

# ДЕРМАТОМИКОЗЫ, ИЛИ ПОВЕРХНОСТНЫЕ МИКОЗЫ КОЖИ И ЕЁ ПРИДАТКОВ – ВОЛОС И НОГТЕЙ. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

**Елинов Н.П. (зам. директора по НИР),  
Васильева Н.В. (директор),  
Разнатовский К.И. (зав. каф.  
дерматовенерологии)**

НИИ медицинской микологии им.П.Н.Кашкина ГОУ  
ДПО СПб МАПО, Санкт-Петербург, Россия  
© Елинов Н.П., Васильева Н.В., Разнатовский К.И., 2008

Представлены современные материалы о дерматомицетах, их систематическом положении с учётом бесполой и половой форм; уделено достаточное внимание геофилам, зоофилам и антропофилам с эпидемиологической точки зрения. Затронуты отдельные ферменты патогенности дерматомицетов. Приведены 5 главных эпидемиологических групп, вызывающих микозы головы и тела. Достаточно подробно описана лабораторная диагностика дерматомикозов, а также определение их возбудителей.

**Ключевые слова:** анаморфы, дерматомицеты, лабораторная диагностика, микозы кожи и её придатков, патогенность, телеоморфы, ферменты

## DERMATOMYCOSES, OR SUPERFICIAL MYCOSES OF SKIN AND ITS APPENDAGES – HAIRS AND NAILS. LABORATORY DIAGNOSIS

**Yelinov N.P. (deputy director for  
Research Programs), Vasilyeva N.V.  
(director) Raznatovsky K.I. (head of a  
dermatovenerology department)**

Kashkin Research Institute of Medical Mycology, SEI APE  
SPb MAPE Minzdravsocdevelopment, Saint Petersburg,  
Russia

© Yelinov N.P., Vasilyeva N.V., Raznatovsky K.I., 2008

The contemporary materials about dermatomycetes, their systematic position with take into consideration an anamorphous and teleomorphous forms have presented in this article. A sufficient

attention have been spared to Geophilic, Zoophilic and Anthrophilic since epidemiologic point of view. Separate enzymes of pathogenicity of dermatomycetes have been also touched on. Five main epidemiologic groups inducing mycoses of head and body. The laboratory diagnosis of dermatomycoses and a definition of their pathogens have described in detail enough.

**Key words:** anamorphous and teleomorphous dermatomycetes, laboratory diagnosis, mycoses of skin and its appendages, pathogenicity enzymes

Дерматомикозы в англо-язычной научной литературе обозначают как ringworm или tinea (по-англ. ring – круглый (-ая) или кольцевидный (-ая); worm – червь, змея; ringworm – контактное поражение кожи кольцевидной формы, вызванное патогенными грибами; по-лат. tinea – кожное грибковое заболевание, особенно – волосистой части головы). Это – грибковые поражения кератин-содержащих тканей – волос, ногтей, кожи у людей и животных из царства *Animalia*, причём грибы (за редким исключением) не проникают в глубокие ткани [1].

Дерматомицеты – повсеместно распространены по миру. Большинство из них являются космополитами, хотя некоторые виды могут быть отнесены к эндемичным видам, например, *Trichophyton yaoundei* – эндемик для экваториальной Африки. Однако из-за больших миграционных процессов людей и развития туризма по заграничным странам возможен занос эндемичных видов в ранее не типичные для них регионы с последующим возможным распространением среди человеческой популяции.

До конца прошлого века дерматомицеты относили к несовершенным грибам, или дейтеромицетам (*Fungi imperfecti*, *Deuteromycetes*). В 1986 году [2] у представителей родов *Microsporum* и *Trichophyton* были описаны половые формы – телеоморфы, известные как представители рода *Arthroderma* в семействе *Arthrodermataceae*. Таким образом, систематическое положение бесполой форм (анаморф) и половых – телеоморф дерматомицетов можно представить в следующем виде:

Надцарство (Домен) – *Eukaryota*  
Царство – *Fungi*  
Отдел – *Eumycota*  
Класс – *Ascomycetes*  
Порядок – *Onygenales*  
Семейство – *Arthrodermataceae*

Роды:

- I. Телеоморфное состояние – *Arthroderma*:
- Ia) Анаморфное состояние – 1) *Trichophyton*  
2) *Microsporum*
- II. Телеоморфное состояние – неизвестно (?)
- IIa) Анаморфное состояние – 1) *Epidermophyton*

Таким образом, из описанных 42 анаморфных видов дерматомицетов лишь 2 относят к роду *Epidermophyton*, 16 – к роду *Microsporum* и 24 – к роду *Trichophyton*. Они сравнительно родственные организмы, но их видовые морфо-физиологические характеристики и экологическая приуроченность

достаточно индивидуальные.

Дерматомицеты могут поражать кератин-содержащие ткани у человека и животных благодаря активности ферментов кератиназ. Субстраты, содержащие названный склеропротеин, попадают в почву, где медленно разрушаются (гидролизуются) и способны выступать резервуаром болезнетворных дерматомицетов. Заметим, что кератин и родственные ему белки в сумме достигают 25% массы тела млекопитающего.

