

На правах рукописи

**ТИТОВА ТАТЬЯНА НИКОЛАЕВНА**

**РАЗРАБОТКА И ОЦЕНКА ИНФОРМАТИВНОСТИ НОВОГО СПОСОБА  
ДЕТЕКЦИИ *MICROSPORUM CANIS*, *TRICHOPHYTON VERRUCOSUM* И  
*TRICHOPHYTON MENTAGROPHYTES* В КЛИНИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ**

03.02.03 – микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Оболенск – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России)

Научный  
руководитель

**Мавзютов Айрат Радикович**,  
доктор медицинских наук, профессор

Официальные  
оппоненты:

**Миронов Андрей Юрьевич**, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, руководитель отдела микробиологии;

**Липницкий Анатолий Васильевич**, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, главный научный сотрудник

Ведущая  
организация

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации**

Защита диссертации состоится «09» июня 2017 г. в 11-00 часов на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 в **Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора)** по адресу: 142279, Московская область, Серпуховский район, пос. Оболенск.

Автореферат диссертации размещен на официальном сайте Минобрнауки РФ. Диссертация и автореферат размещены на сайте [www.obolensk.org/center/diss/competitor.htm](http://www.obolensk.org/center/diss/competitor.htm). С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора.

Автореферат диссертации разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 года.

Ученый секретарь диссертационного  
совета, кандидат биологических наук

Н. К. Фурсова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

В последние годы повсеместно отмечается возрастание медико-биологического значения дерматомицетов (Файзуллина Е.В., 2014; Relloso S. et al., 2012; Сергеев Ю.В. и др., 2015), в частности представителей зоофильных грибов родов *Microsporium* и *Trichophyton* (Balci E. et al., 2014; Kastelan M. et al., 2014; Leite D.P. Jr. et al., 2014). Указанное обусловлено увеличением частоты встречаемости вызываемых ими заболеваний (Щелкунова О.А., Решетникова Т.Б., 2012;), а также их атипичных форм, труднодифференцируемых с микозами другой этиологии и заболеваниями негрибкового происхождения (Елинов Н.П., Васильева Н.В., Разнатовский К.И., 2008; Щелкунова О.А., 2013;). При этом существенно возрастает значимость методов лабораторной диагностики (Медведева Т.В. и др., 2012; Mayo T.T., Cantrell W., 2014), однако, на практике их фактическая информативность относительно невысока (Alegre de Miquel V., 2013; Sakaе H. et al., 2011) ввиду медленного роста дерматомицетов на питательных средах и частого формирования атипичных форм этих грибов в результате предшествующей (как правило, местной) антифунгальной терапии (Aghamirian M.R., Ghiasian S.A., 2011; Sehgal V.N. et al., 2010).

В связи с этим особое значение приобретает необходимость разработки новых, более эффективных способов обнаружения дерматомицетов в биологических субстратах и методов их идентификации. Наиболее перспективными в данном контексте представляются молекулярно-генетические диагностические технологии на основе полимеразной цепной реакции, поскольку показано, что они сочетают в себе и высокую специфичность и высокую чувствительность и могут использоваться для надежной видоспецифичной детекции некоторых дерматомицетов (Jung H.J. et al., 2014; Worek M. et al., 2014; Bernhardt A. et al., 2015).

### Степень разработанности темы исследования

Работы в области разработки методов молекулярно-генетической диагностики дерматомикозов активно ведутся во всем мире. За рубежом создана линейка таких наборов, среди которых можно отметить тест-системы «Onichodiag» (BioAdvance-BioEvolution, Франция) и «Real Fungus-ID kit» (Department of Biomedical Laboratory Science, Yonsei University, Корея). Однако, первая не обеспечивает возможность видоспецифичной идентификации дерматомицетов, а вторая позволяет выявлять дерматомицеты лишь двух родов. Определенный интерес представляет тест-система «Mentype Mycoderm» (Biotype Diagnostic, Германия), но ее широкое практическое применение проблематично ввиду длительности процедуры пробоподготовки, а наборы «Dermatophyte PCR kit» (Statens Serum Institute, Дания) предполагают наличие в лаборатории специального оборудования. И, безусловно, все указанные зарубежные диагностические системы объединяет их

чрезмерно высокая стоимость, что не позволяет им конкурировать на практике с традиционными, менее чувствительными и специфичными, но приемлемыми по цене методами (Gutzmer R. et al., 2004; Richert B., Cappelletti M.L., Andre J., 2011).

В России также имеется опыт конструирования тест-систем для молекулярно-генетической диагностики дерматомикозов различной локализации. В частности создан набор «ТрифАм» (ООО НПФ «Гентех», Россия) для этиологической ПЦР-диагностики онихомикозов (Щербо С.Н., Щербо Д.С., Сергеев А.Ю., 2015). Предложены способы диагностики онихомикоза кистей и стоп, основанные на обнаружении и идентификации методом ПЦР *Trichophyton rubrum* в образцах кожи и/или ногтевых пластинок (патент РФ на изобретение № 2319962 от 20.03.2008) и идентификации дерматомицетов рода *Trichophyton* при онихомикозах (патент РФ на изобретение № 2584035 от 20.05.2016). Представленные отечественные разработки по ряду параметров превосходят их импортные аналоги, но они преимущественно ориентированы на детекцию антропофильных дерматомицетов, тогда как не менее распространенными являются дерматомикозы, вызываемые зоофильными грибами родов *Microsporum* и *Trichophyton*.

В связи с вышеизложенным **целью настоящего исследования** явилось изучение морфофизиологических и молекулярных особенностей патогенных грибов *Microsporum canis*, *Trichophyton verrucosum* и *T. mentagrophytes* для конструирования высокочувствительных и видоспецифичных тест-систем детекции дерматомицетов в клиническом материале.

#### **Задачи исследования:**

1. Изучить морфофизиологические особенности культур *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes*, выявляемых в клинических образцах при микотических поражениях кожи и волос.
2. Установить наиболее стабильные молекулярные маркеры патогенных грибов *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes*, применимые для их видоспецифичной детекции, и конструирования диагностических систем.
3. Обосновать адекватные группы для оценки информативности тест-систем для видоспецифичной детекции *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes* при исследовании клинических образцов.
4. Оценить информативность тест-систем для видоспецифичной детекции *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes* при использовании объективных критериев чувствительности, специфичности, диагностической эффективности, прогностической ценности теста и значений индекса правдоподобия в сравнении с традиционными методами лабораторной диагностики микроспории и трихофитии.

#### **Научная новизна результатов исследования**

На основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей области ДНК, включающей внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS1,

ITS2) и ген 5.8S рРНК, у дерматомицетов выявлены уникальные вариабельные участки ДНК (ITS1 и ITS2) *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes*.

Сконструированы 3 тест-системы и предложено 3 способа ранней диагностики микроспории и трихофитии.

