

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор Мавзютов А.Р.

Уфа – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Медико-биологическое значение дерматомицетов	11
1.2. Заболевания, вызываемые грибами родов <i>Microsporum</i> и <i>Trichophyton</i> ..	14
1.3. Характеристика возбудителей микроспории и трихофитии	16
1.4. Регламентированные методы лабораторной диагностики дерматомикозов ..	18
1.5. Применение полимеразной цепной реакции для выявления и идентификации дерматомицетов	22
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	30
2.1. Объекты исследования	30
2.2. Микологические методы исследования	31
2.2.1. Световая микроскопия клинического материала	31
2.2.2. Культивирование и идентификация дерматомицетов	32
2.3. Выделение ДНК из клинических образцов	33
2.4. Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей	35
2.5. Подбор олигонуклеотидных праймеров для специфической детекции ДНК <i>M. canis</i> , <i>T. mentagrophytes</i> и <i>T. verrucosum</i>	35
2.6. Специфическая детекция ДНК <i>M. canis</i> , <i>T. mentagrophytes</i> и <i>T. verrucosum</i> в клинических образцах с помощью метода ПЦР	36
2.7. Электрофоретический анализ ДНК в агарозном геле	37
2.8. Автоматическое секвенирование ДНК ферментативным методом	38
2.9. Методы статистической обработки полученных данных	39
СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	42
Глава 3. КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕРМАТОМИЦЕТОВ, ВЫЯВЛЯЕМЫХ В КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ	42

3.1. Результаты световой микроскопии клинического материала	42
3.2. Изучение культурально-морфологических особенностей штаммов дерматомицетов	44
Глава 4. ВЫБОР НАИБОЛЕЕ ЭФФЕКТИВНОГО МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ	53
Глава 5. КОНСТРУИРОВАНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ПЦР- ДЕТЕКЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ МИКРОСПОРИИ И ТРИХОФИТИИ В КЛИНИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ	56
5.1. Поиск информативных участков ДНК для ПЦР-идентификации <i>M. canis</i> , <i>T. mentagrophytes</i> и <i>T. verrucosum</i> и подбор оптимальных олигонуклеотидных праймеров	56
5.2. ПЦР-идентификация <i>M. canis</i> и подбор оптимальных условий для эффективной амплификации специфичных участков ДНК	61
5.3. ПЦР-идентификация <i>T. mentagrophytes</i> и <i>T. verrucosum</i> и подбор оптимальных условий для эффективной амплификации специфичных участков ДНК	64
Глава 6. ВЫБОР АДЕКВАТНЫХ ГРУПП СРАВНЕНИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ ИНФОРМАТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ МЕТОДОВ	69
Глава 7. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИНФОРМАТИВНОСТИ ПЦР И ТРАДИЦИОННЫХ МЕТОДОВ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ДЕРМАТОМИКОЗОВ	73
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	81
ВЫВОДЫ	85
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	87
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	88
ПРИЛОЖЕНИЯ	113
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	157

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. В последние годы повсеместно отмечается возрастание медико-биологического значения дерматомицетов [107, 217, 128], в частности представителей зоофильных грибов родов *Microsporum* и *Trichophyton* [137, 185, 189]. Указанное обусловлено увеличением частоты встречаемости вызываемых ими заболеваний [127], а также их атипичных форм, трудно дифференцируемых с микозами другой этиологии и заболеваниями негрибкового происхождения [20, 126]. При этом существенно возрастает значимость методов лабораторной диагностики [54, 200], однако, на практике их фактическая информативность относительно невысока [167, 221] ввиду медленного роста дерматомицетов на питательных средах и частого формирования атипичных форм этих грибов в результате предшествующей (как правило, местной) антифунгальной терапии [133, 224].

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 [181, 237, 144].

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 [174, 219].

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 [128]. Предложены способы диагностики онихомикоза кистей и стоп, основанные на обнаружении и идентификации методом ПЦР *Trichophyton rubrum* в образцах кожи и/или ногтевых пластинок [93] и идентификации дерматомицетов рода *Trichophyton* при онихомикозах [102]. 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 конструирование 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 *Microsporium 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. – 239 с; 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

вариабельные 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 вариабельным 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 зоофильных атипичных 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 днях» (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 № П385 от 30 июля 2009 года.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Медико-биологическое значение дерматомицетов

Грибковые инфекции в последние годы становятся проблемой здравоохранения во многих странах мира. Этому способствовало внедрение в клиническую практику трансплантации органов и тканей, высокодозной иммуносупрессивной терапии, ряда новых инвазивных диагностических и лечебных процедур, пандемия ВИЧ-инфекции, профилактическая антибиотикотерапия бактериальных осложнений в хирургии и многое другое, что привело к увеличению количества иммунокомпроментированных пациентов с высоким риском развития микозов [122, 97, 24]. Все чаще условно-патогенные грибы становятся причиной инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), регистрируемых в самых оснащенных клиниках [26, 120, 97]. В клинической практике в настоящее время имеют значение около 100 видов патогенных и условно-патогенных грибов, не исключается медицинская значимость ещё 400 видов микромицетов [188, 18, 96, 59]. В связи с этим своевременная детекция и идентификация грибковых патогенов становятся обязательными для успешного лечения пациентов и снижения рисков инфицирования населения. Указанное приобретает особое значение при зооантропонозных дерматомикозах в связи с их эпидемиологическими особенностями и распространенностью [229].

По данным ВОЗ, каждый пятый житель планеты страдает от грибковых заболеваний кожи и её придатков [124, 97]. Дерматомикозы (дерматофитии) – поверхностные заболевания кожи и ее придатков, вызываемые микроскопическими грибами – дерматомицетами (дерматофитами), на сегодняшний день остаются актуальной проблемой дерматологии и медицины в целом [69, 84, 14, 21, 45, 107, 186, 217].

Распространение дерматомикозов происходит контактно-бытовым путем (прямой и непрямой контакт). Заболевание передается при непосредственном соприкосновении с источником микотической инфекции (больной человек, больное животное или носитель) или при контакте с объектами окружающей среды, контаминированными дерматомицетами [69].

В настоящее время сохраняется интерес к дерматомикозам, вызываемым зоофильными грибами родов *Microsporum* и *Trichophyton*. В различных регионах Российской Федерации и за рубежом регистрируются периодические эпидемиологические вспышки этих заболеваний [126, 22, 99, 46, 8, 88, 123, 189]. По литературным данным, в странах Европы (Польша, Венгрия, Хорватия, Италия, Греция и др.) за последние тридцать лет заболевание дерматомикозами регистрировалось от 1,2% до 26,9% случаев. Повышение уровня заболеваемости микроспорией отмечалось в летне-осенний период. Болели как взрослые, так и дети [208, 195, 235, 218, 185, 229, 137]. На территории африканского континента, в таких странах, как Египет, Алжир, Сенегал, Нигерия, согласно опубликованным данным, случаи заболеваемости дерматомикозами отмечались значительно чаще (41,5-62,4%) [209, 132, 206, 141]. По данным ряда авторов дерматомикозы достаточно часто встречаются в странах Азии (Иран, Кувейт, Йемен и др.) (16,6-74%) и Южной Америки (Бразилия – 44,8%) [196, 216, 205, 239, 166, 142, 189].

По уровню заболеваемости микроспория занимает второе место в мире среди всех грибковых заболеваний, а трихофития является вторым по частоте встречаемости микозом волосистой части головы после микроспории [31, 116, 126, 32, 67, 66, 57, 43, 207, 132].

Неблагополучная эпидемиологическая ситуация по заболеваемости микроспорией и трихофитией в Российской Федерации неоднократно была отмечена в исследованиях целого ряда авторов [38, 127, 28, 99, 74]. О нестабильности эпидемиологической ситуации в стране свидетельствуют продолжающееся снижение показателей заболеваемости этими дерматомикозами на одних территориях России и их рост на других [127, 99, 47, 7, 48].

Особенностью эпидемиологических проявлений микроспории, как и в других странах, являются вспышки заболевания с формированием семейных очагов [28, 94, 23, 221, 12, 182, 240]. При этом необходимо отметить региональные отличия, обусловленные в определенной мере, как особенностями среды обитания на конкретных территориях, так и существенными отличиями качества диагностики [127, 101, 201, 33, 15, 172, 173, 192].

Трихофития по частоте встречаемости на территории РФ в настоящее время уступает микроспории. Наиболее неблагоприятными являются Южный, Северо-Кавказский, Приволжский, Уральский, Приморский федеральные округа. Республики Дагестан, Кабардино-Балкария, Ингушетия, Саха (Якутия), Башкортостан относятся к регионам с высоким уровнем заболеваемости данной патологией. На территории Северо-Западного федерального округа РФ зооантропонозная трихофития регистрируется спорадически, хотя в последние годы отмечается тенденция к постепенному росту заболеваемости благодаря активной миграции населения из южных регионов России и Средней Азии [74, 68, 2, 56, 99, 46, 7]. Заболеваемость характерна для сельских жителей, так как заражение происходит в основном от домашних животных. В связи с этим заболеваемость сельского населения в 10-15 раз выше городского [23].

Одним из наиболее сложных вопросов в эпидемиологии зооантропонозных дерматомикозов является установление источника заражения [115].

В роли возбудителя микроспории чаще всего выступал зоофильный гриб *M. canis* [152, 225, 215, 229, 239, 166, 142, 185, 141, 206]. Основным источником заражения микроспорией, по данным большинства исследователей, являлись кошки, реже – собаки, а также другие животные [110, 9, 13, 61, 168, 176, 213, 225, 215, 153].

В этиологической структуре трихофитии чаще присутствовали два возбудителя, это *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes* [152, 216, 205, 239, 166, 142, 206, 137, 185, 141, 189, 165, 229, 204, 198, 171]. Источником инфекции для трихофитии, обусловленной *T. verrucosum*, в большинстве случаев являлся крупный рогатый

скот [204, 198, 171]. Заражение трихофитией, обусловленной *T. mentagrophytes*, чаще происходило от контакта с мышевидными грызунами [98, 46, 73, 153].

1.2. Заболевания, вызываемые грибами родов *Microsporum* и *Trichophyton*

Грибковые заболевания, или микозы, относятся к инфекционным болезням, составляя значительную их часть. До настоящего времени еще не предложена классификация микозов, полностью удовлетворяющая запросам практикующего врача. Среди микозов встречаются острые и хронические (по течению), поверхностные и глубокие (по глубине поражения кожи и слизистых), локализованные и распространенные формы [65, 50, 70, 92, 145, 178, 86].

В нашей стране пользуются классификацией дерматомикозов, предложенной профессором Н.Д. Шеклаковым в 1976 году, которая была построена с учетом данных об этиологии и эпидемиологии этих заболеваний [100, 65, 105, 52, 106].

Как уже было отмечено, в настоящее время продолжают оставаться актуальными, особенно для Республики Башкортостан, зооантропонозные дерматомикозы [46, 31].

Микроспория – грибковое заболевание из группы дерматомикозов, при котором поражаются кожа и волосы, а в исключительно редких случаях и ногтевые пластинки [69]. Болеют главным образом дети, т.к. недостаточная плотность и компактность кератина клеток эпидермиса и волос способствует внедрению и развитию гриба [111, 127]. Для заболевания характерна сезонность. Всплеск заболеваний микроспорией приходится на май -июнь и сентябрь – ноябрь [129, 131, 19, 1].

По тяжести поражений различают поверхностную, глубокую, стертую (атипичную) и скрытую формы микроспории [23, 41, 64, 63, 42, 19, 103, 130, 233].

Микроспорией, помимо детей и взрослых, болеют животные (кошки, собаки, лошади и др.), у которых также встречаются глубокая и атипичная формы

заболевания. Описаны стертые формы микроспории кошек [35, 180, 225, 215].

Трихофития – грибковое заболевание кожи, волос, реже ногтей, обусловленное различными видами грибов рода *Trichophyton* [69].

Различают три клинические формы трихофитии: поверхностная, инфильтративно-нагноительная и нагноительная [113, 56, 35, 62].

Трихофития распространена так же среди животных (лошади, свиньи, крупный рогатый скот, мыши, крысы и др.), клинические проявления у которых весьма разнообразны [35, 153, 204, 198, 171].

В последние годы многие исследователи отмечают изменения в клинической картине зооантропонозных дерматомикозов, появление их стертых и атипичных форм [127, 101]. Малосимптомные, стертые, вялотекущие формы микроспории гладкой кожи обычно принимают за проявления себорейного дерматита, себореи, стрептодермию, хроническую трихофитию [42, 127, 201]. Микроспория, сопровождающаяся значительным отеком и эритемой при почти отсутствующем шелушении, имитирует розовый лишай, многоформную экссудативную эритему, центробежную эритему Дарье, эритему Афцелиуса-Липшютца. Глубокие формы микроспории, сопровождающиеся инфильтрацией, нагноением, вегетациями, при локализации на волосистой части головы обычно сходны с инфильтративно-нагноительной трихофитией типа *kerion Celsii* или глубокими формами пиодермии. При локализации на коже лица они имитируют красную волчанку, эозинофильную гранулему лица, лимфоцитарную инфильтрацию, при локализации на голенях – гранулему Майокки [127, 77]. По данным ряда авторов, наблюдаются и атипичные формы зооантропонозной трихофитии, при которых она маскируется под экзему, псориаз, красную волчанку, розовый лишай Жибера [56, 127, 227].

1.3. Характеристика возбудителей микроспории и трихофитии

Дерматомицеты – кератофильные грибы, патогенные для человека и животных, поражающие роговой слой кожи, ногти, когти или волосы [53, 138, 223].

Возбудители дерматомикозов относятся к родам *Trichophyton*, *Microsporum* и *Epidermophyton* (21). Представителей данных родов относят к IV группе патогенности микроорганизмов [76, 135].

С эпидемиологической точки зрения дерматомицеты подразделяют на антропофилы, зоофилы и геофилы, подчёркивая их преимущественную приуроченность к среде обитания [20, 35].

Мицелий дерматомицетов состоит из разнообразных по форме и размерам клеток, заканчивающихся в виде спиралей или завитков, булавовидных вздутий или дубинок. Округлые или грушевидные микроконидии, веретенообразные или сигаровидные макроконидии располагаются по бокам и на концах мицелия, интеркалярные хламидоспоры образуются по ходу, а терминальные – на концах мицелия.

Дерматомицеты – аэробы, используют для питания белки, пептоны, аммонийные соли, нитраты и нитриты, многие хорошо растут на волосах животного и человека, разрушая кератин. Из углеводов используют моно- и дисахариды, многоатомные спирты, соли различных органических кислот, хорошо растут на овощах и фруктах, а некоторые даже на древесине и удобренной почве. Температурный оптимум роста для большинства дерматомицетов 28-30°C. [35, 60].

Как было отмечено многими авторами, в роли возбудителя микроспории чаще всего выступал зоофильный гриб *M. canis* [142, 185, 141, 206], а в этиологической структуре трихофитии чаще присутствовали два возбудителя – *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes* [11, 206, 137, 185, 141, 189, 165, 198].

Представители родов *Microsporum* и *Trichophyton* относятся к семейству *Arthrodermataceae*, порядку *Onygenales*, классу *Ascomycota*, отделу *Eumycota*, царству *Fungi*, надцарству *Eukaryota*.

M. canis – зоофильный гриб, поражающий роговой слой кожи и волосы, по контагиозности уступает антропофильным.

Возбудитель впервые был описан Грюби в 1843 году. В России микроспория впервые была описана С.Л. Богровым в 1912 году [77]. Устойчив к факторам окружающей среды (в волосах сохраняет жизнеспособность до 10 лет, в чешуйках – до 7 лет). Основной резервуар гриба и источник заражения – кошки (особенно котята), собаки, реже – мелкие грызуны [16, 158]. Пути передачи – прямой (основной) и опосредованный (через предметы, загрязненные волосами или чешуйками, содержащими *M. canis*) [169]. Относительно редко инфицирование происходит от больного человека.

Тканевая форма гриба в волосе: мелкоспоровый эктотрикс – мелкие круглые споры диаметром 2-3 мкм, тесно прилегают друг к другу и располагаются в волосе и вокруг него, напоминая мозаику.

Колонии *M. canis* быстрорастущие, рыхло-пушистые, серовато-беловатые, иногда желтовато-розоватые, с концентрическими кругами различной густоты воздушного мицелия, без отпрысков в субстрат [58, 35, 37, 55].

T. mentagrophytes – зоофильный гриб, имеющий повсеместное распространение [98, 21, 159].

В XIX веке одна из разновидностей трихофитии была описана Казенавом в 1842 г., грибковая природа данного заболевания установлена Грюби в 1844 г. [34]. Резервуаром инфекции в природе являются преимущественно мелкие грызуны (в основном, мышевидные). Считается, что заражение человека трихофитией, вызванной данным возбудителем, происходит, в основном, путем прямого или косвенного (через зерно, растения или кошек) контакта с мышевидными грызунами [100, 232].

Гриб относится к быстро растущим дерматомицетам, заметные колонии его получают на 3-4-й день, зрелые 15-дневные достигают 10 см диаметром.

Тканевая форма: волосы поражаются по типу мелкоспорового эктотрикса. В пораженном волосе – цепочки из спор диаметром 5-6 мкм, вне волоса споры неровные, размером 2-11 мкм.

Колонии вначале коротко-бархатистые, затем мучнистые, широкие, плоские, нередко занимают всю поверхность питательной среды в чашках или колбах [35, 37].

T. verrucosum относится к числу повсеместно распространенных зоофильных возбудителей. Основной резервуар инфекции – крупный и мелкий рогатый скот [210]. Максимальная заболеваемость трихофитией, вызванной *T. verrucosum*, наблюдается с декабря по март, что связано со стойловым содержанием животных [73].

Тканевая форма гриба – крупноспоровый эктотрикс. Гриб медленно растущий, развивается лучше при 37° С. Колонии кожистые, бугристые, обычно голые, без воздушного мицелия, периферия колоний плоская, довольно узкая.

Все штаммы *T. verrucosum* нуждаются в тиамине, многие в инозитоле, лучше растут на средах с дрожжевым экстрактом [35, 58, 44].

1.4. Регламентированные методы лабораторной диагностики дерматомикозов

К регламентированным методам лабораторной диагностики микроспории и трихофитии относятся микроскопическое и культуральное (микологическое) исследования. Также важную вспомогательную роль в диагностике играет люминесцентный метод [80, 58, 4, 71, 54, 241, 200, 108, 109].

В 1925 г. Margaret и Deveze обнаружили, что волосы, пораженные некоторыми дерматомицетами, дают характерное свечение в ультрафиолетовых лучах, пропущенных через фильтр Вуда. Стекло Вуда состоит из сульфата бария, содержит около 9% окиси никеля, оно пропускает лучи длиной 365 нм. В качестве источника ультрафиолетовых лучей можно использовать различные приборы. Природа свечения точно не установлена. Волос продолжает светиться после гибели гриба и после попыток экстрагировать флюоресцирующий материал горячей водой или холодным раствором бромида натрия. Интенсивность и характер свечения

зависят от рН раствора. Полагают, что флюоресцирующая субстанция появляется в процессе взаимодействия гриба и растущего волоса.

Свечение в ультрафиолетовых лучах, пропущенных через фильтр Вуда, характерно только для волос, пораженных грибами рода *Microsporum*. Свечение наблюдается только в полностью пораженных грибом волосах. Его может не быть в свежих очагах поражения. Выявленные с помощью люминесцентного метода пораженные волосы должны обязательно подвергаться микроскопическому исследованию [80].

Микроскопия является быстрым, простым и наиболее широко используемым методом лабораторной диагностики дерматомикозов [164, 231, 226]. Результат исследования считается положительным, если в препарате видны нити мицелия или цепочки конидиев. В диагностике дерматомикозов волосистой части головы учитывают также расположение элементов гриба относительно стержня волоса. В случаях отсутствия роста возбудителя в культуре положительный результат прямой микроскопии может являться подтверждением микотической инфекции.

Патологический материал изучают в нативных препаратах. Для просветления препаратов, используют 10-20% раствор едкой щелочи (КОН). Для лучшего просветления материала и достижения мацерации тканей используют комбинацию КОН и диметилсульфоксида (КОН/ДМСО) [58].

В последнее время разработан и внедрен в практику новый метод микроскопии нативных препаратов с окраской калькофлюором белым. Сочетанное применение калькофлюора белого с КОН позволяет выявлять как молодые, так и зрелые гифы гриба. По данным специалистов НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, применение метода окраски калькофлюором белым при микроскопической диагностике дерматомикозов позволяет на 10% увеличить выявляемость грибковой инфекции по сравнению со стандартным КОН-методом [114, 20, 197].

Определение этиологии и идентификация дерматомицетов проводятся по морфологическим особенностям после выделения культуры [36, 82, 134, 159]. При необходимости проводятся дополнительные тесты (уреазная активность, образование

пигмента на специальных средах, потребность в питательных добавках и др.) [88, 39, 40, 91].

Культуральные (микологические) методы исследования до сих пор остаются предпочтительными при диагностике микозов. К задачам культурального метода исследования относят определение возможности смешанной инфекции, подтверждение грибковой инфекции перед началом продолжительного лечения антимикотиками, а также исключение негрибковой патологии [161].

Получение культур грибов необходимо для их идентификации и определения чувствительности к антифунгальным препаратам. Традиционным способом остается посев на среду Сабуро [49]. Однако, эти грибы характеризуются медленным ростом на питательных средах, поэтому посеvy часто зарастают быстрорастущими плесневыми грибами – контаминантами. В практику микологических лабораторий в России и за рубежом чаще входит использование для культуральной диагностики дерматомикозов специальных селективных сред [184, 89, 10].

По результатам анализа ранее проведенных за рубежом крупных исследований, процент положительных посевов при дерматомикозах едва достигает 50%, а в отечественных исследованиях возбудитель не удается выделить в 64% случаев. Это обусловлено техническими погрешностями (нарушение правил сбора материала, его транспортировки и т.д.), но чаще всего проведением предшествующей (как правило, местной) антифунгальной терапии [117, 191, 133, 177, 224]. При этом КОН-микроскопию как основной метод диагностики дерматомикозов назначают более 60% дерматологов перед началом лечения [187, 202, 221, 236].

Следует отметить, что получить подтверждение диагноза сразу двумя регламентированными методами представляется еще более сложной задачей из-за недостаточной специфичности и чувствительности этих методик [151, 222, 199, 193, 136, 167]. По данным ряда зарубежных авторов при исследовании клинических образцов от пациентов с подозрением на дерматомикозы методом прямой КОН-микроскопии с дальнейшим культивированием на среде Сабуро положительные

результаты получали в 12,7% – 26,3% случаев [157, 154, 220, 214, 163, 162, 170, 160].

В оценке диагностической ценности посевов при дерматомикозах приходится принимать во внимание расхождение результатов, получаемых исследователями. Диагностическая ценность традиционных методов исследования во многом зависит от интерпретации полученных результатов, правильности сбора патологического материала, а также от квалификации исследователя. Кроме этого, они обладают некоторыми существенными недостатками.

Микроскопия клинического материала не позволяет идентифицировать дерматомицеты в патологическом материале до вида по их морфологии. Интерпретация результатов микроскопии субъективна, так как они воспринимаются визуально. Кроме того, данный метод обладает низкой чувствительностью [58].

Культуральный метод исследования является очень трудоемким и занимает от 5 до 21 дня. Несмотря на то, что специфичность этого метода значительно выше, чем специфичность микроскопического исследования клинического материала, чувствительность этого метода также не достаточна [58, 184, 10].

Несмотря на то, что метод с использованием ультрафиолетовой лампы Вуда считается эффективным при массовых обследованиях, лечение противогрибковыми мазями приводит к прекращению свечения, которое возобновляется только через 3-4 дня после тщательного мытья волос. Следовательно, использование этого метода приводит к получению большого числа ложно отрицательных результатов [80, 29].

Как отмечалось ранее, клиническая диагностика зооантропонозных дерматомикозов и, соответственно, эффективное этиотропное лечение этих заболеваний в настоящее время существенно затруднены ввиду увеличения количества атипичных и стертых форм (127, 201, 33, 85), сложнодифференцируемых с заболеваниями негрибкового происхождения [7, 20, 28, 126, 32, 28, 89]. В этих условиях существенно возрастает значимость методов лабораторной диагностики [71, 3, 54, 4, 241, 200], эффективность которых,

однако, относительно невысока и не в полной мере отражает истинную ситуацию по заболеваемости этими микозами [170, 193, 167, 221].

В контексте вышеуказанного перспективным представляется разработка способов диагностической детекции возбудителей микроспории и трихофитии (*M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes*) при использовании молекулярно-генетических методов, в частности полимеразной цепной реакции, характеризующейся исключительно высокой чувствительностью и специфичностью [149, 203, 181, 237, 144]. При этом существенно могут быть снижены временные затраты и появляется возможность экспресс-детекции возбудителя в различных клинических образцах.

1.5. Применение полимеразной цепной реакции для выявления и дентификации дерматомицетов

В настоящее время широко и интенсивно изучается возможность применения полимеразной цепной реакции (ПЦР) в диагностике микозов. Диагностическая чувствительность, специфичность и скорость проведения реакции зачастую превосходят таковые при микроскопическом и культуральном методах исследования патологического материала [58].

Метод ПЦР был открыт в 1985 году сотрудником фирмы «Cetus» Кэри Муллис [72, 58].

Полимеразная цепная реакция – метод амплификации ДНК *in vitro*, с помощью которого в течение нескольких часов можно выделить и размножить определённую последовательность ДНК в миллиарды раз. В методе ПЦР используется природный процесс – комплементарное достраивание ДНК-матрицы, осуществляемое с помощью фермента ДНК-полимеразы. Эта реакция носит название репликации ДНК [5].

На сегодняшний день существует множество способов выделения ДНК. Основными критериями, предъявляемыми при выборе метода являются его

быстрота, качество и стоимость [5]. Для обеспечения необходимой степени чистоты ДНК и достаточного её количества предлагается использовать методику Boom R. [146].

Метод основан на сорбции ДНК на частичках силикогеля (SiO_2) в присутствии 4-6 М гуанидинтиоционата. Лизирующим агентом в данном случае служит TritonX100, содержащийся в лизирующем буфере в концентрации 0,5-1%. В свою очередь гуанидинтиоционат 4-6 М концентрации за счет своих хаотропных свойств также способствует лизированию клеток. В дальнейшем при добавлении суспензии силикогеля на их частицах происходит сорбция нуклеиновых кислот (НК). При центрифугировании комплекс $\text{SiO}_2 + \text{НК}$ уходит в осадок, а надосадочную жидкость, содержащую все остальные компоненты клеток становится возможным удалить. Для избавления от остатка гуанидинтиоционата осадок промывают в 70% этиловым спиртом в присутствии которого комплекс $\text{SiO}_2 + \text{НК}$ не разрушается и при центрифугировании также уходит в осадок. Надосадочная жидкость также удаляется. При добавлении к комплексу воды, нуклеиновые кислоты переходят в растворимую форму, тем самым освобождаясь от частичек силикогеля. Для лучшего перехода нуклеиновых кислот в раствор суспензию комплекса в воде можно нагреть до 65°C . [5, 146]. В дальнейшем полученную ДНК используют в качестве матрицы для ПЦР.

Условием проведения ПЦР является многократное увеличение числа специфических фрагментов ДНК, которое ограничивается короткими олигонуклеотидами – праймерами. Праймеры представляют собой короткие цепи нуклеотидов, расположенных в специфической последовательности. Каждый из праймеров комплементарен одной из цепей двухцепочечной матрицы ДНК. Разработка праймеров для ПЦР является самым ответственным звеном в создании диагностической тест-системы, поскольку правильно подобранные праймеры обеспечивают запуск и специфичность реакции.

В основе метода полимеразной цепной реакции лежит многоступенчатый циклический процесс копирования *in vitro* определенных участков ДНК. Каждый

цикл амплификации включает 3 этапа, протекающих в различных температурных режимах:

1 этап: Денатурация ДНК (расплетение двойной спирали). Протекает при 93-95°C в течение 30-40 с,

2 этап: Присоединение праймеров (отжиг). Присоединение праймеров происходит комплементарно к соответствующим последовательностям на противоположных цепях ДНК на границах специфического участка. Для каждой пары праймеров существует своя температура отжига, значения которой располагаются в интервале 50-65°C. Время отжига – 20-60 с,

3 этап: Достаивание цепей ДНК. Комплементарное достаивание цепей ДНК происходит от 5'-конца к 3'-концу цепи в противоположных направлениях, начиная с участков присоединения праймеров. Материалом для синтеза новых цепей ДНК служат добавляемые в раствор дНТФ. Процесс синтеза катализируется ферментом термостабильной ДНК-полимеразой (*Taq*-полимеразой) и проходит при температуре 70-72°C. Время протекания синтеза – 20-40 с [(58, 5)].

После завершения каждого цикла количество продукта ПЦР в реакционной смеси удваивается и по мере прохождения реакции экспоненциально возрастает. На последних циклах реакции рост замедляется («эффект плато») [58].

По окончании ПЦР содержимое реакционной смеси анализируют с помощью электрофореза в агарозном или полиакриламидном гелях в присутствии бромистого этидия, где продукт реакции выявляется в УФ-свете [58].

Метод ПЦР обладает рядом преимуществ по сравнению с другими методами лабораторной диагностики.

1. Прямое определение наличия возбудителей. Выявление специфического участка ДНК возбудителя методом ПЦР дает прямое указание на присутствие возбудителя инфекции в клиническом материале [58, 78].

2. Высокая специфичность метода ПЦР обусловлена тем, что в исследуемом материале выявляется уникальный, характерный только для данного возбудителя фрагмент ДНК [58, 78].

3. Высокая чувствительность метода ПЦР позволяет выявлять даже минимальные количества нуклеиновых кислот микроорганизмов в клиническом материале при отрицательном ответе бактериологического и микроскопического методов [112, 78, 58].

4. Универсальность процедуры выявления различных возбудителей. Метод ПЦР основан на выявлении фрагментов ДНК или РНК, являющихся специфичными для конкретного микроорганизма. Универсальность генетического кода всех нуклеиновых кислот позволяет применять стандартизованные методы проведения лабораторных исследований, что дает возможность диагностировать несколько возбудителей в одной биопrobe. В качестве исследуемого материала могут использоваться волосы, соскобы с кожи, кровь, сыворотка и др. [112, 58, 78].

5. Высокая скорость получения результата анализа. Для проведения ПЦР-анализа не требуется выделения и выращивания культуры возбудителя, занимающих большое количество времени. Стандартизованный метод обработки биоматериала и детекции продуктов реакции, автоматизация процесса амплификации дают возможность провести полный анализ за 4-5 часов. Этим он выгодно отличается от других лабораторных методов, которые дают замедленные результаты [78].

6. Возможность диагностики не только острых, но и латентных инфекций. Поскольку метод ПЦР позволяет избежать сложностей, связанных с выращиванием микроорганизмов в лабораторных условиях, это делает его особенно эффективным при выявлении труднокультивируемых, некультивируемых, требующих сложной питательной среды и персистирующих форм микроорганизмов, с которыми часто приходится сталкиваться при латентных и хронических инфекциях [58].

7. Возможность дифференциальной видовой диагностики [58].

Однако, метод ПЦР имеет некоторые ограничения.

1. Невозможность отличить живые организмы от неживых без дополнительной стадии обратной транскрипции, поскольку амплифицируется ДНК как живого, так и погибшего микроорганизма [58].

2. Возможность реакции кросс-контаминации. Подбор праймеров происходит на основе существующих знаний о геноме диагностируемого и сходных с ним микроорганизмов. Теоретически существует возможность присутствия такого же фрагмента и у других микроорганизмов, геном которых в настоящее время не расшифрован и которые не были протестированы на возможность перекрестной реакции. Присутствие в пробе таких микроорганизмов может привести к ложноположительному результату анализа [78].

В настоящее время предложены всевозможные модификации ПЦР: обратная, гнездовая, количественная «в режиме реального времени» (Real-time PCR), множественная (multiplex PCR), а также гибридизационно-ферментный метод (PCR-ELISA) и другие [112, 78, 58, 27, 238, 143, 139].

