

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР – ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ ИМЕНИ
К.И. СКРЯБИНА и Я.Р. КОВАЛЕНКО РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
(ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)

На правах рукописи

Савинов Василий Александрович

Разработка отечественной хромогенной питательной среды
«ДТМ-Эксперт» для диагностики дерматофитозов мелких
домашних животных

4.2.3 – инфекционные болезни и иммунология животных

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических
наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент
Капустин Андрей Владимирович

ОГЛАВЛЕНИЕ

1.	ВВЕДЕНИЕ	5
2.	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
2.1.	Характеристика возбудителей дерматофитозов животных	13
2.2.	Распространенность дерматофитозов среди мелких домашних животных	18
2.2.1.	Распространенность дерматофитозов в разных странах мира	19
2.2.2.	Бессимптомное миконительство среди животных-компаньонов	24
2.2.3.	Распространенность дерматофитозов в России	26
2.2.4.	Зооантропонозная значимость дерматофитозов животных	28
2.3.	Методы диагностики дерматофитозов животных	29
2.3.1.	Люминесцентное исследование	30
2.3.2.	Прямая микроскопия клинического материала	32
2.3.3.	Прямая микроскопия с использованием флюорохромного красителя	33
2.3.4.	ПЦР-диагностика	35
2.3.5.	ИХА-тест	37
2.3.6.	Гистологическое исследование патматериала	37
2.3.7.	Посев на питательные среды	38
2.3.8.	Видовая идентификация дерматофитов	42
2.4.	Заключение	43
3.	СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	45
3.1.	Материалы	45
3.2.	Методы	47
3.2.1.	Микологические методы	47
3.2.2.	Молекулярные методы	50
3.2.3.	Микробиологические методы	52
4.	РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	56
4.1.	Эпизоотологические особенности дерматофитозов мелких домашних животных	56
4.1.1.	Изучение эпизоотологической ситуации в Московском регионе	56
4.1.2.	Изучение миконительства	59
4.1.3.	Этиологическая структура дерматофитозов в Московском регионе	61
4.2.	Изучение питательных потребностей грибов-дерматофитов	74
4.2.1.	Подбор оптимального пептона	75
4.2.2.	Влияние углеводного состава на ростовые свойства экспериментальной среды	79
4.2.3.	Изучение влияния различных компонентов на скорость роста	

	дерматофитов и индикаторные свойства среды	81
4.2.4.	Подбор селективных добавок	84
4.2.5.	Подбор дополнительных питательных добавок для стимуляции роста	88
4.3.	Апробация среды на клиническом материале от больных животных	91
4.4.	Сравнение эффективности методов диагностики дерматофитозов	94
5.	ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	96
6.	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	107
7.	ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	109
8.	РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	110
9.	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	111
10.	ПРИЛОЖЕНИЯ	125

Список сокращений

DTM (Dermatophyte Test Medium) – селективная среда для выделения дерматофитов;

ООО – общество с ограниченной ответственностью;

гол. – голов;

с. – секунд;

мин. – минут;

ч. – часов;

сут. – сутки;

мес. – месяцев;

рис. – рисунок;

табл. – таблица;

др. – другие;

pH – водородный показатель;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

ITS - internal transcribed spacer - внутренний транскрибируемый участок;

ИХА – иммунохроматографический анализ;

пМ. – пикометр;

нм. – нанометр;

мм. – миллиметр;

см. – сантиметр;

мкл. – микролитр;

г. – грамм;

л. – литр;

ед. – единицы;

соавт. – соавторы.

1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы.

Дерматофитозы распространены практически во всем мире, при этом заболеваемость варьирует и зависит от времени года, климата, вида животных, качества ветеринарного надзора. Дерматофитозам подвержены почти все теплокровные животные, в том числе сельскохозяйственные, домашние и дикие.

Среди кожных патологий животных инфекционной этиологии дерматофитозы занимают лидирующее место. Степень заболеваемости в разных странах находится примерно на одном уровне, независимо от их экономического развития и климатических условий. Хотя болезнь не является летальной и чаще всего проходит в хронической форме, высокая контагиозность, длительность течения и сложность лечения приводят к серьезному экономическому ущербу, который складывается из затрат на профилактику распространения, санитарные обработки окружающей среды, лечение, которое может быть очень длительным.

Особую группу риска составляют животные, проживающие тесно связанными группами, поскольку при близком контакте инфекция проще и быстрее передается от больного здоровому. Именно поэтому, животные в приютах и питомниках особенно часто уязвимы для дерматофитов.

Помимо типичного проявления заболевания с характерными клиническими признаками, существует скрытое миконительство, при котором споры дерматофитов находятся на шерсти в неактивном состоянии, но могут индуцировать инфекционный процесс при благоприятных условиях. Несмотря на отсутствие клинических признаков болезни, миконисты представляют серьезную угрозу как источник заражения здоровых животных и человека.

Мониторинг дерматофитозов животных-компаньонов необходим для изучения сезонности, источников, путей передачи инфекции. Проведение скрининговых исследований в приютах, питомниках и зоомагазинах позволит предотвращать вспышки дерматофитозов и профилактировать распространение заболевания среди здоровых животных, а также обезопасить людей. Определение этиологической значимости различных видов патогенных грибов позволит

выявить новые «эмерджентные» виды дерматофитов, изучить их эпизоотологию, а также поможет усовершенствованию препаратов специфической профилактики. Знания современной этиологии дерматофитозов необходимы при выборе эффективных противогрибковых препаратов, отслеживания происхождения возбудителя (зоофильного или антропофильного) и обеспечения профилактических мероприятий.

При проведении лабораторной диагностики важно использовать достоверные и точные методы выявления и идентификации грибов-дерматофитов. В настоящее время в арсенале ветеринарного врача-клинициста есть несколько способов подтверждения диагноза, среди которых использование люминесцентной УФ-лампы с фильтром Вуда, прямая микроскопия шерсти, микологический посев, ПЦР-диагностика, ИХА-тест. Перечисленные методы диагностики имеют свои плюсы и минусы, однако микологический посев остается «золотым стандартом» диагностики, который позволяет выделить культуру гриба и определить его вид. Но данный метод имеет существенный недостаток – время получения результата, которое может составлять до 21 дня и более. При этом есть вероятность контаминации посева грибами других видов, в том числе плесневых, споры которых содержатся на поверхности шерсти животных. Обладая более активными ростовыми свойствами, они ингибируют рост дерматофитов, что затрудняет постановку правильного диагноза.

Использование для первичного посева среды DTM (Dermatophyte Test Medium) позволяет избежать отрицательные стороны классического микологического посева, при этом сохраняя положительные. Благодаря цветному pH-индикатору можно быстро дифференцировать дерматофиты от грибов других видов, не прибегая к микроскопии культуры и не дожидаясь созревания макро- и микроконидий, что значительно сокращает время диагностики. Селективные добавки ингибируют рост сопутствующей бактериальной микрофлоры, частично или полностью ингибируют рост плесневых грибов-контаминантов. При помощи DTM можно быстро выделить чистую культуру и определить ее чувствительность к антимикотикам.

Степень разработанности темы исследования.

Дерматофитозы относятся к инфекционным заболеваниям, не подлежащим строгой отчетности, из-за их низкой опасности для здоровья человека, что затрудняет изучение распространенности. За рубежом данный вопрос контролируется более тщательно, поскольку обязательному микологическому исследованию подвергаются все животные, попадающие на прием с дерматологическими проблемами, а также пациенты ветеринарных клиник с другими патологиями, что позволяет иметь объективную картину распространенности дерматофитозов среди животных. Исследования затрагивают приюты, зоомагазины, частные подворья – потенциальные источники скрытого миконосительства. Обычно для диагностики дерматофитозов используют микологический посев, либо его сочетание с другими методами, что позволяет получить объективную картину распространенности патогенных грибов.

В России исследования распространенности дерматофитозов публикуют редко. Чаще всего проводится статистический анализ дерматологических больных, среди которых выделяют пациентов с дерматофитозами, при этом не указывается вид выделенных дерматофитов, сезонность заболеваний, половую/видовую/породную предрасположенность, возрастную категорию заболевших, нетипичное течение заболевания, количество миконосителей и животных с классической картиной дерматофитозов. Часто диагноз основывается на использовании УФ-исследования шерсти с помощью лампы Вуда или прямой микроскопии, эффективность которых неоднозначна. Это ставит под сомнение многие результаты исследований, публикуемых отечественными учеными. Диагноз на дерматофитозы должен подтверждаться микологическим посевом и выделением чистой культуры.

Решением данной проблемы может являться использование сред DTM, которые применяют непосредственно в условиях клиники или приюта. На данный момент известен ряд импортных сред DTM, среди которых Dermatophytest, Dermakit, Derm-Duet, Mykodermoassay DTM и другие, однако выбор диагностикумов в России сильно ограничен. Использование импортных аналогов

имеет ряд недостатков. Прежде всего это их низкая доступность в России, отсутствие подробных инструкций с описанием каждого этапа диагностики, но главным недостатком являются частые ложноположительные реакции. Приведенные факты говорят о том, что существует потребность в разработке отечественной хромогенной питательной среды для экспресс-диагностики дерматофитозов животных.

Цель работы:

Изучить современную этиологическую структуру и распространенность дерматофитозов мелких домашних животных в Москве и Московской области и разработать отечественную хромогенную питательную среду «ДТМ-Эксперт» для их диагностики.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

1. Изучить распространенность и этиологическую значимость различных видов грибов-дерматофитов у животных-компаньонов в Московском регионе.
2. Выявить, идентифицировать и депонировать в коллекции штаммы грибов - возбудителей дерматофитозов для последующего использования в качестве тест-культур при контроле выпускаемых серий диагносткумов.
3. Разработать рецептуру и изготовить экспериментальные серии диагностической питательной среды для визуальной детекции грибов-дерматофитов.
4. Изучить свойства разработанной экспериментальной питательной среды в полевых условиях с использованием клинического материала от животных с подозрением на дерматофитозы.
5. Апробировать разработанную экспериментальную питательную среду для диагностики бессимптомного миконительства и подтвердить ее эффективность.

Научная новизна.

- разработана, апробирована и внедрена в диагностическую практику первая отечественная диагностическая хромогенная питательная среда «ДТМ-Эксперт» для выявления возбудителей дерматофитозов животных;

- доказано преимущество новой диагностической питательной среды в сравнении с зарубежными аналогами, которые уступают ей по селективным и индикаторным свойствам при выделении дерматофитов;

- получены данные по распространенности и этиологической значимости грибов-дерматофитов у животных-компаньонов в Московском регионе за период 2018-2021 гг.;

- получены данные о миконосительстве среди животных-компаньонов в Московском регионе за период 2018-2021 гг.

Теоретическая и практическая значимость.

- разработана и внедрена в лабораторно-диагностическую практику дифференциально-диагностическая хромогенная питательная среда для диагностики возбудителей дерматофитозов животных «ДТМ-Эксперт»;

- выделены и депонированы в коллекции штаммы грибов-дерматофитов *Microsporum canis* «FL 79-18 Viev» и *Trichophyton mentagrophytes* «CN 38-18 Viev», используемые в качестве тест-культур при контроле ростовых и индикаторных свойств среды «ДТМ-Эксперт»;

- получен патент «Штаммы мицелиальных грибов *Microsporum canis* и *Trichophyton mentagrophytes*, предназначенные для контроля ростовых свойств питательных сред» на штаммы *Microsporum canis* «FL 79-18 Viev» и *Trichophyton mentagrophytes* «CN 38-18 Viev»;

- получен патент «Селективная питательная среда для выделения возбудителей дерматофитозов» на технологию изготовления питательной среды «ДТМ-Эксперт»;

- разработан и утвержден промышленный технический регламент на производство хромогенной диагностической питательной среды «ДТМ-Эксперт»;

- разработаны и утверждены в установленном порядке методические указания «Диагностика дерматофитозов животных»;

- разработан стандарт организации СТО 00496165-0001-2021 «Дифференциально-диагностическая хромогенная питательная среда для диагностики возбудителей дерматофитозов животных «ДТМ-Эксперт»;

- разработана инструкция по ветеринарному применению дифференциально-диагностической питательной среды для диагностики возбудителей дерматофитозов животных «ДТМ-Эксперт»;

- получена декларация о соответствии требованиям СТО 00496165-0001-2021, регистрационный номер – РОСС RU Д-RU.PA01.B.79702/21;

- получен грант по конкурсу «Лучшие фундаментальные научные исследования, выполняемые молодыми учеными, обучающимися в аспирантуре» на тему «Мониторинг распространенности и разработка методов экспресс-диагностики дерматофитозов домашних животных».

Методология и методы исследования.

Методология диссертационной работы спланирована в соответствии со структурой и задачами исследования. Объектами научного исследования являлись изоляты и штаммы грибов-дерматофитов, контрольные и экспериментальные питательные среды, а также больные животные. Предметом исследования являлось изучение распространенности дерматофитозов среди животных-компаньонов, а также разработка и внедрение в практику дифференциально-диагностической питательной среды «ДТМ-Эксперт». Научная литература, касающаяся тематики исследования, была проанализирована формально-логическими методами.

В работе были использованы эпизоотологические, клинические, бактериологические, микологические, статистические методы исследований, методы молекулярной диагностики.

Положения, выносимые на защиту:

1. Эпизоотологические данные по распространенности дерматофитозов животных-компаньонов в Московском регионе за 2018-2021 гг;

2. Видовой состав и этиологическая значимость грибов, являющихся возбудителями дерматофитозов у животных-компаньонов в Московском регионе;

3. Технология изготовления и состав дифференциально-диагностической питательной среды «ДТМ-Эксперт»;

4. Результаты изучения ростовых и индикаторных свойств

экспериментальной дифференциально-диагностической питательной среды в лабораторных условиях;

5. Результаты апробации дифференциально-диагностической питательной среды «ДТМ-Эксперт» с клиническим материалом в полевых условиях, подтверждающие её преимущество по индикаторным и ростовым свойствам перед импортными ДТМ аналогами.

Степень достоверности и апробация результатов исследования.

Достоверность результатов, полученных в ходе выполнения диссертационной работы, подтверждена статистической обработкой данных, актами комиссионных испытаний, утвержденных в установленном порядке. Основные положения диссертационной работы доложены на:

- Юбилейной научно-практической конференции по микологии и микробиологии, Москва, 11-12.04. 2018 г.;
- II Международной научно-практической конференции (МКВИ-2018) «Актуальные вопросы ветеринарной иммунологии» в рамках конференции, посвященной 120-летию создания «Всероссийского научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко», Москва, 23 ноября 2018 г., ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН;
- Международной научно-практической конференции «Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов», посвященная 100-летию Армавирской биофабрики, пос. Прогресс, 20-21 августа 2021 г.;
- ежегодных отчетах аспирантов очной формы обучения на научно-методических комиссиях ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 11 научных работ: в журналах, рекомендованных ВАК РФ – 3 статьи; в базах, индексируемых Scopus – 4 статьи, в сборниках научных трудов – 4 статьи, а также методические указания, утверждённые руководителем секции «Зоотехния и ветеринария» отделения сельскохозяйственных наук РАН, академиком РАН В.В. Калашниковым 01.10.2021 года.

Личный вклад автора.

Автор принимал непосредственное участие в сборе информации по распространенности дерматофитозов мелких домашних животных Московского региона, проводил бактериологические, микологические и филогенетические исследования материала, осуществлял подбор рецептуры и апробацию различных составов экспериментальной среды «ДТМ-Эксперт», исследовал клинический материал от заболевших животных с применением экспериментальной ДТМ, разрабатывал нормативную документацию.

Структура и объем диссертации.

Материалы диссертации изложены на 147 листах компьютерного текста и включают: введение, обзор литературы, описание материалов и методов, собственные исследования, обсуждение полученных результатов, заключение с выводами, сведения о практическом использовании результатов исследований, рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы, список использованной литературы (163 источника, в т.ч. 139 – иностранных работ). Диссертационная работа содержит 16 таблиц, 35 рисунков, приложения на 22 листах.

Благодарность.

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю, заведующему лабораторией микологии и антибиотиков им. А.Х. Саркисова, д.б.н. Капустину А.В.; заведующему лабораторией диагностики и контроля антибиотикорезистентности возбудителей наиболее клинически значимых инфекционных болезней животных, к.б.н. Лаишевцеву А.И.; ученому секретарю диссертационного совета ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН Ездаковой И.Ю.; к.б.н. Овчинникову Р.С., а также сотрудникам лабораторий ООО «Неовет» и ООО «Артвет» за оказание практической и консультационно-методической помощи.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Характеристика возбудителей дерматофитозов животных

Дерматофитозы – контагиозные заболевания животных, вызываемые патогенными грибами-дерматофитами, которые способны размножаться и проникать в ороговевшие ткани кожи и вызвать их разрушение [32, 115, 154].

Заболеванию подвержены практически все теплокровные наземные животные – сельскохозяйственные, пушные, домашние, дикие, а также птица, рептилии и человек.

Первая таксономия дерматофитов была предложена Ремаком и Груби в 1841 году [83]. Разделение видов грибов происходило на основе клинических признаков. Систематическое изучение дерматофитов было начато Р. Сабуро, который после 1890 года опубликовал ряд исследований, а в 1910 году издал свою классическую монографию «Les Teignes». В этой работе была предпринята первая попытка создать классификацию дерматофитов, основанную на клинических признаках заболевания, особенностях морфологии гриба при паразитировании на волосе и макроскопической характеристике колоний, выросших на питательной среде [154]. К середине XX века было описано около 350 видов дерматофитов, однако основной принцип формирования видов отсутствовал, что приводило к повторным изменениям названий одного и того же вида. Широкое признание трех анаморфных родов - *Epidermophyton*, *Microsporum* и *Trichophyton* – объединило в себе все виды и помогло стабилизировать ситуацию в номенклатуре дерматофитов [79]. Помимо этого, таксономия включала в себя телеоморфные (половые, совершенные) формы грибов-дерматофитов, которые являлись близкородственными к анаморфным. Они были объединены в два рода - *Arthroderma* и *Nannizzia*.

Стандартизация эталонных штаммов затруднялась из-за быстрой дегенерации и сложности поддержания культур, что приводило к появлению множества таксонов. Таким образом, определение вида по фенотипу приводило к неправильной классификации.

Развитие молекулярной биологии позволило пересмотреть таксономию

дерматофитов уже на основании генотипа. В качестве универсального кода для грибов Schoch et al. [138] предложили использовать сиквенс ядерного рибосомального внутреннего транскрибируемого спейсера (nuclear ribosomal ITS). На основании секвенирования возбудители дерматофитозов были разделены на 9 родов: *Arthroderma*, *Epidermophyton*, *Lophophyton*, *Microsporum*, *Paraphyton*, *Nannizzia*, *Trichophyton*, *Ctenomyces* и *Guarrromyces*, которые объединены одним семейством - *Arthrodermataceae*. При этом отсутствуют телеоморфы, а дерматофит имеет только одно название. Род *Trichophyton* представлен 16 видами, в род *Nannizzia* входит 9 видов, в *Microsporum* – 3 вида, в *Arthroderma* - 21 вид, в *Paraphyton* – 3 вида, в рода *Lophophyton*, *Ctenomyces* и *Epidermophyton* включают в себя по 1 виду [32, 70, 76].

Грибы-дерматофиты - гетеротрофные аэробные организмы. Они неподвижны, не способны к фотосинтезу. Благодаря набору ферментов (кератиназ), дерматофиты могут разрушать не перевариваемые кератинизированные ткани, превращая их в более простые соединения, которые абсорбируются внутрь организма [7]. Используя направленный рост гиф и кератиназы, грибы прорастают в роговые структуры кожи, волос и ногтей. Мицелий дерматофитов светлый, равномерно септирован, однороден. Размножение осуществляется двумя способами: половым и бесполом. Размножение происходит с помощью спор, которые образуются в результате простого митоза или мейоза. В первом случае спорообразование осуществляется бесполом путем, а сами споры называются микро- или макроконидиями. Половое размножение происходит с помощью мейоза. Во время деления образуются различные производные структуры грибов – конидиогенные клетки и конидиеносцы, с помощью которых и осуществляется размножение. Часто разные виды обладают характерными для них особенными структурами мицелия, с помощью которых можно определить вид гриба. Например, *Trichophyton mentagrophytes* имеет спиральные гифы и сигарообразные макроконидии, *Nannizzia persicolor* также имеет множество спиральных гиф и веретенообразные макроконидии. Помимо этого, можно обнаружить хламидоспоры и артроспоры

(споры, которые возникают при фрагментации гиф на небольшие секторы, которые потом приобретают круглую форму).

Возбудители устойчивы к воздействию факторов окружающей среды, споры имеют высокую выживаемость, тем самым они отличаются от многих других инфекционных заболеваний. В помещениях они могут сохраняться до 10 лет, в почве – до двух лет [23, 59]. Грибы могут существовать в различных диапазонах температуры, начиная от -47°C до $+60^{\circ}\text{C}$, устойчивы в различных диапазонах pH – от трех до восьми [66].

В зависимости от экологической ниши дерматофиты принято разделять на группы: зоофильные – грибы, поражающие преимущественно животных, геофильные – обитающие в почве, и антропофильные – дерматофиты, которые инфицируют в основном человека. Такое разделение условно, поскольку существуют грибы, которые можно отнести сразу к нескольким группам.

Геофильные виды чаще всего непатогенны, но в редких случаях могут инфицировать животных и человека при их контакте с почвой. В качестве источника питательных веществ используют кератин волос, перьев и рогов, попадающих в почву в связи с утратой их животными. Считается, что геофильные дерматофиты были предками патогенных дерматофитов, которые адаптировались к инфицированию кожи [60].

Зоофильные дерматофиты имеют более высокую вирулентность по сравнению с геофильными. Вирулентность изолята одного и того же вида, выделенного от человека или животного, будет выше, чем у изолята, выделенного из почвы [88]. Среди зоофильных грибов наблюдается высокая частота полового размножения, что также характерно для геофильной группы, у антропофильных видов, напротив, половое размножение встречается редко [113, 155].

Антропофильные виды передаются исключительно от человека к человеку, в редких случаях носителями являются животные. Как правило, течение заболевания носит хронический характер в легкой поверхностной форме, не редко достигая масштабов пандемии [36, 88]. Однако при заражении человека зоофильными видами, заболевание приобретает более выраженную форму,

сопровождающуюся воспалением и острым течением.

Основным способом распространения дерматофитов является образование артроспор – клеток, формирующихся при фрагментации гифы на мелкие структуры. Они могут передаваться при прямом контакте больных животных или через предметы ухода и быта: расчески, щетки, подстилки, ошейники. Заражение из загрязненной окружающей среды считается маловероятным [123].

Дерматофиты способны инфицировать кератинизированные производные эпидермиса – шерсть, волосы, ногти, когти, рога, перья. Процесс инфицирования проходит в три этапа: адгезия артроспор, прорастание микроконидий и инвазия в ороговевшие структуры. Длительность каждого периода варьируется в зависимости от вида патогена и может длиться от нескольких часов до нескольких дней [34]. Во время первого этапа с помощью экспрессии адгезинов (поверхностных гликопротеинов) происходит быстрое прикрепление к ороговевшим тканям артроспор, что позволяет избежать защитные механизмы организма. Адгезия к коже была исследована у нескольких видов дерматофитов с использованием различных экспериментальных моделей. В частности, в экспериментальном исследовании, в котором использовали роговой слой и кератиноциты человека, адгезия артроконидий *T. mentagrophytes* была максимальной через 6 часов исследования [29]. В другом опыте, с использованием модели реконструированного эпидермиса кошек, при заражении *M. canis* адгезия происходила в течение 2-4 ч [150]. В исследованиях показана зависимость количества прилипших спор от времени. Последующий процесс прорастания начинается с образования герминативных или ростковых трубок из артроконидий.

При классическом течении болезни поражаются поверхностные кератинизированные ткани. На коже образуются алопеции круглой формы различного размера, с выраженной десквамацией. Эритема возникает редко. Поражение распространяется от центра к периферии. Поверхность может быть покрыта пустулами, в дальнейшем образуются корки. Поскольку возбудитель поражает волосные фолликулы, шерсть теряет свою окраску, становится ломкой,

легко выщипывается. Воспаление чаще всего отсутствует. При возникновении зуда дерматофитоз может осложняться пиотравматическим дерматитом из-за самотравмирования животным при расчесывании.

Заболевание может быть очаговым и ограничиваться одним или двумя пораженными участками. Чаще всего алоpecia локализуется на морде в области носа, ушей, глаз или на лапах. Как правило, поражения асимметричны. Известны случаи поражения когтей у собак и кошек, которые возникают при контакте с зараженной почвой, особенно сильно подвержены этому охотничьи собаки. Возникает так называемый онихогрифоз, при котором изменяется внешний вид, нарушается рост когтей. При генерализированной (диссеминированной) форме, инфицированные участки сливаются и покрывают значительную площадь поверхности кожи.

Клиническая выраженность дерматофитоза может варьировать в зависимости от вида возбудителя и животного-хозяина. Инфекция может протекать остро и быстро элиминироваться с помощью иммунного ответа организма, но есть виды, которые адаптируются к предпочтительному хозяину и течение заболевания может быть хроническим с незначительными или вовсе отсутствующими симптомами. Такой вид паразитизма дерматофитов называется бессимптомным миконосительством. Споры грибов находятся в покоящемся состоянии, не проявляя патогенных свойств. При наступлении определенных условий, таких как снижение иммунитета, нарушение защитных свойств кожи и т.д., активизируется инфекционный процесс и дерматофит переходит в паразитарную фазу. Клинически здоровые животные с бессимптомным миконосительством грибов-дерматофитов представляют особую социальную опасность – они не вызывают подозрений и могут длительное время контактировать с людьми и другими животными, загрязняя окружающую среду. Особенную угрозу миконосители представляют для детей, которые часто проявляют интерес к уличным животным.

По сравнению с другими животными, миконосительство наиболее часто выявляется среди мелких домашних – собак и особенно кошек. Вероятнее всего

это связано с тем, что другие животные исследуются только при возникновении симптомов заболевания, тогда как интерес к домашним питомцам гораздо выше по причине их тесного взаимодействия с человеком. По разным данным, до 88% животных-компаньонов могут быть бессимптомными миконосителями [20, 30, 31, 53, 112, 114, 124, 127, 135].

Основную этиологическую значимость бессимптомного миконосительства имеет вид *M. canis* [53, 114]. Также в шерсти могут присутствовать и другие неактивные дерматофиты, такие как *Nannizzia persicolor* (ранее *M. persicolor*), *Nannizzia gypsea* (ранее *M. gypseum*), комплекс *T. mentagrophytes*.

Помимо классических симптомов, дерматофитозы могут проявляться в виде атипичных форм. Дерматофиты могут проникать в толщину кожи и образовывать так называемые подкожные нодулярные поражения. Они дифференцируются по характеру проявлений. Различают керионы, которые проявляются в виде единичных или множественных узелков, содержащих экссудат и фрагменты волосяного фолликула. Вокруг поражения может возникать алопеция небольшого диаметра. Другим видом подкожных образований, вызванных дерматофитами, является мицетом. Она характеризуется пиогранулярным гранулематозным подкожным воспалением. Внутри узелков содержатся тканевые клетки и участки мицелия, окруженные фиброзной капсулой. Чаще всего образуются свищевые ходы, через которые выделяется серозный или серозно-гнойный экссудат [46, 58, 130, 131, 159, 163].

Нодулярный подкожный дерматофитоз встречается крайне редко, имеет хроническое течение и поражает, чаще всего, кошек. Ведущую этиологическую роль занимает *M. canis* [92].

2.2. Распространенность дерматофитозов среди мелких домашних животных

Дерматофитозы животных распространены по всему миру. При этом степень распространенности варьирует и зависит от климата, температуры, относительной влажности, количества осадков [48]. Поскольку оптимальными условиями для дерматофитов является повышенная влажность и высокая

температура, то очевидно, что наиболее высокие показатели заболеваемости будет в странах с тропическим и субэкваториальным климатом. Однако не менее важным фактором, регулирующим заболеваемость, является и качество оказания ветеринарной помощи, что напрямую зависит от экономического развития страны. Помимо географической зависимости, количество и видовое разнообразие дерматофитозов зависит от мест проведения исследования. В группе риска находятся животные, содержащиеся в скученных условиях, поскольку основной путь передачи инфекции - от животного к животному. В питомниках, приютах, зоомагазинах, как правило, показатель заболеваемости выше, чем при обследовании животных без симптомов. Другая категория - животные с клиническими симптомами дерматофитозов, которые проходят лечение у ветеринарных специалистов. Как правило, в этой группе заболеваемость самая высокая по сравнению с другими исследуемыми животными.

2.2.1. Распространенность дерматофитозов в разных странах мира

Исследования, проводимые в Южной Америке, показывают в среднем схожую по странам заболеваемость дерматофитозами среди кошек и собак.