Среди кератинофильных грибов имеются не только грибы – патогены, но и не патогенные кератинофилы. Теперь известно, что дерматомицеты могут быть болезнетворными лишь в анаморфной фазе своего развития, телеоморфа – непатогенна. Это важно знать клиническим и лабораторным микологам с точки зрения оценки вида выявляемого гриба в патологическом материале, для постановки достоверных клинического и лабораторного диагнозов, а также адекватного выбора лекарственных средств для конкретного больного.

Названия дерматомицетов то как кератинофилы, то как кератинолитики не совсем тождественные, поскольку в сапробном, или сапротрофном состоянии они способны «переваривать» кератин вне организма (в среде обитания) и использовать его в качестве углерод- и азотсодержащего субстрата; другие способны заражать организм человека и проникать в соответствующие ткани. По форме (морфологии) гриб в паразитической фазе (кератинолитик) отличается от гриба – кератинофила, выросшего на кератин-содержащей питательной среде.

Кератинолитические грибы более редки в сточных водах и в грязях из сточных вод, они могут быть биопоказателями (биоиндикаторами) загрязнения окружающей среды разными отбросами и также содержащимися в них потенциальными патогенами.

Для патогенных анаморфных родов дерматомицетов известно порядка 30 синонимов; для 42 видов ≈ 1000 синонимичных названий. Это, несомненно, привносит определённые трудности в видовое определение возбудителей дерматомикозов. Кроме того, дерматомицетам присуща выраженная изменчивость, особенно — при их длительном выращивании на питательных средах в лабораторных условиях. Вот почему ряд исследователей говорят и пишут о комплексности некоторых видов дерматомицетов. Так, выделяют, по крайней мере, 4–5 вариантов у *Trichophyton mentagrophytes*, которые обнаруживали в плавательных бассейнах, на щетине кабанов, на волосах кошек и собак, домашнего скота, в домашней обуви и т.д. Из вариантов этого вида называют *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*, var. *interdigitale*, var. *erinacei*, var. *quinckeanum*. Комплексными видами также признают *T. terrestre* и *Microsporium gypseum-fulvum*.

С эпидемиологической точки зрения важно знать, что дерматомицеты более или менее чётко подразделяют на *антропофилы*, *зоофилы* и *геофи-*

*лы*, подчёркивая их преимущественную приуроченность к среде обитания. Антропофилы вызывают заболевания у людей, сравнительно редко — у животных. К ним относят: *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium audouinii*, *M. ferrugineum*, *Trichophyton concentricum*, *T. gourvilii*, *T. megninii*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, *T. raubitschekii* (сходен с *T. rubrum*), *T. rubrum*, *T. schoenleinii*, *T. soudanense*, *T. tonsurans*, *T. violaceum*, *T. yaoundei*; большинство из них — космополиты, тогда как некоторые типичны для Африканского континента — *T. gourvilii*, *T. soudanense* и *T. yaoundei*; для Западной Европы и Африки — *T. megninii*, для Азии, Латинской Америки и Океании — *Trichophyton concentricum*; для Восточной Европы, Дальнего Востока, Западной Африки — *M. ferrugineum*.

Зоофильные дерматомицеты — патогены животных, хотя они могут вызывать заболевания и у людей. К ним относят: *Microsporium canis* var. *canis*, *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*, *T. mentagrophytes* var. *erinacei*, *T. mentagrophytes* var. *quinckeanum*, *T. verrucosum*; к поражающим только животных и, редко, людей относят *Microsporium canis* var. *distortum* (поражает обезьян, собак, кошек, грызунов); *M. galline* (поражает домашнюю птицу); *T. equinum* (поражает лошадей, рогатый скот).

Геофильными дерматомицетами, способными поражать и человека, являются *Microsporium cookei*, *M. fulvum*, *M. gypseum*, *M. nanum*, *M. persicolor*, *M. praecox*, *M. racemosum*, *M. vanbreuseghemii*, *T. simii*; из них наиболее частыми патогенами для людей называют *M. fulvum* и *M. gypseum*. А виды *M. nanum* и *M. persicolor* некоторые авторы относят к зоофильным.

На основании молекулярно-генетических исследований авторы [3] признают также три главные группы дерматомицетов, преимущественно совпадающих с подразделением их по экологическим и клиническим характеристикам; одна группа состоит, главным образом, из антропофильных видов рода *Trichophyton*; преобладающе зоофильные виды рода *Microsporium* являются «парафилетическими» по отношению к первой (антропофильной) группе дерматомицетов; геофилы оказались высокодивергентными (расходящимися; от англ. слова divergence — расхождение).

Адаптация, или приспособление к человеческому организму — хозяину сопровождалась постепенной потерей грибом сексуальности, то есть утратой им половой фазы развития.

В последнее десятилетие проведены исследования ферментативной активности ряда дерматомицетов и, прежде всего, протеолитической в целях формирования приблизительных представлений о ферментах как факторах патогенности. Установлено, что дерматомицеты образуют различные протеазы, способные разрушать  $\gamma$ -глобулины, ламинин, фибронектин,  $\alpha 1p1$  кератин и фибриллярный белок — коллаген.

