

УДК 579.62

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2022-360-6-33-36>

исследования/ research

Савинов В.А.,
Овчинников Р.С.,
Лаишевцев А.И.,
Гулюкин А.М.,
Капустин А.В.

Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук, Рязанский проспект, д. 24, к. 1, г. Москва, 109428, Россия
E-mail: visik06@mail.ru

Ключевые слова: дерматофитозы, *M. canis*, *T. mentagrophytes*, диагностика, грибковые инфекции, калькофлюор, люминесцентная диагностика

Для цитирования: Савинов В.А., Овчинников Р.С., Лаишевцев А.И., Гулюкин А.М., Капустин А.В. Сравнение основных методов клинической и лабораторной диагностики дерматофитозов. Аграрная наука. 2022; 360 (6): 33–36.

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2022-360-6-33-36>

Авторы в равной степени принимали участие в написании рукописи, несут равную ответственность за плагиат и представленные данные.

Авторы объявили, что нет никаких конфликтов интересов.

Vasily A. Savinov,
Roman S. Ovchinnikov,
Alexey I. Laishetsev,
Alexey M. Gulyukin,
Andrey V. Kapustin

Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K.I. Scriabin and Ya.R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences, Ryazansky prospect, 24, building 1, Moscow, 109428, Russia E

с новой строки-mail: visik06@mail.ru

Key words: dermatophytoses, *M. canis*, *T. mentagrophytes*, diagnostics, fungal infections, calcofluor, luminescent diagnostics

For citation: Savinov V.A., Ovchinnikov R.S., Laishetsev A.I., Gulyukin A.M., Kapustin A.V. Comparison of the main methods of clinical and laboratory diagnostics of dermatophytosis. Agrarian Science. 2022; 360 (6): 33–36. (In Russ.)

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2022-360-6-33-36>

The authors were equally involved in writing the manuscript and bear the equal responsibility for plagiarism and presented data.

The authors declare no conflict of interest.

Сравнение основных методов клинической и лабораторной диагностики дерматофитозов

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Для диагностики дерматофитозов в практической деятельности врачей используется ряд методов, однако эффективность их различна. Целью исследования являлось сравнение различных способов клинической и лабораторной диагностики дерматофитозов.

Методы. На наличие дерматофитов было исследовано 54 клинических образца волос, отобранных от мелких домашних животных. Диагностику проводили с помощью лампы Вуда, прямой микроскопии, люминесцентной микроскопии с калькофлюором и с помощью посева на питательные среды — Сабуро и ДТМ.

Результаты. При посеве из 54 образцов шерсти удалось выделить 16 дерматофитов. Эффективность среды «ДТМ-Эксперт» составила 100%. На среде Сабуро выросло 13 (81,3%) дерматофитов, из них 2 посева были сильно загрязнены плесневыми грибами. При исследовании шерсти с помощью лампы Вуда удалось выявить 62,5% (10 из 16) положительных образцов. Ложноположительных — 16,7% (9 из 54). С помощью прямой микроскопии дерматофитозы подтвердили только в 56,3% (9 из 16) случаев. Ложноположительных результатов — 7,4% (4 из 54). Микроскопия с калькофлюором выявила возбудитель в 15 случаях, что составило 93,8%. При этом было 5 (9,3%) ложноположительных результатов.

Comparison of the main methods of clinical and laboratory diagnostics of dermatophytosis

ABSTRACT

Relevance. A number of methods are used to diagnose dermatophytosis in the practice of doctors, but their effectiveness varies. The aim of the study was to compare different methods of clinical and laboratory diagnosis of dermatophytosis.

Methods. 54 clinical hair samples taken from small pets were examined for the presence of dermatophytes. Diagnostics was carried out using a Wood lamp, direct microscopy, fluorescent microscopy with calcofluor, and by sowing on nutrient environment — Saburo and DTM.

Results. When sowing, 16 dermatophytes were isolated from 54 wool samples. The efficiency of the “DTM-Expert” environment was 100%. 13 (81.3%) dermatophytes grew on the Saburo environment, of which 2 crops were heavily contaminated with mold fungi. In the study of wool with the help of Wood's lamp, 62.5% (10 out of 16) of positive samples were detected. False positive — 16.7% (9 out of 54). Using direct microscopy, dermatophytoses were confirmed only in 56.3% (9 out of 16) of cases. False positive results — 7.4% (4 out of 54). Microscopy with calcofluor revealed the causative agent in 15 cases, which is 93.8%. At the same time, there were 5 (9.3%) false positive results.