В Южном регионе Бразилии М. Corpetti et al. провели исследование 1240 образцов шерсти, ногтей и чешуек кожи от собак и кошек, подозрительных по дерматофитозам. Среди них было 1089 собак (87,8%) и 151 кошек (12,2%). Образцы исследовали с помощью прямой микроскопии и посевов. Среди собак удалось выявить 111 (10,2%) больных животных, среди кошек 42 (27,8%). Общее число больных дерматофитозами животных с дерматологическими заболеваниями – 12,3%. Основной этиологической единицей являлся гриб *M. canis*. Отмечается, что среди кошек он был единственным возбудителем, от собак удалось выделить также *M. gypseum* и *T. mentagrophytes*. Авторы также указали на 4 случая смешанной инфекции дерматофитоза с демодекозом. Кроме дерматофитозов, острой проблемой в южных странах, в том числе Бразилии, является заболевание криптококкозом, возбудителем которого является диморфный гриб *Cryptococcus neoformans*. Помимо легких животного, он может поражать кожную ткань, вызывая локальные воспаления и образуя alopecii. В

данном исследовании было выявлено 2 (0,2%) животных, больных криптококкозом [63].

Похожие результаты представлены в исследовании R.S.N. Brilhante et al., проводимом в Северной части Бразилии. В течение года изучался клинический материал от кошек и собак, которые проходили обследование у ветеринарного дерматолога и были подозрительными по дерматофитозам. Всего было обследовано 189 собак и 38 кошек. Среди собак удалось определить 27 (14,3%) больных, среди кошек – 14 (36,8%). Общее число больных дерматофитозами животных составило 18%. Как и в предыдущем исследовании, основным возбудителем являлся *M. canis*, среди кошек он был единственным. Также встречались *M. gypseum* (2,5%) и *T. mentagrophytes* (2,5%) [48].

В Аргентине M.F. Lopez et al. исследовали кошек их приютов и питомников на наличие дерматофитов. Всего было обследовано 45 животных с признаками и без признаков дерматофитозов. Авторам удалось выявить 6 (13,3%) больных кошек, при этом в 5 (83,3%) случаях возбудителем был *M. canis* и в 1 (16,6%) случае *T. mentagrophytes* [106]. В Буэнос-Айресе при исследовании 156 животных, авторами выделено 28 дерматофитов, среди которых 27 – *M. canis*, и один – *M. gypseum* [90].

Интересное исследование провели D.T. Lewis et al. На территории США в течение 10 лет было исследовано 2232 клинических образцов от кошек и собак, обратившихся на прием к ветеринарным специалистам. Удалось установить заболеваемость, которая составила среди всех животных 5,9% (131/2232), при этом у кошек она была выше и составляла 14,9% (61/408), у собак – 3,8% (70/1824). Зависимость заболеваемости от пола не была установлена, также как и от породы. Не было разницы и в сезонности заболевания – в разное время года заболеваемость была примерно на одинаковом уровне. Наиболее часто выделялся *M. canis* – в 65,6 % от всех больных животных. От кошек он выделен в 56 (83,6%) случаев, у собак – в 30 (42,9%) [103].

Исследование, проведенное E. Gordon et al. на северо-западе США в течение двух лет, описывает распространенность дерматофитозов в приютах среди кошек.

Было исследовано 11214 животных на наличие дерматофитов. Среди всех кошек было выявлено 221 (2%) больное животное, среди которых 202 были с клиническими признаками заболевания и 19 определены как бессимптомные миконосители. Во всех случаях был выделен *M. canis*. Отмечена возрастная предрасположенность, чаще всего болели животные, в возрасте до 1 года [81].

Изучение распространенности дерматофитозов среди животных проводилось также канадскими исследователями R. Mozes et al., которые обследовали всех вновь прибывших животных в трех приютах, находящихся на расстоянии более 100 километров друг от друга. Пробы шерсти отбирались с помощью метода Маккензи, всего исследовано 400 кошек. В результате не было выделено ни одного гриба-дерматофита [118].

По литературным данным можно отметить, что на территории Северной Америки проводились достаточно длительные исследования, охватывающие большое количество животных. Долгосрочные наблюдения за распространенностью дерматофитозов дают более объективную оценку сезонности заболевания. Значительное внимание уделялось приютам, где содержится большое количество бездомных животных, и, в частности, кошек, которые чаще всего являются переносчиками заболевания. В среднем на территории Северной Америки заболеваемость составляет 6%, при этом может вообще отсутствовать. Во всех описанных случаях чаще всего дерматофитозам подвергались кошки. Наиболее часто выделяемые дерматофиты в описанных исследованиях представлены разными видами, основная этиологически значимая единица не определена.

В Иране в течение четырех лет было исследовано 186 образцов шерсти от кошек и 97 от собак, дерматофиты были выделены из 102 (55%) и 8 (8%) образцов соответственно. *M. canis* был основным выделенным дерматофитом (87% от кошек и 50% от собак), *M. gypseum* на втором месте по встречаемости, на третьем – *T. mentagrophytes* [97].

В Нигерии было исследовано 538 различных животных, в том числе 105 собак и 77 кошек, среди которых было зафиксировано 52 (50%) и 47 (61%)

больных, соответственно. При этом основным выделяемым дерматофитом был *M. canis* (64%), вторым по выделяемости *T. mentagrophytes* (26%), третьим – *M. gypseum* (4%) [122].

На основании приведенных работ можно сделать вывод, что в странах с жарким климатом картина по заболеваемости дерматофитозов схожа. При этом распространенность заболевания среди кошек и собак находится на достаточно высоком уровне, в том числе и виде скрытого миконительства. Основные преобладающие виды дерматофитов также схожи в разных странах – чаще всего возбудителем является *M. canis*, чуть реже - *T. mentagrophytes* и *M. gypseum*.

По сравнению с другими странами, существует значительно большее количество публикаций об исследованиях, отражающих распространенность дерматофитозов среди животных-компаньонов, в странах Европы.

Как минимум 5 исследований проводились на территории Италии за предыдущий двадцатилетний период.

Так Marchisio V.F. et al. в течение года из 203 образцов клинического материала, отобранного от кошек и собак, выделили 82 (40%) культуры дерматофитов. Единственным видом был *M. canis* [110].

Наиболее масштабное исследование по выявлению дерматофитозов было проведено Mancianti F. et al., обследовавшей образцы от 10678 животных с симптомами дерматофитозов, в том числе 7650 кошек и 3028 собак в течение 15 лет. Из них 2456 (23%) животных были положительным по заболеванию – 566 (18,7%) собак и 1890 (24,7%) кошек. *M. canis* был основным возбудителем, его выявили в 83% случаев у собак и 97% случаев у кошек. *M. gypseum* и *T. mentagrophytes* выделяли значительно реже. Отмечается, что *M. gypseum* чаще встречался у собак охотничьих пород [108].

Схожее исследование провели Cafarchia C. et al., выявив среди 424 животных с поражениями кожи, 99 (23,3%) больных дерматофитозами, среди кошек было выявлено 28,2% случаев заболевания, среди собак – 20,5%. Как и в других сообщениях, *M. canis* являлся наиболее частым возбудителем -77,7% [54]. Через два года Cafarchia et al. опубликовал похожее исследование, где сообщил о

схожей заболеваемости дерматофитозами животных-компаньонов [53].

Помимо собак и кошек в современных реалиях в качестве домашних питомцев часто фигурируют и «экзотические» животные, которые также могут представлять потенциальную угрозу заражения дерматофитами. Сведений о распространенности дерматофитозов среди таких животных мало. В статье по изучению этиологии заболеваемости дерматофитозами мелких домашних животных других видов, в частности, кроликов, морских свинок, хорьков, ежей, шиншилл и крыс, сообщается, что авторам удалось выявить поражение грибами у 46 животных из 655 обследованных, при этом *T. mentagrophytes* диагностировали в 43 случаях, остальные 3 приходились на *Microsporum spp.* [73].

В Турции в одном из исследований среди 162 животных с различной клинической картиной, больными оказались 22 (13,6%), при этом у всех животных диагностировали *M. canis* [30]. В другом исследовании авторы определяли распространенность дерматофитозов и виды выделенных изолятов. За 4 года удалось выявить среди 362 образцов 70 (19,3%) положительных на наличие возбудителя. Заболеваемость среди кошек и собак была практически на одном уровне, а основным дерматофитом был *M. canis* (57,1% случаев) [139].

В доступной литературе имеется много сообщений из стран Европы. Так, в Португалии на основании исследования 1298 образцов клинического материала от кошек и собак установлена заболеваемость на уровне 18,1%. *M. canis* выделен в 70,2% случаев, *T. mentagrophytes* был на втором месте по выделению, на третьем – *M. gypseum* [43]. При исследовании бездомных кошек и собак на наличие паразитарных инфекций, Duarte A. et al. отметили, что среди 136 животных 40 были больными или переносчиками дерматофитов. 17 (42,5%) изолятов принадлежали виду *M. canis*, 15 (37,5%) – *T. mentagrophytes*, 8 (20%) – *T. verrucosum* [75].

В Швейцарии исследовали 274 мелких домашних животных на наличие возбудителей дерматофитозов. Удалось выявить 57 культурально положительных животных. Интересен факт, что помимо *M. canis*, который, как и везде, чаще всего являлся возбудителем заболевания, авторы отмечают наличие других видов

дерматофитов: 21 (37%) случай выделения приходится на *Arthroderma vanbreuseghemii*, 6 (10%) – на *Arthroderma benhamiae*, которые выделяли только от морских свинок [74].

В Испании в течение 10 лет был выделен 91 (33,7%) дерматофит от 270 особей домашних животных, о чем сообщает Cabanes F.J. et al. Основные виды возбудителей принадлежали видам *M. canis* – 77,8%, *T. mentagrophytes* – 13,3%, *M. gypseum* – 8,9% [50].

Интересный опрос провела Европейская Конфедерация Медицинской Микологии (ЕСММ), в котором отразились результаты пятилетней работы по диагностике дерматофитозов животных различных стран Европы – Бельгии, Хорватии, Чехии, Германии, Италии и Испании. Были собраны данные о 6442 кошках и 6160 собаках. Дерматофиты выделены от 1767 (27,4%) кошек и 765 (12,4%) от собак. Как у кошек, так и у собак, общее количество положительных культур было выше в осенние и зимние месяцы. У кошек наиболее распространенным выделенным видом был *M. canis* (96,9%). Другими выделенными видами были *M. gypseum* (1,9%), *T. mentagrophytes* (1%), *M. persicolor* (0,05%) и *Trichophyton spp.* (0,15%). У собак *M. canis* (76,2%) также был наиболее распространенным изолированным видом. Другими выделенными видами были *T. mentagrophytes* (12,4%), *M. gypseum* (10,8%) и *Trichophyton spp.* (0,6%) [51].

2.2.2. Бессимптомное миконосительство среди животных-компаньонов

Группа исследователей Минас-Жирайс, юго-восток Бразилии, приводит данные изучения шерсти домашних и уличных животных, среди которых было 40 собак и 40 кошек. Им удалось выявить споры грибов у 13 (32,5%) собак и 14 (35%) кошек, при этом только два животных имели симптомы дерматофитозов, остальные являлись миконосителями. Таким образом, среди 80 животных, потенциально опасными переносчиками дерматофитозов были 33,8%. Основным возбудителем заболевания являлся *M. canis*: у собак он был выделен в 6 (15%) случаях, у кошек – 19 (47,5%). *Trichophyton spp.* был выделен в 11 (27,5%) случаях

от собак и 4 (10%) случаях от кошек. В общей сложности, *M. canis* выделили в 25 (31,3%), *T. mentagrophytes* – в 15 (18,8%), *M. gypseum* – в 7 (8,75%) случаях [38].

В Колумбии (Кали) M.Alvarez et al. было обследовано 251 собака, среди которых 86 были бродячими. От исследуемых собак больными и носителями оказались 34 (13,5%), из которых 23 были домашними и 11 бродячими. Только у 8 собак были обнаружены характерные клинические симптомы, остальные 26 были бессимптомными миконосителями. Наиболее частым возбудителем признан *M. gypseum*, выявленный в 19 (55,9%) случаев, *M. canis* и *T. mentagrophytes* выделили в 5 (14,7%) случаях [55].

Заболеваемость дерматофитозами в приютах изучена К.А. Moriello et al. При обследовании двух приютов, находящихся в разных климатических регионах США, проведены посевы образцов от 200 кошек, не имеющих симптомов дерматофитозов. Носительство спор дерматофитов составило 17,5%. Основным возбудителем признан *T. rubrum*, который выделили в 16 (45,7%) случаях из 35. Частота выделения *M. canis* составила 22,9%, *T. verrucosum* и *Epidermophyton spp.* – по 14,3%, *T. mentagrophytes* – 2,9% [117].

Аналогичное исследование провели К. Boyanowski et al., исследовавшие 200 образцов клинического материала от кошек, которые находились в четырех различных приютах. Установлена заболеваемость, составившая 5,5%. При этом *M. canis* был выделен в 90,9% случаев (10 из 11). Авторы отмечают, что 10 из 11 кошек не имели клинических признаков заболевания и являлись бессимптомными миконосителями [47].

В Индии, где преобладает тропический климат, в течение двух лет исследовали животных-компаньонов без каких-либо клинических признаков заболеваний кожи. Среди 1209 образцов от собак и 292 от кошек удалось выявить 253 (20,93%) и 109 (37,33%) дерматофитов, соответственно. Основным возбудителем был *M. canis* (43,55%), второй по значимости - *M. gypseum* (36,69%), на третьем месте по выделяемости был *T. mentagrophytes* (19,79%). Диагноз подтверждали с помощью прямой микроскопии и посева на DTM [71].

Представленные данные говорят о высокой степени распространенности

бессимптомного миконосительства в Индии. Стоит заметить, что исследование проводилось в связи с ростом заболеваемости дерматофитозами людей, что подчеркивает значимость животных в распространении дерматофитов.

В Турции Ates A. et al. изучали бессимптомное миконосительство среди собак. Из 154 животных было выделено всего 4 дерматофита – 3 изолята *T. mentagrophytes* и 1 изолят *M. gypseum* [31]. В другом турецком исследовании среди 100 клинически здоровых кошек было обнаружено 11 (11%) бессимптомных миконосителей, выделенный дерматофит принадлежал к виду *M. canis* [30].

В Англии было проведено небольшое исследование, где изучали миконосительство среди домашних животных без симптомов заболевания. Из 139 образцов выделено всего 9 (6,5%) дерматофитов, 5 из которых принадлежали роду *Trichophyton* и 4 – роду *Microsporum* [127].

2.2.3 Распространенность дерматофитозов в России

В России сообщений на данную тему крайне мало.

Крупное исследование по изучению распространенности и видового состава дерматофитозов было проведено в Якутии. За 10-летний период обследовано 2770 домашних животных, в том числе 2172 собаки и 573 кошки с симптомами дерматофитозов. Заболевание подтверждено у 248 (11,4%) собак и 197 (34,4%) кошек, что в общем составило 16,2%. *M. canis* у собак выделен в 10,49% случаев, у кошек – 27,74%, значительно реже выделялись *M. gypseum* и *T. mentagrophytes*. Отмечается высокая степень бессимптомного миконосительства [23].

Другое крупное исследование проводили в Омске. В течение 10 лет обследовано 25670 животных, среди которых 10360 (40,36%) животных имели дерматологические заболевания разной этиологии. Среди всех больных дерматологического профиля, дерматофитозы подтверждены у 196 (18%) собак и 134 (17,4%) кошек, общая заболеваемость составила 3,2%. Чаще всего возбудителем заболевания был *T. mentagrophytes* – 15%, реже *M. canis* – 7,5% [10,11].

В Тюмени Столбова О.А. и соавт. провели исследование 2706 животных (1254 собак и 1452 кошки) с кожными поражениями разной этиологии с целью изучить причину заболеваний. Дерматофиты выявлены у 9% животных, среди которых 110 собак и 136 кошек. Видовая структура дерматофитов авторами не уточнялась [22].

Представлены результаты исследования Казанских ученых, по изучению микобиоты кожных покровов и шерсти 50 образцов от 34 кошек и 16 собак, поступивших на прием к ветеринару без признаков дерматологических заболеваний. Авторами отмечено, что 6 кошек и 3 собаки имели небольшие алопеции, отрицательные при люминесцентном исследовании. В результате установлено, что 15 кошек и 7 собак были носителями спор грибов-дерматофитов. От кошек в 6 случаях выделен *M. canis*, в 8 случаях – *T. mentagrophytes*, в 3 случаях выделили *Trichophyton spp.* У собак *M. gypseum* был выделен от 2 животных, *T. mentagrophytes* – от 4 животных, и *Trichophyton spp* – от 1 собаки [24].

В исследовании, проведенном в секторе микозов ВГНКИ, при изучении этиологической структуры зооантропонозных микозов, установлено, что основную этиологическую роль при дерматофитозах животных играет *M. canis*. При микологическом исследовании кожных поражений 11 кошек и 19 собак было выделено три штамма *M. canis* от кошек и один изолят *M. canis* от собак [14]. На основании полученных данных, Маноян М.Г. и соавт. утверждают, что ведущая этиологическая роль дерматофитозов кошек и собак принадлежит *M. canis* [9].

По данным Горбатова А.В., анализ заболеваемости дерматофитозов мелких домашних животных в Москве за 1961-1981 гг. показал, что у собак сохраняется тенденция к росту заболеваемости. Если в 1961 году было зарегистрировано всего 34 случая микроспории собак, то в 1973 году зафиксировано 382 случая, а к 1981 году количество заболевших снизилось до 124. Заболеваемость кошек за этот период также имеет подъемы и спады: в 1961 году зарегистрировано 514 случаев, в 1971 г. отмечен максимум заболеваемости – 1270 случаев, после чего наблюдается постепенное снижение (рис. 1).

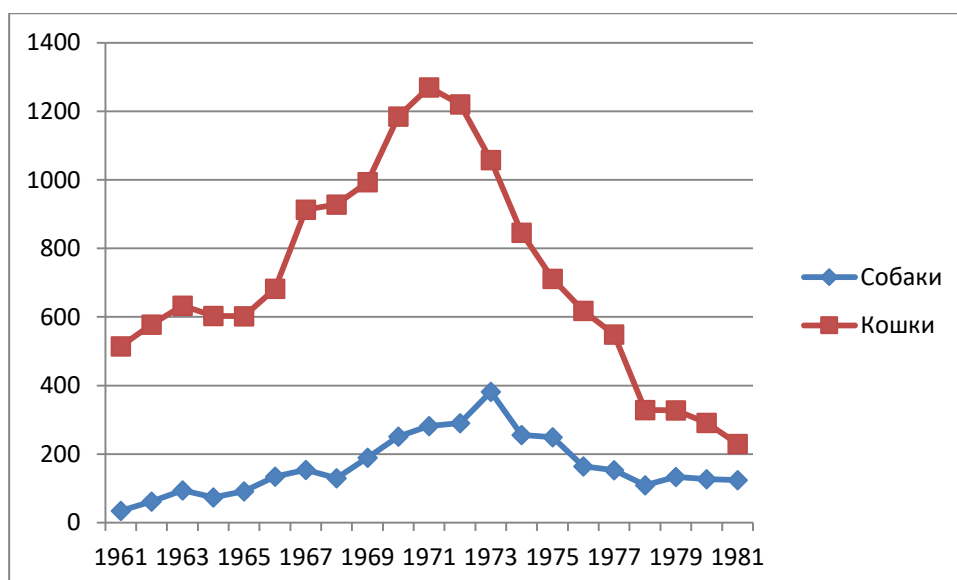


Рис. 1 – Динамика заболеваемости микроскопией собак и кошек в Москве за 1961-1981 гг.

Как видно из графика, пики роста заболеваемости у кошек и собак совпадают по времени 1971 г. Также заметно преобладающее количество случаев дерматофитозов среди кошек по сравнению с собаками.

Отмечено, что в течение проводимого исследования было выделено всего 4 изолята *T. mentagrophytes* – один случай в 1961 г., один в 1978 г. и два в 1981 г., остальные изоляты были отнесены к виду *M. canis* [5].

Кроме этих сообщений, литературных данных о распространенности дерматофитозов в России нет.

2.2.4. Зооантропонозная значимость дерматофитозов животных

Синантропные животные играют важнейшую роль в эпидемиологии дерматофитозов человека. В настоящее время установлено, что в этиологической структуре преобладают зоофильные дерматофиты [12].

По данным Антоновой С.Б. и соавт., основным источником микроспорий и трихофитий людей являются бродячие животные – 46,7 % случаев, доля домашних животных в качестве источника заболевания – 30,7% [3].

В Корее в течение 17 лет изучали этиологическую структуру дерматофитозов человека и пришли к выводу, что основным видом является зоофильный вид *M. canis* [102]. Аналогичные данные приводят и другие исследователи из различных стран мира. В Греции при изучении эпидемиологии

дерматофитозов людей установили, что в этиологии заболевания превалирует *M. canis* (35,8%), *T. rubrum* (35.1%) и *T. mentagrophytes* (23.3%) [109]. Китайские ученые получили аналогичные результаты при анализе данных за период с 1956 по 2015 годы: из 38962 полученных изолятов, примерно 80% составлял *M. canis*. Авторы полагают, что экономическое развитие и урбанизация городов способствует смещению этиологических единиц дерматофитов от антропофильных к зоофильным, а основным источником заболевания становятся домашние животные [161]. В Польше получены схожие результаты – в течение 12 лет было зарегистрировано 1195 случаев дерматофитозов человека. Среди них *T. mentagrophytes* был выделен в 42,1% случаев, *M. canis* в 26,0% случаев, остальные приходились на антропофильные виды дерматофитов [121]. В Республике Македонии зоофильный вид *M. canis* был на втором месте по количеству выделений от человека с дерматофитозами [145].

В последнее время все чаще возникают сообщения о дерматофитозах, вызванных *Arthroderma benhamiae* и *T. erinacei* [18, 25, 89, 120, 137, 149, 156, 162]. Эти виды стали чаще вызывать заболевания среди людей, несмотря на то, что являются зоофильными. Считается, что основным источником и переносчиком *A. benhamiae* являются морские свинки, при этом носителями могут быть и другие грызуны. При этом клиническая картина у животных может проявляться незначительно или отсутствовать совсем. У людей *T. benhamiae* вызывает тяжелые поражения кожи, связанные с обширным воспалением и вторичной бактериальной инфекцией [35].

Основным источником *T. erinacei* являются ежи [140]. Описаны случаи заболевания людей дерматофитозами, в том числе детей, контактировавшие с ежами [77, 137]. Возрастающий интерес к данным животным приводит к повышенному распространению дерматофитов среди людей.

2.3. Методы диагностики дерматофитозов животных

Для диагностики дерматофитозов применяют различные методы исследования клинического материала. Непосредственно в месте оказания

помощи животному чаще всего используют люминесцентное исследование с помощью лампы с фильтром Вуда. Другим методом быстрой диагностики является прямая микроскопия шерсти, обработанной раствором щелочи.

Лабораторная диагностика подразумевает использование различных методов, которые включают в себя уже названные тесты с лампой Вуда, прямой микроскопией со щелочью, микроскопией шерсти с добавлением люминесцирующего вещества калькофлюора белого, посев клинического материала на питательные среды различного состава, в том числе ДТМ, ПЦР-диагностика, исследование крови больного животного на наличие антител к возбудителю с помощью ИХА-тестов.

2.3.1. Люминесцентное исследование

Наиболее быстрый и практичный способ диагностики дерматофитозов – люминесцентное исследование клинического материала или непосредственно самого животного. Для проведения теста необходимо использовать лампу с фильтром Вуда. Она была изобретена в 1903 году Робертом У. Вудом. Изнутри стекло лампы покрыто фильтрующим материалом темно-синего или фиолетового цвета, оно непрозрачно для всех видимых лучей света, за исключением самых длинных красных и самых коротких фиолетовых длин волн. Стекло пропускает ультрафиолетовый свет, длина волны которого находится в диапазоне 320-400 нм, с пиком в 365 нм. Благодаря такому излучению, можно обнаружить по характерной изумрудной флюоресценции химический метаболит птеридин, который образуют ряд дерматофитов. Первое сообщение об использовании этого метода относится к 1933 году. Davidson A. et al. выявили больного котенка, который являлся источником заражения для владельцев [67].

Однако спектр дерматофитов, которые производят люминесцирующий пигмент, ограничен несколькими видами, в основном из рода *Microsporum spp.*: *M. canis*, *M. ferrugineum*, *M. gypseum*, *M. persicolor*, а также *T. schoenleinii* [45, 56, 94, 95, 119].

Наличие свечения шерсти не является полноценным подтверждением инфекции. При длительном лечении, дерматофиты могут быть полностью

устранены, но люминесценция может сохраняться благодаря наличию метаболита на шерсти, который сохраняется длительно после выздоровления. Поэтому этот метод нельзя использовать для контроля лечения.

Исследование следует проводить в темном помещении, заблаговременно прогрев лампу в течение нескольких минут. Следует помнить, что флюоресценцией обладают, в том числе, и некоторые лекарственные препараты, другие микроорганизмы, производящие люминофоры, что может приводить к ложноположительным результатам.

Тест следует использовать при первичном осмотре животного для отбора клинического материала и его дальнейшего исследования с применением более точных методов диагностики. Лампа Вуда позволит точно определить локализацию инфицированного участка, что поможет отобрать оптимальный образец для исследования.

Эффективность метода в различных исследованиях сильно варьируется.

Detar L.G. et al. в исследовании по диагностике дерматофитозов среди кошек установили эффективность использования лампы Вуда, которая составила 78,8% по сравнению с посевом на DTM, при этом чувствительность и специфичность метода была на уровне 66,8% и 74,8% соответственно [72].

Safarchia C. et al. отмечают эффективность лампы Вуда на уровне 45,5%, по сравнению с посевом [54]. В другом исследовании, посвященном диагностике дерматофитозов у собак, эффективность люминесцентного метода составила 0%, из 17 культурально-положительных образцов с помощью лампы Вуда не выявлено ни одного положительного. При этом было выделено 16 культур *M. canis*, которые должны иметь характерное люминесцентное свечение [64].

Kaplan W. et al. при обследовании 2183 образцов на дерматофитозы в течение 18 месяцев подтвердили *M. canis* в 445. С помощью лампы Вуда удалось выявить только 30% положительных результатов [95]. Похожие результаты были получены в исследовании Wright A. et al. В течение 20 лет удалось зафиксировать только 32% флюоресцирующих образцов от всех положительных по *M. canis* [158].

В исследовании, проведенном Sparkes A. et al., эффективность люминесцентной диагностики при выявлении *M. canis* составила 90%, по сравнению с микологическим посевом [144]. При этом было исследовано 8349 образцов, среди которых 1368 были культурально положительными.

Как видно из представленных данных, эффективность метода неоднозначна, что подтверждается многими исследованиями. Тест не рекомендуется использовать в качестве основного метода диагностики дерматофитозов животных.

2.3.2. Прямая микроскопия клинического материала

С помощью прямой микроскопии можно обнаружить грибные элементы, находящиеся на волосе и в коже. При дерматофитозах на шерсти больного животного чаще всего выявляют артроспоры – спороподобные клетки, образующиеся при фрагментации мицелия на отдельные сферические участки. Они могут покрывать волос, чаще его корень, в виде чехла по типу экзотрикса (тип инвазии волоса), образуя большие скопления в виде муфты. Другой тип расположения артроспор – эндотрикс, когда артроспоры проникают внутрь волоса. Кроме спор, можно обнаружить цепочки гиф или участки мицелия, но это не дает основания предполагать дерматофитоз, поскольку гифы могут принадлежать другим, в том числе сапрофитным, микромицетам.

Для проведения качественной микроскопии волоса, следует правильно подготовить препарат. Пучки волос необходимо разделить на отдельные волосы, от исследуемой шерсти следует отделить корневые участки и поместить их в каплю 15-20% NaOH или KOH. Щелочь способствует растворению дебриса и размягчению роговых структур, облегчая обнаружение грибных элементов. Для ускорения просветления материала, стекло подогревают над пламенем горелки, не доводя до кипения. После подготовки, препарат просматривают сначала под малым увеличением микроскопа - x100, затем переходят для более детального исследования на увеличение - x200-400.

