

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Арзуманян В. Г.¹, Ильина И. В.², Васильева Г. В.¹, Магаршак О. О.¹, Миронов А. Ю.³

НОВОЕ В КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ДЕРМАТОФИТНЫХ ГРИБОВ У ДЕТЕЙ С АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ

¹ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, 105064, Москва, Россия;

²Институт медико-социальных технологий ФГБОУ ВПО МГУПП Министерства образования и науки РФ, кафедра кожных и венерических болезней с курсом косметологии, 125080, Москва, Россия;

³ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, 125212, Москва

Роль бактерий рода Staphylococcus spp., дрожжевых грибов родов Candida spp., Malassezia spp. при atopическом дерматите (АД) у детей хорошо известна, однако, практически отсутствуют данные о распространённости дерматофитных грибов при этой нозологии. Целью работы явилась оценка результатов обследования детей с АД на носительство дерматофитных грибов.

Группа обследованных состояла из 44 детей в возрасте от 1 до 18 лет с диагностированным АД в стадии обострения. Для проведения исследования разработан безболезненный для пациента и безопасный для персонала способ забора проб, заключающийся в растирании лихенифицированных участков кожи стерильным тупфером, смоченным фосфатным буферным раствором с Твином 80, и последующим отделением кожных чешуй методом центрифугирования.

При исследовании гидролизированных чешуй использовано максимальное увеличение микроскопа (x1750), зарегистрированы различные формы дерматофитных и дрожжевых грибов. Споры дерматофитных грибов встречались с частотой 67,0%, дерматофитный мицелий – с частотой 18,3%. Корреляции между частотами обнаружения дерматофитных спор и дерматофитного мицелия практически не отмечено (коэффициент Пирсона $r=0,236$), ни разу мицелий не обнаружен без спор, а споры в 73,3% случаев обнаруживались без мицелия. Дрожжевые споры выявлены у 45,2% обследованных, что согласуется с данными, полученными ранее культуральным методом, дрожжевой мицелий – у 3,5% пациентов.

Впервые установлена частая встречаемость дерматофитных грибов на поражённых участках кожи при АД, причём в подавляющем большинстве случаев в виде спор. Полученные результаты важны для клинической диагностики, поскольку от них зависит выбор проводимой терапии.

Ключевые слова: дерматофитные грибы; микроскопия; atopический дерматит; клиническая лабораторная диагностика.

Для цитирования: Арзуманян В.Г., Ильина И.В., Васильева Г.В., Магаршак О.О., Миронов А.Ю., Новое в клинической лабораторной диагностике дерматофитных грибов у детей с atopическим дерматитом. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (6) : 351-353. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2-19-64-6-351-353>

Arzumanyan V.G.¹, Il'ina I.V.², Vasilieva G.V.¹, Magarshak O.O.¹, Mironov A.Yu.³

NEW IN CLINICAL LABORATORY DIAGNOSTICS OF DERMATOPHYTE FUNGI IN CHILDREN WITH ATOPIC DERMATITIS

¹ Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia;

² Institute of Medical and Social Technologies, 125080, Moscow, Russia;

³ G. N. Gabrichevsky research institute for epidemiology & microbiology, 125212, Moscow

Role of bacteria Staphylococcus spp., yeasts of Candida spp., Malassezia spp. genera in pathogenesis of atopic dermatitis (AD) in infant patients is well known. However, no data concerning the incidence of dermatophytes in such disease entity were obtained. Aim of the study was estimation of dermatophytes carriage in children with AD.

Group of patients involved 44 persons 1 to 18 years old with clinically diagnosed acute AD. Especially for the study a method of skin scales collection was created: painless for patients and safe for medical personnel. The method is based on following stages – rubbing of lichenified skin zones with sterile swab which was preliminary saturated with phosphate/Tween 80 buffer pH 7,9 and centrifuging of the suspension for sedimentation of skin scales.

Microscopic examination of hydrolyzed scales was carried out at maximal magnification x1750, at that different dermatophyte and yeast fungal forms were registered. Spores of dermatophyte fungi were detected with 67,0% frequency, whereas dermatophyte mycelium - with 18,3% frequency. No correlation between dermatophyte spores and mycelium was found out (Pirson's coefficient $r=0,236$), however no mycelium without spores was detected, but in 73,3% of cases spores occurred without mycelium. Yeast spores were detected in 45,2% of patients – this fact is agreed with data obtained earlier by the seeding method, but yeast mycelium was found out in 3,5% of patients.