У представителей рода *Microsporum*, например, *M. canis* обнаружено 6 протеиназ с различной молекулярной массой. Полагают, что ферменты с молекулярной массой 122, 62 и 25 кДа индуцируются при переходе сапротрофной (неболезнетворной) формы гриба в паразитическую. И всё же роль протеиназ в обеспечении свойств вирулентности остаётся ещё окончательно не доказанной.

Дерматомицеты, поражающие человека, обычно локализуются на определённых участках тела – на коже, ногтях и волосах. Например, при хронических, не воспалительных, шелушащихся поражениях ладони, вызванных *T. rubrum* (трихофитон красный), можно отметить гиперкератоз с небольшим кожным инфильтратом. При керионе (гнойное поражение на скальпе), вызванном *T. verrucosum*, типично образование плотного инфильтрата кожи из лимфоцитов, плазматических клеток, нейтрофилов и эозинофилов.

В случае периваскулярного воспаления можно думать об аллергическом васкулите. Фолликулиты обычно характеризуются остатками грибов в фолликулах, а перифолликулярное воспаление может включать гигантские клетки и нейтрофилы.

Грибные гифы в коже – случайная картина для кериона, но интегральную часть «дерматомицетной» мицеломы фактически резонно называют диссеминированным грибковым заболеванием кожи. При мицеломе гифы в дерме граничат с зёрнами [1]. При других причинных агентах мицеломы грибные гифы погружаются в эозинофильный матрикс. Вокруг зёрен имеются нейтрофилы, позади которых – грануломатозное воспаление, включающее гигантские и эпителиальные клетки.

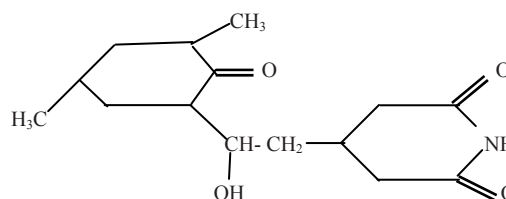
По свойствам патогенности (болезнетворности) грибы относят к разным группам опасности (HG, по-англ. hazard group), начиная с первой – Н 1 – не болезнетворной (или менее и почти непатогенной) для взрослого здорового человека; ко второй группе относят более патогенные виды, например, дерматомицеты (относят к HG 2) и, кончая третьей группой, к которой относят высоко патогенные виды (например, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* и др.). Поэтому работа с ними в лабораторных условиях оговорена специальными положениями.

Выделяют также уровни безопасности (BSL, по-англ. biosafety levels) при работе с микроскопическими грибами – микромицетами, их три: *первый*, когда используют известные средства и оборудование, применяемые в обычной (стандартной) микробиологической работе, но грибы, включённые в эту группу, не известны в качестве патогенов для взрослого здорового человека.

*Второй* уровень рассчитан на микромицеты, вызывающие заболевания у взрослых людей, например, дерматомицеты; при этом уровне безопасности необходимо дополнить первый уровень специальной лабораторной одеждой («глухими» халатами, головными колпаками или шапочками, специальными

перчатками), а также проводить обеззараживание всех инфицированных отходов во избежание риска заразиться данной группой патогенных грибов; следует также разместить знаки биоопасности в соответствующих местах.

Наконец, при работе с грибами *третьей* группы безопасности целесообразно иметь (или организовать) специальную комнату – кабинет, в которой необходимо содержать специальную одежду и некоторое необходимое оборудование в приближённом подобии к противочумным одежде и кабинету. Персонал, работающий с грибами третьего уровня безопасности, должен быть хорошо подготовленным и высокоопытным профессионально. Медицинский миколог — лабораторный или клинический должен всегда помнить, что грибы, как правило, являются патогенами в анаморфном состоянии!



Циклогексими́д (актидион)

Необходимо помнить и о том, что дерматомицеты устойчивы к циклогексими́ду, обычно добавляемому в питательные среды в целях ингибирования сапротрофных мицелиальных грибов. На жидкой глюкозопептонной среде дерматомицеты растут с возрастанием pH выше 7,0. В качестве объектов исследования приходится анализировать образцы почв или других материалов с размельчением и истиранием их в стерильных ёмкостях.

#### Главные эпидемиологические группы дерматомицетов.

##### *I. Микозы головы и тела:*

1. Обычно эпидемические (поражённые волосы флуоресцируют в лучах лампы Вуда). Возбудители – *Microsporum audouinii*, *M. ferrugineum*.

2. Обычно спорадические (поражённые волосы флуоресцируют в лучах лампы Вуда). Возбудители – *M. canis* var. *canis*, *M. canis* var. *distortum*.

*II. 1. Эпидемические* (без флуоресценции волос в лучах лампы Вуда). Возбудители: *Trichophyton tonsurans*, *T. violaceum*, *T. gourvilii*, *T. soudanense*, *T. yaoundei*.

2. Эпидемический фавус – скутулярный и чешуйчатый. Возбудитель – *T. schoenleinii*.

*III. 1. Эпидемический микоз бороды и ассоциированные микозы тела и головы.* Возбудитель – *T. megninii*.

2. Частые и спорадические микозы головы, бороды и тела. Возбудители: *T. mentagrophytes*, *T. verrucosum*, *M. gypseum*.

