

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2562540

**СПОСОБ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИИ
TRICHOPHYTON VERRUCOSUM В КЛИНИЧЕСКОМ
МАТЕРИАЛЕ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ КЛИНИЧЕСКИХ
ФОРМАХ ЗАБОЛЕВАНИЯ**

Патентообладатель(ли): *Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2014124793

Приоритет изобретения **17 июня 2014 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации **12 августа 2015 г.**

Срок действия патента истекает **17 июня 2034 г.**

Заместитель руководителя Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Л.Л. Кирий



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014124793/15, 17.06.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
17.06.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 17.06.2014

(45) Опубликовано: 10.09.2015 Бюл. № 25

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2237709 C2, 10.10.2004. RU 2181144 C1, 10.04.2002. US 20060153789, 13.07.2006. СКРИПКИН Ю.А. Кожные и венерические болезни. - М.: Трида-Х, 2000, С.188-199. ВОСК М et al. Polymerase chain reaction-based detection of dermatophyte DNA with a fungus-specific primer system. Mycoses. 1994 Mar-Apr; 37(3-4):79-84

Адрес для переписки:

450077, г. Уфа-Центр, Ленина, 3,
БАШГОСМЕДУНИВЕРСИТЕТ, Патентный
отдел

(72) Автор(ы):

МАВЗЮТОВ АЙРАТ РАДИКОВИЧ (RU),
ЕФИМОВ ГЕОРГИЙ ЕМЕЛЬЯНОВИЧ
(RU),
НИКАНОРОВ ЮРИЙ МИХАЙЛОВИЧ
(RU),
КУЛУЕВ БУЛАТ РАЗЯПОВИЧ (RU),
ТИТОВА ТАТЬЯНА НИКОЛАЕВНА (RU),
ПОПОВА ДИЛАРА РАУЛЕВНА (RU),
ХИСМАТУЛЛИНА ЗАРЕМА РИМОВНА
(RU),
ТИТОВА АНАСТАСИЯ АРКАДЬЕВНА
(RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
профессионального образования
"БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ"
Министерства здравоохранения Российской
Федерации (RU)

(54) СПОСОБ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИИ TRICHOPHYTON VERRUCOSUM В КЛИНИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ФОРМАХ ЗАБОЛЕВАНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к микологии и дерматовенерологии, и может быть использовано для диагностики микроспории. Способ включает выделение тотальной нативной ДНК из кожи и волос, специфическую амплификацию фрагмента гена 5.8S рРНК Trichophyton verrucosum с использованием праймеров следующей структуры: 5' CCACGAT AGGGATCAGCGTT 3', 5' GAAAGTTTAACTGA

TTTTGCTTG 3'. Затем при электрофоретическом обнаружении продукта амплификации размером 231 п.н. определяют наличие возбудителя. Использование изобретения позволяет установить факт инфицированности человека Trichophyton verrucosum при различных клинических формах заболевания, в том числе стертых и атипичных. 2 пр.

Предлагаемое изобретение относится к медицине, а именно к клинической лабораторной диагностике, лабораторной микологии и дерматовенерологии, и может быть использовано для диагностики зооантропонозной трихофитии.

В настоящее время сохраняется интерес к дерматофитиям, обусловленным зоофильными грибами. Периодические эпидемиологические вспышки этих инфекций регистрируются в различных областях нашей страны и за рубежом. В России наиболее неблагоприятными районами по заболеваемости трихофитией являются Северо-Кавказский и Уральский регионы, где заболеваемость в среднем составляет 7,8 и 6,9 на 100 тысяч населения соответственно. В Республике Башкортостан заболеваемость зооантропонозной трихофитией превышает заболеваемость в РФ в 5-6 раз [Латыпов, А.Б. Научное обоснование профилактики зооантропонозной трихофитии и совершенствования медицинской помощи больным (на примере Республики Башкортостан): дис... канд. мед. наук - Екатеринбург, 2007]. Одним из диагностических критериев постановки диагноза трихофитии являются клинические проявления. Однако клиническое многообразие, наличие атипичных и стертых клинических форм дерматофитий в настоящее время затрудняют своевременную диагностику [Блинов Н.П., Васильева Н.В., Разнатовский К.И. Дерматомикозы, или поверхностные микозы кожи и ее придатков, волос и ногтей. Лабораторная диагностика. Проблемы медицинской микологии 2008; 1:27-34]. Поэтому выставить окончательный диагноз микоза или снять его возможно только при проведении лабораторного обследования.