Эффективность метода зависит от многих факторов – от соблюдения

правильности проведения исследования, навыков и опыта персонала, проводящего наблюдение, степени поражения волоса – при ярком клиническом течении заболевания обнаружить дерматофиты будет достаточно просто. Однако далеко не всегда дерматофитозы имеют классическую картину, из-за этого эффективность прямой микроскопии может сильно варьироваться. По данным Brilhante R.S.N. et al., эффективность микроскопии по сравнению с посевом составила 61%, выявив среди всех 41 культурально-положительных образцов только 25 [48]. Аналогичное исследование Piri F. et al. показало эффективность метода на уровне 85% [129]. В исследовании, проводимое в течение 35 лет, эффективность прямой микроскопии при обнаружении дерматофитозов животных составляла 93% [144]. В Иране группой исследователей удалось установить эффективность метода на уровне 88,3% [141]. Seker E. et al. при диагностике дерматофитозов мелких домашних животных из 362 образцов шерсти при помощи прямой микроскопии определили 52 положительных образца, среди которых только 44 были подтверждены микологическим посевом. При этом из 26 образцов, отрицательных по прямой микроскопии, были выделены дерматофиты [139].

Важно помнить, что препарат, приготовленный со щелочью, может иметь артефакты, которые могут быть ошибочно идентифицированы. К ним относятся так называемые «мозаичные грибы» - кристаллы щелочи в виде нитей и гранул. Как правило, эти артефакты исчезают после добавления дистиллированной воды [128].

Несмотря на достаточно высокую диагностическую эффективность, прямую микроскопию, как и люминесцентную диагностику, следует использовать как вспомогательный метод, поскольку исследование имеет низкую специфичность.

2.3.3. Прямая микроскопия с использованием флюорохромного красителя

Чтобы повысить эффективность и чувствительность прямой микроскопии, в лабораториях используют специальные красящие добавки, которые позволяют визуализировать мицелий.

Существует модификация прямой микроскопии с использованием люминесцирующего агента калькофлюора белого. Грибы, при взаимодействии с красителем и раствором щелочи, поглощают калькофлюор, поскольку он имеет сродство к хитину и целлюлозе [86]. Первоначально флюорохромный краситель применялся в качестве отбеливателя в текстильной промышленности.

При использовании люминесцентной микроскопии можно наблюдать голубое или зеленое свечение грибных элементов, которое зависит от применяющегося фильтра в микроскопе. При использовании фильтра 400 нм, грибные элементы в люминесцентном свете имеют ярко-зеленый цвет.

Для использования этого метода необходимо иметь люминесцентный микроскоп и люминесцирующий агент. Тем не менее, метод является высокочувствительным, что подтверждается рядом исследований. David J.M. et al. сравнивали прямую микроскопию с КОН и микроскопию с добавлением калькофлюора. Авторами была установлена чувствительность и специфичность, которые соответствовали 92% и 95% - для калькофлюора, и 88% и 95% для щелочи [87]. Диагностическая эффективность калькофлюора – 74%, щелочи – 73%. Отмечено, что оба способа легко выполнимы, однако использование красителя позволяет значительно проще интерпретировать результаты микроскопии. При этом могут возникнуть ложноположительные результаты, которые чаще всего связаны с нежизнеспособными спорами.

В исследовании Abdelrahman et al. сообщается о более высокой, по сравнению с использованием КОН, специфичности и чувствительности метода с калькофлюором, которая составила 88,5 и 93% соответственно [26].

В России данные об использовании калькофлюора белого при диагностике дерматофитозов животных отсутствуют.

Кроме того, люминесцентную диагностику часто используют для выявления микозов в медицине. Существуют сообщения о выявлении грибов при неинвазивном микозе околоносовых пазух [106], инвазивном аспергиллезе легких [6], наружном отите [2] и пр. Это подчеркивает высокую значимость метода при диагностике грибов в целом.

Помимо люминесцентного красителя, в препарат можно добавлять перманентные чернила Parker (Parker quink permanent blue ink), диметилсульфоксид (КОН-ДМСО), Конго красный (Congo red), Chicago Sky Blue, хлоразоловый черный [80, 101, 126]. Однако они не являются специфическими, только упрощают обнаружение грибных элементов в препарате при помощи их контрастирования или затемнения поля.

2.3.4. ПЦР-диагностика

Полимеразная цепная реакция – это процесс амплификации участка ДНК *in vitro*, в результате которого в течение нескольких часов можно получить множество копий конкретного участка. Следовательно, метод очень чувствительный и специфичный.

ПЦР-диагностика дерматофитов в клиническом материале является перспективным методом, который имеет ряд преимуществ: быструю скорость выполнения, высокую диагностическую эффективность, специфичность и чувствительность. В данный момент существует несколько диагностических методов для идентификации дерматофитов непосредственно в клиническом материале, основанных на применении молекулярной биологии. Например, ПЦР-блоттинг с обратной линией [42], ПЦР в реальном времени с использованием наборов видоспецифичных праймеров и зондов [28, 41, 98, 157], мультиплексная ПЦР с использованием пан-дерматофитных праймеров [49], вложенная ПЦР и другие [37, 78, 104, 151].

Основные участки, которые используют в качестве мишеней ПЦР-исследования, это гены хитинсинтазы 1 (CHS 1), внутренние транскрибируемые участки (internal transcribed spacer - ITS) в гене рДНК и ген топоизомеразы II [37, 39, 93, 104, 151].

Piri F. et al. сравнили методы прямой микроскопии шерсти, посева и ПЦР диагностики. В результате диагностическая эффективность ПЦР составила 90%, прямой микроскопии – 85,7%, посева – 75% [129].

В исследовании, проведенном Cafarchia C. et al., эффективность ПЦР

диагностики оказалась выше, по сравнению с посевом, выявив возбудителей дерматофитозов в 63 исследуемых образцах, при посеве выявлено 59 положительных проб. Чувствительность и специфичность ПЦР составила 94,9% и 94,4% соответственно. Однако отмечено, что не все положительные результаты, диагностированные с помощью ПЦР, подтверждают заболевание, поскольку ПЦР способна выявлять нежизнеспособных дерматофитов, в том числе у животных после прохождения курса антимикотической терапии [52]. Это может приводить к возникновению ложноположительных результатов.

Dąbrowska I. et al. установили, что эффективность диагностики дерматофитозов с использованием ПЦР не уступает классическому посеву, показав 100% выявляемость дерматофитов в клиническом материале. При этом время, затраченное на одно исследование, занимало менее 5 часов [49].

Существуют исследования, в которых проводили идентификацию выросших культур с помощью ПЦР. Для этого использовали полиморфизм длины фрагмента конечного ограничения (Terminal restriction fragment length polymorphism - TRFLP) или иммуноферментный анализ с применением ПЦР (PCR-ELISA) [148, 151, 152]. Это значительно сокращало время идентификации полученного изолята, а, следовательно, и постановку диагноза по сравнению с классическим методом определения вида культуры по морфологии. Однако метод больше применим для идентификации дерматофитов, чем для его выявления в клиническом материале.

Тем не менее, метод требует наличие дорогостоящего оборудования, специализированных наборов для выделения ДНК, обученный персонал, выполняющий исследование. Большинство наборов на основе ПЦР, которые сегодня доступны в продаже, нацелены только на один или несколько видов дерматофитов [128]. Поэтому, несмотря на отличную чувствительность и специфичность, во многих исследованиях и более быстрый ответ с использованием ПЦР, рутинная диагностика дерматофитозов по-прежнему опирается на традиционные методы.

2.3.5. ИХА-тест

ИХА-тест предназначен для выявления антител к дерматофитам в крови животного. Метод основан на связывании антигена, который нанесен на кассеты, со специфическими антителами. При положительном результате возникает комплекс антиген-антитело, который можно обнаружить по возникшим специальным тест-полоскам. Метод достаточно новый и на сегодняшний день еще мало данных по его эффективности. Существует одно сообщение о применении теста на 100 животных, которые имели разнообразные клинические признаки дерматофитозов [16]. Для сравнения эффективности, помимо ИХА, использовали другие методы диагностики: прямую микроскопию, люминесцентную диагностику с лампой Вуда, микологический посев и ПЦР. В результате с помощью ИХА было выявлено 30 больных животных, среди которых 11 животных были в контакте с больными и не имели клинических признаков, а также имели отрицательные результаты по посеву и ПЦР. 19 ИХА-положительных животных имели клинические признаки, среди которых 11 больных животных были культурально положительными, 4 из них подтверждены ПЦР. Вероятнее всего, большинство животных, отрицательных по посеву и ПЦР, уже переболели дерматофитозами и сохраняли в крови антитела к патогену. Учитывая вышесказанное, на данный момент ИХА нельзя использовать в качестве единственного диагностического метода выявления дерматофитозов животных.

2.3.6. Гистологическое исследование патматериала

Гистологическое исследования не применяется в рутинной практике. Тем не менее, оно является высокоинформативным и высокочувствительным методом, позволяющим не только детектировать грибок в тканях, но и оценить реактивность организма на его внедрение, интенсивность патологического процесса. Для получения гистологического препарата используют биопсийный материал, который фиксируют сразу после взятия, после чего, с помощью микротомы готовят срезы и окрашивают. Наиболее простое окрашивание, при котором

возможно обнаружить грибы – гематоксилин-эозин. Помимо этого, существуют другие методы окраски препарата: периодическая кислота – Шифф (PAS), с помощью которой можно обнаружить полисахариды, в частности гликоген; окраска серебром по методу Гомори-Грокотту; по Брауну-Бренну; Граму-Вейгерту [8, 15, 84, 153]. Стоит понимать, что ни один из методов не позволяет классифицировать обнаруженные грибы.

Чаще всего, гистологическое исследование используют, когда диагноз вызывает затруднения. Имеются сообщения, в которых описано, что лишь благодаря гистологическому исследованию удалось выявить возбудителя дерматофитоза в незаживающей ране [27, 40, 44, 46, 92, 159, 163]. Подобные патологии часто связаны с образованием керионов, мицетом и псевдомицетом. Также есть сообщения о дерматофитозах мелких домашних животных, где постановка диагноза затруднялась из-за нетипичных поражений кожи, которые имели сходные признаки с другими заболеваниями, в том числе неинфекционной этиологии [45, 62, 160].

Таким образом, гистологическое исследование является ценным методом исследования в сложных и неоднозначных ситуациях, раскрывающее картину патогенеза возбудителя.

2.3.7. Посев на питательные среды

Положительный результат по микологическому посеву служит подтверждением диагноза [57]. Исходя из этого, выделение возбудителя необходимо для постановки диагноза. Микологический посев используют в нескольких случаях:

1. Для подтверждения диагноза дерматофитоза у животного, с клинически выраженным заболеванием.
2. Для выявления бессимптомного миконосительства у клинически здоровых животных.
3. Для подтверждения выздоровления животных, проходящих антимикотическую терапию.

Для выделения чистой культуры возбудителей дерматофитозов из клинического материала используют микологический посев на питательные среды. С помощью данного метода можно определить принадлежность возбудителя к виду, определить антимикотическую чувствительность. Получение культуры гриба необходимо для постановки окончательного диагноза, выбора эффективного лечения, а также для определения источника возбудителя и предотвращения заноса инфекции.

Для культивирования дерматофитов применяют разнообразные среды, как готовые промышленного производства, так и приготовленные непосредственно в лаборатории. Различают неселективные питательные среды, которые используются в микологии: среда Сабуро и ее модификации, среда Чапека, сусло-агар. На практике чаще всего используют среду Сабуро, которая содержит глюкозу, пептон и агар. Именно такой состав способен обеспечить рост большинства культивируемых плесеней, в том числе дерматофитов.

Отрицательной стороной неселективных сред при диагностике дерматофитозов является их пригодность для роста большинства грибов, в том числе быстрорастущих. Учитывая возможность наличия грибов-контаминантов на шерсти животных, существует вероятность роста других плесневых недерматофитных грибов, которые будут затруднять рост дерматофитов. Это снижает диагностическую эффективность посева на «обычные» питательные среды.

Существует селективная среда для выделения дерматофитов из клинического материала, которая называется DTM (Dermatophyte Test Medium). Первое сообщение об ее использовании принадлежит Taplin D. et al., которые являются в том числе ее разработчиками [147]. Изначально среда разрабатывалась для медицинских целей, однако спустя время посев на DTM стал широко применяться среди ветеринарных учреждений и лабораторий для диагностики дерматофитозов животных [13, 21, 30, 71, 81, 105, 116, 117]. Принцип использования среды заключается в следующем: в процессе жизнедеятельности дерматофиты потребляют белковые пептиды, продуцируя щелочные метаболиты,

и за счет pH-индикатора, входящего в состав DTM, цвет среды меняется с желтого на красный. Плесневые грибы-контаминанты, которые могут находиться в посевном материале, чаще всего в качестве источника энергии используют углеводы, не защелачивая среду.

Точная рецептура может варьироваться в зависимости от производителя среды, но все DTM содержат питательные вещества, способствующие росту дерматофитов. Основными компонентами среды являются глюкоза и пептон, происхождение которого зависит от производителя.

В качестве индикатора в классическом варианте среды используется феноловый красный, изменение цвета которым происходит при pH=6,8. Оптимальным уровнем pH для начала роста дерматофитов считается 5,5, который в процессе жизнедеятельности сдвигается в щелочную сторону до 8.0-9.0 [91, 111, 146]. Учитывая физиологию грибов, используемый индикатор наиболее оптимально подходит под диапазон изменения pH.

Китайские исследователи предложили заменить стандартный индикатор на бромтимоловый синий. По их мнению, изменение цвета наступает раньше, а значит можно раньше установить тип возбудителя [105]. Однако в широкой практике эта среда не используется.

Кроме того, в среде содержатся ингибирующие добавки, которые замедляют или полностью устраняют рост контаминирующих плесеней и бактерий. Необходимый компонент, обеспечивающий селективность и препятствующий росту плесеней – циклогексимид (актидион). Он также используется в составе неселективных сред, в частности в среде Сабуро, обеспечивая повышение чувствительности. Другим компонентом DTM является антибиотик, который подавляет рост бактерий.

Первоначально Taplin D. et al. считали, что изменение цвета среды уже является признаком роста дерматофитов, однако вскоре появились сообщения, где изменение цвета возникало при росте контаминирующих плесеней [96, 133, 143]. В дальнейшем, согласно другим исследованиям, было установлено, что дерматофитозы на DTM могут быть подтверждены по двум параметрам: 1) цвет

среды изменился с желтого на красный; 2) культура имеет белый или кремовый цвет. Микроскопия культуры значительно повышает специфичность и эффективность диагностики с использованием DTM [96].

Существует не много исследований по оценке диагностической эффективности DTM, но в целом эффективность по разным сообщениям находится на высоком уровне. Однако авторами отмечаются частые ложноположительные результаты [136].

Carroll H. сообщил, что при использовании DTM при диагностике дерматофитозов более 20% культур имели ложноположительный результат [57].

Moriello K. A. в исследовании обнаружила изоляты *M. canis*, которые не изменяли цвет DTM, даже спустя 3 недели культивирования. Только спустя 3 последовательных пассажа они смогли менять цвет среды во время роста [116].

В крупном исследовании животных из приюта на наличие скрытого миконительства, частота ложноположительных результатов при использовании DTM составила 28% [81].

Интересное исследование провели Kaufmann R. et al., оценив эффективность применения DTM в ветеринарных клиниках, по результатам которого была установлена чувствительность и специфичность – 71,4% и 92,3% соответственно, количество ложноположительных и ложноотрицательных результатов – 5 и 2 соответственно из 36 исследуемых [96].

Несколько позже, после изобретения DTM, Salkin I.F. et al. предложил модификацию этой среды – DIM (Dermatophyte Identification Medium), в которой использовался бромкрезоловый пурпурный, увеличенная концентрация циклогексиимида, а температуру инкубирования автор предложил увеличить до 37 °C [132]. Однако в исследовании Guillot J. et al. утверждается, что оптимальной температурой для культивирования дерматофитов на DTM является диапазон 24-27 °C [85], в остальном изобретение принципиально ничем не отличается от DTM. Более того, в исследовании Gromadzki S. et al. утверждается, что на среде DIM при 37 °C изменение цвета при росте дерматофитов возникало только в 25 из 77 случаях [82].

Примечательно, что ни в одной из предложенных сред DTM-типа ни один из авторов не проводил замену основных компонентов - углеводов и пептонов, и не исследовал влияние различных стимулирующих добавок на рост дерматофитов.

По данным Алешкевич В.Н., раффиноза, целлобиоза, сорбоза и сорбит хорошо стимулировали рост дерматофитов. На рост и развитие спорогенности культур благоприятно влияли фруктоза, глюкоза, мальтоза, манноза. Однако это исследования проводилось для изучения стимулирующих добавок с целью накопления биомассы при производстве вакцины [1].

На данный момент существует достаточно много зарубежных производителей, которые выпускают среды DTM. Среди них Dermatophyte Agar (Becton Dickinson, Германия); Derm-Duet (Hardy Diagnostics, США); DermaTube (Remel, USA); DTM (Lab M, Англия), Dermatophytest (Virbac, Франция), Mykodermoassay DTM (Megacor, Австрия), DermaKit (Agrolabo Biopronix, Италия). Практически во всех средах используются одинаковые компоненты, за исключением антибиотиков.

В России до настоящего времени среды типа DTM собственного производства отсутствовали, но и выбор готовых к употреблению DTM сильно ограничен. К тому же, они имеют явные недостатки [134]. Как утверждает Руппель В.В., упаковка не позволяет проводить микроскопию выросшей культуры, возникают ложноположительные изменение цвета среды во время роста контаминирующих плесеней, а также отмечена их высокая цена по сравнению с другими [17].

2.3.8. Видовая идентификация дерматофитов

Классический метод определения вида грибов, и в частности дерматофитов, - сравнение макроскопических и микроскопических признаков полученной чистой культуры с описанием изученных штаммов, приведенных в микологических атласах и определителях грибов, а также изучение физиологии изолята. Ключевым признаком определения вида дерматофита является

морфология микро- и макроконидии.

Учитывая полиморфизм некоторых видов дерматофитов, а также расширение этиологической структуры дерматофитозов, видовая идентификация с помощью микроскопии становится все менее актуальным способом.

Наиболее современным и точным способом видовой идентификации считается молекулярный метод, а именно секвенирование. Методика филогенетического анализа основана на сравнении нуклеотидных последовательностей участков ДНК исследуемых образцов и эталонных образцов, чья последовательность была охарактеризована ранее.

В настоящее время последовательность области ITS-региона рибосомальной ДНК (ITS - internal transcribed spacer) считается золотым стандартом для определения вида дерматофитов [33, 107]. Кроме участка ITS, можно секвенировать ген 60S, фрагменты β -тубулина.

Набирающий популярность метод определения вида относится к молекулярно-биологическому, такому как масс-спектрометрия с помощью MALDI-TOF. На сегодняшний день существуют сообщения о его успешном применении в диагностике, но в рутинной практике он не используется, поскольку оборудование очень дорогое, а сама методика еще недостаточно хорошо отработана.

2.4. Заключение

Дерматофитозы мелких домашних животных являются наиболее частой патологией среди дерматологических больных. В соответствии с имеющимися сообщениями из разных стран мира, распространенность заболевания среди собак и кошек находится на уровне 2 – 40%. Отмечаются места, где не зафиксировано ни одного больного животного. При этом степень распространенности зависит от клинического течения и среды обитания животного. Нет прямой зависимости от развитости страны и от климатических условий. В России данные о распространенности практически отсутствуют. Также отсутствуют актуальные данные об этиологической структуре дерматофитозов в России, в частности на

территории Москвы, что указывает на необходимость изучения эпизоотической и этиологической структуры дерматофитозов мелких домашних животных.

Почти во всех исследованиях прямая микроскопия шерсти и лампа Вуда применялась в качестве вспомогательного метода, а основным способом диагностики заболевания был посев на среду Сабуро с циклогексимидом, либо на DTM. По литературным данным, DTM использовали не только в лаборатории, но и в ветеринарных клиниках и приютах. Это подчеркивает актуальность использования DTM при диагностике в местах непосредственного оказания помощи животному.

В настоящее время в России среда DTM труднодоступна. Выбор ограничен всего одним производителем. Согласно литературным данным, случаи возникновения ложноположительного изменения цвета DTM не так редки. В соответствии с приведенными фактами возникает необходимость в разработке и производстве отечественной DTM среды, скорость диагностики которой будет быстрее, чем при классическом посеве, количество ложноположительных результатов будет минимально, эффективность будет превосходить другие методы диагностики, и которая будет иметь удобную эргономичную упаковку.

3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Материалы

Научная работа выполнена в период с 2017 по 2021 гг. в лаборатории микологии и антибиотиков им. А.Х. Саркисова Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН).

Исследование клинического материала, молекулярно-генетический анализ выделенных изолятов дерматофитов, подбор и испытание различных компонентов питательной среды, апробация экспериментальной серии питательной среды «ДТМ-Эксперт» с клиническим материалом, а также сравнение эффективности различных методов диагностики, проводили в условиях лаборатории ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

В работе были использованы коллекционные, музейные штаммы и изоляты грибов и бактерий, дифференциально-диагностические питательные среды, химические реактивы, лабораторная посуда и оборудование, а также эпизоотологические, бактериологические, микологические, статистические методы исследований, молекулярной диагностики и другие методы исследований.

Диагностические исследования проводились согласно методическим указаниям «Диагностика дерматофитозов животных» (Никифоров Л.И., МГАВМиБ им. К.И. Скрябина, 2002 г.).

При выполнении научной работы были использованы материалы:

Штаммы грибов: *M. canis* V916, *M. canis* «FL 79-18 Viev», *M. canis* I, *M. canis* 71-19, *M. canis* K, *T. mentagrophytes* 135, *T. mentagrophytes* V516, *T. mentagrophytes* «CN 38-18 Viev», *Aspergillus niger* «GB 47-19 Viev», *Penicillium chrysogenum* «PL 11-19 Viev».

Штаммы бактерий: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Во время выполнения работы культуры микроорганизмов хранились и поддерживались нами в лиофилизированном виде в запаянных ампулах и в нативной форме на питательных средах при температурном режиме 2-8 °C.

Питательные среды: при проведении микологического посева клинического материала использовались: среда DTM «DermaKit», производства «AgroLabo» (Италия), питательная среда Сабуро с хлорамфениколом, основа агар для дерматофитов с добавлением селективной добавки для дерматофитов, агаризованная среда Мюллер-Хинтона, производства «Himedia» (Индия).

Диагностические наборы: для выделения ДНК из грибов использовали набор «DNeasy Plant Mini Kit» (Qiagen, Германия), для экстрагирования ДНК из геля использовали набор «DNA Extraction Kit» (MBI Fermentas, Литва), секвенирование ДНК проводили с помощью набора «Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit», (Applied Biosystems, США).

Реактивы и химические компоненты: при проведении диагностики дерматофитозов использовали лактофенол хлопковый голубой, метиленовый синий, 20% раствор KOH, воду дистиллированную, калькофлюор белый (Thermo Fisher Scientific, США), 96% этиловый спирт, 70% этиловый спирт.

Для приготовления экспериментальных серий сред использовали пептоны: казеиновый (Casein peptone pancreatic digested, Германия), соевый (Soyabean peptone, Германия), сухой ферментативный мясной (Россия), мясной (Meat Peptone, Германия), мясной пептон (Россия); углеводы и многоатомные спирты: манноза, инозит, маннит, лактоза, арабиноза, адонит, сорбит, дульцит, ксилоза, рамноза, раффиноза, салицин, мальтоза, глюкоза; агар-агар, феноловый красный, бромтимоловый синий, цистеин, комплекс витаминов группы В, белково-пептидный комплекс, хлорамфеникол, энрофлоксацин, циклогексимид, диски для определения чувствительности к антимикробным препаратам: азитромицин, энрофлоксацин, хлорамфеникол, ципрофлоксацин, гентамицин, амоксициллин, хлортетрациклин, тетрациклин, доксициклин, стрептомицин.

Лабораторная посуда: сбор клинического материала осуществлялся в стерильные пластиковые контейнеры для биологического материала, в пробирки

типа «Eppendorf» и с помощью транспортных систем (свабов). В ходе исследования использовались чашки Петри, ампулы стеклянные, колбы мерные, пробирки стеклянные лабораторные, пипетки стерильные одноразовые пластиковые, шприцы разных объемов стерильные, бактериологическая петля, микологический крючок, горелка спиртовая, стекла предметные, стекла покровные, ножницы, скальпель, пинцеты и т.д.

Лабораторное оборудование: микроскоп биологический Axio Lab.A1 люминесцентный, холодильник фармацевтический ХФ-400-3 "ПОЗИС", термостат суховоздушный ТС-1/80 СПУ, стерилизатор воздушный ГП-80 СПУ, весы электронные AND GX-200, паровой стерилизатор ГК 100-3М ВК-75, автоматические пипетки-дозаторы одноканальные объемами 10-200 мкл Biohit mLINE, аппарат для лиофилизации Christ epsilon 1-4, pH-метр selecta ph-2005 ph meter, высокоскоростная мини-центрифуга Minispin-12, вортекс V-1 plus, термостат Tagler HT-120, амплификатор «Терцик», камера для горизонтального электрофореза (Bio-Rad), источник питания для электрофореза «Эльф», автоматический секвенатор ABI Prism 3100.

3.2. Методы

3.2.1. Микологические методы

Изучение эпизоотологической ситуации. При изучении эпизоотологической ситуации по дерматофитозам проведен анализ результатов 3984 диагностических исследований ветеринарных лабораторий ООО «Неовет» и ООО «Артвет». Материал для исследования отбирался от мелких домашних животных г. Москвы и Московской обл., поступавших на прием к ветеринарным врачам. Материал исследовали различными способами: с помощью прямой микроскопии, микологического посева на питательную среду Сабуро и на среду DTM.

Изучение этиологической структуры. Этиологическую структуру дерматофитозов изучали на основании собственных микологических исследований 174 образцов клинического материала, который отбирался от

мелких домашних животных, содержащихся на территории Московского региона, в том числе у частных владельцев, в приютах и питомниках. Материал исследовали с помощью лампы с фильтром Вуда, прямой микроскопии, в том числе с люминесцентным красителем, микологического посева на питательные среды.

Отбор проб. Клинический материал отбирали путем выщипывания пинцетом шерсти из крайнего участка алопеций. При исследовании бессимптомного миконительства отбор материала осуществляли по методу Маккензи (Mackenzie) – стерильной зубной щеткой прочесывали шерсть животного в течение нескольких минут, после чего щетку помещали в чистый герметично закрывающийся контейнер.

Люминесцентная диагностика. Исследование проводили в затемненном помещении лаборатории, предварительно прогрев лампу Вуда в течение 2-3 минут. Материал осматривали на расстоянии 5-10 см от лампы, положительным результатом считали изумрудно-зеленое свечение шерсти в лучах люминесцентного освещения.

Подготовка образцов. Для выявления изолятов возбудителей преимущественно отбирали шерсть, имеющую положительный результат при люминесцентном исследовании. Для посева использовали корневые участки длиной 2-4 см, предварительно отделив скальпелем остальную часть волоса. Для последующего исследования корни измельчали и делили на три-четыре одинаковые аликвоты. Манипуляции проводили в стерильной чашке Петри.

Прямая микроскопия шерсти. Измельченные корни волос переносили на предметное стекло в каплю 20% раствора гидроксида калия и накрывали покровным стеклом. Затем препарат нагревали, не доводя до кипения, остужали до комнатной температуры, ожидали 10 минут и проводили микроскопию в световом микроскопе. Вначале препарат рассматривали под малым увеличением – $\times 100$, затем переходили на большее увеличение – $\times 200-400$, для детального изучения. Препарат считался положительным, если обнаруживали споры, мицелий, или характерные скопления артроспор в виде чехла вокруг или внутри

волоса.

Прямая микроскопия шерсти с использованием флюорохромного красителя. Препарат с люминесцентным красителем готовили аналогично. Измельченные корни помещали на предметное стекло в каплю 10% раствора гидроксида калия, добавляли каплю раствора калькофлюора, после чего накрывали покровным стеклом и проводили микроскопию на люминесцентном микроскопе с флюоресцирующим фильтром с диапазоном 400-500 нм. Препарат также рассматривали под малым, а затем под большим увеличением. Образец считался положительным в случае обнаружения светящихся изумрудным цветом элементов грибов или спор.

Микологический посев на питательные среды. Микологический крючок нагревали в пламени горелки. После охлаждения в твердой питательной среде крючок становился липким, благодаря чему заранее подготовленный посевной материал переносили на три участка чашки Петри на равноудаленном расстоянии друг от друга. При посеве материала, отобранного по методу МакКензи, щетку прикладывали к агару, делая отпечатки щетины на поверхности среды.

Посев инкубировали при температуре 27-29 °C в течение 21 суток, проверяя наличие роста и изменение цвета ежедневно. При наличии выраженной контаминации, подозрительные на дерматофиты культуры отсевали на отдельные чашки с питательной средой.