Редкие спорадические микозы головы, бороды и тела. Возбудители: *T. equinum*, *T. gallinae*, *M. fulvum*, *M. nanum*, *M. vanbreuseghemii*.



Редкие микозы головы и бороды, обычные как микозы тела. Возбудитель: *T. rubrum*.

IV. Эпидемические микозы тела. Возбудители: *Epidermophyton floccosum*, *T. rubrum*, *T. concentricum*.

Эпидемические микозы и интертригинозный (паховый) микоз тела. Возбудители: *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *E. floccosum*.

## ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ДЕРМАТОМИКОЗОВ

При любом грибковом заболевании необходимо убедиться и/или доказать, что причинным агентом при этом является патогенный микромицет. Клинические проявления многих микозов, часто выявляемых в Российской Федерации, например, дерматомикозов, кандидоза кожи и слизистых оболочек, онихомикозов и некоторых других, хорошо известны специалистам. И в тоже время большое количество врачей разных специальностей ещё недостаточно знакомы с названными микромицетами и их идентификацией (включая некоторые методы, предложенные в последние годы).

Выделение грибов из клинического материала и природных образцов является обязательным действием врача – лабораторного миколога на пути лабораторной диагностики грибов – патогенов и условных патогенов.

В качестве исследуемых объектов при дерматомикозах могут быть чешуйки кожи и соскобы с ногтей, поражённые волосы, различные биоптаты органов и тканей, кровь, содержимое абсцессов и пр. Любые образцы материала должны быть в подходящих ёмкостях и с необходимыми сопроводительными документами; хранение их в надлежащих условиях не должно превышать положенные сроки. Затем приступают к непосредственному изучению того или иного образца взятого материала. При этом чаще прибегают к микроскопическому обнаружению типичных элементов (иногда – фрагментов) гриба – патогена, например, мицелиальных нитей с регулярными перегородками или без перегородок (септ). В поражённых волосах можно видеть споры гриба внутри волоса – *тип эндотрикс*, или в форме чехла снаружи волоса – *тип эктотрикс*. В ряде случаев прибегают к обработке исследуемых объектов специальными реактивами (таблица 1).

Наиболее вероятные результаты КОН-микроскопии.

- **Ectothrix тип** на поражённых волосах формируют: *M. audouinii*, *M. canis*, *M. ferrugineum* (мозаичное расположение масс мелких спор на внешней стороне волоса пенька); *M. praecox* (редкий), *T. mentagrophytes* (образует чехол из мелких спор или в изолированных цепочках на поверхности волоса пенька); *M. gypseum*, *M. fulvum*, *M. nanum*, *M. gallinae*, *M. vanbreuseghemii* (разбросанные цепочки больших спор внутри и снаружи волоса пенька).

Таблица 1.

### Методы прямой микроскопии в целях выявления микромицетов в исследуемых клинических и других материалах (выборочно)

Метод с применением:	Использование	Необходимое время (мин)	Оценка полезности	Неудобства
калия гидроксида (КОН)	для просветления образца	5 до 10 при необходимости	Быстрое определение элементов гриба	Необходим опыт из-за конфузующих артефактов; некоторые образцы просветляются через более длительное время
метенамина (гексаметилентетрамин) серебра – $C_6H_{12}N_4Ag$	для определения грибов в гистологических срезах	60	Лучшая окраска на грибные элементы	Необходим специальный метод окрашивания
метиленового синего	для определения грибов в кожных чешуйках	2	Обычно добавляют к раствору КОН. Обеспечивает контрастирование гриба	Затрудняет оценку из-за окрашенного фона
калькофлюора белого	для определения грибов в пат. материале и в чистых культурах	1	Лучше смешать с КОН; в итоге – светлая флюоресценция	Трудно интерпретировать вагинальные секреты
альцианового синего	то же	2	Когда позитивен, то имеет диагностическое значение	Не всегда используют; не во всех случаях позитивен
PAS – окрашивания*	то же	30 и более	Хорошо окрашивает гифы и дрожжевые клетки	<i>Blastomyces dermatitidis</i> может быть плеоморфным; могут быть позитивные артефакты

\*Периодная кислота – Шиффа окрашивание.

го штифта); *T. equinum*, *T. megninii*, *T. rubrum* (редкий) (образуют чехол из больших спор или в изолированных цепочках на поверхности волоса пенька); *T. verrucosum* (формирует чехол из больших спор или цепочки на поверхности волоса пенька).

- **Endothrix тип** в поражённых волосах формируют: *T. gourvilii*, *T. rubrum* (редкий), *T. soudanense*, *T. tonsurans*, *T. violaceum*, *T. youndei* (образуют цепочки спор, упакованные внутри волоса пенька; волосы утолщены, скручены и коротко сломаны).
- **Фавозные волосы** – гифы *T. schoenleinii* внутри, без спор по всей длине волоса, обычно видны жировые капельки во всех пустых зонах, где гифы дегенерировали.

Лабораторную диагностику дерматомикозов можно подразделить на 5 этапов:

- 1) микроскопическое изучение патологического материала;
- 2) получение патогена в чистой культуре на питательных средах;

идентификация патогена – изолята из патологического материала;

*in vitro* тест на перфорацию волос (при необходимости);

*in vitro* тест на спаривание (+) и (-) штаммов одного вида анаморфного дерматомицета (при возможности и необходимости).