ПЦР с обратной транскрипцией (Reverse Transcription PCR, RT-PCR) применяется для амплификации, выделения или идентификации известной последовательности РНК. Метод основан на синтезе на матрице мРНК одноцепочечной молекулы кДНК с помощью фермента ревертазы (обратной транскриптазы, РНК-зависимой ДНК полимеразы), которая в дальнейшем используется в качестве матрицы для постановки ПЦР [58, 112].

Мультиплексная ПЦР (multiplex PCR, мультипраймерная ПЦР, множественная ПЦР) – позволяет проводить одновременную диагностику различных видов возбудителей путем использования нескольких пар праймеров, проводя амплификацию нескольких матриц ДНК или ДНК-мишеней в одной пробирке [58, 112]. Имеются литературные данные о положительных результатах применения этого метода для обнаружения и идентификации клинически значимых видов дерматомицетов родов *Trichophyton*, *Microsporum* и *Epidermophyton* в образцах ногтей, кожи и волос. Однако авторы сообщают о более низкой чувствительности данного метода по сравнению с RT-PCR [143, 179].

Гнездовая ПЦР (nested PCR) используется для снижения числа сопутствующих продуктов реакции, повышения чувствительности и специфичности. Принцип метода заключается в проведении двух последовательных реакций ПЦР с использованием двух пар праймеров,

специфичных в отношении ДНК-мишени. Вначале проводят амплификацию ДНК с внешними праймерами. Небольшое количество образовавшегося продукта амплификации далее используют в качестве матрицы на втором этапе ПЦР, которую осуществляют с помощью внутренних праймеров, комплементарных внутренним последовательностям ДНК, амплифицированной на первом этапе [58, 112]. Согласно опубликованным данным эта методика также была опробована для обнаружения генетического материала дерматомицетов в клинических образцах, но чувствительность этого метода разными авторами оценена не однозначно [51, 238, 212].

ПЦР «в режиме реального времени» (Real-time PCR) позволяет измерять количество амплифицированных фрагментов искомой ДНК непосредственно в пробирке в течение и после окончания реакции [78]. Метод Real-time PCR основан на количественной флюоресцентно-гибридизационной детекции специфических продуктов амплификации, в которой флюоресцентная репортерная молекула (флюорофор) используется для наблюдения за развитием реакции амплификации, а увеличение интенсивности репортерной флюоресценции прямо пропорционально увеличению количества ампликонов [58, 119]. Имеются положительные результаты применения этого метода для диагностики дерматомикозов, вызванных антропофильными видами дерматомицетов и отмечается быстрота и достаточно высокая чувствительность [203, 234].

Гибридизационно-ферментный метод детекции (ГИФА, PCR-ELISA). В основе метода лежит реакция гибридизации олигонуклеотидных зондов, меченных биотином, которые иммобилизованы на дне лунок планшета с одноцепочечной ДНК-мишенью. Бiotин связывается с авидином, входящим в состав конъюгата, меченного пероксидазой хрена. Далее проводят ферментативную реакцию с добавлением хромогена ТМБ субстрата H_2O_2 . Интенсивность окраски в лунках планшета измеряют на фотометре при 430нм. О присутствии в исходном материале инфекционного агента говорит образование ампликон-биотин-авидин-ферментного комплекса (58). По мнению некоторых авторов метод PCR-ELISA обладает довольно высокой чувствительностью, специфичностью и

воспроизводимостью результатов для идентификации дерматомицетов в клинических образцах на видовом уровне, независимо от их морфологических и биохимических характеристик. При этом отмечаются следующие недостатки этого метода – высокий риск контаминации и низкие значения оптического сигнала у положительных образцов [139, 155, 211, 190].

ПЦР-анализ с последующим рестрикционным гидролизом образующихся фрагментов (ПЦР-ПДРФ). Суть метода заключается в амплификации определенного фрагмента ДНК, содержащего анализируемую точковую мутацию, с последующим расщеплением наработанного ампликона соответствующей рестриктазой для идентификации аллелей анализируемого гена. Данный метод получил широкое распространение и был использован также для исследования различных видов дерматомицетов. Полученные при этом результаты во многом совпали с данными культивирования грибов. Следует отметить, что данная методика трудоемкая, требует особых организационных мероприятий. Кроме того, авторы указывают на важность специальной подготовки материала [194, 181].

С конца 90-х годов исследователями во всем мире велись активные поиски методов молекулярно-генетической диагностики дерматомикозов [147, 140, 183]. Уже в 2000 году сообщалось о совпадениях результатов ПЦР и культурального метода при использовании праймеров на основе 18S рРНК и ITS для детекции ряда возбудителей дерматомикозов человека и животных [230]. Имеются литературные данные о положительных результатах использования GISH-зондов для идентификации *T. interdigitale*, *T. rubrum* и *M. canis* [237]. В последние годы многие зарубежные исследователи сообщают о высокой чувствительности и специфичности метода ПЦР в отношении некоторых представителей видов *Trichophyton* и *Microsporum* [150, 147, 228]. При этом актуальными остаются исследования в направлении создания тест-систем для детекции возбудителей как зоонозных, так и антропонозных дерматомикозов [156, 175]. Важным аспектом является то, что метод ПЦР, обладая более высокой чувствительностью и специфичностью, будет наиболее быстрым для точной диагностики дерматомикозов [149, 144].

Однако, несмотря на возможную перспективность данного метода, высокая стоимость исследования с применением тест-систем, созданных за рубежом, исключает его широкое применение в дерматомикологии [174, 219]. Поэтому целесообразным представляется создание отечественных разработок в этом направлении.

В начале этого века в России достаточно активно проводились исследования по применению молекулярно-генетических методов в диагностике дерматомикозов. В литературных источниках сообщается о первом опыте прямой ПЦР-диагностики дерматомикоза ногтей [87], а так же о создании российского ПЦР-набора для диагностики онихомикозов [84, 128]. Предложен способ диагностики онихомикоза кистей и стоп, сущность которого заключается в идентификации *T. rubrum* методом ПЦР, выделяя ДНК из образцов кожи или ногтевых пластинок [121].

Проведенный анализ литературы, посвященный существующим и перспективным методам лабораторной диагностики микроспории и трихофитии, позволяет сделать вывод, что эффективность стандартных методов лабораторной диагностики не в полной мере отражает истинную ситуацию по заболеваемости данными дерматомикозами. Также усугубляет ситуацию наличие изменений в клинической картине зооантропонозных дерматомикозов, увеличение количества их стертых и атипичных форм. Кроме этого широкое внедрение в практику здравоохранения и ветеринарной службы молекулярно-генетических методов диагностики ограничивается высокой стоимостью тест-систем, созданных за рубежом. Российскими исследователями разработаны способы детекции антропофильных дерматомицетов. Достаточно перспективным представляется создание отечественных тест-систем для обнаружения возбудителей зооантропонозных дерматомикозов (*M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes*).

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Материалом для исследования послужили 269 образцов клинического материала от пациентов ГАУЗ «Республиканский кожно-венерологический диспансер №1» г. Уфы с диагнозом микроспория в возрасте от 1 до 18 лет, среди них 161 человек мужского пола и 108 – женского, и 427 образцов – от пациентов с диагнозом трихофития в возрасте от 1 до 49 лет, 334 из которых были мужского пола и 93 – женского.

Сбор клинического материала проводился за период с февраля 2009 года по декабрь 2013 года. Материал получен от 696 пациентов с дерматомикозами и 189 пациентов с другими кожными заболеваниями (псориазом, экземой).

После предварительной стратификации совокупность материала исследования распределена в две выборки – основную и группу сравнения.

Для формирования контрольной группы (сравнения) были выбраны 189 пациентов с кожными заболеваниями негрибкового происхождения.

В качестве клинического материала использовали волосы, соскобы с кожи, чешуйки, корочки. Перед взятием материала пораженный участок обрабатывали 70° спиртом для устранения грибковой и бактериальной контаминации и удаления остатков мазей, болтушек и присыпок.

Материал соскабливали тупым стерильным скальпелем с периферии очага поражения, т. к. в этом месте происходит интенсивный рост грибов, захватывающий новые неповрежденные участки. При незначительном шелушении на поверхности гладкой кожи для получения достаточного количества материала использовали прозрачную липкую ленту. Небольшую полоску прижимали к пораженному участку, затем приклеивали ее к предметному стеклу. Стекла пересылали в пластиковых упаковках.

Из очагов на волосистой части головы эпиляционным пинцетом отбирали короткие, тусклые, обломанные, утолщенные, перекрученные волосы. Пушковые волосы соскабливали вместе с чешуйками кожи. Образцы включали волосы, волосяные фолликулы, кусочки кожи.

При отборе пораженных волос использовали также ряд дополнительных признаков. Волосы, пораженные микроспорумами, в основании имели серый чехлик из наружно расположенных спор. При хронической трихофитии в толще чешуек обнаруживались короткие серого цвета изогнутые в виде «запятых» и «вопросительных знаков» пораженные волосы, а также «черные точки» (утолщенные черные, обломанные в устье фолликула пораженные волосы). При инфильтративно-нагноительной трихофитии для микроскопического исследования, кроме пораженного волоса, использовали гной и корочки с очага поражения.

Для отбора материала также использовали ультрафиолетовую лампу Вуда. Отбирали волосы, которые светились в ее лучах голубовато-зеленым цветом.

Материал для исследования собирали в стерильные чашки Петри и доставляли в лабораторию в течение 0,5-1 часа со времени его получения, где его подвергали микроскопическому и культуральному исследованию, а также детекции возбудителя методом ПЦР.

2.2. Микологические методы исследования

2.2.1. Световая микроскопия клинического материала

Патологический материал изучали в нативных препаратах. Для просветления препаратов, т. е. для растворения роговых масс, использовали 20% раствор КОН.

Для микроскопического исследования волос на предметное стекло наносили небольшую каплю 20% раствора КОН и в нее препаровальной иглой помещали

пораженный волос. Каплю с волосом слегка подогревали над пламенем спиртовки до появления паров над поверхностью жидкости или выпадения ободка кристаллов по краю капли щелочи. После накрывания покровным стеклом избыток щелочи удаляли фильтровальной бумагой. Чтобы избежать раздавливания волоса, покровное стекло не придавливали препаровальной иглой.

Чешуйки эпидермиса также помещали на предметное стекло в каплю 20% раствора КОН и нагревали, добавляя щелочь при испарении. Остывший неокрашенный препарат накрывали покровным стеклом, покровное стекло придавливали препаровальной иглой.

Препараты исследовали сначала под малым ($\times 10$) увеличением, а затем под большим ($\times 40$) увеличением микроскопа.

2.2.2. Культивирование и идентификация дерматомицетов

После предварительного исследования биосубстратов под микроскопом клинический материал (волосы, соскобы с кожи, чешуйки, корочки) засеивали на питательные среды.

В качестве основной среды для выделения возбудителей микроспории и трихофитии использовали среду № 2 ГРМ (Сабуро) (ФБУГ ГНЦ ПМБ, Россия), а также селективную среду М188 для выделения дерматофитов («HiMedia», Индия). Для образования характерных морфологических признаков и стимуляции конидиеобразования использовали специальную среду М1026 с рисовым экстрактом («HiMedia», Индия). Посевы инкубировали в течение 2-3 недель при температуре 25-30°C.

Засеянные чашки начинали просматривать на второй день после посева с целью обнаружения начала роста возбудителей и дифференциации их от сапрофитов окружающей среды, которые могли контаминировать посевы.

Идентификацию выделенных культур производили по морфологическим признакам колоний, микроморфологии гриба. Микроморфологию гриба изучали в нативных препаратах с добавлением смеси равных объемов спирта, воды и

глицерина. Для определения видовой принадлежности использовали определитель патогенных и условно патогенных грибов Саттона, 2001.

2.3. Выделение ДНК из клинических образцов

Тотальную ДНК из клинических образцов выделяли методом нуклеосорбции (Boom, 1990). В ходе работы в одноразовые пробирки вносили по 300 мкл лизирующего раствора (5М гуанидинтиоционат, 1% Triton X100). Далее в пробирки с лизирующим раствором добавляли необходимое количество материала. Пробы тщательно перемешивали на вортексе («BioSan», Латвия) и прогревали 5 мин при температуре 65°C. Центрифугировали на микроцентрифуге MiniSpin (Eppendorf Manufacturing Corporation, Германия) в течение 5 мин при 10000 g и для выделения ДНК использовали надосадочную жидкость, перенесли ее в новую пробирку. В каждую пробирку отдельным наконечником добавляли по 25 мкл ресуспендированного сорбента (силикагель) и перемешивали на вортексе. Затем пробирки ставили в штатив на 2 мин, еще раз перемешивали и оставляли в штативе на 5 мин. Далее осаждали сорбент в пробирках центрифугированием в течение 30 с при 2000 g и удаляли надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель «ОМ-1» (ООО «Утес», Россия) и отдельный наконечник для каждой пробы. В пробы добавляли по 300 мкл раствора для отмывки (5М гуанидинтиоционат) и перемешивали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Сорбент осаждали центрифугированием в течение 30 с при 2000 g. Надосадочную жидкость удаляли, используя вакуумный отсасыватель. Затем в пробы добавляли по 950 мкл раствора для отмывки (70% этиловый спирт), перемешивали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента и центрифугировали 30 с при 2000 g. Надосадочную жидкость удаляли, пробирки помещали в термостат («BioSan», Латвия) на 5-10 мин для подсушивания сорбента при температуре 65°C. При этом крышки пробирок оставляли открытыми. Далее в пробирки добавляли по 50 мкл

TE-буфера для элюции ДНК, перемешивали и помещали в термостат при температуре 65°C на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе. После этого пробирки центрифугировали в течение 1 мин при 10000 g. В итоге получали надосадочную жидкость, содержащую очищенную ДНК, готовую к постановке ПЦР.

Так как эффективность ПЦР сильно зависит от качества выделенной ДНК, в работе для сравнения использовали и другие методы выделения и очистки ДНК. Например, использовали так называемое выделение ДНК методом солевой экстракции. Для этого клинические образцы гомогенизировали в 400 мкл стерильного солевого буфера (0,4 М NaCl, 10 мМ трис-HCl, pH 8,0, 2 мМ ЭДТА). Потом добавляли 40 мкл 20% SDS и 8 мкл протеиназы К с концентрацией 20 мг/мл (до конечной концентрации 400 мкг/мл) и тщательно перемешивали. После этого образцы инкубировали при 55-65°C в течение часа, добавляли по 300 мкл 6М NaCl и центрифугировали 30 мин при 10000 g. Далее супернатант переносили в новую пробирку и добавляли эквивалентное количество изопропанола, перемешивали и инкубировали при -20°C в течение часа. Затем образцы центрифугировали 20 мин при 4°C при 10000 g. Осадок промывали 70% этанолом, высушивали и растворяли в 300-500 мкл стерильной дистиллированной воды.

При выделении ДНК из клинических образцов также использовали метод фенольно-хлороформной экстракции (Graham, 1978). При этом клинические образцы растирали в ступке с жидким азотом и добавляли 10 мл буфера (100 мМ трис-HCl, pH 8,5, 20 мМ ЭДТА, 15% раствор сахарозы и 5 мг/мл лизоцима). Инкубировали 15 мин при 0°C, добавляли 10 мл лизирующего раствора (2% додецилсульфат натрия) и 10 мг/мл протеиназы К, инкубировали 2 ч при 55°C. К раствору добавляли равный объем смеси 80% свежеперегнанного фенола (pH 8,0), хлороформа и изоамилового спирта в соотношении 25:24:1. Центрифугировали, к супернатанту добавляли 2 объема охлажденного 96% этилового спирта. ДНК осаждали центрифугированием, промывали 70% спиртом, затем растворяли в TE буфере (1 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-HCl, pH 8,0).

2.4. Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей

Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью пакета компьютерных программ Lasergene (DNASTAR, Inc., США) с использованием IBM-совместимых персональных компьютеров. Нуклеотидные последовательности ДНК патогенов загружали из базы данных GenBank, доступной на сайте www.ncbi.nlm.nih.gov. Для этого использовали известные номера доступа (accession number) или строку поиска Nucleotide. Для уточнения видовой принадлежности найденных нуклеотидных последовательностей использовали также on-line ресурс MegaBlast. Дополнительный анализ нуклеотидных последовательностей, в частности, поиски участков отжига специфичных праймеров и открытых рамок считывания проводили с помощью программы EditSeq. Выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли кластерным W-методом при помощи программы MegAlign. Схожесть нуклеотидных последовательностей ДНК патогенов с гомологами из других видов микроорганизмов определяли при помощи on-line ресурса MegaBlast.

2.5. Подбор олигонуклеотидных праймеров для специфической детекции ДНК *M. canis*, *T. mentagrophytes* и *T. verrucosum*

Специфические олигонуклеотидные праймеры для перечисленных выше дерматомицетов подбирались к внутренней области транскрипционной единицы генов больших рибосомных РНК, включающей в себя внутренний транскрибируемый спейсер 1 (ITS1), ген 5.8S рРНК и внутренний транскрибируемый спейсер 2 (ITS2). Кодированные области генов 18S и 28S рРНК, фланкирующие эту область, у перечисленных видов являются высоко консервативными и не позволяют дифференцировать эти виды. Кроме этого, использование в ПЦР праймеров, специфичных для этих генов, может привести к

получению ложноположительных результатов вследствие их гомологичности с соответствующими генами в ДНК человека. Умеренная вариабельность в нуклеотидных последовательностях ITS1 и ITS2 позволяет подобрать видо- и расоспецифические праймеры для уверенной детекции ДНК дерматомицетов в условиях присутствия избытка ДНК хозяйского вида (человека или животных).

Дизайн праймеров в данной работе осуществляли с использованием программы PrimerSelect из пакета Lasergene (DNASTAR, Inc., США) и привлечением к анализу последовательностей из международного банка GenBank (NCBI), соответствующих для *M. canis* (AJ000618), *T. mentagrophytes* (Z97995) и *T. verrucosum* (Z98003). При подборе праймеров также использовали сетевой ресурс <http://www.frodo.wi.mit.edu>, где доступна программа Primer3 Input. Синтез олигонуклеотидных праймеров осуществлен в фирме «Синтол» (Москва, Россия).

2.6. Специфическая детекция ДНК *M. canis*, *T. mentagrophytes* и *T. verrucosum* в клинических образцах с помощью метода ПЦР

Для избирательной амплификации *in vitro* определенных участков ДНК использован метод ПЦР. Реакционная смесь объемом 30 мкл содержала 1 мкл тотальной ДНК, 3 мкл 10-кратного буфера для *Taq*-полимеразы, поставляемого в наборе с используемым ферментом, по 3 мкл dNTP, 1 мкл каждого праймера и 1 мкл *Taq*-полимеразы («СибЭнзим», Россия). Содержание ДНК в образцах варьировало от 2 до 37 нг/мкл. Во избежание испарения жидкости на поверхность каждой реакционной смеси наслаивали 50 мкл минерального масла. ПЦР проводили в амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия). На начальном этапе проводили денатурацию ДНК при 94°C в течение 2 мин, после чего следовали 25-30 циклов амплификации, каждый из которых включал стадию денатурации ДНК в течение 20 с при 94°C, стадию отжига праймеров продолжительностью 20 с при температуре от 58°C до 64°C (в зависимости от длины и нуклеотидных

последовательностей использованных праймеров), и стадию элонгации в течение 10-20 с при температуре 72°C, оптимальной для работы *Taq*-полимеразы. Конечную стадию амплификации, а именно «удлинение» ампликонов проводили при 72°C в течение 1 мин. В некоторых случаях для оптимизации ПЦР и уменьшения количества неспецифичных продуктов амплификации использовали «горячий старт». По этой процедуре попадание *Taq*-полимеразы, разбавленной в 10 мкл соответствующего 1-кратного буфера, в реакционную смесь осуществлялось только после нагрева последней до 94°C, что исключало возможность неспецифичного отжига праймеров на нуклеотидных последовательностях с низкой гомологией. Результаты амплификации анализировали после проведения электрофоретического разделения продуктов.

2.7. Электрофоретический анализ ДНК в агарозном геле

Для приготовления агарозного геля рассчитанное количество порошка агарозы (1,5 г) добавляли в отмеренный объем электрофоретического буфера (2 мл 50x TAE буфера и 100 мл очищенной воды). Нагревали смесь в СВЧ-печи до полного расплавления геля (2-2,5 мин). Раствор остужали до 50°C. В заливочную камеру помещали чисто вымытую стеклянную пластинку. Края камеры обрабатывали остывающей агарозой во избежание дальнейшего вытекания агарозы из камеры. На одном из краев камеры установили пластиковый гребешок так, что его зубцы образовали в геле лунки для проб ДНК. Аккуратно заливали в форму теплый раствор агарозы толщиной не более 5-6 мм. Готовили 1 л 1-кратного буфера TAE. После полного затвердения агарозы (15-20 мин) аккуратно вынимали гребенку, стараясь не повредить образовавшиеся кармашки. Пластинку с гелем из камеры помещали в электрофоретическую камеру. Заливали в камеру буфер так, чтобы он покрыл агарозу сверху тонким слоем 2-3 мм.

Из пробирок с продуктами амплификации отбирали по 10 мкл, добавляли по 3 мкл красителя бромфенолового синего с ксиленцианолом и глицерином. Перемешивали пипеткой. Медленно наносили пробы с красителем в лунки геля под слой буфера. Подключали клеммы прибора к источнику питания так, чтобы (-) находился на старте, а (+) – на финише. Включали источник питания и устанавливали напряжение в 120 В. Проводили разделение ДНК в течение 30-40 мин. Вынимали пластинку с гелем и помещали ее в кювету для окрашивания. Наливали в кювету слабый раствор бромистого этидия. Окрашивали в течение 10-15 мин. Сливали краситель в колбу. Промывали гель проточной водой. Помещали его на стекло трансиллюминатора. Далее фотографировали гель на фотосистеме Gel Camera System (UVP, Inc., США).

2.8. Автоматическое секвенирование ДНК ферментативным методом

Определение нуклеотидных последовательностей амплифицированных фрагментов ДНК дерматомицетов проводили на автоматическом секвенаторе «ABI PRISM 310» («Applied Biosystems», США), используя наборы для секвенирования «Big Dye Terminator v.3.0» («Applied Biosystems», США).

Секвенирующие реакции проводили при следующем режиме: 96°C – 60 с, и 27 циклов: 96°C – 20 с, 50-55°C – 15 с, 60°C – 2 мин. В конце проводили дополнительную элонгацию при 60°C в течение 3 мин. Состав реакционной смеси включал 4 мкл «Terminator Ready Reaction Mix» («Applied Biosystems», США), 10-15 нг амплифицированной или плазмидной ДНК-матрицы, 3.2 пкм праймера. Смесь до конечного объема 10 мкл доводили деионизованной водой.

Очистку от избытка невключившихся меченых дидезокситерминаторов проводили с помощью набора «Centri-Step» («Applied Biosystems», США).

2.9. Методы статистической обработки полученных данных

Изучение заболеваемости микроспорией и трихофитией (МКБ-10 В35) за 1996-2013 гг. среди населения г. Уфа проведено на основе анализа учетной формы № 2 «Сведения об инфекционной и паразитарной заболеваемости» за 1996-2013 гг. Всего в работу при сплошной выборке была включена информация о 20184 впервые выявленных случаях микроспории и 6673 случаях трихофитии у пациентов ГАУЗ «Республиканский кожно-венерологический диспансер №1». Информация о численности населения исследуемых территорий за анализируемый период получена из ТОФС «Государственная статистика по Республике Башкортостан». Проявления заболеваемости исследованы в динамике и по среднесноголетним данным (1996-2013 гг.), а также по отдельным периодам наблюдений. Полученные результаты подвергались статистической обработке с использованием пакета MS Excel 2010. Определялись средние величины и их ошибки, достоверность различий оценивалась по доверительным интервалам при уровне вероятности 95,5% и значимости $p < 0,05$ [25]. Направление линии тренда в заболеваемости микроспорией определяли выравниванием динамического ряда по методу наименьших квадратов.

Данные о дерматомицетах, обнаруженных в клиническом материале с помощью микроскопического и культурального методов, а также методом ПЦР, вносили в электронную базу данных в виде таблицы «объект-признак». Эти данные подвергали поэтапной математико-статистической обработке.

Для проведения сравнительного анализа информативности используемых методов детекции *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes* рассчитывали показатели специфичности, чувствительности, диагностической эффективности, прогностической ценности и отношения правдоподобия [6, 79, 104].

В соответствии с общепринятыми при оценке эффективности и прогностической ценности разных методов диагностики на первом этапе рассчитывали четыре фундаментальных параметра:

1. Истинно-положительный результат (ИП), или число случаев, характеризующихся наличием у больного интересующего нас заболевания и обнаружением в клиническом материале исследуемого дерматомицета.

2. Истинно-отрицательный результат (ИО), или число случаев, характеризующихся отсутствием у больного интересующего нас заболевания и отсутствием в клиническом материале исследуемого дерматомицета.

3. Ложноположительный результат (ЛП), или «ошибка второго рода» – число случаев, характеризующихся отсутствием у больного интересующего нас заболевания и обнаружением в клиническом материале исследуемого дерматомицета.

4. Ложноотрицательный результат (ЛО), или «ошибка первого рода» – число случаев, характеризующихся наличием у больного интересующего нас заболевания и отсутствием в клиническом материале исследуемого дерматомицета.

По этим данным осуществляли расчет следующих операционных характеристик диагностических тестов диагностики:

1. Чувствительность метода (ЧС), или процентная доля лиц с истинно положительным результатом среди всех лиц, отнесенных к данной группе (классу). Она эквивалентна относительной частоте обнаружения субъектов/объектов данного класса:

$$\frac{ИПр}{ИПр + ЛО} \times 100\% = ЧС \quad (1)$$

2. Специфичность метода (СП), или процентная доля истинно отрицательных прогнозов в общей массе всех лиц, не отнесенных к данному классу:

$$\frac{ИО}{ИО + ЛП} \times 100\% = СП \quad (2)$$

3. Диагностическая эффективность (ДЭ) для правильных прогнозов в общей массе прогнозируемых случаев:

$$\frac{ИО + ИПр}{ИО + ЛП + ЛО + ИПр} \times 100\% = ДЭ \quad (3)$$

4. Прогностическая ценность положительного результата (ПЦ+) или вероятность того, что объект действительно относится к данному классу при положительном результате используемого метода исследования:

$$\frac{ИПр}{ИПр+ЛП} \times 100\% = ПЦ+ \quad (4)$$

5. Прогностическая ценность отрицательного результата (ПЦ-), или вероятность того, что объект действительно не относится к данному классу при отрицательном результате используемого метода исследования:

$$\frac{ИО}{ИО+ЛО} \times 100\% = ПЦ- \quad (5)$$

6. Отношение правдоподобия (ОП) – отношение вероятности получить положительный результат диагностического теста у больных к вероятности получить положительный результат у здоровых лиц:

$$\frac{ЧС}{1-СП} = ОП+ \quad (6)$$

$$\frac{1-ЧС}{СП} = ОП- \quad (7)$$

Для удобного расчета показателей использовали четырехпольную таблицу Юла:

Прогноз	Основная группа	Контрольная группа
+	ИП (+, +)	ЛП (+, -)
-	ЛО (-, +)	ИО (-, -)

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Глава 3. КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕРМАТОМИЦЕТОВ, ВЫЯВЛЯЕМЫХ В КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ

Клинический материал, прежде всего, подвергли исследованию регламентированными методами лабораторной диагностики. В результате проведенных культурально-морфологических исследований 885 образцов дерматомицеты выявлены в 696 (78,6%) случаях. 189 (21,4%) образцов, в которых не обнаружены возбудители дерматомикозов, принадлежали пациентам с другими кожными заболеваниями (псориазом, экземой).

3.1. Результаты световой микроскопии клинического материала

Микроскопия клинических образцов показала, что при поражении гладкой кожи в чешуйках присутствовали нити плохо окрашивающегося тонкого мицелия различной длины, диаметром 2-4 мкм, прямые, иногда ветвящиеся и септированные. Достаточно часто в препаратах был представлен 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.

При исследовании пораженных волос обращали внимание на особенности расположения спор (внутри или снаружи волоса) и их величину.

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 вида *M. canis*.



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

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*.

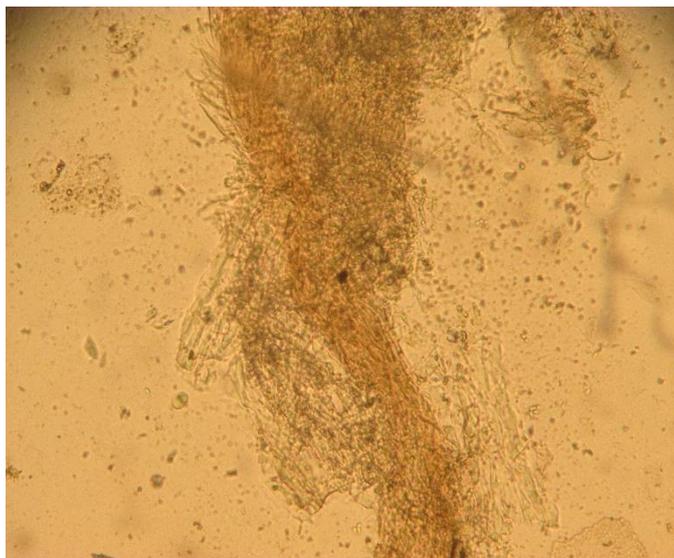


Рисунок 2 – Микроскопическая картина волоса, пораженного *Trichophyton ectothrix microides* (увеличение $\times 10$)

В целом вышеизложенные морфологические данные при исследовании клинических образцов, несмотря на их количество и попытки морфометрии, не позволили установить надежные критерии дифференцировки дерматомицетов непосредственно в клинических образцах.

3.2. Изучение культурально-морфологических особенностей штаммов дерматомицетов

В ходе проведенных исследований получен 601 штамм дерматомицетов. При определении видовой принадлежности установлены относительно характерные признаки, которые позволили отнести их к одному из трех широко распространенных видов возбудителей зооантропонозных дерматомикозов.

Таким образом к виду *M. canis* отнесены 244 штамма. При этом в 201 (82,4%) случае культуры имели характерную для этого вида морфологию.

Колонии быстрорастущие плоские, лучисто-ворсистые. Мицелий серовато-белый, на фоне желто-коричневой обратной стороны (рисунок 3). При микроскопии наблюдали характерный септированный бамбуковидный мицелий 2-

3 мкм в диаметре. Характерные веретенообразные макроконидии (35-110 × 12-25 мкм), остроконечные, шиповатые, многокамерные (4-12-клеточные) с четкой двухконтурной оболочкой. Иногда встречались булавовидные микроконидии (4-6 × 2-3 мкм) (рисунок 4).



Рисунок 3 – Колония культуры *M. canis* (среда Сабуро, температура – 28°C, 2 недели культивирования)



Рисунок 4 – Микроскопическая картина культуры *M. canis* (увеличение ×100), стрелками указаны макроконидии

Однако в 43 (17,6 %) случаях культуры были подвержены плеоморфным изменениям. Колонии имели ряд нехарактерных для данного вида признаков, по совокупности которых их разделили на четыре типа:

- 1) бархатисто-пушистые с кожистыми краями;
- 2) мелкие, кожистые или покрытые редким воздушным мицелием, темно-коричневые;
- 3) ватообразные, с длинным тонким пушком;
- 4) звездчато-мучнистые.

У ряда культур при микроскопии не обнаруживали характерные веретенообразные макроконидии, у других в изобилии присутствовали округлые микроконидии, что характерно для *T. mentagrophytes*. Краткая характеристика их представлена в таблице 1.

Также в результате проведенных исследований 168 из полученных штаммов отнесены к виду *T. mentagrophytes*. Однако характерные для данного вида морфологические признаки имели 159 (94,6%) из них.