Therefore frequent occurrence of dermatophyte fungi on the skin of AD infants is revealed for the first time. At that dermatophytes were found out to exist more often in the form of spores. These results are important for choice of the further therapy.

Key words: dermatophyte; microscopy; atopic dermatitis; clinical laboratory diagnostics.

For correspondence: Arzumanyan V.G., Sc.D., professor, head of laboratory of fungal and bacterial physiology; e-mail: veraar@mail.ru

For citation: *Arzumanian V. G., Il'ina I. V., Vasilieva G. V., Magarshak O. O., Mironov A. Yu. New in clinical laboratory diagnostics dermatophyte fungi in children with atopic dermatitis. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (6): 351-353. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-6-351-353>*

Conflict of interest. *The authors declare no conflict of interest.*

Acknowledgment. *The study had no sponsorship.*

Received 21.01.2019
Accepted 20.02.2019

Введение. В патогенезе атопического дерматита (АД) немаловажную роль играют микробные аллергены, среди которых часто упоминаются аллергены дрожжевых и плесневых грибов [1-3], значительно реже – дерматофитов [4-7]. Исследования, посвященные взаимосвязи атопии и дерматофитии, проводились на небольших контингентах взрослых пациентов (всего 68 пациентов за все годы), тогда как исследований, посвященных дерматофитии у детей с АД не обнаружено. Сообщалось о частоте обнаружения различных родов дрожжевых грибов при АД [3]. Эти данные получены в результате посевов методом отпечатков или смывов на селективные среды и идентификации грибов классическими микробиологическими методами. Обычно врач-аллерголог направляет ребёнка с АД именно на такое исследование кожной микрофлоры, хотя при этом посева на дерматофитные грибы не производятся. Причиной этого является, в основном, длительность их культивирования и идентификации. В данном случае в помощь врачу служит микроскопия, результаты которой в большой степени обусловлены квалификацией персонала и качеством микроскопа.

Цель работы - усовершенствование методов забора материала и микроскопии, оценка результатов обследования детей с АД на носительство дрожжевых и дерматофитных грибов.

Материал и методы. Обследована группа из 44 детей в возрасте от 1 до 18 лет (медиана 10 лет) с диагностированным АД в стадии обострения. Сбор кожных чешуй производили с лихенифицированных участков кожи следующим образом. Готовили раствор 0,1 М фосфатного буфера с Твином 80, pH 7,9: к 100 мл дистиллированной воды добавляли 1,96 г $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ и 0,1 мл Твина 80, pH доводили до 7,9 с помощью 10% раствора КОН, стерилизовали при 0,5 амт в течение 30 мин. В пробирку Эппендорф вносили 0,7 мл данного буферного раствора, в который обмакивали стерильный тупфер (палочку с ватиком), отжимали о стенку пробирки для удаления излишков жидкости. Увлажнённым тупфером растирали поражённый участок кожи, после чего тупфер промывали в той же пробирке, отжимали, процедуру повторяли 3-4 раза до тех пор, пока суспензия в пробирке не становилась очень мутной. Полученную суспензию центрифугировали со скоростью 15000 об/мин в течение 5 мин, супернатант удаляли, полученный осадок заливали раствором едкого кали с диметилсульфоксидом, оставляли на ночь при комнатной температуре [8].

Полученный гомогенат микроскопировали при суммарном увеличении в 1750 раз (рис. 1, а – з, см.обложку). Обилие обнаруженных морфотипов грибов в среднем в 10 полях зрения выражали в баллах: 0 – означало отсутствие; 1 балл – наличие в среднем 1-2 клеток в поле зре-

ния; 2 балла – от 3 до 5; 3 балла - 6 и выше.

Расчёт коэффициентов корреляции Пирсона проводили с помощью программы Microsoft Excell. Расчёт коэффициентов Манна-Уитни, свидетельствующих о наличии/отсутствии значимости различий между показателями, проводили с помощью автоматической программы [9].

