

3
НОМЕР

БОНЦ

ISSN 2304-9081

ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ
On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН

Lycaena thersamon (Esper, 1784)
Червонец блестящий
Шовкун Д.Ф.



2019

УЧРЕДИТЕЛЬ
ОРЕНБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР УРО РАН

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616.5:616-07

*Т.Н. Титова, А.Р. Мавзютов, Р.А. Фатхутдинова, А.З. Габбасов,
А.А. Титова, А.Р. Харисова*

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ *TRICHOPHYTON MENTAGROPHYTES*

Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

Цель. Разработка новых подходов к детекции *Trichophyton mentagrophytes* с применением ПЦР и оценка информативности тест-системы по сравнению с регламентированными методами лабораторной диагностики микозов.

Материалы и методы. В исследовании использовали клинический материал от пациентов с подозрением на трихофитию, вызванную *T. mentagrophytes*. Применяли регламентированные методы лабораторной диагностики дерматомикозов и молекулярно-генетические технологии на основе ПЦР. Дизайн праймеров осуществлен с использованием программы PrimerSelect из пакета Lasergene (DNASTAR, USA) и привлечением к анализу последовательностей из международного банка GenBank (NCBI), соответствующих для *T. mentagrophytes* (Z97995). Проверка на специфичность и чувствительность подобранных праймеров выполнена с помощью ПЦР по конечной точке.

Результаты. Применение микроскопического и культурального исследования способствовало установлению видовой принадлежности лишь грибов с относительно характерными фенотипическими признаками. Результаты специфической детекции атипичных культур получены с использованием праймеров к области ДНК, включающей внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS1, ITS2) и ген 5.8S рРНК. Оценка эффективности использования ПЦР свидетельствует о высокой чувствительности, специфичности и диагностической эффективности метода ПЦР, нежели регламентированные методы диагностики.

Заключение. Разработанные праймеры могут быть использованы для специфической детекции *T. mentagrophytes* в клиническом материале.

Ключевые слова: *Trichophyton mentagrophytes*, диагностика, оценка информативности.

T.N. Titova, A.R. Mavzyutov, R.A. Fatkhutdinova, A.Z. Gabbasov, A.A. Titova, A.R. Kharisova

APPLICATION OF THE POLYMERASE CHAIN REACTION METHOD FOR *TRICHOPHYTON MENTAGROPHYTES* DETECTIONS

Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

Objective. Development of new approaches to *Trichophyton mentagrophytes* detection using PCR and evaluation of the test system informativity in comparison with the regulated methods of laboratory diagnostics of mycoses.

Materials and methods. The study used clinical material from patients with suspected trichophytes caused by *T. mentagrophytes*. Regulated methods of laboratory diagnostics of dermatomycosis and molecular genetic technologies based on PCR were used. The primers were designed using PrimerSelect software from Lasergene (DNASTAR, USA) and using sequences from GenBank International (NCBI) corresponding to *T. mentagrophytes* (Z97995). The specificity and sensitivity of the selected primers are tested using PCR at the end point.

Results. The use of microscopic and cultural studies has contributed to the identification of species only with relatively characteristic phenotypic features. The results of specific detection of

atypical cultures were obtained using primers for the DNA region, including internal transcribed spacers (ITS1, ITS2) and the 5.8S rRNA gene. Evaluation of the effectiveness of polymerase chain reaction use testifies to high sensitivity, specificity and diagnostic effectiveness of PCR method rather than regulated diagnostic methods.

Conclusion. The developed primers can be used for the specific detection of *T. mentagrophytes* in clinical material.

Key words: *Trichophyton mentagrophytes*, diagnostics, information evaluation.

Введение

Среди грибковых заболеваний дерматомикозы являются одной из серьёзных проблем клинической медицины во всем мире в связи высокими показателями и неуклонным ростом заболеваемости населения [1-2]. В настоящее время сохраняется интерес к дерматомикозам, вызываемым зоофильными грибами рода *Trichophyton*. Многими авторами отмечается, что эпидемиологическая ситуация по трихофитии в России продолжает оставаться неблагоприятной. Трихофития является вторым по частоте встречаемости микозом волосистой части головы, уступая лишь микроспории [3].

