis. // *British Journal of Dermatology.* 2011. - № 160. - P. 37-39.
- 68) Feuilhade de Chauvin M. // *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* - 2005.
- 69) Foulet F., Cremer G. // *Ann. Dermatol. Venereol.* - 2003. - Vol. 130, N 12, Pt 2. - P. 1244 - 1247.
- 70) Gupta A. K., Ryder J. E., Summerbell R. C. // *J. Drugs Dermatol.* - 2004. - Vol. 3, N 1. — P. 51—56.
- 71) Haley L, Daniel CR. Fungal infections In : Scher RK, Daniel CR, editors. *Nails: Therapy Diagnosis Surgery.* 1 st ed. Philadelphia: WB Saunders; 1990. p. 106-17.
- 72) Karimzadegan-Nia M., A. Mir-Amin-Mohammadi, Bouzari N. et al. Comparison of direct smear, culture and histology for the diagnosis of

- onychomycosis // *Australasian Journal of Dermatology*. – 2007. – Vol. 48. – P. 18-21.].
- 73) Kambe T., Yamaguchi-Iwai Y., Sasaki R., Nagao M. Overview of mammalian zinc transporters // *Cell Mol Life Sci*. 2004. - Vol. 61. -№1. -P. 49-68.
- 74) Kane J. *Laboratory Handbook of Dermatophytes: a Clinical Guide and Laboratory Handbook of Dermatophytes and other Filamentous Fungi from Skin, Hair, and Nails.* — Belmont, 1997.
- 75) Mehlig L., Garve C., Ritschel A. et al. Clinical evaluation of a novel commercial multiplex-based PCR diagnostic test for differential diagnosis of dermatomycoses // *Mycoses*. – 2014. – Vol.57. – P. 27-34.
- 76) Romano C. Retrospective study of onychomycosis in Italy: 1985–2000 / C. Romano, C. Gianni, E. M. Difonzo // *Mycoses*. – 2005. – Vol. 48(1). – P. 42-44.
- 77) Scher P.K., et al. Onychomycosis: diagnosis and definition of cure// *J. Am. acad. dermatol.*- 2007.- vol.56, №6.- p.939-44.
- 78) Walshe M.M., English M.P. Fungi in nails. // *British Journal of Dermatoljgy*. 1966. - № 78. - P. 198-207.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Справка об антиплагиате студентки МБ 401А Ханафиной Д.Г.

Информация о документе:

Имя исходного файла: Ханафина Диплом.doc

Имя компании:

Башкирский государственный медицинский университет

Тип документа:

Прочее

Имя документа:

Диплом Ханафиной

Текстовые статистики:

Индекс читаемости:

обычный

Неизвестные слова:

в пределах нормы

Макс. длина слова:

в пределах нормы

Большие слова:

в пределах нормы

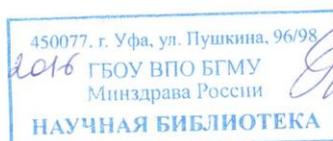
Оригинальные блоки: 83,55 %

Заимствованные блоки: 16,37%

Заимствование из "белых" источников: 0,08 %

Итоговая оценка оригинальности: **83,63 %**

28.06.2016



Отзыв научного руководителя о прохождении дипломной практики
студентки 4 курса обучения
медико-профилактического факультета с отделением микробиологии
ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России
Ханафиной Джамили Галимовны по теме:
«РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ ПРЕПАРАТИВНОГО ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК
ГРИБОВ ИЗ НОГТЕВЫХ ПЛАСТИНОК».

Ханафина Д.Г. проходила дипломную практику в Центральной научно-исследовательской лаборатории Башкирского государственного медицинского университета. Во время практики она изучила большой объем литературных источников.

В процессе экспериментальной работы по теме дипломной работы Ханафина Д.Г. овладела основными молекулярно-генетическими, микробиологическими методами, а также правилами работы с патогенными грибами. Самостоятельно проверила стандартные схемы выделения ДНК грибов и модифицированные методы.

За время прохождения практики проявила себя как ответственный и исполнительный экспериментатор.

Результат дипломной практики Ханафиной Д.Г. заслуживает отличной оценки.

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

Р.А. Фатхутдинова

РЕЦЕНЗИЯ

на дипломную работу студентки 4 курса обучения
медико-профилактического факультета с отделением микробиологии
ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России
Ханафиной Джамили Галимовны

Представленная на рецензию дипломная работа на тему «Разработка способов препаративного выделения ДНК грибов из ногтевых пластинок» полностью раскрывает актуальность проблемы исследования. Онихомикозы – грибковые поражения ногтей. Классические методы диагностики онихомикозов, основанные на микроскопии патологического материала и выделении культуры возбудителя, достаточно трудоемки, требуют значительных временных затрат, отличаются невысокой чувствительностью. В связи с этим, перспективным направлением в лабораторной диагностике онихомикозов представляется обнаружение генетических маркеров возбудителей с помощью полимеразной цепной реакции.

Цель работы состоит в выявлении эффективности известных наборов для выделения ДНК патогенных грибов и сравнение их с другими модифицированными методами с целью разработки более усовершенствованного способа диагностики онихомикозов.

Выпускная аттестационная работа логически выстроена и состоит из введения, трех глав, выводов, списка литературы, приложения. В первой главе описывается эпидемиология, этиология и методы диагностики грибковых заболеваний. Во второй главе представлены различные методики выделения ДНК патогенных грибов с варьированием различных условий. Третья глава включает в себя результаты проведенных исследований.

Выпускная аттестационная работа носит заверченный характер, соответствует требованиям, предъявляемым к данному виду работ, и может быть рекомендована к защите с оценкой «отлично».

к.б.н., старший 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
Ханафиной Джамилы Галимовны

На рецензию представлена дипломная работа на тему «Разработка способов препаративного выделения ДНК грибов из ногтевых пластинок».

В дипломной работе рассматривается одна из актуальных проблем современной микологии – диагностика грибковых поражений ногтей - онихомикозов. В ходе исследования Ханафина Д.Г. изучила теоретические основы грибкового заболевания - онихомикоза, дала характеристику всем известным методам его диагностики, а также описала новые модифицированные методы выделения ДНК грибов, возбудителей этого заболевания.

Целью дипломной работы является выявление эффективности известных наборов для выделения ДНК патогенных грибов и сравнение их с другими модифицированными методами с целью разработки более усовершенствованного способа диагностики онихомикозов.

Дипломная работа соответствует предъявленным требованиям и выданному заданию. Прослеживается большая работа по каждому разделу темы исследования. В обзоре литературы достаточно полно освещено состояние проблемы диагностики онихомикозов. В главе, посвященной результатам исследований, подробно изложены итоги выделения ДНК патогенных грибов. Были выявлены наиболее эффективные методы.

Дипломная работа, выполненная Ханафиной Д.Г., удовлетворяет требованиям, предъявляемым к дипломным работам, может быть допущена к защите и заслуживает отличной оценки.

н с. Федерального бюджетного учреждения науки
Институт биохимии и
генетики Уфимского научного центра, к.б.н.

Д.Р.Масленникова