Впервые с целью практической оценки информативности тест-систем для видоспецифичной ПЦР-детекции патогенных грибов *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes* определены и использованы адекватные группы сравнения, что позволило количественно охарактеризовать «диагностическую полезность» данных разработок с учетом распространенности вызываемых указанными дерматомицетами заболеваний, а также установить во сколько раз повышалась вероятность точного диагноза (микроспория и/или трихофития) при использовании ПЦР-детекции в сравнении с применением культурального метода и микроскопии.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Получено 3 патента РФ на изобретения: «Способ специфической детекции *Microsporum canis* в клиническом материале при различных клинических формах заболевания» (№ 2558927 от 10.08.2015; уровень внедрения – федеральный); «Способ специфической детекции *Trichophyton verrucosum* в клиническом материале при различных клинических формах заболевания» (№ 2562540 от 10.09.2015; уровень внедрения – федеральный); «Способ специфической детекции *Trichophyton mentagrophytes* в клиническом материале при различных клинических формах заболевания» (№ 2563619 от 20.09.2015; уровень внедрения – федеральный).

Результаты исследования внедрены и используются в учебно-образовательном процессе в виде аттестационных педагогических измерительных материалов (АПИМ) для итоговой аттестации студентов, в соответствующих разделах Сборника тестов для итоговой аттестации бакалавров по направлению подготовки 06.03.01 – Биология / под ред. А.Р. Мавзютова. («Допущено УМО по классическому университетскому образованию...», решение №088-4/98-13 от 08.07.2013; уровень внедрения – федеральный) – Уфа: Изд-во БГМУ, 2013. – 239с; а также Сборника ситуационных задач по микробиологии (в 4 частях) / под ред. А.Р. Мавзютова – 2-е изд., перераб. и доп. («Допущено УМО по классическому университетскому образованию...», решение №088-4/98-13 от 08.07.2013; уровень внедрения – федеральный) – Уфа: Изд-во БГМУ, 2013; в виде демонстрационных материалов для студентов, обучающихся по направлению подготовки 06.03.01 – Биология в рамках преподавания дисциплин «Лабораторная микология», «Методы молекулярной диагностики» на кафедре фундаментальной и прикладной микробиологии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России (акт внедрения от 22.09.2016, утвержден ректором ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России; уровень

внедрения – учрежденческий); в виде демонстрационных материалов для специалистов, обучающихся на кафедре лабораторной диагностики Института дополнительного профессионального образования (ИДПО) ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России в ходе преподавания соответствующих разделов циклов профессиональной переподготовки по специальности «Бактериология» и повышения квалификации «Избранные вопросы общей, частной и санитарной микробиологии» (акт внедрения от 22.09.2016, утвержден ректором ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России; уровень внедрения – учрежденческий).

### **Методология и методы исследования**

Методология диссертационной работы выстроена исходя из цели и задач исследования.

В частности проводилось микологическое исследование клинических образцов, в ходе которого была сформирована коллекция клинических культур дерматомицетов. Установлены морфофизиологические особенности атипичных культур *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes*, выявляемых в клинических образцах при микотических поражениях кожи и волос.

Указанное послужило основанием для разработки эффективных способов видоспецифичной детекции дерматомицетов (*M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes*.), включая их атипичные варианты. Оптимальной для этого была признана методология молекулярно-генетических диагностических технологий, что определило необходимость поиска наиболее стабильных молекулярных маркеров грибов *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes*, применимых для их видоспецифичной детекции, и конструирования диагностических систем.

Информативность диагностических систем оценивали при использовании методических подходов, применяемых в клинической лабораторной диагностике и молекулярной микробиологии на этапах оценки диагностической эффективности новых тест-систем.

Научная литература, посвященная исследованиям в области разработки методов молекулярно-генетической диагностики дерматомикозов проанализирована формально-логическими методами. В работе использованы микробиологические (микологические), молекулярно-биологические, биоинформационные и статистические методы исследования.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Нуклеотидные последовательности области ДНК, включающей внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS1, ITS2) и ген 5.8S рРНК, содержат уникальные переменные участки ДНК (ITS1 и ITS2), которые могут использоваться для видоспецифичной идентификации грибов *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes*. Амплификационные системы с применением видоспецифичных праймеров к переменным участкам ДНК (ITS1 и ITS2) обеспечивают

надежную видоспецифичную детекцию фрагментов ДНК *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes* с размерами 182 п.н., 231 п.н. и 182 п.н., соответственно.

2. Информативность тест-систем на базе полимеразной цепной реакции, основанных на видоспецифичной детекции ампликонов с размерами 182 п.н., 231 п.н. и 182 п.н. грибов *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes*, соответственно, в различных клинических образцах характеризуется значениями показателей чувствительности и специфичности исследования для *M. canis* – 97,4% и 98%, для *T. mentagrophytes* – 97,3% и 97,1%, а *T. verrucosum* – 98,2% и 97,5%, соответственно. Способы специфической детекции *M. canis* (патент РФ на изобретение № 2558927 от 10.08.2015), *T. verrucosum* (патент РФ на изобретение № 2562540 от 10.09.2015) и *T. mentagrophytes* (патент РФ на изобретение № 2563619 от 20.09.2015) могут использоваться для высокоспецифичной детекции и идентификации атипичных зоофильных дерматомицетов в клинических образцах и диагностики микроспории и трихофитии.

### **Степень достоверности и апробация результатов исследования**

О достоверности полученных результатов работы свидетельствует достаточный объем проведенных исследований по созданию тест-систем для детекции возбудителей микроспории и трихофитии в клиническом материале. Обоснованность выводов подтверждается результатами, полученными с применением комплекса методов микробиологических (микологических) и молекулярно-генетических исследований и данными их анализа с использованием адекватных методов их статистической обработки.

Диссертация апробирована на совместном заседании проблемной комиссии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России «Проблемы инфектологии», кафедр фундаментальной и прикладной микробиологии, эпидемиологии, лабораторной диагностики ИДПО и центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России (протокол № 5 от 02.07.2014).

Материалы и результаты исследований представлены на II Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням (Москва, 2010); «Национальных лабораторных днях» (Москва, 2010); VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика-2010» (Москва, 2010); II междисциплинарном микологическом форуме (Москва, 2010); XII Международном конгрессе по антимикробной терапии МАКМАХ/ESCMID (Москва, 2010); «Национальных лабораторных днях» (Москва, 2011); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Эпидемиология в XXI веке: новые горизонты профилактики» (Кемерово, 2013), VI Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням (Москва, 2014); VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика-2014» (Москва,

2014); VI Всероссийском конгрессе по медицинской микологии (Москва, 2014); «Национальных лабораторных дней» (Москва, 2014).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 14 научных работ, в том числе 2 – в изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации, 12 работ – в других изданиях. Получено 3 патента РФ на изобретения.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертационная работа изложена на 159 страницах машинописного текста и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, глава с описанием используемых материалов и методов исследования, 5 глав собственных исследований, заключение, выводы. Список литературы включает 241 источник, в том числе 131 отечественных и 110 зарубежных авторов.