При подозрении на трихофитию основным методом лабораторной диагностики, как и при других дерматофитиях, является обнаружение возбудителя в исследуемом материале (частички кожи и волосы). Для этого в настоящее время применяются следующие методики [Методики клинических лабораторных исследований: Справочное пособие. Том 3. / Под ред. В.В. Меншикова. - М.: Лабора, 2009. - 880 с.]:

1. Микроскопия клинического материала - метод предварительной диагностики заболевания. В случаях отсутствия роста возбудителя в культуре положительный результат прямой микроскопии является единственным подтверждением микотической инфекции. Патологический материал изучают в нативных препаратах. Для просветления препаратов, т.е. для растворения роговых масс, используют 20% раствор едкой щелочи (КОН или NaOH).

2. Культуральный метод исследования до сих пор остается предпочтительным методом диагностики микозов. Осуществляется для окончательного уточнения диагноза и выяснения эпидемиологии. Она включает получение культуры гриба с последующим микроскопическим исследованием. По внешнему виду колоний на чашках Петри можно составить представление о роде возбудителя (*Trichophyton*), его виде (*Trichophyton verrucosum*). Окончательное уточнение рода и вида гриба возможно только на основании микроскопического исследования полученной культуры.

Однако все используемые методы имеют ряд существенных недостатков:

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

2. Культуральный метод исследования является очень трудоемким и занимает от 5 до 21 дня. Несмотря на то что специфичность этого метода значительно выше, чем при микроскопии клинического материала, чувствительность этого метода тоже не достаточна.

Эффективность перечисленных методов лабораторной диагностики не в полной мере отражает истинную ситуацию по заболеваемости трихофитией. Следовательно,

для формирования наиболее объективных представлений о масштабах ее распространения, необходимо широкое внедрение в практику здравоохранения и ветеринарной служб молекулярно-генетических методов диагностики, в частности полимеразной цепной реакции (ПЦР), которую отличает исключительно высокая чувствительность и специфичность, что позволит выявлять *Trichophyton verrucosum* в клиническом материале при различных формах заболевания и, в особенности - при стертых и атипичных формах.

Известен способ диагностики дерматомикозов, заключающийся в том, что диагностику дерматомикозов осуществляют путем посева дерматофитов из клинического материала на плотную селективную среду Сабуро с добавлением антибиотика - левомецитина и гидролизата кератина, полученного из куриного пера. Питательная среда для выделения дерматофитов имеет следующий состав, г/л: глюкоза - 40,0; пептон - 10,0; агар - 18,0-20,0; гидролизат кератина (в пересчете на сухое вещество) - 10,0-20,0; левомецитин - 50000 ЕД; дистиллированная вода - остальное. Посев инкубируют при температуре 22-24°C в течение 4-8 дней с последующей идентификацией вида колоний. Способ наиболее эффективен при выделении из материала от больных культур грибов-дерматофитов, в частности *Microsporum canis*, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton mentagrophytes* var. *gypseum*, *Trichophyton rubrum* [патент RU №2275631, 2006 г.].

Прототипом предлагаемого изобретения является способ диагностики онихомикоза кистей и стоп, сущность которого заключается в том, что грибок *Trichophyton rubrum* идентифицируют методом ПЦР, для чего выделяют ДНК из образца кожи или ногтевых пластинок, при этом для выделения ДНК образец инкубируют в 2-4 М растворе щелочи не менее 1 ч при температуре 50-65°C, нейтрализуют раствор 30%-ной соляной кислотой, переосаждают образец в 50%-ном растворе этанола при температуре минус 10 - минус 20°C и высушивают при температуре 50-65°C; проводят ПЦР ДНК с применением высокоспецифичных для гена 28 S РНК *Trichophyton rubrum* синтетических ДНК-зондов, имеющих последовательность: TR-1-F (смысловой): 5' atcgaatcttgaacgcaca 3'; TR-1-R (антисмысловой): 5' tataaagattggggccaggg 3' и при положительном результате диагностируют онихомикоз, вызванный грибом *Trichophyton rubrum* [патент RU №2319962, 2008 г.].

Задачей изобретения является разработка высокоспецифичного и высокочувствительного способа детекции *Trichophyton verrucosum* при различных клинических формах заболевания и, в особенности, при стертых и атипичных формах.

Технический результат при использовании изобретения - повышение точности лабораторной диагностики трихофитии у человека за счет достоверного обнаружения мицелия и спор *Trichophyton verrucosum* в клиническом материале.