Идентификация полученных изолятов. Полученные чистые культуры грибов при пересеве на твердую питательную среду Сабуро изучали по культурально-морфологическим особенностям колоний, учитывая характер, размеры, пигментацию, энергию роста. Проводили микроскопию изолята. Препарат готовили с помощью полоски скотча, которую прикладывали к колонии, а затем переносили на предметное стекло кверху липкой стороной, вносили каплю лактофенола хлопкового голубого и накрывали покровным стеклом, слегка надавливая для равномерного распределения красителя. При микроскопии обращали внимание на строение спороносного аппарата и спор. Полученные характеристики культуры сопоставляли с описанием известных

видов, приведенных в микологических определителях и атласах: Atlas of Clinical Fungi (2001, G. S. De Hoog et al.), Atlas of Clinical Fungi 4th edition (2020, G. S. De Hoog et al.) [68,69].

В затруднительных случаях, когда не удавалось определить вид консервативными методами, проводили секвенирование полученного изолята.

3.2.2. Молекулярные методы

Для секвенирования грибов использовали участки двух генов: внутреннего транскрибируемого спейсера гена рибосомальной РНК (ITS) и гена β - тубулина. Схема проведения секвенирования следующая: выделение ДНК из образца → амплификация → выделение из агарозного геля наработанного фрагмента ДНК → определение нуклеотидной последовательности → анализ последовательности.

Выделение ДНК из клеток грибов. Для выделения ДНК использовали набор DNeasy Plant Mini Kit согласно инструкции производителя: первым этапом измельчали взвесь грибов в ступке, предварительно обработав культуру жидким азотом. Далее навеску смешивали с лизисным буфером в присутствии РНКазы, белки и полисахариды осаждали, супернатант смешивали с раствором связывания гДНК. Полученную смесь помещали в очистительную колонку, где выделенная ДНК связывается с кремнеземной мембранной. Примеси удаляли путем промывки колонки подготовленными промывочными буферами. Затем гДНК вымывали промывочным буфером в условиях низкой ионной силы.

ПЦР. Реакционная смесь для проведения ПЦР конечным объемом 25 мкл содержала: 5 мкл выделенной ДНК, 10 пМ каждого праймера, 0,25 мМ каждого dNTP, 1,25 ед. Taq-полимеразы, 10 мМ трис-НСl (рН 9,0), 50 мМ KCl, 1,5 мМ MgCl₂, 0,1% тритон X-100. Пробы вносили в амплификатор со следующим температурным режимом: 94° – 5 мин (1 цикл); 94° – 15 с; 50° – 20 с; 72° – 20 с (35 циклов); 72° – 5 мин (1 цикл).

Электрофорез ДНК в агарозном геле. Весь объем реакционной смеси вносили в лунки агарозного геля. Электрофорез проводили при напряжении 8

вольт/см длины геля до тех пор, пока краситель проходил от старта не менее половины геля. Результаты учитывали, просматривая гель с использованием трансиллюминатор с ультрафиолетовым светом с длиной волны 254 нм. Амплифицированные фрагменты ДНК выявляются в виде светящихся красноватых полос.

Очистка фрагмента ДНК из геля. После проведения электрофореза, определяли полосу необходимого фрагмента ДНК. Скальпелем вырезали кусок геля, содержащий фрагмент ДНК нужного веса. Экстрагировали ДНК из геля с помощью набора «DNA Extraction Kit» согласно инструкции производителя.

Подготовка образца к секвенированию. Принцип реакции секвенирования заключается во встраивании флуоресцентно-меченных дидезоксинуклеотидов, терминирующих синтез цепи ДНК. Секвенирование проводили с помощью набора для секвенирования ДНК «Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit». Для секвенирования по двум цепям использовали те же праймеры, что и для проведения ПЦР, для участка гена E2 – праймеры для второй амплификации. Состав реакционной смеси: 2 мкл ABI Prism BigDye Terminator v 3.1 Ready Reaction mix, 2 мкл 5 x Sequencing Buffer; 1 мкл праймера (3,2pmol); 5 нг матрицы ДНК, воды до 10 мкл. Температурный режим реакции: 96 °С – 5 мин (1 цикл); 96 °С –30 с; 50 °С – 10 с; 60 °С – 4 мин (25 циклов).

Переосаждение продуктов реакции секвенирования. Добавляли к реакционной смеси 2 мкл 3М ацетата натрия (pH 5,2), 2 мкл 125mM EDTA (pH 8,0) и 150 мкл охлажденного до -20°C 96% этанола. Инкубировали 15 минут при комнатной температуре. Центрифугировали 30 секунд при ускорении 12000 g. Отбирали надосадок вакуумным насосом, затем добавляли 200 мкл холодного 80% этанола, перемешивали на вортексе, центрифугировали 4,5 минуты при 12000 g, после чего повторяли промывку. Высушивали осадок при 55 °С, не допуская пересушивания. Ресуспендировали в 15 мкл формамида. Инкубировали последовательно: 2 минуты при 95°C, 1 минуту при -20°C и 2 минуты при 40°C. Переносили образцы в лунки оптически прозрачной плашки и проводили определение нуклеотидной последовательности при помощи автоматического

секвенатора ABI Prism 3100 по инструкции производителя.

Филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей проводили с помощью приложения SeqMan (DNASTAR Lasergene v.7.1.0). Сравнение этих последовательностей с имеющимися в базе данных GenBank выполняли с использованием пакета программ Standard Nucleotide BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)

3.2.3. Микробиологические методы

Подбор оптимального пептона. Экспериментальные серии сред готовили по прописи питательной среды Сабуро – пептон в количестве 10 г/л, глюкоза – 40 г/л, агар-агар – 15 г/л, при этом использовали 5 различных пептонов — казеиновый, соевый, сухой ферментативный мясной, мясной (Германия), мясной (Россия). В качестве контрольной использовали коммерческую среду Сабуро. Ростовые свойства сред оценивали, используя штаммы *M. canis* I, *M. canis* 71-19, *M. canis* K, *T. mentagrophytes* 135. Культуры дерматофитов высевались уколом в центр чашки Петри, посевы инкубировали при температуре 27-29 °С в течение 7 суток.

Контроль выраженности роста проводили ежедневно, начиная со второго дня после посева. Измеряли диаметр колоний, интенсивность образования воздушного мицелия. Степень развития воздушного мицелия оценивали в баллах: 1 — воздушный мицелий развит плохо, полупрозрачный, паутинистый; 2 — воздушный мицелий развит умеренно, бархатистый, порошистый; 3 — воздушный мицелий развит хорошо, шерстистый, пушистый.

Подбор оптимального углевода в составе среды. Влияния различных углеводов на скорость роста и спорогенность культур дерматофитов изучали с использованием 13 видов сахаров и многоатомных спиртов, которые добавляли в основу питательной среды в различных комбинациях и концентрациях. В качестве добавок использовали маннозу, инозит, маннит, лактозу, арабинозу, адонит, сорбит, дульцит, ксилозу, рамнозу, раффинозу, салицин, мальтозу. Культуры дерматофитов высевались в центр чашки Петри с опытной средой. В

качестве контрольных штаммов использовали *M. canis* 71-19 и *T. mentagrophytes* 135.

Оценку скорости роста проводили путем измерения диаметра колоний каждые сутки после посева. Все опыты проводили в трех повторностях. Посевы инкубировали при температуре 27-29 °С в течение 7 суток.

Подбор ингибирующих добавок. С целью выявления наиболее эффективного антибиотика, проводили оценку ингибирующего действия различных антимикробных препаратов диско-диффузным методом и в последующем – определением минимальной ингибирующей концентрации в соответствии с МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам». Интерпретацию результатов проводили в соответствии с рекомендациями CLSI и EUCAST. В качестве контрольных штаммов использовали бактерии, наиболее часто обнаруживаемые в клиническом материале – *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis* и *P. aeruginosa*, в том числе и «полевые» изоляты вышеуказанных видов. В качестве антимикробных препаратов использовали: азитромицин, энрофлоксацин, хлорамфеникол, ципрофлоксацин, гентамицин, амоксициллин, хлортетрациклин, тетрациклин, доксициклин, стрептомицин.

Оценку ингибирующего действия циклогексимида проводили методом определения минимальной ингибирующей концентрации, используя контрольные штаммы грибов *A. niger* и *P. chrysogenum*.

Изучение влияния различных компонентов на скорость роста дерматофитов и индикаторные свойства среды. Были подготовлены восемь опытных вариантов питательной среды с различными комбинациями компонентов (табл. 1). Опытные образцы диагностической питательной среды готовили путем растворения основных компонентов (углевод, пептон, индикатор, агар-агар) в дистиллированной воде, с последующим автоклавированием при 121 °С в течение 15 минут. Измерение значения pH проводили при температуре среды 40±5 °С. Уровень pH устанавливали растворами HCl и NaOH. Ингибирующие добавки асептически вносили после остывания среды до 50-60 °С.

На первом этапе исследований определяли наиболее оптимальные индикаторы в составе среды, показавшие лучший результат. Были посеяны контрольные штаммы грибов дерматофитов *M. canis* «FL 79-18 Viev» и *T. mentagrophytes* «CN 38-18 Viev» и контрольные штаммы плесневых грибов *A. niger* GB 47-19 Viev и *P. chrysogenum* PL 11-19 Viev на I и VII варианты среды.

На втором этапе изучали влияние различных компонентов на индикаторные и ростовые свойства в составе экспериментальных серий питательной среды. Были посеяны контрольные штаммы на II, III и IV варианты среды.

На третьем этапе изучали взаимодействие разных компонентов и влияние их количества на ростовые и индикаторные свойства сред. Были посеяны контрольные штаммы на V и VI варианты среды. Все посеы инкубировали в течение 10 дней с ежедневным учетом результатов.

Табл. 1 – Количественный и качественный состав экспериментальных серий питательной среды

Компонент	Вариант I	Вариант II	Вариант III	Вариант IV	Вариант V	Вариант VI	Вариант VII	Вариант VIII
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Манноза, г/л	-	10	-	-	-	-	-	-
Маннит, г/л	-	-	10	-	5	10	-	5
Глюкоза, г/л	10	-	-	10	5	10	10	5
Пептон (мясной), г/л	10	10	10	10	10	10	10	10
Феноловый красный, г/л	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	-	0,2
Комплекс углеводов, г/л	-	-	-	-	-	-	-	7
Бромтимоловый синий, г/л	-	-	-	-	-	-	0.025	-
Агар-агар, г/л	18	18	18	18	18	18	18	18
pH	5.5	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	5.5	4.8
Циклогексимид, г/л	-	-	-	-	-	-	-	0,5
Энрофлоксацин, г/л	-	-	-	-	-	-	-	0,1

Изучение влияния дополнительных стимулирующих добавок. Для изучения воздействия питательных добавок на энергию роста дерматофитов использовали различные компоненты в составе экспериментальной среды DTM: 1 компонент - цистеин (аминокислота, входящая в состав кератина волос и кожи,

ассимилируется кератинофильными дерматофитами); 2 — комплекс витаминов группы В; 3 - белково-пептидный комплекс (дополнительный источник органического азота); 4 - комплекс углеводов (моно- и полисахаридов) как дополнительный источник углерода.

Влияние различных питательных компонентов на скорость роста *M. canis* было изучено в сравнении с базовой формуляцией среды DTM при росте контрольных штаммов *M. canis* «FL 79-18 Viev» и *T. mentagrophytes* «CN 38-18 Viev». Посевы инкубировали при температуре 27-29 °С в течение 10 суток. Учет результатов проводили ежедневно.

Апробация среды на клиническом материале. Для апробации экспериментальной серии диагностической питательной среды, показавшей оптимальные ингибирующие и ростообеспечивающие свойства, было высеяно 94 образца клинического материала. Для сравнения посевы проводили на импортные аналоги - 40 образцов были высеяны на DTM «DermaKit» (Италия) и 54 образца на DTM «HiMedia» (Индия). Посевы проверяли ежедневно в течение 21 дня. В качестве контрольной использована среда Сабуро с хлорамфениколом.

Сравнение эффективности посевов на среду DTM с другими методами диагностики. При диагностике дерматофитозов животных использовали различные методы, в том числе люминесцентное исследование, прямую микроскопию, микроскопию с флюоресцентным красителем, посев на среду Dtm, что позволило получить достоверные данные об эффективности каждого из методов и выявить наиболее чувствительный и эффективный способ диагностики дерматофитозов.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

4.1. Эпизоотологические особенности дерматофитозов мелких домашних животных

Дерматофитозы животных не относятся к особо опасным болезням, в связи с чем официальная статистика по заболеваемости органами ветеринарного надзора не ведется. Согласно нормативно-регламентирующему документу «Правила по профилактике и ликвидации дерматофитозов животных» (Минсельхозпрод России, 2000 г.) обо всех случаях возникновения заболевания необходимо информировать ветеринарную службу. Однако, в подавляющем большинстве случаев, информация о появлении очага дерматофитоза не выходит за пределы ветеринарной клиники, приюта, питомника или лаборатории, где проводили исследование. Карантинные мероприятия при дерматофитозах не предусмотрены.

Для анализа эпизоотологической ситуации и получения объективных данных по распространенности дерматофитозов, при выполнении данной работы нами учитывались результаты диагностических исследований двух крупных ветеринарных лабораторий, клиентами которых являются более 450 ветеринарных клиник г. Москвы и Подмосковья, трех питомников и одного приюта с единовременным пребыванием 500 бездомных животных, а также результаты собственных исследований за 2017-2021 гг.

4.1.1. Изучение эпизоотологической ситуации в Московском регионе

В ходе выполнения научной работы нами проведен анализ результатов исследований 3984 образцов клинического материала, полученного от 2242 кошек и 1720 собак с кожными поражениями, а также 9 образцов от морских свинок, 5 от кроликов, 6 от крыс и 2 от шиншилл, подозреваемых на заражение дерматофитозами. Исследования проводили различными методами, при этом образцы от 1294 собак, 1751 кошек, 5 морских свинок, а также кроликов, крыс и шиншилл (3063 пробы) были подвергнуты прямой микроскопии; 398 образцов от кошек, 310 от собак и 4 от морских свинок (712 проб) были проверены при помощи микологического посева на общепринятые питательные среды; 209 проб

от 116 собак и 93 кошек исследовали посевом на коммерческие среды DTM.

Прямая микроскопия клинического материала, как наиболее быстрый метод диагностики, показала достаточно низкую эффективность, поскольку позволила установить диагноз лишь у 107 кошек (3,49% от общего количества проб) и 118 собак (3,85%), что в общем составило лишь 7,34% положительных результатов. При этом больными оказались только кошки и собаки, у остальных видов домашних животных дерматофитозы не подтверждены.

Наиболее часто поражения, схожие по клиническим признакам с дерматофитозами, у кошек наблюдали в осенний период – 702 обращения (40%), и несколько меньше летом – 524 (29,9%), при этом с помощью прямой микроскопии был выявлен 41 положительный образец осенью и 31 – летом. У собак, в отличие от кошек, кожные поражения чаще фиксировали в летний период, чем в осенний. При этом от собак летом было отобрано и исследовано 496 (38,3%) проб материала, осенью – 348 (26,9%) образцов. Результаты исследований образцов методом прямой микроскопии представлены на рис. 2.

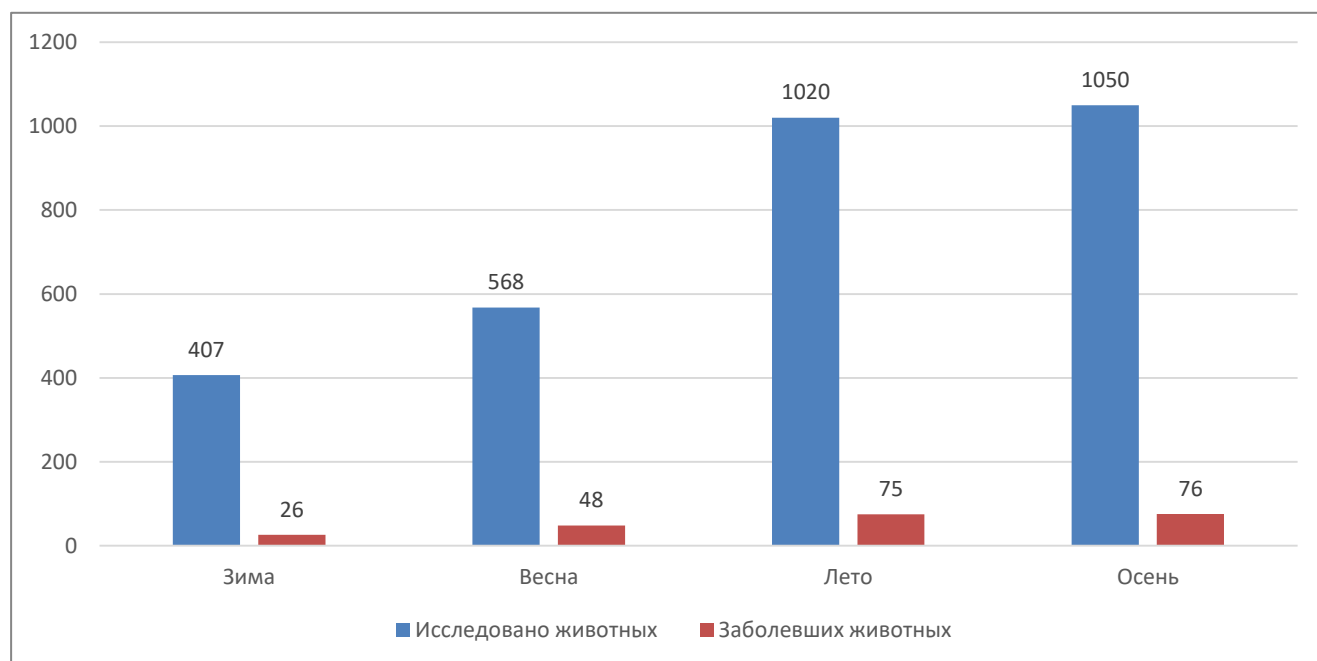


Рис. 2 – Исследование образцов клинического материала прямой микроскопией, распределенное по сезонам

Как видно из представленных на рис. 2 данных, наибольшее количество исследований на дерматофиты приходится на осенний период (34,5%), несколько меньше на летний – 33,5%. В другие периоды обращений с кожными

патологиями, подозрительными на дерматофитозы, значительно меньше. Так, зимой было исследовано 407 проб, что составило 38,8% от пикового значения в осенний период, весной - 568 пробы (54,1%), при этом количество положительных случаев было в три и полтора раза ниже, чем осенью. Наибольшее количество положительных результатов зафиксировано в осенний период – 76 (33,8%).

Методом классического посева было исследовано 398 образцов от кошек, 310 от собак и 4 от морских свинок (712 проб). Результаты исследования представлены на рис 3.



Рис. 3 – Исследование образцов клинического материала с помощью классического посева, распределенное по сезонам

Удалось выявить 46 (6,5%) случаев дерматофитозов, из них 32 (4,5%) у кошек, 13 (1,8%) у собак и 1 (0,14%) у морской свинки. Пик исследований зафиксирован осенью - 275 (38,6%), на тот же период приходится и наибольшее количество случаев заболевания – 17 (36,9%). Немного меньше выявленных случаев дерматофитозов приходится на лето – 10 (21,7%) и зиму - 14 (30,4%) положительных исследований.

С помощью ДТМ удалось диагностировать 58 (27,7%) случаев дерматофитозов из 209 обследований. При этом инфекция у кошек зафиксирована в 37 случаях из 93 (17,7%), у собак – 21 положительный результат из 116 (10%) (рис. 4).

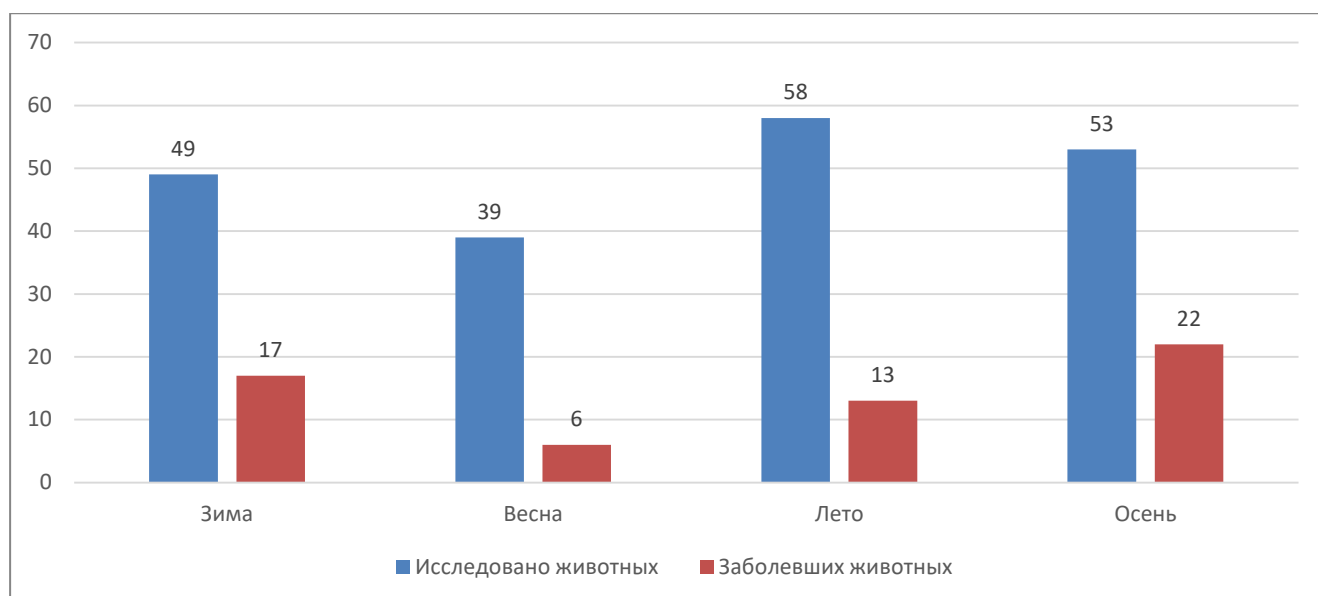


Рис. 4 – Исследование образцов клинического материала с помощью посева на DTM, распределенное по сезонам

Пик заболеваемости приходится на осенний период, когда выявлено 22 (38%) положительных случаев, меньшая заболеваемость отмечена зимой – 17 случаев (29%).

Таким образом, при исследовании прямой микроскопией 3045 образцов клинического материала, отобранных от собак и кошек, заболеваемость составила 7,38% (225 положительных образцов); летом и осенью было проведено наибольшее количество исследований на дерматофитозы, в эти же сезоны было выявлено наибольшее количество положительных образцов.

Классический микологический посев показал заболеваемость на уровне 6,5% (46 положительных образцов из 712), при этом сезонность заболевания приходится на осень – как по количеству исследований, так и по количеству положительных образцов.

При исследовании дерматофитозов с помощью DTM, заболеваемость составила 27,7% (58 положительных случаев из 209). Количество исследований в различных сезонах года находится примерно на одном уровне, а количество положительных результатов больше в зимний и осенний период.

4.1.2. Изучение миконосительства

С целью выявления миконосительства дерматофитозов было отобрано и

изучено 44 образца материала от животных, не имеющих клинических симптомов кожных заболеваний. Материал отбирали у животных, которых условно можно разделить на три категории в зависимости от среды обитания: бродячие (уличные) животные; содержащиеся в приютах; животные из питомников (табл. 2).

Табл. 2 – Количество обследованных животных с подозрением на бессимптомное миконосительство

Место обитания	Количество обследованных животных, гол.		Животных с миконосительством, гол. / %			
	Кошки	Собаки	Кошки		Собаки	
1	2	3	4	5	6	7
Приюты	17	-	14	82,3	-	-
Питомники	9	1	6	66,7	0	0
Уличные	12	5	5	41,7	0	0
Всего	38	6	25	65,8	0	0

Как видно из представленных в табл. 2 данных, всего было выявлено 25 миконосителей, что составляет 56,8 % от общего числа обследованных животных.

Отмечено, что в приютах количество миконосителей больше, по сравнению с другими местами обитания.

При изучении миконосительства дерматофитозов в приюте, было обследовано 17 животных, размещенных в отдельных клетках. При микологическом исследовании споры дерматофитов были выделены у 14 из 17 кошек, что составило 82%, при этом у 5 животных (36%) имелись слабо выраженные признаки дерматитов, у оставшихся 9 (64%) не было каких-либо поражений кожных покровов, что позволяет считать их бессимптомными носителями. Стоит отметить, что 4 из 9 кошек, являющихся положительными миконосителями, ранее прошли курс лечение от дерматофитоза, при этом признаки заболевания исчезли полностью, а миконосительство сохранилось. Основная масса животных, являющихся миконосителями спор дерматофитов, представлена котятами в возрасте до одного года - 85%. Отрицательные результаты микологического посева были получены у 2 кошек без клинических признаков и у одной кошки с легкими поражениями кожи. Объяснить высокий

процент заболеваемости и миконительства дерматофитов в приюте можно скученным содержанием, достаточно высоким движением животных, которые поступают на передержку и низким санитарным состоянием помещений, поскольку постоянное присутствие животных не позволяет проводить дезинфекцию поверхностей и оборудования.

При изучении миконительства в питомниках было выявлено 6 (60%) больных животных из 10. Поводом для исследования служили животные с клинически выраженным дерматофитозом, при этом образцы отбирали от всех животных, в том числе от тех, которые были в контакте с больными. В результате выявлены кошки с бессимптомным носительством, которые являлись источником инфекции. Поскольку одним из путей передачи заболевания является вертикальный, а носительство не имеет выраженной клинической картины, заводчики не обращают на это внимания до тех пор, пока не получают приплод, который заражается от родителей и заболевает с характерными выраженными клиническими признаками. При обследовании в питомнике собак, не имевших симптомов дерматофитозов, миконительство выявлено не было.

Пробы на выраженное миконительство от бродячих животных отбирали при обращении новых хозяев, подобравших их на улице, и опасавшихся заражения. При первичном приеме было обследовано 12 кошек, 5 из которых оказались положительными миконистелями, и 5 собак, среди которых миконительство не было выявлено.

Данный факт подчеркивает зооантропонозное значение дерматофитозов животных, а именно кошек, поскольку уличные животные имеют непосредственную опасность для человека, особенно детей. Среди собак бессимптомное миконительство не распространено. Единственным видом дерматофитов, обнаруженным в ходе выявления носительства, был *M. canis*.

4.1.3. Этиологическая структура дерматофитозов в Московском регионе.

В результате проведенных нами исследований, включающих микологические посевы на различных питательных средах, из 176 образцов

материала было выделено 84 изолята грибов-дерматофитов. Идентификацию полученных изолятов проводили комплексно, проводя микроскопию, оценивая морфологию колоний, скорость роста и другие культуральные особенности чистых культур, а также секвенирование. Результаты исследования представлены в табл. 3.

Табл. 3 – Видовая структура дерматофитозов животных-компаньонов

Вид животного	Кол-во исследованных образцов	Кол-во положительных образцов	Этиологическая единица	
			Кол-во	Вид
1	2	3	4	5
Собаки	40	10	10	<i>M. canis</i>
Кошки	135	73	67	<i>M. canis</i>
			2	<i>N. fulva</i>
			1	<i>N. gypsea</i>
			1	<i>M. ferrugineum</i>
			1	<i>N. persicolor</i>
			1	<i>T. mentagrophytes</i>
Морские свинки	1	1	1	<i>T. benhamiae</i>
Всего	176	84	77	<i>M. canis</i>
			1	<i>N. gypsea</i>
			2	<i>N. fulva</i>
			1	<i>M. ferrugineum</i>
			1	<i>N. persicolor</i>
			1	<i>T. benhamiae</i>
			1	<i>T. mentagrophytes</i>

Всего, как видно из данных табл. 3, при проведенном исследовании было выявлено 7 видов грибов, являвшихся возбудителями различных кожных заболеваний у животных, преобладающим из которых был *M. canis*. При выполнении работы были получены: *M. canis* – 77 изолятов, *N. fulva* - 2 и по одному изоляту грибов *T. benhamiae*, *T. mentagrophytes*, *M. ferrugineum*, *N. persicolor*, *N. gypsea*.

Стоит отметить, что часто штаммы одного вида имели разную морфологию колоний. Например, *M. canis* образовывал при росте на среде Сабуро несколько фенотипически различных вариантов колоний, что объясняется широким полиморфизмом и изменчивостью признаков, но существенно затрудняет идентификацию.

Чаще всего изоляты *M. canis* имели типичный рост: колонии имели белый

или сероватый цвет, шерстистый или пушистый воздушный мицелий (рис. 5). В первые дни развития наблюдали характерный для этого вида рост мицелия – от центра колонии к периферии распространялись тонкие, ровные, длинные гифы. Рост радиальный, край паутинистый. Реверс охряно-желтого цвета. Независимо от морфологии колоний, скорость роста различных изолятов *M. canis* была идентичной и на 7 сутки роста колонии достигали в среднем 25-30 мм в диаметре.

Из 77 выделенных изолятов *M. canis*, 4 культуры имели желтый пигмент, при этом воздушный мицелий был менее плотным и более прозрачным.