Микроскопическое изучение патологического материала.

Такие поражённые объекты как кератин-содержащие волосы, ногтевые и кожные чешуйки подготавливают для микроскопии, используя 10% раствор КОН (калия гидроксида, или едкого кали), можно 25% раствор NaOH (натрия гидроксида) с добавлением 5% глицерина, а также калькофлюор белый.

Морфологически дерматомицеты сравнительно легко отличить от других грибов, вызывающих поверхностные инфекционные заболевания. При микозах краниальной волосистой части головы и бороды необходимо выбирать поражённые штамбы (остатки) волос, немного выступающих над кожей. Больной волос легко определить в случае контактного поражения кольцевидной формы (ringworm – см. в начале статьи), но труднее – при других формах. Например, «чёрно-точечный тип» при дерматомикозе волосистой части головы характеризуется ломкостью волос над поверхностью кожи, их утолщённостью, искривлённостью или потемнением.

Грибные гифы и артроспоры, скапливающиеся в устьицах поражённых волосных фолликул при фавусе, отчётливо видны.

В случае микроспории поражённые волосы часто становятся серыми и пылевидными из-за ломкости волос на уровне 1–2 мм выше над кожей головы, штамбы волос покрываются массой артроспор. Если поражённых волос мало или неотчётливы признаки их грибкового поражения, то используют ультрафиолетовые лучи (лампу Вуда). Если волосы инфицированы одним из следующих микроспорумов — *M. audouinii*, *M. canis*, *M. ferrugineum*, то они проявляют светлую жёлто-зелёную флуоресценцию; тогда волосные штамбы вытаскивают тонкими щипцами, помещают на предметное стекло в каплю раствора КОН, накрывают препарат покровным стеклом (осторожно! – не повредить внешнюю стенку волоса). В случае правильного приготовления препарата хорошо выявляются типы «эндотрикс» и «экзотрикс». Кстати заметим здесь, что *Trichophyton schoenleinii* флуоресцирует под лампой Вуда тусклым голубовато-белым цветом, а все другие дерматомицеты не флуоресцируют вовсе.

При микозе стоп белая мацерированная кожа протирается тампоном, смоченным в 70% этаноле, прежде, чем взять полоски эпидермиса с краёв поражения. Эпидермальные полоски – лоскутики можно поддержать пинцетом, подрезая их маленькими ножницами. Если имеются пузырьки, то их верхнюю

часть можно срезать также маленькими ножницами и подвергнуть анализу с калькофлюором белым вместе с раствором КОН.

Калькофлюор белый используют в качестве отбеливающего средства в бумажной и текстильной промышленности. Он полезен для демонстрации присутствия грибных клеток в клинических образцах, поскольку калькофлюор присоединяется к  $\beta$ -1,3 и  $\beta$ -1,4 глюкозидным связям в таких полисахаридах, как хитин и целлюлоза [4]. Краска флуоресцирует в ультрафиолетовом свете (при коротковолновом облучении). Поэтому здесь необходим флуоресцентный микроскоп. Калькофлюор имеется на рынке реагентов и продаётся в порошке.

*Этапы проведения флуоресцентного анализа.*

- Растворить 0,1 г. калькофлюора белого в 100 мл дистиллированной воды для получения 0,1% раствора, который следует слегка подогреть.
- Нанести в центр чистого предметного стекла небольшую каплю 10% раствора КОН и одну небольшую каплю 0,1% раствора калькофлюора белого, смешать капли.
- Поместить исследуемый образец в смесь двух капель вышеназванных растворов и накрыть покровным стеклом; немного (слабо) нагреть предметное стекло и затем просмотреть его при малом увеличении в ультрафиолетовом микроскопе. Гифы, дрожжевые клетки, псевдомицелий выявляются белыми меловидными или блестящими яблочно-зелёной флуоресценции, что зависит от применяемых фильтров.

Следует помнить, что при хранении смеси растворов калькофлюора белого и едкого кали может образоваться осадок (преципитат), который не рекомендуют использовать для выявления грибных элементов.

Для окрашивания гистологических срезов широко применяют PAS (periodic acid-Schiff) — метод; в случаях прямого анализа клинических образцов патологического материала PAS-окрашивание применяют тогда, когда в КОН-препаратах не удаётся обнаружить микромицеты, хотя полагали, что они должны находиться в них.

Процедуру PAS-окрашивания выполняют на свежем материале, и она мало отличается от процедуры окрашивания тканевых срезов [5].

Периодную кислоту (5 г.) растворяют в 100 мл дистиллированной воды в тёмно-коричневой стеклянной бутылке с притёртой пробкой.

1. Раствор основного фуксина готовят следующим образом: 5 мл 95% этанола вносят в 95 мл дистиллированной воды, смешивают и внимательно добавляют 0,1 г основного фуксина, после чего ёмкость с ингредиентами помещают на роторный смеситель.

2. Готовят раствор натрия бисульфита ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ), 1 г которого и 10 мл 1N соляной кислоты вносят в 190 мл дистиллированной воды, а также светло-зелёную контрастную краску из 0,2 г кристаллического светло-зелёного, 2 мл ледяной уксусной кислоты в

100 мл дистиллированной воды. В последнем случае ледяную уксусную кислоту добавляют к дистиллированной воде в коричневой бутылке, затем добавляют метабисульфит, тщательно и плотно закупоривают.

