

С.І. Лаврушко<sup>1—3</sup>, В.І. Степаненко<sup>4</sup><sup>1</sup>Полтавський державний медичний університет<sup>2</sup>КП «Полтавський обласний клінічний шкірно-венерологічний диспансер Полтавської обласної ради»<sup>3</sup>Медична клініка «Елітмед+», Полтава<sup>4</sup>Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ

## Сучасна діагностика мікроспорії

**Мета роботи** — розробити методику сучасної молекулярно-генетичної діагностики мікроспорії у дітей на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), що дасть змогу ідентифікувати збудника *Microsporum canis* на рівні ДНК.

**Матеріали та методи.** Під спостереженням перебували 40 хворих на мікроспорію гладенької шкіри, волосистої частини голови, волосистої частини голови і гладенької шкіри. Біологічним матеріалом для дослідження слугували лусочки з гладенької шкіри та волосистої частини голови, волосся із волосистої частини голови хворих на мікроспорію. Досліджено 40 зразків біологічного матеріалу хворих на мікроспорію гладенької шкіри, мікроспорію волосистої частини голови, мікроспорію волосистої частини голови і гладенької шкіри. На першому етапі проводили видалення ДНК *Microsporum canis*, потім ПЛР для збільшення кількості копій ділянки ДНК за допомогою специфічних праймерів. Заключним етапом було типування 40 зразків клінічного матеріалу пацієнтів.

**Результати та обговорення.** Проведення ПЛР-діагностики надало змогу виявити ДНК *Microsporum canis* у всіх 40 зразках біологічного матеріалу хворих на мікроспорію. В нашому розробленому методі діагностики мікроспорії на основі ПЛР було використано набір двох праймерів МС (ділянки гена бета тубуліну *Microsporum canis*). Для внутрішнього контролю перебігу ампліфікації та якості забору біоматеріалу застосовано специфічні праймери АРОЕ (ділянки гена аполіпопротеїну Е людини).

**Висновки.** З метою вдосконалення точної специфічної діагностики мікроспорії у дітей розроблено методику сучасної молекулярно-генетичної діагностики на основі ПЛР, що дало змогу ідентифікувати збудника *Microsporum canis* на рівні ДНК. Аналіз молекулярної структури геному *Microsporum canis* підтвердив, що найбільш об'єктивним методом діагностики мікроорганізмів є ПЛР. Розроблений метод ДНК-діагностики на основі ПЛР із використанням специфічних праймерів може бути включено в алгоритм виявлення *Microsporum canis* у людей.

### Ключові слова

Мікроспорія, *Microsporum canis*, діагностика, полімеразна ланцюгова реакція.

На сьогодні грибкові інфекції шкіри та її придатків поширені в усьому світі і їхня частота продовжує зростати. Дерматофіти розвиваються у міру розширення географії і покращення соціально-економічних умов життя. *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum audouinii* та *Trichophyton schoenleinii* були головними збудниками поверхневих грибкових захворювань 100 років тому, але із середини ХХ ст. їхня частота різко знизилась і натеper дані мікроорганізми обмежено виявляють в деяких менш розвинених країнах. Тим часом частота *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton tonsurans* та *Microsporum canis* зростала поступово, і вони стали головними видами у всьому світі. Деякі інші дерматофіти, наприклад, *Trichophyton violaceum*, *Trichophyton verrucosum* та *Microsporum*

*ferrugineum*, є здебільшого ендемічними в деяких районах Африки, Азії та Європи. На сьогодні *Trichophyton rubrum* виступає основним збудником грибкових інфекцій шкіри та нігтів, тоді як *Microsporum canis*, *Trichophyton tonsurans* та *Trichophyton violaceum* представлені як переважні дерматофіти. Мобільність населення, зміни способу життя та застосування протигрибкових препаратів будуть постійно стимулювати еволюцію дерматофітів у мікросередовищі шкіри. Для кращого розуміння цього виду організмів та прогнозування тенденцій їхніх змін у майбутньому потрібне всебічне спостереження [3, 4, 6, 29].

Питання діагностики мікроспорії у дітей не втратило своєї актуальності і потребує постійного вдосконалення і розробки нових методів дослідження. Існують різні методи діагностики

грибкових захворювань шкіри, нігтів та волосся. Це і стандартні методи, які використовують з початку розвитку науки про гриби — мікології. До них належать лабораторні методи діагностики: бактеріоскопічний, культуральний (бактеріологічний) та люмінесцентний. В різних країнах світу створені нові методи молекулярно-генетичної діагностики, такі як полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), імуоферментний аналіз (ІФА), ендогенна флуоресцентна спектrometerія на гіперспектральному флуоресцентному мікроскопі, дерматоскопія.

Мікроспорія — грибкове захворювання шкіри та її придатків (переважно волосся і дуже рідко — нігтьових пластинок), зумовлене грибами роду *Microsporum*. Найчастіше виникає в дитячому віці. Діагностика типового ураження при мікроспорії зазвичай не викликає ускладнень [5, 10].

Діагноз мікроспорії складається з оцінки клінічної картини, даних лабораторних мікологічних методів дослідження (мікроспорія шкірних лусочок, волосся — КОН-тест і виділення збудника в культурі), а також огляду під лампою Вуда, під час якого виявляють характерне смарагдове світіння волосся [2, 25].

Останніми роками часто реєструють випадки атипового перебігу мікроспорії, які призводять до низки діагностичних помилок. На жаль, проведення класичних мікологічних тестів не позбавлене деяких недоліків: КОН-тест може давати як хибнопозитивні (артефакти), так і помилково негативні результати, а час проведення культурального дослідження може бути занадто тривалим (10—14 днів і більше). У процесі вирощування культура гриба може набувати нетипових морфологічних ознак, що також ускладнює правильну діагностику [7, 13, 18].

За даними нещодавно проведених наукових досліджень встановлено, що ефективність включення в алгоритм діагностики мікроспорії гладенької шкіри у дітей сприяє підвищенню точності діагностики уражень пушкового волосся на 12,8 % під час первинного прийому, що зумовлює своєчасне призначення системних проти-грибкових препаратів [1].