Указанный технический результат достигается тем, что в способе детекции *Trichophyton verrucosum*, включающем выделение тотальной нативной ДНК из клинического материала, представляющего образец кожи, проведение полимеразной цепной реакции, согласно изобретению в качестве клинического материала дополнительно используют волосы, проводят специфическую амплификацию фрагмента гена 5.8S рРНК *Trichophyton verrucosum* с использованием праймеров следующей структуры:

5' CCACGATAGGGATCAGCGTT 3';

5' GAAAGTTTTAACTGATTTTGCTTG 3' и при электрофоретическом обнаружении продукта амплификации размером 231 п.н. определяют наличие возбудителя.

Предлагаемый способ детекции *Trichophyton verrucosum* осуществляется следующим

образом. Из клинического материала (частички кожи и волосы) выделяют тотальную нативную ДНК, после чего проводят специфическую амплификацию (ПЦР) фрагмента гена 5.8S рибосомальной РНК (рРНК) *Trichophyton verrucosum* с использованием праймеров следующей структуры:

5' CCACGATAGGGATCAGCGTT 3',
5' GAAAGTTTTAACTGATTTTGCTTG 3'.

При электрофоретическом обнаружении продукта амплификации размером 231 п.н. констатируют факт присутствия возбудителя в клиническом материале и подтверждают соответствующий диагноз.

ДНК выделяют из клинического материала (частички кожи и волосы). Для обеспечения необходимой степени чистоты ДНК и достаточного ее количества используют методику Boom R. [Boom R., et al. 1990. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. J. Clin. Microbiol. 28: 495-503]:

1. В пробирку с 300 мкл лизирующего раствора (5М гуанидинтиоционат, 1% Triton X100) вносится 1 грамм исследуемого материала. Проба тщательно перемешивается на вортексе и прогревается 5 мин при температуре 65°C. Центрифугировали 5 сек при 5 тыс. об/мин на микроцентрифуге. Когда проба растворялась не полностью, - пробирку центрифугировали на микроцентрифуге 5 мин при 12 тыс. об/мин. Надосадочная жидкость переносится в новую чистую пробирку.

2. Отдельным наконечником в пробирку вносят 25 мкл ресуспендированного сорбента (силикагель, SiO₂). Перемешивают на вортексе, ставят в штатив на 2 мин, еще раз перемешивают и оставляют в штативе на 5 мин.

3. Сорбент осаждается центрифугированием при 5 тыс. об/мин в течение 30 сек. Надосадочная жидкость удаляется с использованием вакуумного отсасывателя.

4. Далее в пробирку с сорбентом вносится 300 мкл раствора для отмывки (5М гуанидинтиоционат). Образовавшуюся смесь тщательно ресуспендируют на вортексе.

5. Сорбент осаждается центрифугированием при 5 тыс. об/мин на микроцентрифуге в течение 30 сек. Надосадочная жидкость удаляется с помощью вакуумного отсасывателя и чистого наконечника.

6. Добавляется 950 мкл отмывочного раствора (70% этиловый спирт). Сорбент ресуспендируют на вортексе, центрифугируют 30 сек при 10 тыс. об/мин на микроцентрифуге. Надосадочную жидкость удаляют, используя вакуумный отсасыватель и чистый наконечник.

7. Пробирку инкубируют при температуре 65°C 5-10 мин для подсушивания сорбента. При этом крышка пробирки должна быть открыта. В пробирку после подсушки добавляется 50 мкл ТЕ-буфера (1 мМ EDTA, 10 мМ TRIS-HCl pH 8.0) для элюции ДНК. Перемешивается на вортексе. Для лучшей элюции пробирка инкубируется в термостате при температуре 65°C в течение 5 мин с периодическим встряхиванием на вортексе.

8. Далее сорбент осаждается центрифугированием при 12 тыс. об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость, содержащая очищенную ДНК, готова к постановке ПЦР.

Раствор ДНК можно хранить при температуре -18°C в течение 6 месяцев.

В дальнейшем полученную ДНК используют в качестве матрицы для полимеразной цепной реакции (ПЦР) и амплификации нужного фрагмента гена 5.8S рРНК, выявляемого при помощи подобранных нами праймеров следующей структуры:

5' CCACGATAGGGATCAGCGTT 3',
5' GAAAGTTTTAACTGATTTTGCTTG 3'.

Амплификацию специфичного фрагмента гена 5.8S рРНК проводят в 30 мкл общего

объема смеси, содержащей 1 мкл тотальной ДНК, 3 мкл 10-кратного буфера для Taq-полимеразы, по 1 мкл каждого праймера, 3 мкл dNTP и 1 мкл Taq-полимеразы.

Режим амплификации следующий: начальная денатурация при 94°C в течение 2 мин; 30 циклов, включая денатурацию при 94°C - 20 сек, отжиг праймеров и синтез ДНК при 61°C - 20 сек; элонгация при 72°C - 20 сек; терминальная элонгация - 1 мин.