Колонии быстрорастущие, к 3-4-му дню формировался белесоватый бугорок, а к 10-му дню – плоская сухая зернисто-порошковидная колония в виде диска белого, желтоватого, кремового или даже буроватого цвета с пупковидным возвышением в центре, богатая микроконидиями. Обратная сторона буровато-кремового цвета. Периферическая зона колонии представлялась лучистой, имелись мелкие отсевы (рисунок 5). При микроскопии наблюдали ровный, ветвистый, септированный мицелий. Округлые микроконидии обильно располагались по бокам мицелия одиночно и в виде гроздьев. В зрелых культурах встречались спиральные гифы. Сигарообразные макроконидии (20-40 × 6-8 мкм), тонкостенные, 3-8-клеточные с закругленными концами (рисунок 6).



Рисунок 5 – Колонии культуры *T. mentagrophytes* (среда Сабуро, температура – 28°C, 2 недели культивирования)

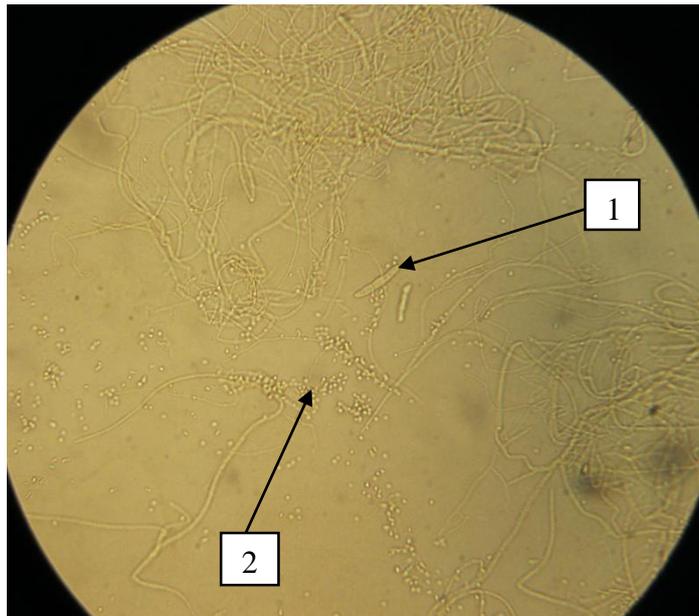


Рисунок 6 – Микроскопическая картина культуры *T. mentagrophytes* (увеличение $\times 100$), стрелками указаны макроконидии (1) и микроконидии (2)

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

№ 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 булабовидные, 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 булабовидные
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	—	—

Не смотря на то, что в большинстве случаев культуры *T. mentagrophytes* имели относительно типичные морфологические признаки, у 9 (5,4 %) из них колонии имели атипичные признаки, по совокупности которых они разделены на два типа:

- 1) строчковидно-бугристые, почти лишены воздушного мицелия;
- 2) бархатисто-пушистые, беловатые с волокнистыми краями, поверхность колонии складчатая, мучнистость только в центре.

Некоторые из них на обратной стороне не образовывали коричневый пигмент, характерный для *T. mentagrophytes*. Кроме этого при микроскопии почти отсутствовали микроконидии. Краткая характеристика таких культур также представлена в таблице 1.

Наиболее сложной задачей явилась идентификация дерматомицетов, отнесенных в ходе исследований к виду *T. verrucosum*. Это связано с трудностями культивирования данного вида. Однако, образования характерных морфологических признаков можно было добиться изменением условий культивирования, а именно повышением температуры до 37°C и добавлением в среду тиамина. Таким образом в ходе проведенных исследований 189 штаммов отнесены к виду *T. verrucosum*. При этом характерные для данного вида морфологические признаки имели 170 (89,9%) из них.

Колонии медленнорастущие, в виде диска с возвышающимся кожистым морщинистым центром серовато-желтого цвета и порошковатой беловатой периферической зоной (рисунок 7). При микроскопии определяли много ветвящегося мицелия, микро- и макроконидии встречались очень редко. Характерной чертой возбудителя являлось образование концевых и интеркалярных хламидоспор в виде четок по ходу мицелия (рисунок 8).

Однако проведенные наблюдения показали, что в 19 (10,1 %) случаях колонии имели ряд нехарактерных для данного вида признаков, по совокупности которых они разделены на два типа:

- 1) плоские, дисковидные, слегка пушистые, беловато-сероватые;
- 2) крупноморщинистые, строчковидные приподнятые, белые (таблица 1).



Рисунок 7 – Колония культуры *T. verrucosum* (среда Сабуро, температура – 37°C, 4 недели культивирования)



Рисунок 8 – Микроскопическая картина культуры *T. verrucosum* (увеличение $\times 100$), стрелкой указаны хламидоспоры

Таким образом с помощью регламентированных методов присутствие дерматомицетов установлено в 696 клинических образцах. Однако при этом световая микроскопия позволила получить положительный результат только в 598 (85,9%) случаях, а культивирование на питательных средах – в 601 (86,4%) случае.

Не смотря на то, что микроскопия клинического материала, являясь методом предварительной диагностики, не позволила идентифицировать дерматомицеты до вида, в 95 (13,6%) случаях отсутствия роста возбудителя в культуре положительный результат прямой микроскопии считали единственным подтверждением микотической инфекции. Следует отметить, что подтверждение диагноза сразу двумя регламентированными методами получили всего лишь в 503 (72,3%) случаях, что связано с недостаточной специфичностью и чувствительностью этих методик.

В то же время, в ходе микологического исследования 530 (88,2%) клинических образцов от пациентов, заболевших относительно недавно (до 3 месяцев) и не получавших специфические антимикотические препараты установлено, что патогенные дерматомицеты имели относительно характерную для них морфологию, на основании которой была возможна их дифференцировка. Напротив, в 71 (11,8 %) случае, при исследовании образцов от длительно болевших пациентов и лиц старших возрастных групп выявлены культуры, обладающие нехарактерными фенотипическими признаками (*M. canis* – 43 (60,6%), *T. verrucosum* – 19 (26,7%) и *T. mentagrophytes* – 9 (12,7%)), что существенно затруднило их морфологическую дифференцировку и послужило основанием для формирования соответствующей коллекции культур (таблица 1). Справедливости ради необходимо отметить, что при этом сохранялась возможность уточнения видовой принадлежности клинических культур дерматомицетов, но предполагало при этом в обязательном порядке дополнительные трудоемкие исследования (стимуляция характерного фенотипа и/или конидиеобразования посредством дополнительных пересевов на специальных питательных средах). В результате для апробации сконструированных тест-систем была собрана коллекция клинических штаммов патогенных грибов, отнесенных к *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes*, но отличающихся характерными и нехарактерными для данных видов культуральными признаками и морфологией (приложения А, Б).

Глава 4. ВЫБОР НАИБОЛЕЕ ЭФФЕКТИВНОГО МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ

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 оценку эффективности нескольких способов её выделения из проб с целью определения оптимального метода для работы с клиническими образцами, в которых содержание грибов варьирует в широких пределах и, как правило, присутствуют криптические ингибиторы амплификации. Для этого использовали следующие методы: солевая экстракция, фенольно-хлороформная экстракция, нуклеосорбция. Вне зависимости от сравниваемых методов на стадии гомогенизации ткани для повышения глубины лизиса в экстракт клинического образца дополнительно вносили 15 мкл хитиназы («Sigma-ALDRICH», Германия). В результате проведенных исследований установили, что при использовании метода фенольно-хлороформной экстракции без хитиназы ДНК из клинических образцов выделялась в минимальных количествах, выход ДНК при использовании данного метода несколько увеличивался при добавлении хитиназы. Метод солевой экстракции ДНК в сравнении с фенольно-хлороформной был более эффективным, при этом выход ДНК также повышался при использовании хитиназы. Наибольший выход ДНК изучаемых патогенных дерматомицетов получили методом нуклеосорбции с предварительной обработкой проб хитиназой (рисунок 9). Таким образом, в дальнейшей работе решено использовать именно эту методику при выделении ДНК.

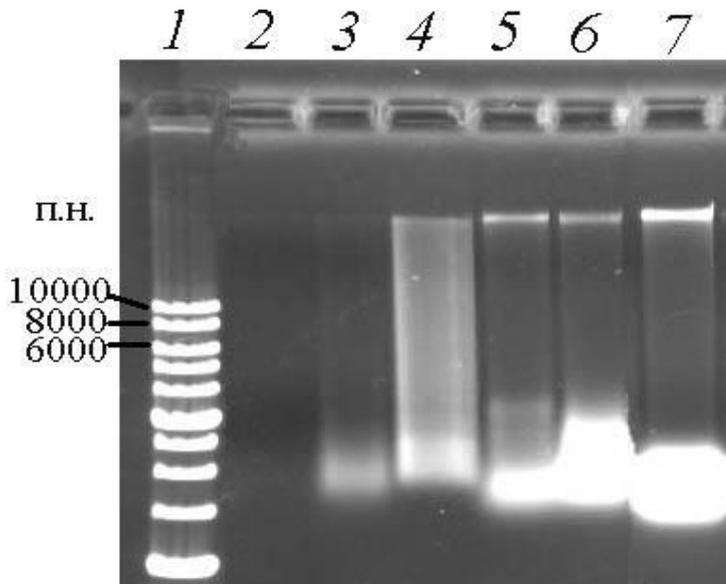


Рисунок 9 – Электрофореграмма результатов выделения ДНК из клинического материала различными методами. 1 – контроль (1Кв маркер, «СибЭнзим», Россия), 2 – метод фенольно-хлороформной экстракции, 3 – метод фенольно-хлороформной экстракции с добавлением хитиназы, 4 – метод солевой экстракции, 5 – метод солевой экстракции с добавлением хитиназы, 6 – метод нуклеосорбции, 7 – метод нуклеосорбции с добавлением хитиназы

Далее измерили концентрацию ДНК в полученных различными методами образцах. В результате анализа показано, что наименьшая концентрация ДНК характерна для образцов, выделенных методом фенольно-хлороформной экстракции. Однако, при использовании хитиназы концентрация ДНК увеличилась в два раза, но осталась на низком уровне. Наибольшая концентрация ДНК характерна для образцов ДНК, выделенных методом нуклеосорбции, при этом добавление хитиназы также способствовало увеличению концентрации ДНК в образце (рисунок 10).

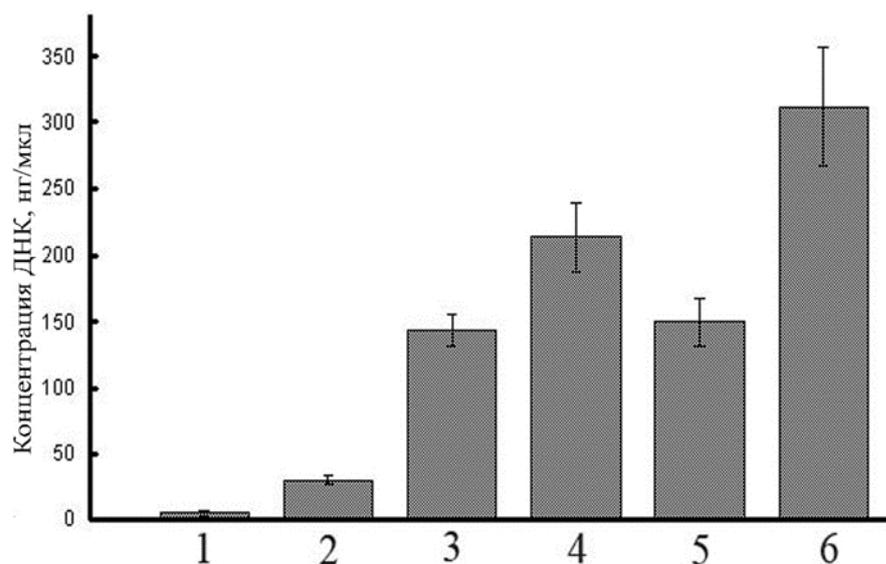


Рисунок 10 – Концентрация ДНК при различных методах выделения. 1 – метод фенольно-хлороформной экстракции, 2 – метод фенольно-хлороформной экстракции с добавлением хитиназы, 3 – метод солевой экстракции, 4 – метод солевой экстракции с добавлением хитиназы, 5 – метод нуклеосорбции, 6 – метод нуклеосорбции с добавлением хитиназы

Глава 5. КОНСТРУИРОВАНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ПЦР-ДЕТЕКЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ МИКРОСПОРИИ И ТРИХОФИТИИ В КЛИНИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

5.1. Поиск информативных участков ДНК для ПЦР-идентификации *M. canis*, *T. mentagrophytes* и *T. verrucosum* и подбор оптимальных олигонуклеотидных праймеров

В связи с тем, что полные геномы патогенных грибов *M. canis*, *T. mentagrophytes* и *T. verrucosum* не секвенированы, подобрать для каждого из них специфичный участок для ПЦР-идентификации представляется практически невозможным. Поэтому для ПЦР-анализа этих микроорганизмов должны быть использованы консервативные участки ДНК, содержащие переменные участки. Известно, что у всех эукариот наибольшей консервативностью отличаются гены, кодирующие 18S, 5S, 5,8S и 28S рРНК. В то же время внутренние части генов 18S, 5S, 5,8S и 28S рРНК являются настолько высококонсервативными, что не позволяют определять даже род, причем подобранные к этим генам праймеры вероятнее всего будут даже гибридизоваться с ДНК человека, что неминуемо приведет к ложноположительным результатам. В связи с этим решено подбирать праймеры к переменным участкам этих консервативных генов, каковыми являются внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2, фланкирующие с двух сторон ген 5,8 рРНК (рисунок 11). Далее проведен поиск нуклеотидных последовательностей генов 5,8 рРНК и прилегающих к ним ITS1 и ITS2 в GenBank. В результате проведенной работы обнаружены нуклеотидные последовательности генов 5,8 рРНК с фланкирующими участками ITS1 и ITS2 всех исследуемых дерматомицетов.

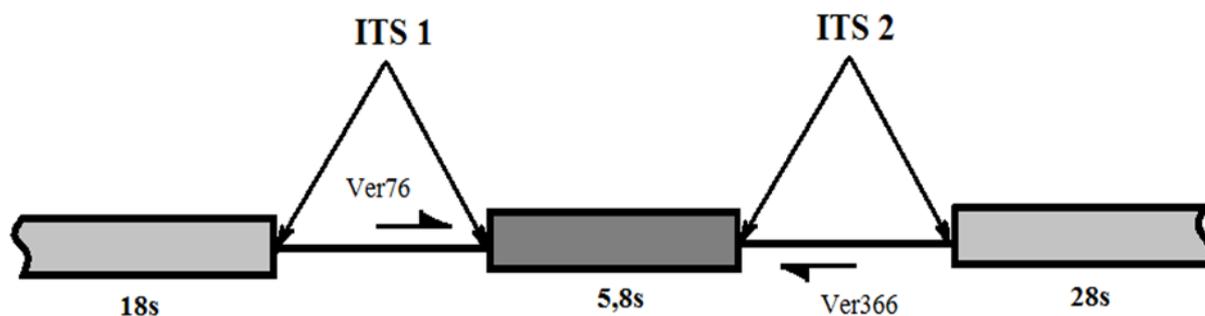


Рисунок 11 – Физическая карта области ДНК, включающая внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS1, ITS2) и ген 5.8S рРНК. Стрелками обозначены праймеры для идентификации ДНК *T. verrucosum*

В GenBank нуклеотидная последовательность *M. canis* зарегистрирована под номером AJ000618 и состоит из 769 п.н. Эта нуклеотидная последовательность использована для подбора специфических праймеров. Для этих целей использовали программу PrimerSelect из пакета Lasergine. Праймеры подбирались лишь к вариабельным участкам (ITS1, ITS2). В результате проведенной работы подобрана оптимальная пара праймеров Mic480F/Mic660R, при этом размер ампликона должен был составить 182 п.н., а температура отжига праймеров – 60°C. Для дополнительного анализа праймеров использовали сетевой ресурс <http://www.frodo.wi.mit.edu>, где доступна программа Primer3 Input. Подобранные праймеры не формировали стабильных шпилек и димеров. Кроме этого для дополнительной проверки специфичности и исключения возможностей гибридизации подобранных ДНК к человеческой или ДНК других дерматомицетов, провели выравнивание последовательностей праймеров со всеми доступными в GenBank нуклеотидными последовательностями при помощи ресурса MegaBlast доступной на сайте NCBI. Показано, пара праймеров Mic480F/Mic660R будет специфична лишь к ДНК *M. canis*, что позволяет надеяться на отсутствие ложноположительных результатов при клинических испытаниях разрабатываемой тест-системы.

Нуклеотидные последовательности *T. mentagrophytes* и *T. verrucosum* зарегистрированы в GenBank под номерами Z97995 и Z98003 соответственно. С целью подбора специфичных праймеров для ПЦР-идентификации соответствующих дерматомицетов нуклеотидные последовательности их генов 5,8 рРНК и прилегающих к ним ITS1 и ITS2 были выровнены с использованием программы Lasergene. К умеренно-вариабельным участкам ITS1 и ITS2, прилегающим к гену 5,8S рРНК подобраны праймеры TriM130F/TriM311R для идентификации *T. mentagrophytes*, при этом размер ампликона, согласно данным полученным при помощи программы PrimerSelect, должен был составить 182 п.н., а рассчитанная при помощи той же программы оптимальная температура отжига должна была составить 55°C.

Для однозначной ПЦР-идентификации вида *T. verrucosum* подобраны праймеры Ver76F/Ver366R, причем теоретически рассчитанный размер ампликона составил 231 п.н. Температура отжига праймеров должна была составить примерно 57°C. Расположение участков отжига специфичных праймеров показано на рисунке 12.

В результате проведенной работы подобраны 3 пары праймеров. Теоретические исследования при помощи программы PrimerSelect показали, что данные праймеры не формируют димеров и шпилек, оптимальная температура отжига превышает 55°C, причем разница в температурах плавления составляет не более 2°C. Все это позволяет быть уверенным, что подобранные праймеры окажутся работоспособными и на клиническом материале. Все 3 пары праймеров были синтезированы и использованы для дальнейших экспериментов. Результаты работы по подбору оптимальных олигонуклеотидных праймеров приводятся в таблице 2.

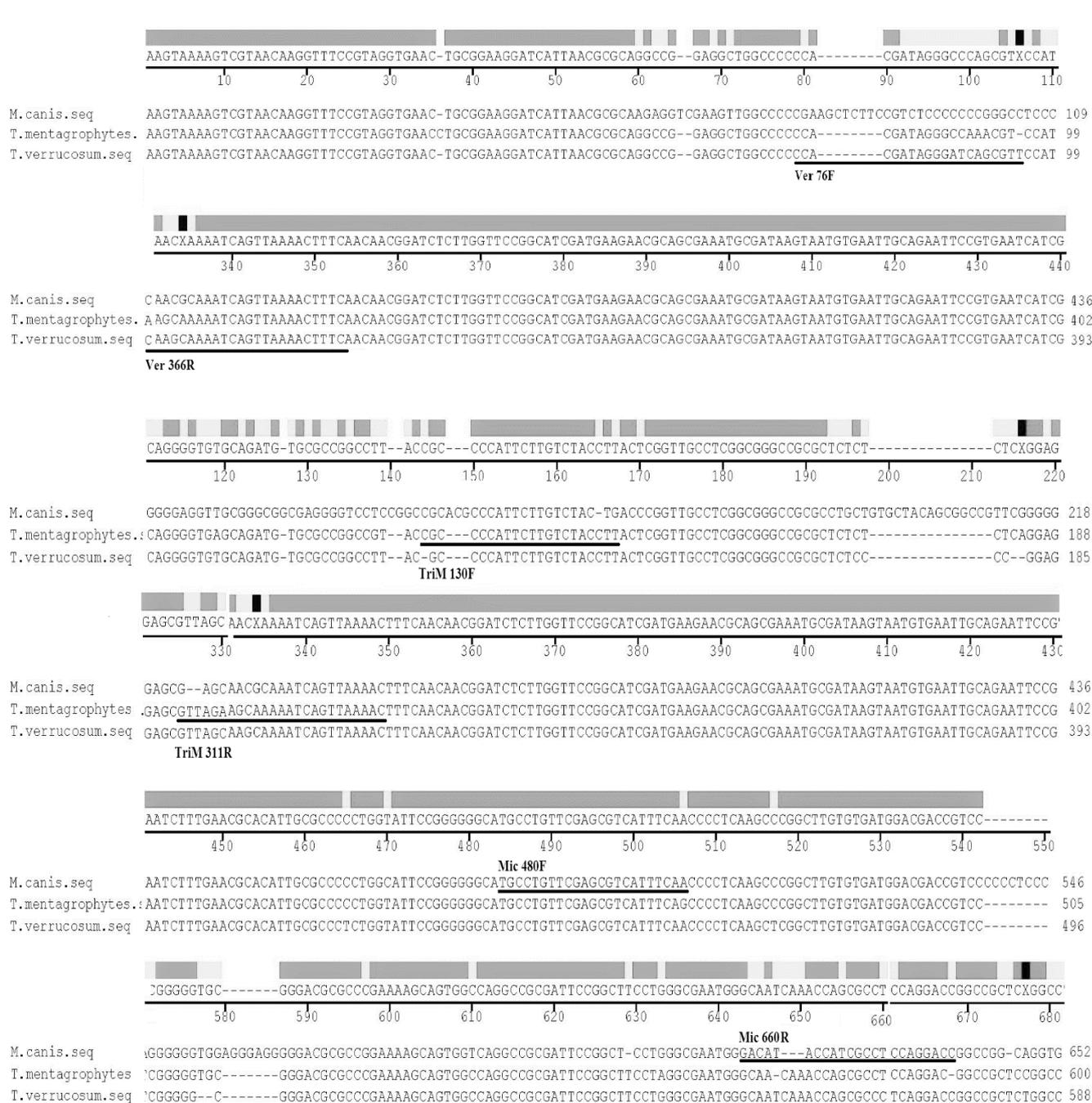


Рисунок 12 – Результаты выравнивания нуклеотидных последовательностей генов 5,8 рРНК и прилегающих к ним ITS1 и ITS2 *T. verrucosum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis* и расположение участков отжига подобранных специфических праймеров. Темно-серый цвет соответствует полному совпадению нуклеотидных последовательностей, а светло-серый умеренно-вариабельным участкам

Таблица 2 – Праймеры, подобранные в ходе проделанной работы и теоретически рассчитанные параметры ПЦР

Название праймера	Последовательности нуклеотидов праймеров	Температура отжига	Ожидаемый размер продукта (п.н.)
Mic480F/Mic660R (McanFor/McanRev)	5'-tgcctgttcgagcgtcatttcaa-3' 5'-ggctctggaggcgatggatgtc-3'	60°C	182
TriM130F/TriM311R (TmntFor/TmntRev)	5'-cgccccattcttgtctacctt-3' 5'-gtttaactgattttgcttctaac-3'	55°C	182
Ver76F/Ver366R (TverFor/TverRev)	5'-ccacgatagggatcagcgtt-3' 5'-gaaagtttaactgattttgcttg-3'	57°C	231

Сконструированные праймеры сначала апробировали на музейных культурах *M. canis*, *T. mentagrophytes* и *T. verrucosum*, полученных из бактериологической лаборатории ГАУЗ «Республиканский кожно-венерологический диспансер №1» г. Уфы.

Во всех случаях в ходе эксперимента имела место амплификация видоспецифических фрагментов ДНК заданного размера, тогда как в ходе амплификационного исследования дерматомицетов других видов получены отрицательные результаты ПЦР. Указанное позволило выдвинуть предположение о возможности использования созданных праймеров для видоспецифической детекции *M. canis*, *T. mentagrophytes* и *T. verrucosum*. При оценке результатов амплификации ПЦР с подобранными праймерами положительными, т. е. содержащими ДНК патогенов, считались пробы, в которых размер продукта, выявленный в геле, соответствовал положительному контрольному образцу. Напротив, у отрицательного контрольного образца (ДНК другого возбудителя) после проведения ПЦР продукт амплификации не определялся. Положительным контролем считали амплификационные пробы с ДНК музейных культур, размер которых соотносили с ДНК-маркером («СибЭнзим», Россия).

5.2. ПЦР-идентификация *M. canis* и подбор оптимальных условий для эффективной амплификации специфичных участков ДНК

Для апробации разрабатываемой тест-системы и подбора наиболее оптимальных условий ПЦР использовали ДНК, выделенную из музейной культуры *M. canis*. Очевидно, что оптимизация условий ПЦР должна быть направлена в первую очередь на уменьшение времени всего процесса. Для этого необходимо увеличивать температуру отжига праймеров до тех пор, пока специфический ампликон образуется в достаточном для детекции с помощью гель-электрофореза количестве. Также необходимо уменьшать время каждой стадии в ПЦР и общее количество циклов. В первую очередь испытаны праймеры Mic480F/Mic660R. В результате получены специфичные ампликоны, при оптимальной температуре отжига неспецифическая ДНК не проявлялась. Наибольшее количество специфического ампликона получалось при температуре отжига праймеров 64°C, дальнейшее повышение этого параметра приводило к ухудшению результатов ПЦР (рисунок 13). Время начальной денатурации менее 2 мин не ставили, так как указанное время необходимо для полной денатурации крупноразмерной тотальной ДНК, которая к тому же контаминирована ДНК хозяина. В циклах время элонгации решено оставить 15 с, так как из клинических образцов может быть выделена ДНК неодинакового качества, иногда времени элонгации 10 с может и не хватить. В целом для ПЦР были подобраны следующие оптимальные условия: начальная денатурация 94°C – 2 мин, 25 циклов – денатурация 94°C – 20 с, отжиг праймеров 64°C – 20 с, элонгация 72°C – 10 с, терминальная элонгация – 1 мин.

С целью доказательства того, что амплифицированы специфические участки ДНК *M. canis* проведено их секвенирование. Для определения нуклеотидной последовательности использовались как форвард, так и реверс праймеры. Анализ секвенированных последовательностей при помощи программы Megablast показал, что секвенированный участок совпадает с последовательностью, зарегистрированной в GenBank, а значит на самом деле амплифицированы специфические участки ДНК *M. canis*.

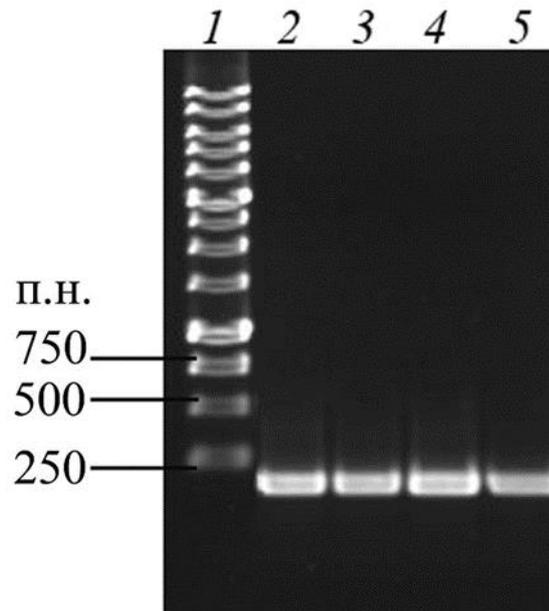


Рисунок 13 – Электрофореграмма результатов ПЦР участков ITS1 и ITS2, прилегающих к гену 5,8S рРНК музейной культуры *M. canis* при различных температурах отжига праймеров Mic480F/Mic660R. 1 – маркер молекулярного веса (1Кб маркер, «СибЭнзим», Россия), 2 – результаты ПЦР при температуре отжига праймеров 60°C, 3 – результаты ПЦР при температуре отжига праймеров 62°C, 4 – результаты ПЦР при температуре отжига праймеров 64°C, 5 – результаты ПЦР при температуре отжига праймеров 66°C. Размер ампликона – 182 п.н.

После апробации разрабатываемой тест-системы, поставлена задача определения специфичности подобранных праймеров. Для этого проведены тесты по постановке ПЦР с ДНК как *M. canis*, так и других дерматомицетов (*T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. verrucosum* *T. violaceum*, *T. tonsurans*), а также ДНК человека, присутствие которых возможно в клиническом материале.

Показано, что при использовании ДНК человека, а также других патогенных грибов, ПЦР с праймерами Mic480F/Mic660R не проходит, что позволяет делать выводы о высоком уровне специфичности подобранных праймеров (рисунок 14).

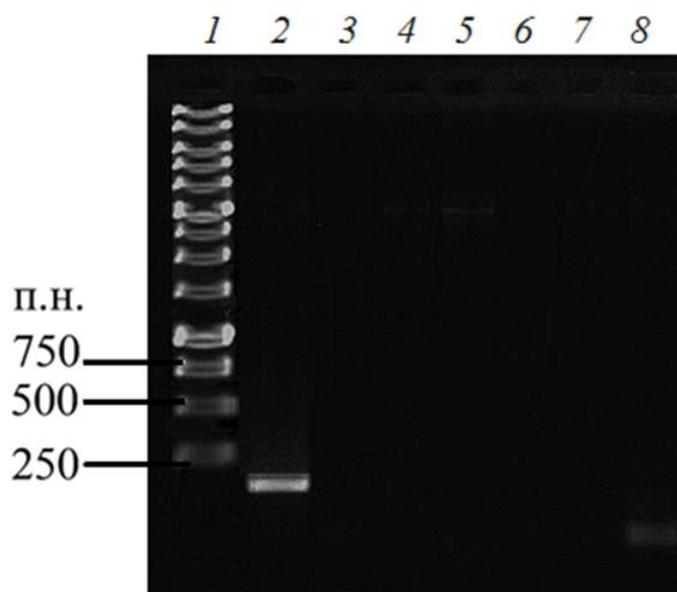


Рисунок 14 – Определение специфичности праймеров Mic480F/Mic660R, подобранных для ПЦР-идентификации *M. canis*. 1 – маркер молекулярного веса (1Kb маркер, «СибЭнзим», Россия), 2 – положительный контроль (ДНК *M. canis*), 3 – ДНК *T. mentagrophytes*, 4 – ДНК *T. rubrum*, 5 – ДНК *T. verrucosum*, 6 – ДНК *T. violaceum*, 7 – ДНК *T. tonsurans*, 8 – ДНК человека

Для оценки чувствительности тест-системы приготовили 10-кратные серийные разведения контрольной ДНК *M. canis* (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} и 10^{-5}), по 1 мкл каждого из которых исследовали методом ПЦР. Изначальная концентрация в образце составляла 340 нг/мкл. Каждую серию опытов повторили 5 раз. В ходе проведенных исследований положительные результаты ПЦР получены с разведениями 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , что соответствовало концентрации ДНК 34 нг/мкл, 3,4 нг/мкл, 0,34 нг/мкл, 34 пкг/мкл. Таким образом минимально детектируемая концентрация контрольной ДНК *M. canis* составила 34 пкг/мкл, что говорит о высокой чувствительности разрабатываемой тест-системы.

Для оценки работоспособности праймеров проведены испытания на клиническом материале. Для этого использованы образцы, в которых присутствие *M. canis* установлено с помощью регламентированных методов (микроскопическим и/или культуральным). В целом, при исследовании 269 клинических образцов методом ПЦР ДНК *M. canis* обнаружена в 261 (97%) из них.

Следует отметить, что с помощью микроскопического и культурального методов патоген удалось выявить в 244 (90,7%) и 239 (88,8%) случаях, соответственно. При этом положительные результаты ПЦР получены и в образцах, из которых традиционным методом не удалось получить культуры с характерными для данного вида культуральными признаками, что свидетельствует о более высокой чувствительности и специфичности метода ПЦР в сравнении с микроскопическим и культуральным методами.

5.3. ПЦР-идентификация *T. mentagrophytes* и *T. verrucosum* и подбор оптимальных условий для эффективной амплификации специфичных участков ДНК

Для ПЦР-идентификации вида *T. mentagrophytes* использованы праймеры TriM130F/TriM311R. При температуре отжига праймеров 58°C в образцах ДНК, выделенной из музейной культуры *T. mentagrophytes*, выявлены специфичные ПЦР-продукты (рисунок 15). В ходе оптимизации ПЦР были подобраны следующие условия реакции: начальная денатурация 94°C – 2 мин, 30 циклов – денатурация 94°C – 20 с, отжиг праймеров 58°C – 20 с, элонгация 72°C – 15 с, терминальная элонгация – 1 мин. Полученный ПЦР-продукт секвенирован с обеих концов ампликона. Анализ секвенированных последовательностей при помощи программы Megablast показал, что секвенированный участок совпадает с последовательностью, зарегистрированной в GenBank, а значит на самом деле амплифицированы специфические участки ДНК *T. mentagrophytes*.