### **Конкурсная поддержка работы**

Исследования проведены при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг., в рамках реализации мероприятия 1.2.1. Государственный контракт № ПЗ85 от 30 июля 2009 года.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследований**

Коллекцию исследуемых зоофильных дерматомицетов формировали при использовании предварительной световой микроскопии 885 образцов клинического материала (волосы, соскобы, чешуйки, корочки с пораженных участков кожи и волосистой части головы), осветленного 20% раствором КОН, а также культивирования на обычных (среда № 2 ГРМ (Сабуро), ФБУГ ГНЦ ПМБ, Россия) и специальных (среда М188 для выделения дерматофитов и среда М1026 с рисовым экстрактом, «HiMedia», Индия) питательных средах. Посевы инкубировали в течение 2-3 недель при температуре 25-30°C с последующей макро- и микроскопической морфологической дифференцировкой колоний.

В работе использованы находящиеся в открытом доступе данные Genbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), для обработки которых применяли методологию (выравнивание и др.) и программное обеспечение Lasergene (DNASTAR, Inc., США) биоинформационных исследований. Для выделения контрольной ДНК *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes* использовали метод фенольно-хлороформной экстракции (Graham, 1978). ДНК из клинического материала получали методом нуклеосорбции (Boom, 1990). Полученную ДНК хранили при -20°C до 6 месяцев. Амплификацию ДНК проводили на амплификаторе «Терцик» («ДНК-Технология», Россия) с последующей электрофоретической детекцией ампликонов в агарозном геле при постоянном напряжении 120 В и окрашиванием бромистым



этидием. Продукты амплификации размером 182 п.н., 231 п.н. и 182 п.н., соответствующие *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes*, обнаруживали в виде светящейся полосы красно-оранжевого цвета, результаты документировали при использовании программы «Biotest-D».

Информативность разработанных тест-систем экспериментально охарактеризовали в ходе исследования клинических образцов (волосы, соскобы с кожи, чешуйки, корочки) от 269 пациентов с подозрением на микроспорию и 427 пациентов с подозрением на трихофитию, обратившихся в ГАУЗ «Республиканский кожно-венерологический диспансер №1» г. Уфы в период 2009-2013 гг. Контрольные отрицательные образцы получены от 189 пациентов с другими кожными заболеваниями (псориаз и др.). Для сравнительного анализа информативности разработанных методов детекции *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes* рассчитали показатели специфичности, чувствительности, диагностической эффективности, прогностической ценности и отношения правдоподобия (В.И. Покровский, Н.И. Брико, 2012; Трухачева Н. В., 2013).

#### **Результаты исследований и их обсуждение**

В результате проведенных микологических исследований 885 образцов дерматомицеты выявлены в 696 (78,6%) случаях.

Микроскопия клинических образцов показала, что при поражении гладкой кожи в чешуйках присутствовали нити плохоокрашивающегося тонкого мицелия различной длины, диаметром 2-4 мкм, прямые, иногда ветвящиеся и септированные. Достаточно часто в препаратах присутствовал мицелий нехарактерной формы, особенно в образцах от длительно болевших пациентов или занимавшихся самолечением. Нередко обнаруживали полиморфные споры неправильной формы, расположенные свободно или в виде цепочек. Это свидетельствовало о грибковой природе поражений, но морфологическая идентификация патогенных грибов в таких образцах оказалась затруднительной.

Для волос, пораженных микроспорумами характерно наличие множества хаотично расположенных мелких спор (2-3 мкм) правильной круглой формы, которые легко отделялись при надавливании. Внутри волоса в ряде случаев обнаруживали септированный мицелий по всей его длине и небольшие скопления спор (рисунок 1). В некоторых случаях отмечали отклонения, характеризующиеся более крупным размером спор или расположением спор в виде цепочек, однако в результате микологического исследования этих образцов получали культуру с морфологическими признаками, характерными для *M. canis*. При трихофитии отмечена «окутанность» волоса спорами снаружи и расположение их в виде параллельных цепочек. Диаметр спор при этом варьировал в очень широких пределах: от мелких, характерных для *Trichophyton ectothrix microides* (рисунок 2) до относительно крупных (4-6 мкм), более характерных для *Trichophyton ectothrix megasporon*.

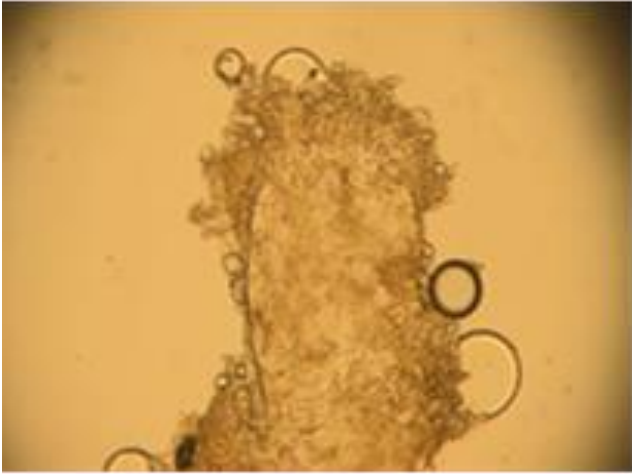


Рисунок 1 – Микроскопическая картина волоса, пораженного микроспорумами (увеличение  $\times 40$ )

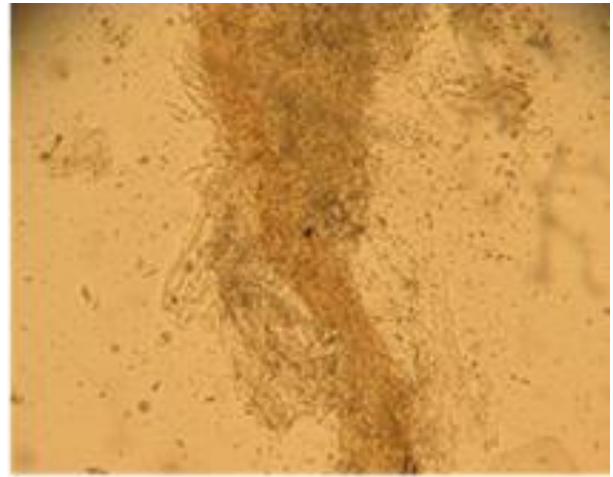


Рисунок 2 – Микроскопическая картина волоса, пораженного *Trichophyton ectothrix microides* (увеличение  $\times 10$ )

В целом посредством микроскопии дерматомицеты выявлены в 598 (85,9%) клинических образцах. Однако вышеизложенные морфологические данные, несмотря на их количество и попытки морфометрии, не позволили установить надежные критерии дифференцировки дерматомицетов непосредственно в клиническом материале.