Для диференційної діагностики мікроспорії волосистої частини голови і гніздової алопеції у дітей пропонують спосіб дерматоскопічного дослідження, за результатами якого визначають такі симптоми: «волосся у формі коми», «зигзагоподібна форма волосся», «штопороподібна форма волосся». У разі виявлення хоча б одного із цих трьох симптомів і за відсутності ознак, характерних для гніздової алопеції, а саме: «жовті крапки», «чорні крапки» (кадаверизоване волосся), «волосся у формі знаку оклику», «мініатюризо-

ване волосся, позбавлене пігменту (велус)», діагностують мікроспорію волосистої частини голови [12].

Деякі дослідники для діагностики дерматофітозу проводять ендогенну флуоресцентну спектrometerію на гіперспектральному флуоресцентному мікроскопі. На отриманих зразках дерматофітів, включаючи *Aspergillus*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum gypseum* та *Microsporum canis*, розраховують ендогенний спектр флуоресценції. Для визначення типу дерматофіта використовують висококонтрастні флуоресцентні зображення та ендогенний спектр флуоресценції окремого гриба. Морфологічно подібні *Microsporum gypseum* та *Microsporum canis* можна розрізнити за ендогенним спектром флуоресценції. Результати дослідження показали, що чутливість та специфічність ідентифікації *Microsporum gypseum* становили 95 та 93 %, а чутливість та специфічність ідентифікації *Microsporum canis* — 94 та 93 % відповідно [28].

Отримано дані про те, що поверхнево-посилена спектроскопія комбінаційного розсіювання (SERS) у поєднанні з аналізом основних компонентів (PCA) може бути швидким і надійним методом виявлення та ідентифікації дерматофітних грибів як на рівні роду, так і на рівні видів. Дерматофітні інфекції — найпоширеніші мікотичні захворювання у всьому світі, що вражають чверть людської популяції. На сьогодні не існує оптимального методу виявлення та ідентифікації грибкових захворювань, оскільки кожний з них має певні обмеження. Автори публікації вперше з високою точністю досягли диференціації дерматофітів, що представляють три основних роди, тобто *Trichophyton*, *Microsporum* та *Epidermophyton*. Два перших основних компоненти (ПК), а саме ПК-1 та ПК-2, давали разом 97 % загальної дисперсії. Крім того, їх було ідентифіковано на рівні видів роду *Trichophyton*. PC-1 та PC-2, які є найбільш діагностично значущими, пояснюють 98 % дисперсії даних, отриманих зі спектрів *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton interdigitale* та *Trichophyton tonsurans*. Це швидке, надійне та економічно вигідне дослідження пропонує новий діагностичний підхід для ідентифікації дерматофітів і може бути включене в клінічну практику для вдосконалення діагностики грибкових інфекцій [27].

Науковці наполягають, що для формування найбільш об'єктивних уявлень про масштаби поширення мікроспорії необхідне широке впровадження високочутливих і специфічних молекулярно-генетичних методів діагностики. Проведено порівняльне дослідження з метою оцінки ефективності ПЛР із мікроскопічним і культу-

ральним методами лабораторної діагностики мікроспорії. Для порівняльного аналізу інформативності методів детекції розраховували показники специфічності, чутливості, діагностичної ефективності, прогностичної цінності та відношення правдоподібності. Результати досліджень виявили більш високі значення цих показників у всіх обстежених для методу ПЛР [11].

У літературі є багато повідомлень щодо ПЛР-ідентифікації видів дерматофітів [15, 17, 20, 22, 23 ], але існує не так багато ПЛР-аналізів для окремого виявлення представників родів *Microsporum*, особливо *Microsporum canis* (зоофільні види) та *Microsporum audouinii* (антропофільні види). Правильне розмежування цих видів є важливим з метою визначення джерела зараження для здійснення відповідних дій щодо усунення шляху передачі інфекції.

Група європейських дослідників оцінювала ефективність нового аналізу ПЛР у режимі реального часу (DermaGenius®2.0, PathoNostics BV, Маастрихт, Нідерланди) та нещодавно розробленого тесту мікрочипів (EUROArray Dermatomyosis, Euroimmun, Lübeck, Німеччина) для специфічної ідентифікації ДНК дерматофітів. Результати тестів порівнювали із даними звичайних методів та секвенування. Мікрочиповий тест на дерматофіти дає змогу виявити 50 дерматофітів і остаточно визначити 23 види дерматофітів, 6 дріжджів і цвілі, об'єднаних в одному тесті. Для порівняння: ПЛР у режимі реального часу дає можливість виявити 11 дерматофітів та одні дріжджі на видовому рівні. Використовуючи EUROArray, були правильно визначені 22 з 24 видів дерматофітів. За допомогою ПЛР у режимі реального часу правильно визначено 9 з 11 різних дерматофітів, що входять до складу набору. Обидва молекулярні тести для виявлення та диференціації дерматофітів є корисними інструментами для застосування у щоденній клінічній практиці. Тест ПЛР у реальному часі не виявляє стільки видів, а його специфічність є дещо нижчою. Однак це дуже швидкий і простий у виконанні тест, за даними якого виявляють дерматофіти, що зустрічаються найчастіше, такі як *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton interdigitale* та *Microsporum canis*. EUROArray є більш досконалим для виконання в лабораторії завдяки етапу гібридизації, однак має вищу специфічність і може виявити набагато ширший спектр збудників, включаючи рідкісні види, в дерматомікології [26].