3. Раствор гидроксида калия (КОН) готовят из расчёта 10 г КОН и 10 мл глицерина в 80 мл дистиллированной воды; тщательно смешивают и сохраняют при комнатной температуре.

4. Готовят тонкий мазок мокроты (гноя, чистой культуры и т.п.) на чистом предметном стекле и высушивают на воздухе.

5. Погружают стекло в абсолютный этанол (100%) на 1 минуту, затем его высушивают и немедленно помещают в 5% раствор периодной кислоты на 5 минут.

6. Промывают мазок водопроводной водой в течение 2 минут и помещают в раствор основного фуксина также на 2 минуты.

7. Промывают мазок водопроводной водой в течение 2 минут, погружают предметное стекло в раствор натрия бисульфита на 3-5 минут, затем промывают водопроводной водой в течение 5 минут.

8. Препарат обезживают ступенчатым проведением через 85%, 95% и 100% (абсолютный) этанол с двухминутными интервалами каждый раз.

9. Помещают в ксилол на 2 минуты и «монтируют» с покровным стеклом.

10. Проверяют изготовленный препарат в светлом микроскопе.

Непосредственно на PAS-окрашивание необходимо затратить 30-35 минут, если использовать и контрастирование. Предпочтительно светло-зелёное контрастирование, потому что грибок проявляется интенсивно тёмно-красным на контрастирующем фоне. Препарат для контрастирования необходимо поместить в светло-зелёную краску на 5 секунд и затем промыть его в течение 5-10 секунд между вышеобозначенными этапами 8 и 9.

PAS-реакция сопровождается окраской определённых гликанов (полисахаридов), находящихся в клеточной стенке грибов. Для более качественных результатов растворы периодной кислоты и натрия бисульфита должны быть свежеприготовленными и защищёнными от света.

Если в лаборатории имеется флуоресцентный микроскоп, то предпочтение отдают калькофлюору белому, а не PAS-реакции. Калькофлюор белый с КОН выявляет молодые гифы гриба как длинные изогнутые ветвящиеся нити; более зрелые гифы имеют многочисленные перегородки (септы) или бочковидные артроконидии (артроспоры), являющиеся продуктом фрагментации гифы на каждой перегородке. Эти споры (конидии) представляют собой инфекционные пропагулы (клетки размножения) при распространении заболевания на другие субъекты — хозяева. В недавней работе [6] было показано, что артроконидии *Trichophyton rubrum* в ногтях могут быть вовлечены в патогенез ониомикоза и, вероятно, в отпавших чешуйках эпидермиса могут служить

источником инфекции.

При микроскопии следует различать нити ваты или другие волокна иного происхождения, а также кристаллы холестерина и гифы (или гифальные элементы) микромицетов. При использовании микроскопов большего разрешения грибные гифы можно отличить от посторонних нитей — загрязнителей по септам, ветвлению и одинаковой толщины клеточной стенки на протяжении грибной нити.

Эпидермальные чешуйки при грибковом поражении тела можно обрабатывать вышеописанным способом за исключение того, что нет необходимости удалять поверхностный материал перед получением чешуек.

При грибковом поражении ногтя (-ей) верхняя заражённая его часть удаляется, а глубокие, более тонкие, слои ногтя забирают скальпелем, помещают на чистое предметное стекло для приготовления препарата в растворе КОН.

На взятие проб ногтей накладывает некоторые особенности форма микоза. Таких форм выделяют пять: дистальную и боковую подногтевую, поверхностную белую, проксимальную подногтевую, внутриногтевую, тотальную дистрофическую. Самой обычной формой заболевания является первая [7], характеризующаяся грибковой инфекцией ногтевого ложа, сопровождающейся гиперкератозом и возможным онихолизисом и утолщением ногтевой пластинки [8,9].

Поверхностный белый онихомикоз обычно ограничивается в верхних слоях ногтевой пластинки. Меловидно-белые участки («заплатки») появляются на ногте, оставляя поверхность крошащейся и мягкой.

Проксимальный подногтевой онихомикоз является самой обычной его формой у лиц, инфицированных вирусом иммунодефицита (ВИЧ-инфекция), и у иммунокомпрометированных (иммунодефицитных) пациентов; при этом «грибные мишени» — область под кутикулой (кожицей), инфицирование которой приводит к микозу проксимальной части ногтевого ложа; белые и жёлтые участки захватывают ногтевую lunулку, а затем — ногтевую пластинку.

При внутриногтевом онихомикозе инфицируются ногтевая пластинка и ногтевое ложе.

Тотальный дистрофический онихомикоз представляет собой инфекцию всего ногтя; в действительности его можно рассматривать слиянием всех вышеописанных форм онихомикоза как завершение этой инфекции [8].

В редких случаях дерматомицеты инвазируют ноготь другими путями, при которых он (ноготь) не является начальным звеном онихомикоза. Так, Р.Дж. Хей и Р. Баран [10] полагают, что грибы могут распространяться проксимально или дистально через лимфатическую систему или гематогенно. Некоторые авторы полагают, что условия, приводящие к иммунодефициту у субъектов, могут быть причиной определённых форм дерматомикозов [10].