Далее в ходе культурального исследования клинических образцов установлено, что в 530 (88,2%) из 601 случая патогенные дерматомицеты имели относительно характерную для них морфологию, на основании которой была возможна их дифференцировка. При этом известно, что клинический материал получен от пациентов, заболевших относительно недавно (до 3 месяцев) и не получавших специфические антимикотические препараты. В 71 (11,8%) случае, при исследовании образцов от длительно болевших пациентов и лиц старших возрастных групп выявлены преимущественно атипичные культуры (*M. canis* – 43 (60,6%), *T. verrucosum* – 19 (26,7%) и *T. mentagrophytes* – 9 (12,7%)), что существенно затрудняло их морфологическую дифференцировку и послужило основанием для формирования соответствующей коллекции культур (таблица 1).

Вышеизложенное одновременно послужило основанием для продолжения данных исследований и разработки более информативных способов идентификации дерматомицетов, применимых для диагностического тестирования клинических образцов. Безусловным лидером последних лет являются молекулярно-генетические методы, поскольку благодаря видоспецифичной амплификации нуклеиновых кислот патогенов, возможна их высокочувствительная детекция в клинических образцах без предварительного выделения в чистой культуре.

Таблица 1 – Характеристика штаммов дерматомицетов, обладающих нехарактерными фенотипическими признаками

№ п/п	Штамм	Морфологические признаки колоний	Микроморфология дерматомицетов		
			Хламидоспоры	Макроконидии	Микроконидии
1	<i>M. canis</i> 5699/09, 5763/09, 5793/09, 5815/09, 5652/10, 5691/10, 5573/11, 5684/11, 5734/11, 5682/12, 5749/12, 5759/12, 5845/12, 5679/13, 5681/13, 5724/13	Бархатисто-пушистые с кожистыми краями, обратная стороны темно-коричневая	Интеркалярные	Толстостенные, веретенообразные, 3-8 клеточные	Грушевидные, располагаются одиночно или кучками
2	<i>M. canis</i> 5789/09, 5649/10, 5671/10, 5702/10, 5751/10, 5564/11, 5697/11, 5718/11, 5562/12, 5569/12, 5697/13	Мелкие, кожистые или покрытые редким воздушным мицелием, темно-коричневые	Располагаются по ходу мицелия и на концах нитей	Короткие, узкие, 2-6-клеточные	—
3	<i>M. canis</i> 5655/10, 5682/10, 5757/10, 5710/11, 5762/11, 5719/12, 5751/12, 5810/12, 5758/13	Ватообразные, с длинным тонким пушком	—	—	—
4	<i>M. canis</i> 5647/09, 5691/09, 5806/09, 5714/10, 5569/11, 5574/11, 5689/13	Звездчато-мучнистые	—	Изогнутые, толстостенные, с неровными клетками, 4-10-клеточные	Многочисленные грушевидные, округлые
5	<i>T. mentagrophytes</i> 1194/09, 7062/09	Строчковидно-бугристые, почти лишены воздушного мицелия	Интеркалярные, располагаются в виде цепочек или одиночно	—	Округлые, одиночные

Продолжение таблицы 1

№ п/п	Штамм	Морфологические признаки колоний	Микроморфология дерматомицетов		
			Хламидоспоры	Макроконидии	Микроконидии
6	<i>T. mentagrophytes</i> 1012/09, 1065/09, 1127/09, 1159/10, 7078/10, 1264/11, 1069/12	Бархатисто-пушистые, беловатые с волокнистыми краями. Поверхность колонии складчатая. Мучнистость только в центре	Интеркалярные и концевые	Продолговатые булавовидные, 2-10-клеточные; малочисленные	Многочисленные, овальные или грушевидные, боковые, чаще одиночные или небольшими гроздьями
7	<i>T. verrucosum</i> 1025/09, 1083/09, 7059/09, 1204/10, 1252/10, 1152/11, 1249/11, 6985/11, 1016/12, 7039/12	Плоские, дисковидные, слегка пушистые, беловато-сероватые	Интеркалярные хламидоспоры в виде четок по ходу мицелия	—	Малочисленные булавовидные
8	<i>T. verrucosum</i> 1047/09, 7063/09, 1081/10, 1234/10, 7207/10, 7169/11, 1152/12, 7226/12, 7138/13	Крупноморщинистые, строчковидные приподнятые, белые	Интеркалярные хламидоспоры в виде цепочек. Концевые хламидоспоры разного размера, зернистые	—	—

Для этого проанализированы современные данные об особенностях геномной организации рассматриваемых дерматомицетов, которые могли бы оказаться полезными для высокочувствительной детекции и высокоспецифичной идентификации их в клинических образцах. Проведенный сравнительный анализ первичных структур генов указанных грибов, размещенных в свободном доступе в международном банке Genbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) обозначил в качестве наиболее перспективной мишени рРНК дерматомицетов, ввиду высокой консервативности ее первичной структуры и выраженных видоспецифичных отличий рибосомальных генов, а именно участков, включающих внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2, фланкирующие с двух сторон ген 5.8S рРНК (рисунок 3).

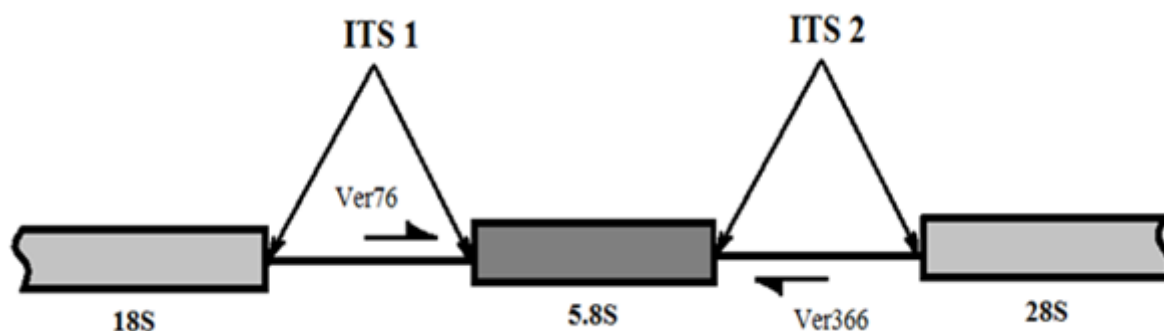


Рисунок 3 – Физическая карта области ДНК, включающей внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS1, ITS2) и ген 5.8S рРНК. Стрелками обозначены праймеры для идентификации ДНК *T. verrucosum*

В ходе компьютерного выравнивания и сравнительного анализа представленных в банке генов нуклеотидных последовательностей области ДНК, включающей внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS1, ITS2) и ген 5.8S рРНК, представителей родов *Microsporium* и *Trichophyton* выявлены участки ДНК (ITS1 и ITS2) *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes*, которые не имели гомологии с нуклеотидными последовательностями большинства известных дерматомицетов. При использовании программы PrimerSelect из пакета Lasergene (DNASTAR, Inc., США) в серии подобраны несколько пар праймеров. Для дальнейших исследований отобраны пары McanFor и McanRev (патент РФ на изобретение № 2558927 от 10.08.2015), TverFor и TverRev (патент РФ на изобретение № 2562540 от 10.09.2015), TmntFor и TmntRev (патент РФ на изобретение № 2563619 от 20.09.2015), которые обеспечивали надежную наработку ампликонов размером 182 п.н., 231 п.н. и 182 п.н., включающих частично области ITS1, ITS2 и ген 5.8S рРНК *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes*, соответственно.