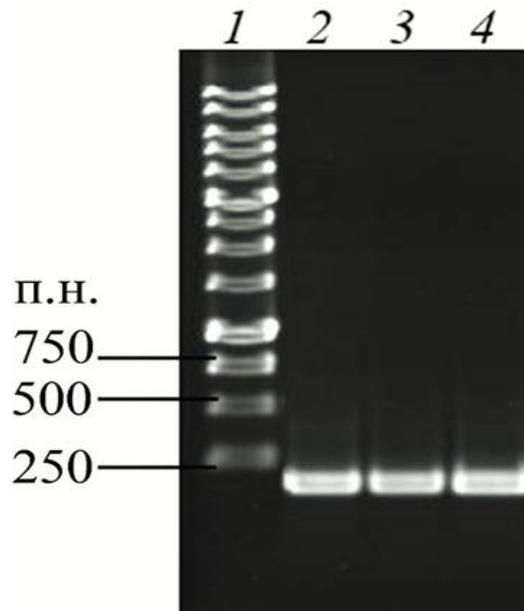


Рисунок 15 – Электрофореграмма результатов ПЦР участков ITS1 и ITS2, прилегающих к гену 5,8S рРНК музейной культуры *T. mentagrophytes* при использовании праймеров TriM130F/TriM311R. 1 – маркер молекулярного веса (1Кб маркер, «СибЭнзим», Россия), 2-4 – специфические ампликоны размером 182 п.н.

Далее при помощи праймеров Ver76F/Ver366R проведена ПЦР-идентификация вида *T. verrucosum* (рисунок 16). В результате получены специфичные ПЦР-продукты, которые были секвенированы. Было доказано, что секвенированный участок совпадает с последовательностью, зарегистрированной в GenBank, а значит на самом деле амплифицированы специфические участки ДНК *T. verrucosum*. Также была проведена работа по оптимизации условий ПЦР. Для праймеров Ver76F/Ver366R наиболее оптимальными оказались следующие условия: начальная денатурация 94°C – 2 мин, 30 циклов – денатурация 94°C – 20 с, отжиг праймеров 61°C – 20 с, элонгация 72°C – 20 с, терминальная элонгация – 1 мин.

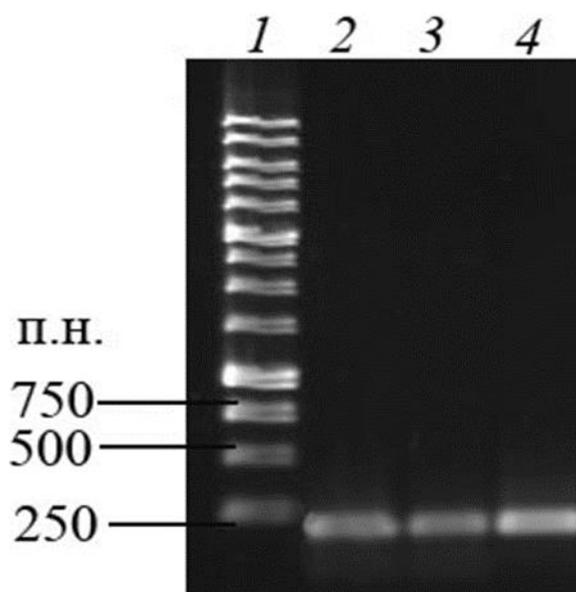


Рисунок 16 – Электрофореграмма результатов ПЦР участков ITS1 и ITS2, прилегающих к гену 5,8S рРНК музейной культуры *T. verrucosum* при использовании праймеров Ver76F/Ver366R. 1 – маркер молекулярного веса (1Кб маркер, «СибЭнзим», Россия), 2-4 – специфические ампликоны размером 231 п.н.

После апробации подобранных праймеров, поставлена задача оценки их специфичности. Для этого ставили ПЦР как с ДНК изучаемого вида, так и с ДНК других видов, которые теоретически могут встречаться в клиническом материале. Тестирование праймеров TriM130F/TriM311R показало, что ПЦР положительна лишь при использовании ДНК *T. mentagrophytes* (рисунок 17).

В свою очередь, при определении специфичности праймеров Ver76F/Ver366R, подобранных для детекции *T. verrucosum*, установлено, что положительный результат ПЦР имел место лишь с ДНК *T. verrucosum* (рисунок 18).

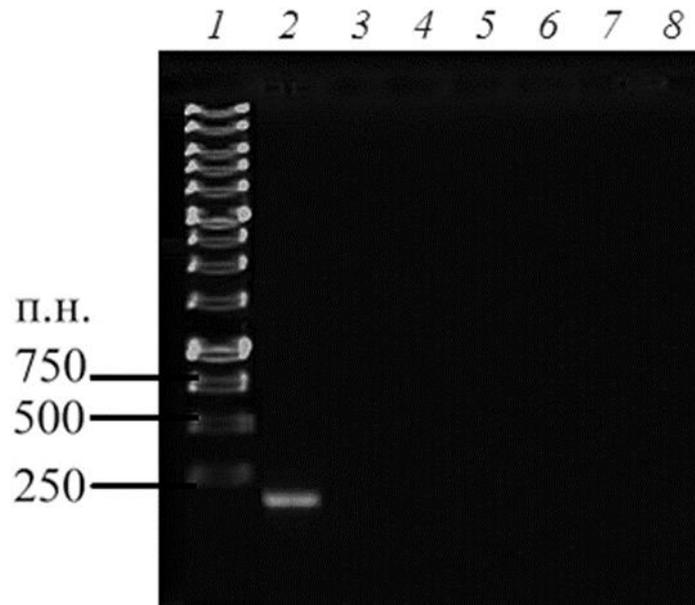


Рисунок 17 – Определение специфичности праймеров TriM130F/TriM311R, подобранных для ПЦР-идентификации *T. mentagrophytes*. 1 – маркер молекулярного веса (1Kb маркер, «СибЭнзим», Россия), 2 – положительный контроль (ДНК *T. mentagrophytes*), 3 – ДНК *T. rubrum*, 4 – ДНК *T. verrucosum*, 5 – ДНК *M. canis*, 6 – ДНК *T. violaceum*, 7 – ДНК *T. tonsurans*, 8 – ДНК человека

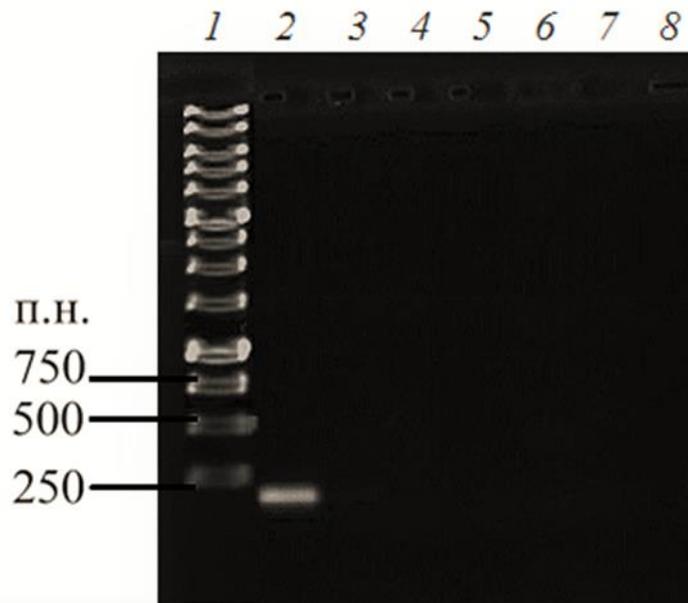


Рисунок 18 – Определение специфичности праймеров Ver76F/Ver366R, подобранных для ПЦР-идентификации *T. verrucosum*. 1 – маркер молекулярного веса (1Kb маркер, «СибЭнзим», Россия), 2 – положительный контроль (ДНК *T. verrucosum*), 3 – ДНК *T. rubrum*, 4 – ДНК *T. mentagrophytes*, 5 – ДНК *M. canis*, 6 – ДНК *T. violaceum*, 7 – ДНК *T. tonsurans*, 8 – ДНК человека

После определения оптимальных условий ПЦР и подтверждения специфичности подобранных праймеров, проведена работа по определению чувствительности разрабатываемых тест-систем. Для этого также приготовлены 10-кратные серийные разведения контрольной ДНК *T. mentagrophytes* и *T. verrucosum* (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} и 10^{-5}), по 1 мкл каждого из которых исследовали методом ПЦР. Изначальная концентрация в образцах составляла для ДНК *T. mentagrophytes* – 214 нг/мкл, а для ДНК *T. verrucosum* – 433 нг/мкл. При этом положительные результаты ПЦР получены с разведениями 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} как при использовании праймеров TriM130F/TriM311R, так и при использовании праймеров Ver76F/Ver366R. Таким образом минимально детектируемая концентрация ДНК *T. mentagrophytes* составила 21,4 пкг/мкл, а *T. verrucosum* – 43,3 пкг/мкл. Полученные результаты свидетельствуют о высокой чувствительности разрабатываемых тест-систем.

Для оценки работоспособности праймеров на клиническом материале также использованы 427 клинических образцов, в которых микроскопическим и/или культуральным методами установлено присутствие *T. mentagrophytes* в 193 случаях и *T. verrucosum* – в 234 случаях. При этом культуральный метод выявил *T. mentagrophytes* в 168 (87%) образцах, а *T. verrucosum* – в 189 (80,8%). В свою очередь методом световой микроскопии получены положительные результаты для *T. mentagrophytes* в 155 (80,3%) и *T. verrucosum* в 204 (87,2%) случаях. При исследовании клинических образцов методом ПЦР ДНК *T. mentagrophytes* обнаружена в 188 (97,4%) из них, а ДНК *T. verrucosum* – в 229 (97,9%). Необходимо отметить, что положительные результаты ПЦР получены также в образцах, из которых выделены атипичные культуры, что свидетельствует о более высокой чувствительности и специфичности метода ПЦР в сравнении с микроскопическим и культуральным методами.

Глава 6. ВЫБОР АДЕКВАТНЫХ ГРУПП СРАВНЕНИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ ИНФОРМАТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ МЕТОДОВ

Несмотря на положительные результаты разработки и применения молекулярно-генетических методов в лабораторной диагностике дерматомикозов информативность этих исследований оценивается неоднозначно ввиду большого разнообразия лабораторных протоколов, оборудования, способов выделения ДНК, вариантов и режимов амплификации и других особенностей. Унифицированным способом разрешения этой проблемы является объективная, рассчитанная статистически и основанная на соответствующих показателях диагностическая эффективность предлагаемых разработок. Однако на объективность оценки диагностической эффективности лабораторных тестов в существенной мере влияют стадия и степень тяжести воспалительного процесса, количество видов этиологических агентов заболевания, но наиболее существенно эти данные могут быть искажены игнорированием эпидемиологических различий в уровне заболеваемости в группах сравнения.

В связи с этим одной из задач настоящего исследования явилось эпидемиологическое обоснование адекватных групп сравнения и основанная на их использовании сравнительная оценка диагностической эффективности микроскопии, культурального метода и ПЦР при лабораторной диагностике микроспории и трихофитии. С этой целью проанализирована эпидемиологическая ситуация по исследуемым дерматомикозам в целом по Республике Башкортостан и в г. Уфа в частности за 1996-2013 гг.

Интенсивность заболеваемости микроспорией, согласно среднегодовых данных (1996-2013 гг.), по Республике Башкортостан составляла $32,7 \pm 0,9$ на 100 тыс. населения и заметно уступала таковой на территории г. Уфа ($42,9 \pm 1,9^{0/0000}$). При трихофитиях, обусловленных *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes*, напротив, отмечалась существенно более низкая их интенсивность в г. Уфа ($0,6 \pm 0,2^{0/0000}$ и $0,2 \pm 0,1^{0/0000}$) по сравнению с аналогичными

их значениями в целом по Республике Башкортостан ($6,4 \pm 0,4^0/0000$ и $2,3 \pm 0,2^0/0000$). Эти данные свидетельствуют о преимущественном поражении микроспорией городского населения, а исследуемыми нозоформами трихофитий – жителей сельских поселений. При этом из общего числа заболевших микроспорией в г. Уфа 95% составляли дети до 14 лет. Соответственно, дети г. Уфа и по интенсивному показателю заболеваемости микроспорией ($213,9 \pm 10,8^0/0000$) более чем в 20 раз превосходили таковой взрослого населения ($10,8 \pm 1,5^0/0000$). В Республике Башкортостан подобное соотношение показателей между детьми и взрослыми отмечалось на более низких уровнях при трихофитии, вызванной *T. verrucosum* ($19,6 \pm 1,5^0/0000$ и $3,1 \pm 0,3^0/0000$) и особенно *T. mentagrophytes* ($6,9 \pm 0,9^0/0000$ и $1,1 \pm 0,2^0/0000$). Формирование этих показателей по всем анализируемым формам дерматомикозов у детей происходило при благоприятной тенденции, с формированием в ее динамике при трихофитиях двух периодов (1996-2004 гг. и 2005-2013 гг.). В отличие от них, при микроспории выделялось три периода, последний из которых по своей продолжительности совпадал с таковым регистрируемым при трихофитиях. Этот период (2005-2013 гг.), сравнительно с начальным характеризовался значимо более низкими показателями заболеваемости всеми исследуемыми нозоформами дерматомикозов. При этом среди детского населения г. Уфа максимальные и сходные показатели заболеваемости микроспорией регистрировались в возрастных группах 3-6 и 7-14 лет ($268,1 \pm 25,4^0/0000$ и $265,5 \pm 18,9^0/0000$) (рисунок 19), как и в Республике Башкортостан при трихофитии, вызванной *T. mentagrophytes* ($2,4 \pm 1,1^0/0000$ и $6,0 \pm 1,2^0/0000$) (рисунок 20).

Это явилось объективным основанием объединения данных по указанным группам в одну когорту детей 3-14 лет, заболеваемость микроспорией среди которых на территории г. Уфа в последнем периоде (2005-2013 гг.) составила $266,8 \pm 44,4^0/0000$, а трихофитией по Республике Башкортостан, обусловленной *T. mentagrophytes*, – $4,2 \pm 2,0^0/0000$. В отличие от указанного при трихофитии, вызванного *T. verrucosum*, группой наибольшего риска по Республике

Башкортостан в эти годы являлась возрастная когорта детей 7-14 лет с показателем заболеваемости $16,1 \pm 1,9^{0/0000}$ (рисунок 20).

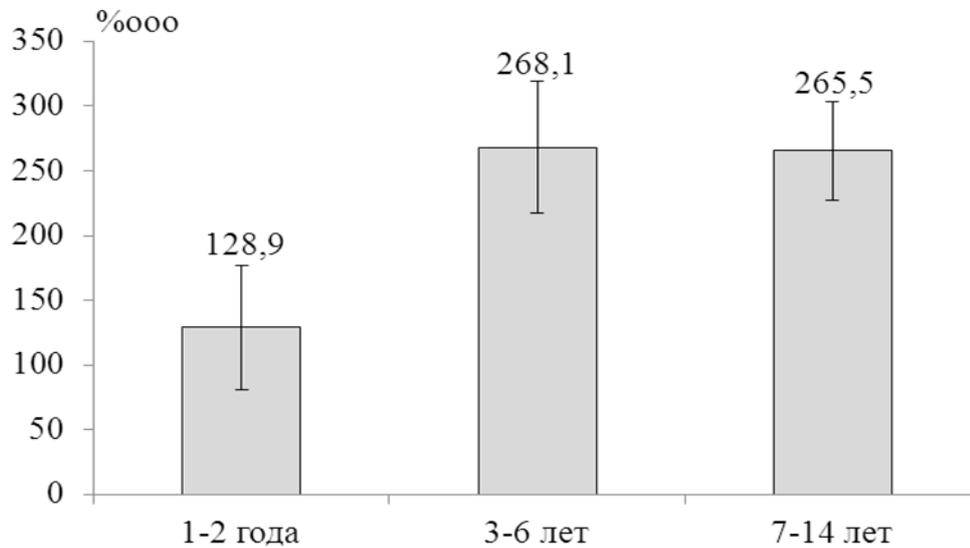


Рисунок 19 – Заболеваемость микроспорией в отдельных возрастных группах детского населения на территории г. Уфа в 2005-2013 гг.

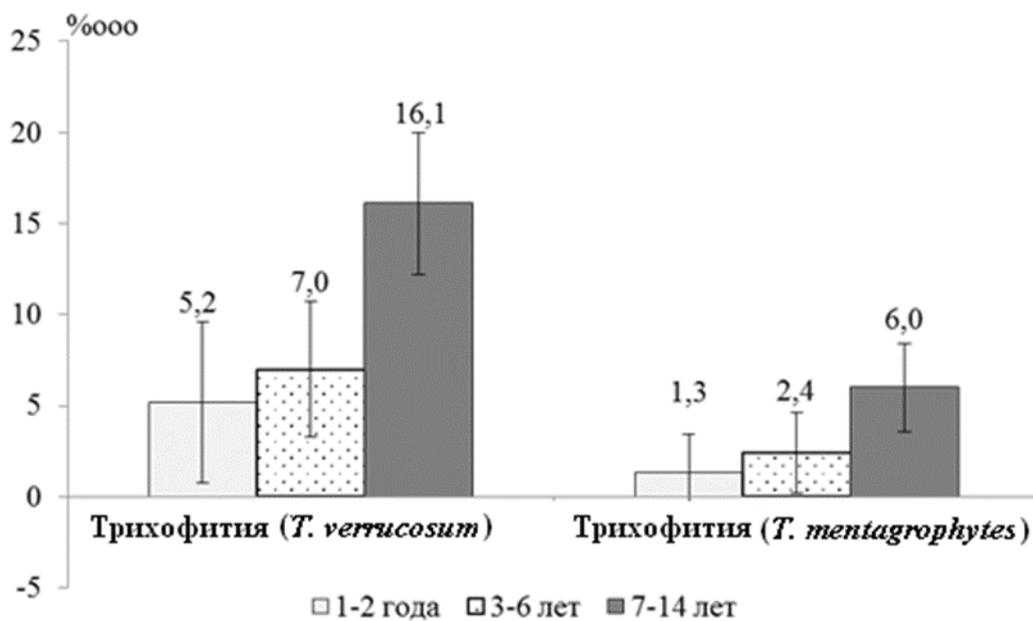


Рисунок 20 – Заболеваемость исследуемыми нозоформами трихофитий в отдельных возрастных группах детского населения Республики Башкортостан в 2005-2013 гг.

Приведенные данные свидетельствуют об определяющей роли в формировании заболеваемости микроспорией городских детей, а анализируемыми формами трихофитий – детей сельских поселений. Указанное предполагает получение на подобных группах больных, сравнительно с другими, наиболее адекватных результатов, обосновывающих эффективность использования ПЦР-исследования наряду с рутинными методами. Поэтому на группах обследуемых больных 3-14 лет с подозрением на микроспорию и, соответственно, трихофитию, вызванную *T. mentagrophytes*, а также пациентов 7-14 лет с подозрением на трихофитию, обусловленную *T. verrucosum*, проведена сравнительная оценка разработанных тест-систем и традиционных методов, применяемых в лабораторной диагностике дерматомикозов по показателям диагностической информативности.

Глава 7. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИНФОРМАТИВНОСТИ ПЦР И ТРАДИЦИОННЫХ МЕТОДОВ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ДЕРМАТОМИКОЗОВ

Для оценки информативности разработанных тест-систем по обнаружению *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes* в клиническом материале в сравнении с традиционными методами лабораторной диагностики дерматомикозов использовали критерии чувствительности, специфичности, диагностической эффективности, прогностической ценности теста и отношения правдоподобия.

Оценка эффективности тест-системы для детекции *M. canis* методом ПЦР, проведена на группе обследуемых лиц 3-14 лет с подозрением на микроспорию. При этом отмечено, что результаты исследований выявили более высокие значения указанных выше показателей во всех группах обследуемых для метода ПЦР. Вместе с тем статистически значимые различия между сравниваемыми методами по анализируемым показателям, как и предполагалось, наблюдали лишь в группе детей 3-14 лет, где чувствительность 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, $p < 0,05$) (рисунок 21). При этом величина вероятности наличия заболевания при положительном результате ПЦР на микроспорию, оцененной через прогностическую ценность положительного результата (ПЦ+), в этой группе пациентов оказалась также наибольшей (98,7%). Тем самым вероятность отсутствия этого заболевания, т.е. отрицательная прогностическая ценность теста (ПЦ–), при отрицательных результатах ПЦР-детекции *M. canis* в клиническом материале составила 91,9% (таблица 3).

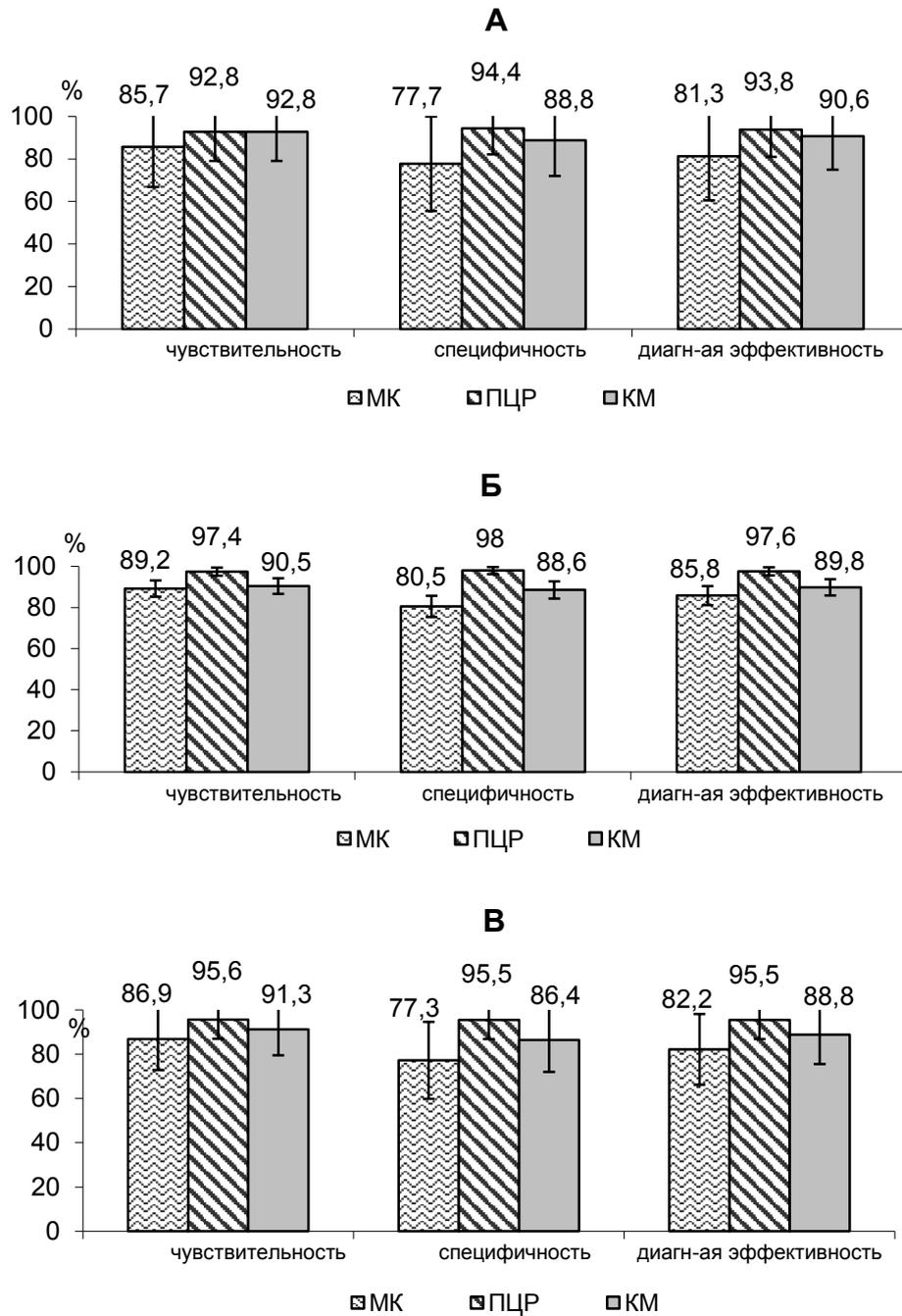


Рисунок 21 – Сравнительная оценка чувствительности, специфичности и диагностической эффективности микроскопии (МК), ПЦР и культурального метода (КМ) при диагностике микроспории в возрастных группах 1-2 года (А), 3-14 лет (Б), 15 лет и старше (В)

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 таблицы 3, применение ПЦР при диагностике микроспории, повышало вероятность точного диагноза (ОП+) в 48,7 раза, тогда как микроскопия и культуральное исследование увеличивали шансы на точный диагноз лишь в 4,6 и 7,9 раза соответственно (таблица 3).

По рискам ложноотрицательных результатов микроскопия, культуральный метод и ПЦР при диагностике микроспории сравнительно оценены при помощи критерия отношения правдоподобия для отрицательного результата (ОП-). Показано, что применение тест-системы для ПЦР-детекции *M. canis* в диагностике дерматомикозов снижало вероятность не выявить больного в 0,03 раза, тогда как микроскопия и культуральное исследование увеличивали шансы на точный диагноз лишь в 0,1 раза (таблица 3).

Таблица 3 – Показатели прогностической ценности (ПЦ+; ПЦ-) и отношения правдоподобия (ОП+; ОП-) микроскопии, культурального метода и ПЦР при диагностике микроспории у детей (3-14 лет)

Метод	ПЦ (%)		ОП (шанс)	
	ПЦ+	ПЦ-	ОП+	ОП-
МК	87,7	82,8	4,6	0,1
КМ	92,5	85,7	7,9	0,1
ПЦР	98,7	91,9	48,7	0,03

Оценка информативности тест-системы по обнаружению *T. mentagrophytes* в клиническом материале в сравнении с рутинными методами проведена на группе пациентов 3-14 лет с подозрением на трихофитию, вызванную *T. mentagrophytes*. Следует отметить, что во всех группах обследуемых более высокие значения

показателей диагностической информативности получены для метода ПЦР. Однако статистически значимые различия между изучаемыми методами по всем показателям также наблюдались лишь в группе детей 3-14 лет, где чувствительность составила – 97,3% (95,8-98,8, $p<0,05$), специфичность – 97,1% (95,5-98,7, $p<0,05$), а диагностическая эффективность – 97,2% (96,1-98,3, $p<0,05$) (рисунок 22). Вместе с тем величина прогностической ценности положительного результата ПЦР (ПЦ+) в этой группе оказалась также наибольшей (97,3%), в то время как значения этого показателя для микроскопии и культурального исследования составили 80,9% и 88,1% соответственно. Кроме этого применение ПЦР в диагностике трихофитии, обусловленной *T. mentagrophytes*, повышало вероятность точного диагноза (ОП+) в 33,6 раза, тогда как микроскопия и культуральное исследование увеличивали шансы на точный диагноз лишь в 4 и 7 раз соответственно (таблица 4).

Таблица 4 – Показатели прогностической ценности (ПЦ+; ПЦ–) и отношения правдоподобия (ОП+; ОП–) микроскопии, культурального метода и ПЦР при диагностике трихофитии, обусловленной *T. mentagrophytes*, у детей (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

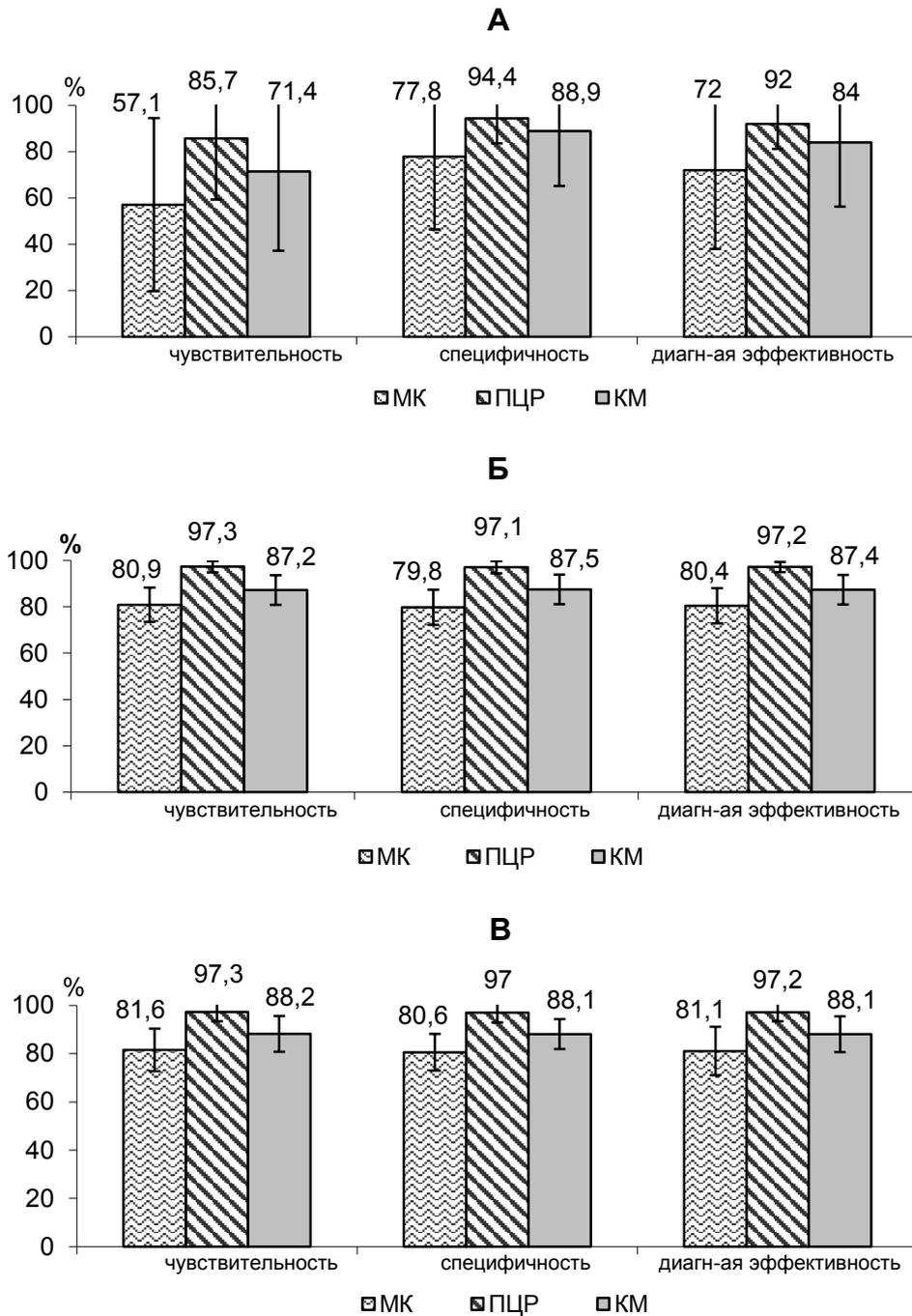


Рисунок 22 – Сравнительная оценка чувствительности, специфичности и диагностической эффективности микроскопии (МК), ПЦР и культурального метода (КМ) при диагностике трихофитии, обусловленной *T. mentagrophytes*, в возрастных группах 1-2 года (А), 3-14 лет (Б), 15 лет и старше (В)

Для оценки эффективности тест-системы для детекции *T. verrucosum* методом ПЦР, использовали группу обследуемых лиц 7-14 лет с подозрением на трихофитию, вызванную, *T. verrucosum*.