Поступила в редакцию: 15 мая 2022
Одобрена после рецензирования: 29 мая 2022
Принята к публикации: 17 июня 2022

Received: 15 may 2022
Accepted in revised form: 29 may 2022
Accepted for publication: 17 june 2022

Введение

Часто практикующие ветеринарные врачи во время работы встречаются с животными, имеющими заболевания кожи. Для дифференциации кожных патологий существуют различные инструменты и методы. Дерматофитозы довольно редко имеют классическую клиническую картину — круглая алопеция, выпадение шерсти, шелушение кожи, иногда присутствие зуда и воспаления. Для подтверждения диагноза необходимо проведение дополнительных лабораторных исследований, независимо от опыта доктора. На практике чаще всего используется прямая микроскопия шерсти, при этом чувствительность метода будет зависеть от степени поражения — при ярко выраженных клинических признаках заболевания обнаружение возбудителя не вызывает затруднений. Однако при миконосительстве спор может быть небольшое количество, и их можно выявить не только на корне волоса [1].

Также существует модификация прямой микроскопии с использованием люминесцирующего агента калькофлюора белого. Грибы при взаимодействии с красителем и раствором щелочи поглощают калькофлюор, и при использовании люминесцентной микроскопии можно наблюдать голубое или зеленое свечение грибных элементов. Метод высокочувствительный, но для его использования необходимо иметь люминесцентный микроскоп и люминесцирующий агент [2].

Другой экспресс-метод, применяемый врачами-клиницистами непосредственно при оказании помощи, — использование ультрафиолетовой лампы с фильтром Вуда. Результаты позволяют при первичном осмотре животного подтвердить диагноз по наличию флуоресценции участка волоса. Как и при микроскопии, отрицательный результат при использовании лампы Вуда не исключает наличие возбудителя [3, 4].

Для подтверждения диагноза врачи могут передать шерсть в лабораторию, где с помощью ряда методов могут определить наличие дерматофитов. В современной диагностике возбудителей болезней, включая дерматофитозы, наиболее точными и эффективными являются молекулярно-генетические методы, прежде всего ПЦР-диагностика [5, 6]. Несмотря на явные преимущества в скорости и точности исследования, метод остается малодоступным, а высокая чувствительность может показывать ложноположительные результаты при наличии в материале нежизнеспособных дерматофитов. Кроме того, могут возникнуть затруднения при выделении ДНК грибов.

Наиболее распространенным лабораторным диагностическим методом для подтверждения дерматофитозов является микологический посев на питательные среды [7]. Существует несколько вариантов сред для выделения возбудителя. Классическая среда Сабуро используется для культивирования практически всех грибов-микромикетов. Часто при посеве клинического материала на среду Сабуро вырастают не только дерматофиты, но и грибы-контаминанты, которые растут быстрее, чем дерматофиты. Модифицировать эту среду можно добавлением в ее состав циклогексимида, который частично или полностью ингибирует рост плесеней, не влияя на рост дерматофитов. Установить принадлежность выросших грибов к дерматофитам можно только по морфологии спороносящих органов, которые в среднем появляются к 10–14-му дню. Это значительно замедляет время постановки диагноза и требует высокой квалификации лаборантов-исследователей.

Для ускоренной диагностики дерматофитозов была предложена среда ДТМ (DTM — *Dermatophyte Test Medium*), в состав которой входят среда Сабуро, циклогексимида и индикатор уровня pH [8]. Особенность трофики дерматофитов — использование в качестве источника энергии в первую очередь пептонов, а плесневые грибы используют углеводы. После переваривания белков в среду выделяются щелочные метаболиты, pH сдвигается в щелочную сторону и индикатор меняет цвет. Характерная колония белого цвета и изменение цвета среды дает основание подтвердить рост дерматофита. Как правило, изменение цвета происходит на 7–10-е сутки [9]. Кроме основных преимуществ, по сравнению с посевами на другие среды, среду ДТМ можно использовать в клиниках при отсутствии контакта врача с культурой гриба.

Цель исследования — сравнение различных методов диагностики дерматофитозов. В соответствии с целью были сформулированы следующие задачи: 1) практическое применение различных методов для лабораторной диагностики дерматофитозов; 2) сравнительный анализ данных методов с оценкой их эффективности.

Материалы и методы

Патологический материал собирали от мелких домашних животных (кошек и собак), имеющих симптомы дерматофитозов. Волосы с корнем выщипывали пинцетом по краям алопеций. Собрано 54 образца волос, которые были исследованы следующими методами.