Для швидкої та точної діагностики інфекції *Microsporum canis* у людей було запропоновано непрямий імуноферментний аналіз (I-ELISA). У дослідженні повідомляється про виробництво,

часткове очищення та аналіз SDS-PAGE міцельних антигенів *M. canis* і продукування специфічних поліклональних антитіл. Розроблено та оптимізовано непрямий IФА та оцінено його потенціал для діагностики. Чутливість методу I-ELISA становить 94,55 %, специфічність — 93,33 %, позитивні та негативні прогностичні значення — відповідно 96,30 та 90,32 %. Аналіз даних кривої робочої характеристики приймача (ROC) показав вищу діагностичну точність. Площа під кривою (AUC) становила 0,925. Значний коефіцієнт кореляції 0,8771 ( $p < 0,0001$ ) отримано між I-ELISA та методом грибкового посіву. Отже, це дослідження чітко демонструє виявлення специфічних антитіл за допомогою непрямого IФА з використанням антигенів *Microsporum canis*. Аналіз є чутливим, специфічним і простим у виконанні, забезпечує швидку та зручну діагностику дерматофітозу в людей [14].

У науковій літературі є дані щодо видової ідентифікації дерматофітів у біоптатах, вбудованих у парафін, за допомогою ПЛР, націленої на внутрішню транскрибовану спейсерну область 2 (ITS2), та відомості про порівняння з гістопатологічними ознаками. В дослідження було включено 121 біопсію 92 пацієнтів з клінічною підозрою на лишай. У 42 зразках клінічний діагноз підтверджено гістопатологічно, а в 79 — грибкових елементів не виявлено. ПЛР, спрямовану на ITS2 дерматофітів, проводили на біопсіях з подальшим секвенуванням. Зрізи переоцінювали на наявність/відсутність гіф/спор, малюнок та склад інфільтрату та епідермальні/фолікулярні зміни. Схеми обстеження пацієнтів переглянуто для отримання клінічних даних. Досягнуто таких результатів: новий ПЛР-аналіз ITS2 виявив 94 % дерматофітних інфекцій (порівняно з 79 %, виявленими за даними мікроскопії). *Trichophyton rubrum* був домінуючим (89 %), а іншими видами були *Trichophyton verrucosum* (2 %), *Microsporum canis* (4 %), *Epidermophyton floccosum* (2 %) та *Trichophyton interdigitale* (4 %). Зокрема, інфекції *Trichophyton interdigitale* та вияви з вираженим спонгіозом не діагностували гістологічно. Отже, молекулярну ідентифікацію видів дерматофітів за допомогою ПЛР ITS2 визнано легким і швидким методом [19].

Оцінювали ефективність комерційної мультиплексної тандемної ПЛР для виявлення дерматофітів та інших грибів у зразках шкіри і нігтів шляхом тестування низки референтних культур грибів та бактерій, ретроспективного тестування набору шкіри і зразки нігтів з відомими результатами мікроскопії та культури, і проспективне тестування зразків шкіри та нігтів паралельно з мікроскопією та засівом. Аналіз

AusDiagnostics дерматофітів та інших грибів точно виявив та ідентифікував низку поширених дерматофітів за видами, видовим комплексом або рівнем роду, а також *Candida*, *Aspergillus* та *Scopulariopsis spp.*, але не зміг виявити рідкісні дерматофіти, такі як *Nannizzia fulva* (раніше *Microsporium fulvum*) та *Paraphyton cookei* (раніше *Microsporium cookei*). За використання ПЛР виявлено дерматофіт у 25,9 % перспективних зразків, які дали негативний результат. Чутливість, специфічність, позитивна прогностична цінність та негативна прогностична цінність були найвищими там, де поєднувались результати мікроскопії та ПЛР, порівняно з мікроскопією та засівом, що свідчить про значний внесок мікроскопії у діагностичний пошук. Цей аналіз може зменшити робоче навантаження на отримання результатів культивування та ідентифікації дерматофітів, хоча мікроскопія залишається важливим методом дослідження [24].

У нашій країні діагноз мікроспорії ґрунтується на даних клінічного перебігу дерматозу та результатах лабораторних досліджень. Важливим методом діагностики і критерієм виліковності хворих на мікроспорію є люмінесцентний метод діагностики, при якому волосся і лусочки, уражені грибом роду *Microsporium*, світяться яскраво-зеленим кольором у променях лампи Вуда. Ця властивість флюоресцювати в променях лампи Вуда дає можливість майже зі 100 % точністю встановити діагноз мікроспорії, що також підтверджується даними інших методів лабораторної діагностики, які включають переважно мікроскопічний та культуральний методи.

Наразі ні в Україні, ні в провідних країнах світу не існує комерційних сертифікованих та достатньо клінічно апробованих тест-систем для ПЛР-діагностики *Microsporium canis*. Таким чином, застосування і впровадження у клінічну практику нового лабораторного підходу з видої ідентифікації *Microsporium canis* у ПЛР є актуальним завданням сучасної науки. Розробка і впровадження у клінічну практику нового діагностичного підходу поряд із сучасними методами лікування сприятиме удосконаленню діагностики, профілактики та терапії мікроспорії в Україні і світі.

У нашому дослідженні ми вирішили вивчити вже існуючі методики і розробити нову тест-систему для діагностики мікроспорії на основі ПЛР. Аналогом запропонованого методу є ПЛР-діагностика мікроорганізмів-патогенів людини [8]. Прототипом методу є ДНК-діагностика *Microsporium canis* за допомогою кількісної ПЛР [16]. Основна задача дослідження — розробити спосіб визначення ДНК *Microsporium canis* шляхом

ПЛР, що забезпечить ДНК-діагностику в умовах, які не потребують великих матеріальних та часових затрат. Основою розробки є ПЛР, яку на сьогодні визнано «золотим стандартом» в діагностиці різних захворювань та інфекцій.

Мета роботи — розробити методику сучасної молекулярно-генетичної діагностики мікроспорії у дітей на основі ПЛР, що дасть змогу ідентифікувати збудника *Microsporium canis* на рівні ДНК.

### Матеріали та методи

Під нашим спостереженням перебували 40 хворих на мікроспорію гладенької шкіри, волосистої частини голови, волосистої частини голови і гладенької шкіри. Клінічний діагноз у всіх пацієнтів підтверджено результатами досліджень методом ПЛР, а також мікроскопічного, культурального та люмінесцентного (у променях лампи Вуда) досліджень.