Как и в предыдущих случаях, результаты исследований выявили более высокие значения показателей во всех группах обследуемых. Вместе с тем статистически значимые различия между изучаемыми методами по анализируемым показателям наблюдались лишь в группе детей 7-14 лет, где чувствительность составила – 98,2% (97,0-99,4, $p < 0,05$), специфичность – 97,5% (85,8-99,2, $p < 0,05$), а диагностическая эффективность – 97,9% (96,9-98,9, $p < 0,05$) (рисунок 23). При этом величина вероятности наличия заболевания при положительном результате ПЦР на трихофитию, обусловленную *T. verrucosum*, оцененной через прогностическую ценность положительного результата (ПЦ+) в этой группе оказалась также наибольшей (98,2%), как и значение отношения правдоподобия ($ОП+ = 39,3$), определяющего наличие истинного заболевания, при самой низкой вероятности получения у них отрицательного результата ($ОП- = 0,02$) (таблица 5).

Таблица 5 – Показатели прогностической ценности (ПЦ+; ПЦ-) и отношения правдоподобия (ОП+; ОП-) микроскопии, культурального метода и ПЦР при диагностике трихофитии, обусловленной *T. verrucosum*, у детей (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

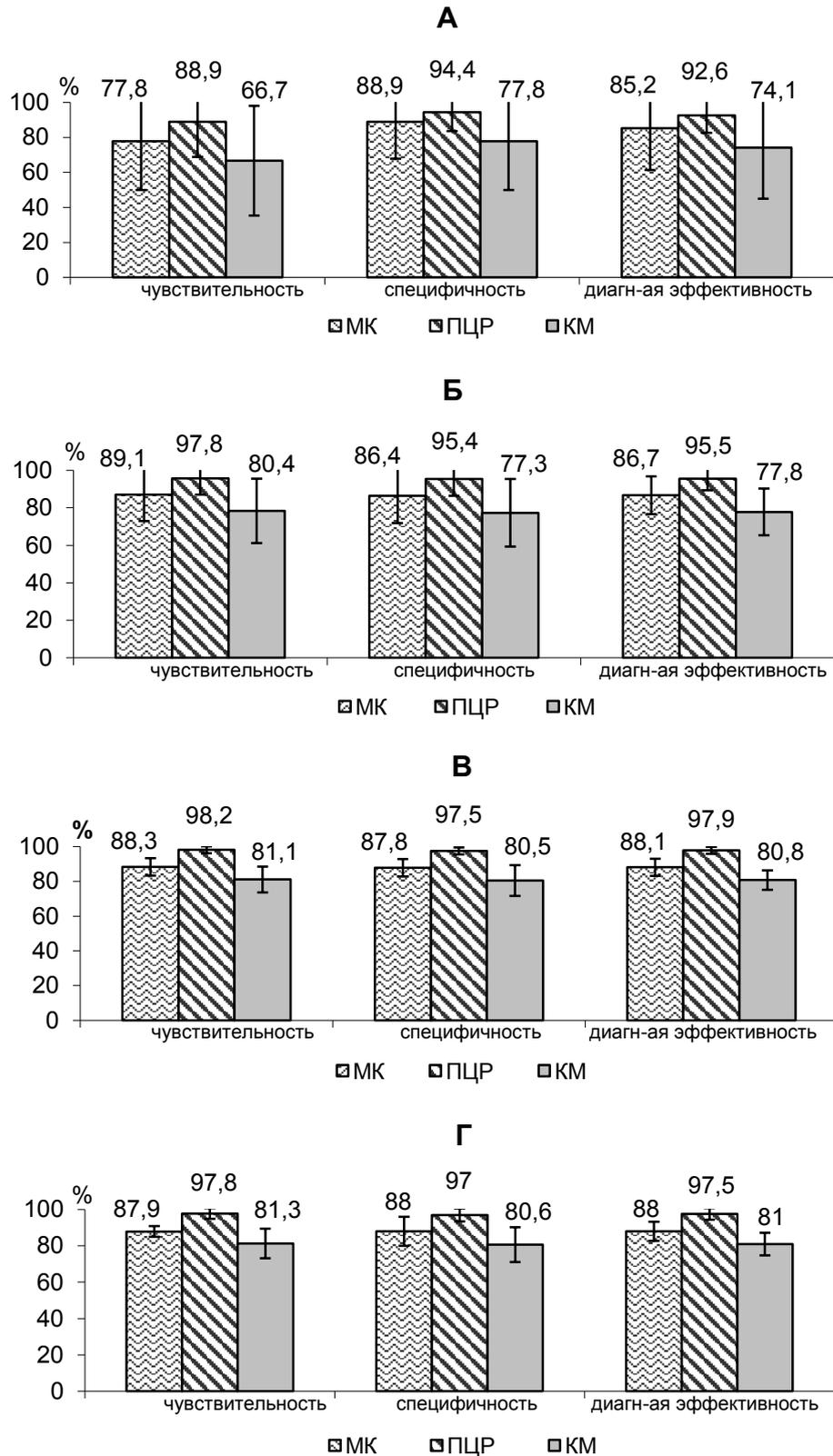


Рисунок 23 – Сравнительная оценка чувствительности, специфичности и диагностической эффективности микроскопии (МК), ПЦР и культурального метода (КМ) при диагностике трихофитии, обусловленной *T. verrucosum*, в возрастных группах 1-2 года (А), 3-6 лет (Б), 7-14 лет (В), 15 лет и старше (Г)

Полученные данные, свидетельствуют о том, что разработанные тест-системы позволяют обнаруживать *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes* в различных клинических образцах и обладают существенно более высокой диагностической эффективностью, чувствительностью и, особенно, специфичностью в лабораторной диагностике зооантропонозных дерматомикозов, по сравнению с микроскопическим и культуральным методами.

Продемонстрированный алгоритм конструирования новых диагностических систем, отличающийся испытанием их на обоснованных группах наблюдения, позволяет повысить информативность разработок при существенном сокращении расходов без снижения достоверности результатов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Заболеваемость зооантропонозными дерматомикозами характеризуется возникновением периодических эпидемиологических вспышек как в различных регионах Российской Федерации, так и за рубежом. О нестабильности эпидемиологической ситуации в нашей стране свидетельствуют продолжающееся снижение показателей заболеваемости этими дерматомикозами на одних территориях России и их рост на других. Кроме того, увеличение количества атипичных и стертых форм в настоящее время существенно затрудняют клиническую диагностику этих заболеваний.

Необходимо отметить, что проблему быстрого, высокоспецифичного и чувствительного выявления возбудителей микроспории и трихофитии в клиническом материале до настоящего времени решить не удалось даже, несмотря на целый ряд применяемых в настоящее время методов лабораторной диагностики, поскольку их информативность в силу ряда причин оставляет желать лучшего.

Следовательно, для формирования объективных представлений о масштабах распространения микроспории и трихофитии, наиболее перспективным представляется внедрение молекулярно-генетических методов, способных обеспечить высокочувствительную и специфичную прямую детекцию генетического материала возбудителя. Однако ПЦР и ее модификации для детекции возбудителей зооантропонозных дерматомикозов в нашей стране практически не используются и никак не регламентированы. Существующие разработки для выявления дерматомицетов преимущественно ориентированы на детекцию возбудителей онихомикозов. Указанные проблемы могли бы быть решены через разработку тест-систем для обнаружения *M. canis*, *T. mentagrophytes* и *T. verrucosum* в клиническом материале.

В связи с этим основной целью исследования явилось конструирование, испытание и сравнительная оценка информативности новых диагностических

систем для ПЦР-детекции возбудителей зооантропонозных дерматомикозов в клиническом материале и повышения, в конечном счете, эффективности этиологической диагностики этих заболеваний.

В ходе работы изучены морфофизиологические особенности культур *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes*, выявляемых в клинических образцах при микотических поражениях кожи и волос. Показано, что дерматомицеты имели относительно характерную для них морфологию, на основании которой была возможна их дифференцировка, только у пациентов, заболевших относительно недавно и не получавших специфические антимикотические препараты. При микологическом исследовании образцов от длительно болевших пациентов и лиц старших возрастных групп, преимущественно выявлены атипичные культуры: *M. canis* – 60,6%, *T. verrucosum* – 26,7% и *T. mentagrophytes* – 12,7%. Таким образом для апробации сконструированных тест-систем собрана коллекция клинических штаммов патогенных грибов, отнесенных к *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes*, но отличающихся характерными и нехарактерными для данных видов культуральными признаками и морфологией.

В результате проведенного множественного выравнивания известных последовательностей ДНК возбудителей микроспории и трихофитии, обнаружения умеренно вариабельных участков и подбора соответствующих им олигонуклеотидных праймеров сконструированы три тест-системы для детекции *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes* в клиническом материале. Обоснованы адекватные группы для оценки информативности этих тест-систем.

В ходе оценки информативности сконструированных тест-систем и рутинных методов (микроскопический, культуральный) при исследовании клинических образцов был получен ряд новых данных, имеющих научно-практическое значение.

При сравнительном анализе показателей информативности лабораторных методов (ПЦР, микроскопический и культуральный) в диагностике зооантропонозных дерматомикозов на адекватных группах сравнения показано, что ПЦР характеризовалась наибольшей диагностической эффективностью (97,9%

(96,9-98,9, $p < 0,05$)), при диагностике трихофитии, вызванной *T. verrucosum*, и обеспечивала статистически значимо более высокие показатели чувствительности (98,2% (97,0-99,4, $p < 0,05$)), специфичности (97,5% (85,8-99,2, $p < 0,05$)) и прогностической ценности положительного результата (ПЦ+ = 98,2%) по сравнению с результатами традиционных методов исследования. При этом высокое значение показателя «отношение правдоподобия» повышало вероятность точного диагноза при ПЦР-исследовании в 39,3 раза, тогда как микроскопическое и культуральное исследования увеличивали шансы на точный диагноз лишь в 7,2 и 4,2 раза соответственно. Следует отметить, что в случаях, когда в роли возбудителя заболевания выступал *T. verrucosum* показатели информативности культурального метода (чувствительность – 81,1% (77,4-84,8, $p < 0,05$), специфичность – 80,5% (76,1-84,9, $p < 0,05$), диагностическая эффективность – 80,8% (78-83,6, $p < 0,05$)) были значительно ниже соответствующих значений, полученных при микроскопическом исследовании (чувствительность – 88,3% (85,2-91,4, $p < 0,05$), специфичность – 87,8% (84,7-90,9, $p < 0,05$), диагностическая эффективность – 88,1% (85-91,2, $p < 0,05$)). Это связано с тем, что *T. verrucosum* сложно культивируется. Данный факт делает еще более ценными результаты, полученные при ПЦР-исследовании, особенно если учитывать, что культуральное исследование до сих пор считается основным при лабораторной диагностике трихофитии.

Сравнение информативности ПЦР и рутинных методов при диагностике трихофитии, обусловленной *T. mentagrophytes*, также свидетельствовало о статистически значимо большей диагностической эффективности (97,2% (96,1-98,3, $p < 0,05$)), чувствительности (97,3% (95,8-98,8, $p < 0,05$)), специфичности (97,1% (95,5-98,7, $p < 0,05$)) и прогностической ценности положительного результата (ПЦ+ = 97,3%) метода ПЦР. Шансы получения точного диагноза с помощью микроскопического (ОП+ = 4,0) и культурального (ОП+ = 7,0) исследований были достаточно низкими в сравнении с результатами ПЦР-исследования (ОП+ = 33,6).

Показатели информативности микроскопического и культурального исследований при диагностике микроспории также значительно уступали соответствующим показателям, полученным с применением ПЦР. В частности, при

исследовании клинического материала от пациентов с подозрением на микроспорию методом ПЦР показатели диагностической эффективности (97,6% (96,6-98,6, $p < 0,05$)), чувствительности (97,4% (96,4-98,4, $p < 0,05$)), специфичности (98% (87,1-98,9, $p < 0,05$)) и прогностической ценности положительного результата (ПЦ+ = 98,7%) были статистически значимо выше по сравнению с данными показателями при использовании традиционных методов. При этом вероятность получения точного диагноза при ПЦР-исследовании увеличивалась в 48,7 раз, тогда как микроскопическое и культуральное исследования увеличивали шансы на точный диагноз лишь в 4,6 и 7,9 раза соответственно.

Полученные данные, свидетельствуют о существенно более высокой диагностической эффективности, чувствительности и особенно специфичности разработанных тест-систем для ПЦР-детекции *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes* в клиническом материале по сравнению с микроскопическим и культуральным методами.

Указанное обосновывает необходимость широкого внедрения молекулярно-генетических исследований в практическое здравоохранение при диагностике микозов, а также необходимость оптимизации лабораторного компонента диагностической подсистемы не только эпидемиологического, но и ветеринарного надзора за микроспорией и трихофитией. Это связано с известным фактом, что основными источниками данных инфекций являются животные. В этой связи, адекватное осуществление обоих видов надзора (эпидемиологического и ветеринарного) требует в каждом конкретном случае микроспории или трихофитии ПЦР-детекции возбудителя, для объективного выявления эпидемиологических связей между источниками инфекции, факторами и путями заражения, идентификации загрязненных пространств в больничных, детских, школьных учреждениях и других значимых объектов. При этом существенно могут быть снижены временные затраты и появляется возможность экспресс-детекции возбудителя в различных клинических образцах.

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 СОКРАЩЕНИЙ

- ДЭ – диагностическая эффективность
- ИО – истинно-отрицательный результат
- ИП – истинно-положительный результат
- КМ – культуральный метод
- ЛО – ложноотрицательный результат
- ЛП – ложноположительный результат
- МК – микроскопический метод
- ОП – отношение правдоподобия
- ПЦ – прогностическая ценность
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- СП – специфичность метода
- ЧС – чувствительность метода

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абидова, З.М. Состояние иммунной реактивности у больных микроспорией / З.М. Абидова, И.Т. Карабаева, О.В. Извекова // Проблемы мед. микологии. – 2010. – Т. 12, № 1. – С. 20-23.
2. Антонов, В.Б. К вопросу об инфильтративно-нагноительной трихофитии / В.Б. Антонов, Т.В. Медведева, Л.М. Леина [и др.] // Успехи мед. микологии. – 2006. – Т. VIII. – С. 185-187.
3. Аравийский, Р.А. Диагностика микозов / Р.А. Аравийский, Н.Н. Климко, Н.В. Васильева. – СПб., 2004. – 186 с.
4. Ахмади, М.С. Классические методы диагностики дерматомикозов животных и человека / М.С. Ахмади, Е.В. Кухар // Sworld: сборник научных трудов. – 2013. – Т. 38, № 2. – С. 87-95.
5. Баймиев, Ан.Х. Филогенетическая систематика прокариот: методические рекомендации для студентов, обучающихся по специальности Микробиология / Ан.Х. Баймиев, Ал.Х. Баймиев, А.Р. Мавзютов. – Уфа, 2011. – 19 с.
6. Банержи, А. Медицинская статистика понятным языком: вводный курс / А. Банержи. – М.: Практическая медицина, 2014. – 287 с.
7. Белоусова, Т.А. Паховая дерматофития: этиология, клиника, современные возможности терапии / Т.А. Белоусова // Дерматол. Косметол. и пластич. хирургия. – 2008. – № 23. – С. 1555-1559.
8. Белоусова, Т.А. Эпидемиология, клиника и терапия поверхностных микозов кожи / Т.А. Белоусова, М.В. Горячкина // Фарматека. – 2013. – № 10 (263). – С. 30-34.
9. Бондаренко, В.В. Современные особенности эпидемиологии, клинического течения и терапии микроспории и трихофитии у детей и подростков: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.11 / Бондаренко Виктория Валерьевна. – М., 2002. – 18 с.

10. Васильева, Н.В. Микологические культуральные исследования: методические рекомендации / авт. колл.: Н.В. Васильева, Н.В. Елинов, Т.С. Богомолова [и др.]. – СПб., 2013. – 47 с.
11. Васильева, Н.В. Экспериментальное моделирование трихофитии на морских свинках в зависимости от вирулентности патогена – возбудителя / Н.В. Васильева, Р.А. Аравийский, И.В. Выборнова [и др.] // Проблемы мед. микологии. – 2013. – Т. 15, № 1. – С. 34-39.
12. Вислобоков, А.В. Микроспория: трудности диагностики / А.В. Вислобоков, Р.А. Хмельницкий // Рос. журн. кожных и венерических болезней. – 2010. – № 2. – С. 47-49.
13. Генис, Д.Е. Медицинская паразитология / Д.Е. Генис. – М.: Медицина, 1985. – 304 с.
14. Герасимчук, Е.В. Дерматомикозы как фактор, отягощающий течение хронических дерматозов / Е.В. Герасимчук, В.В. Гладько, М.Ю. Герасимчук // Вестн. последиплом. мед. образования. – 2014. – № 1. – С. 42.
15. Герасимчук, Е.В. Современный метод диагностики дерматоонкомикологической патологии и необходимость его внедрения в поликлиническое звено медицинских учреждений Минобороны России / Е.В. Герасимчук, М.Ю. Герасимчук // Вестн. последиплом. мед. образования. – 2011. – № 4. – С. 7-8.
16. Глузмин, М.И. Аспекты заболеваемости дерматофитиями в Краснодарском крае / М.И. Глузмин, А.Г. Шевченко, С.Д. Жестовский, Л.Ю. Краснокутская // Актуальные вопросы инфекционной патологии: материалы 5-й науч.-практич. конф. ЮФО. – Краснодар, Сочи, Майкоп: ОАО «Полиграф-ЮГ», 2010. – 232 с.
17. Грибковые заболевания кожи: руководство для врачей. – СПб.: Издательство «Питер», 2000. – 288 с.
18. Доршакова, Е.В. Микромицеты в естественной среде обитания и в помещениях – их потенциальная опасность для здоровья людей / Е.В. Доршакова, Н.П. Елинов, И.Э. Павлова [и др.] // Проблемы мед. микологии. – 2012. – Т. 14, № 3. – С. 53-58.

19. Дроздова, Т.И. Опыт применения препарата «ТЕРБИЗИЛ» в лечении микроспории у детей / Т.И. Дроздова, Т.В. Деревянко // Мед. наука и практика. – 2005. – № 3. – С. 1.
20. Елинов, Н.П. Дерматомикозы, или поверхностные микозы кожи и ее придатков – волос и ногтей. Лабораторная диагностика / Н.П. Елинов, Н.В. Васильева, К.И. Разнатовский // Проблемы мед. микологии. – 2008. – Т. 10, № 1. – С. 27-34.
21. Елинов, Н.П. Дерматомицеты: лекция / Н.П. Елинов, Санкт-Петербургская мед. акад. последипломного образования Россоцздрава, НИИ мед. микологии им. П.Н. Кашкина, Каф. лабораторной микологии и патоморфологии микозов. – СПб., 2010.
22. Ерзина, Е.И. Микроспория: клинические особенности у детей и подростков / Е.И. Ерзина, О.Н. Позднякова // Медицина и образование в Сибири. – 2012. – № 2. – С. 19.
23. Ерзина, Е.И. Современные особенности эпидемиологии микроспории и трихофитии у детей / Е.И. Ерзина, О.Н. Позднякова // Медицина и образование в Сибири. – 2012. – № 1. – С. 29.
24. Журавлева, Н.П. Литический эндофактор у микромицетов, составляющих банк культур – продуцентов аллергенов / Н.П. Журавлева, Н.П. Елинов, Н.В. Васильева [и др.] // Проблемы мед. микологии. – 2015. – Т. 17, № 2. – С. 15-19.
25. Зайцев, В.М. Прикладная медицинская статистика / В.М. Зайцев, В.Г. Лифляндский, В.И. Маринкин. – М., 2006. – 432 с.
26. Затевалов, А.М. Исследование состава микробиоценоза кишечника в зависимости от полирезистентности грибов рода *Candida* / А.М. Затевалов, Е.П. Селькова, А.Ю. Миронов [и др.] // Успехи мед. микологии. – 2016. – Т. XV. – С. 310-313.
27. Иванов, О.Л. Совершенствование лабораторной диагностики онихомикозов на основе метода полимеразной цепной реакции / О.Л. Иванов, Ю.В. Сергеев, А.Ю. Сергеев, С.Н. Щербо // Рос. журн. кожных и венерических болезней. – 2009. – № 4. – С. 6-11.

28. Иванова, М.А. Грибковые заболевания кожи в амурской области и других субъектах российской федерации, 2008-2009 гг. / М.А. Иванова, А.В. Гречко, Н.Е. Мельниченко // Соц. аспекты здоровья населения. – 2010. – Т. 15, № 3. – С. 21.
29. Игнатовский, А. Грибковые инфекции. Диагностика и лечение в аспекте качества медицинской помощи / А. Игнатовский // Врач. – 2013. – № 3. – С. 66-68.
30. Исаева, Т.И. Клинико-эпидемиологические и медико-социальные аспекты микроспории в различных климатогеографических условиях: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.11 : 14.00.33 / Исаева Тамила Исаевна. – М., 2009. – 25 с.
31. Карибаева, А. Современные особенности клиники, эпидемиологии, иммунных механизмов трихофитии, микроспории и усовершенствование терапии: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.00.11 / Карибаева Алмагуль Токтарбековна. – Алматы, 2010. – 41 с.
32. Касаткин, Е.В. Этиология дерматомикозов в Красногвардейском районе в 2009-2011 годах / Е.В. Касаткин, И.В. Лысогорская, Е.С. Саворовская // Проблемы мед. микологии. – 2012. – Т. 14, № 2. – С. 92.
33. Касымов, О.И. Особенности клинического течения зооантропонозной микроспории / О.И. Касымов, М.И. Максудова // Проблемы мед. микологии. – 2008. – Т. 10, № 2. – С. 49.
34. Кашкин, П.М. Руководство по медицинской микологии / П.М. Кашкин, Н.Д. Шеклаков. – М., 1978. – 335 с.
35. Кашкин, П.Н. Определитель патогенных, токсигенных и вредных для человека грибов / П.Н. Кашкин, М.К. Хохряков, Л.П. Кашкин. – Л.: Медицина, 1979. – 272 с.
36. Кашкин, П.Н. Определитель патогенных, токсикогенных и вредных для человека грибов / П.Н. Кашкин, М.К. Хохряков, А.П. Кашкин. – М.: Медицина, 1975. – 269 с.
37. Кашкин, П.Н. Практическое руководство по медицинской микологии / П.Н. Кашкин, В.В. Лисин. – Л.: Медицина, 1983. – 192 с.

38. Климко, Н.Н. Распространенность тяжелых и хронических микотических заболеваний в Российской Федерации по модели life program / Н.Н. Климко, Я.И. Козлова, С.Н. Хостелиди [и др.] // Проблемы мед. микологии. — 2014. — Т. 16, № 1. — С. 3-8.
39. Кожичкина, Н.В. Этиология микозов стоп и онихомикоза / Н.В. Кожичкина // Вестн. дерматологии и венерологии. — 2013. — № 1. — С. 9-13.
40. Королева, Ж.В. Этиология, клиника и оптимизация терапии при микозе стоп / Ж.В. Королева // Укр. журн. дерматологии, венерологии, косметологии. — 2013. — № 2 (49). — С. 171-175.
41. Корсунская, И.М. Дерматофитии с поражением волос у детей (клиника и лечение) / И.М. Корсунская, О.Б. Тамразова. — М., 2004. — 31 с.
42. Корсунская, И.М. Дерматофитии с поражением волос у детей / И.М. Корсунская, О.Б. Тамразова. — М.: Медицина, 2005. — 31 с.
43. Кравец, Е.В. Случаи микроспории волосистой части головы у взрослых / Е.В. Кравец // Укр. журн. дерматологии, венерологии, косметологии. — 2012. — № 3 (46). — С. 124-131.
44. Кубасова, Н.Л. Особенности диагностики и лечения онихомикоза стоп, обусловленного нитчатými недерматомицетами и дрожжами / Н.Л. Кубасова, М.А. Пупкова, О.А. Клиценко, Н.В. Васильева // Проблемы мед. микологии. — 2010. — Т. 12, № 3. — С. 25-28.
45. Куляев, К.А. Клинико-диагностические параллели инфильтративно-нагноительной микроспории и глубокой трихофитии / К.А. Куляев, А.Ю. Епифанова, И.О. Каткова [и др.] // Саратовский науч.-мед. журнал. — 2013. — Т. 9, № 3. — С. 601-604.
46. Латыпов, А.Б. Динамика заболеваемости и особенности эпидемиологии зооантропонозной трихофитии в республике Башкортостан / А.Б. Латыпов // Успехи мед. микологии. — 2007. — Т. X. — С. 9-12.
47. Латыпов, А.Б. Научное обоснование профилактики зооантропоножной трихофитии и совершенствования медицинской помощи больным (на примере

- Республики Башкортостан): автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.33, 14.00.11 / Латыпов Айрат Борисович. – Екатеринбург, 2007. – 20 с.
48. Латыпов, А.Б. Проблема зооантропонозной трихофитии в Республике Башкортостан / А.Б. Латыпов, Н.Х. Шарафутдинова // Здравоохранение Республики Башкортостан. Спец. Вып. – 2005. – № 8. – С. 28-29.
 49. Лещенко, В.М. Лабораторная диагностика грибковых заболеваний / В.М. Лещенко. – М.: Медицина, 1982. – 275 с.
 50. Ломоносов, К.М. Микозы стоп в практике врача-дерматолога / К.М. Ломоносов, Д.В. Игнатьев // Consil. Medic. Дерматология. – 2009. – № 1. – С. 25-31.
 51. Лыкова, С.Г. Использование метода ПЦР-диагностики у пациентов с микотической патологией / С.Г. Лыкова, С.В. Липатникова, О.Н. Гришаева [и др.] // Успехи мед. микологии. – 2006. – Т. VIII. – С. 100-101.
 52. Малишевская, Н.П. Общеклиническое значение проблемы заболеваемости микозами стоп и их эффективного лечения (обзор) / Н.П. Малишевская // Леч. врач. – 2012. – № 8. – С. 78.
 53. Маноян, М.Г. Бессимптомное миконосительство и его значение в распространении дерматофитозов животных и человека / М.Г. Маноян, Р.С. Овчинников, А.Н. Панин // VetPharma. – 2012. – № 3. – С. 40-44.
 54. Медведева, Т.В. Микроспория: редкие клинические случаи / Т.В. Медведева, Л.М. Леина, Г.А. Чилина [и др.] // Клиническая дерматология и венерология. – 2012. – Т. 10, № 4. – С. 94-101.
 55. Медведева, Т.В. Случай онихомикоза, вызванного *Microsporum canis* / Т.В. Медведева, Г.А. Чилина // Проблемы мед. микологии. – 2011. – Т. 13, № 2. – С. 42-44.
 56. Медведева, Т.В. Трихофития: современные представления об этиологии, клинической картине, особенностях диагностики и терапии / Т.В. Медведева, В.Б. Антонов, Л.М. Леина [и др.] // Клиническая дерматология и венерология. – 2007. – Т. 4. – С. 70-74.

57. Мельниченко, Н.Е. Результаты лабораторной диагностики дерматомицетов по данным Амурского ОКВД / Н.Е. Мельниченко // Иммунопатология. Аллергология. Инфектология. – 2010. – № 1. – С. 163.
58. Меньшиков, В.В. Молекулярные исследования в диагностике инфекционных заболеваний / В.В. Меньшиков. – М.: Лабора, 2009. – Т. 3. – 855 с.
59. Михайлова, Е.А. Видовой состав грибов рода *Candida* и их чувствительность к антимикотикам у лиц с хроническими заболеваниями верхних дыхательных путей / Е.А. Михайлова, А.Ю. Миронов, О.О. Жеребятьева [и др.] // Успехи мед. микологии. – 2016. – Т. XV. – С. 287-290.
60. Мокина, Е. Дерматофития в России: перспективы новых методов лечения / Е. Мокина, А. Сергеев, Н. Савченко [и др.] // Врач. – 2009. – № 8. – С. 38-41.
61. Мохаммад, Ю. Клинико-эпидемиологические особенности микроспории в современных условиях и разработка лечения новыми медикаментозными средствами: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.11 / Мохаммад Юсуф. – М., 1996. – 18 с.
62. Мухамадеева, О.Р. Лечение зооантропонозных дерматофитий / О.Р. Мухамадеева, З.Р. Хисматуллина, Р.У. Даниленко // Современ. проблемы дерматовенерологии, иммунологии и врач. косметологии. – 2013. – Т. 8, № 1 (24). – С. 35-39.
63. Нажмутдинова, Д.К. Микроспория / Д.К. Нажмутдинова, Т.В. Таха // Рус. мед. журн. – 2004. – Т. 12, № 12. – С. 696-698.
64. Наконечная, С.И. Практический опыт применения тербинафина в терапии микроспории гладкой кожи с преимущественным поражением пушковых волос / С.И. Наконечная // Укр. журн. дерматологии, венерологии, косметологии. – 2013. – № 4 (51). – С. 98-103.
65. Никитина, И.В. Клинические особенности дерматомикозов [Электронный ресурс] / И.В. Никитина // Дерматология и Косметология. – 2009. – Т. 17, № 6. – Режим доступа: http://online.zakon.kz/Document/?doc_id=30785270
66. Новикова, В.В. Анализ этиологической структуры микозов гладкой кожи у пациентов кожно-венерологического диспансера г. Перми / В.В. Новикова,

- Т.Ф. Одегова, М.В. Кучевасова // Проблемы мед. микологии. – 2012. – Т. 14, № 2. – С. 115.
67. Новикова, Л.А. К характеристике заболеваемости микроспорией / Л.А. Новикова [и др.] // Проблемы мед. микологии. – 2012. – Т. 14, № 2. – С. 115.
68. Нуралиев, М.Д. Эпидемиология, особенности клиники и совершенствование терапии трихофитии в условиях жаркого климата: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.11 / Нуралиев Махмадали Дустмуродович. – Душанбе, 2007. – 20 с.
69. Организация и проведение дезинфекционных мероприятий при дерматомикозах: методические указания МУ 3.5.2644—10. – М., 2010.
70. Панкратов, В.Г. Дерматомикозы в практической работе врача первичного звена / В.Г. Панкратов // Здоровоохранение (Минск). – 2013. – № 4. – С. 39-45.
71. Пархоменко, В.В. Микроспория в Краснодарском крае / В.В. Пархоменко, Г.К. Рафеенко, М.И. Глузмин [и др.] // Кубанский науч. мед. вестник. — 2011. – № 2. – С. 127-130.
72. Патрушев, Л.И. Искусственные генетические системы: в 2-х т. / Л.И. Патрушев. – М.: «Наука», 2004. – Т. 1. Генная и белковая инженерия. – 530 с.
73. Пестерев, П.Н. Трихофития зооантропонозная / П.Н. Пестерев. – Томск, 1988. – 124 с.
74. Попова, Д.Р. Современные подходы к диагностике зооантропонозной трихофитии / Д.Р. Попова, З.Р. Хисматуллина, О.Р. Мухамадеева, Г.Х. Биккулова // Соврем. пробл. дерматовенерологии, иммунологии и врач. косметологии. – 2010.
75. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 28 января 2008 г. № 4 "Об утверждении санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08" (с изменениями и дополнениями). – М., 2008.
76. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 28 января 2008 г. № 4 "Об утверждении санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08" (с изменениями и дополнениями). Приложение. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322-08 "Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями

- паразитарных болезней". Приложение № 1 (справочно). Классификация микроорганизмов – возбудителей инфекционных заболеваний человека, простейших, гельминтов и ядов биологического происхождения по группам патогенности.
77. Потекаев, Н.С. Микроспория взрослых / Н.С. Потекаев, Л.Р. Плиева, С.В. Шкребец // Клиническая дерматология и венерология. – 2008. – № 4. – С. 19-21.
 78. Ребриков, Д.В. ПЦР в реальном времени / Д.В. Ребриков, Г.А. Саматов // Молекулярные исследования в диагностике инфекционных заболеваний. – М.: Бином, 2009. – С. 715-855.
 79. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с.
 80. Родионов, А.Н. Грибковые заболевания кожи: руководство для врачей / А.Н. Родионов. – СПб., М., Харьков, Минск, 2000.
 81. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322-08 "Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней". Приложение № 1. Классификация микроорганизмов – возбудителей инфекционных заболеваний человека, простейших, гельминтов и ядов биологического происхождения по группам патогенности. – М., 2008.
 82. Саттон, Д. Определитель патогенных и условно патогенных грибов / Д. Саттон, А. Фотергилл, М. Ринальди, пер. с англ. К.Л. Тарасовой, Ю.Н. Ковалева, под ред. И.Р. Дорожковой. – М.: Мир, 2001. – 486 с.
 83. Сведения об инфекционной и паразитарной заболеваемости за 1997-2011 гг. (МКБ 10- В35). – М., 2012.
 84. Сергеев, А.Ю. Дерматофитии: новое в диагностике терапии и профилактике наиболее распространенных микозов человека / А.Ю. Сергеев, Ю.В. Сергеев // Consil. Medicum. Дерматология. – 2008. – № 1. – С. 30-35.