Trychophyton mentagrophytes – возбудитель зоонозного дерматомикоза. Заболевание регистрируется спорадически, хотя в последние годы отмечается тенденция к постепенному росту заболеваемости [4]. Патология характерна для сельских жителей, так как заражение происходит в основном от домашних животных. В связи с этим заболеваемость сельского населения в разы выше городского [5]. Одним из наиболее сложных вопросов в эпидемиологии зооантропонозных дерматомикозов является точное выявление и корректная идентификация вида патогенных грибов [6]. Своевременную диагностику зооантропонозных дерматомикозов затрудняет клиническое многообразие, наличие атипичных и стертых форм, число которых за последние годы увеличилось [7]. Дифференциальная лабораторная диагностика дерматомикозов затруднена, а видоспецифичная детекция требует использования молекулярно-диагностических технологий на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Цель данной работы – разработка эффективного способа детекции патогенных грибов *T. mentagrophytes* с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР) с оценкой эффективности ее использования в сравнении с регламентированными методами в лабораторной диагностике трихофитии.

Материалы и методы

В качестве клинического материала использовали волосы, волосяные фолликулы, соскобы с кожи, чешуйки, корочки.

Микологическая диагностика включала микроскопию нативных препаратов. Для растворения ороговевших масс и просветления препаратов использовали 10% раствор КОН. Готовые препараты микроскопировали под малым ($\times 100$) и большим ($\times 400$) увеличением без иммерсии (AxioImager M1, Германия). После микроскопического исследования патологический материал засеивали на питательные среды. Для определения видовой принадлежности возбудителя использовали определитель патогенных грибов Саттона (2001). ПЦР-исследования проводились по конечной точке. Подбор праймеров осуществляли к вариабельным участкам (ITS1, ITS2), с помощью пакета компьютерных программ PrimerSelect из пакета Lasergine (DNASTAR, Inc., USA) и данных международного банка Национального Центра Биотехнологической Информации США (GenBank NCBI USA) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) соответствующих *T. mentagrophytes* (Z97995).

Для проведения сравнительного анализа информативности используемых методов детекции грибов рассчитывали показатели специфичности, чувствительности, диагностической эффективности на основе изучения заболеваемости трихофитией за 2006-2016 гг. среди детского населения г. Уфа.

Результаты и обсуждения

При микроскопическом исследовании в 10% КОН волосы были окружены спорами снаружи и расположены в виде параллельных цепочек. При этом размер спор отличался друг от друга.

При посеве на питательную среду Сабуро отмечали рост на 3 день. Колонии возбудителей имели порошковидную поверхность, нередко с выраженной зернистостью и морщинками, цвет от белого до кремового, края часто лучистые. Наблюдали ветвящийся мицелий с перегородками, нередко закрученный в спирали. Микроконидии округлой или грушевидной формы обильно располагались по бокам мицелия одиночно и в виде гроздьев. Нередко наблюдали атипичные культуры, у которых по морфологическим признакам невозможно определить видовую принадлежность.

Для детекции атипичных культур подобраны праймеры к вариабельным участкам (ITS1, ITS2). Положительным контролем считали амплификационные пробы с ДНК музейных культур, размер которых соотносили с ДНК-

маркером («СибЭнзим», Россия). Для определения специфичности подобранных праймеров, проведены тесты по постановке ПЦР по конечной точке с ДНК других патогенных грибов – *Microsporium canis*, а также ДНК человека. Установлено, что при использовании генетического материала других грибов, а также ДНК человека, реакция ПЦР не проходит, что позволяет делать выводы о высоком уровне специфичности подобранных праймеров (рис. 1).

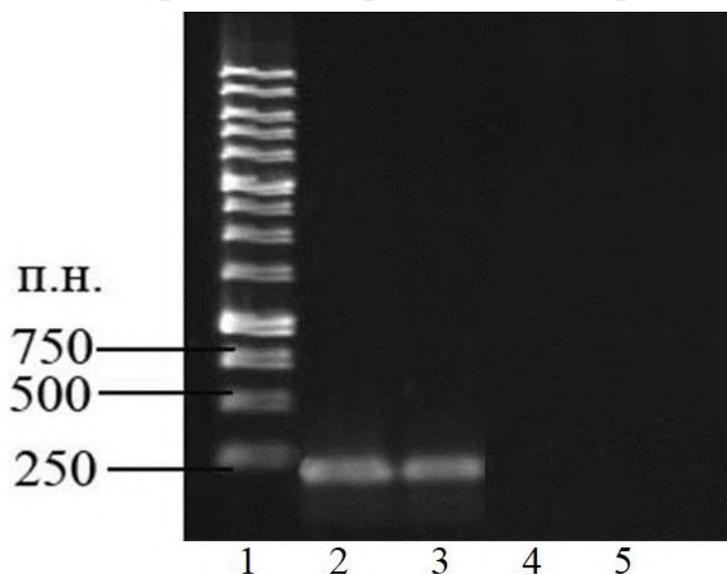


Рис. 1. Электрофореграмма результатов ПЦР.