Специфичность подобранных пар праймеров охарактеризована как теоретически с помощью компьютерного сравнительного выравнивания известных нуклеотидных последовательностей наиболее распространенных дерматомицетов, так и опытным путем при исследовании образцов, содержащих в своем составе

кроме контрольной ДНК *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes* также ДНК других дерматомицетов, встречавшихся в клинических образцах.

Прикладные параметры тест-систем (режимы амплификации, оптимальный состав реакционной смеси и др.) изначально оптимизировали на контрольной ДНК чистых культур *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes*, выделенной методом фенольно-хлороформной экстракции (Graham, 1978), поскольку в ранних исследованиях указанная методика обеспечивала необходимые количества ДНК требуемого качества.

В результате проведенных испытаний, как наиболее оптимальные, определены следующие условия:

- для пары McanFor и McanRev (*M. canis*): начальная денатурация при 94°C в течение 2 мин, 25 циклов, включая денатурацию при 94°C – 20 с, отжиг праймеров и синтез ДНК при 64°C – 20 с, элонгация при 72°C – 10 с, терминальная элонгация – 1 мин;
- для пары TverFor и TverRev (*T. verrucosum*): начальная денатурация при 94°C в течение 2 мин, 30 циклов, включая денатурацию при 94°C – 20 с, отжиг праймеров и синтез ДНК при 61°C – 20 с, элонгация при 72°C – 20 с, терминальная элонгация – 1 мин;
- для пары TmntFor и TmntRev (*T. mentagrophytes*): начальная денатурация при 94°C в течение 2 мин, 30 циклов, включая денатурацию при 94°C – 20 с, отжиг праймеров и синтез ДНК при 58°C – 20 с, элонгация при 72°C – 15 с, терминальная элонгация – 1 мин.

Аmplифицированные фрагменты ДНК разделяли электрофоретически в агарозном геле и после окрашивания геля бромидом этидия визуализировали в ультрафиолете. В качестве электролита для электрофореза применяли ТАЕ буфер. Продукты амплификации размером 182 п.н. 231 п.н. 182 п.н., для McanFor и McanRev, TverFor и TverRev, TmntFor и TmntRev, соответственно, проявлялись в виде светящейся полосы красно-оранжевого цвета.

Для оценки чувствительности разработок *in vitro* использовали 10-кратные серийные разведения контрольной ДНК *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes* ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  и  $10^{-5}$ ), по 1 мкл каждого из которых исследовали методом полимеразной цепной реакции в приведенных выше режимах. Каждую серию опытов повторили 5 раз. В результате проведенных испытаний минимальная чувствительность ПЦР составила 34 пкг/мкл для ДНК *M. canis*, 43,3 пкг/мкл – для ДНК *T. verrucosum* и 21,4 пкг/мкл – для ДНК *T. mentagrophytes*. При этом в ходе ПЦР с контрольной ДНК на фореграмме обнаруживали единственную полосу, соответствовавшую по размеру ожидаемым продуктам амплификации видоспецифичных фрагментов, включающих частично области ITS1, ITS2 и ген 5.8S рРНК *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes*.

Одной из нерешенных задач молекулярной диагностической детекции возбудителей микозов является низкая эффективность методов выделения высококачественной ДНК, что обусловлено наличием хитина в клеточных стенках микромицетов. Учитывая, что эффективность ПЦР во многом определяется качеством и количеством выделенной ДНК, провели сравнительную экспериментальную оценку эффективности нескольких способов её выделения с целью выбора оптимального, поскольку концентрация различных форм грибов в пробах от человека и животных варьирует в широких пределах и в них, как правило, присутствуют криптические ингибиторы амплификации (Мавзютов А.Р. с соавт., 2003). Для этого использовали метод солевой экстракции, фенольно-хлороформную экстракцию и нуклеосорбцию. Вне зависимости от сравниваемых методов на стадии гомогенизации ткани для повышения эффективности лизиса в экстракт клинического образца дополнительно вносили 15 мкл хитиназы («Sigma-ALDRICH», Германия). В результате проведенных исследований установлено, что наименьшие количества тотальной ДНК из клинических образцов выделялись при использовании метода фенольно-хлороформной экстракции без предварительной обработки хитиназой (рисунок 4, трек 1), выход ДНК при использовании данного метода несколько увеличивался при добавлении фермента (рисунок 4, трек 2). Метод солевой экстракции ДНК в сравнении с фенольно-хлороформной был более эффективен (рисунок 4, трек 3), при этом выход ДНК также повышался при использовании хитиназы (рисунок 4, трек 4). Наибольший выход ДНК изучаемых дерматомицетов обеспечивал метод нуклеосорбции с предварительной обработкой проб хитиназой (рисунок 4, трек 6).

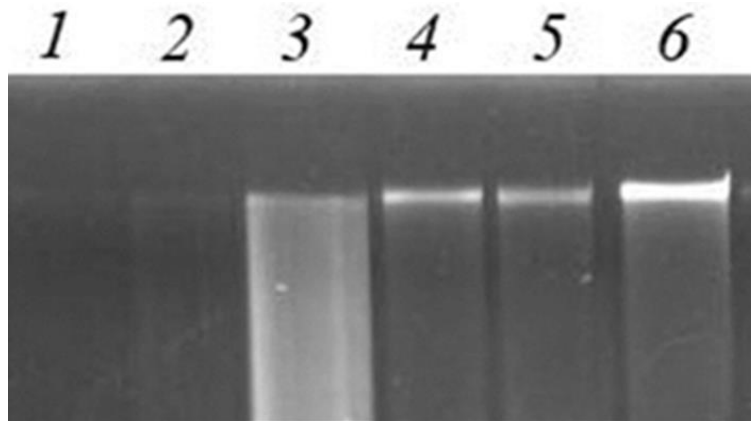


Рисунок 4 – Электрофореграмма результатов выделения тотальной ДНК различными методами. 1 – метод фенольно-хлороформной экстракции, 2 – метод фенольно-хлороформной экстракции с добавлением хитиназы, 3 – метод солевой экстракции, 4 – метод солевой экстракции с добавлением хитиназы, 5 – метод нуклеосорбции, 6 – метод нуклеосорбции с добавлением хитиназы

Далее провели комплексную оценку диагностической информативности сконструированных тест-систем для обоснования возможности их применения в этиологической диагностике трихофитии и микроспории. Обязательными при этом являются критерии: «специфичность», «чувствительность», «диагностическая эффективность», «прогностическая ценность» и «отношения правдоподобия» (В.И. Покровский, Н.И. Брико, 2012; Трухачева Н. В., 2013), позволяющие объективно, в количественном выражении оценить диагностическую информативность тест-систем. Однако относительно недавно было показано, что значения вышеуказанных критериев могут включать погрешности, обусловленные эпидемиологическими особенностями диагностируемых инфекций (Ефимов Г.Е. с соавт., 2013). В связи с этим в качестве дополнительных проведены исследования, ориентированные на определение адекватных групп пациентов, при обследовании которых уровень объективности данных, характеризующих эффективность разработанных методов лабораторной диагностики существенно возрастает. Для этого проанализировали многолетнюю эпидемиологическую ситуацию по исследуемым нозологиям по Республике Башкортостан (РБ) и в г. Уфа за период 1996-2013 гг. Полученные данные свидетельствовали об определяющей роли в формировании заболеваемости микроспорией и трихофитией, обусловленной *T. mentagrophytes*, пациентов в возрасте 3-14 лет, а трихофитией, вызванной *T. verrucosum* – пациентов 7-14 лет. Указанное послужило основанием для включения в исследование больных именно этих групп, что обеспечило максимальную объективность сравнительной оценки эффективности использования ПЦР и традиционных методов для обнаружения *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes* в клиническом материале.