85. Сергеев, А.Ю. Доказательная медицина и стандарты лечения дерматофитии / А.Ю. Сергеев, Ю.В. Сергеев // Успехи мед. микологии. – 2016. – Т. XV. – С. 187-191.
86. Сергеев, А.Ю. Доказательный опыт терапии дерматомикозов сертраконазолом / А.Ю. Сергеев, Г.Н. Бурцева, В.О. Николаевский, Ю.Ю. Сергеев // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2015. – № 4. – С. 92-104.
87. Сергеев, А.Ю. Первый опыт прямой ПЦР диагностики дерматофитии ногтей / А.Ю. Сергеев, П.Г. Богуш, Н.Ю. Земляная [и др.] // Успехи мед. микологии. – 2004. – Т. III. – С. 19-21.
88. Сергеев, А.Ю. Руководство по лабораторной диагностике онихомикозов / под ред. А.Ю. Сергеева. – М.: Гэотар Медицина, 2000. – 154 с.
89. Сергеев, А.Ю. Системы оценки онихомикозов в 2016 году / А.Ю. Сергеев // Успехи мед. микологии. – 2016. – Т. XV. – С. 209-212.
90. Сергеев, Ю.В. Местная и комбинированная терапия онихомикозов / Ю.В. Сергеев, Е.В. Мокина, А.Ю. Сергеев [и др.]. – М., 2015.
91. Сергеев, Ю.В. Онихомикозы: современные подходы к лечению / Ю.В. Сергеев, Е.И. Касихина // Вестн. дерматологии и венерологии. – 2009. – № 5. – С. 117-119.
92. Соколова, Т.В. Клинико-эпидемиологический мониторинг поверхностных микозов кожи в регионах Российской Федерации / Т.В. Соколова, А.П. Малярчук, Т.А. Малярчук // Клини. дерматология и венерология. – 2011. – № 4. – С. 55-64.
93. Соколовский, Е.В. Способ диагностики онихомикоза кистей и стоп: пат. РФ № 2319962 от 20.03.2008 / Соколовский Е.В., Аравийская Е.Р., Кузнецов А.В., Чухловин А.Б., Соколов Г.Н., Тотолян А.А.
94. Солодовников, Ю.П. Эпидемическая вспышка дерматофитии в общеобразовательной школе (Часть I) / Ю.П. Солодовников, И.В. Фокина, Л.Н. Берглезова [и др.] // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2004. – № 4. – С. 114-116.

95. Степанова, А.А. Проникновение *Aspergillus fumigatus* через клетки эпителия бронхов мышей / А.А. Степанова, Н.В. Васильева, М. Ямагучи [и др.] // Проблемы мед. микологии. – 2015. – Т. 17, № 4. – С. 45-50.
96. Степанова, А.А. Ультраструктурные аспекты взаимодействия между альвеолярными макрофагами мышей и клетками гиф *Aspergillus fumigatus* / А.А. Степанова, Н.В. Васильева, М. Ямагучи [и др.] // Проблемы мед. микологии. – 2016. – Т. 18, № 1. – С. 20-25.
97. Степанова, А.А. Электронномикроскопическое изучение инвазивного аспергиллеза, обусловленного *Aspergillus fumigatus* / А.А. Степанова, Н.В. Васильева, Ф. Чжан [и др.] // Проблемы мед. микологии. – 2015. – Т. 17, № 3. – С. 38-41.
98. Степанова, Ж.В. Грибковые заболевания: диагностика и лечение / Ж.В. Степанова. – М.: Миклош, 2007. – 104 с.
99. Степанова, Ж.В. Диагностические ошибки при зоантропонозной трихофитии / Ж.В. Степанова, В.Н. Гребенюк, И.А. Воробьева [и др.] // Вестн. дерматологии и венерологии. – 2001. – № 6. – С. 36-38.
100. Степанова, Ж.В. Заболеваемость трихофитией и ошибки в диагностике / Ж.В. Степанова // Успехи мед. микологии. – 2007. – Т. X. – С. 143.
101. Степанова, Ж.В. Клинические особенности и лечение микроспории в современных условиях / Ж.В. Степанова // Вестн. дерматологии и венерологии. – 2008. – № 6. – С. 85-88.
102. Тараскина, А.Е. Способ диагностики онихомикоза: пат. РФ № 2584035 от 20.05.2016 / Тараскина А.Е., Крылова Е.В., Медведева Т.В., Чилина Г.А., Васильева Н.В., Лавникевич Д.М.
103. Тихоновская, И.В. Эпидемиологическая характеристика и опыт лечения микоза волосистой части головы, вызванного *m. Canis* / И.В. Тихоновская, В.П. Адаскевич, Т.В. Шафранская // Рецепт. – 2012. – № 1. – С. 109-113.
104. Трухачева, Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica / Н.В. Трухачева. – М.: ГОЭТАР-Медиа, 2013. – 384 с.

105. Усубалиев, М.Б. Клинико-эпидемиологические и этиологические особенности паховой дерматофитии / М.Б. Усубалиев, Г.М. Калыбекова, А.Ж. Касымова, А.Д. Ибраимова // Вестн. КГМА им. И.К. Ахунбаева. – 2013. – № 3. – С. 115-119.
106. Усубалиев, М.Б. Патоморфологические изменения и результаты комплексного лечения паховой дерматофитии / М.Б. Усубалиев, Ю.В. Козьмина // Вестн. КГМА им. И.К. Ахунбаева. – 2013. – Т. 1, № 4. – С. 114-120.
107. Файзуллина, Е.В. Современные тенденции эпидемиологии онихомикоза / Е.В. Файзуллина // Проблемы мед. микологии. – 2014. – Т. 16, № 1. – С. 18-22.
108. Федеральные клинические рекомендации по ведению больных микроспорией / Рос. о-во дерматовенерологов и косметологов. – М., 2013.
109. Федеральные клинические рекомендации по ведению больных трихофитией / Рос. о-во дерматовенерологов и косметологов. – М., 2013.
110. Филимонкова, Н.Н. Морфо-биологические особенности возбудителей микроспории и клиническое течение заболевания (аналитический обзор) / Н.Н. Филимонкова, М.М. Кохан, Н.В. Щербакова [и др.] // Мед. наука и практика. – 2005. – № 3.
111. Хамаганова, И.В. Проблемы диагностики и лечения трихомикозов у детей / И.В. Хамаганова, А.Г. Шекрота, З.В. Макушина, А.А. Красеха // Клин. дерматология и венерология. – 2012. – Т. 10, № 6. – С. 95-97.
112. Херрингтон, С. Молекулярная клиническая диагностика. Методы: пер. с англ. / С. Херрингтон, Д. Макги. – М.: Мир, 1999. – 558 с.
113. Хисматуллина, З.Р. Клиническое многообразие зооантропонозной трихофитии / З.Р. Хисматуллина, О.Р. Мухамадеева // Проблемы мед. микологии. – 2004. – Т. 16, № 2. – С. 1
114. Хисматуллина, З.Р. Новые подходы к диагностике зооантропонозной трихофитии [Электронный ресурс] / З.Р. Хисматуллина, Д.Р. Попова, О.Р. Мухамадеева, Г.Р. Мустафина // Практик. медицина. – 2012. – № 1 (56). – Режим доступа: <http://pmarchive.ru/novye-podxody-k-diagnostike-zooantroponoznoj-trixofitii/>

115. Хисматуллина, З.Р. Ошибки в диагностике зооантропонозных микотических инфекций / З.Р. Хисматуллина, Н.Х. Шарафутдинова, С.Р. Габдуллина // *Практ. медицина.* – 2012. – № 1 (56). – С. 135-136.
116. Хисматуллина, З.Р. Случай зооантропонозной трихофитии, устойчивой к лечению гризеофульвином / З.Р. Хисматуллина // *Вестн. дерматологии и венерологии.* – 2005. – № 6. – С. 58.
117. Цыкин, А.А. Онихомикозы: ДНК–диагностика, совершенствование комбинированной терапии: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2008. – 24 с.
118. Чемерис, А.В. ПЦР, ЛЦР и ГЦР – цепные реакции нуклеиновых кислот в режиме реального времени / А.В. Чемерис [и др.] // *Вестн. биотехнологии и физико-химической биологии.* – 2005. – Т. 1, № 2. – С. 5-14.
119. Чемерис, А.В. ПЦР, ЛЦР и ГЦР – цепные реакции нуклеиновых кислот в режиме реального времени / А.В. Чемерис, Ю.М. Никоноров, Д.А. Чемерис // *Вестн. биотехнологии и физико-химической биологии.* – 2005. – Т. 1, № 2. – С. 5-14.
120. Чесноков, В.А. Микобиота слизистой оболочки полости рта и поверхности съемных акриловых пластиночных протезов при ортопедической реабилитации / В.А. Чесноков, М.Г. Чеснокова, А.А. Стафеев, А.Ю. Миронов // *Клин. лаб. диагностика.* – 2016. – Т. 61, № 2. – С. 126-128.
121. Чухловин, К.А. Способ диагностики онихомикоза кистей и стоп: пат. №2319962 / Чухловин К.А., Кузнецов А.В., Соколовский Е.В., Аравийская Е.Р., Соколов Г.Н., Тотолян А.А. – опубл. 20.03.08.
122. Шадринова, О.В. Клинико-лабораторные предикторы исхода инвазивного аспергиллеза у пациентов с лимфомой Ходжкина / О.В. Шадринова, Е.В. Фролова, Е.А. Десятник [и др.] // *Успехи мед. микологии.* – 2016. – Т. XVI, Гл. 5. – С. 46-48.
123. Шебашова, Н.В. Видовое разнообразие грибов рода *Candida* при микозах кожи и онихомикозах / Н.В. Шебашова, И.А. Клеменова, А.В. Резайкин // *Вестн. дерматологии и венерологии.* – 2009. – № 6. – С. 81-84.

124. Школа, О.А. Опыт применения препарата Итразол в дерматологической практике / О.А. Школа, Е.Г. Рыжкова // Вестн. дерматологии и венерологии. – 2005. – № 4. – С. 50-51.
125. Шмелькова, Е.С. Современное комплексное лечение при атипичных формах микроспории / Е.С. Шмелькова // Укр. журн. дерматологии, венерологии, косметологии. – 2010. – № 3 (38). – С. 99-102.
126. Щелкунова, О.А. Клинико-эпидемиологические особенности микроспории и трихофитии, подходы к лечению: автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.01.10 / Щелкунова Ольга Александровна. – Новосибирск, 2013. – 18 с.
127. Щелкунова, О.А. Особенности иммунного статуса у больных микроспорией и его коррекция / О.А. Щелкунова, Т.Б. Решетникова // Медицина и образование в Сибири. – 2012. – № 2. – С. 37.
128. Щербо, С.Н. Современные технологии генодиагностики в персонализированной медицине, метагеномике и микологии / С.Н. Щербо, Д.С. Щербо, А.Ю. Сергеев // Успехи мед. микологии. – 2015. – Т. XIV. – С. 282-283.
129. Яковлев, А.Б. Особенности клиники поверхностных микозов в детском возрасте / А.Б. Яковлев // Практик. медицина. – 2009. – № 5. – С. 47-55.
130. Яковлев, А.Б. Современные данные об этиологии, патогенезе, клинической картине, лечении и профилактике микроспории / А.Б. Яковлев // Terra Medica. – 2011. – № 3-4. – С. 38-43.
131. Яковлев, А.Б. Эпидермодермальные микозы кожи в практике дерматолога / А.Б. Яковлев // Леч. врач. – 2012. – № 5. – С. 53.
132. Aboueisha, A.M. Public health significance of dermatophytes in Ismailia and Port Said Provinces, Egypt / A.M. Aboueisha, H. El-Mahallawy // Med. Mycol. J. – 2013. – Vol. 54, № 2. – P. 123-129.
133. Aghamirian, M.R. Dermatophytes as a cause of epizoonoses in dairy cattle and humans in Iran: epidemiological and clinical aspects / M.R. Aghamirian, S.A. Ghiasian // Mycoses. – 2011. – Vol. 54, № 4. – P. e52-6.

134. Andreoni, S. Medical Mycology Atlas / S. Andreoni, C. Farina, G. Lombardi. – GRAFIK@rt srl – Paderno Dugnano, 2004. – 239 p.
135. Arenas, R. Classification of subcutaneous and systemic mycoses / R. Arenas, G. Moreno-Coutino, O. Welsh // Clin. Dermatol. – 2012. – Vol. 30, № 4. – P. 369-71.
136. Arenas, R. Onychomycosis. A Mexican survey / R. Arenas, A. Bonifaz, M.C. Padilla [et al.] // Eur. J. Dermatol. – 2010. – Vol. 20, № 5. – P. 611-4.
137. Balci, E. Prevalence and risk factors of tinea capitis and tinea pedis in school children in Turkey / E. Balci, M. Gulgun, O. Babacan [et al.] // J. Pak. Med. Assoc. – 2014. – Vol. 64, № 5. – P. 514-518.
138. Baldo, A. Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes / A. Baldo, M. Monod, A. Mathy [et al.] // Mycoses. – 2012. – Vol. 55, № 3. – P. 218-23.
139. Beifuss, B. Direct detection of five common dermatophyte species in clinical samples using a rapid and sensitive 24-h PCR-ELISA technique open to protocol transfer / B. Beifuss, G. Bezold, P. Gottlober [et al.] // Mycoses. – 2011. – Vol. 54, № 2. – P. 137-45.
140. Bejdak, P. Detection and identification of filamentous fungi causing mycoses using molecular genetic methods / P. Bejdak, M. Lengerova, D. Palousova [et al.] // Klin. Mikrobiol. Infek. Lek. – 2012. – Vol. 18, № 4. – P. 109-14.
141. Bendjaballah-Laliam, A. Epidemiology of Tinea capitis in the suburbs of Tipasa, Algeria / A. Bendjaballah-Laliam, H. Djazer // J. Mycol. Med. – 2014. – Vol. 24, № 2. – P. 141-143.
142. Benmezdad, A. Tinea capitis in the University Hospital of Constantine (Algeria) / A. Benmezdad, T. Moulahem, M. Benyazzar [et al.] // J. Mycol. Med. – 2012. – Vol. 22, № 4. – P. 354-356.
143. Bergmans, A.M. Evaluation of a single-tube real-time PCR for detection and identification of 11 dermatophyte species in clinical material / A.M. Bergmans, M. van der Ent, A. Klaassen [et al.] // Clin. Microbiol. Infect. – 2010. – Vol. 16, № 6. – P. 704-710.

144. Bernhardt, A. Molecular identification of fungal pathogens in nodular skin lesions of cats / A. Bernhardt, W. von Bomhard, E. Antweiler, K. Tintelnot // *Med. Mycol.* – 2015. – Vol. 53, № 2. – P. 132-144.
145. Bonifaz, A. Subcutaneous mycoses: chromoblastomycosis, sporotrichosis and mycetoma / A. Bonifaz, D. Vazquez-Gonzalez, A.M. Perusquia-Ortiz // *J. Deutsch. Dermatol. Gesellsch.* – 2010. – Bd. 8, № 8. – P. 619-627.
146. Boom, R. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids / R. Boom, C.J. Sol, M.M. Salimans [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1990. – Vol. 28. – P. 495-503.
147. Brasch, J. Fast and sensitive detection of *Trichophyton rubrum* in superficial tinea and onychomycosis by use of a direct polymerase chain reaction assay / J. Brasch, V. Beck-Jendroschek, R. Glaser // *Mycoses.* – 2011. – Vol. 54, № 5. – P. e313-317.
148. Brasch, J. Tinea capitis caused by *Trichophyton equinum* / J. Brasch, B. Logering, Y. Graser // *Acta Dermato-Venereol.* – 2009. – Vol. 89, № 2. – P. 204-205.
149. Brillowska-Dabrowska, A. Diagnostic PCR tests for *Microsporum audouinii*, *M. canis* and *Trichophyton infections* / A. Brillowska-Dabrowska, A. Swierkowska, D.M. Lindhardt Saunte, M.C. Arendrup // *Med. Mycol.* – 2010. – Vol. 48, № 3. – P. 486-490.
150. Brillowska-Dabrowska, A. PCR test for *Microsporum canis* identification / A. Brillowska-Dabrowska, E. Michalek, D.M. Saunte [et al.] // *Med. Mycol.* – 2013. – Vol. 51, № 6. – P. 576-579.
151. Buitrago, M.J. Current epidemiology and laboratory diagnosis of endemic mycoses in Spain / M.J. Buitrago, M. Cuenca-Estrella // *Enfermed. Infec. Microbiol. Clin.* – 2012. – Vol. 30, № 7. – P. 407-413.
152. Cabanes, F.J. Dermatophytes isolated from domestic animals in Barcelona, Spain / F.J. Cabanes, M.L. Abarca, M.R. Bragulat // *Mycopathologia.* – 1997. – Vol. 137, № 2. – P. 107-113.
153. Cafarchia, C. Epidemiology and risk factors for dermatophytoses in rabbit farms / C. Cafarchia, A. Camarda, C. Coccioli [et al.] // *Med. Mycol.* – 2010. – Vol. 48, № 7. – P. 975-980.

154. Cambuim, I.I. Clinical and mycological evaluation of onychomycosis among Brazilian HIV/AIDS patients / I.I. Cambuim, D.P. Macedo, M. Delgado [et al.] // Rev. Soc. Brasil. Med. Tropic. – 2011. – Vol. 44, № 1. – P. 40-42.
155. Chandran, N.S. Complementary role of a polymerase chain reaction test in the diagnosis of onychomycosis / N.S. Chandran, J.Y. Pan, Z.A. Pramono [et al.] // Austr. J. Dermatol. – 2013. – Vol. 54, № 2. – P. 105-108.
156. Chung, T.H. A rapid molecular method for diagnosing epidemic dermatophytosis in a racehorse facility / T.H. Chung, G.B. Park, C.Y. Lim [et al.] // Equine Vet. J. – 2010. – Vol. 42, № 1. – P. 73-78.
157. Costa, T.R. The etiology and epidemiology of dermatophytoses in Goiania, GO, Brazil / T.R. Costa, M.R. Costa, M.V. da Silva [et al.] // Rev. Soc. Brasil. Med. Trop. – 1999. – Vol. 32, № 4. – P. 367-371.
158. da Costa, F.V. Genetic variability in *Microsporum canis* isolated from cats, dogs and humans in Brazil / F.V. da Costa, M.R. Farias, D. Bier [et al.] // Mycoses. – 2013. – Vol. 56, № 5. – P. 582-588.
159. de Hoog, G.S. Atlas of Clinical Fungi 2009.05 / G.S. de Hoog, J. Guarro, J. Gené, M.J. Figueras. URL: <http://atlas-of-clinical-fungi-2009-05.updatestar.com/>
160. del Boz-Gonzalez, J. Tinea capitis: trends in Spain / J. del Boz-Gonzalez // Actas Dermo-Sifiliografic. – 2012. – Vol. 103, № 4. – P. 288-293.
161. Denning, D.W. Fungal nail disease: a guide to good practice (report of a Working Group of the British Society for Medical Mycology) / D.W. Denning, E.G. Evans, C.C. Kibbler [et al.] // BMJ. – 1995. – Vol. 311, № 7015. – P. 1277-1281.
162. Dias, M.F. Update on therapy for superficial mycoses: review article part I / M.F. Dias, M.V. Quaresma-Santos, F. Bernardes-Filho [et al.] // An. Brasil. Dermatol. – 2013. – Vol. 88, № 5. – P. 764-774.
163. Diogo, H.C. Evaluation of the disk-diffusion method to determine the in vitro efficacy of terbinafine against subcutaneous and superficial mycoses agents / H.C. Diogo, M. Melhem, A. Sarpieri, M.C. Pires // An. Brasil. Dermatol. – 2010. – Vol. 85, № 3. – P. 324-330.

164. Elewski, B.E. Diagnostic techniques for confirming onychomycosis / B.E. Elewski // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 1996. – Vol. 35, № 3. – P. 56-59.
165. El-Khalawany, M. A multicenter clinicomycological study evaluating the spectrum of adult tinea capitis in Egypt / M. El-Khalawany, D. Shaaban, H. Hassan [et al.] // *Acta Dermatovenerol. Alp. Pannonica Adriat.* – 2013. – Vol. 22, № 4. – P. 77-82.
166. Elmaataoui, A. Tinea capitis etiology in Ibn Sina Hospital in Rabat (Morocco) / A. Elmaataoui, Z. Zeroual, M. Lyagoubi, S. Aoufi // *J. Mycol. Med.* – 2012. – Vol. 22, № 3. – P. 261-264.
167. Estela Cubells, J.R. Tinea capitis / J.R. Estela Cubells, V. Alegre de Miquel // *Med. Clin.* – 2013. – Vol. 141, № 8. – P. 215.
168. Friedlander, S.F. The evolving role of itraconazole, fluconazole and terbinafine in the treatment of tinea capitis / S.F. Friedlander // *Pediat. Inf. Dis. J.* – 1999. – Vol. 18. – P. 205-210.
169. Frymus, T. Dermatophytosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management / T. Frymus, T. Gruffydd-Jones, M.G. Pennisi[et al.] // *J. Feline Med. Surg.* – 2013. – Vol. 15, № 7. – P. 598-604.
170. Garcia-Martos, P. Dermatophytoses due to anthropophilic fungi in Cadiz, Spain, between 1997 and 2008, Spanish / P. Garcia-Martos, L. Garcia-Agudo, E. Agudo-Perez [et al.] // *Actas Dermo-Sifiliograficas.* – 2010. – Vol. 101, № 3. – P. 242-247.
171. Garnica, M. Difficult mycoses of the skin: advances in the epidemiology and management of eumycetoma, phaeohyphomycosis and chromoblastomycosis / M. Garnica, M. Nucci, F. Queiroz-Telles // *Curr. Opin. Infect. Dis.* – 2009. – Vol. 22, № 6. – P. 559-563.
172. Grover, C. Onychomycosis: newer insights in pathogenesis and diagnosis / C. Grover, A. Khurana // *Ind. J. Dermatol. Venereol. Leprol.* – 2012. – Vol. 78, № 3. – P. 263-270.
173. Gupta, A.K. Diagnosing onychomycosis / A.K. Gupta, F.C. Simpson // *Clin. Dermatol.* – 2013. – Vol. 31, № 5. – P. 540-543.

174. Gutzmer, R. Rapid identification and differentiation of fungal DNA in dermatological specimens by Light Cycler PCR / R. Gutzmer, S. Mommert, U. Kuttler [et al.] // J. Med. Microbiol. – 2004. – Vol. 53, pt. 12. – P. 1207-1214.
175. Haghani, I. Comparison of diagnostic methods in the evaluation of onychomycosis / I. Haghani, T. Shokohi, Z. Hajheidari [et al.] // Mycopathologia. – 2013. – Vol. 175, № 3-4. – P. 315-321.
176. Halmy, K. *Microsporium* infection in Hajdu-Bihar County, Hungarian / K. Halmy // Orvosi Hetilap. – 1997. – Vol. 138, № 21. – P. 1329-1332.
177. Hashemi, S.J. Onychomycosis in Tehran: mycological study of 504 patients / S.J. Hashemi, M. Gerami, E. Zibafar [et al.] // Mycoses. – 2010. – Vol. 53, № 3. – P. 251-255.
178. Hay, R.J. Onychomycosis: a proposed revision of the clinical classification / R.J. Hay, R. Baran // J. Am. Acad. Dermatol. – 2011. – Vol. 65, № 6. – P. 1219-1227.
179. Hernandez-Bel, P. Comma hairs: a new dermoscopic marker for tinea capitis / P. Hernandez-Bel, J. Malveyh, A. Crocker [et al.] // Actas Dermo-Sifiliograficas. – 2012. – Vol. 103, № 9. – P. 836-837.
180. Hof, H. Mycoses in the elderly / H. Hof // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2010. – Vol. 29, № 1. – P. 5-13.
181. Jung, H.J. Identification of dermatophytes by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of metalloproteinase-1 / H.J. Jung, S.Y. Kim, J.W. Jung [et al.] // Ann. Dermatol. – 2014. – Vol. 26, № 3. – P. 338-342.
182. Kakourou, T. Guidelines for the management of tinea capitis in children / T. Kakourou, U. Uksal // Pediatr. Dermatol. – 2010. – Vol. 27, № 3. – P. 226-228.
183. Kamei, K. Clinical problems that come with mycoses brought in from foreign countries / K. Kamei // Med. Mycol. J. – 2012. – Vol. 53, № 2. – P. 103-108.
184. Kane, J. Laboratory handbook of dermatophytes: a clinical guide and laboratory handbook of dermatophytes and other filamentous fungi from skin, hair, and nails / J. Kane. – Belmont, C.A., 1997. – 344 p.

185. Kastelan, M. Dermatophyte Infections in Primorsko-Goranska County, Croatia: a 21-year Survey / M. Kastelan, V. Utjesinovic-Gudelj, L. Prpic-Massari, I. Brajac // *Acta Dermatovenerol. Croat.* – 2014. – Vol. 22, № 3. – P. 175-179.
186. Kobayashi, H. Tinea Corporis and Tinea Pedis / H. Kobayashi // *Med. Mycol. J.* – 2011. – Vol. 52, № 3. – P. 177-181.
187. Koshnick, R.L. Use of diagnostic tests by dermatologists, podiatrists and family practitioners in the United States: pilot data, from a cross-sectional survey / R.L. Koshnick, K.K. Lilly, K. St. Clair [et al.] // *Mycoses.* – 2007. – Vol. 50, № 6. – P. 463-469.
188. Kriengkauykiat, J. Epidemiology and treatment approaches in management of invasive fungal infections / J. Kriengkauykiat, J.I. Ito, S.S. Dadwal // *Clin. Epidemiol.* – 2011. – № 3. – P. 175-191.
189. Leite Jr., D.P. Dermatophytosis in military in the central—west region of Brazil: literature review / D.P. Leite Jr., J.V. Amadio, A. Simoes Sde [et al.] // *Mycopathologia.* – 2014. – Vol. 177, № 1-2. – P. 65-74.
190. Li, X.F. Direct detection and differentiation of causative fungi of onychomycosis by multiplex polymerase chain reaction-based assay / X.F. Li, W. Tian, H. Wang [et al.] // *Eur. J. Dermatol.* – 2011. – Vol. 21, № 1. – P. 37-42.
191. Lilly, K.K. Cost-effectiveness of diagnostic tests for toe nail onychomycosis: a repeated-measure, single-linded, cross-sectional evaluation of 7 diagnostic tests / K.K. Lilly, R.L. Koshnick, J.P. Grill [et al.] // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 2006. – Vol. 55, № 4. – P. 620—626.
192. Litz, C.E. Polymerase chain reaction in the diagnosis of onychomycosis: a large, single-institute study / C.E. Litz, R.Z. Cavagnolo // *Br. J. Dermatol.* – 2010. – Vol. 163, № 3. – P. 511-4.
193. Lopez-Martinez, R. Dynamics of dermatophytosis frequency in Mexico: an analysis of 2084 cases / R. Lopez-Martinez, P. Manzano-Gayosso, F. Hernandez-Hernandez [et al.] // *Med. Mycol.* – 2010. – Vol. 48, № 3. – P. 476-479.
194. Machouart-Dubach, M. Rapid discrimination among dermatophytes, *Scytalidium* spp., and other fungi with a PCR-estricion fragment length polymorphism

- ribotyping method / M. Machouart-Dubach, C. Lacroix, M.F. de Chauvin [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2001. – Vol. 39, № 2. – P. 685-690.
195. Macura, A.B. Dermatophyte species in superficial mycoses in the Krakow district, Poland in the years 1972-2007 / A.B. Macura, P. Krzysciak, M. Skora, A. Gniadek // Mycoses. – 2010. – Vol. 53, № 2. – P. 148-152.
196. Mahmoud, A.L. A study of dermatophytoses in Sana'a, Yemen Republic / A.L. Mahmoud // Mycoses. – 2002. – Vol. 45, № 3-4. – P. 105-108.
197. Manual of Clinical Microbiology / American Society for Microbiology. – 8-th ed.- Washington D.C., 1991. – 1364 p.
198. Mapelli, E.T. Tinea capitis in the paediatric population in Milan, Italy: the emergence of *Trichophyton violaceum* / E.T. Mapelli, A. Cerri, C. Bombonato, S. Menni // Mycopathologia. – 2013. – Vol. 176, № 3-4. – P. 243-6.
199. Maraki, S. A 7-year survey of dermatophytoses in Crete, Greece / S. Maraki, E. Nioti, E. Mantadakis, Y. Tselentis // Mycoses. – 2007. – Vol. 50, № 6. – P. 481-484.
200. Mayo, T.T. Putting onychomycosis under the microscope / T.T. Mayo, W. Cantrell // Nurse Pract. – 2014. – Vol. 39, № 5. – P. 8-11.
201. McPherson, M.E. High prevalence of tinea capitis in newly arrived migrants at an English-language school, Melbourne, 2005 / M.E. McPherson, A.J. Woodgyer, K. Simpson, A.H. Chong // Med. J. Aust. – 2008. – Vol. 189, № 1. – P. 13-16.
202. Millikan, L.E. Current concepts in systemic and topical therapy for superficial mycoses / L.E. Millikan // Clin. Dermatol. – 2010. – Vol. 28, № 2. – P. 212-216.
203. Miyajima, Y. Rapid real-time diagnostic PCR for *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* in patients with tinea unguium and tinea pedis using specific fluorescent probes / Y. Miyajima, K. Satoh, T. Uchida [et al.] // J. Dermatol. Sci. – 2013. – Vol. 69, № 3. – P. 229-235.
204. Moretti, A. Epidemiological aspects of dermatophyte infections in horses and cattle / A. Moretti, L. Boncio, P. Pasquali, D.P. Fioretti // Zentralbl. Fuer Veterinaermedizin Reihe B. – 1998. – Bd. 45, № 4. – P. 205-208.

205. Naseri, A. Tinea capitis due to *Microsporum vanbreuseghemii*: report of two cases / A. Naseri, A. Fata, A.R. Khosravi // *Mycopathologia*. – 2012. – Vol. 174, № 1. – P. 77-80.
206. Ndiaye, D. Dermatophytosis diagnosed at the laboratory of parasitology and mycology of Le Dantec Hospital in Dakar between 2007 and 2011 / D. Ndiaye, M. Ndiaye, A. Badiane [et al.] // *J. Mycol. Med.* – 2013. – Vol. 23, № 4. – P. 219-224.
207. Neri, I. Corkscrew hair: a trichoscopy marker of tinea capitis in an adult white patient / I. Neri, M. Starace, A. Patrizi, R. Balestri // *JAMA Dermatol.* – 2013. – Vol. 149, № 8. – P. 990-1001.
208. Nowicki, R. Dermatophytoses in the Gdansk area, Poland: a 12-year survey / R. Nowicki // *Mycoses*. – 1996. – Vol. 39, № 9-10. – P. 399-402.
209. Nweze, E.I. Dermatophytosis among children of Fulani/Hausa herdsman living in southeastern Nigeria / E.I. Nweze // *Rev. Iberoam. Micol.* – 2010. – Vol. 27, № 4. – P. 191-194.
210. O'Gorman, S.M. An uncommon dermatophyte infection: two cases of cutaneous infection with *Trichophyton verrucosum* / S.M. O'Gorman, D. Britton, P. Collins // *Clin. Exp. Dermatol.* – 2014. – Vol. 40, № 4. – P. 395-8.
211. Pankewitz, F. Development of a novel polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Trichophyton rubrum* onychomycosis / F. Pankewitz, P. Nenoff, S. Uhrlass [et al.] // *Br. J. Dermatol.* – 2013. – Vol. 168, № 6. – P. 1236-1242.
212. Park, B.C. Molecular identification of mycologic correlation in patients with concomitant tinea pedis and tinea manuum infection / B.C. Park, S.J. Lee, W. Kim do [et al.] // *Arch. Dermatol.* – 2009. – Vol. 145, № 2. – P. 205-207.
213. Patel, G.A. Tinea capitis: still an unsolved problem? / G.A. Patel, R.A. Schwartz // *Mycoses*. – 2011. – Vol. 54, № 3. – P. 183-188.
214. Pinheiro, A.M. Dermoscopy findings in tinea capitis: case report and literature review / A.M. Pinheiro, L.A. Lobato, T.C. Varella // *An. Brasil. Dermatol.* – 2012. – Vol. 87, № 2. – P. 313-314.