Диагностика с помощью лампы Вуда. Использовали лампу с фильтром Вуда в диапазоне длины волны 368–371 нм. Исследование проводили в темном помещении, предварительно прогревая лампу не менее 5 минут. Результат считали положительным, если шерсть имела люминесцентное свечение.

Прямая микроскопия. Для приготовления препарата с помощью скальпеля отделяли корень волоса, помещали его на предметное стекло, добавляли каплю щелочи (15%-ный раствор NaOH). Далее накрывали покровным стеклом, короткое время прогревали над пламенем горелки, и спустя 10 минут проводили микроскопию при увеличении 200х. При необходимости детального рассмотрения препарата использовали увеличение 400х. Результат считали положительным, если обнаруживали артроспоры и/или мицелий грибов.

Люминесцентная микроскопия с калькофлюором. Приготовление препарата из шерсти производили аналогично прямой микроскопии. По инструкции производителя красителя к одной капле 10%-ной щелочи добавляли одну каплю “BactiDrop Calcofluor White” (“Remel”, USA). Накрывали покровным стеклом и проводили микроскопию на люминесцентном микроскопе с флуоресцирующим фильтром в диапазоне 400–500 нм. Результат считали положительным при обнаружении светящихся артроспор и/или мицелия грибов.

Посев на среды. Материал для посева измельчали с помощью скальпеля. В чашке/флаконе со средой размещали по 3–4 участка волоса в двух взаимно противоположных местах. Инкубировали при температуре $28 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 21 суток. В исследовании использовали среду Сабуро производства «HiMedia Laboratories Pvt. Limited» (India) и «ДТМ-Эксперт» (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, Россия). Посев на среде Сабуро считали положительным, если вырастала типичная колония дерматофита, а при микроскопии культуры обнаруживали типичные макро- и микроконидии. Посев на среду «ДТМ-Эксперт» считали положительным, если на среде вырастала ко-

лония белого или кремового цвета, а цвет среды менялся с желтого на красный. Учет результатов на среде «ДТМ-Эксперт» проводили в соответствии с инструкцией изготовителя.

Поскольку выделение чистой культуры дерматофита считается референсным методом подтверждения дерматофитозов, диагностическую эффективность всех методов оценивали относительно посевов на среду «ДТМ-Эксперт».

Результаты

При посеве 54 образцов шерсти удалось выделить 16 дерматофитов. Почти все выделенные дерматофиты принадлежали роду *Microsporum*.

Большинство из них относились к виду *M. canis*. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Эффективность среды «ДТМ-Эксперт» составила 100% (рис. 1). В среднем изменение цвета регистрировали на 8–10-е сутки роста. В одном посеве наблюдали рост культуры, но изменение цвета не произошло даже спустя 21 сутки. Культуру по результатам микроскопии идентифицировали как *Nannizzia (Microsporum) persicolor*. Количество ложноположительных изменений цвета среды составило 5,6% (3 из 54). Во всех случаях изменение вызывали плесени из рода *Alternaria*.

На среде Сабуро выросло 13 (81,3%) дерматофитов, из них 2 посева были сильно загрязнены плесневыми грибами. Отрицательными по дерматофитам были 13 посевов, к 7-му дню они полностью зарастали плесенью. Чаще всего вырастали *Alternaria sp.* — в 8 случаях, реже *Penicillium sp.*, *Cladosporium sp.* и *Aspergillus sp.*, в одном посеве был обнаружен рост *Trichothecium sp.*

При исследовании шерсти с помощью лампы Вуда удалось выявить 62,5% (10 из 16) положительных образцов и 16,7% (9 из 54) ложноположительных.

С помощью прямой микроскопии дерматофитозы подтвердили только в 56,3% (9 из 16) случаев. Ложноположительных результатов — 7,4% (4 из 54) (рис. 2).