Из общего количества изученных культур *M. canis* выявлена одна, скорость роста которой была значительно слабее, воздушный мицелий практически полностью отсутствовал, из-за чего цвет колонии приобретал коричнево-бежевый оттенок и кожистую структуру, состоящую из редких гиф (рис. 6).



Рис. 5 – Типичный рост колоний *M. Canis*, 10 сут. роста, среда Сабуро



Рис. 6 – Нетипичный рост колоний *M. canis*, 7 сут. роста, среда Сабуро

При этом нами отмечено, что при микроскопии все типы колоний *M. canis* имели характерные для вида макроконидии веретеновидной формы с клювовидным кончиком и толстой стенкой, внутри которых различимы 5-12 перегородок. Наблюдалась значительная разница в количестве микроконидий у отдельных культур: большинство выделенных изолятов имели небольшое количество микроконидии, они присутствовали в единичном количестве либо отсутствовали вовсе. При этом выявлено два изолята *M. canis*, образующих большое количество микроконидии, что не являлось типичным признаком для

вида. Оба штамма были депонированы в коллекции микроорганизмов.

Помимо *M. canis*, была выявлена культура гриба *T. benhamiae*, являвшегося причиной клинически выраженного поражения кожи на морде у морской свинки, содержащейся в живом уголке зоомагазина. Животное имело алопеции в области носа (рис. 7). Поскольку в доступной нам литературе нет сведений о выявлении данного вида гриба на территории Российской Федерации, можно утверждать, что культура *T. benhamiae* выявлена нами в стране впервые.

Стоит обратить внимание, что культура *T. benhamiae* по внешнему виду и энергии роста очень напоминала *M. canis* (рис. 8). Она имела белый пушистый центр, желтый пигмент и характерный радиальный рост со складками. Однако при микроскопии не удалось обнаружить характерные для дерматофитов макроконидии, даже спустя 30 дней культивирования. При этом было множество микроконидий округлой и грушевидной формы, которые также были похожи на конидии *M. canis*.



Рис. 7 – Морская свинка с клинической картиной дерматофитоза – алопеция в области носа



Рис. 8 – Культура *T. benhamiae*, 12 сут. роста, среда Сабуро

Учитывая, что по литературным данным наиболее частым возбудителем дерматофитозов у морских свинок является *T. benhamiae* [35, 100, 120, 156], был проведен филогенетический анализ с целью дифференциации изолята от внешне похожего вида *M. canis*.

Результаты построения филогенетической дендрограммы на основе секвенирования региона ITS штамма *T. benhamiae* 02-20 GP VIEV представлены на рис. 9.

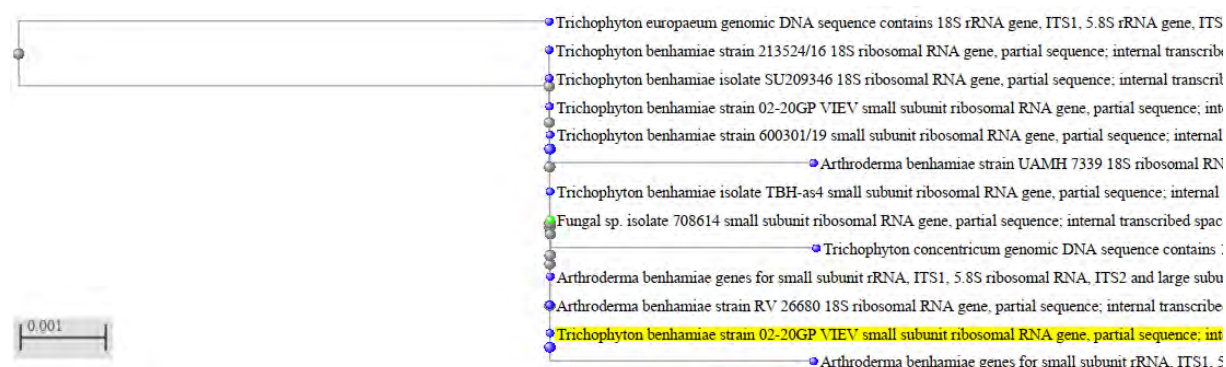


Рис. 9 – Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе секвенирования региона ITS штамма *T. benhamiae* 02-20 GP VIEV (отмечен желтым) в сравнении наиболее гомологичными штаммами из базы данных GenBank NCBI

Как видно из представленных данных на рис. 9, в результате проведенного секвенирования региона ITS, установлена 100% гомологичность штамма *T. benhamiae* 02-20 GP VIEV с многочисленными зарубежными штаммами *T. benhamiae*, депонированными в GenBank NCBI. Сиквенс штамма *T. benhamiae* 02-20 GP VIEV депонирован в репозитории GenBank NCBI под номером OK376997.1. Исследование позволило полностью исключить принадлежность культуры к виду *M. canis*, несмотря на выраженное морфологическое сходство.

Культуры *N. fulva* были выделены от котенка 3 месячного возраста с ярко выраженными признаками дерматофитоза и уличной кошки. Котенок был подобран на улице, осмотрен ветеринарным специалистом, отметившим изумрудное свечение шерсти при люминесцентной диагностике. Анамнез кошки неизвестен.

Как и в случае с *T. benhamiae*, изоляты имели схожую морфологию с видом *M. canis*: макроконидии имели одинаковое строение – толстостенные, веретеновидной формой с 5 - 8 перегородками. Также было схоже расположение микроконидий – они находились вдоль гифы попарно по разные стороны и имели булабовидную форму (рис. 11). Однако внешний вид культур не был типичным для *M. canis* – колонии имели пушисто-зернистое строение, кремовый цвет с желто-зеленым оттенком, диаметр колоний был меньше (рис. 10). Также отмечено, что споры способны легко распыляться, что редко встречается у вида *M. canis*.



Рис. 10 – Культура *N. fulva*, 14 сут. роста, среда Сабуро

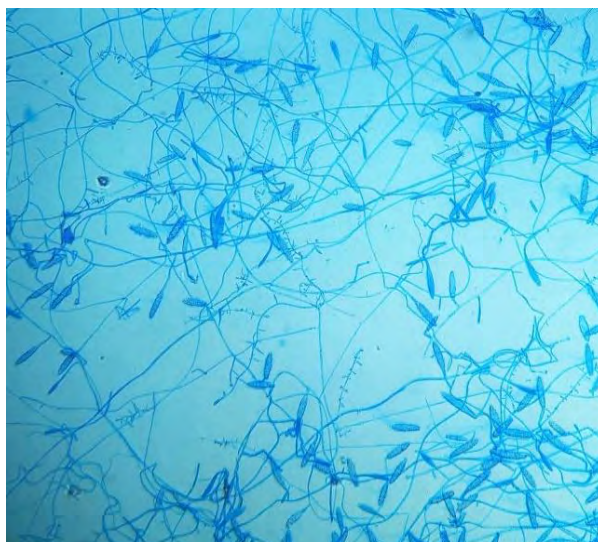


Рис. 11 – Макроконидии *N. fulva*, схожие по строению с *M. canis*

Учитывая, что классическая видовая идентификация дерматофитов основана на изучении строения макроконидий и микроконидий, в данном случае эти изоляты следовало отнести к виду *M. canis*, а также дифференцировать от *N. gypseae*. Однако у нас возникли сомнения в типичности признаков и идентификации культур и, с помощью секвенирования, изолят был отнесен к виду *N. fulva*. Результаты построения филогенетической дендрограммы на основе секвенирования региона ITS штамма *N. fulva* 02-21NVT VIEV представлены на рис. 12.

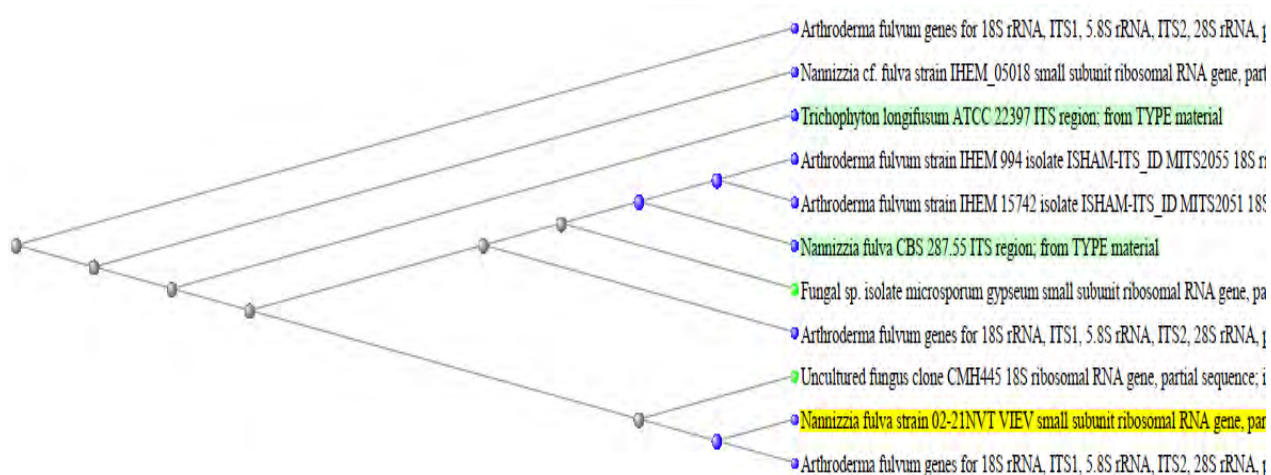


Рис. 12 – Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе секвенирования региона ITS штамма *N. fulva* 02-21NVT VIEV (отмечен желтым) в сравнении наиболее гомологичными штаммами из базы данных GenBank NCBI

По результатам секвенирования региона ITS, установлена 100% и 99%

гомологичность штамма *N. fulva* 02-21NVT VIEV с многочисленными штаммами *N. fulva* (синоним *Arthroderma fulvum*), депонированными в GenBank NCBI. Сиквенс штамма *N. fulva* 02-21NVT VIEV депонирован в репозитории GenBank NCBI под номером OK376357.1.

Данный дерматофит относится к геофильным видам и чаще всего его выделяют от человека. Можно предположить, что люди заражаются от больных дерматофитозами животных, которые, в свою очередь являются недообследованными, либо диагноз у которых установлен некорректно.

Культура гриба *N. persicolor* также была выделена от уличного котенка, оказавшегося положительным на дерматофитоз при исследовании лампой Вуда.

Внешний вид культуры был схож с *M. canis*: белая колония, имеющая пушистый воздушный мицелий, радиальный рост, растущий край паутинистый (рис. 13). При микроскопии были обнаружены тонкостенные сигаро- и веретенообразные макроконидии, напоминающие *M. canis*.

Отличительной особенностью строения *N. persicolor* являются спиралевидные гифы, которые были обнаружены в препарате (рис. 14). Для уточнения вида проведено секвенирование.



Рис. 13 – Культура *N. persicolor*, 9 сут. роста, среда Сабуро

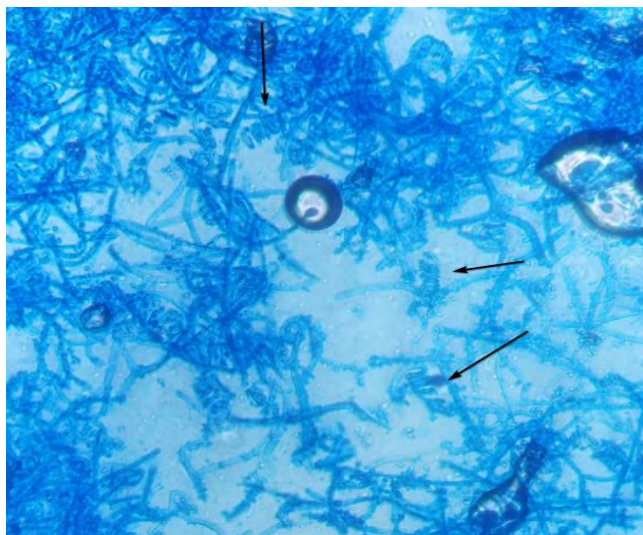


Рис. 14 – Микроскопия *N. persicolor*, видны типичные для вида спиралевидные гифы

Стоит отметить, что согласно литературным данным [59, 69], спиралевидные гифы также образует вид *N. fulva*, однако у выделенного изолята мы их не обнаружили. Другой схожей чертой являются макроконидии, которые

имеют похожее строение, в том числе и с *M. canis*. Для дифференциации этих видов следует использовать филогенетические методы исследования. Результаты построения филогенетической дендрограммы на основе секвенирования региона ITS штамма *N. persicolor* 0821 NVT VIEV представлены на рис. 15.

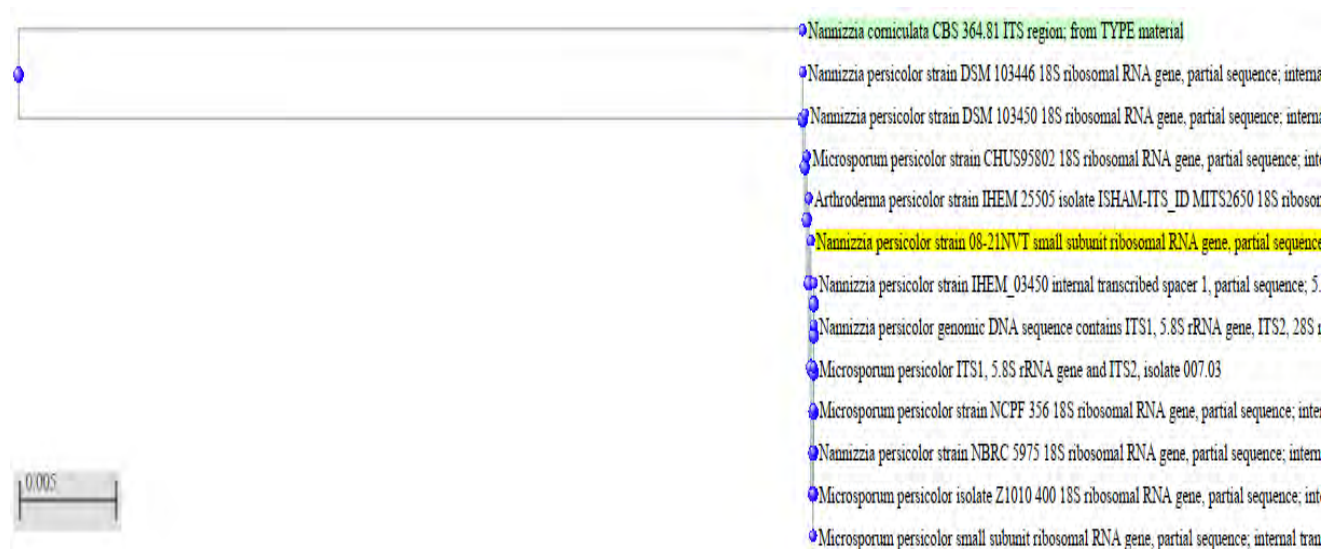


Рис. 15 – Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе секвенирования региона ITS штамма *N. persicolor* 08-21 NVT VIEV (отмечен желтым) в сравнении наиболее гомологичными штаммами из базы GenBank NCBI

По результатам секвенирования региона ITS, установлена 100% гомологичность штамма *N. persicolor* 08-21 NVT VIEV с многочисленными зарубежными штаммами *N. persicolor*, депонированными в GenBank NCBI. Сиквенс штамма *N. persicolor* 0821 NVT VIEV депонирован в репозитории GenBank NCBI под номером OK483684.1.

M. ferrugineum был выделен от кошки, которая имела алопеции на морде. Изолят по внешнему виду практически не отличался от *M. canis* – центр колонии имел белый воздушный мицелий, растущий край имел паутинистую структуру (рис. 16). Также было схоже и микроскопическое строение: макроконидии имели веретенообразное строение внутри которых было 4-7 перегородок.



Рис. 16 – Культура *M. ferrugineum*, 20 сут. роста, среда Сабуро

M. ferrugineum является генетически близкородственной анаморфой комплекса, в который также входят *M. canis* и *M. audouinii*. Эти виды имеют разные экологические ниши: *M. canis* является зоофильным дерматофитом, другие два вида – антропофильным. Однако все они вовлечены в инфекции человека, могут вызывать схожие клинические признаки и передаваться от человека и от животного к животному. Дифференциация этих родственных видов важна с эпидемиологической точки зрения.

Результаты построения филогенетической дендрограммы на основе секвенирования региона ITS штамма *M. ferrugineum* 04-21 NVT VIEV представлены на рис. 17.



Рис. 17 – Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе секвенирования региона ITS штамма *M. ferrugineum* 04-21 NVT VIEV (отмечен желтым) в сравнении наиболее гомологичными штаммами из базы GenBank NCBI

По результатам секвенирования региона ITS, установлена 100% гомологичность штамма *M. ferrugineum* 04-21 NVT VIEV с многочисленными

зарубежными штаммами *M. ferrugineum*, депонированными в GenBank NCBI.

Сиквенс штамма *M. ferrugineum* 04-21 NVT VIEV депонирован в репозитории GenBank NCBI под номером OK483680.1.

T. mentagrophytes выделен от кошки с характерными симптомами дерматофитоза. Как правило, этот вид чаще всего выделяется от собак и не характерен для кошек.

Колония, типичная для данного вида, на среде Сабуро имела белый цвет. Морфология колонии мучнисто-пушистая, поверхность матовая, центр колонии имел небольшое возвышение. Растущий край ровный, паутинистый. Культура быстрорастущая – на 14 сутки диаметр колонии достигал 55 мм (рис. 18). Реверс – охряно-коричневый. Пигмент и экссудат не образует.



Рис. 18 – Рост культуры *T. mentagrophytes*, 14 сут. роста, среда Сабуро

При микроскопии культуры удалось обнаружить изогнутый, септированный, ветвящийся бесцветный мицелий. Микроконидии многочисленные, чаще овальной или булавовидной формы, располагаются непосредственно на гифах, одиночно или гроздьями. Макроконидии не обнаружены. Дополнительные признаки (наличие хламидоспор, артроспор, склероциев и т.д.) не выявлены.

Колония *T. mentagrophytes* имела мало общего с культурой *M. canis*, кроме характерного для всех дерматофитов белого цвета, поэтому дифференциация не вызвала затруднений. Однако для установления принадлежности к виду

проведено секвенирование, поскольку отсутствовали макроконидии, по которым можно было судить о виде дерматофита. Результаты построения филогенетической дендрограммы на основе секвенирования региона ITS штамма *T. mentagrophytes* 09-21 NVT представлены на рис. 19.

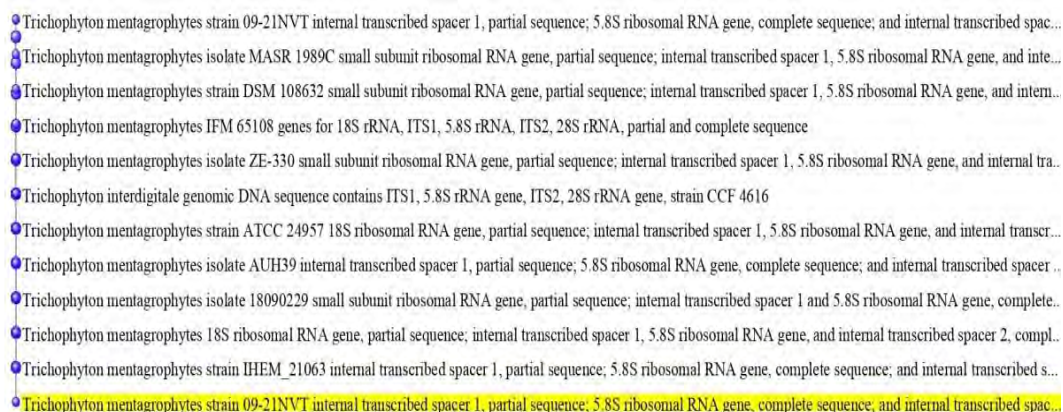


Рис. 19 – Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе секвенирования региона ITS штамма *T. mentagrophytes* 09-21 NVT (отмечен желтым) в сравнении наиболее гомологичными штаммами из базы данных GenBank NCBI

По результатам секвенирования региона ITS, установлена 100% гомологичность штамма *T. mentagrophytes* 09-21 NVT с многочисленными зарубежными штаммами *T. mentagrophytes*, депонированными в GenBank NCBI.

Сиквенс штамма *T. mentagrophytes* 09-21 NVT депонирован в репозитории GenBank NCBI под номером OK484432.1.

Культура *N. gypsea* была выделена от кошки. Внешне колония была похожа на культуры *N. fulva*. Макроморфология имела мучнисто-порошкообразную структуру коричневого цвета. Культура быстрорастущая, на 14 сутки диаметр колоний достигал 45 мм. Поверхность матовая, без возвышений и радиальных складок. Растущий край ровный. Реверс – желто-коричневый. Пигмент и экссудат не образует (рис. 20).



Рис. 20 – Рост культуры *N. gypsea*, 14 сут. роста, среда Сабууро

Микроморфология имела схожие черты с культурой *M. canis*. Оба вида имеют вытянутые веретенообразные макроконидии с септами, микроконидии имеют схожу булавовидную или овальную форму.

Результаты построения филогенетической дендрограммы на основе секвенирования региона ITS штамма *N. gypsea* 139-21 VIEV представлены на рис. 21.

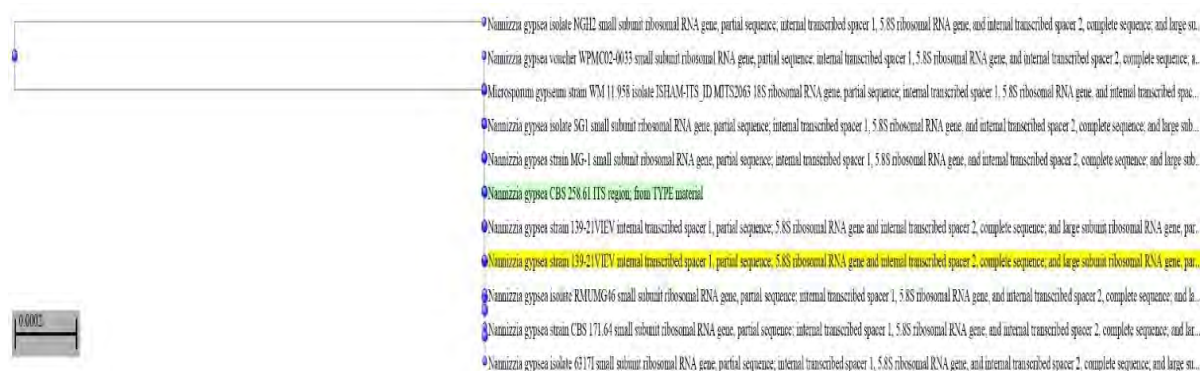


Рис. 21 – Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе секвенирования региона ITS штамма *N. gypsea* 139-21 VIEV (отмечен желтым) в сравнении наиболее гомологичными штаммами из базы данных GenBank NCBI

По результатам секвенирования региона ITS, установлена 100% гомологичность штамма *N. gypsea* 139-21 VIEV с многочисленными зарубежными штаммами *N. gypsea*, депонированными в GenBank NCBI. Сиквенс штамма *N. gypsea* 139-21 VIEV депонирован в репозитории GenBank NCBI под номером OL795501.1

Помимо грибов-дерматофитов, при проведении микологических

исследований от больных животных часто выделялись плесневые грибы, такие как *Scopulariopsis spp.*, *Paecilomyces spp.*, *Mucor spp.*, *Alternaria spp.*, *Cladosporium spp.*, *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.* и некоторые другие.

Во всех случаях, когда были выявлены нетипичные изоляты дерматофитов, мы использовали секвенирование для точного определения вида. Практически во всех перечисленных случаях дерматофиты имели схожую морфологию с *M. canis*, при этом существовал один или несколько отличительных признаков (табл. 4).

Табл. 4 – Сравнение морфологии выделенных изолятов с морфологией *M.canis*

№№	Наименование вида гриба	Схожие черты с <i>M. canis</i>	Отличительные черты от <i>M. canis</i>
1	<i>T. benhamiae</i>	Внешний вид колонии; желтый пигмент; морфология микроконидий	Практически не образуются макроконидии
2	<i>N. fulva</i>	Морфология макро- и микроконидий	Цвет и структура колонии
3	<i>N. gypsea</i>	Морфология макро- и микроконидий	Цвет и структура колонии
4	<i>N. persicolor</i>	Внешний вид колонии; морфология макроконидий	Наличие спиралевидных гиф
5	<i>M. ferrugineum</i>	Внешний вид колонии; морфология макроконидий	Отсутствуют

Однако, несмотря на значительное количество отличий, эти признаки имеют косвенное значение, поскольку *M. canis* обладает ярко выраженным полиморфизмом.

Выделенные нами в ходе работы от мелких домашних животных штаммы дерматофитов являются достаточно редкими, что подтверждается литературными данными [35, 45, 56, 89]. Причиной этого может являться ошибочная диагностика, основанная только на морфологическом типировании изолятов. Также это может быть связано с филогенетической изменчивостью дерматофитов вследствие их приспособления к новым видам хозяев. Поэтому для точной идентификации необходимо использовать современные методы диагностики, в частности секвенирование и метагеномные исследования, что позволит получить объективную информацию о этиологической значимости различных видов грибов дерматофитов у животных-компаньонов.

После выделения и изучения полученные штаммы были депонированы в государственной коллекции микроорганизмов ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН и могут

быть использованы при разработке диагностикумов и препаратов для специфической профилактики.

4.2. Изучение питательных потребностей грибов-дерматофитов

При проведении диагностических исследований нами были использованы среда Сабуро и среды DTM зарубежного производства, при этом отмечено несколько отрицательных моментов: ложноположительное изменение цвета при росте плесневых грибов, относительно медленный рост дерматофитов по сравнению со средой Сабуро, отсутствие изменения цвета при росте дерматофитов. Для устранения перечисленных недостатков было проведено исследование различных составов питательной среды, результатом которого стало создание собственной питательной селективной хромогенной среды, лишенной перечисленных недостатков.

В качестве первого опытного образца была изготовлена экспериментальная серия питательной среды DTM по классической рецептуре, описанной D. Taplin et al, с целью изучения ее ростовых и индикаторных свойств. Посев тест-культур на полученные образцы питательной среды показал, что они обладают выраженными ростообеспечивающими и индикаторными свойствами, особенно в отношении гриба *T. mentagrophytes*. Через 5 суток после посева на поверхности агара образовывалась крупная колония, при этом среда приобрела ярко выраженную красную окраску. Однако рост гриба-дерматофита *M. canis* был слабо выражен, окрашивание среды на 5 сутки практически отсутствовало (рис. 22 и 23).



Рис. 22 – Рост *M. canis* V916 на DTM, изготовленной по классической рецептуре, 5 сут.

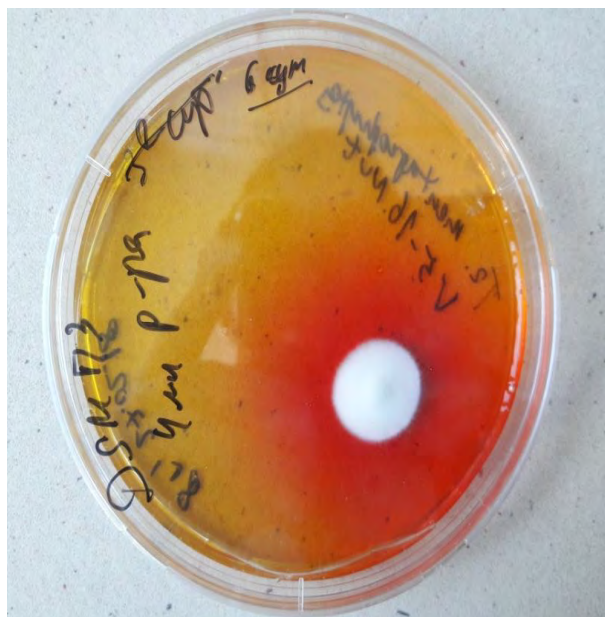


Рис. 23 – Рост *T. mentagrophytes* V516 на DTM, изготовленной по классической рецептуре, 5 сут.

При посеве тест-штаммов на коммерческую среду DTM, используемую в качестве контроля, цвет среды при росте *T. mentagrophytes* начал меняться на 3 сутки и на 4 имел выраженную красную окраску. При росте *M. canis* четкое изменение цвета произошло на 5 сутки роста. Таким образом, на коммерческой среде изменение цвета при росте дерматофитов наступало на 2 суток раньше, чем на первой серии DTM, изготовленной по классической рецептуре.

Полученный результат свидетельствовал о необходимости модификации классического состава питательной среды и оптимизации соотношения компонентов, с целью обеспечения роста *M. canis*, являющегося в настоящее время наиболее распространенным и патогенным видом.