Обозначения: 1 – маркер молекулярного веса (1Kb маркер); 2 – положительный контроль; 3 – специфический ампликон, размером 182 п.н. (ДНК *T. mentagrophytes*); 4 – ДНК *M. canis*; 5 – ДНК человека.

Информативность молекулярно-генетических методов в лабораторной диагностике дерматомикозов оценивается неоднозначно. Для оценки информативности разработанных тест-систем по обнаружению *T. mentagrophytes* в клиническом материале в сравнении с традиционными методами лабораторной диагностики дерматомикозов использовали критерии чувствительности, специфичности, диагностической эффективности.

Изучение заболеваемости проводилось путем анализа учетной формы № 2 «Сведения об инфекционной и паразитарной заболеваемости» за 2006-2016 гг. среди детского населения г. Уфа. Так, среди детского населения максимальные и сходные показатели заболеваемости трихофитией регистрировались в возрастных группах 3-6 и 7-14 лет. Это явилось объективным основанием объединения данных по указанным группам в одну когорту детей 3-14 лет для получения статистически значимых результатов.

Оценка информативности тест-системы по обнаружению *T. mentagrophytes* в клиническом материале в сравнении с рутинными методами проведена на группе пациентов с подозрением на трихофитию, вызванную *T. mentagrophytes* (рис. 2).

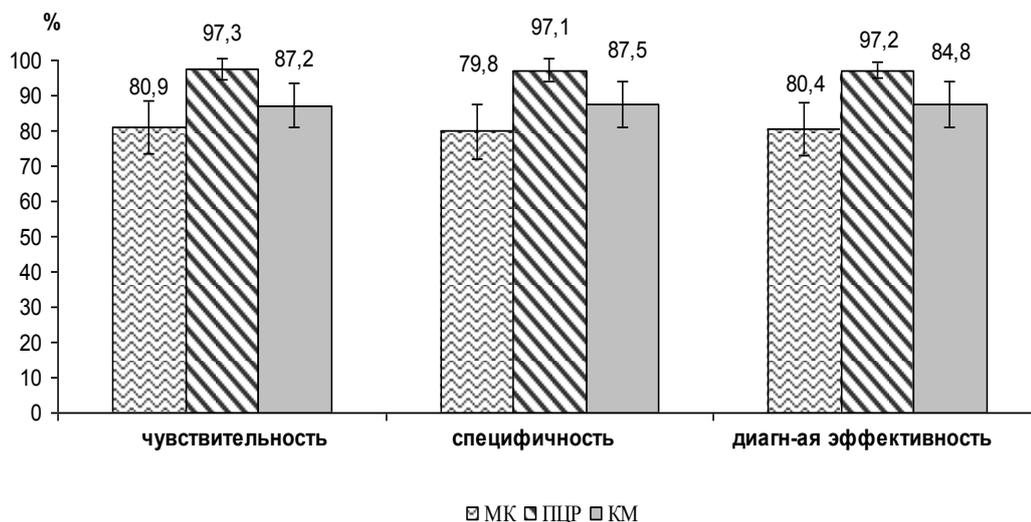


Рис. 2. Сравнительная оценка чувствительности, специфичности и диагностической эффективности микроскопии (МК), ПЦР и культурального метода (КМ).

Следует отметить, что более высокие значения показателей диагностической информативности получены методом ПЦР, о чем свидетельствовали статистически значимые отличия при сравнении данных, полученных разными методами. При этом результаты ПЦР-исследования демонстрировали чувствительность молекулярно-генетического метода на уровне 97,3%, специфичность – 97,1%, диагностическую эффективность – 97,2%.

Заключение

Предложенный способ специфической детекции *T. mentagrophytes* характеризуется чувствительностью, специфичностью и диагностической эффективностью на уровне 97,3%, 97,1% и 97,2% соответственно, а полученные с его помощью результаты превосходя таковые, полученные при микроскопии, на 16,4%, 17,3% и 16,8% соответственно, а при культуральном исследовании – на 10,1%, 9,6% и 12,4% соответственно.

Применение данного метода в клиничко-лабораторной практике позволит улучшить диагностику трихофитии, обусловленную *T. mentagrophytes*.

(Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере по программе «УМНИК»-2019, Уфа)

ЛИТЕРАТУРА

1. Coulibaly O., L'Ollivier C., Piarroux R., Ranque S. Epidemiology of human dermatophytoses in Africa. *Med Mycol.* 2018. 56(2): 145-161.
2. Miyajima Y., Satoh K., Uchida T. et al. Rapid real-time diagnostic PCR for *Trichophyton mentagrophytes* in patients with tinea unguium and tinea pedis using specific fluorescent probes. *J. Dermatol. Sci.* 2013. 69 (3): 229-235.
3. Ефимов Г.Е., Мавзютов А.Р., Титова Т.Н., Мухамадиева Р.Р. Эпидемиологически обоснованная сравнительная оценка информативности методов лабораторной диагностики зооантропонозной трихофитии. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2015. Т. 60, № 7: 58-62.
4. Хисматуллина З.Р., Попова Д.Р., Мухамадеева О.Р., Мустафина Г.Р. Новые подходы к диагностике зооантропонозной трихофитии. *Практическая медицина.* 2012. № 1 (56): 132-138. [Электр. ресурс] (URL: <http://pmarchive.ru/novye-podxody-k-diagnostike-zooantroponoznoj-trixofitii>)
5. Латыпов А.Б., Шарафутдинова Н.Х. Проблема зооантропонозной трихофитии в Республике Башкортостан. *Здравоохранение Башкортостана.* 2005. Спец. Вып. № 8: 28-29.
6. Васильева Н.В., Елинов Н.В., Богомолова Т.С. и др. Микологические культуральные исследования: методические рекомендации. СПб., 2013. 47 с.
7. Ефимов Г.Е., Мавзютов А.Р., Титова Т.Н., Кайданек Т.В., Шайхиева Г.М., Сенькина Е.В., Мухамадиева Р.Р. Оптимизация лабораторной составляющей диагностической подсистемы эпидемиологического надзора за микроспорией. *Медицина в Кузбассе.* 2013. Vol.12(2): 53-58.

Поступила 29 августа 2019 г.

(Контактная информация: Мавзютов Айрат Радикович - д.м.н., профессор, зав. кафедрой фундаментальной и прикладной микробиологии Башкирского государственного медицинского университета; адрес: 450008, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Ленина, д. 3; тел: 8 (347) 276-19-60; e-mail: ufalab@mail.ru).

LITERATURA

1. Coulibaly O., L'Ollivier C., Piarroux R., Ranque S. Epidemiology of human dermatophytoses in Africa. *Med Mycol.* 2018. 56(2): 145-161.
2. Miyajima Y., Satoh K., Uchida T. et al. Rapid real-time diagnostic PCR for *Trichophyton mentagrophytes* in patients with tinea unguium and tinea pedis using specific fluorescent probes. *J. Dermatol. Sci.* 2013. 69 (3): 229-235.
3. Efimov G.E., Mavzyutov A.R., Titova T.N., Mukhamadieva R.R. The epidemiologically valid comparative evaluation of informativeness of techniques of laboratory diagnostic of zooanthroponosk trichophytosis. *Russian clinical laboratory diagnostics.* 2018. 60(7): 58-62.
4. Khismatullina Z.R., Popova D.R., Muhamadeeva O.R., Mustafina G.R. New approaches to the diagnosis zooanthroponotic trichophytia. *Practical Medicine.* 2012. 1: 132-138.
5. Latypov A.B., Sharafutdinova N.H. Problem of zooanthroponosis trichophytosis in the Republic of Bashkortostan. *Health Bashkortostan.* 2005: 28-29.
6. N.V. Vasilieva, N.V. Elinov, T.S. Bogomolova etc. M: Micological cultural researches. St. Petersburg, 2013. 47p.

7. Efimov G.E., Mavzyutov A.R., Titova T.N., Kaydanek T.V., Shaykhieva G.M., Senkina E.V., Mukhamadieva R.R. Optimization of diagnostic subsystem laboratory component of epidemiological surveillance for microspory. *Medicine in Kuzbass*. 2013. Vol.12(2): 53-58.

Образец ссылки на статью:

Титова Т.Н., Мавзютов А.Р., Фатхутдинова Р.А., Габбасов А.З., Титова А.А., Харисова А.Р. Применение метода полимеразной цепной реакции для детекции *Trichophyton mentagrophytes*. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2019. №3. 6с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2019-3/Articles/TNT-2019-3.pdf>) DOI: 10.24411/2304-9081-2019-13017.