Біологічним матеріалом для дослідження слугували лусочки з гладенької шкіри та волосистої частини голови, волосся із волосистої частини голови хворих на мікроспорію.

Забір матеріалу для ПЛР-діагностики у 20 пацієнтів проводили шляхом зішкрібу лусочок з гладенької шкіри лезом скальпеля одноразового використання (стерильним), цитощіточкою або зондом для забору проб. У 18 хворих забір біоматеріалу з волосистої частини голови виконано шляхом видалення волосся епіляційним пінцетом та зішкрібу лусочок лезом скальпеля одноразового використання (стерильним), цитощіточкою або зондом для забору проб. Видалення ураженого волосся та лусочок у 10 пацієнтів проводили в променях лампи Вуда в темній кімнаті, що дало змогу взяти для дослідження волосся, уражене *Microsporium canis*, яке світилося яскраво-зеленим кольором. У 2 дітей забір біоматеріалу виконано за допомогою зішкрібу лусочок з волосистої частини голови та гладенької шкіри. Дослідний матеріал розміщували у пробірках «Еппендорф», що містили 1 мл транспортного середовища або стерильного ізотонічного розчину натрію хлориду, і зберігали в замороженому вигляді до проведення дослідження.

Досліджено 40 зразків біологічного матеріалу (лусочки з гладенької шкіри та волосистої частини голови, волосся із волосистої частини голови) у хворих на мікроспорію гладенької шкіри, мікроспорію волосистої частини голови, мікроспорію волосистої частини голови і гладенької шкіри.

На першому етапі проводили видалення ДНК з клінічного матеріалу (ДНК *Microsporium canis*) з використанням комерційного набору DNA-sorb-B nucleic acid extraction kit (AmpliSens, РФ) за протоколом фірми-виробника.

Таблиця. Структура та температура ренатурації праймерів для визначення *Microsporium canis*

Послідовність праймера 5'-3'	Температура ренатурації	
	Розрахункова	Фактична
MC F - AACGAGCGTCGAGTTTCATAACCC	63	65
MC R - GTTAGTATTCTGCTGAAGAGAAGGGC	65	65
APOE F - AAGCTGCGTAAGCGGCTCC	65	65
APOE R - TTCACCTCGTCCAGGCGGTC	65	65

Після виділення ДНК концентрацію та ступінь очищення її визначали спектрофотометрично (спектрофотометр СФ-46) за довжини хвилі 260–280 нм. Оптична щільність  $D = 1$  за довжини хвилі 260 нм відповідає приблизно 50 мкг/мл дволанцюгової ДНК. Відношення  $D_{260}/D_{280}$ , що дорівнює 1,8 або 2,0, свідчить про чистоту препарату ДНК.

Реакцію проводили в мікроцентрифужних пробірках об'ємом 0,6 мл на термоциклері «Терцик-2» виробництва «ДНК-технологии» (РФ) в 25 мкл ПЛР-суміші: 2,5 мкл 10-кратного буфера (670 мМ Tris — HCl, рН 8,8 за температури 25 °С, 20 мМ БСА, 166 мМ амонію сірчано-кислого  $(NH_4)_2SO_4$ , 100 мМ 2-β-меркаптоетанол), 1 мкл 2,5 мМ dNTP, по 0,5 мкл (0,1 опт. од.) кожного з праймерів, 1,5 мкл 50 мМ  $MgCl_2$ , зразок ДНК свині — до кінцевої концентрації в суміші 1 мкг/мл, 2–3 од. Таq ДНК-полімерази (*Thermus aquaticus*) (Державний науковий центр «ГосНИИгенетика», РФ, Москва).

На суміш нашаровували 25 мкл мінерального масла. Проводили 35 циклів ампліфікації за такими параметрами: 1 хв — 94 °С, 1 хв — 65 °С, 1 хв — 72 °С. Останній цикл ампліфікації: 5 хв — 72 °С.

У процесі ампліфікації використовували олігонуклеотидні праймери власної розробки (таблиця).

Потім проводили ПЛР для збільшення кількості копій ділянки ДНК за допомогою специфічних праймерів.

Для внутрішнього контролю перебігу ампліфікації та якості забору біоматеріалу нами було обрано фрагмент аполіпротеїну E — ділянки гена аполіпротеїну E людини, оскільки його досить часто використовують для внутрішнього контролю ампліфікації.

Наступною ланкою було електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації. Електрофоретичне розділення фрагментів ДНК проводили в 2 % агарозному гелі такого складу в 1,0-кратному тріс-боратному електрофорезному буфері (ТВЕ: 0,0879 М Tris, 0,089 М борна кислота  $(H_3BO_3)$ , 0,002 М ЕДТА рН 8,0) згідно з мето-

дичними рекомендаціями. Для нанесення зразків на гель використовували буфер 6 × Loading solution (Thermal scientific).

Потім здійснювали візуалізацію електрофореграм шляхом фарбування гелів у розчині етидію броміду (0,5 мкг/мл) з експозицією 10 хв з подальшою їхньою багаторазовою відмивкою у дистильованій воді. Візуалізацію фрагментів ДНК проводили в УФ-світлі на транслюмінаторі за довжини хвилі 310 нм. Фотодокументування виконували за допомогою системи гел-документації Cleaver Micro DOC (Велика Британія).

Контролювали розміри продуктів ампліфікації. Розміри отриманих за даними ПЛР продуктів на електрофореграмах виявляли за допомогою специфічного маркера маси (ДНК плазміді pUC19, обробленою ферментом рестрикції *MspI*) згідно з рекомендаціями та інструкцією фірми-виробника (Thermoscientific, ЄС) [9].