4.2.1. Подбор оптимального пептона

В основе принципа работы диагностической питательной среды DTM лежит изменение уровня pH в сторону защелачивания, что ведет к изменению цвета. Этот процесс обусловлен тем, что растущая колония гриба-дерматофита метаболизирует пептидные компоненты, поэтому важно подобрать именно те, которые наилучшим образом будут стимулировать рост и развитие гриба. В начале первого этапа исследований было необходимо изучить влияния различных пептонов на скорость роста и степень развития воздушного мицелия контрольных

штаммов дерматофитов. С этой целью было изготовлено пять серий среды Сабуро, отличающихся качественным составом пептона. При этом остальной состав сред не отличался от классической рецептуры, куда входила глюкоза в количестве 10 г/л, бактериологический агар в количестве 18 г/л, а количество пептона составляло 10 г/л. В качестве контрольной использовали коммерческую среду Сабуро («HiMedia», Индия) в состав которой входили микологический пептон – 10 г/л, глюкоза – 40 г/л, агар-агар – 15 г/л.

На каждый вариант среды Сабуро уколом высевали контрольные штаммы дерматофитов в центр чашки, после чего инкубировали в течение 7 сут. при температуре 27-29 °С, а затем измеряли диаметр колоний и оценивали интенсивность образования воздушного мицелия.

Результаты исследования представлены в табл. 5.

Табл. 5 – Влияние различных пептонов в составе среды Сабуро на ростовые свойства дерматофитов (7 сут. роста)

Вид, штамм гриба	Диаметр колонии, мм / развитие воздушного мицелия, баллы					
	Среда Сабуро (контроль)	Мясной пептон (Германия)	Соевый пептон (Германия)	Мясной пептон (Россия)	Сухой ферментативный мясной пептон (Россия)	Казеиновый пептон (Германия)
1	2	3	4	5	6	7
<i>M. canis</i> I	21,67±0,67 / 2	26,67±0,67 / 2	26,67±0,67 / 1	26,0±0,58 / 1	25,67±1,20 / 1	27,33±0,33 / 1
<i>M. canis</i> 71-19	23,33±0,33 / 3	31,33±0,88 / 2	33,0±0,58 / 1	29,67±1,20 / 1	31,33±0,33 / 1	32,67±0,67 / 1
<i>M. canis</i> K	29,67±1,20 / 3	30,67±0,88 / 1	31,33±1,20 / 1	33,67±0,88 / 1	32,33±0,33 / 1	35,0±0,58 / 1
<i>T. mentagrophytes</i> #135	37,0±0,58 / 3	38,33±0,67 / 2	34,0±1,0 / 2	36,67±0,88 / 2	36,33±0,33 / 2	28,0±0,58 / 1

Как видно из представленных в табл. 5 данных, наилучшая энергия роста всех трех контрольных штаммов *M. canis* отмечена на среде с добавлением соевого и казеинового пептона – на 7 сутки диаметр колоний достигал в среднем 31 мм. Однако эти пептоны слабо стимулируют рост воздушного мицелия, который свидетельствует об активной споруляции. Штаммы *M. canis* на средах с соевым и казеиновым пептонами формировали плоские полупрозрачные паутинистые

колонии, в центре которых формировался небольшой участок белого цвета круглой формы с зачатками воздушного мицелия.

Несколько хуже энергия роста отмечена у штаммов *M. canis* на средах с добавлением мясных пептонов. При этом мясной пептон отечественного производства лучше стимулировал рост колоний, чем немецкий, диаметр колоний дерматофитов достигал в среднем 30 и 29 мм, соответственно. Однако импортный мясной пептон лучше стимулировал формирование воздушного мицелия – штаммы имели типичную для *M. canis* колонию, по всей площади которой был хорошо развит и сформирован воздушный мицелий (рис. 24).

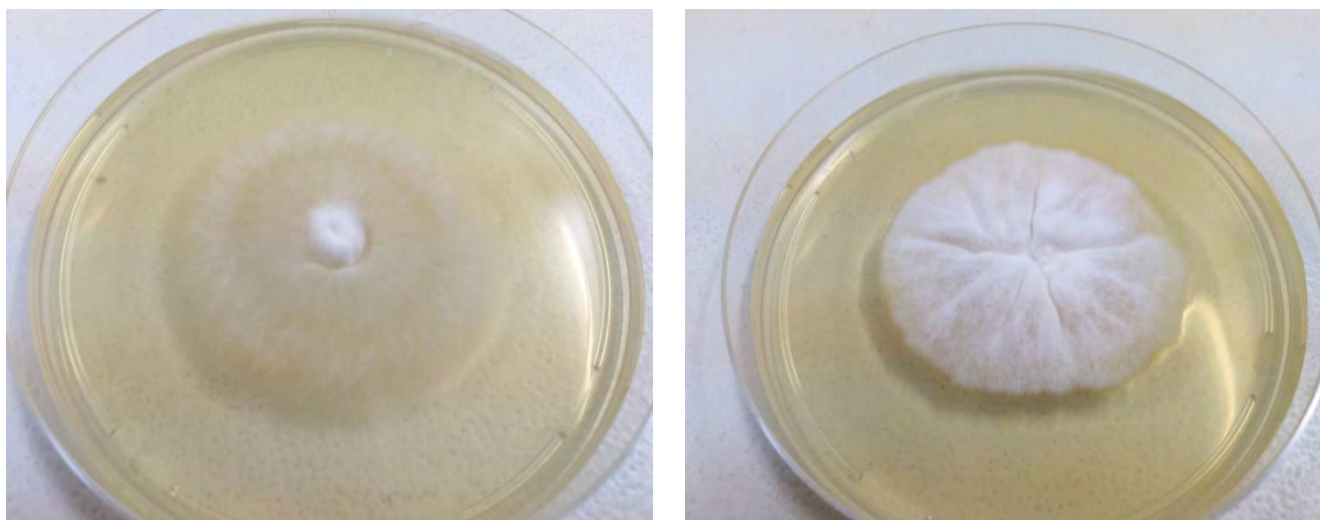


Рис. 24 – Колония *M. canis* на средах с пептонами различного происхождения: слева – казеиновый пептон (Германия), справа – мясной пептон (Германия), 7 сут. роста

Сухой ферментативный пептон имел схожие показатели по сравнению с российским мясным пептоном – он несколько лучше влиял на скорость роста колоний *M. canis*, при этом на нем также хуже формировался воздушный мицелий относительно немецкого мясного пептона.

Контрольная среда Сабуро показала хорошее стимулирующее влияние на формирование воздушного мицелия – все тест-штаммы *M. canis* формировали хорошо развитые колонии. Однако энергия роста дерматофитов на данной среде была значительно ниже, по сравнению с остальными опытными средами – диаметр колоний на 7 сутки в среднем достигал 25 мм.

Все исследуемые среды практически одинаково хорошо стимулировали рост *T. mentagrophytes*. Исключением являлась среда с добавлением казеинового

пептона, который единственный из всех замедлял развитие колонии гриба. Культура имела слабо развитый мицелий, а энергия роста была значительно меньше в сравнении с ростом на других опытных средах.

Биохимическое исследование вариантов питательной среды с добавлением различных пептонов показало различия таких показателей, как содержание общего и аминного азота. Результаты представлены в табл. 6.

Табл. 6 – Биохимический состав экспериментальных пептонов

Виды пептонов	Мясной (Германия)	Соевый (Германия)	Мясной (Россия)	Сухой ферментативный (Россия)	Казеиновый (Германия)
1	2	3	4	5	6
рН	7.01	6.98	6.99	6.81	7.27
Аминный азот (%)	3.75	3.4	3.93	4.2	4.5
Общий азот (%)	11.6	14.0	16.0	22.0	12.0
Влажность (%)	5.3	3.89	4.07	4.39	4.6
Нерастворимые примеси	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

Как видно из табл. 6, наибольшее количество аминного азота содержится в казеиновом пептоне – 4,5%, а наибольшее общее содержание азота наблюдается в сухом ферментативном – 22,0%. При этом отмечено, что количество общего и аминного азота практически никак не коррелирует со стимулирующими рост грибов-дерматофитов свойствами пептонов, вероятно, скорость роста колоний зависит от других показателей, например, качественного аминокислотного состава.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что наилучшим пептоном, стимулирующим рост и развитие культур грибов-дерматофитов, является мясной пептон немецкого производства. Несмотря на то, что он несколько хуже стимулирует рост дерматофитов в сравнении с соевым и сухим ферментативным пептонами, на нем лучше формируется воздушный мицелий. Мясной пептон российского производства уступает по обоим показателям, среда Сабуро значительно хуже стимулирует скорость роста, а казеиновый пептон отрицательно воздействует на рост контрольного штамма *Tr. mentagrophytes*. Таким образом, в дальнейших исследованиях было решено использовать мясной

пептон немецкого производства, который представляет «золотую середину», обладая выраженными ростообеспечивающими свойствами и стимулирующими формирование мицелия.

4.2.2. Влияние углеводного состава на ростовые свойства экспериментальной среды

Следующим этапом исследования являлось изучение влияния углеводного состава питательной среды ДТМ на стимуляцию роста контрольных штаммов дерматофитов. Несмотря на то, что в первую очередь грибы-дерматофиты используют для роста и развития пептоны, не стоит недооценивать роль углеводов в стимулировании роста. Углеводный состав важен еще и потому, что так выявляются плесневые грибы-контаминанты, которые используют сахара при проведении диагностики, закисляют среду, благодаря чему цвет не меняется.

Для проведения этого этапа было создано 14 вариантов питательной среды. В качестве белкового компонента, исходя из результатов предыдущего исследования, использовали мясной пептон немецкого производства, в качестве углеводного - 14 различных видов сахаров и многоатомных спиртов по 10 г/л. В ходе исследования были получены результаты, отраженные в табл. 7.

Табл. 7 – Влияние различных углеводов на стимуляцию роста дерматофитов на 7 сутки.

№№	Виды углеводов	<i>M. canis</i> I	<i>M. canis</i> 71-19	<i>T. mentagrophytes</i> 135
1	Манноза	32,0±0,58	32,67±1,20	33,33±1,20
2	Инозит	30,33±0,67	26,67±0,88	33,67±0,67
3	Маннит	31,67±0,67	33,33±0,33	35,33±0,67
4	Лактоза	28,67±0,33	29,00±0,58	34,00±0,58
5	Арабиноза	28,0±1,15	22,33±1,20	36,00±1,15
6	Адонит	29,67±0,88	28,33±0,88	34,00±1,53
7	Сорбит	28,67±1,76	28,33±1,20	29,67±1,20
8	Дульцит	29,33±1,20	30,00±1,00	29,00±1,00
9	Ксилоза	17,67±0,33	18,67±0,88	31,33±0,67
10	Рамноза	29,67±1,76	27,33±1,86	33,00±0,58
11	Раффиноза	32,00±1,15	28,33±0,33	32,00±1,15
12	Салицин	28,33±0,88	31,00±1,15	32,33±0,33
13	Мальтоза	29,67±1,20	30,33±0,88	34,33±1,20
14	Глюкоза	29,67±0,67	30,33±0,88	34,67±0,88

Практически на всех средах контрольные штаммы имели одинаковую энергию роста, кроме среды с добавлением ксилозы – на 7 сутки диаметр колоний контрольных штаммов *M. canis* имел 17-18 мм, что значительно ниже, по сравнению с другими вариантами. Воздушный мицелий также хорошо формировался почти на всех исследуемых средах, за исключением сред, с добавлением салицины, ксилозы, дульцита и арабинозы – на них колонии *M. canis* имели паутинистую структуру с плохо развитым мицелием, что свидетельствует об отсутствии стимулирующих свойств этих углеводов на дерматофиты.

Культура контрольного штамма *T. mentagrophytes* имела хорошо сформированные колонии на всех вариантах среды.

Наилучшие результаты были получены при использовании в качестве добавок маннита и маннозы - на 7 сутки колонии *M. canis* достигали в среднем 32 мм в диаметре. При этом колонии были хорошо сформированы, культуры имели полноценно развитый воздушный мицелий.

Хуже дерматофиты росли на средах с добавлением глюкозы, лактозы, адонита, сорбита, дульцита, раффинозы, салицина и мальтозы – за идентичный период времени диаметр колоний в среднем не превышал 30 мм.

На скорость роста *T. mentagrophytes* наилучшим образом повлияли маннит и лактоза, диаметр колоний достигал в среднем 35 мм в соответствующий период времени. Практически такую же стимуляцию роста продемонстрировали манноза и глюкоза – диаметр колонии в среднем доходил до 34 мм.

Таким образом, проведенное исследование показало, что особый практический интерес в качестве ростостимулирующих добавок к среде DTM из 14 использованных в опыте углеводов, представляют маннит и манноза, которые могут применяться как дополнительные добавки к дифференциально-диагностической среде при выявлении грибов-дерматофитов из клинического материала.

4.2.3. Изучение влияния различных компонентов на скорость роста дерматофитов и индикаторные свойства среды

После изучения питательных и стимулирующих компонентов, влияющих на рост грибов-дерматофитов, нами был установлен наиболее оптимальный состав среды, в котором в качестве белкового источника используется мясной пептон, а в качестве источника углевода – маннит и манноза.

Для определения лучшего индикатора в составе экспериментальной «ДТМ-Эксперт» в качестве опытных были выбраны бромтимоловый синий и феноловый красный. Выбор основан на том, что изменение цвета этих индикаторов находится в диапазоне сдвига уровня pH от 5,5 до 9,0 при росте дерматофитов.

Концентрация была подобрана на основании литературных данных – феноловый красный используется в классической рецептуре DTM, а бромтимоловый синий использовался в исследовании китайскими учеными [105, 147].

Для определения наиболее оптимального индикатора в составе питательной среды и исходного значения pH были сформированы два варианта среды – I и VII (табл. 8).

Табл. 8 – Количественный и качественный состав исследуемых вариантов питательной среды «ДТМ-Эксперт»

Компонент	Вариант I	Вариант II	Вариант III	Вариант IV	Вариант V	Вариант VI	Вариант VII	Вариант VIII
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Манноза, г/л	-	10	-	-	-	-	-	-
Маннит, г/л	-	-	10	-	5	10	-	5
Глюкоза, г/л	10	-	-	10	5	10	10	5
Пептон (мясной), г/л	10	10	10	10	10	10	10	10
Феноловый красный, г/л	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	-	0,2
Комплекс углеводов, г/л	-	-	-	-	-	-	-	7
Бромтимоловый синий, г/л	-	-	-	-	-	-	0.025	-
Агар-агар, г/л	18	18	18	18	18	18	18	18
pH	5.5	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	5.5	4.8
Циклогексими́д, г/л	-	-	-	-	-	-	-	0,5
Энрофлоксацин, г/л	-	-	-	-	-	-	-	0,1

I вариант имел в своем составе глюкозу и первоначальное значение pH 5,5, при этом цвет самой среды был красно-коричневый, что впоследствии затрудняло оценку изменения её цвета при росте дерматофитов. Задержек в скорости роста контрольных штаммов выявлено не было. Установлено, что изменение цвета при росте *M. canis* наступало на 3 сутки, при росте *T. mentagrophytes* на 2 сутки (рис. 25 и 26).

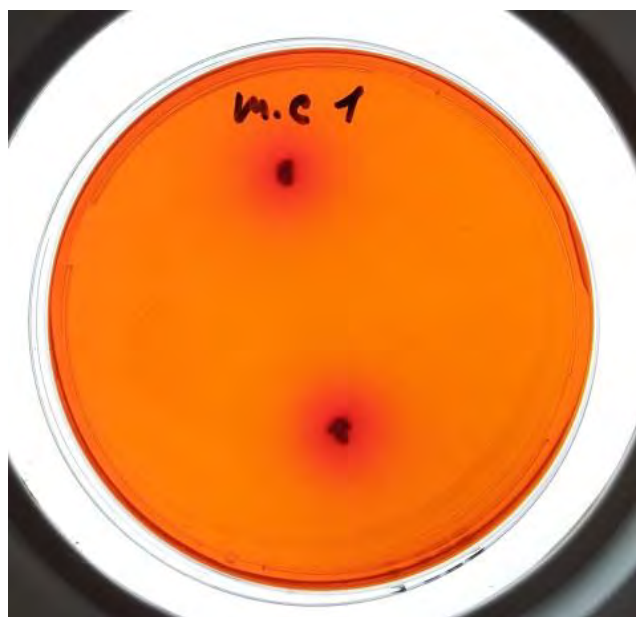


Рис. 25 – Рост *M. canis* на I варианте, 3 сут.

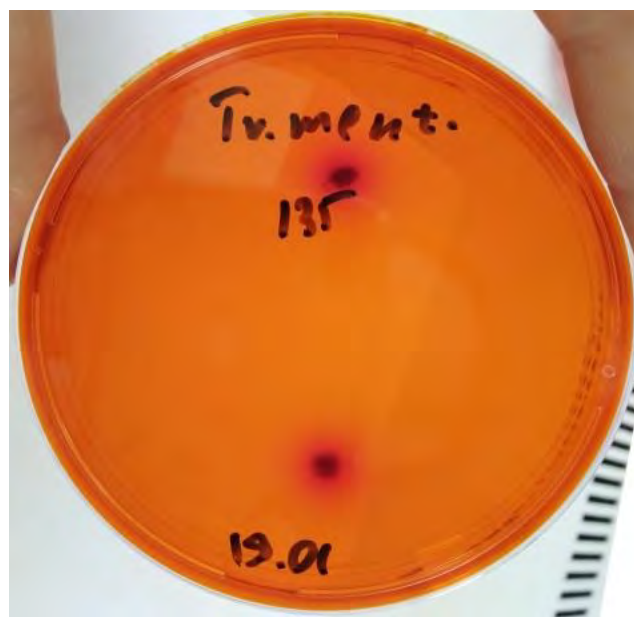


Рис. 26 – Рост *T. mentagrophytes* на I варианте, 2 сут.

VII вариант среды имел схожее с I вариантом значение pH и состав, кроме индикатора – вместо фенолового красного использовался бромтимоловый синий. Изменение цвета на VII варианте среды при росте контрольного штамма *M. canis* наступило на 5 сут. и стало насыщенным только на 6 сут. При росте *T. mentagrophytes* среда начала менять цвет уже на 2 сутки, на третий он стал более выраженным (рис. 27 и 28).

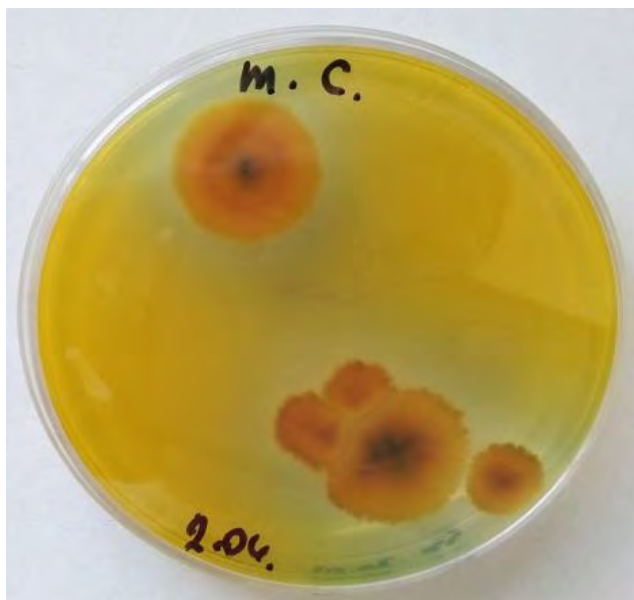


Рис. 27 – Рост *M. canis* на VII варианте, 5 сут.

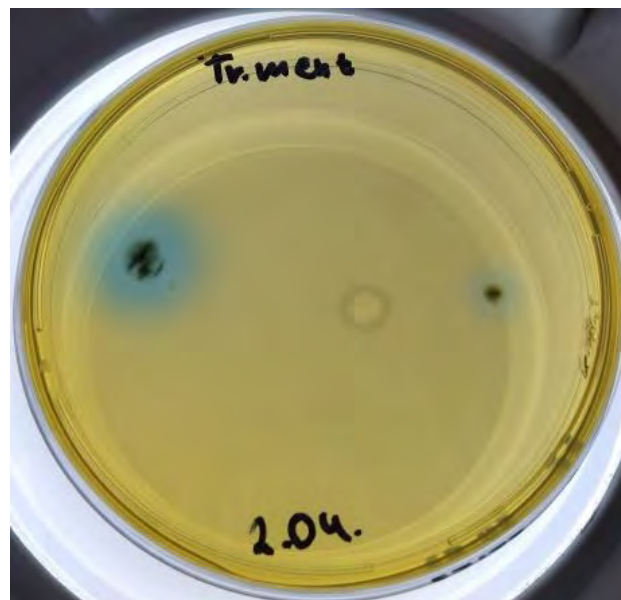


Рис. 28 – Рост *T. mentagrophytes* на VII варианте, 2 сут.

По результатам проведенного опыта, было решено уменьшить значение pH с 5,5 до 4,7, что обеспечивало лучшую наглядность изменения цвета, а в качестве индикатора использовать феноловый красный, поскольку среда с бромтимоловым синим медленнее меняла цвет при росте контрольных штаммов (табл. 9).

Для изучения влияния различных углеводов на срок индикации среды при росте контрольных штаммов дерматофитов и плесневых грибов, было изготовлено 3 варианты среды. Различия между ними были в углеводном компоненте: во II варианте была манноза, в III – маннит, в IV – глюкоза.

В процессе роста контрольных штаммов на II варианте изменение цвета отмечено на 4 день для *M. canis* и на 3 для *T. mentagrophytes*, на III варианте среда поменяла цвет на 2 день роста *M. canis* и на 1 день для *T. mentagrophytes*. Рост контрольных штаммов плесеней изменил окраску среды на 6 день для *P. chrysogenum* и на 7 день для *A. niger*. Среда с глюкозой (IV вариант) поменяла цвет на 3 и на 2 сутки при росте *M. canis* и *T. mentagrophytes*, соответственно.

Было установлено, что среда с маннитом имеет лучшие индикаторные свойства, однако цвет среды также меняется и при росте плесневых грибов, чего не наблюдается на II и IV вариантах.

Исходя из результатов предыдущего этапа, было решено изучить комбинацию маннита и глюкозы в разных пропорциях. Для этого сделали 2

варианта среды: в V варианте использовали 5 г маннита и 5 г глюкозы, в VI – 10 г маннита и 10 г глюкозы. Проведенные опыты показали, что V вариант среды дает лучшие результаты индикации, по сравнению с VI – изменение цвета при росте *M. canis* наступает на 1 день раньше. Изменение цвета при росте плесневых грибов на V варианте наступало на 3-4 дня позднее, по сравнению с VI.

Результаты по первому, второму и третьему этапам представлены в табл. 9.

Табл. 9 – Срок изменения цвета экспериментальной среды DTM при росте контрольных штаммов (сутки).

Штаммы грибов	Вариант I	Вариант II	Вариант III	Вариант IV	Вариант V	Вариант VI	Вариант VII
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	2	3	1	2	2	3	2
<i>Microsporum canis</i>	3	4	2	3	3	4	6
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	7	-	10	6	-
<i>Penicillium chrysogenum</i>	-	-	6	-	8	5	7

В результате было установлено, что среда с добавлением глюкозы и маннита (V вариант) по индикаторным свойствам близка к среде, где использовали только глюкозу (IV вариант), однако энергия роста дерматофитов выше на V варианте – диаметр колоний на 2-4 мм был шире. Также выявлено изменение цвета при росте плесневых грибов, однако цвет менялся при длительном культивировании. Дальнейший подбор селективных добавок позволит снизить или полностью устранить рост плесневых грибов-контаминантов.

4.2.4. Подбор селективных добавок

Селективные добавки, как компоненты диагностической питательной среды, необходимы для предотвращения или замедления роста различных контаминантов, способных повлиять на скорость и точность выявления грибов-дерматофитов. Учитывая, что среда используется для посева первичного клинического материал, контаминантами могут быть как плесневые грибы, так и бактерии.

Для поиска оптимального антибиотика, способного ингибировать рост большинства потенциальных бактерий-контаминантов, использовали диско-диффузный метод определения чувствительности контрольных штаммов бактерий к ряду широко распространенных антимикробных препаратов. Результаты представлены в табл. 10.

Табл. 10 – Чувствительность бактериальных штаммов к различным антимикробным препаратам

№№	Вид антибиотиков	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213
1	Азитромицин	I	S	S	S
2	Энрофлоксацин	S	S	S	S
3	Хлорамфеникол	S	I	R	S
4	Ципрофлоксацин	S	S	S	S
5	Гентамицин	I	I	S	I
6	Амоксициллин	S	I	R	I
7	Хлортетрациклин	S	S	R	S
8	Тетрациклин	I	I	R	S
9	Доксициклин	S	I	R	S
10	Стрептомицин	S	S	S	S

* R – (resistant) – резистентный

I – (intermediate) – промежуточная чувствительность

S – (sensitive) – чувствительный

Из данных табл. 10 видно, что все контрольные штаммы бактерий были высокочувствительны к фторхинолонам (энрофлоксацин, ципрофлоксацин) и стрептомицину, вызвавшим зону задержки роста не менее 30 мм. Однако, учитывая появление в последнее время все большего количества резистентных штаммов микроорганизмов, целесообразным является изучения чувствительности к антибиотикам в первую очередь циркулирующих штаммов, а не тест-культур бактерий, что и стало следующим шагом работы.

Изучение чувствительности полевых изолятов бактерий, выделенных с кожи мелких домашних животных, к ранее выбранным антибиотикам проводили в соответствии с МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам». Каждый вид бактерий был представлен 5 изолятами, полученными из коллекции патогенных и вакцинных штаммов микроорганизмов ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ. Результаты исследования

представлены в табл. 11.

Табл. 11 – Ингибирующая активность антибиотиков к полевым штаммам.

№№	Виды бактерий	Ципрофлоксацин	Энрофлоксацин	Стрептомицин
1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	S	I
		I	S	R
		S	S	S
		I	I	R
		S	S	I
2	<i>Bacillus subtilis</i>	S	S	I
		R	I	R
		I	S	S
		I	R	I
		R	S	S
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	I	S	I
		S	S	I
		R	I	I
		I	I	R
		I	R	R
4	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S
		I	S	S
		S	I	I
		S	S	S
		I	I	R

* R – (resistant) – резистентный

I – (intermediate) – промежуточная чувствительность

S – (sensitive) – чувствительный

Как видно из табл. 11, наиболее часто бактерии оказывались чувствительны к энрофлоксацину, реже к ципрофлоксацину.

Для определения необходимой концентрации антибиотика в среде, определяли минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) энрофлоксацина для полевых штаммов, которые имели устойчивость или промежуточную чувствительность к данному препарату. Результаты представлены в табл. 12.

Табл. 12 – Определение МИК энрофлоксацина

№ №	Концентрация антибиотика	1	2	3	4	5	6	7	8	9
		3,2 мг/мл	1,6 мг/мл	0,8 мг/мл	0,4 мг/мл	0,2 мг/мл	0,1 мг/мл	0,05 мг/мл	0,025 мг/мл	0,0125 мг/мл
1	<i>K. pneumoniae</i>	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Р	Р
2	<i>B. subtilis</i>	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Р
3	<i>P. aeruginosa</i>	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Р	Р	Р
4	<i>S. aureus</i>	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Р	Р

* Ч – рост отсутствует

Р – рост присутствует

Наименее чувствительной культурой оказалась *P. aeruginosa*, для ингибирования роста которой была необходима концентрация антибиотика 0,1 мг/мл. Рост штаммов *K. pneumoniae* и *S. aureus* ингибировался концентрацией 0,05 мг/мл, а для подавления роста *B. subtilis* была необходима концентрация, равная 0,025 мг/мл. Таким образом, была получена концентрация антибиотика, которая составляет 0,1 мг/мл, способная подавлять рост потенциальных возбудителей, находящихся на коже животных.

Для обеспечения селективности среды используется циклогексимид – природный антибиотик, продуцируемый *Streptomyces griseus*. Он способен элиминировать или замедлять рост контаминирующих быстрорастущих плесеней, не влияя на рост дерматофитов.

Ингибирующие свойства циклогексимида в составе экспериментальной среды «ДТМ-Эксперт» оценивали также путём определения минимальной ингибирующей концентрации действующего вещества для музейных штаммов плесневых грибов *A. niger* GB-47-19/Viev и *P. chrysogenum* PL-11-19/Viev. Результаты представлены в табл. 13.