Результаты. Результат по частоте носительства дрожжей (см. таблицу) согласуется с результатом, ранее полученным культуральным методом [3], обращает на себя внимание отсутствие дрожжевого мицелия. 43,2% детей являлись одновременно носителями и дрожжей и дерматофитов. Из 44 детей у 35 на коже обнаружены дерматофиты, причём у 11 человек – на локтевых сгибах и кистях, у 8 – на лице, у 6 – на подколенных ямках и стопах, у 4 – на груди и спине, у 4 – на волосистой поверхности головы, у 1 – на лобке и у 1 – за ухом. Корреляции между частотами обнаружения дерматофитных спор и дерматофитного мицелия практически не отмечено (коэффициент Пирсона $r=0,236$), ни разу мицелий не обнаружен без спор, споры в 73,3% случаев обнаруживались без мицелия. Достоверность различий между обилием (и частотой встречаемости) дерматофитных и дрожжевых спор лежит в области значимости по критерию Манна-Уитни: $0,01 \leq p \leq 0,05$. Возраст и пол пациентов не коррелировали с частотой обнаружения дерматофитных спор/ мицелия и дрожжевых спор/ мицелия (см. таблицу).

Обсуждение. О случаях обнаружения поверхностной трихофитии у детей в Московском регионе сообщалось ранее [10], рост заболеваемости авторы связывали с низким уровнем санитарно-просветительной работы, некачественной дезинфекцией спортивного инвентаря и др. Детей с АД можно небезосновательно считать группой риска при инфицировании не только *S. aureus* и дрожжами [11], но и дерматофитными грибами. Термин «атопико-дерматофитозный синдром» впервые введен для обозначения роли аллергенов дерматофитов в хроническом течении АД у взрослых пациентов [4]. Нам не удалось обнаружить работ, касающихся такого явления у детей. Проведение исследования в данном направлении имеет важное клиническое значение, поскольку от его результатов во многом может зависеть успех назначаемого лечения.

Важным моментом при работе с пациентами детско-

Обнаружение морфотипов микроорганизмов в чешуях кожи пациентов с атопическим дерматитом

Показатели носительства	Бактерии		Дерматофитные грибы		Дрожжевые грибы	
	кокки	палочки	мицелий	споры	мицелий	споры
Частота встречаемости, %	13,9	81,7	18,3	67,0	3,5	45,2
Обилие (баллы), ср. знач. \pm ср. откл.	0,33 \pm 0,57	2,47 \pm 0,65	0,22 \pm 0,36	1,87 \pm 1,07	0,04 \pm 0,08	0,89 \pm 0,96
Корреляция показателя с полом пациентов	-0,083	-0,088	-0,047	-0,044	0,044	-0,058
Корреляция показателя с возрастом пациентов	-0,208	-0,102	0,138	-0,016	0,128	0,023

го возраста является наличие удобного, быстрого, безболезненного для пациента и безопасного для персонала способа забора проб. Традиционным методом отбора образцов кожных чешуй является соскоб, однако, его недостатки в данном случае совершенно очевидны. Нами разработан новый способ забора проб у детей с atopическим дерматитом, позволяющий быстро, безболезненно и качественно брать необходимое количество материала. Способ заключается в многократном смыве чешуй с поверхности кожи с помощью стерильного тупфера, периодически погружаемого в специальный буферный раствор, с последующим удалением водной фракции и обработкой фракции, содержащей клетки.

Другой важный момент – традиции микроскопии образцов кожи. Обычно диагноз «дерматофития» выставляют на основании наличия мицелиальных форм грибов. По нашему глубокому убеждению огромное значение имеет не только мицелий, но и споры, поскольку у диморфных грибов эти две формы являются лишь различными стадиями размножения [12]. В этой связи квалификация исследователя играет не последнюю роль, т. к. «узнавание» спор при их морфологическом разнообразии – процесс довольно сложный, ведь в монографиях и пособиях приведены в основном те морфотипы, которые образуются при культивировании грибов вне организма на питательных средах. Морфотипы грибов, встречающиеся в патологическом материале, разнообразнее тех, что имеют место при лабораторном культивировании. Большое значение имеет увеличение микроскопа. В подавляющем большинстве клинических лабораторий максимальное суммарное увеличение микроскопов составляет $\times 900$, тогда как в данной работе использован микроскоп с увеличением $\times 1750$, что значительно облегчило идентификацию грибов.