Для розробки тест-системи ПЛР для діагностики *Microsporium canis* аналізували такі первинні послідовності ДНК *Microsporium canis* з бази даних NCBI — KU897019, XM\_002845542, XM\_002848601, XM\_002848521, XM\_002850842, XM\_002843730, XM\_002844911, XM\_002843632, XM\_002844171, XM\_002843982 [16]. Дані послідовності завантажували для подальшого підбору праймерів.

Наступним етапом роботи був підбір олігонуклеотидних праймерів для ПЛР. Для досягнення поставленої мети ми копіювали послідовності до текстового редактора Word та формували послідовність суцільним текстом. Власне підбір праймерів відбувався за допомогою програми FastPCR ver 6.3. При виконанні програма видає можливі праймери з раніше вибраними характеристиками [21].

Наступним етапом розробки тест-системи була перевірка обраних праймерів на первинній послідовності з метою вибору найбільш придатних праймерів для лабораторних досліджень (розмір майбутнього ампліфікованого фрагмента).

Такі самі кроки робили для розробки системи праймерів гена аполіпротеїну E людини.

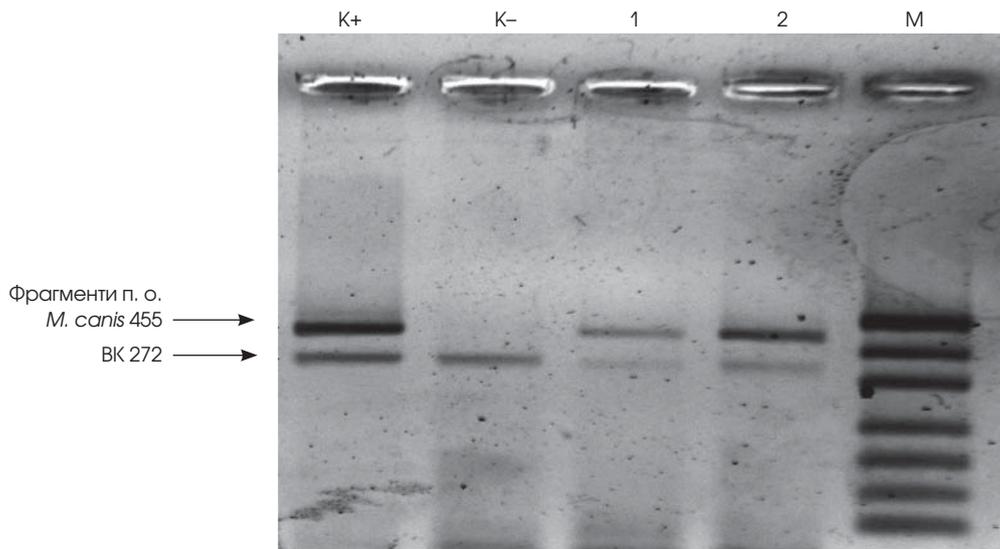


Рис. 1. Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації, де K+ і K- — позитивний і негативний контролі; 1 і 2 — продукти ампліфікації суміші ДНК з культури *M. canis* та людини; M — маркер молекулярного розміру pUC19/MspI

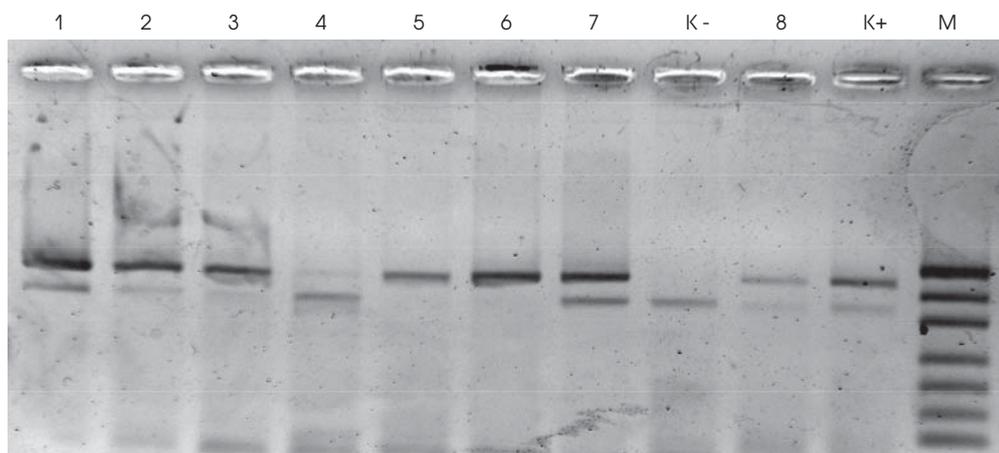


Рис. 2. Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації, де 1—8 — продукти ампліфікації ДНК з клінічного матеріалу; K+ і K- — позитивний і негативний контролі; M — маркер молекулярного розміру pUC19/MspI

Основною проблемою був підбір праймерів внутрішнього контролю таким чином, щоб температури ренатурації праймерів цільового призначення і внутрішнього контролю співпадали. При цьому ампліфіковані фрагменти мають відрізнятися за розміром, що придатний для електрофоретичного розділення фрагментів. Також перевіряли можливість праймерів гібридуватися між собою. Так, ампліфікований фрагмент гена *Microsporium canis* був розміром 455 п. о., тоді як продукт ПЛР гена АПОЕ внутрішнього контролю — 272 п. о.

На наступному етапі відпрацьовували ампліфікацію зі зразками ДНК, виділених з культур *Microsporium canis*, та контрольної ДНК людини. Для цього використовували ДНК, виділену з

200 мкл венозної крові, що додавали в пробірки як окремо, так і в суміші (рис. 1). Після одержання позитивних результатів ПЛР робили на клінічних зразках.

Заключним етапом було типування 40 зразків клінічного матеріалу пацієнтів (рис. 2).

### Результати та обговорення

Досліджено 40 зразків біологічного матеріалу (лусочки з гладенької шкіри та волосистої частини голови, волосся із волосистої частини голови) у хворих на мікроспорію гладенької шкіри, мікроспорію волосистої частини голови, мікроспорію волосистої частини голови і гладенької шкіри.