215. Rallis, E. *Microsporum canis* tinea capitis in a centenarian patient / E. Rallis, E. Koumantaki-Mathioudaki, H. Papadogeorgakis // *Ind. J. Dermatol. Venereol. Leprol.* – 2011. – Vol. 77, № 5. – P. 626.
216. Rassai, S. Some epidemiological aspects of dermatophyte infections in Southwest Iran / S. Rassai, A. Feily, N. Sina, F. Derakhshanmehr // *Acta Dermatovenerol. Croatica.* – 2011. – Vol. 19, № 1. – P. 13-15.
217. Relloso, S. Onychomycosis: multicentre epidemiological, clinical and mycological study / S. Relloso, A. Arechavala, L. Guelfand [et al.] // *Rev. Iberoam. Micol.* – 2012. – Vol. 29, № 3. – P. 157-163.
218. Rezust, A. Tinea capitis caused by *Trichophyton soudanense* and *Microsporum audouinii* in an adult: a case report / A. Rezusta, A. Betran, I. Querol [et al.] // *Mycoses.* – 2011. – Vol. 54, № 1. – P. 89-90.
219. Richert, B. Differential diagnosis of onychomycosis / B. Richert, M.L. Cappelletti, J. Andre // *Rev. Med. Bruxelles.* – 2011. – Bd. 32, № 4. – P. 219-223.
220. Sabadin, C.S. Onychomycosis and tinea pedis in athletes from the State of Rio Grande Do Sul (Brazil): a cross-sectional study / C.S. Sabadin, S.A. Benvegnu, M.M. da Fontoura [et al.] // *Mycopathologia.* – 2011. – Vol. 171, № 3. – P. 183-189.
221. Sakae, H. Analysis of 25 cases of *Microsporum canis* infection encountered at a dermatology clinic in Kumamoto during a recent 3-year period / H. Sakae, H. Noguchi, Y. Ichinokawa, M. Hiruma // *Med. Mycol. J.* – 2011. – Vol. 52, № 2. – P. 139-144.
222. Sandoval, A.B. Dermoscopic pattern in tinea capitis / A.B. Sandoval, J.A. Ortiz, J.M. Rodriguez [et al.] // *Rev. Iberoam. Micol.* – 2010. – Vol. 27, № 3. – P. 151-152.
223. Scher, R.K. The epidemiology, etiology, and pathophysiology of onychomycosis / R.K. Scher, P. Rich, D. Pariser, B. Elewski // *Semin. Cutan. Med. Surg.* – 2013. – Vol. 32, № 2. – P. 52-54.
224. Sehgal, V.N. Onychomycosis: an Asian perspective / V.N. Sehgal, G. Srivastava, S. Dogra [et al.] // *SKINmed.* – 2010. – Vol. 8, № 1. – P. 37-45.

225. Seker, E. Isolation of dermatophytes from dogs and cats with suspected dermatophytosis in Western Turkey / E. Seker, N. Dogan // *Prevent. Vet. Med.* – 2011. – Vol. 98, № 1. – P. 46-51.
226. Singal, A. Onychomycosis: Diagnosis and management / A. Singal, D. Khanna // *Ind. J. Dermatol. Venereol. Leprol.* – 2011. – Vol. 77, № 6. – P. 659-672.
227. Skerlev, M. An intriguing and unusual clinical manifestation of *Microsporum canis* infection / M. Skerlev, N. Cerjak, S. Murat-Susic [et al.] // *Acta Dermatovenereol. Croat.* – 1996. – Vol. 4. – P. 117-120.
228. Tchernev, G. Onychomycosis: modern diagnostic and treatment approaches / G. Tchernev, P.K. Penev, P. Nenoff [et al.] // *Wiener Med. Wochensch.* – 2013. – Vol. 163, № 1-2. – P. 10-12.
229. Tsoumani, M. Changes of dermatophytoses in southwestern Greece: an 18-year survey / M. Tsoumani, E. Jelastopulu, C. Bartzavali [et al.] // *Mycopathologia.* – 2011. – Vol. 172, № 1. – P. 63-7.
230. Turin, L. Fast, simple and highly sensitive double-rounder polymerase chain reaction assay to detect medically relevant fungi dermatological specimens / L. Turin, P. Riva, G. Galbiati, T. Cainelli // *Eur. J. Clin. Invest.* – 2000. – Vol. 30, № 6. – P. 511-518.
231. Van Duyn Graham, L. Recent updates in oral terbinafine: its use in onychomycosis and tinea capitis in the US / L. Van Duyn Graham, B.E. Elewski // *Mycoses.* – 2011. – Vol. 54, № 6. – P. e679-85.
232. Vazquez-Lopez, F. Dermoscopic corkscrew hairs dissolve after successful therapy of *Trichophyton violaceum* tinea capitis: a case report / F. Vazquez-Lopez, L. Palacios-Garcia, G. Argenziano // *Austr. J. Dermatol.* – 2012. – Vol. 53, № 2. – P. 118-119.
233. Walling, H.W. Subclinical onychomycosis is associated with tinea pedis / H.W. Walling // *Br. J. Dermatol.* – 2009. – Vol. 161, № 4. – P. 746-749.
234. Winter, I. Molecular biological detection of dermatophytes in clinical samples when onychomycosis or tinea pedis is suspected. A prospective study comparing conventional dermatomycological diagnostics and polymerase chain reaction / I.

- Winter, S. Uhrlas, C. Kruger [et al.] // *Hautarzt*. – 2013. – Vol. 64, № 4. – P. 283-289.
235. Wojcik, A. Parasitoses and mycoses-still current public health hazards / A. Wojcik, J. Blaszkowska // *Ann. Parasitol.* – 2013. – Vol. 59, № 4. – P. 153-162.
236. Wong, S.S. Changing epidemiology of human mycoses-China and beyond / S.S. Wong, K.Y. Yuen // *Mycopathologia*. – 2011. – Vol. 171, № 6. – P. 383-386.
237. Worek, M. Identification of dermatophyte species using genomic in situ hybridization (GISH) / M. Worek, A. Kwiatkowska, A. Ciesielska [et al.] // *J. Microbiol. Methods*. – 2014. – Vol. 100. – P. 32-41.
238. Yang, C.Y. Direct identification of dermatophyte DNA from clinical specimens by a nested polymerase chain. Reaction assay / C.Y. Yang, T.L. Lin, T.Y. Tzung [et al.] // *Arch. Dermatol.* – 2007. – Vol. 143, № 6. – P. 799-800.
239. Yehia, M.A. The spectrum of fungal infections with a special reference to dermatophytoses in the capital area of Kuwait during 2000-2005: a retrospective analysis / M.A. Yehia, T.S. El-Ammawi, K.M. Al-Mazidi [et al.] // *Mycopathologia*. – 2010. – Vol. 169, № 4. – P. 241-246.
240. Yin, B. *Microsporum canis* infection in three familial cases with tinea capitis and tinea corporis / B. Yin, Y. Xiao, Y. Ran [et al.] // *Mycopathologia*. – 2013. – Vol. 176, № 3-4. – P. 259-265.
241. Zaraa, I. Inflammatory Tinea capitis: a 12-year study and a review of the literature / I. Zaraa, A. Hawilo, A. Aounallah [et al.] // *Mycoses*. – 2013. – Vol. 56, № 2. – P. 110-116.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А

Характеристика штаммов *Microsporium spp.*, использованных в работе

№ п/п	Штамм	Год выделения	Источник выделения	Место выделения
1	<i>M. canis</i> 5645/09	2009	человек (гладкая кожа)	Уфимский район
2	<i>M. canis</i> 5646/09	2009	человек (волосистая часть головы)	г. Туймазы
3	<i>M. canis</i> 5647/09	2009	человек (волосистая часть головы)	г. Сибай
4	<i>M. canis</i> 5648/09	2009	человек (гладкая кожа)	г. Сибай
5	<i>M. canis</i> 5649/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Нуримановский район
6	<i>M. canis</i> 5650/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Зианчуринский район
7	<i>M. canis</i> 5655/09	2009	человек (волосистая часть головы)	г. Бирск
8	<i>M. canis</i> 5659/09	2009	человек (волосистая часть головы)	г. Нефтекамск
9	<i>M. canis</i> 5663/09	2009	человек (гладкая кожа)	г. Уфа
10	<i>M. canis</i> 5669/09	2009	человек (волосистая часть головы)	г. Уфа

11	<i>M. canis</i> 5671/09	2009	человек (гладкая кожа)	Чишминский район
12	<i>M. canis</i> 5673/09	2009	человек (волосистая часть головы)	г. Туймазы
13	<i>M. canis</i> 5676/09	2009	человек (волосистая часть головы)	г. Бирск
14	<i>M. canis</i> 5681/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Чишминский район
15	<i>M. canis</i> 5682/09	2009	человек (гладкая кожа)	Бакалинский район
16	<i>M. canis</i> 5685/09	2009	человек (волосистая часть головы)	г. Янаул
17	<i>M. canis</i> 5688/09	2009	человек (гладкая кожа)	г. Баймак
18	<i>M. canis</i> 5691/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Калтасинский район
19	<i>M. canis</i> 5695/09	2009	человек (гладкая кожа)	Стерлибашевский район
20	<i>M. canis</i> 5697/09	2009	человек (волосистая часть головы)	г. Уфа
21	<i>M. canis</i> 5699/09	2009	человек (волосистая часть головы)	г. Ишимбай
22	<i>M. canis</i> 5701/09	2009	человек (волосистая часть головы)	г. Стерлитамак
23	<i>M. canis</i> 5706/09	2009	человек (гладкая кожа)	г. Давлеканово
24	<i>M. canis</i> 5710/09	2009	человек (гладкая кожа)	г. Уфа

25	<i>M. canis</i> 5713/09	2009	человек (волосистая часть головы)	г. Кумертау
26	<i>M. canis</i> 5717/09	2009	человек (волосистая часть головы)	г. Мелеуз
27	<i>M. canis</i> 5721/09	2009	человек (волосистая часть головы)	г. Ишимбай
28	<i>M. canis</i> 5723/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Хайбуллинский район
29	<i>M. canis</i> 5726/09	2009	человек (волосистая часть головы)	г. Мелеуз
30	<i>M. canis</i> 5727/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Уфимский район
31	<i>M. canis</i> 5730/09	2009	человек (гладкая кожа)	г. Благовещенск
32	<i>M. canis</i> 5735/09	2009	человек (волосистая часть головы)	г. Янаул
33	<i>M. canis</i> 5740/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Кугарчинский район
34	<i>M. canis</i> 5745/09	2009	человек (гладкая кожа)	Кигинский район
35	<i>M. canis</i> 5748/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Иглинский район
36	<i>M. canis</i> 5750/09	2009	человек (гладкая кожа)	г. Ишимбай
37	<i>M. canis</i> 5751/09	2009	человек (гладкая кожа)	Федоровский район
38	<i>M. canis</i> 5755/09	2009	человек (волосистая часть головы)	г. Уфа

39	<i>M. canis</i> 5757/09	2009	человек (гладкая кожа)	г. Кумертау
40	<i>M. canis</i> 5759/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Зианчуринский район
41	<i>M. canis</i> 5761/09	2009	человек (гладкая кожа)	Калтасинский район
42	<i>M. canis</i> 5763/09	2009	человек (волосистая часть головы)	г. Бирск
43	<i>M. canis</i> 5768/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Чекмагушевский район
44	<i>M. canis</i> 5775/09	2009	человек (гладкая кожа)	г. Стерлитамак
45	<i>M. canis</i> 5779/09	2009	человек (волосистая часть головы)	г. Уфа
46	<i>M. canis</i> 5784/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Хайбуллинский район
47	<i>M. canis</i> 5785/09	2009	человек (гладкая кожа)	г. Благовещенск
48	<i>M. canis</i> 5789/09	2009	человек (волосистая часть головы)	г. Бирск
49	<i>M. canis</i> 5791/09	2009	человек (гладкая кожа)	Чишминский район
50	<i>M. canis</i> 5793/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Кугарчинский район
51	<i>M. canis</i> 5799/09	2009	человек (гладкая кожа)	г. Салават
52	<i>M. canis</i> 5806/09	2009	человек (волосистая часть головы)	г. Ишимбай

53	<i>M. canis</i> 5815/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Кигинский район
54	<i>M. canis</i> 5822/09	2009	человек (волосистая часть головы)	г. Кумертау
55	<i>M. canis</i> 5823/09	2009	человек (гладкая кожа)	Зианчуринский район
56	<i>M. canis</i> 5647/10	2010	человек (гладкая кожа)	г. Уфа
57	<i>M. canis</i> 5649/10	2010	человек (волосистая часть головы)	г. Мелеуз
58	<i>M. canis</i> 5650/10	2010	человек (волосистая часть головы)	г. Янаул
59	<i>M. canis</i> 5651/10	2010	человек (гладкая кожа)	Иглинский район
60	<i>M. canis</i> 5652/10	2010	человек (волосистая часть головы)	г. Баймак
61	<i>M. canis</i> 5654/10	2010	человек (волосистая часть головы)	г. Стерлитамак
62	<i>M. canis</i> 5655/10	2010	человек (волосистая часть головы)	г. Стерлитамак
63	<i>M. canis</i> 5659/10	2010	человек (гладкая кожа)	Федоровский район
64	<i>M. canis</i> 5664/10	2010	человек (гладкая кожа)	Татышлинский район
65	<i>M. canis</i> 5669/10	2010	человек (волосистая часть головы)	г. Уфа
66	<i>M. canis</i> 5671/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Калтасинский район

67	<i>M. canis</i> 5674/10	2010	человек (волосистая часть головы)	г. Янаул
68	<i>M. canis</i> 5676/10	2010	человек (гладкая кожа)	Кугарчинский район
69	<i>M. canis</i> 5682/10	2010	человек (волосистая часть головы)	г. Бирск
70	<i>M. canis</i> 5686/10	2010	человек (волосистая часть головы)	г. Бирск
71	<i>M. canis</i> 5688/10	2010	человек (гладкая кожа)	г. Стерлитамак
72	<i>M. canis</i> 5691/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Уфимский район
73	<i>M. canis</i> 5696/10	2010	человек (волосистая часть головы)	г. Ишимбай
74	<i>M. canis</i> 5698/10	2010	человек (волосистая часть головы)	г. Благовещенск
75	<i>M. canis</i> 5702/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Зианчуринский район
76	<i>M. canis</i> 5707/10	2010	человек (гладкая кожа)	г. Кумертау
77	<i>M. canis</i> 5710/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Куюргазинский район
78	<i>M. canis</i> 5714/10	2010	человек (волосистая часть головы)	г. Баймак
79	<i>M. canis</i> 5715/10	2010	человек (гладкая кожа)	Чишминский район
80	<i>M. canis</i> 5718/10	2010	человек (гладкая кожа)	г. Бирск

81	<i>M. canis</i> 5721/10	2010	человек (волосистая часть головы)	г. Уфа
82	<i>M. canis</i> 5723/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Кигинский район
83	<i>M. canis</i> 5726/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Татышлинский район
84	<i>M. canis</i> 5728/10	2010	человек (гладкая кожа)	г. Ишимбай
85	<i>M. canis</i> 5730/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Нуримановский район
86	<i>M. canis</i> 5735/10	2010	человек (волосистая часть головы)	г. Уфа
87	<i>M. canis</i> 5741/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Зианчуринский район
88	<i>M. canis</i> 5745/10	2010	человек (гладкая кожа)	г. Благовещенск
89	<i>M. canis</i> 5748/10	2010	человек (волосистая часть головы)	г. Янаул
90	<i>M. canis</i> 5750/10	2010	человек (гладкая кожа)	г. Мелеуз
91	<i>M. canis</i> 5751/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Калтасинский район
92	<i>M. canis</i> 5756/10	2010	человек (волосистая часть головы)	г. Мелеуз
93	<i>M. canis</i> 5757/10	2010	человек (волосистая часть головы)	г. Мелеуз
94	<i>M. canis</i> 5759/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Кугарчинский район

95	<i>M. canis</i> 5761/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Зианчуринский район
96	<i>M. canis</i> 5765/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Уфимский район
97	<i>M. canis</i> 5768/10	2010	человек (волосистая часть головы)	г. Стерлитамак
98	<i>M. canis</i> 5557/11	2011	человек (гладкая кожа)	г. Ишимбай
99	<i>M. canis</i> 5559/11	2011	человек (гладкая кожа)	Иглинский район
100	<i>M. canis</i> 5564/11	2011	человек (волосистая часть головы)	г. Баймак
101	<i>M. canis</i> 5566/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Федоровский район
102	<i>M. canis</i> 5569/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Хайбуллинский район
103	<i>M. canis</i> 5572/11	2011	человек (гладкая кожа)	г. Кумертау
104	<i>M. canis</i> 5573/11	2011	человек (волосистая часть головы)	г. Салават
105	<i>M. canis</i> 5574/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Татышлинский район
106	<i>M. canis</i> 5675/11	2011	человек (гладкая кожа)	г. Благовещенск
107	<i>M. canis</i> 5677/11	2011	человек (гладкая кожа)	Чишминский район
108	<i>M. canis</i> 5681/11	2011	человек (гладкая кожа)	г. Янаул

109	<i>M. canis</i> 5684/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Уфимский район
110	<i>M. canis</i> 5686/11	2011	человек (волосистая часть головы)	г. Ишимбай
111	<i>M. canis</i> 5689/11	2011	человек (волосистая часть головы)	г. Уфа
112	<i>M. canis</i> 5691/11	2011	человек (гладкая кожа)	Кугарчинский район
113	<i>M. canis</i> 5697/11	2011	человек (волосистая часть головы)	г. Бирск
114	<i>M. canis</i> 5698/11	2011	человек (гладкая кожа)	Калтасинский район
115	<i>M. canis</i> 5699/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Уфимский район
116	<i>M. canis</i> 5704/11	2011	человек (гладкая кожа)	Зианчуринский район
117	<i>M. canis</i> 5708/11	2011	человек (волосистая часть головы)	г. Уфа
118	<i>M. canis</i> 5710/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Иглинский район
119	<i>M. canis</i> 5711/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Иглинский район
120	<i>M. canis</i> 5713/11	2011	человек (гладкая кожа)	г. Ишимбай
121	<i>M. canis</i> 5717/11	2011	человек (волосистая часть головы)	г. Стерлитамак
122	<i>M. canis</i> 5718/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Мелеузовский район

123	<i>M. canis</i> 5721/11	2011	человек (гладкая кожа)	Нуримановский район
124	<i>M. canis</i> 5723/11	2011	человек (волосистая часть головы)	г. Мелеуз
125	<i>M. canis</i> 5726/11	2011	человек (волосистая часть головы)	г. Баймак
126	<i>M. canis</i> 5729/11	2011	человек (гладкая кожа)	Уфимский район
127	<i>M. canis</i> 5730/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Кугарчинский район
128	<i>M. canis</i> 5734/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Кигинский район
129	<i>M. canis</i> 5741/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Федоровский район
130	<i>M. canis</i> 5747/11	2011	человек (волосистая часть головы)	г. Мелеуз
131	<i>M. canis</i> 5748/11	2011	человек (гладкая кожа)	Зианчуринский район
132	<i>M. canis</i> 5750/11	2011	человек (волосистая часть головы)	г. Бирск
133	<i>M. canis</i> 5751/11	2011	человек (волосистая часть головы)	г. Ишимбай
134	<i>M. canis</i> 5753/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Иглинский район
135	<i>M. canis</i> 5758/11	2011	человек (волосистая часть головы)	г. Янаул
136	<i>M. canis</i> 5759/11	2011	человек (гладкая кожа)	г. Кумертау

137	<i>M. canis</i> 5761/11	2011	человек (волосистая часть головы)	г. Уфа
138	<i>M. canis</i> 5762/11	2011	человек (волосистая часть головы)	г. Уфа
139	<i>M. canis</i> 5768/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Татышлинский район
140	<i>M. canis</i> 5559/12	2012	человек (гладкая кожа)	Чекмагушевский район
141	<i>M. canis</i> 5562/12	2012	человек (волосистая часть головы)	г. Уфа
142	<i>M. canis</i> 5566/12	2012	человек (волосистая часть головы)	г. Баймак
143	<i>M. canis</i> 5569/12	2012	человек (волосистая часть головы)	г. Стерлитамак
144	<i>M. canis</i> 5572/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Чишминский район
145	<i>M. canis</i> 5574/12	2012	человек (гладкая кожа)	г. Мелеуз
146	<i>M. canis</i> 5675/12	2012	человек (волосистая часть головы)	г. Кумертау
147	<i>M. canis</i> 5677/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Кугарчинский район
148	<i>M. canis</i> 5682/12	2012	человек (волосистая часть головы)	г. Уфа
149	<i>M. canis</i> 5686/12	2012	человек (гладкая кожа)	г. Баймак
150	<i>M. canis</i> 5689/12	2012	человек (гладкая кожа)	Иглинский район

151	<i>M. canis</i> 5696/12	2012	человек (волосистая часть головы)	г. Ишимбай
152	<i>M. canis</i> 5697/12	2012	человек (волосистая часть головы)	г. Дюртюли
153	<i>M. canis</i> 5698/12	2012	человек (волосистая часть головы)	г. Кумертау
154	<i>M. canis</i> 5699/12	2012	человек (гладкая кожа)	Уфимский район
155	<i>M. canis</i> 5704/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Федоровский район
156	<i>M. canis</i> 5710/12	2012	человек (волосистая часть головы)	г. Бирск
157	<i>M. canis</i> 5711/12	2012	человек (гладкая кожа)	Нуримановский район
158	<i>M. canis</i> 5714/12	2012	человек (волосистая часть головы)	г. Стерлитамак
159	<i>M. canis</i> 5717/12	2012	человек (волосистая часть головы)	г. Ишимбай
160	<i>M. canis</i> 5719/12	2012	человек (волосистая часть головы)	г. Ишимбай
161	<i>M. canis</i> 5724/12	2012	человек (гладкая кожа)	г. Уфа
162	<i>M. canis</i> 5726/12	2012	человек (гладкая кожа)	Чишминский район
163	<i>M. canis</i> 5731/12	2012	человек (волосистая часть головы)	г. Янаул
164	<i>M. canis</i> 5734/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Зианчуринский район

165	<i>M. canis</i> 5745/12	2012	человек (гладкая кожа)	г. Бирск
166	<i>M. canis</i> 5749/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Татышлинский район
167	<i>M. canis</i> 5751/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Уфимский район
168	<i>M. canis</i> 5752/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Уфимский район
169	<i>M. canis</i> 5753/12	2012	человек (гладкая кожа)	г. Мелеуз
170	<i>M. canis</i> 5755/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Чекмагушевский район
171	<i>M. canis</i> 5759/12	2012	человек (волосистая часть головы)	г. Благовещенск
172	<i>M. canis</i> 5760/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Куюргазинский район
173	<i>M. canis</i> 5762/12	2012	человек (волосистая часть головы)	г. Дюртюли
174	<i>M. canis</i> 5769/12	2012	человек (волосистая часть головы)	г. Стерлитамак
175	<i>M. canis</i> 5772/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Нуримановский район
176	<i>M. canis</i> 5778/12	2012	человек (гладкая кожа)	г. Салават
177	<i>M. canis</i> 5781/12	2012	человек (гладкая кожа)	г. Ишимбай
178	<i>M. canis</i> 5789/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Чишминский район

179	<i>M. canis</i> 5806/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Кигинский район
180	<i>M. canis</i> 5810/12	2012	человек (волосистая часть головы)	г. Кумертау
181	<i>M. canis</i> 5811/12	2012	человек (волосистая часть головы)	г. Кумертау
182	<i>M. canis</i> 5819/12	2012	человек (гладкая кожа)	Уфимский район
183	<i>M. canis</i> 5822/12	2012	человек (волосистая часть головы)	г. Стерлитамак
184	<i>M. canis</i> 5825/12	2012	человек (волосистая часть головы)	г. Баймак
185	<i>M. canis</i> 5829/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Кугарчинский район
186	<i>M. canis</i> 5831/12	2012	человек (волосистая часть головы)	г. Мелеуз
187	<i>M. canis</i> 5835/12	2012	человек (гладкая кожа)	г. Благовещенск
188	<i>M. canis</i> 5837/12	2012	человек (гладкая кожа)	г. Кумертау
189	<i>M. canis</i> 5841/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Уфимский район
190	<i>M. canis</i> 5845/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Иглинский район
191	<i>M. canis</i> 5846/12	2012	человек (волосистая часть головы)	г. Янаул
192	<i>M. canis</i> 5538/12	2013	человек (волосистая часть головы)	г. Баймак

193	<i>M. canis</i> 5565/13	2013	человек (волосистая часть головы)	г. Дюртюли
194	<i>M. canis</i> 5569/13	2013	человек (волосистая часть головы)	г. Мелеуз
195	<i>M. canis</i> 5574/13	2013	человек (гладкая кожа)	Нуримановский район
196	<i>M. canis</i> 5679/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Кугарчинский район
197	<i>M. canis</i> 5681/13	2013	человек (волосистая часть головы)	г. Ишимбай
198	<i>M. canis</i> 5685/13	2013	человек (гладкая кожа)	г. Кумертау
199	<i>M. canis</i> 5686/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Татышлинский район
200	<i>M. canis</i> 5689/13	2013	человек (волосистая часть головы)	г. Салават
201	<i>M. canis</i> 5695/13	2013	человек (волосистая часть головы)	г. Уфа
202	<i>M. canis</i> 5697/13	2013	человек (волосистая часть головы)	г. Мелеуз
203	<i>M. canis</i> 5698/13	2013	человек (гладкая кожа)	Зианчуринский район
204	<i>M. canis</i> 5699/13	2013	человек (волосистая часть головы)	г. Янаул
205	<i>M. canis</i> 5705/13	2013	человек (волосистая часть головы)	г. Стерлитамак
206	<i>M. canis</i> 5708/13	2013	человек (гладкая кожа)	г. Кумертау

207	<i>M. canis</i> 5710/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Кигинский район
208	<i>M. canis</i> 5713/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Хайбуллинский район
209	<i>M. canis</i> 5715/13	2013	человек (волосистая часть головы)	г. Уфа
210	<i>M. canis</i> 5718/13	2013	человек (гладкая кожа)	Куюргазинский район
211	<i>M. canis</i> 5721/13	2013	человек (волосистая часть головы)	г. Дюртюли
212	<i>M. canis</i> 5724/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Чекмагушевский район
213	<i>M. canis</i> 5726/13	2013	человек (гладкая кожа)	г. Кумертау
214	<i>M. canis</i> 5729/13	2013	человек (гладкая кожа)	г. Баймак
215	<i>M. canis</i> 5734/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Федоровский район
216	<i>M. canis</i> 5741/13	2013	человек (волосистая часть головы)	г. Благовещенск
217	<i>M. canis</i> 5745/13	2013	человек (волосистая часть головы)	г. Стерлитамак
218	<i>M. canis</i> 5749/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Иглинский район
219	<i>M. canis</i> 5750/13	2013	человек (волосистая часть головы)	г. Янаул
220	<i>M. canis</i> 5751/13	2013	человек (гладкая кожа)	Уфимский район

221	<i>M. canis</i> 5755/13	2013	человек (волосистая часть головы)	г. Салават
222	<i>M. canis</i> 5758/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Нуримановский район
223	<i>M. canis</i> 5759/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Нуримановский район
224	<i>M. canis</i> 5768/13	2013	человек (волосистая часть головы)	г. Янаул
225	<i>M. canis</i> 5811/13	2013	человек (гладкая кожа)	г. Баймак
226	<i>M. canis</i> 5814/13	2013	человек (волосистая часть головы)	г. Ишимбай
227	<i>M. canis</i> 5815/13	2013	человек (волосистая часть головы)	г. Стерлитамак
228	<i>M. canis</i> 5818/13	2013	человек (волосистая часть головы)	г. Мелеуз
229	<i>M. canis</i> 5821/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Зианчуринский район
230	<i>M. canis</i> 5823/13	2013	человек (волосистая часть головы)	г. Янаул
231	<i>M. canis</i> 5826/13	2013	человек (гладкая кожа)	Калтасинский район
232	<i>M. canis</i> 5828/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Кигинский район
233	<i>M. canis</i> 5830/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Федоровский район
234	<i>M. canis</i> 5835/13	2013	человек (волосистая часть головы)	г. Баймак

235	<i>M. canis</i> 5841/13	2013	человек (волосистая часть головы)	г. Баймак
236	<i>M. canis</i> 5845/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Уфимский район
237	<i>M. canis</i> 5848/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Иглинский район
238	<i>M. canis</i> 5850/13	2013	человек (волосистая часть головы)	г. Кумертау
239	<i>M. canis</i> 5851/13	2013	человек (волосистая часть головы)	г. Благовещенск
240	<i>M. canis</i> 5859/13	2013	человек (гладкая кожа)	г. Стерлитамак
241	<i>M. canis</i> 5861/13	2013	человек (волосистая часть головы)	г. Уфа
242	<i>M. canis</i> 5865/13	2013	человек (волосистая часть головы)	г. Благовещенск
243	<i>M. canis</i> 5873/13	2013	человек (волосистая часть головы)	г. Бирск
244	<i>M. canis</i> 5879/13	2013	человек (волосистая часть головы)	г. Уфа

Приложение Б

Характеристика штаммов *Trichophyton spp.*, использованных в работе

№ п/п	Штамм	Год выделения	Источник выделения	Место выделения
1	<i>T. mentagrophytes</i> 1012/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Мечетлинский район
2	<i>T. mentagrophytes</i> 1019/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Мелеузовский район
3	<i>T. mentagrophytes</i> 1022/09	2009	человек (гладкая кожа)	г. Мелеуз
4	<i>T. mentagrophytes</i> 1031/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Татышлинский район
5	<i>T. mentagrophytes</i> 1035/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Зилаирский район
6	<i>T. mentagrophytes</i> 1037/09	2009	человек (гладкая кожа)	Зианчуринский район
7	<i>T. mentagrophytes</i> 1050/09	2009	человек (гладкая кожа)	Чишминский район
8	<i>T. mentagrophytes</i> 1060/09	2009	человек (гладкая кожа)	Нуримановский район
9	<i>T. mentagrophytes</i> 1065/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Татышлинский район
10	<i>T. mentagrophytes</i> 1071/09	2009	человек (гладкая кожа)	Илишевский район
11	<i>T. mentagrophytes</i> 1073/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Хайбуллинский район
12	<i>T. mentagrophytes</i> 1085/09	2009	человек (гладкая кожа)	Ермекеевский район