Таблица 1. Результаты диагностики дерматофитозов различными методами

Table 1. Results of detecting dermatophytosis by different methods

	Лампа Вуда	Прямая микроскопия	Люминесцентная микроскопия с калькофлюором	Посев на Сабуро	Посев на ДТМ-Эксперт
Положительных образцов	10 (62,5%)	9 (56,3%)	15 (93,8%)	13 (81,3%)	16 (100%)
Ложноотрицательных образцов	9 (16,7%)	4 (7,4%)	5 (9,3%)	–	3 (5,6%)
Всего положительных образцов			16		
Всего образцов			54		

Рис. 1. Рост дерматофитов на 6-е сутки на среде «ДТМ-Экспресс»

Fig. 1. Growth of dermatophytes on the "DTM-Expert" environment (6th day)

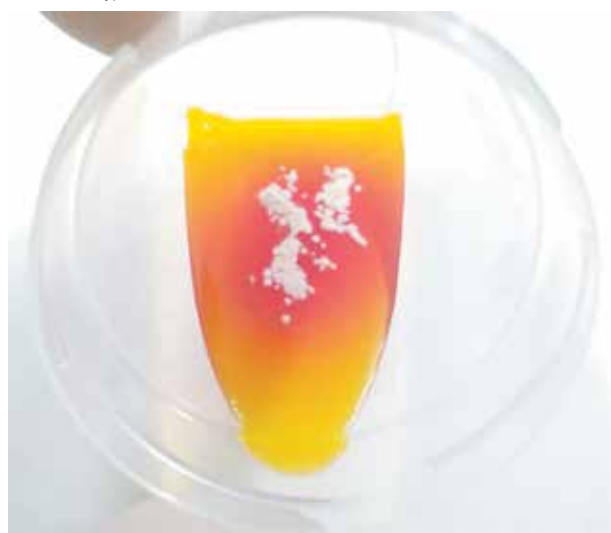


Рис. 2. Прямая микроскопия волоса. Увеличение x200

Fig. 2. Direct microscopy of the hair. Magnification x200.



Рис. 3. Микроскопия волоса с использованием калькофлюора белого. Увеличение x200

Fig. 3. Luminescent microscopy with calcofluor white. Magnification x200



Микроскопия с калькофлюором выявила возбудитель в 15 случаях, что составило 93,8%. При этом было 5 (9,3%) ложноположительных результатов (рис. 3).

Наиболее высокую диагностическую эффективность в исследовании показали два метода: посев на «ДТМ-Эксперт» и люминесцентная микроскопия шерсти с использованием калькофлюора белого, эффективность этих методов составила 100% и 93,8% соответственно, что согласуется с другими подобными исследованиями [8–12]. Однако несмотря на их высокую эффективность, они имеют и отрицательные стороны: на среде ДТМ иногда могут возникать ложноположительные изменения цвета. В данном случае следует иметь в виду цвет колоний: дерматофиты имеют белый или кремовый цвет. В исследовании все три ложноположительные реакции возникали на рост плесеней из рода *Alternaria*, которые имели темно-зеленый или коричневый цвет колоний. Помимо этого, изменение цвета при росте дерматофитов возникает не раньше 5–6-х суток после посева.

Заслуживает внимание выделение на среде ДТМ-Эксперт редкого вида дерматофита *Nannizzia (Microsporum) persicolor*. Возможно, данный случай является первым в ветеринарной практике на территории РФ.

Очевидно, что посев уступает по скорости диагностики другим экспресс-методам, прежде всего методу прямой микроскопии с использованием калькофлюора. Для проведения диагностики требуется микроскоп с люминесцентным блоком, что редко встречается в лабораториях. В нашем исследовании метод показал высокую эффективность, а ложноположительные результаты, вероятно, возникали из-за высокой чувствительности — метод позволяет обнаруживать споры не

только дерматофитов, но и других грибов. Чаще всего к ошибке приводят единичные споры, которые можно обнаружить на поверхности волоса. Большое скопление гиф и артроконидий практически всегда указывает на наличие возбудителя дерматофитозов.

Прямая микроскопия без красителя показала низкую эффективность, положительно подтвердив диагноз лишь в половине случаев. Метод также имеет низкую чувствительность, обнаружение единичных спор или гиф затруднено. Эффективность в большей мере зависит от опыта и навыков специалиста-исследователя.

Аналогичные результаты показал метод исследования шерсти с помощью лампы Вуда. Помимо низкой диагностической эффективности, в ходе исследования возникало много ложноположительных свечений шерсти, которые могли возникать по ряду причин.

Прямую микроскопию в КОН и тест с лампой Вуда следует использовать как вспомогательные методы при отборе наиболее подходящих образцов для посева.

Выводы

С учетом полученных результатов и сравнительной оценки эффективности методов диагностики дерматофитозов показано, что оптимальным вариантом представляется посев на среды ДТМ-типа, например «ДТМ-Эксперт». Данный метод является наиболее эффективным и доступным, прост в применении и интерпретации результатов, не требует дорогостоящего оборудования и специальной подготовки персонала.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-316-90064.