У всіх хворих на мікроспорію діагноз підтверджено результатами досліджень методом

ПЛР, а також даними мікроскопічного, культурального та люмінесцентного досліджень. Із клінічного матеріалу було виділено ДНК, яку перевірено за допомогою постановки на 2 % агарозному гелі-електрофорезі. Для визначення ДНК мікроспорії проведено 40 ПЛР-постановок.

При дослідженні в усіх 40 зразках виявлено ДНК *Microsporum canis*.

В основу дослідження покладено метод ПЛР — циклічний процес, кожний цикл якого складається з трьох етапів:

- 1) денатурація нуклеїнової кислоти, що досліджується;
- 2) ренатурація нуклеїнової кислоти з олігонуклеотидними праймерами, що обмежують ампліфіковану ділянку;
- 3) синтез обмеженої праймерами ділянки ДНК до рівня виявлення. Тривалість циклу становила 1,5–3 хв, а кількість циклів залежно від кількості вихідного матеріалу — від 30 до 40. Головним параметром, що визначає специфічність та чутливість ПЛР, є «якість» праймерів: ступінь їхньої гомології з ДНК-матрицею, відсутність взаємної і неспецифічної ренатурації та електрофоретичного фракціонування продуктів ампліфікації в агарозному гелі.

Етапи дослідження включали:

1. Отримання біоматеріалу (зішкріб лусочок шкіри та видалення волосся) від об'єкта дослідження.
2. Виділення ДНК з біоматеріалу.
3. Здійснення ПЛР для збільшення кількості копій ділянки ДНК за допомогою специфічних праймерів.

Структура специфічних праймерів МС

- МС (ділянка гена бета тубуліну *Microsporum canis*):
  - МС (ділянка гена бета тубуліну *Microsporum canis*);
- АРОЕ (ділянка гена аполіпопротеїну Е людини як внутрішній контроль та контроль якості взяття біоматеріалу):
  - прями праймер: 5'-AACGAGCGTTCGAGTTTCATAACCC-3';
  - зворотний праймер: 5'-GTTAGTATTCTGCTGAAGAGAAGGGC-3';
  - АРОЕ (ділянка гена аполіпопротеїну Е людини як внутрішній контроль та контроль якості взяття біоматеріалу);
  - прями праймер: 5'-AAGCTGCGTAAGCGGCTCC-3';
  - зворотний праймер: 5'-TTCACCTCGTCCAGGCGGTC-3'.

Схема ПЛР:

Перший цикл ПЛР: 94 °С — 3 хв; наступних 35 циклів: 94 °С — 30 с, 65 °С — 30 с, 72 °С — 30 с; останній: 72 °С — 5 хв.

Розділяли отримані фрагменти в 2 % агарозному гелі з довжиною пробігу 8 см, фарбували етидію бромідом, переглядали в ультрафіолетовому світлі та фотодокументували.

Потім аналізували результати досліджень. Фрагменти, що утворилися, порівнювали зі стандартами молекулярного розміру та визначали наявність чи відсутність продуктів ПЛР, які мають бути розміром 272 пари нуклеотидів в усіх пробах (внутрішній контроль), та фрагмент 455 пар нуклеотидів за наявності *Microsporum canis* у пробі.

У способі ДНК-діагностики *Microsporum canis* на основі ПЛР специфічними олігонуклеотидними праймерами, які дають змогу отримувати продукти ампліфікації 272 та 455 пар нуклеотидів, є:

- МС (ділянка гена бета тубуліну *Microsporum canis*):

- прями праймер: 5'-AACGAGCGTTCGAGTTTCATAACCC-3';
- зворотний праймер: 5'-GTTAGTATTCTGCTGAAGAGAAGGGC-3';
- АРОЕ (ділянка гена аполіпопротеїну Е людини як внутрішній контроль та контроль якості взяття біоматеріалу);
- АРОЕ (ділянка гена аполіпопротеїну Е людини як внутрішній контроль та контроль якості взяття біоматеріалу):
  - прями праймер: 5'-AAGCTGCGTAAGCGGCTCC-3';
  - зворотний праймер: 5'-TTCACCTCGTCCAGGCGGTC-3'.

У нашому дослідженні розроблено метод діагностики мікроспорії на основі ПЛР, за якого було використано набір двох праймерів МС (ділянки гена бета тубуліну *Microsporum canis*). Для внутрішнього контролю перебігу ампліфікації та якості забору біоматеріалу також застосовано специфічні праймери АРОЕ (ділянки гена аполіпопротеїну Е людини).

## Висновки

З метою вдосконалення точної специфічної діагностики мікроспорії у дітей розроблено методу сучасної молекулярно-генетичної діагностики на основі ПЛР, що дає змогу ідентифікувати збудника *Microsporum canis* на рівні ДНК. Аналіз молекулярної структури геному *Microsporum canis* довів, що найбільш об'єктивним методом діагностики мікроорганізмів є ПЛР. Розроблений метод ДНК-діагностики на основі ПЛР із використанням специфічних праймерів може бути включений в алгоритм виявлення *Microsporum canis* у людей.