Из полученных результатов следует, что дерматофитные грибы на коже пациентов с АД встречаются чаще и в большем обилии, чем дрожжевые. Часто имеет место одновременное носительство дрожжевой и дерматофитной микробиоты. Локализация дерматофитов и дрожжей соответствует участкам с лихенифицированной кожей. Обращает на себя внимание высокая частота обнаружения спор дерматофитов при отсутствии мицелия (в 73,3% случаев). Это позволяет сделать вывод о высокой вероятности ложноотрицательных результатов при традиционной микроскопии.

Что касается бактериальной микробиоты, важно отметить, что частота обнаружения кокков на коже пациентов с АД при микроскопии значительно ниже, чем культуральным методом (14% против 95%) [11]; палочковидные бактерии, причём в высоком обилии, представлены, очевидно, родом *Propionibacterium* spp., о чём свидетельствуют с одной стороны размеры и форма обнаруживаемых клеток, с другой – данные литературы и собственные данные [13, 14].

Выводы:

1. Усовершенствован метод пробоподготовки материала кожных чешуй и последующей микроскопии.
2. Проведена оценка результатов обследования детей с АД на предмет носительства дрожжевых и дерматофитных грибов.
3. Установлена высокая частота обнаружения спор дерматофитных грибов наряду со спорами дрожжевых грибов в кожных чешуйках детей с АД.
4. Полученные результаты могут быть полезны в клинике, поскольку от них зависит выбор проводимой терапии.

Благодарность. Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории физиологии грибов и бактерий НИИВС им. И. И. Мечникова Артёмовой Т. А. и Бутковченко Л. М. за помощь при проведении исследований.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках НИР № 0525-2014-0042 ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова», Москва.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п. 4 – 6, 8, 12, 14 см. REFERENCES)

1. Сергеев Ю.В., Иванов О.Л., Новиков Д.К., Караулов А.В., Сергеев А.Ю. Атопический дерматит: современная диагностика и лечение. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2001; 4: 39-63.
2. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В., Караулов А.В., Кудрявцева Е.В. Атопический дерматит: от патогенеза к диагностике. *Практическая пульмонология*. 2003; 4: 35-9.
3. Арзуманян В.Г. Дрожжевая микрофлора кожи и респираторного тракта при аллергических заболеваниях. Дисс. Москва; 2002.
7. Соколова Т.В., Малиарчук А.П., Газарян О.Л. Количественные критерии дифференциальной диагностики микозов крупных складок. *Успехи медицинской микологии*. 2015; XIV: 38-43.
9. Математические методы обработки данных (он-лайн расчёт) (источник: <https://www.psychol-ok.ru/lib/statistics.html>)
10. Степанова Ж.В., Климова И.Я., Воробьева И.А. К вопросу о хронической трихофитии у детей. *Успехи медицинской микологии*. 2003; 2: 177-8.
11. Арзуманян В.Г., Зайцева Е.В., Кабаева Т.И., Темпер Р.М. Оценка стафилококковой и нелипофильной дрожжевой микрофлоры кожи у больных с кожной патологией при контактно-способе посева. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2004; 6: 3-6.
13. Нобл У.К. Микробиология кожи человека. М.: Медицина; 1986.