Табл. 13 – Определение МИК циклогексимида для музейных штаммов плесневых грибов

№№	Наименование штамма	Концентрация антибиотика								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
		32 мг/мл	16 мг/мл	8 мг/мл	4 мг/мл	2 мг/мл	1 мг/мл	0,5 мг/мл	0,25 мг/мл	0,125 мг/мл
1	<i>A. niger</i> GB 47-19	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Р	Р
2	<i>P. chrysogenum</i> PL 11-19	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Р

Как видно из данных табл. 13, циклогексимид в концентрации 0,5 мг/мл способен ингибировать рост контрольных штаммов плесневых грибов *A. niger* и *P. chrysogenum*. Схожие результаты были получены и при определении чувствительности полевых изолятов плесневых грибов видов *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Scopulariopsis sp.*, *Cladosporium sp.* на экспериментальной среде «ДТМ-Эксперт», с содержанием циклогексимида в количестве 0,5 мг/мл. Установлено, что при такой концентрации подавляющего вещества рост колоний

плесневых грибов значительно замедляется, в отличие от роста колоний грибов-дерматофитов (рис. 29 и 30).

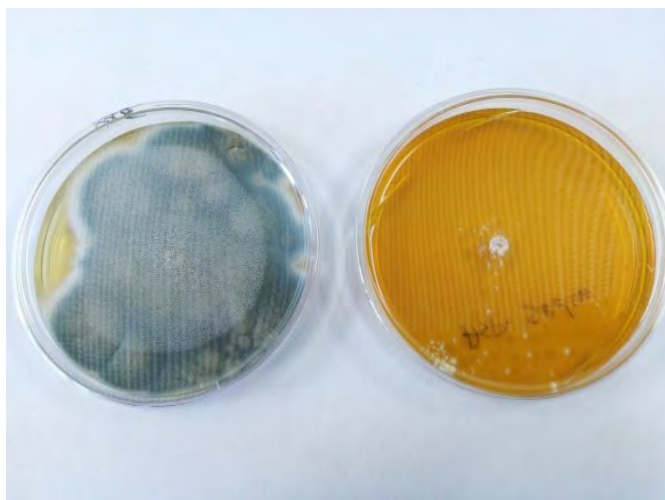


Рис. 29 – Рост *A. fumigatus*. Слева среда Сабуро, справа – «ДТМ-Эксперт», 5 сут. роста

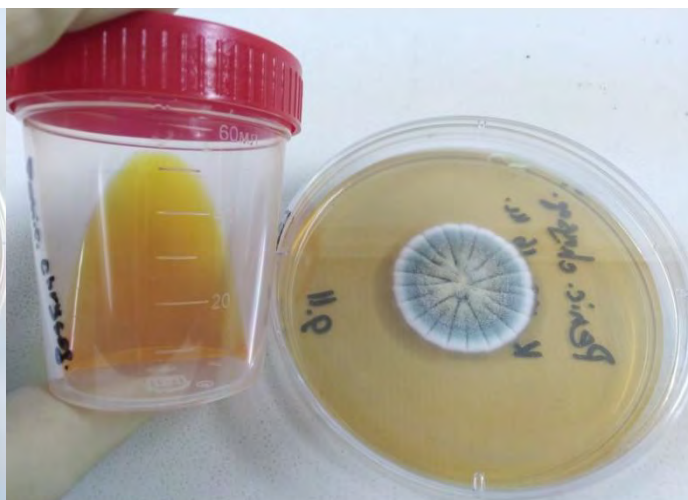


Рис. 30 – Рост *P. chrysogenum*. Слева среда «ДТМ-Эксперт», справа – среда Сабуро, 5 сут. роста

Таким образом, проведенные опыты позволили в качестве ингибирующих компонентов питательной среды использовать антибиотик энрофлоксацин в концентрации 0,1 мг/мл и циклогексимид в концентрации 0,5 мг/мл, что обеспечивает селективные свойства экспериментальной «ДТМ-Эксперт», замедляя или полностью ингибируя рост контаминирующих микроорганизмов.

4.2.5. Подбор дополнительных питательных добавок для стимуляции роста.

На данном этапе нами был полностью установлен состав диагностической питательной среды, определены все основные необходимые для роста микроорганизмов компоненты, уровень pH, изучено влияние различных ингибирующих добавок.

Однако, с целью выявления возможных механизмов стимулирования роста целевых видов грибов, были проведены исследования по влиянию витаминно-ростовых добавок, необходимых для роста микроорганизмов. В качестве исследуемых добавок были подобраны следующие:

- 1 – цистеин, основная аминокислота кератина, ассимилируемая кератинофильными дерматофитами;
- 2 – комплекс витаминов группы В, благоприятно влияющих на рост грибов-дерматофитов;
- 3 – белково-пептидный

комплекс, как дополнительный источник органического азота; - 4 – комплекс моно- и полисахаридов в качестве дополнительного источника углеводов.

В качестве контроля использовали серию среды «ДТМ-Эксперт», в которую вышеперечисленные дополнительные компоненты не вносились.

В результате проведенного опыта установлено выраженное положительное влияние на скорость роста *M. canis* среды с добавлением комплекса 4. Выраженный рост колоний наблюдался на 2-3 сутки, а на 5 сутки диаметр колонии достигал 16-18 мм. Также заметным стимулирующим влиянием обладал витаминный комплекс (компонент 2) – видимый рост был отмечен на 3-4 сутки. Белково-пептидный комплекс (компонент 3) оказывал наименее выраженное влияние на энергию роста *M. canis*. Примечательно, что добавление к среде аминокислоты цистеин (компонент 1) не стимулировало, а ингибировало рост штамма (рис. 31).

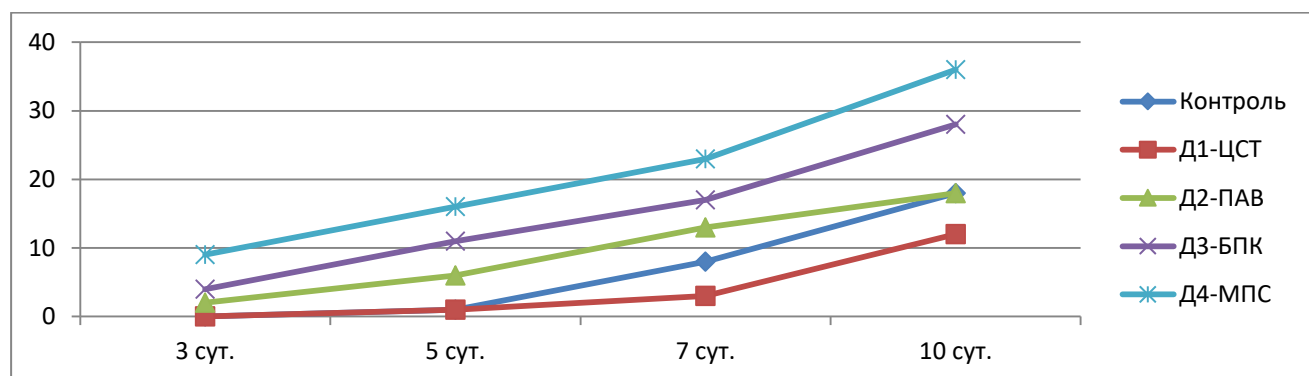


Рис. 31 – Энергия роста *M. canis* на средах «ДТМ-Эксперт» с различными ростовыми добавками. Контроль – среда «ДТМ-Эксперт» без добавок. По оси Y – диаметр грибных колоний, мм.

T. mentagrophytes наибольшую интенсивность роста показал также на среде с добавлением 4 комплекса углеводов, заметный рост культуры был отмечен на 3 сутки. Практически одинаковые результаты показали контрольная среда и среда со 2 компонентом. Хуже всего стимулировали рост *T. mentagrophytes* цистеин и белково-пептидный комплекс (рис. 32).

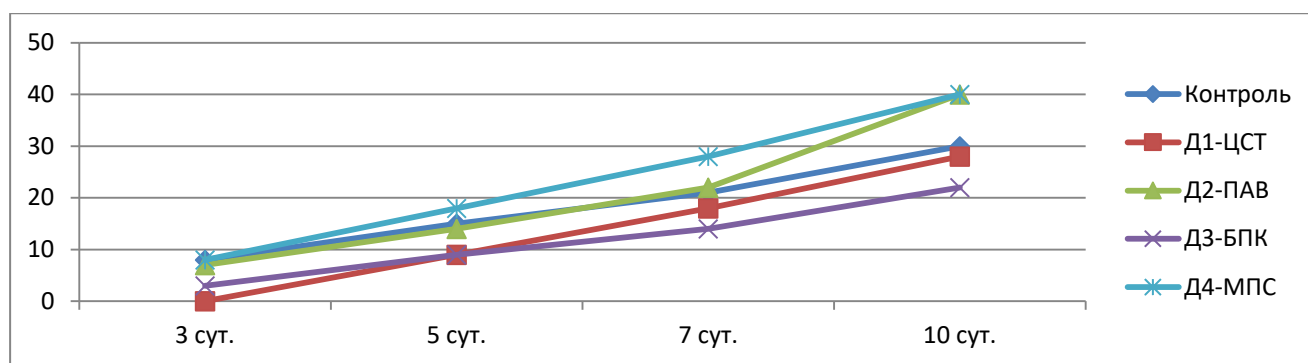


Рис. 32 – Энергия роста *T. mentagrophytes* на средах «ДТМ-Эксперт» с различными ростовыми добавками. Контроль – среда «ДТМ-Эксперт» без добавок. По оси Y – диаметр грибных колоний, мм

Питательные компоненты оказывали значительное влияние на индикаторные свойства экспериментальной среды ДТМ, т.е. на способность приобретать красное окрашивание при росте грибов-дерматофитов, что имеет важное диагностическое значение.

Наиболее выраженное красное окрашивание среды наблюдали при внесении углеводов (компонент 4) (рис. 33). При этом изменение цвета (покраснение) наблюдали уже через 48-72 ч. после посева, что быстрее, чем в остальных вариантах.



Рис. 33 – Влияние на индикаторные свойства среды «ДТМ-Эксперт» различных ростовых компонентов (слева направо: компоненты 1, 2, 3, 4).

Также отчетливое красное окрашивание вызвал витаминный комплекс (компонент 2). Наиболее слабая окраска наблюдалась в среде с цистеином (компонент 1). Что касается белково-пептидного комплекса, то его добавление меняло цвет среды с желтого на красный в незасеянной среде, что очевидно связано с щелочным значением pH данного компонента. В силу этого фактора, данный компонент не может быть использован для приготовления

диагностической среды.

По результатам было установлено, что оптимальными ростовыми и индикаторными свойствами обладает питательная среда, обогащенная углеводным компонентом, представляющий собой комплекс моно- и полисахаридов. Комплекс обеспечивает быстрый рост колоний дерматофитов, при этом колонии обладают характерными культурально-морфологическими признаками, что важно для видовой идентификации. Покраснение среды наступает через 2-3 дня после посева, на 7-е сутки культивирования оно отчетливо выражено.

4.3. Аprobация среды на клиническом материале от больных животных

После получения положительных результатов аprobации диагностикума с контрольными штаммами грибов, важным этапом было исследовать «ДТМ-Эксперт» на клиническом материале от мелких домашних животных.

Первым этапом аprobацию среды проводили в сравнении с импортной DTM «DermaKit» (Италия). Кроме коммерческой DTM, материал от животных высевался на опытный образец «ДТМ-Эксперт», соответствующий VIII варианту, а в качестве контроля – на среду Сабуро с хлорамфениколом. Посев материала осуществлялся классическим методом, в том числе использовался метод Маккензи.

Всего было исследовано 40 образцов шерсти, из которых положительных по дерматофитозу было 14. Эффективность среды Сабуро составила 64,3%. На среде Сабуро рост дерматофитов в трех случаях начинался на 4 сутки, в четырех случаях – на 5, в одном случае – на 6, и в одном – на 7 сутки со дня посева. К 8 дню диаметр колонии составлял, в среднем, 4-6 см. Из-за отсутствия в среде Сабуро ингибиторов, часто возникал обильный рост грибов-контаминантов. Из 14 положительных проб, 4 имели сильную контаминацию, затрудняющую рост дерматофитов. Чаще всего грибы-контаминанты относились к родам *Penicillium*, *Alternaria*, *Scopulariopsis*, *Mucor*, реже *Aspergillus* и *Cladosporum*.

Эффективность импортной среды DTM составила 92,8%. Начало роста

колоний было отмечено в одном случае на 5 сутки, в трех случаях на 6, в пяти – на 7 сутки, в трех – на 8, в одном – на 9 сутки после посева. Изменение цвета возникало на 8-9, иногда 10 день.

Стоит отметить, что отрицательным моментом является размер и форма первичной упаковки, которая затрудняет дифференциацию дерматофитов по морфологии. Контаминанты не позволяют дерматофитам образовать видимую колонию, сама культура имеет скудный рост, а макроконидии образовывались не ранее 18 дня или вообще не обнаруживались. Помимо этого, часто возникало ложноположительное изменение цвета среды в связи с выраженным ростом контаминантов, что существенно снижает эффективность диагностики дерматофитозов.

Что касается экспериментальной среды «ДТМ-Эксперт», эффективность не уступает импортной среде и составляет 85,7%. Рост дерматофитов отмечался в двух случаях на 6 сутки, в четырех – на 7, в пяти – на 8 и в одном на 9 сутки после посева. Изменение цвета среды возникало на 8-10 день. Количество грибов-контаминантов выросло в полтора раза меньше, чем на импортной среде, при этом не возникало случаев ложноположительного изменения цвета (табл. 14).

Табл. 14 – Сравнительные результаты микологического исследования клинического материала при использовании различных питательных сред.

	Количество проб	Выделено дерматофитов		Видимый рост, день	Изменение цвета, день	Выраженный рост грибов-контаминантов, %	Ложноположительная реакция, %
«ДТМ-эксперт»	40	12	85,7%	7-9	8-10	15	0
«DermaKit»		13	92,8%	6-8	8-9	22,5	13,2
Сабуро		9	64,3%	4-6	-	25	-

Следующий этап апробации проводили с импортной средой ДТМ «HiMedia» (Индия).

Из 54 животных положительными по дерматофитам оказались 15. На среде Сабуро рост возникал на 3-4 сутки после посева, однако отмечается сильная контаминация плесневыми грибами – из 54 проб 15 имели практически полное зарастание чашки, среди которых 2 посева были положительными по

дерматофитам.

Опытный образец «ДТМ-Эксперт» позволил выявить возбудителей во всех положительных образцах, DTM HiMedia выявила возбудителя в 13 (86.6%) из 15 случаях. В среднем, скорость покраснения «ДТМ-Эксперт» после посева составила 10 суток, DTM HiMedia – 11. Скорость покраснения среды DTM HiMedia после начала роста составила 7 суток, опытного образца DTM – 2. Также в испытуемых средах отмечено ложноположительное покраснение на рост плесневых грибов, чаще всего на *Alternaria sp.* Из 54 образцов, на среде «ДТМ-Эксперт» выявлено 3 (5.56%) ложноположительных случая, покраснение наступало в среднем на 7 сутки, на HiMedia – 5 (9.2%) случаев, покраснение на 7 сутки (табл. 15).

Табл. 15 – Сравнительные результаты микологического исследования клинического материала при использовании различных питательных сред.

	Количество проб	Выделено дерматофитов	Видимый рост, день	Изменение цвета, день	Выраженный рост грибов-контаминантов, %	Ложноположительная реакция, %
«ДТМ-Эксперт»	54	15	8	10	6	6
«HiMedia»		13	3	11	11	9
Сабуро		13	3-4	-	27	-

Как видно из табл. 15, на «ДТМ-Эксперт» рост возникал в среднем на 5 дней позже, чем на импортной среде, при этом, на DTM HiMedia при раннем начале роста покраснение начиналось в среднем на 1 день позже, чем на экспериментальной среде.

Экспериментальная среда «ДТМ-Эксперт», приготовленная по VIII варианту, имеет ряд преимуществ перед импортными средами. Прежде всего, это значительно меньшее количество ложноположительных результатов, вызываемых ростом контаминирующих грибов – из 96 посевов только в 3 менялся цвет при росте плесневых грибов, тогда как на импортных средах изменение цвета возникало в 8 случаях, что почти в 2,5 раза больше. Несмотря на то, что видимый рост дерматофитов наступает одновременно или немного позже, чем на импортных DTM, цвет экспериментальной среды DTM меняется раньше по

сравнению с другими зарубежными аналогами.

4.4. Сравнение эффективности методов диагностики дерматофитозов

Чтобы понять важность среды ДТМ при диагностике дерматофитозов, было проведено сравнительное изучение эффективности различных диагностических методов. С этой целью было отобран материал от 54 животных, подозрительных на заболевание дерматофитозами. Каждый образец клинического материала разделяли на 4 одинаковые части и исследовали различными способами: с помощью лампы Вуда, прямой микроскопии, микроскопии с калкофлюором белым, посевом на среду Сабуро и «ДТМ-Эксперт». В результате проведенных исследований из 54 образцов шерсти выделено 16 культур грибов-дерматофитов. Результаты сравнительной эффективности каждого из использованных методов представлены в табл. 16.

Табл. 16 – Эффективность различных методов диагностики дерматофитозов.

	Лампа Вуда	Прямая микроскопия	Люминесцентная микроскопия с калкофлюором	Посев на Сабуро	Посев на «ДТМ-Эксперт»	Всего образцов	Всего положительных образцов
1	2	3	4	5	6	7	8
Положительных образцов	10 (62.5%)	9 (56.3%)	15 (93.8%)	13 (81.3%)	16 (100%)	54	16
Ложноотрицательных образцов	9 (16.7%)	4 (7.4%)	5 (9.3%)	-	3 (5.6%)		

С помощью прямой микроскопии дерматофитозы подтвердили только в 56,3 % (9 из 16) случаях. Ложноположительных результатов 7,4% (4 из 54) (рис. 34).

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

На среде Сабуро выросло 13 (81,3%) дерматофитов, из них 2 посева имели высокую степень контаминации плесневыми грибами. 13 посевов, отрицательные по дерматофитам, полностью зарастали плесенью к 7 дню. Чаще всего вырастали *Alternaria sp.* – в 8 случаях, реже *Penicillium sp.*, *Cladosporium sp.* и *Aspergillus sp.*,

в 1 посеве был обнаружен рост *Trichothecium sp.*

Микроскопия с калькофлюором выявила возбудитель в 15 случаях, что составило 93,8%. При этом было 5 (9,3%) ложноположительных результатов (рис. 35).

Эффективность среды «ДТМ-Эксперт» составила 100%, выявив из 54 образцов 16 положительных. Изменение цвета питательной среды происходило на 8-10 сутки роста колоний. В одном посеве наблюдался рост культуры, но изменение цвета не происходило даже спустя 21 суток. С помощью микроскопии культуру удалось идентифицировать как *N. persicolor*. Количество ложноположительных изменений цвета среды составило 5,6% (3 из 54). Во всех случаях изменение вызывали плесени из рода *Alternaria*.



Рис. 34 – Прямая микроскопия волоса.
Увеличение x200

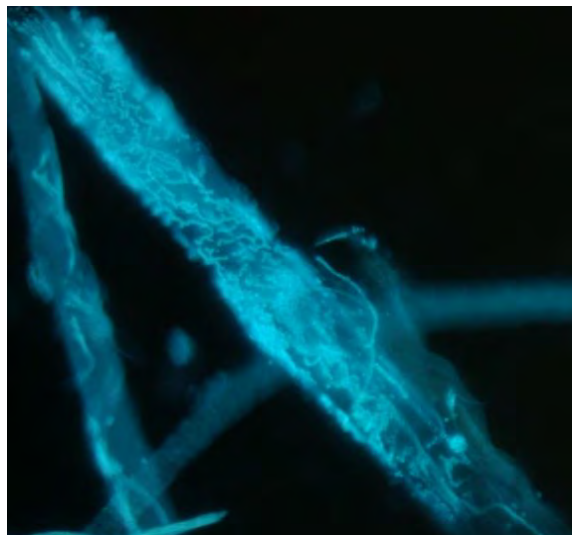


Рис. 35 – Микроскопия волоса с использованием
калькофлюора белого Увеличение x200

Таким образом, прямая микроскопия показала наихудший результат выявления дерматофитозов, подтвердив диагноз только в половине случаев. Эффективность лампы Вуда также показала низкую эффективность, выявив 62,5% положительных образцов. Посев на среду Сабуро имеет хорошую выявляемость дерматофитозов – из 16 образцов с помощью этого метода выявлено 13, но отрицательным моментом является ее низкая специфичность.

Наилучшую эффективность показали два метода: посев на «ДТМ-Эксперт», выявив все положительные образцы, и прямая микроскопия с добавлением флюорохромного красителя калькофлюора.

5. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Дерматофитозы по-прежнему являются актуальным инфекционными заболеваниями домашних животных, особенно кошек и собак. Длительность течения болезни, высокая контагиозность, быстрое распространение среди животных, контаминация окружающей среды, сложность и высокая стоимость мер борьбы, приводят к серьезным экономическим последствиям. Помимо физических страданий, неэстетичного внешнего вида больного животного, дерматофитозы являются препятствием для посещения выставок и спортивных мероприятий, коммерческих сделок и торговли животными. Кроме этого, дерматофитозы играют существенную роль в общественном здравоохранении, поскольку основным источником заболевания людей являются больные животные.

Мониторинг распространенности дерматофитозов является важной задачей по ряду причин. Во-первых, понимание общей тенденции распространения заболевания среди животных-компаньонов позволит ответить на ряд вопросов: каким образом происходит заражение, как влияет образ жизни животного на заболеваемость, какой возраст более восприимчив, существует ли сезонность заболевания и закономерности ее проявления. Во-вторых, своевременное выявление заболевания позволит предотвратить вспышки дерматофитозов в местах скученного содержания, таких как приюты и питомники. В-третьих, изучение заболеваемости позволит выявлять новые виды дерматофитов, в том числе завезенных из-за границы. Это, в свою очередь, даст понимание о механизме развития и эволюции грибов-дерматофитов. Наиболее важной задачей мониторинга дерматофитозов среди животных является профилактика заболеваемости у людей, поскольку в этиологии дерматофитозов человека важное место занимают зоофильные виды грибов-дерматофитов.

В России вопрос распространенности дерматофитозов среди мелких домашних животных изучен достаточно слабо. Основная проблема изучения распространенности – отсутствие государственной системы контроля. Несмотря на то, что НД «Правила по профилактике и ликвидации дерматофитозов

животных» предусматривают ведение отчетности, данные о заболеваемости зачастую не выходят за пределы ветеринарного пункта или лаборатории.

Полученные в процессе выполнения научно-исследовательской работы результаты позволяют судить о заболеваемости дерматофитозами животных-компаньонов, сезонности заболевания, частоте заболевания среди кошек и собак, этиологической структуре, а также о методах диагностики, используемых ветеринарными врачами.

По результатам проведенных микологических посевов из 176 образцов клинического материала нами было выделено 84 изолята дерматофитов, при этом *M. canis* выделен в 77 (91,7%) случае и является наиболее распространенным возбудителем дерматофитозов. Меньшей этиологической значимостью обладает вид *N. gypsea*, он был выделен в 2 (2,4%) случаях. Остальные виды дерматофитов (*T. mentagrophytes*, *M. ferrugineum*, *N. persicolor*, *N. fulva*, *T. benhamiae*) выделены в единичных случаях.

В большинстве исследований для определения видов применяют только морфологические, но не молекулярные методы идентификации. В действительности видовой состав возбудителей дерматофитозов может быть более разнообразным, что и подтверждается нашими исследованиями.

В качестве примера можно привести случай выделения гриба *N. persicolor* о этиологической значимости которого для собак и кошек есть немногочисленные данные в зарубежных источниках литературы [99, 122, 125]. Основным резервуаром и источником заражения *N. persicolor* являются мелкие грызуны, такие как полевки, хомяки и мыши. В естественных условиях гриб может находиться в почве. Чаще всего инфицированию подвержены животные, вступающие в контакт с основными переносчиками – это собаки охотничьих пород и кошки, имеющие доступ к улице [82]. Также имеются данные по инфицированию человека грибом данного вида. В России случаи инфицирования мелких домашних животных *N. persicolor* ранее описаны не были.

T. benhamiae – зооантропонозный дерматофит. За последние 15 лет его распространение значительно увеличилось во всем мире, включая Западную

Европу. Чаще всего он вызывает дерматофитозы у морских свинок, реже у животных других видов. Существует прямая угроза заражения человека непосредственно от больного животного, о чем сообщается в ряде исследований [100, 149]. Чаще инфицированию подвержены дети, проявляющие активный интерес к потенциально больным животным в зоомагазинах, которые являются основным источником распространения гриба данного вида. В доступной литературе отсутствуют сведения о выявлении *T. benhamiae* в России. Вероятно, появление его связано с завозом инфекции из соседних европейских стран.

N. fulva – распространенный повсеместно геофильный дерматофит, обладающий патогенным потенциалом для животных и людей. Предполагаемая причина его редкого выявления в лабораториях - схожая морфология с *N. gypsea*, но молекулярные методы исследований позволяют различать эти виды. Сложно судить о распространенности этого дерматофита, поскольку в большинстве исследований его идентифицируют как *N. gypsea*.

M. ferrugineum является близкородственным видом *M. canis*, однако имеет ряд морфологических особенностей, позволяющих идентифицировать их до вида. Гриб считается антропофильным, но в нашем исследовании он был выделен от кошки.

T. mentagrophytes относится к зоофильным видам и является основным возбудителем дерматофитозов собак, реже выделяется от кошек. Основные переносчики - грызуны, поэтому болеют, как правило, животные в сельской местности и/или имеющие свободный выгул на улицу. Также *T. mentagrophytes* является частым возбудителем дерматофитозов у людей, поражая кожный покров и ногти, поэтому может рассматриваться как зооантропофильный вид, имеющий потенциальную социальную угрозу.

Данные о встречаемости на территории РФ видов *N. fulva*, *N. persicolor*, *T. benhamiae* и *M. ferrugineum* в доступной литературе не найдены.

Основная проблема изучения этиологии дерматофитозов – использование в качестве основного и, часто, единственного метода диагностики дерматофитозов прямой микроскопии, эффективность которой низкая и зависит от многих

факторов, в том числе профессионализма врача-лаборанта. Но даже положительные результаты этого метода не позволяют определить вид возбудителя. В случаях, когда используется классический микологический посев, определение вида происходит только по морфологии культуры, что в свою очередь также может быть ошибочно. К сожалению, секвенирование в рутинной практике практически не используется.

При изучении распространенности дерматофитозов, были проанализированы данные из ветеринарных лабораторий.

Из 3984 образцов клинического материала с помощью различных методов диагностики удалось выявить 329 положительных по дерматофитозам, что составило 8,3%. При этом, с помощью прямой микроскопии выявлено 7,38% положительных, с помощью классического посева на среду Сабуро – 6,5%, с помощью посева на DTM – 27,7%.

Представленные данные свидетельствуют о том, что наиболее часто для исключения дерматофитозов с больными животными владельцы обращаются осенью, реже зимой и летом. Это в первую очередь связано с окончанием отпускного «дачного» сезона, на время которого животных вывозят из города в сельскую местность, что повышает потенциальную опасность заражения при контакте с другими животными и почвой.

Также в осенний период зафиксировано наибольшее количество больных животных – 114 (34,7%). Меньше случаев заболевания отмечено летом – 97 (29,5%). Зимой и весной заболевание диагностировано почти в два раза реже – всего 61 (18,5%) и 57 (17,3%) положительных случаев, соответственно. Причиной увеличения заболеваемости в этот период могут служить погодные условия, поскольку теплая и влажная погода осенью и летом обеспечивает благоприятные условия для развития дерматофитов.

Проведенное исследование показывает, что чаще с различными заболеваниями кожи обращаются владельцы кошек, на долю которых приходится 2242 исследований, в то время как от собак исследовалось 1720 образцов. При этом заболеваемость находится примерно на одинаковом уровне – 176 (53,5%)

больных кошек и 152 (46,3) больных собаки.

Также можно сделать выводы о предпочитаемых методах диагностики, выбираемых ветеринарными врачами. Как видно из полученных данных, наибольшей популярностью среди врачей и владельцев пользуется прямая микроскопия шерсти, доля которой составляет 76,9% (3065 из 3984) от всех исследований. Причина популярности метода заключается в его скорости и доступности. В исследовании из 3065 образцов, проверенных с помощью прямой микроскопии, было обнаружено 225 (7,3%). Большое количество отрицательных тестов может объясняться тем, что практикующие врачи часто используют это исследование для исключения дерматофитозов в сомнительных случаях. Однако, по мнению зарубежных авторов, эффективность метода может быть как очень низкой – всего, 12% [52], так и достигать 80% [61]. Для повышения эффективности этого метода диагностики требуется подготовка специалистов, способных точно определять фрагменты мицелия, гиф и артростор в препарате, что бывает сложно сделать из-за присутствия в пробах большого количества артефактов. Несмотря на очевидные недостатки, на практике этот вид исследования может быть очень полезен при условии его грамотного применения, сокращая время, необходимое для начала лечения.