## Список літератури

1. Антонова С.Б. Современные клинико-эпидемиологические особенности заболеваемости дерматомикозами у детей. Оптимизация диагностических, медико-профилактических технологий [диссертация].— Екатеринбург, 2019.— 118 с.
2. Антонова С.Б., Уфимцева М.А. Заболеваемость микроспорией: эпидемиологические аспекты, современные особенности течения // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского.— 2016.— № 95 (2).— С. 142–146.
3. Лаврушко С.І. Клінічний випадок та лікування микроспорії волосистої частини голови і нігтя кисті // Укр. журн. дерматол., венерол., косметол.— 2020.— № 3 (78).— С. 44–49. doi: 10.30978/UJDVK2020-3-44.
4. Лаврушко С.І., Дудченко М.О. Оптимізація лікування микроспорії гладенької шкіри // Укр. журн. дерматол., венерол., косметол.— 2018.— № 3 (70).— С. 43–54. doi: 10.30978/UJDVK2018-3-43.
5. Лаврушко С.І., Степаненко В.І. Оптимізація сучасного комплексного лікування микроспорії у спортсменів з урахуванням клінічного перебігу дерматозу // Укр. журн. дерматол., венерол., косметол.— 2020.— № 3 (78).— С. 29–38. doi: 10.30978/UJDVK2020-3-29.
6. Лаврушко С.І., Степаненко В.І., Дудченко М.О., Павленко Г.П. Сучасні погляди на лікування микроспорії у дітей з урахуванням етіології, патогенезу та особливостей клінічного перебігу дерматозу // Укр. журн. дерматол., венерол., косметол.— 2018.— № 4 (71).— С. 16–25. doi: 10.30978/UJDVK2018-4-16.
7. Медведева Т.В., Леина Л.М., Чилина Г.А. и др. Микроспория: современное представление о проблеме (описание клинических случаев и обзор литературы) // Пробл. медицинской микологии.— 2020.— № 22 (2).— С. 12–22. doi: 10.24412/1999-6780-2020-2-12-21.
8. Муталпяпова Г.З. Проблемы диагностики инфекций, передающихся половым путем, методом полимеразной цепной реакции // Клин. медицина Казахстана.— 2011.— № 3–4.— С. 22–23.
9. Методы молекулярной генетики и геномной инженерии / Под ред. Р.И. Салганика.— Новосибирск: Наука, 1990.— 247 с.
10. Селютин О.В. Микроспория лобковой области, вопросы диагностики // Успехи мед. микологии.— 2016.— № 15.— С. 213–214.
11. Титова Т.Н., Мавзютов А.Р., Ефимов Г.Е. Сравнительная оценка информативности методов лабораторной диагностики микроспории // Успехи мед. микологии.— 2014.— № 13.— С. 196–198.
12. Уфимцева М.А., Антонова С.Б., Бочкарев Ю.М. и др. Уральский государственный медицинский университет, патентообладатель. Способ дифференциальной диагностики микроспории волосистой части головы и гнездовой алопеции у детей. Патент РФ № 2609204.— 2017.— Ноябрь 20.
13. Харисова А.Р., Хисматуллина З.Р. Трудности в диагностике инфильтративно-нагноительной микроспории. Клинический случай // Пробл. мед. микологии.— 2018.— № 20 (4).— С. 31–33.
14. Aruna G.L., Ramalingappa B. Development and evaluation of indirect enzyme linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of *Microsporium canis* infection in humans // J. Mycol. Med.— 2018.— Vol. 28, N 2.— P. 285–288. doi: 10.1016/j.mycmed.2018.01.007.
15. Bergmans A.M., van der Ent M., Klaassen A. et al. Evaluation of a single-tube real-time PCR for detection and identification of 11 dermatophyte species in clinical material // Clin. Microbiol. Infect.— 2010.— Jun.— Vol. 16, N 6.— P. 704–710. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.02991.x.
16. Ciesielska A., Stączek P. Selection and validation of reference genes for qRT-PCR analysis of gene expression in *Microsporium canis* growing under different adhesion-inducing conditions // Sci. Rep.— 2018.— Vol. 8, N 1.— P. 1197.
17. Didehdar M., Shokohi T., Khansarinejad B. et al. Characterization of clinically important dermatophytes in North of Iran using PCR-RFLP on ITS region // J. Mycol. Med.— 2016.— Vol. 26, N 4.— P. 345–350. doi: 10.1016/j.mycmed.2016.06.006.
18. Diongue K., Boye A., Bréhard L. et al. Dermatophytic mycetoma of the scalp due to an atypical strain of *Microsporium audouinii* identified by MALDI-TOF MS and ITS sequencing // J. Mycol. Med.— 2019.— Vol. 29, N 2.— P. 185–188. doi: 10.1016/j.mycmed.2019.03.001.
19. Eckert J.C., Ertas B., Falk T.M. et al. Species identification of dermatophytes in paraffin-embedded biopsies with a new polymerase chain reaction assay targeting the internal transcribed spacer 2 region and comparison with histopathological features // Br. J. Dermatol.— 2016.— Vol. 174, N 4.— P. 869–877. doi: 10.1111/bjd.14281.
20. Hayette M.P., Seidel L., Adjety C. et al. Clinical evaluation of the DermaGenius® Nail real-time PCR assay for the detection of dermatophytes and *Candida albicans* in nails // Med. Mycol.— 2019.— Vol. 57, N 3.— P. 277–283. doi: 10.1093/mmy/myy020.
21. Kalendar R., Lee D., Schulman A.H. Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis // Genomics.— 2011.— Vol. 98, N 2.— P. 137–144.
22. Kobylak N., Bykowska B., Kurzyk E. et al. PCR and real-time PCR approaches to the identification of *Arthroderma otae* species *Microsporium canis* and *Microsporium audouinii*/*Microsporium ferrugineum* // J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.— 2016.— Vol. 30, N 10.— P. 1819–1822. doi: 10.1111/jdv.13681.
23. Liu D., Pearce L., Lilley G. et al. A specific PCR assay for the dermatophyte fungus *Microsporium canis* // Med. Mycol.— 2001.— Vol. 39, N 2.— P. 215–219. doi: 10.1080/mmy.39.2.215.219.
24. Ross I.L., Weldhagen G.F., Kidd S.E. Detection and identification of dermatophyte fungi in clinical samples using a commercial multiplex tandem PCR assay // Pathology.— 2020.— Vol. 52, N 4.— P. 473–477. doi: 10.1016/j.pathol.2020.03.002.
25. Sato T., Asahina Y., Toshima S. et al. Usefulness of Wood's Lamp for the Diagnosis and Treatment Follow-up of Onychomycosis // Med. Mycol. J.— 2020.— Vol. 61, N 2.— P. 17–21. doi: 10.3314/mmj.20-00004.
26. Uhrhlaß S., Wittig F., Koch D. et al. Do the new molecular assays-microarray and realtime polymerase chain reaction-for dermatophyte detection keep what they promise? // Hautarzt.— 2019.— Vol. 70, N 8.— P. 618–626. doi: 10.1007/s00105-019-4447-z.
27. Witkowska E., Jagielski T., Kamińska A. Genus- and species-level identification of dermatophyte fungi by surface-enhanced Raman spectroscopy // Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.— 2018.— Vol. 192.— P. 285–290. doi: 10.1016/j.saa.2017.11.008.
28. Ye F., Li M., Zhu S. et al. Diagnosis of dermatophytosis using single fungus endogenous fluorescence spectrometry // Biomed. Opt. Express.— 2018.— Vol. 9, N 6.— P. 2733–2742. doi: 10.1364/BOE.9.002733.
29. Zhan P., Liu W. The Changing Face of Dermatophytic Infections Worldwide // Mycopathologia.— 2017.— Vol. 182, N 1–2.— P. 77–86. doi: 10.1007/s11046-016-0082-8.