13	<i>T. mentagrophytes</i> 1086/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Мелеузовский район
14	<i>T. mentagrophytes</i> 1118/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Шаранский район
15	<i>T. mentagrophytes</i> 1125/09	2009	человек (гладкая кожа)	Зилаирский район
16	<i>T. mentagrophytes</i> 1127/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Куюргазинский район
17	<i>T. mentagrophytes</i> 1129/09	2009	человек (гладкая кожа)	Чекмагушевский район
18	<i>T. mentagrophytes</i> 1130/09	2009	человек (гладкая кожа)	Нуримановский район
19	<i>T. mentagrophytes</i> 1134/09	2009	человек (гладкая кожа)	Чишминский район
20	<i>T. mentagrophytes</i> 1139/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Чишминский район
21	<i>T. mentagrophytes</i> 1141/09	2009	человек (волосистая часть головы)	г. Ишимбай
22	<i>T. mentagrophytes</i> 1146/09	2009	человек (гладкая кожа)	Мелеузовский район
23	<i>T. mentagrophytes</i> 1149/09	2009	человек (гладкая кожа)	Ермекеевский район
24	<i>T. mentagrophytes</i> 1155/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Буздякский район
25	<i>T. mentagrophytes</i> 1168/09	2009	человек (гладкая кожа)	Уфимский район
26	<i>T. mentagrophytes</i> 1177/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Аургазинский район

27	<i>T. mentagrophytes</i> 1179/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Куюргазинский район
28	<i>T. mentagrophytes</i> 1188/09	2009	человек (гладкая кожа)	Чишминский район
29	<i>T. mentagrophytes</i> 1194/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Мелеузовский район
30	<i>T. mentagrophytes</i> 1228/09	2009	человек (гладкая кожа)	Аургазинский район
31	<i>T. mentagrophytes</i> 1249/09	2009	человек (гладкая кожа)	Татышлинский район
32	<i>T. mentagrophytes</i> 1276/09	2009	человек (гладкая кожа)	Салаватский район
33	<i>T. mentagrophytes</i> 1281/09	2009	человек (гладкая кожа)	Зианчуринский район
34	<i>T. mentagrophytes</i> 7062/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Мелеузовский район
35	<i>T. verrucosum</i> 1004/09	2009	человек (гладкая кожа)	Чекмагушевский район
36	<i>T. verrucosum</i> 1006/09	2009	человек (гладкая кожа)	Зианчуринский район
37	<i>T. verrucosum</i> 1009/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Аургазинский район
38	<i>T. verrucosum</i> 1011/09	2009	человек (гладкая кожа)	Чишминский район
39	<i>T. verrucosum</i> 1016/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Хайбуллинский район
40	<i>T. verrucosum</i> 1020/09	2009	человек (гладкая кожа)	Татышлинский район

41	<i>T. verrucosum</i> 1024/09	2009	человек (гладкая кожа)	Нуримановский район
42	<i>T. verrucosum</i> 1025/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Салаватский район
43	<i>T. verrucosum</i> 1030/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Архангельский район
44	<i>T. verrucosum</i> 1033/09	2009	человек (гладкая кожа)	Благоварский район
45	<i>T. verrucosum</i> 1038/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Уфимский район
46	<i>T. verrucosum</i> 1039/09	2009	человек (гладкая кожа)	Зианчуринский район
47	<i>T. verrucosum</i> 1047/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Зианчуринский район
48	<i>T. verrucosum</i> 1052/09	2009	человек (гладкая кожа)	Зианчуринский район
49	<i>T. verrucosum</i> 1059/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Уфимский район
50	<i>T. verrucosum</i> 1075/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Зилаирский район
51	<i>T. verrucosum</i> 1081/09	2009	человек (гладкая кожа)	Чекмагушевский район
52	<i>T. verrucosum</i> 1083/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Зианчуринский район
53	<i>T. verrucosum</i> 1099/09	2009	человек (гладкая кожа)	Краснокаменски й район
54	<i>T. verrucosum</i> 1209/09	2009	человек (гладкая кожа)	Шаранский район

55	<i>T. verrucosum</i> 1219/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Дуванский район
56	<i>T. verrucosum</i> 1230/09	2009	человек (гладкая кожа)	Ермекеевский район
57	<i>T. verrucosum</i> 1239/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Мечетлинский район
58	<i>T. verrucosum</i> 1245/09	2009	человек (гладкая кожа)	Уфимский район
59	<i>T. verrucosum</i> 1254/09	2009	человек (гладкая кожа)	Нуримановский район
60	<i>T. verrucosum</i> 1259/09	2009	человек (гладкая кожа)	Кугарчинский район
61	<i>T. verrucosum</i> 1266/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Нуримановский район
62	<i>T. verrucosum</i> 1274/09	2009	человек (гладкая кожа)	Уфимский район
63	<i>T. verrucosum</i> 1278/09	2009	человек (гладкая кожа)	Стерлитамакски й район
64	<i>T. verrucosum</i> 1279/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Чишминский район
65	<i>T. verrucosum</i> 1285/09	2009	человек (гладкая кожа)	Буздякский район
66	<i>T. verrucosum</i> 7059/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Дуванский район
67	<i>T. verrucosum</i> 7063/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Илишевский район
68	<i>T. verrucosum</i> 7065/09	2009	человек (гладкая кожа)	Илишевский район

69	<i>T. verrucosum</i> 7071/09	2009	человек (гладкая кожа)	Татышлинский район
70	<i>T. verrucosum</i> 7075/09	2009	человек (волосистая часть головы)	Салаватский район
71	<i>T. mentagrophytes</i> 1065/10	2010	человек (гладкая кожа)	Зианчуринский район
72	<i>T. mentagrophytes</i> 1070/10	2010	человек (гладкая кожа)	Мечетлинский район
73	<i>T. mentagrophytes</i> 1081/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Хайбуллинский район
74	<i>T. mentagrophytes</i> 1093/10	2010	человек (гладкая кожа)	Нуримановский район
75	<i>T. mentagrophytes</i> 1099/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Гафурийский район
76	<i>T. mentagrophytes</i> 1104/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Уфимский район
77	<i>T. mentagrophytes</i> 1109/10	2010	человек (гладкая кожа)	Уфимский район
78	<i>T. mentagrophytes</i> 1115/10	2010	человек (гладкая кожа)	Мелеузовский район
79	<i>T. mentagrophytes</i> 1121/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Татышлинский район
80	<i>T. mentagrophytes</i> 1125/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Нуримановский район
81	<i>T. mentagrophytes</i> 1139/10	2010	человек (гладкая кожа)	Салаватский район
82	<i>T. mentagrophytes</i> 1148/10	2010	человек (гладкая кожа)	Кугарчинский район

83	<i>T. mentagrophytes</i> 1159/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Уфимский район
84	<i>T. mentagrophytes</i> 1161/10	2010	человек (гладкая кожа)	Ермекеевский район
85	<i>T. mentagrophytes</i> 1165/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Зилаирский район
86	<i>T. mentagrophytes</i> 1178/10	2010	человек (гладкая кожа)	г. Белебей
87	<i>T. mentagrophytes</i> 1185/10	2010	человек (гладкая кожа)	Чекмагушевский район
88	<i>T. mentagrophytes</i> 1248/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Мелеузовский район
89	<i>T. mentagrophytes</i> 1254/10	2010	человек (гладкая кожа)	Дуванский район
90	<i>T. mentagrophytes</i> 1263/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Шаранский район
91	<i>T. mentagrophytes</i> 7015/10	2010	человек (гладкая кожа)	Зианчуринский район
92	<i>T. mentagrophytes</i> 7024/10	2010	человек (гладкая кожа)	Хайбуллинский район
93	<i>T. mentagrophytes</i> 7029/10	2010	человек (гладкая кожа)	Куюргазинский район
94	<i>T. mentagrophytes</i> 7036/10	2010	человек (гладкая кожа)	Илишевский район
95	<i>T. mentagrophytes</i> 7038/10	2010	человек (гладкая кожа)	Мечетлинский район
96	<i>T. mentagrophytes</i> 7044/10	2010	человек (гладкая кожа)	Салаватский район

97	<i>T. mentagrophytes</i> 7050/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Уфимский район
98	<i>T. mentagrophytes</i> 7052/10	2010	человек (гладкая кожа)	Мелеузовский район
99	<i>T. mentagrophytes</i> 7071/10	2010	человек (гладкая кожа)	Чишминский район
100	<i>T. mentagrophytes</i> 7078/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Архангельский район
101	<i>T. mentagrophytes</i> 7093/10	2010	человек (гладкая кожа)	Нуримановский район
102	<i>T. mentagrophytes</i> 7096/10	2010	человек (гладкая кожа)	Куюргазинский район
103	<i>T. mentagrophytes</i> 7108/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Мелеузовский район
104	<i>T. verrucosum</i> 1076/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Кугарчинский район
105	<i>T. verrucosum</i> 1079/10	2010	человек (гладкая кожа)	Уфимский район
106	<i>T. verrucosum</i> 1081/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Уфимский район
107	<i>T. verrucosum</i> 1082/10	2010	человек (гладкая кожа)	Чишминский район
108	<i>T. verrucosum</i> 1197/10	2010	человек (гладкая кожа)	Туймазинский район
109	<i>T. verrucosum</i> 1204/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Чишминский район
110	<i>T. verrucosum</i> 1213/10	2010	человек (гладкая кожа)	Зианчуринский район

111	<i>T. verrucosum</i> 1219/10	2010	человек (гладкая кожа)	Чекмагушевский район
112	<i>T. verrucosum</i> 1221/10	2010	человек (гладкая кожа)	Куюргазинский район
113	<i>T. verrucosum</i> 1225/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Хайбуллинский район
114	<i>T. verrucosum</i> 1228/10	2010	человек (гладкая кожа)	Нуримановский район
115	<i>T. verrucosum</i> 1234/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Мечетлинский район
116	<i>T. verrucosum</i> 1240/10	2010	человек (гладкая кожа)	Нуримановский район
117	<i>T. verrucosum</i> 1243/10	2010	человек (гладкая кожа)	Татышлинский район
118	<i>T. verrucosum</i> 1246/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Зилаирский район
119	<i>T. verrucosum</i> 1248/10	2010	человек (гладкая кожа)	Ермекеевский район
120	<i>T. verrucosum</i> 1252/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Илишевский район
121	<i>T. verrucosum</i> 1255/10	2010	человек (гладкая кожа)	Буздякский район
122	<i>T. verrucosum</i> 1259/10	2010	человек (гладкая кожа)	Архангельский район
123	<i>T. verrucosum</i> 1261/10	2010	человек (гладкая кожа)	Хайбуллинский район
124	<i>T. verrucosum</i> 1267/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Мелеузовский район

125	<i>T. verrucosum</i> 1274/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Мечетлинский район
126	<i>T. verrucosum</i> 1277/10	2010	человек (гладкая кожа)	Хайбуллинский район
127	<i>T. verrucosum</i> 1279/10	2010	человек (гладкая кожа)	Куюргазинский район
128	<i>T. verrucosum</i> 1281/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Татышлинский район
129	<i>T. verrucosum</i> 7040/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Татышлинский район
130	<i>T. verrucosum</i> 7065/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Зианчуринский район
131	<i>T. verrucosum</i> 7091/10	2010	человек (гладкая кожа)	Зианчуринский район
132	<i>T. verrucosum</i> 7102/10	2010	человек (гладкая кожа)	Татышлинский район
133	<i>T. verrucosum</i> 7207/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Мечетлинский район
134	<i>T. verrucosum</i> 7210/10	2010	человек (гладкая кожа)	Дуванский район
135	<i>T. verrucosum</i> 7214/10	2010	человек (волосистая часть головы)	Чекмагушевский район
136	<i>T. verrucosum</i> 7219/10	2010	человек (гладкая кожа)	Уфимский район
137	<i>T. verrucosum</i> 7227/10	2010	человек (гладкая кожа)	Архангельский район
138	<i>T. mentagrophytes</i> 1043/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Зилаирский район

139	<i>T. mentagrophytes</i> 1078/11	2011	человек (гладкая кожа)	Уфимский район
140	<i>T. mentagrophytes</i> 1082/11	2011	человек (гладкая кожа)	Зилаирский район
141	<i>T. mentagrophytes</i> 1091/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Чишминский район
142	<i>T. mentagrophytes</i> 1096/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Дуванский район
143	<i>T. mentagrophytes</i> 1103/11	2011	человек (гладкая кожа)	Татышлинский район
144	<i>T. mentagrophytes</i> 1114/11	2011	человек (гладкая кожа)	Чишминский район
145	<i>T. mentagrophytes</i> 1122/11	2011	человек (гладкая кожа)	Илишевский район
146	<i>T. mentagrophytes</i> 1129/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Чекмагушевский район
147	<i>T. mentagrophytes</i> 1137/11	2011	человек (гладкая кожа)	Зианчуринский район
148	<i>T. mentagrophytes</i> 1148/11	2011	человек (гладкая кожа)	Ермекеевский район
149	<i>T. mentagrophytes</i> 1156/11	2011	человек (гладкая кожа)	Чишминский район
150	<i>T. mentagrophytes</i> 1161/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Ермекеевский район
151	<i>T. mentagrophytes</i> 1169/11	2011	человек (гладкая кожа)	Благоварский район
152	<i>T. mentagrophytes</i> 1177/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Аургазинский район

153	<i>T. mentagrophytes</i> 1183/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Нуримановский район
154	<i>T. mentagrophytes</i> 1242/11	2011	человек (гладкая кожа)	Чекмагушевский район
155	<i>T. mentagrophytes</i> 1257/11	2011	человек (гладкая кожа)	Баймакский район
156	<i>T. mentagrophytes</i> 1264/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Татышлинский район
157	<i>T. mentagrophytes</i> 7021/11	2011	человек (гладкая кожа)	Нуримановский район
158	<i>T. mentagrophytes</i> 7126/11	2011	человек (гладкая кожа)	Салаватский район
159	<i>T. mentagrophytes</i> 7129/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Уфимский район
160	<i>T. mentagrophytes</i> 7132/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Чишминский район
161	<i>T. mentagrophytes</i> 7138/11	2011	человек (гладкая кожа)	Зианчуринский район
162	<i>T. mentagrophytes</i> 7143/11	2011	человек (волосистая часть головы)	г. Ишимбай
163	<i>T. mentagrophytes</i> 7155/11	2011	человек (гладкая кожа)	Чишминский район
164	<i>T. mentagrophytes</i> 7167/11	2011	человек (гладкая кожа)	Зианчуринский район
165	<i>T. mentagrophytes</i> 7174/11	2011	человек (гладкая кожа)	Уфимский район
166	<i>T. mentagrophytes</i> 7181/11	2011	человек (гладкая кожа)	Мелеузовский район

167	<i>T. mentagrophytes</i> 7198/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Зианчуринский район
168	<i>T. mentagrophytes</i> 7205/11	2011	человек (гладкая кожа)	Буздякский район
169	<i>T. mentagrophytes</i> 7208/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Чишминский район
170	<i>T. mentagrophytes</i> 7223/11	2011	человек (гладкая кожа)	Мелеузовский район
171	<i>T. mentagrophytes</i> 7231/11	2011	человек (гладкая кожа)	Чекмагушевский район
172	<i>T. mentagrophytes</i> 7237/11	2011	человек (гладкая кожа)	г. Мелеуз
173	<i>T. mentagrophytes</i> 7242/11	2011	человек (гладкая кожа)	Куюргазинский район
174	<i>T. verrucosum</i> 1077/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Нуримановский район
175	<i>T. verrucosum</i> 1108/11	2011	человек (гладкая кожа)	Татышлинский район
176	<i>T. verrucosum</i> 1131/11	2011	человек (гладкая кожа)	Шаранский район
177	<i>T. verrucosum</i> 1139/11	2011	человек (гладкая кожа)	Благоварский район
178	<i>T. verrucosum</i> 1145/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Хайбуллинский район
179	<i>T. verrucosum</i> 1152/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Мелеузовский район
180	<i>T. verrucosum</i> 1158/11	2011	человек (гладкая кожа)	Уфимский район

181	<i>T. verrucosum</i> 1161/11	2011	человек (гладкая кожа)	Илишевский район
182	<i>T. verrucosum</i> 1174/11	2011	человек (гладкая кожа)	Чишминский район
183	<i>T. verrucosum</i> 1193/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Зианчуринский район
184	<i>T. verrucosum</i> 1206/11	2011	человек (гладкая кожа)	Туймазинский район
185	<i>T. verrucosum</i> 1212/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Буздякский район
186	<i>T. verrucosum</i> 1218/11	2011	человек (гладкая кожа)	Дуванский район
187	<i>T. verrucosum</i> 1227/11	2011	человек (гладкая кожа)	Гафурийский район
188	<i>T. verrucosum</i> 1234/11	2011	человек (гладкая кожа)	Шаранский район
189	<i>T. verrucosum</i> 1249/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Чишминский район
190	<i>T. verrucosum</i> 1256/11	2011	человек (гладкая кожа)	Хайбуллинский район
191	<i>T. verrucosum</i> 1258/11	2011	человек (гладкая кожа)	Архангельский район
192	<i>T. verrucosum</i> 1264/11	2011	человек (гладкая кожа)	Гафурийский район
193	<i>T. verrucosum</i> 1271/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Хайбуллинский район
194	<i>T. verrucosum</i> 6942/11	2011	человек (гладкая кожа)	Баймакский район

195	<i>T. verrucosum</i> 6946/11	2011	человек (гладкая кожа)	Мечетлинский район
196	<i>T. verrucosum</i> 6958/11	2011	человек (гладкая кожа)	Зилаирский район
197	<i>T. verrucosum</i> 6964/11	2011	человек (гладкая кожа)	Мелеузовский район
198	<i>T. verrucosum</i> 6969/11	2011	человек (гладкая кожа)	Архангельский район
199	<i>T. verrucosum</i> 6973/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Уфимский район
200	<i>T. verrucosum</i> 6976/11	2011	человек (гладкая кожа)	Чишминский район
201	<i>T. verrucosum</i> 6985/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Зианчуринский район
202	<i>T. verrucosum</i> 6998/11	2011	человек (гладкая кожа)	Куюргазинский район
203	<i>T. verrucosum</i> 7029/11	2011	человек (гладкая кожа)	Илишевский район
204	<i>T. verrucosum</i> 7041/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Ермекеевский район
205	<i>T. verrucosum</i> 7049/11	2011	человек (гладкая кожа)	Дуванский район
206	<i>T. verrucosum</i> 7052/11	2011	человек (гладкая кожа)	Благоварский район
207	<i>T. verrucosum</i> 7074/11	2011	человек (гладкая кожа)	Туймазинский район
208	<i>T. verrucosum</i> 7095/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Хайбуллинский район

209	<i>T. verrucosum</i> 7128/11	2011	человек (гладкая кожа)	Кугарчинский район
210	<i>T. verrucosum</i> 7160/11	2011	человек (гладкая кожа)	Дуванский район
211	<i>T. verrucosum</i> 7169/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Нуримановский район
212	<i>T. verrucosum</i> 7211/11	2011	человек (волосистая часть головы)	Архангельский район
213	<i>T. verrucosum</i> 7220/11	2011	человек (гладкая кожа)	Мечетлинский район
214	<i>T. verrucosum</i> 7239/11	2011	человек (гладкая кожа)	Татышлинский район
215	<i>T. verrucosum</i> 7243/11	2011	человек (гладкая кожа)	Нуримановский район
216	<i>T. mentagrophytes</i> 1004/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Туймазинский район
217	<i>T. mentagrophytes</i> 1010/12	2012	человек (гладкая кожа)	Нуримановский район
218	<i>T. mentagrophytes</i> 1017/12	2012	человек (гладкая кожа)	Буздякский район
219	<i>T. mentagrophytes</i> 1028/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Стерлитамакски й район
220	<i>T. mentagrophytes</i> 1032/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Уфимский район
221	<i>T. mentagrophytes</i> 1051/12	2012	человек (гладкая кожа)	Аургазинский район
222	<i>T. mentagrophytes</i> 1056/12	2012	человек (гладкая кожа)	Зианчуринский район

223	<i>T. mentagrophytes</i> 1069/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Чишминский район
224	<i>T. mentagrophytes</i> 1075/12	2012	человек (гладкая кожа)	Архангельский район
225	<i>T. mentagrophytes</i> 1084/12	2012	человек (гладкая кожа)	Зианчуринский район
226	<i>T. mentagrophytes</i> 1108/12	2012	человек (гладкая кожа)	Хайбуллинский район
227	<i>T. mentagrophytes</i> 1122/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Зилаирский район
228	<i>T. mentagrophytes</i> 1236/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Зианчуринский район
229	<i>T. mentagrophytes</i> 1247/12	2012	человек (гладкая кожа)	Зилаирский район
230	<i>T. mentagrophytes</i> 1265/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Уфимский район
231	<i>T. mentagrophytes</i> 1289/12	2012	человек (гладкая кожа)	Мелеузовский район
232	<i>T. mentagrophytes</i> 1299/12	2012	человек (гладкая кожа)	Хайбуллинский район
233	<i>T. mentagrophytes</i> 7017/12	2012	человек (гладкая кожа)	Ермекеевский район
234	<i>T. mentagrophytes</i> 7019/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Уфимский район
235	<i>T. mentagrophytes</i> 7021/12	2012	человек (гладкая кожа)	Илишевский район
236	<i>T. mentagrophytes</i> 7033/12	2012	человек (гладкая кожа)	Чекмагушевский район

237	<i>T. mentagrophytes</i> 7039/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Архангельский район
238	<i>T. mentagrophytes</i> 7048/12	2012	человек (гладкая кожа)	Ермекеевский район
239	<i>T. mentagrophytes</i> 7057/12	2012	человек (гладкая кожа)	Хайбуллинский район
240	<i>T. mentagrophytes</i> 7061/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Баймакский район
241	<i>T. mentagrophytes</i> 7125/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Татышлинский район
242	<i>T. mentagrophytes</i> 7137/12	2012	человек (гладкая кожа)	Нуримановский район
243	<i>T. mentagrophytes</i> 7149/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Салаватский район
244	<i>T. mentagrophytes</i> 7150/12	2012	человек (гладкая кожа)	Кугарчинский район
245	<i>T. mentagrophytes</i> 7162/12	2012	человек (гладкая кожа)	Илишевский район
246	<i>T. mentagrophytes</i> 7173/12	2012	человек (гладкая кожа)	г. Мелеуз
247	<i>T. mentagrophytes</i> 7185/12	2012	человек (гладкая кожа)	Зианчуринский район
248	<i>T. mentagrophytes</i> 7219/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Хайбуллинский район
249	<i>T. mentagrophytes</i> 7234/12	2012	человек (гладкая кожа)	Мечетлинский район
250	<i>T. mentagrophytes</i> 7243/12	2012	человек (гладкая кожа)	Ермекеевский район

251	<i>T. mentagrophytes</i> 7254/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Уфимский район
252	<i>T. mentagrophytes</i> 7268/12	2012	человек (гладкая кожа)	Чишминский район
253	<i>T. mentagrophytes</i> 7279/12	2012	человек (гладкая кожа)	Уфимский район
254	<i>T. mentagrophytes</i> 7290/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Куюргазинский район
255	<i>T. mentagrophytes</i> 7296/12	2012	человек (гладкая кожа)	Зилаирский район
256	<i>T. verrucosum</i> 1016/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Мечетлинский район
257	<i>T. verrucosum</i> 1028/12	2012	человек (гладкая кожа)	Буздякский район
258	<i>T. verrucosum</i> 1034/12	2012	человек (гладкая кожа)	Шаранский район
259	<i>T. verrucosum</i> 1039/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Хайбуллинский район
260	<i>T. verrucosum</i> 1041/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Гафурийский район
261	<i>T. verrucosum</i> 1046/12	2012	человек (гладкая кожа)	Мелеузовский район
262	<i>T. verrucosum</i> 1058/12	2012	человек (гладкая кожа)	Уфимский район
263	<i>T. verrucosum</i> 1063/12	2012	человек (гладкая кожа)	Шаранский район
264	<i>T. verrucosum</i> 1075/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Дуванский район

265	<i>T. verrucosum</i> 1087/12	2012	человек (гладкая кожа)	Чишминский район
266	<i>T. verrucosum</i> 1092/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Гафурийский район
267	<i>T. verrucosum</i> 1098/12	2012	человек (гладкая кожа)	Нуримановский район
268	<i>T. verrucosum</i> 1113/12	2012	человек (гладкая кожа)	Туймазинский район
269	<i>T. verrucosum</i> 1121/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Шаранский район
270	<i>T. verrucosum</i> 1130/12	2012	человек (гладкая кожа)	Мечетлинский район
271	<i>T. verrucosum</i> 1134/12	2012	человек (гладкая кожа)	Туймазинский район
272	<i>T. verrucosum</i> 1149/12	2012	человек (гладкая кожа)	Чишминский район
273	<i>T. verrucosum</i> 1152/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Дуванский район
274	<i>T. verrucosum</i> 1165/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Туймазинский район
275	<i>T. verrucosum</i> 1187/12	2012	человек (гладкая кожа)	Уфимский район
276	<i>T. verrucosum</i> 1191/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Илишевский район
277	<i>T. verrucosum</i> 1201/12	2012	человек (гладкая кожа)	Татышлинский район
278	<i>T. verrucosum</i> 1223/12	2012	человек (гладкая кожа)	Архангельский район

279	<i>T. verrucosum</i> 1226/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Баймакский район
280	<i>T. verrucosum</i> 1238/12	2012	человек (гладкая кожа)	Благоварский район
281	<i>T. verrucosum</i> 1257/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Нуримановский район
282	<i>T. verrucosum</i> 1262/12	2012	человек (гладкая кожа)	Куюргазинский район
283	<i>T. verrucosum</i> 1274/12	2012	человек (гладкая кожа)	Буздякский район
284	<i>T. verrucosum</i> 1285/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Аургазинский район
285	<i>T. verrucosum</i> 7018/12	2012	человек (гладкая кожа)	Чекмагушевский район
286	<i>T. verrucosum</i> 7025/12	2012	человек (гладкая кожа)	Нуримановский район
287	<i>T. verrucosum</i> 7027/12	2012	человек (гладкая кожа)	Архангельский район
288	<i>T. verrucosum</i> 7039/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Нуримановский район
289	<i>T. verrucosum</i> 7044/12	2012	человек (гладкая кожа)	Дуванский район
290	<i>T. verrucosum</i> 7058/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Дуванский район
291	<i>T. verrucosum</i> 7062/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Илишевский район
292	<i>T. verrucosum</i> 7083/12	2012	человек (гладкая кожа)	Мечетлинский район

293	<i>T. verrucosum</i> 7089/12	2012	человек (гладкая кожа)	Чекмагушевский район
294	<i>T. verrucosum</i> 7106/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Уфимский район
295	<i>T. verrucosum</i> 7131/12	2012	человек (гладкая кожа)	Зилаирский район
296	<i>T. verrucosum</i> 7147/12	2012	человек (гладкая кожа)	Салаватский район
297	<i>T. verrucosum</i> 7159/12	2012	человек (гладкая кожа)	Нуримановский район
298	<i>T. verrucosum</i> 7187/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Благоварский район
299	<i>T. verrucosum</i> 7192/12	2012	человек (гладкая кожа)	Хайбуллинский район
300	<i>T. verrucosum</i> 7219/12	2012	человек (гладкая кожа)	Илишевский район
301	<i>T. verrucosum</i> 7226/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Татышлинский район
302	<i>T. verrucosum</i> 7231/12	2012	человек (гладкая кожа)	Уфимский район
303	<i>T. verrucosum</i> 7235/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Чекмагушевский район
304	<i>T. verrucosum</i> 7249/12	2012	человек (гладкая кожа)	Ермекеевский район
305	<i>T. verrucosum</i> 7258/12	2012	человек (волосистая часть головы)	Туймазинский район
306	<i>T. mentagrophytes</i> 1032/13	2013	человек (гладкая кожа)	Архангельский район

307	<i>T. mentagrophytes</i> 1048/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Нуримановский район
308	<i>T. mentagrophytes</i> 1051/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Хайбуллинский район
309	<i>T. mentagrophytes</i> 1068/13	2013	человек (гладкая кожа)	Ермекеевский район
310	<i>T. mentagrophytes</i> 1072/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Нуримановский район
311	<i>T. mentagrophytes</i> 1081/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Чишминский район
312	<i>T. mentagrophytes</i> 1104/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Кигинский район
313	<i>T. mentagrophytes</i> 1119/13	2013	человек (гладкая кожа)	Уфимский район
314	<i>T. mentagrophytes</i> 1128/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Татышлинский район
315	<i>T. mentagrophytes</i> <i>var.</i> 1134/13	2013	человек (гладкая кожа)	Нуримановский район
316	<i>T. mentagrophytes</i> 1147/13	2013	человек (гладкая кожа)	Шаранский район
317	<i>T. mentagrophytes</i> 1153/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Куюргазинский район
318	<i>T. mentagrophytes</i> 1159/13	2013	человек (гладкая кожа)	Мелеузовский район
319	<i>T. mentagrophytes</i> 1162/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Хайбуллинский район
320	<i>T. mentagrophytes</i> 1176/13	2013	человек (гладкая кожа)	Нуримановский район

321	<i>T. mentagrophytes</i> 7135/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Татышлинский район
322	<i>T. mentagrophytes</i> 7149/13	2013	человек (гладкая кожа)	Шаранский район
323	<i>T. mentagrophytes</i> 7160/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Хайбуллинский район
324	<i>T. mentagrophytes</i> 7177/13	2013	человек (волосистая часть головы)	г. Ишимбай
325	<i>T. mentagrophytes</i> 7198/13	2013	человек (гладкая кожа)	Нуримановский район
326	<i>T. mentagrophytes</i> 7201/13	2013	человек (гладкая кожа)	Зианчуринский район
327	<i>T. mentagrophytes</i> 7207/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Уфимский район
328	<i>T. mentagrophytes</i> 7224/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Чишминский район
329	<i>T. mentagrophytes</i> 7231/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Мелеузовский район
330	<i>T. mentagrophytes</i> 7243/13	2013	человек (гладкая кожа)	Зианчуринский район
331	<i>T. verrucosum</i> 1159/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Альшеевский район
332	<i>T. verrucosum</i> 1167/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Салаватский район
333	<i>T. verrucosum</i> 1170/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Нуримановский район
334	<i>T. verrucosum</i> 1184/13	2013	человек (гладкая кожа)	Ермекеевский район

335	<i>T. verrucosum</i> 1191/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Дуванский район
336	<i>T. verrucosum</i> 1205/13	2013	человек (гладкая кожа)	Янаульский район
337	<i>T. verrucosum</i> 1211/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Караидельский район
338	<i>T. verrucosum</i> 1217/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Туймазинский район
339	<i>T. verrucosum</i> 1239/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Аургазинский район
340	<i>T. verrucosum</i> 1251/13	2013	человек (гладкая кожа)	Уфимский район
341	<i>T. verrucosum</i> 1262/13	2013	человек (гладкая кожа)	Чишминский район
342	<i>T. verrucosum</i> 1286/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Туймазинский район
343	<i>T. verrucosum</i> 1287/13	2013	человек (гладкая кожа)	Мелеузовский район
344	<i>T. verrucosum</i> 1298/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Чекмагушевский район
345	<i>T. verrucosum</i> 1309/13	2013	человек (гладкая кожа)	Уфимский район
346	<i>T. verrucosum</i> 7049/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Нуримановский район
347	<i>T. verrucosum</i> 7057/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Альшеевский район
348	<i>T. verrucosum</i> 7062/13	2013	человек (гладкая кожа)	Чекмагушевский район
349	<i>T. verrucosum</i>	2013	человек	Зилаирский

	7068/13		(гладкая кожа)	район
350	<i>T. verrucosum</i> 7086/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Нуримановский район
351	<i>T. verrucosum</i> 7091/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Куюргазинский район
352	<i>T. verrucosum</i> 7109/13	2013	человек (гладкая кожа)	Чекмагушевский район
353	<i>T. verrucosum</i> 7136/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Архангельский район
354	<i>T. verrucosum</i> 7138/13	2013	человек (гладкая кожа)	Буздякский район
355	<i>T. verrucosum</i> 7145/13	2013	человек (гладкая кожа)	Архангельский район
356	<i>T. verrucosum</i> 7172/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Дуванский район
357	<i>T. verrucosum</i> 7208/13	2013	человек (волосистая часть головы)	Нуримановский район

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 *Microsporium 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 // **Имунопатология. 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