Амплифицированные фрагменты ДНК разделяют электрофоретически в 1% агарозном геле и после окрашивания геля бромидом этидия идентифицируют в ультрафиолетовом свете. В качестве электролита для электрофореза применяют 0,5 X боратный буфер (0,089 М трисHCl, pH=7,9; 0,089 М борная кислота, 0,002 ЭДТА, pH=8,0).

Электрофорез проводят при постоянном напряжении 100 В. Детекцию результатов проводят путем окрашивания агарозного геля бромистым этидием в течение 10-15 минут с последующей визуализацией в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе. Продукт амплификации размером 231 п.н. обнаруживается в виде светящейся полосы красно-оранжевого цвета.

Предлагаемое изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1.

Больной И., 10 лет, поступил с жалобами на высыпания на волосистой части головы, сопровождающиеся зудом и болезненностью.

Анамнез: Заболевание заметили родители 15 дней назад. Пораженные участки смазывали настойкой йода. Заразился от коровы.

Status localis: Процесс поражения локализовался на коже волосистой части головы, где имелись на гиперемированном, отечном фоне один крупный очаг размером 10,5×8,5 см в диаметре и пять мелких отсеков по периферии. В виде полушаровидных, опухолевидных образований ярко-красного цвета, с множеством воспалившихся волосяных фолликулов. При надавливании из расширенных отверстий фолликулов появлялись капли гноя (Kerion Celsii), волосы отсутствовали, оставшиеся легко эпилировались. Шейные и затылочные лимфатические узлы были увеличены, болезненны. Отмечались повышение температуры и головная боль.

Результаты лабораторных исследований:

ОАК лейкоциты - $9,0 \times 10^9$ /л, СОЭ 24 мм/ч.

Микроскопия: T. ectothrix megaspores.

Посев: нет роста.

Результаты ПЦР: в клиническом материале (частички кожи и волосы) методом полимеразной цепной реакции обнаружены и идентифицированы специфичные для Trichophyton verrucosum фрагменты гена 5.8S рРНК.

Окончательный диагноз: Инфильтративно-нагноительная трихофития волосистой части головы (6 очагов).

Пример 2.

Больной В., 8 лет, поступил с жалобами на поражение кожи левой кисти.

Анамнез: Болен в течение 10 дней. Источник заражения не известен.

Status localis: Процесс поражения локализовался на коже тыла левой кисти, где имелся на отечном и гиперемированном фоне воспалительный инфильтрат округлой формы, размером 8-9 см в диаметре, занимающий всю поверхность тыла кисти. Края очага незначительно приподняты и состоят из пустул и папул, покрытые серозно-гнойными корками. Были резко увеличены регионарные лимфатические узлы.

Результаты лабораторных исследований:

ОАК лейкоциты - $10,0 \times 10^9$ /л, СОЭ - 17 мм/ч, эозинофилия - 11%.

Микроскопия: С гладкой кожи споры не обнаружены. В пушковых волосах мицелий не обнаружен.

Посев: *Tr. verrucosum*.

Результаты ПНР: в клиническом материале (частички кожи и волосы) методом
5 полимеразной цепной реакции обнаружены и идентифицированы специфичные для *Trichophyton verrucosum* фрагменты гена 5.8S рРНК.

Окончательный диагноз: Инфильтративно-нагноительная трихофития кожи левой кисти (1 очаг).

Таким образом, предлагаемый способ специфической детекции *Trichophyton verrucosum*
10 в клиническом материале при различных клинических формах заболевания в отличие от микроскопического и культурального методов позволяет выявлять и идентифицировать мицелий и споры *Trichophyton verrucosum* в доступном клиническом материале при различных клинических формах заболевания (в особенности, при стертых и атипичных формах), что надежно коррелирует с результатами других исследований
15 и, соответственно, обеспечивает единую интерпретацию данных.

Формула изобретения

Способ детекции *Trichophyton verrucosum*, включающий выделение тотальной нативной ДНК из клинического материала, представляющего образец кожи, проведение
20 полимеразной цепной реакции, отличающийся тем, что в качестве клинического материала дополнительно используют волосы, проводят специфическую амплификацию фрагмента гена 5.8S рРНК *Trichophyton verrucosum* с использованием праймеров следующей структуры:

5' CCACGATAGGGATCAGCGTT 3';

25 5' GAAAGTTTТААСТGATTTTGCTTG 3' и при электрофоретическом обнаружении продукта амплификации размером 231 п.н. определяют наличие возбудителя.

30

35

40

45