С.И. Лаврушко<sup>1–3</sup>, В.И. Степаненко<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Полтавский государственный медицинский университет

<sup>2</sup>КП «Полтавский областной клинический кожно-венерологический диспансер Полтавского областного совета»

<sup>3</sup>Медицинская клиника «Элитмед+», Полтава

<sup>4</sup>Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, Киев

## Современная диагностика микроспории

**Цель работы** — разработать методику современной молекулярно-генетической диагностики микроспории у детей на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), что позволит идентифицировать возбудителя *Microsporium canis* на уровне ДНК.

**Материалы и методы.** Под наблюдением находились 40 больных с микроспорией гладкой кожи, волосистой части головы, волосистой части головы и гладкой кожи. В роли биологического материала для исследования выступали чешуйки с гладкой кожи и волосистой части головы, волосы с волосистой части головы больных микроспорией. Исследовано 40 образцов биологического материала у больных с микроспорией гладкой кожи, микроспорией волосистой части головы, микроспорией волосистой части головы и гладкой кожи. На первом этапе проводили выделение ДНК *Microsporium canis*, затем — ПЦР для увеличения количества копий участка ДНК с помощью специфических праймеров. Заключительным этапом было типирование 40 образцов клинического материала пациентов.

**Результаты и обсуждение.** Проведение ПЦР-диагностики дало возможность выявить ДНК *Microsporium canis* во всех 40 образцах биологического материала у больных с микроспорией. В нашем исследовании разработан метод диагностики микроспории на основе ПЦР, который использует набор двух праймеров МС (участки гена бета тубулина *Microsporium canis*). Для внутреннего контроля течения амплификации и качества забора биоматериала также использованы специфические праймеры АРОЕ (участка гена аполипопротеина Е человека).

**Выводы.** Для совершенствования точной специфической диагностики микроспории у детей разработана методика современной молекулярно-генетической диагностики на ПЦР, что позволяет идентифицировать возбудителя *Microsporium canis* на уровне ДНК. Анализ молекулярной структуры генома *Microsporium canis* доказал, что наиболее объективным методом диагностики микроорганизмов является ПЦР. Разработанный метод ДНК-диагностики на основе ПЦР с использованием специфических праймеров может быть включен в алгоритм выявления *Microsporium canis* у людей.

**Ключевые слова:** микроспория, *Microsporium canis*, диагностика, полимеразная цепная реакция.

S.I. Lavrushko<sup>1–3</sup>, V.I. Stepanenko<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Poltava State Medical University

<sup>2</sup>ME «Poltava Regional Clinical Dermatovenerologic Dispensary of Poltava Regional Council»

<sup>3</sup>Medical Clinic «Elitmed+», Poltava

<sup>4</sup>Bogomolets National Medical University, Kyiv

## Modern diagnostics of microsporia

**Objective** — to develop a method of modern molecular genetic diagnosis of microsporia in children based on polymerase chain reaction (PCR), which will allow identification of the pathogen of *Microsporium canis* at the DNA level.

**Materials and methods.** The study included 40 patients with microsporia of smooth skin, scalp, scalp and smooth skin. The biological materials for the research were scales from the smooth skin and scalp, hair from the scalp of patients with microsporia. A study of 40 samples of biological material was carried out in patients with microsporia of smooth skin, microsporia of the scalp, microsporia of the scalp and smooth skin. At the first stage, DNA isolation of *Microsporium canis* was carried out. Then PCR was carried out to increase the copies of the DNA region using specific primers. The final step was typing 40 samples of clinical material of patients.

**Results and discussion.** PCR diagnostics made it possible to identify the DNA of *Microsporium canis* in all 40 samples of biological material of patients with microsporia. In our study, we developed a PCR-based method for diagnosing microsporia, which uses a set of two MC primers (regions of the beta tubulin gene of *Microsporium canis*). For internal control of the course of amplification and the quality of biomaterial sampling, specific primers of APOE (a region of the human apolipoprotein E gene) were also used.

**Conclusions.** In order to improve the precise specific diagnosis of microsporia in children, a method of modern molecular genetic diagnostics based on polymerase chain reaction (PCR) has been developed, which allows identification of the *Microsporium canis* pathogen at the DNA level. Analysis of the molecular structure of the genome of *Microsporium canis* proved that the most objective diagnosis of microorganisms is the PCR method. The developed method of DNA diagnostics based on PCR using specific primers can be included in the algorithm for detecting *Microsporium canis* in humans.

**Key words:** microsporia, *Microsporium canis*, diagnostics, polymerase chain reaction.

### Дані про авторів:

Лаврушко Світлана Іванівна, аспірант кафедри шкірних та венеричних хвороб Полтавського державного медичного університету 36011, м. Полтава, вул. Шевченка, 23. E-mail: lavruskosvitlana@gmail.com

Степаненко Віктор Іванович, д. мед. н., проф., зав. кафедри дерматології та венерології з курсом косметології