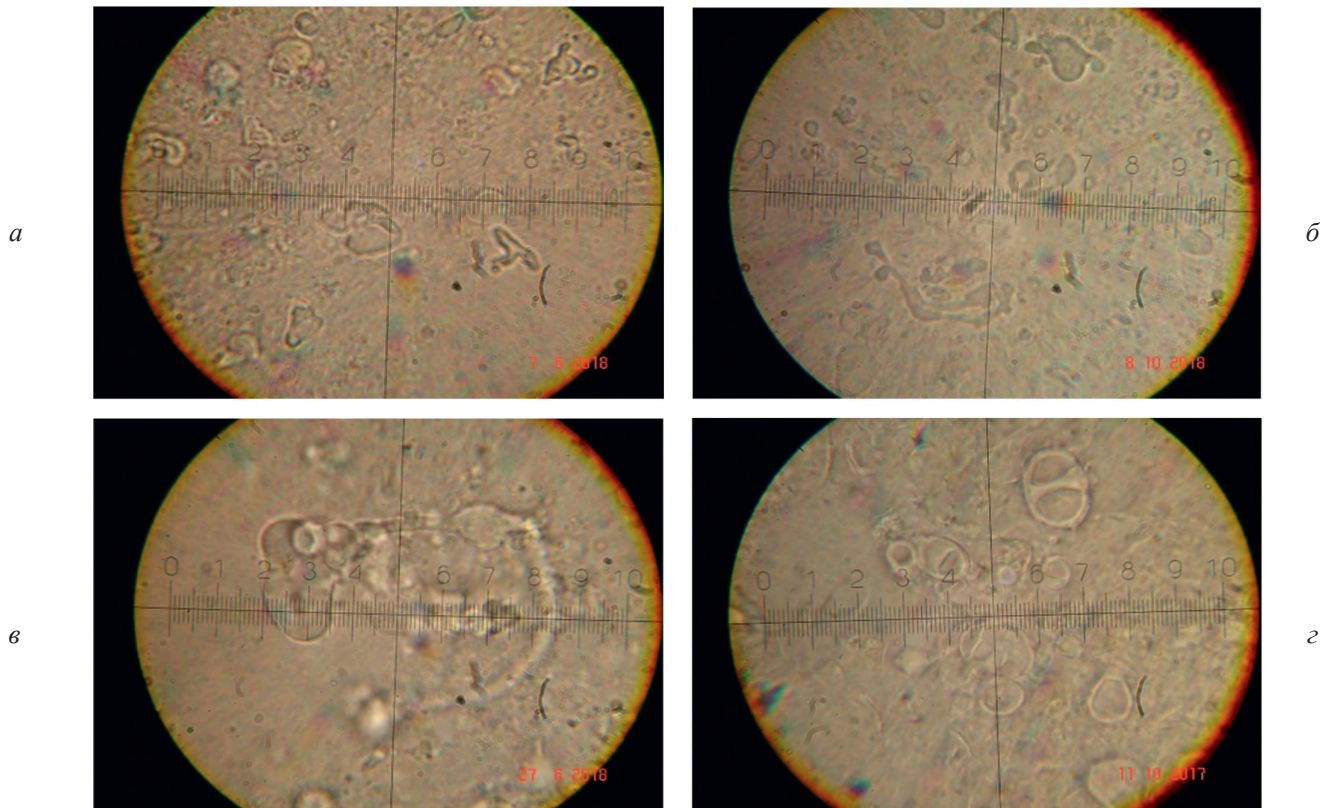
REFERENCES

1. Sergeev Y.V., Ivanov O.L., Novikov D.K., Sergeev A.Y. Atopic dermatitis: modern diagnostics and surgery. *Immunopatologia, allergologia, infectologia*. 2001; 4: 39-63. (in Russian)
2. Sergeev A.Y., Sergeev Y.V., Karaulov A.V., Kudriavtseva E.V. Atopic dermatitis: from pathogenesis to diagnostics. *Practicheskaia pulmonologia*. 2003; 4: 35-9. (in Russian)
3. Arzumanyan V.G. Yeast microflora of skin and respiratory tract in allergic diseases. Diss. Moscow; 2002. (in Russian)
4. Jones H.E. The atopic-dermatophytosis syndrome. *Acta Derm. Venereol.* (Stockh). 1980; 92:81-5.
5. Wilson B.B., Deuell B., Mills T.A. Atopic dermatitis associated with dermatophyte infection and Trichophyton hypersensitivity. *Cutis*. 1993; 51(3):191-2.
6. Klein P.A., Clark R.A., Nicol N.H. Acute infection with Trichophyton rubrum associated with flares of atopic dermatitis. *Cutis*. 1999; 63(3):171-2.
7. Sokolova T.V., Maliarchuk A.P., Gazarian O.L. Quantitative criteria of differential diagnostics of large body folds mycoses. *Uspekhi meditsinskoy mycologii*. 2015; XIV: 38-43. (in Russian)
8. Rebell G., Taplin D. Dermatophytes. Their recognition and identification. University of Miami Press. 1971.
9. Mathematical methods of data processing (on-line calculation). Available at: <https://www.psychol-ok.ru/lib/statistics.html> (in Russian)
10. Stepanova J.V., Klimova I.Y., Vorobieva I.A. About chronic trichophytia in children. *Uspekhi meditsinskoi mycologii*. 2003; 2: 177-8. (in Russian)
11. Arzumanyan V.G., Zaitseva E.V., Kabaeva T.I., Temper R.M. Evaluation of cutaneous staphylococcal and non-lipophilic yeast microflora in patients with skin diseases by contact method of seeding. *Vestnik dermatologii i venerologii*. 2004; 6: 3-6. (in Russian)
12. de Hoog G.S., Guarro J., eds. Atlas of Clinical Fungi. Baarn and Delft: Centraalbureau voor Schimmelcultures; 1995.
13. Nobl W.K. Microbiology of human skin [Mikrobiologiya kozhi cheloveka]. Moscow: Meditsina; 1986. (in Russian)
14. Arzumanyan V., Zaborova V., Globa A., Shmeleva O. Communities of Skin Propionic Bacteria: Cultivation and Antifungal Antagonistic Activity. *J. Bacteriol. Parasitol.* 2016; 7: 266.