Сравнительно новыми методами диагностики дерматомикозов (в том числе – при онихимикозе) признают окраску калькофлюором белым (см. выше по тексту), обеспечивающей меньшее число (на 10%) негативных результатов по сравнению с «КОН-методом». Хорошо оценивают PAS-реакцию, поскольку она более чувствительна, чем окраска калькофлюором белым, и микроскопия объекта проста с применением раствора едкого кали.

Перспективным представляется метод определения полиморфизма длины фрагментов – рестриктоф (RFLP=Restriction fragment length polymorphisms) в повторе рибосомальной дезоксирибонуклеиновой кислоты (рДНК) в целях дифференциации дерматомицета *T. rubrum*. Из 50 случайных клинических изолятов данного вида было идентифицировано 14 индивидуальных RFLP-образцов, или паттернов [11]. Авторы считают, что данный метод полезен для дифференциации штаммов *T. rubrum*, являющихся причиной рекуррентного (возвратного) онихимикоза из-за недолеченности предшествующей инфекции, или причиной реинфекции новым штаммом.

Получение патогена в чистой культуре на питательных средах.

Это — важный этап лабораторной диагностики дерматомицетов, так как принципиально необходимо знать видовую принадлежность микромицета – патогена. Выбор лечебного препарата и прогноз лечения зависят нередко от видов и штаммов грибов – патогенов, а посему весьма полезно и необходимо определять чувствительность гриба – изолята к лекарственным препаратам (действующую субстанцию в них следует использовать в качестве контроля). В тоже время необходимо учитывать потребности дерматомицетов в отдельных аминокислотах, витаминах и некоторых субстанциях, способствующих повышению роста гриба (-ов).

Известно множество разных питательных сред для микромицетов, часть которых изготавливают в производственных условиях, и которые можно приобретать или заказывать поставщику (-ам). Назовём некоторые из них: агаризованная и жидкая среда Сабуро с глюкозой, агаризованное и жидкое пивное неохмелённое сусло, картофельно-глюкозный агар, агар Сабуро с левомицетином и циклогексимином, агар Чапека-Докса, агар Христенсена, агаризованная среда для первичной изоляции дерматомицетов (среда DTM – от англ. Dermatormycete test medium) и др.

Вначале очищают кожные и ногтевые поражения 70% этанолом, отбирают образцы (как сказано об этом ранее по тексту) и помещают их непосредственно на подходящую агаризованную питательную среду с циклогексимином и левомицетином. Если образцы сильно загрязнены бактериями, то можно использовать среду с гентамицином. На агаре для первичного выделения дерматомицетов (DTM) происходит трансформация окраски среды в красный цвет благодаря щелочному рН при их росте. Многие банальные плесени (сапробы) могут также

трансформировать среду в красный цвет, но их можно легко отличить от дерматомицетов по макроморфологии колоний. Выдерживают посевы патологического материала в термостатах при 25–26 °С до 37 °С в течение месяца, в среднем. Как только колонии гриба появились на питательной среде, вырезают маленький блок агара с верхушками молодого мицелия специальной лопаточкой и переносят в свежую питательную среду для исключения возможного заражения другими микроорганизмами, связанными с образцом патологического материала. Отдельные дерматомицеты образуют споры уже в пределах 5 суток. Их макроконидии более типичны для молодых культур, нежели для старых. В целях идентификации патогена проводят дополнительное изучение грибов-патогенов — изолятов из патологического материала.

Тесты на ростовые питательные вещества (аминокислоты, витамины) обычно проводят для видов *Trichophyton*.

При необходимости выполняют in vitro тест на перфорацию волос (по Айелло и Джорж) в целях дифференциации *T. mentagrophytes* и *T. rubrum*.

Для этого помещают короткие пряди волос от человека в чашки Петри, автоклавируют 10 минут при 120 °С, добавляют 25 мл стерильной дистиллированной воды и 2-3 капли 10% стерильного дрожжевого экстракта. Засевают эти чашки различными фрагментами тест-культуры, выращенной на агаре Сабуро с глюкозой. Засеянные чашки Петри выдерживают при 25 °С в течение 20-30 суток с регулярным микроскопическим контролем. Отбирают некоторые волосы, помещают в каплю жидкости Аммана (молочная кислота – 20 мл, кристаллический фенол – 20 г, глицерин – 40 мл, вода – 20 мл). После смешения и растворения ингредиентов добавить 0,05 г метиленового синего для контрастирования бесцветных структур гриба.

Обычно волосы покрываются мицелием, под которым можно рассмотреть в микроскопе перфорации (клиновидные – для *Trichophyton mentagrophytes* и при отсутствии таковых на волосах от *T. rubrum*).

Тесты на спаривание (+) и (-) анаморфных вариантов дерматомицетов.

Исследования проводят с видами родов *Microsporum* и *Trichophyton*, чтобы доказать получение телеоморфы рода *Arthroderma*. Для этого необходимо иметь «тестерные» штаммы (+) и (-), которые используют в качестве стандартных контролей. При их спаривании между собой и с анаморфной культурой противоположного типа спаривания из патологического материала образуются овальной формы плодовые тела – аскокарпы на линии контакта между двумя культурами на агаризованной среде в чашке Петри.