По данным, полученным в ходе обследования пациентов соответствующих групп при подозрении на микроспорию чувствительность ПЦР составила 97,4% (96,4-98,4;  $p < 0,05$ ), специфичность – 98% (87,1-98,9;  $p < 0,05$ ), а диагностическая эффективность – 97,6% (96,6-98,6;  $p < 0,05$ ). При диагностике трихофитии, обусловленной *T. mentagrophytes*, показатели чувствительности, специфичности и диагностической эффективности для ПЦР составили соответственно 97,3% (95,8-98,8;  $p < 0,05$ ), 97,1% (95,5-98,7;  $p < 0,05$ ) и 97,2% (96,1-98,3;  $p < 0,05$ ), а в ходе лабораторной диагностики трихофитии, вызванной *T. verrucosum*, – 98,2% (97,0-99,4;  $p < 0,05$ ), 97,5% (85,8-99,2;  $p < 0,05$ ) и 97,9% (96,9-98,9;  $p < 0,05$ ) соответственно (рисунок 5). При этом выявленные преимущества ПЦР во всех случаях были статистически значимыми в сравнении с данными световой микроскопии и культурального исследования.



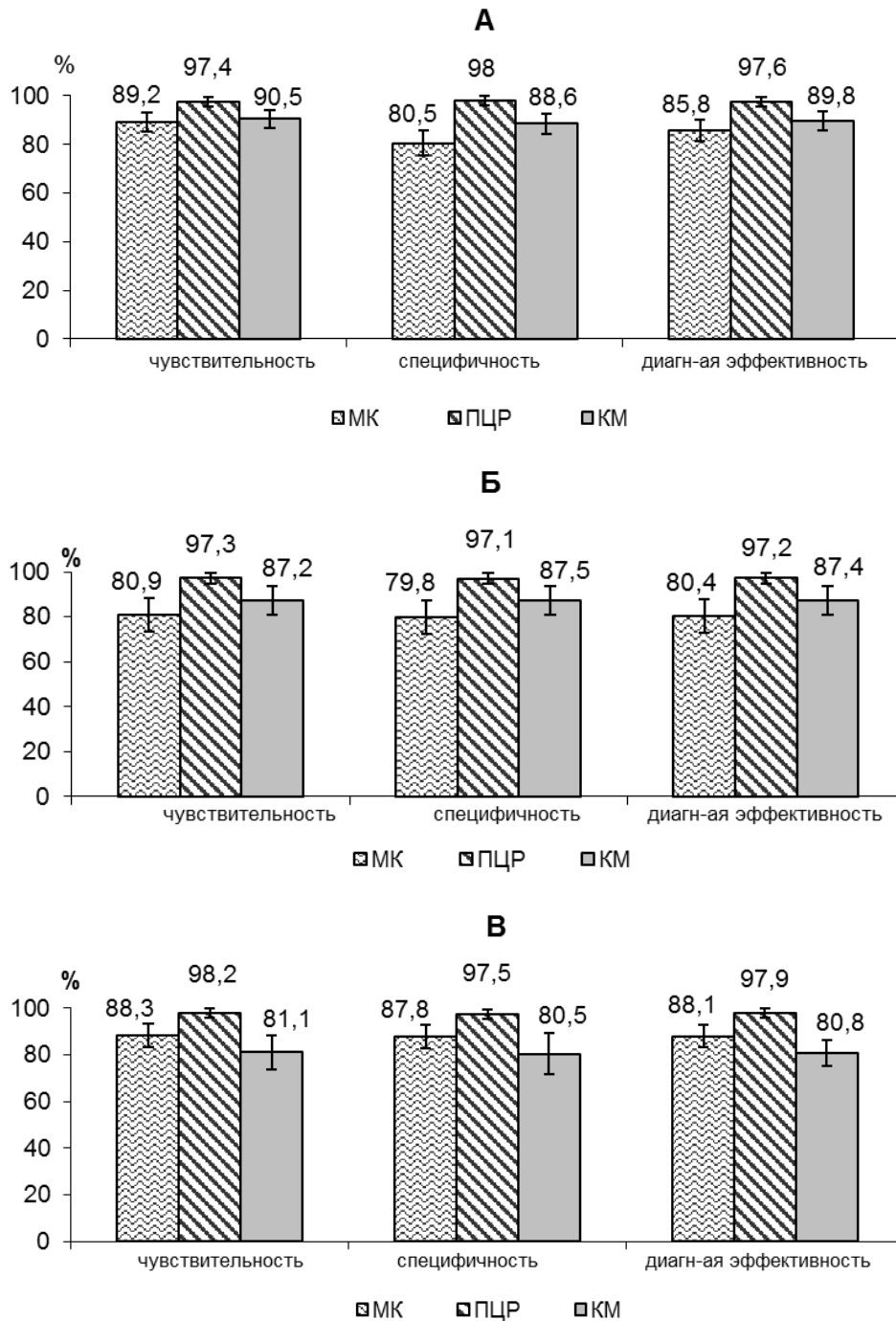


Рисунок 5 – Сравнительная оценка чувствительности, специфичности и диагностической эффективности микроскопии (МК), ПЦР и культурального метода (КМ) в диагностике микроспории (А), трихофитии, обусловленной *T. mentagrophytes* (Б), и трихофитии, обусловленной *T. verrucosum* (В), на группах пациентов высокого риска заболеваемости перечисленными выше патологиями.

Вероятность диагностируемого заболевания при положительном результате ПЦР на микроспорию, оцененная через прогностическую ценность положительного результата (ПЦ+), в группе детей 3-14 лет оказалась также наибольшей

(98,7%), как и значение положительного результата ПЦР на трихофитию, обусловленную *T. mentagrophytes*, (ПЦ+ = 97,3%) в аналогичной группе. Величина вероятности наличия заболевания при положительном результате ПЦР на трихофитию, вызванную *T. verrucosum*, оказалась наибольшей в группе детей 7-14 лет (ПЦ+ = 98,2%). Тем самым вероятность отсутствия этих заболеваний (отрицательная прогностическая ценность теста (ПЦ-) при отрицательных результатах ПЦР-детекции *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes* в клиническом материале составила 91,9%, 97,5% и 97,1% соответственно (таблицы 2, 3, 4).