Поступила 21.01.19

Принята к печати 20.02.19

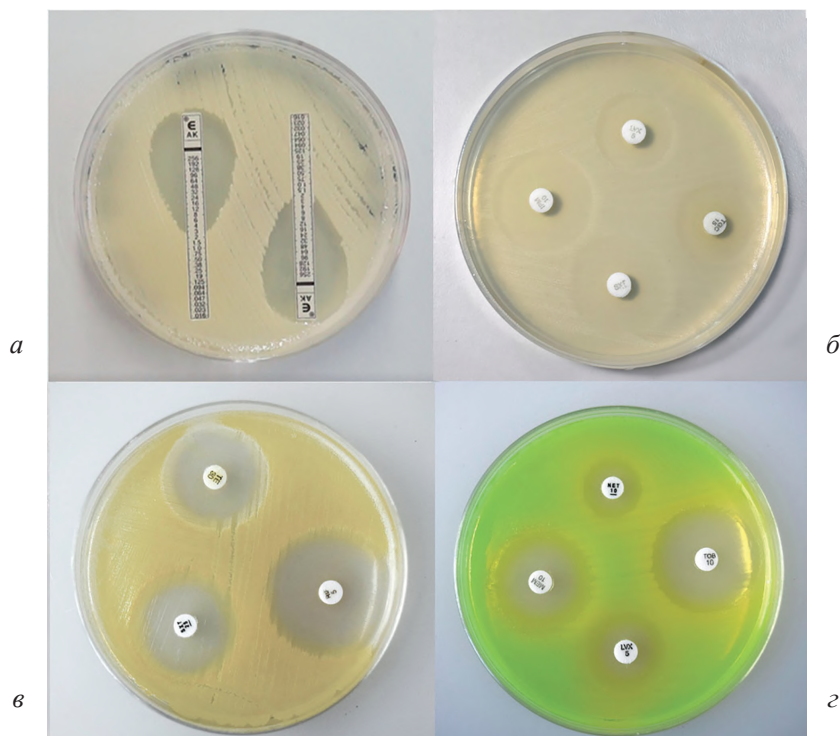
К ст. Арзумян В.Г. и соавт.



Элементы дерматофитных грибов в препаратах чешуй кожи больных атопическим дерматитом (АД) в стадии обострения.

а - мальчик 5,5 лет (спина); б – мальчик 13 лет (волосистая часть головы);
в – девушка 16 лет (наружная поверхность ступни); г – девушка 18 лет (предплечья).
Увеличение микроскопа 1750 раз. Линейка на фото в микрометрах.

К ст. Косиловой И.С. и соавт.



Е-тест на чувствительность штамма *K. pneumoniae* 409 NDM к амоксициллину (а). Диско-диффузионный метод на чувствительность *E. coli* X 627 к имипенему, левофлоксацину, триметоприм/сульфаметоксазолу и тигециклину (б), *S. aureus* Д 508 к тетрациклину, триметоприм/сульфаметоксазолу и рифампицину (в), *Pseudomonas aeruginosa* X 629 к нетилицину, меропенему, тобрамицину, левофлоксацину на разработанной питательной среде «МХА П-Оболенск» (г).