

# РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



## ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2563619

### СПОСОБ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИИ *Trichophyton mentagrophytes* 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 № 2014124735

Приоритет изобретения 17 июня 2014 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 25 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: 2014124735/15, 17.06.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
17.06.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 17.06.2014

(45) Опубликовано: 20.09.2015 Бюл. № 26

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: RU 2319962 C2, 20.03.2008. JP  
0004936278 B2, 23.05.2012. JP 0005188808 B2,  
24.04.2013. CN 0101928778 A, 29.12.2010. CN  
0102127590 A, 20.07.2011

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 mentagrophytes В КЛИНИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ФОРМАХ ЗАБОЛЕВАНИЯ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины и предназначено для детекции гриба Trichophyton mentagrophytes. Осуществляют выделение тотальной нативной ДНК из образца кожи и волос, проводят полимеразную цепную реакцию и амплификацию фрагмента гена 5.8S рРНК Trichophyton mentagrophytes с использованием специфических праймеров. При

электрофоретическом обнаружении продукта амплификации размером 182 п.н. определяют наличие возбудителя. Изобретение обеспечивает специфическую детекцию Trichophyton mentagrophytes в клиническом материале и может быть использовано для диагностики зооантропонозной трихофитии. 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 [Елинов 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. Меньшикова. - 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 mentagrophytes*). 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 не достаточна.

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 службы молекулярно-генетических методов диагностики, в частности полимеразной цепной реакции (ПЦР), которую отличает исключительно высокая чувствительность и специфичность, что позволит выявлять *Trichophyton mentagrophytes* 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 - левомецетина 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; левомецетин - 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 vermicosum*, *Trichophyton mentagrophytes* var. *gypseum*, *Trichophyton rubrum* [патент RU №2275631, 2006 г.].

Прототипом предлагаемого изобретения является способ диагностики ониомикоза 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 ониомикоз, вызванный грибом *Trichophyton rubrum* [патент RU №2319962, 2008 г.].

Задачей изобретения является разработка высокоспецифичного и высокочувствительного способа детекции *Trichophyton mentagrophytes* 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 mentagrophytes* в клиническом материале.

Указанный технический результат достигается тем, что в способе детекции *Trichophyton mentagrophytes*, 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 mentagrophytes* с использованием праймеров следующей структуры:

5' CGCCCCATTCTTGTCTACCTT 3',

5' GTTTTAACTGATTTTGGCTTCTAAC 3' и при электрофоретическом обнаружении продукта амплификации размером 182 п.н. определяют наличие возбудителя.

Предлагаемый способ детекции *Trichophyton mentagrophytes* 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 mentagrophytes* с использованием праймеров следующей структуры:

- 5' CGCCCCATTCTTGTCTACCTT 3',  
5' STTTTAACTGATTTTGTCTTCTAAC 3'.

При электрофоретическом обнаружении продукта амплификации размером 182 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, SiO<sub>2</sub>). 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' CGCCCCATTCTTGTCTACCTT 3',  
5' GTTTTAACTGATTTTGTCTTCTAAC 3'.

Амплификацию специфического 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 58°C - 20 сек.; элонгация при 72°C - 15 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 182 п.н. обнаруживается в виде светящейся полосы красно-оранжевого цвета.

Предлагаемое изобретение иллюстрируется следующими примерами.

#### Пример 1.

Больной М., 14 лет, поступил с жалобами на обильные высыпания на туловище, сопровождающиеся зудом.

Анамнез: Заболевание обнаружил сам 20 дней назад. Лечился 5% настойкой йода и 5% салициловой мазью, без улучшения. Заразился при контакте с сеном.

Status localis: Процесс поражения носил распространенный характер. На передней поверхности кожи живота, на гиперемизированном, отечном основании имелось 9 инфильтрированных очагов, фолликулярные узелки, везикулы, покрытые серозными корками.

Результаты лабораторных исследований:

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

Посев: *Trichophyton mentagrophytes*.

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

Окончательный диагноз: Распространенная инфильтративная трихофития гладкой кожи туловища (9 очагов).

#### Пример 2.

Больной С., 16 лет, поступил с жалобами на поражение кожи правой руки, сопровождающиеся зудом.

Анамнез: Заболевание обнаружил сам 14 дней назад. Источник заражения не известен.

Status localis: На коже тыльной стороны лучезапястного сустава имеется инфильтрированный очаг розового цвета, размером 5,5х6 см в диаметре. В очаге имелись фолликулярные папулы, эрозии, чешуйки, по периферии очага - незначительный инфильтрированный венчик. Субъективно больного беспокоил незначительный зуд.

Результаты лабораторных исследований:

Микроскопия: С гладкой кожи обнаружен *Tr. ectothrix microides*.

Посев: нет роста.

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

Окончательный диагноз: Инфильтративная трихофития гладкой кожи правой руки (1 очаг).

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

#### Формула изобретения

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

5' CGCCCCATTCTTGTCTACCTT 3',

5' GTTTTAACTGATTTTGTCTCTAAC 3' и при электрофоретическом обнаружении продукта амплификации размером 182 п.н. определяют наличие возбудителя.