REFERENCES

1. Savinov VA, Kapustin AV, Ovchinnikov RS, Shastin PN, Laishevstev AI. Incidence and seasonal variation of pet dermatophytosis in Moscow region. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science – IOP Publishing*. 2020;548(7): 072048.
2. Abdelrahman T, Bru VL, Waller J, Noacco G, Candolfi E. Dermatophytosis: comparison of the performance of calcofluor and potassium hydroxide 30% for the direct examination of skin scrapings and nails. *Journal de mycologie medicale*. 2006;16(2): 87-91.
3. Moriello K. Dermatophytosis in cats and dogs: a practical guide to diagnosis and treatment. *In Practice*. 2019;41(4): 138-147.
4. Begum J, Mir NA, Lingaraju MC, Buyamayum B, Dev K. Recent advances in the diagnosis of dermatophytosis. *Journal of basic microbiology*. 2020;60(4): 293-303.
5. Piri F, Zarei Mahmoudabadi A, Ronagh A, Ahmadi B, Makimura K, Rezaei-Matehkolaei A. Assessment of a pan-dermatophyte nested-PCR compared with conventional methods for direct detection and identification of dermatophytosis agents in animals. *Mycoses*. 2018;61(11): 837-844.
6. Dąbrowska I, Dworecka-Kaszak B, Brillowska-Dąbrowska

- A. The use of a one-step PCR method for the identification of *Microsporum canis* and *Trichophyton mentagrophytes* infection of pets. *Acta Biochimica Polonica*. 2014;61(2): 375-8.
7. Moriello KA. Diagnostic techniques for dermatophytosis. *Clinical Techniques In Small Animal Practice*. 2001;16(4): 219-24.
8. Taplin D, Zaias N, Rebell G, Blank H. Isolation and recognition of dermatophytes on a new medium (DTM). *Archives Of Dermatology*. 1969;99(2): 203-9.
9. Kaufmann R, Blum SE, Elad D, Zur G. Comparison between point of care dermatophyte test medium and mycology laboratory culture for diagnosis of dermatophytosis in dogs and cats. *Veterinary Dermatology*. 2016;27(4): 284-e68.
10. Singh S, Beena PM. Comparative study of different microscopic techniques and culture media for the isolation of dermatophytes. *Indian J. Med. Microbiol*. 2003;21: 21-4.
11. Gnat S, Łagowski D, Nowakiewicz A, Dyląg M. A global view on fungal infections in humans and animals: opportunistic infections and microsporidiosis. *Journal of Applied Microbiology*. 2021;131(5): 2095-2113.
12. Pihet M, Le Govic Y. Reappraisal of conventional diagnosis for dermatophytes. *Mycopathologia*. 2017;182(1-2): 169-80

ОБ АВТОРАХ:

Савинов Василий Александрович, научный сотрудник лаборатории микологии и антибиотиков им. А.Х. Саркисова, <https://orcid.org/0000-0003-1891-0005>

Овчинников Роман Сергеевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории микологии и антибиотиков им. А.Х. Саркисова, <https://orcid.org/0000-0001-6634-9879>

Лаишевцев Алексей Иванович, кандидат биологических наук, зав. лабораторией микробиологии, <https://orcid.org/0000-0002-5050-2274>

Гулюкин Алексей Михайлович, доктор ветеринарных наук, профессор, директор, <https://orcid.org/0000-0003-2160-4770>

Капустин Андрей Владимирович, доктор биологических наук, доцент, заместитель директора по научной работе, <https://orcid.org/0000-0003-0136-2487>

ABOUT THE AUTHORS:

Savinov Vasily Alexandrovich, researcher of laboratory of mycology and antibiotics named after A. H. Sarkisov, <https://orcid.org/0000-0003-1891-0005>

Ovchinnikov Roman Sergeevich, PhD, leading Researcher of laboratory of mycology and antibiotics named after A. H. Sarkisov, <https://orcid.org/0000-0001-6634-9879>

Laishevstev Alexey Ivanovich, PhD, head of the laboratory of microbiology, <https://orcid.org/0000-0002-5050-2274>

Gulyukin Alexey Mikhailovich, PhD, director of Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Centre VIEV" <https://orcid.org/0000-0003-2160-4770>

Kapustin Andrey Vladimirovich, PhD, assistant Director <https://orcid.org/0000-0003-0136-2487>