Таблица 2 – Показатели прогностической ценности (ПЦ+; ПЦ-) и отношения правдоподобия (ОП+; ОП-) микроскопии, культурального метода и ПЦР при диагностике микроспории в возрастной группе пациентов 3-14 лет

Метод	ПЦ (%)		ОП (шанс)	
	ПЦ+	ПЦ-	ОП+	ОП-
МК	97,7	82,8	4,6	0,1
КМ	92,5	85,7	7,9	0,1
ПЦР	98,7	91,9	48,7	0,03

Таблица 3 – Показатели прогностической ценности (ПЦ+; ПЦ-) и отношения правдоподобия (ОП+; ОП-) микроскопии, культурального метода и ПЦР при диагностике трихофитии, обусловленной *T. verrucosum*, в возрастной группе пациентов 7-14 лет

Метод	ПЦ (%)		ОП (шанс)	
	ПЦ+	ПЦ-	ОП+	ОП-
МК	90,7	84,7	7,2	0,1
КМ	84,9	75,8	4,2	0,2
ПЦР	98,2	97,5	39,3	0,02

Таблица 4 – Показатели прогностической ценности (ПЦ+; ПЦ-) и отношения правдоподобия (ОП+; ОП-) микроскопии, культурального метода и ПЦР при диагностике трихофитии, обусловленной *T. mentagrophytes*, в возрастной группе пациентов 3-14 лет

Метод	ПЦ (%)		ОП (шанс)	
	ПЦ+	ПЦ-	ОП+	ОП-
МК	80,9	79,8	4,0	0,2
КМ	88,1	86,7	7,0	0,1
ПЦР	97,3	97,1	33,6	0,03

В смысловом ряду критерия прогностической ценности теста находится ещё один показатель, применяемый для выражения и сравнения между собой диагностической пользы различных тестов и обозначаемый как отношение правдоподобия (ОП). Этот критерий наглядно отражает во сколько раз возрастают шансы на точный диагноз у истинно больного при использовании лабораторного теста, чем без его применения, с учетом риска ложноположительных результатов. Как следует из данных таблиц 2, 3, 4, применение ПЦР при дерматомикозах, вызванных *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes*, повышало вероятность точного диагноза в 48,7, 39,3 и 33,6 раза соответственно, тогда как микроскопия и культуральное исследование увеличивали шансы на точный диагноз лишь в 4,6/7,2/4,0 (*M. canis* / *T. verrucosum* / *T. mentagrophytes*) и 7,9/4,2/7,0 (*M. canis* / *T. verrucosum* / *T. mentagrophytes*) раза соответственно.

По рискам ложноотрицательных результатов микроскопия, культуральный метод и ПЦР при дерматомикозах сравнительно оценены при помощи критерия отношения правдоподобия для отрицательного результата (ОП–) (таблицы 2, 3, 4). Показано, что применение ПЦР при дерматомикозах, обусловленных *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes*, снижало вероятность не выявить больного в 0,03, 0,02 и 0,03 раза соответственно, тогда как микроскопия и культуральное исследование увеличивали шансы на точный диагноз лишь в 0,1/0,1/0,2 (*M. canis* / *T. verrucosum* / *T. mentagrophytes*) и 0,1/0,2/0,1 (*M. canis* / *T. verrucosum* / *T. mentagrophytes*) раза соответственно. Полученные данные наглядно отражают тот факт, что вероятность ложноотрицательного результата при ПЦР-диагностике дерматомикозов ниже, чем при использовании микроскопии и/или культурального метода в 10 раз.

Таким образом, предложенные на основании комплексного исследования биологических свойств патогенных дерматомицетов праймеры к умеренно вариабельным участкам ДНК (ITS1 и ITS2) *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes* обеспечивают надежную видоспецифичную амплификацию искомым фрагментов нуклеиновых кислот указанных грибов. Тест-системы, созданные на их основе, позволяют обнаруживать *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes* в различных клинических образцах. В количественном выражении диагностическая информативность разработанных тест-систем для ПЦР-диагностики микроспории и трихофитии в сравнении с микроскопией и культуральным методом характеризуется значениями показателей чувствительности и специфичности исследования для *M. canis* – 97,4% и 98%, для *T. mentagrophytes* – 97,3% и 97,1% и *T. verrucosum* – 98,2% и 97,5%, соответственно.

Продемонстрированный алгоритм конструирования новых диагностических систем, отличающийся испытанием их на обоснованных группах наблюдения, позволяет повысить информативность разработок при существенном сокра-

щении расходов без снижения достоверности результатов. Созданные тест-системы позволяют формировать коллекции грибов для исследования теоретических основ наследственности и закономерностей взаимоотношения патогенных грибов с окружающей средой и живыми организмами, для борьбы с вызываемыми ими болезнями человека и животных, для их идентификации, в том числе при обнаружении дерматомицетов с нетипичной морфологией, при изменениях их физиологии, биохимии и даже генетики, обусловленных сапрофитическими, паразитическими или симбиотическими формами взаимодействий с другими микроорганизмами.

## ВЫВОДЫ

1. Клинические штаммы культур *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes*, полученные от пациентов, заболевших относительно недавно и не получавших специфические антимикотические препараты, имеют относительно характерную для них морфологию. В остальных случаях (11,7%), при микологическом исследовании образцов от длительно болевших пациентов и лиц старших возрастных групп, преимущественно выявляются атипичные культуры (*M. canis* – 60,6%, *T. verrucosum* – 26,7%, *T. mentagrophytes* – 12,7%), что существенно затрудняет их морфологическую дифференцировку.

2. Для специфичной молекулярно-генетической детекции *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes* оптимальной является амплификация методом ПЦР фрагментов, включающих участки ДНК (ITS1, ITS2), прилегающие к гену 5.8S рРНК, что может использоваться для разработки диагностических тест-систем. Полимеразная цепная реакция позволяет выявлять и идентифицировать *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes* в клиническом материале в минимальной концентрации 34 пкг/мкл, 43,3 пкг/мкл и 21,4 пкг/мкл, соответственно.

3. Статистически значимые результаты оценки информативности тест-систем для видоспецифичной детекции *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes* возможно получить при сплошном исследовании образцов от пациентов в возрасте 3-14 лет с подозрением на микроспорию и трихофитию, обусловленную *T. mentagrophytes*, и пациентов 7-14 лет с подозрением на трихофитию, обусловленную *T. verrucosum*. При этом исключается влияние на результаты оценки популяционных факторов и уменьшается влияние ложноположительных результатов при обнаружении *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes* в 48,7, 39,3 и 33,6 раза соответственно.