Из всего вышесказанного следует, что лабораторная микология ныне заняла важное место среди микробиологических дисциплин, знание которой

насуточно необходимо врачам различных специальностей.

Важнейшим событием для научно-практических работников здравоохранения России оказались решения, принятые Министерством здравоохранения Российской Федерации и оформленные приказами от 21 марта 2003 г. № 115 о введении «Клинической микологии» и «Лабораторной микологии» в качестве основных специальностей в соответствующую номенклатуру специальностей, согласно приказу № 337 от 27.08.99 г. и № 116 о враче – клиническом микологе и о враче – лабораторном микологе с положениями об организации их деятельности.

На основании указанных приказов была начата первичная подготовка соответствующих специалистов в ГОУ ДПО «Санкт-Петербургская медицинская академия последипломного образования Росздрава» на базе единственного в России НИИ медицинской микологии им. проф. П.Н. Кашкина, где кроме собственных структур НИИ размещены кафедры дерматовенерологии, клинической микологии, аллергологии и иммунологии, а также лабораторной микологии и патоморфологии микозов.

Врачи, прошедшие подготовку по медицинской микологии (клинической и лабораторной) получают сертификаты установленного образца. С 2004 года проведено около 20 циклов по обоим специальностям.

Позднее изданные приказы Минздравсоцразвития №553 (от 20.08.2007 г.) и №112 (от 11.03.2008 г.) не стали, к сожалению, улучшенными вариантами применительно к приказам №115 и №116 от 21.03.2003 г. Напротив, они заметно недоработаны в отношении всех микробиологических дисциплин, оказавшихся разобщенными, а базовый для них предмет «Микро-

биология» давно исчез из названных приказов. Остается надеяться на недалекое лучшее будущее, когда будут учтены имеющиеся недочеты с учебными планами, и Минздравсоцразвития «выпустит» приказы об организации микологической службы в России, и в Государственном масштабе будут регистрировать висцеральные (внутренние) микозы.

Заслуживает акцентирования приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 20 от 28 января 2004 г. о создании научно-методического микологического центра Минздрава России на базе НИИ медицинской микологии ГОУ ДПО СПб МАПО Росздрава России. Задачи названного центра определены утверждённым положением; в частности: определение направлений и формирование основных проблем научных исследований в области медицинской микологии, их координации в Российской Федерации; оказание консультативной помощи НИИ и ЛПУ по вопросам определения культур патогенных и условно-патогенных грибов, диагностики, профилактики и лечения микозов и микоаллергозов; проведение мероприятий по обучению, повышению квалификации практических врачей и врачей-лаборантов по вопросам диагностики и лечения больных микозами и микоаллергозами; разработка протоколов ведения больных микозами и микогенной аллергией; разработка протоколов клинических исследований в области медицинской микологии; исполнение функций *референтного учреждения по медицинской микологии Российской Федерации* и др.

Данный приказ нацелен на повышение значимости организующей и лидирующей роли НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина в России по всем разделам медицинской микологии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kwon-Chung K.J., Bennett J.E. Medical Mycology. Lea & Febiger. Philadelphia – London, 1992.- 866 p.
2. Weitzman I., McGinnis M.R., Padhye A., Ajello L. The genus *Arthroderma* and its later synonym *Nannizzia* // Mycotaxon. — 1986.-Vol. 25. — P. 505-518.
3. Грезер И., де Хоог Г.С., Кюйнепс А.Ф.А. В кн. Revista Iberoamericana de Micologia. Eds. R.K.S. Kushwaga and J. Guarro. — Bilbao, 2000. —Vol. 17.- 176 p.
4. Manual of Clinical Microbiology 8th ed. Editor in Chief Albert Balows. American Society for Microbiology. — Washington, D.C., 1991.- 1364 p.
5. Haley L.D. and Callaway C.S. Laboratory Methods in Medical Mycology. — Washington, D.C.USA., 1978. — P. 51-52.
6. Yazdanparast S.A. and Barton R.C. Arthroconidia in *Trichophyton rubrum* and new model of onychomycosis // J. of Med. Microbiology. — 2006. —Vol. 55. — P. 1577-1581.
7. Hay R. Literature review // JEADV. — 2003. — Vol. 19, Suppl. 1. — P.1-7.
8. Faergemann J., Baran R. Epidemiology, clinical presentation and diagnosis of onychomycosis // Br. J. Dermatol. -2003. —Vol. 149. — P. 1-4.
9. Ellis D.H. Diagnosis onychomycosis made simple // J. Am. Acad. Dermatol. — 1999. — Vol. 40. — P. S3-S8.
10. Hay R.J., Baran R. Deep dermatophytosis: rare infections or common, but unrecognized, complications of lymphatic spread? //Curr. Opin. Infect. Dis. — 2004. — Vol. 17. — P.77-79.
11. Jackson C.J., Barton R.C., Evans E.G. Species identification of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions // J. Clin. Microbiol. — 1999. — Vol. 37. — P. 931-936.

Поступила в редакцию журнала 02.04.08

Рецензент: Корнищева В.Г.