4. Предложенные способы специфической детекции *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes* характеризуются чувствительностью, специфичностью и диагностической эффективностью исследования для *M. canis* – 97,4%, 98% и 97,6%, *T. mentagrophytes* – 97,3%, 97,1% и 97,2%, *T. verrucosum* – 98,2%, 97,5% и 97,9%, соответственно, и превосходят результаты, полученные

при микроскопии для *M. canis* на 8,2%, 17,5% и 11,8%, для *T. mentagrophytes* на 16,4%, 17,3% и 16,8%, для *T. verrucosum* на 9,9%, 9,7% и 9,8%, соответственно, а при культуральном исследовании для *M. canis* на 6,9%, 9,4% и 7,8%, для *T. mentagrophytes* на 10,1%, 9,6% и 12,4%, для *T. verrucosum* на 17,1%, 17% и 17,1%, соответственно.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### а) статьи в рецензируемых научных журналах ВАК Минобрнауки России

1. Ефимов, Г.Е. Оптимизация лабораторной составляющей диагностической подсистемы эпидемиологического надзора за микроспорией / Г.Е. Ефимов, А.Р. Мавзютов, **Т.Н. Титова** [и др.] // **Медицина в Кузбассе**. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 53-58. ИФ 0,106 цит. 1

2. **Титова, Т.Н.** Эпидемиологически обоснованная сравнительная оценка информативности методов лабораторной диагностики зооантропонозной трихофитии / **Т.Н. Титова**, А.Р. Мавзютов, Г.Е. Ефимов, Р.Р. Мухамадиева // **Клиническая лабораторная диагностика**. – 2015. – № 7. – С. 58-62. ИФ 0,297

### б) патенты

1. Мавзютов, А.Р. Способ специфической детекции *Microsporum canis* в клиническом материале при различных клинических формах заболевания: пат. 2558927 Рос. Федерация / Мавзютов А.Р., Ефимов Г.Е., **Титова Т.Н.**, Никаноров Ю.М., Кулуев Б.Р., Титова А.А.; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО БГМУ. – № 2014124734; заявл. 17.06.2014; опубл. 10.08.2015, Бюл. № 22.

2. Мавзютов, А.Р. Способ специфической детекции *Trichophyton verrucosum* в клиническом материале при различных клинических формах заболевания: пат. 2562540 Рос. Федерация / Мавзютов А.Р., Ефимов Г.Е., Никаноров Ю.М., Кулуев Б.Р., **Титова Т.Н.**, Попова Д.Р., Хисматуллина З.Р., Титова А.А.; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО БГМУ. – № 2014124793; заявл. 17.06.2014; опубл. 10.09.2015, Бюл. № 25.

3. Мавзютов, А.Р. Способ специфической детекции *Trichophyton mentagrophytes* в клиническом материале при различных клинических формах заболевания: пат. 2563619 Рос. Федерация / Мавзютов А.Р., Ефимов Г.Е., Никаноров Ю.М., Кулуев Б.Р., **Титова Т.Н.**, Попова Д.Р., Хисматуллина З.Р., Титова А.А. – № 2014124735; заявл. 17.06.2014; опубл. 20.09.2015б, Бюл. № 26.

### в) статьи в других рецензируемых журналах

1. Хисматуллина, З.Р. Ошибки в диагностике трихофитии волосистой части головы / З.Р. Хисматуллина, О.Р. Мухамадеева, Т.М. Гафаров, **Т.Н. Титова** // **Современные проблемы дерматовенерологии, иммунологии и врачебной косметологии**. – 2012. – № 2 (21). – С. 32-36.

г) тезисы докладов научных конференций

1. **Титова, Т.Н.** Сравнительная оценка методов диагностики микроспории / **Т.Н. Титова**, А.Р. Мавзютов, Э.З. Мингазова, Ф.И. Язданов // **Инфекционные болезни.** – 2010. – Т. 8, № 1: Материалы II Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням. – С. 320. ИФ 0,549

2. **Титова, Т.Н.** Эпидемиология и идентификация микроспорий в РБ / **Т.Н. Титова**, А.Р. Мавзютов, Э.З. Мингазова, Ф.И. Язданов // **Иммунопатология. Аллергология. Инфектология.** – 2010. – № 1. – С. 172. ИФ 0,388

3. **Титова, Т.Н.** Методы диагностики микроспории / **Т.Н. Титова**, А.Р. Мавзютов, Р.Н. Гущина [и др.] // **Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.** – 2010. – Т. 12, № 2, прил. 1. – С. 49. ИФ 1,262

4. **Титова, Т.Н.** Актуальность и перспективы лабораторной диагностики микроспории / **Т.Н. Титова**, Р.Н. Гущина, Ф.И. Халилова [и др.] // **Клиническая лабораторная диагностика.** – 2010. – № 9. – С. 38. ИФ 0,297

5. Язданов, Ф.И. О перспективах молекулярно-биологической диагностики микроспории / Ф.И. Язданов, **Т.Н. Титова**, Э.З. Мингазова, А.Р. Мавзютов // **Клиническая лабораторная диагностика.** – 2011. – № 9. – С. 49. ИФ 0,297  
цит. 2

6. **Титова, Т.Н.** Детекция *Trichophyton verrucosum* и *Trichophyton mentagrophytes* в клиническом материале при использовании полимеразной цепной реакции / **Т.Н. Титова**, Ю.М. Никаноров, Б.Р. Кулуев, А.Р. Мавзютов // Молекулярная диагностика: сборник трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – 2014. – Т. 2. – С. 547-548.

7. **Титова, Т.Н.** Детекция *Microsporum canis* в клиническом материале при использовании полимеразной цепной реакции / **Т.Н. Титова**, А.Р. Мавзютов, Э.З. Мингазова, Ф.И. Язданов // Молекулярная диагностика: сборник трудов VII Всероссийской научно-практической конференции. – 2010. – Т. 3. – С. 258.

8. **Титова, Т.Н.** Актуальность и перспективы профилактики микроспории / **Т.Н. Титова**, Ф.И. Язданов // Ломоносов 2010: материалы XVII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных. – М., 2010.

9. **Титова, Т.Н.** Сравнительная оценка информативности методов лабораторной диагностики микроспории / **Т.Н. Титова**, Г.Е. Ефимов, А.Р. Мавзютов // Сборник материалов VI Всероссийского конгресса по медицинской микологии. – М., 2014. – С. 196-198.

10. **Титова, Т.Н.** Сравнительная оценка информативности методов лабораторной диагностики зооантропонозной трихофитии / **Т.Н. Титова**, Г.Е. Ефимов, Р.Н. Гущина, А.Р. Мавзютов // Сборник материалов VI Всероссийского конгресса по инфекционным болезням. – М., 2014. – С. 387.

11. **Титова, Т.Н.** Применение метода полимеразной цепной реакции в лабораторной диагностике зооантропонозной трихофитии / **Т.Н. Титова**, А.Р. Мавзютов, Г.Е. Ефимов, А.А. Титова, Р.Ш. Хуснутдинов // **Клиническая лабораторная диагностика.** – 2014. – № 9. – С. 89. ИФ 0,297