Вторым по популярности методом диагностики дерматофитозов является микологический посев на среду Сабуро. При исследовании этим методом 712 животных положительные результаты получены в 46 случаях (6,4%). По сравнению с прямой микроскопией, посевы делают значительно реже. Вероятнее всего, врачам и владельцам требуется быстрый результат, подтверждающий наличие дерматофитов в шерсти больного животного. Несмотря на его высокую эффективность, которая позволяет обнаружить возбудителя дерматофита и определить его родовую и видовую принадлежность, существуют факторы, влияющие на результат. Успешность зависит от способа отбора материала, условий транспортировки, квалификации сотрудников лаборатории, которые проводят исследование и дальнейшую его диагностику. Проведение микологического посева возможно только в специализированных лабораториях,

данное исследование нельзя провести в условиях ветеринарной клиники, что снижает уровень диагностирования дерматофитозов. Тем не менее, данный метод является наиболее достоверным и информативным.

Третий способ, который используют для диагностики дерматофитозов животных-компаньонов, посев на среду DTM. Такой метод только набирает популярность, однако стоит отметить, что из трех использованных методов, путем посева на DTM было подтверждено наибольшее количество дерматофитозов – из 209 посевов положительными оказались 58 (27,7%). Это позволяет утверждать, что диагностическая эффективность использования среды DTM среды выше, чем обычного посева. Данный вид среды отличается селективными свойствами, подавляя рост контаминирующей сопутствующей микрофлоры, что обеспечивает простую и наглядную детекцию роста дерматофита. Среда Сабуро не обладает такими свойствами и может прорасти быстрорастущими плесневыми грибами и некоторыми бактериями, подавляющими рост дерматофитов, что ведет к ложноотрицательному результату исследования [31].

В нашем исследовании наилучшую диагностическую эффективность в исследовании показали два метода: посев на среду «ДТМ-Эксперт» и люминесцентная микроскопия шерсти с использованием калькофлюора белого. Эффективность первого метода составила 100%, второго - 93.8% соответственно, что согласуется с другими подобными исследованиями [65, 116, 142, 147].

Однако, несмотря на их высокую эффективность, они имеют и отрицательные стороны: на среде «ДТМ-Эксперт» иногда могут возникать ложноположительные изменения цвета. В данном случае следует принимать во внимание 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 суток после посева.

Очевидно, что микологические посевы уступают по скорости диагностики

экспресс-методам, наиболее эффективным из которых является прямая микроскопия 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, что может ввести в заблуждение. На 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, правильно подтвердив диагноз лишь в половине проведенных исследований. Метод также имеет низкую чувствительность, обнаружение единичных спор или гиф сильно затруднительно. Такие же результаты показывают другие аналогичные исследования [52, 115, 158].

Схожие 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 шерсти, обработанной раствором КОН, и тест с лампой Вуда следует использовать как вспомогательные методы при отборе наиболее подходящих образцов для посева.

Учитывая особенности и недостатки каждого из методов, для диагностики дерматофитозов оптимальным вариантом представляется посев на среды ДТМ, поскольку она является наиболее эффективным и доступным методом, не требующим серьезной подготовки персонала и дорогостоящего оборудования. Метод прост в применении и интерпретации результатов.

При разработке экспериментальной среды «ДТМ-Эксперт» в первую очередь было решено изучить ростовые свойства различных пептонов и углеводов.

При подборе пептонов ключевыми показателями эффективности служили скорость роста и образование воздушного мицелия, поскольку активное образование мицелия свидетельствует о происходящем метаболизме, иными словами, чем объемнее культура, тем быстрее проходят обменные процессы за счет потребления питательных веществ. Этот процесс играет важную роль в индикации среды – чем быстрее происходит защелачивание, тем быстрее изменится цвет среды. Кроме того, в воздушном мицелии образуются характерные микроскопические плодовые тела, по которым можно отнести дерматофит к определенному виду. В ходе исследования было установлено, что оптимальным по указанным параметрам является мясной пептон немецкого производителя. Он хорошо влиял на образование воздушного мицелия, а скорость роста была сравнима с ростом на других видах пептонов.

При изучении влияния углеводов на рост дерматофитов, оценку проводили по тем же показателям. Из 14 видов удалось выделить два углевода: маннит и манноза, показавшие на практике наилучший результат в скорости роста, при этом, на средах с добавлением этих углеводов хорошо формировался воздушный мицелий.

Кислотность питательных сред является одним из важных параметров, влияющих на рост дерматофитов. Оптимальной нижней границей pH является 5,0-5,5 [111]. В процессе роста дерматофиты сдвигают pH в щелочную сторону до уровня 8,0 - 9,0 [19]. В таком диапазоне для регистрации изменений pH можно использовать лишь ограниченное количество видов индикаторов. В классической рецептуре DTM Taplin et al. используется феноловый красный, изменение цвета возникает при сдвиге $\text{pH} > 6,8$, а первоначальное значение pH среды составляет 5,5. Группа ученых из Китая в качестве индикатора предложила использовать бромтимоловый синий, поскольку он имеет более ранний сдвиг цвета, возникающий при $\text{pH}=6,0$. По их утверждениям, бромтимоловый синий позволяет зафиксировать рост дерматофитов значительно раньше, чем при использовании фенолового красного [105].

Однако в нашем исследовании были продемонстрированы иные результаты

с использованием бромтимолового синего: при росте *M. canis* цвет среды изменился с желтого на голубой только на 5 сутки и стал насыщенным на 6, что значительно хуже по сравнению с классическим индикатором, и не согласуется с исследованием китайских ученых. Таким образом, в качестве индикатора было решено использовать феноловый красный.

Было установлено, что уровень $pH=5,5$ изменяет оттенок среды, делая его более насыщенным. В связи с этим было решено уменьшить значение pH до 4.7, что никак не сказалось на ростовые свойства, но фиксировать изменения цвета стало проще.

Также изучено влияния на индикацию грибов различных углеводов и многоатомных спиртов, из которых три вошли в состав экспериментальных вариантов ДТМ. Среда с маннитом показала хорошие индикаторные и ростовые свойства. Практически тот же результат получен на среде с глюкозой, но энергия роста колонии была немного ниже. Среда с маннозой показала худшие ростовые качества при сравнении этих вариантов между собой.

При подборе селективных добавок использовали контрольные штаммы бактерий, которые потенциально могли находиться на коже как здоровой, так и с выраженной патологией. Первоначальным этапом был подбор антибиотиков с помощью диско-диффузного метода, в результате чего были отобраны энрофлоксацин, ципрофлоксацин и стрептомицин как наиболее активные антибактериальные вещества. Дальнейшее изучение заключалось в подтитровке выбранных антибиотиков к 5 штаммам каждого из четырех видов микроорганизмов. В результате большинство бактерии оказывались высоко чувствительны к энрофлоксацину.

Для определения необходимой концентрации антибактериального препарата в среде ДТМ определяли минимальную ингибирующую концентрацию антибиотика для полевых изолятов бактерий, которые имели устойчивость или промежуточную чувствительность для энрофлоксацина. В результате была установлена концентрация 0,1 мг/мл (0,1 г/л), способная подавлять рост бактериальных контаминантов при посеве клинического материала.

Для замедления или предотвращения роста грибов-контаминантов в классической рецептуре используют циклогексимид. Он отличается селективным действием на большинство плесневых грибов, при этом не влияет на рост дерматофитов. Оптимальную концентрацию препарата в DTM установили с помощью определения минимальной ингибирующей концентрации раствора, которая составляла 0,5 мг/мл (0,5 г/л).

Для дополнительной стимуляции роста дерматофитов использовали различные компоненты – белковые, аминокислотные, витаминные, углеводные. Цистеин – основная аминокислота, которую ассимилируют дерматофиты. Она входит в состав кератина волос, поэтому, логично предположить, что добавление этого компонента в среду улучшит рост дерматофитов. Также, по литературным данным, комплекс витаминов группы В хорошо стимулируют рост дерматофитов. В качестве дополнительного источника органического азота использовали белково-пептидный комплекс, а как источник дополнительного углевода – комплекс моно- и полисахаридов.

По результатам исследования цистеин оказал ингибирующее действие, что можно объяснить переходом дерматофита от паразитической формы в сапротрофную. В связи с этим изменились и питательные потребности гриба. Хорошо повлиял на стимуляцию роста витаминный комплекс и комплекс углеводов. Белково-пептидный комплекс влияние на рост почти не оказывал, при этом его внесение вызывало изменение цвета среды без роста дерматофитов, поэтому дальнейшее использование этой добавки прекратили.

На индикаторные свойства среды хорошо повлияли дополнительные углеводы, вызвав отчетливое изменение цвета при росте дерматофитов на 2-3 сутки.

Апробацию среды с клиническим материалом проводили в два этапа: в первую очередь сравнивали ростовые свойства экспериментальной среды с импортной средой DTM «DermaKit» (Италия). В результате импортная среда показала немного лучшее выделение, по сравнению с «DTM-Эксперт», однако количество ложноположительных результатов на разрабатываемой среде было

меньше, что увеличивает ее диагностическую значимость.

На втором этапе «ДТМ-Эксперт» сравнивали со средой ДТМ «HiMedia» (Индия). На экспериментальной среде было выделено больше дерматофитов, видимое изменение цвета наступало раньше, а рост контаминирующих грибов и ложноположительные изменения цвета встречались практически в два раза реже. Таким образом, «ДТМ-Эксперт» по всем показателям превосходит импортный вариант среды фирмы «HiMedia».

Нами проведена экспериментальная работа, позволившая предложить российскую среду «ДТМ-Эксперт» для экспресс-диагностики дерматофитозов животных. Формуляция среды была значительно переработана по сравнению с классической прописью Taplin et al. Введены углеводные питательные компоненты, выбрана оптимальная разновидность пептона, что позволило улучшить ростовые и индикаторные свойства среды. Среда обладает хорошими селективными свойствами, эффективно ингибируя рост бактерий и плесневых грибов, что способствует росту патогенных дерматофитов.

Диагностическая апробация показала, что разработанная среда «ДТМ-Эксперт» по показателю выделения грибов-дерматофитов не уступает зарубежной среде аналогичного назначения, а количество ложноположительных результатов при росте плесневых грибов значительно меньше, что выгодно отличает её от зарубежных аналогов.

Фасовка отечественной среды во флаконы с широким горлом делает возможным проведение посевов по методу МакКензи, что очень удобно в практических условиях – вся процедура отбора и посева клинического материала занимает 1-2 минуты. Это расширяет охват и повышает эффективность диагностики дерматофитозов животных, что улучшит эпизоотологическую и эпидемиологическую ситуацию по данному инфекционному заболеванию.

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных исследований были сделаны следующие выводы:

1. Исследование клинического материала от 3984 животных-компаньонов, содержащихся в г. Москва и Московской области, позволило выявить заболевание дерматофитозами у 329 животных, что составляет 8,3% от общего количества обследованных. При этом подтверждено широкое распространение бессимптомного миконительства, выявленное у 56,8 % животных, преимущественно кошек.

2. Использование современных филогенетических методов для идентификации культур грибов-дерматофитов, имеющих этиологическое значение в заболевании животных-компаньонов, позволило идентифицировать семь видов возбудителей: *M. canis*, *T. mentagrophytes*, *N. gypsea*, *T. benhamiae*, *M. ferrugineum*, *N. persicolor*, *N. fulva*, из которых *M. canis* имеет преобладающее значение и выявляется в 91,7% случаев.

3. Впервые на территории России выделены, идентифицированы и описаны «экзотические» виды грибов-дерматофитов, таких как *T. benhamiae*, *M. ferrugineum*, *N. persicolor*, *N. fulva*, упоминание которых ранее встречалось лишь в статьях зарубежных исследователей. Вероятно, названные виды грибов завезены на нашу территорию из стран Европы, где распространены достаточно широко.

4. Анализ используемых в ветеринарных лабораториях методов диагностики дерматофитозов, таких как прямая микроскопия и микологический посев на среду Сабуро, показал их низкую эффективность в сравнении с посевами клинического материала на среду DTM: прямая микроскопия позволяет выявить 7,4% больных, посевы на среду Сабуро - 6,5%, среда DTM – 27,7%.

5. Разработана и внедрена в практику диагностическая питательная среда «DTM-Эксперт», обеспечивающая точное и быстрое выявление в исследуемом материале спор возбудителей грибов-дерматофитов, не уступающая по ростовым, индикаторным и селективным свойствам импортным аналогам.

6. Клиническими исследованиями разработанной диагностической питательной среды подтверждена не только высокая эффективность при

выявлении заболевания и бессимптомного миконительства грибов-дерматофитов, но и удобство использования диагностической среды, поскольку первичная упаковка позволяет без проблем осуществлять посев по методу Маккензи непосредственно в месте взятия пробы от животного в условиях ветеринарных клиник, питомников и приютов, в отличие от аналогичных сред импортного производства.

7. Использование раствора калькофлюора белого при прямой микроскопии обеспечивает высокую чувствительность метода и позволяет повысить выявляемость грибов до 94%, что выше в 1,7 раза в сравнении с микроскопией без красителей, что делает возможным рекомендовать его для экспресс-диагностики дерматофитозов.

8. В ходе исследования были выделены, изучены и депонированы контрольные штаммы грибов-дерматофитов *Microsporum canis* «FL 79-18 Viev» и *Trichophyton mentagrophytes* «CN 38-18 Viev», используемые в качестве тест-культур при контроле ростовых и индикаторных свойств среды «ДТМ-Эксперт». На названные штаммы получен патент «Штаммы мицелиальных грибов *Microsporum canis* и *Trichophyton mentagrophytes*, предназначенные для контроля ростовых свойств питательных сред».

7. ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Разработана, апробирована и внедрена в диагностическую практику дифференциально-диагностическая хромогенная питательная среда для диагностики возбудителей дерматофитозов животных «ДТМ-Эксперт».

Хромогенная питательная среда «ДТМ-Эксперт» позволяет выявить культуры грибов-дерматофитов у животных на 8-10 сутки исследования, при этом практически полностью исключается риск постановки ложноположительного диагноза.

Разработана технология изготовления питательной среды «ДТМ-Эксперт», имеющая патентную охрану.

Разработаны инструкция по ветеринарному применению дифференциально-диагностической питательной среды для диагностики возбудителей дерматофитозов животных «ДТМ-Эксперт» и СТО 00496165-0001-2021 «Дифференциально-диагностическая хромогенная питательная среда для диагностики возбудителей дерматофитозов животных «ДТМ-Эксперт».

Получена декларация о соответствии выпускаемых серий диагностической среды требованиям СТО 00496165-0001-2021, регистрационный номер – РОСС RU Д-RU.PA01.B.79702/21

Разработаны, утверждены и опубликованы методические указания «Диагностика дерматофитозов животных» (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, Москва, 2021 г.).

Выделенные в ходе исследования штаммы *Microsporum canis* «FL 79-18 Viev» и *Trichophyton mentagrophytes* «CN 38-18 Viev» депонированы и запатентованы в качестве референтных для контроля ростовых и индикаторных свойств питательной среды «ДТМ-Эксперт».

Этиологически значимые виды дерматофитов *T. benhamiae*, *M. ferrugineum*, *N. persicolor*, *N. fulva*, выделенные от животных впервые в России, были изучены, депонированы и могут использоваться при диагностике в качестве референтных штаммов или при создании иммунобиологических препаратов для специфической профилактики.

8. РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

- рекомендовать при проведении диагностических исследований в условиях ветеринарных клиник, питомников и приютов для животных использовать диагностические среды ДТМ-типа, обеспечивающие высокую эффективность и специфичность;

- использовать при проведении диагностических исследований разработанные и утвержденные в установленном порядке методические указания «Диагностика дерматофитозов животных» (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, Москва, 2021 г.);

- для подтверждения видовой принадлежности грибов-дерматофитозов рекомендовать практикующим ветеринарным врачам-лаборантам использовать помимо классических методов диагностики, секвенирование чистых культур грибов-дерматофитов, что позволит точно установить этиологию заболевания, правильно подобрать лекарственные химиотерапевтические препараты и средства специфической профилактики;

- рекомендовать в качестве основного метода диагностики дерматофитозов использовать микологический посев, позволяющий выделить чистую культуру возбудителя и определить его видовую принадлежность. Другие методы диагностики, такие как прямая микроскопия и люминесцентное исследование, следует считать лишь вспомогательными тестами;

- при проведении в условиях ветеринарной лаборатории диагностических исследований методом прямой микроскопии шерсти, рекомендовать использование раствора флюорохромного красителя для обработки препарата.

9. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алешкевич, В.Н. Стимуляция роста и размножения дерматофитов / В.Н. Алешкевич, А.П. Медведев, Д.Б. Кулешов // Ветеринарный журнал Беларуси. – 2018. – №1. – С. 25–27.
2. Андреев, В.А. Медицинская микология. / В.А. Андреев, В.Б. Сбойчаков, А.В. Зачиняева, А.В. Москалев // М.: Издательство «ГЭОТАР-Медиа» – 2008. – С. 208.
3. Антонова, С.Б. Заболеваемость микроспорией: эпидемиологические аспекты, современные особенности течения / С.Б. Антонова, М.А. Уфимцева // Педиатрия. Журнал им. ГН Сперанского. – 2016. – Т. 95. – №. 2. – С. 142-146
4. Банников, С. А. Диагностическая ценность методов выявления грибов при неинвазивном микозе околоносовых пазух / С.А. Банников, Н.В. Бойко, В.Г. Миронов // Российская ринология. – 2019. – Т. 27. – №. 1. – С. 5-8.
5. Горбатов, А.В. Дерматофитозы мелких домашних животных // дис. ... канд. вет. наук / А.В. Горбатов. Москва. – 1984. – С. 145.
6. Игнатьева, С.М. Микологические и иммунологические методы исследования бронхо-альвеолярной жидкости онкогематологических больных с инвазивным аспергиллезом легких / С.М. Игнатьева, Т.С. Богомоллова, В.А. Спиридонова, Ю.В. Михайлова, М.В. Руднева, Г.А. Чилина // Успехи медицинской микологии. – 2015. – Т. 14. – С. 126-127.
7. Кухар, Е.В. Экология микроскопических грибов, патогенов животных и человека / Е.В. Кухар // Эколого-географические проблемы развития регионов и городов Республики Казахстан. – 2017. – С. 119-130.
8. Максимова, П.Е. Гистология микозов кожи, обусловленных дерматофитами / П.Е. Максимова, Е.И. Купша //Международный студенческий научный вестник. – 2018. – №. 6. – С. 21-21.
9. Маноян, М.Г. Ветеринарная и медицинская значимость зооантропофильных видов дерматофитов / М.Г. Маноян, А.Н. Панин, Р.С. Овчинников // Успехи медицинской микологии: Материалы 4-го Всерос. конгр. по мед. микологии. – 2006. – Т. 8. – С. 182.
10. Никитушкина, Н.А. Клинико-эпизоотологические и этиологические особенности дерматомикозов у собак и кошек, совершенствование схем их лечения // дис. ... канд. вет. наук / Н.А. Никитушкина. Новосибирск. - 2008. – С. 124.
11. Никитушкина, Н.А. Этиология, клиническое проявление и стратегия лечения дерматомикозов мелких домашних животных / Н.А. Никитушкина, Л.Н. Гордиенко // Патология продуктивных и непродуктивных животных, рыб и птиц. – 2009. – С. 207-213.
12. Овчинников, Р.С. Микологический скрининг домашних животных - важный способ профилактики дерматофитозов человека / Р.С. Овчинников, П.П. Ершов, А.В. Капустин, В.А. Савинов, А.Г. Гайнуллина // Успехи медицинской микологии. – 2019. – Т. 20. – С. 712-716.

13. Овчинников, Р.С. Современные аспекты диагностики дерматофитозов мелких домашних животных / В.А. Савинов, А.В. Капустин // Успехи медицинской микологии. – 2019. – Т. 20. – С. 721-726.
14. Панин, А.Н. Этиологическая структура зооантропонозных микозов / А.Н. Панин, М.Г. Маноян, Р.С. Овчинников // Успехи медицинской микологии. – 2003. – Т. 2. – С. 120-120.
15. Родионов, А.Н. Грибковые заболевания кожи - Руководство для врачей. / А.Н. Родионов // СПб.: Издательство «Питер» - 2000. - С. 288.
16. Рублевская, И.В. Новый метод диагностики дерматофитов – иммунохроматографический анализ. Сравнительная оценка эффективности и достоверности ИХА метода в диагностики дерматофитов в ветеринарной медицине мелких домашних животных / И.В. Рублевская // VetPharma. – 2020. – №. 1.
17. Руппель, В.В. Дерматофития. Как диагностировать и лечить в условиях ветеринарной клиники / В.В. Руппель // Ветеринарный Петербург. – 2018. – №. 2. – С. 9-14.
18. Савинов, В.А. Новые виды возбудителей в этиологии дерматофитозов животных-компаньонов в Московском регионе / В.А. Савинов, Р.С. Овчинников, А.Г. Южаков, А.В. Хабарова, А.Г. Гайнуллина // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2021. – №. 9. – С. 15-25.
19. Савинов, В.А. Оптимизация углеводного состава среды ДТМ для стимуляции роста дерматофитов / В.А. Савинов, Р.С. Овчинников, А.В. Капустин, П.Н. Шастин // Успехи медицинской микологии. – 2020. – Т. 21. – С. 60-64.
20. Савинов, В.А. Распространенность дерматофитозов у мелких домашних животных / В.А. Савинов // Успехи медицинской микологии. – 2018. – Т. 19. – С. 373-375.
21. Савинов, В.А. Экспресс-диагностика дерматофитозов животных / В.А. Савинов, Р.С. Овчинников, А.В. Капустин, А.Г. Гайнуллина // Аграрная наука. – 2019. – №. 10. – С. 20-24.
22. Столбова, О.А. Болезни кожи у собак и кошек в Тюменской области / О.А. Столбова, Л.Н. Скосырских, Ю.А. Ткачева // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – №. 4. – С. 516-516.
23. Устинцева, Ю.Ю. Дерматофитозы мелких домашних животных Якутии // дис. ... канд. вет. наук / Ю.Ю. Устинцева. Якутск. – 2011. – С. 144.
24. Халдеева, Е.В. Микобиота кожных покровов и шерсти домашних животных как потенциальный источник возбудителей дерматомикозов / Е.В. Халдеева, С.А. Лисовская, Н.И. Глушко // Проблемы медицинской микологии. – 2019. – Т. 21. – №. 4. – С. 54-56.
25. Abarca, M.L. Trichophyton erinacei in pet hedgehogs in Spain: occurrence and revision of its taxonomic status / M.L. Abarca, G. Castellá, J. Martorell, F.J. Cabañes // Medical mycology. – 2017. – Т. 55. – №. 2. – С. 164-172.

26. Abdelrahman, T. Dermatophytosis: comparison of the performance of calcofluor and potassium hydroxide 30% for the direct examination of skin scrapings and nails / T. Abdelrahman, V.L. Bru, J. Waller, G. Noacco, E. Candolfi // *Journal de mycologie médicale*. – 2006. – T. 16. – №. 2. – C. 87-91.
27. Abramo, F. Two cases of dermatophytic pseudomycetoma in the dog: an immunohistochemical study / F. Abramo, A. Vercelli, F. Mancianti // *Veterinary dermatology*. – 2001. – T. 12. – №. 4. – C. 203-207.
28. Alexander, C.L. Introduction of a dermatophyte polymerase chain reaction assay to the diagnostic mycology service in Scotland / C.L. Alexander, G.S. Shankland, W. Carman, C. Williams // *British Journal of Dermatology*. – 2011. – T. 164. – №. 5. – C. 966-972.
29. Aljabre, S.H.M. Germination of *Trichophyton mentagrophytes* on human stratum corneum in vitro / S.H.M. Aljabre, M.D. Richardson, E.M. Scott, G.S. Shankland // *Journal of medical and veterinary mycology*. – 1992. – T. 30. – №. 2. – C. 145-152.
30. Alpun, G. Mycological examination of *Microsporum canis* infection in suspected dermatophytosis of owned and ownerless cats and its asymptomatic carriage / G. Alpun, N.Y. Ozgur // *Journal of animal and veterinary advances*. – 2009. – T. 8. – №. 4. – C. 803-806.
31. Ates, A. Dermatophytes isolated from asymptomatic dogs in Adana, Turkey: a preliminary study / A. Ates, M.E.H.M.E.T. Ilkit, R. Ozdemir, K. Ozcan // *Journal de mycologie médicale*. – 2008. – T. 18. – №. 3. – C. 154-157.
32. Baert, F. Updating the taxonomy of dermatophytes of the BCCM/IHEM collection according to the new standard: a phylogenetic approach / F. Baert, D. Stubbe, E. D'hooge, A. Packeu, M. Hendrickx // *Mycopathologia*. – 2020. – T. 185. – №. 1. – C. 161-168.
33. Bagyalakshmi, R. Application of polymerase chain reaction (PCR) and PCR based restriction fragment length polymorphism for detection and identification of dermatophytes from dermatological specimens / R. Bagyalakshmi, B. Senthilvelan, K.L. Therese, S. Murugusundram, H.N. Madhavan // *Indian journal of dermatology*. – 2008. – T. 53. – №. 1. – C. 15.
34. Baldo, A. Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes / A. Baldo, M. Monod, A. Mathy, L. Cambier, E.T. Bagut, V. Defaweux, B. Mignon // *Mycoses*. – 2012. – T. 55. – №. 3. – C. 218-223.
35. Bartosch, T. *Trichophyton benhamiae* and *T. mentagrophytes* target guinea pigs in a mixed small animal stock / T. Bartosch, A. Frank, C. Günther, S. Uhrlaß, T. Heydel, P. Nenoff, W. Schrödl // *Medical mycology case reports*. – 2019. – T. 23. – C. 37-42.
36. Bassiri-Jahromi, S. Epidemiological trends in zoophilic and geophilic fungi in Iran / S. Bassiri-Jahromi // *Clinical and Experimental Dermatology: Clinical dermatology*. – 2013. – T. 38. – №. 1. – C. 13-19.

37. Beifuss, B. Direct detection of five common dermatophyte species in clinical samples using a rapid and sensitive 24-h PCR–ELISA technique open to protocol transfer / B. Beifuss, G. Bezold, P. Gottlöber, C. Borelli, J. Wagener, M. Schaller, H.C. Korting // *Mycoses*. – 2011. – T. 54. – №. 2. – C. 137-145.
38. Beraldo, R.M. Dermatophytes in household cats and dogs / R.M. Beraldo, A.K. Gasparoto, A.M. de Siqueira, A.L.T. Dias // *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*. – 2011. – T. 18. – №. 2-3. – C. 15-18.
39. Bergman, A. Fast and specific dermatophyte detection by automated DNA extraction and real-time PCR / A. Bergman, D. Heimer, N. Kondori, H. Enroth // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2013. – T. 19. – №. 4. – C. E205-E211.
40. Bergman, R.L. Dermatophyte granulomas caused by *Trichophyton mentagrophytes* in a dog / R.L. Bergman, L. Medleau, K. Hnilica, E. Howerth // *Veterinary dermatology*. – 2002. – T. 13. – №. 1. – C. 51-54.
41. Bergmans, A.M.C. Evaluation of a single-tube real-time PCR for detection and identification of 11 dermatophyte species in clinical material / A.M.C. Bergmans, M. Van der Ent, A. Klaassen, N. Böhm, G.I. Andriesse, R.G.F. Winternans // *Clinical microbiology and infection*. – 2010. – T. 16. – №. 6. – C. 704-710.
42. Bergmans, A.M.C. Validation of PCR–reverse line blot, a method for rapid detection and identification of nine dermatophyte species in nail, skin and hair samples / A.M.C. Bergmans, L.M. Schouls, M. Van Der Ent, A. Klaassen, N. Böhm, R.G.F. Winternans // *Clinical microbiology and infection*. – 2008. – T. 14. – №. 8. – C. 778-788.
43. Bernardo, F. Dermatophytes isolated from pet, dogs and cats, in Lisbon, Portugal (2000-2004) / F. Bernardo, A. Lança, M.M. Guerra, H. Marina Martins // *Rev Port Cienc Vet*. – 2005. – T. 100. – C. 85-87.
44. Black, S.S. Intra-abdominal dermatophytic pseudomycetoma in a Persian cat / S.S. Black, T. Abemethy, J.W. Tyler, M.W. Thomas, A. Garma-Aviña, H.E. Jensen // *Journal of veterinary internal medicine*. – 2001. – T. 15. – №. 3. – C. 245-248.
45. Bond, R. Chronic dermatophytosis due to *Microsporum persicolor* infection in three dogs / R. Bond, D.J. Middleton, D.H. Scarff, A.I. Lamport // *Journal of Small Animal Practice*. – 1992. – T. 33. – №. 12. – C. 571-576.
46. Bond, R. Pseudomycetoma caused by *Microsporum canis* in a Persian cat: lack of response to oral terbinafine / R. Bond, A.M. Pocknell, C.E. Toze // *Journal of Small Animal Practice*. – 2001. – T. 42. – №. 11. – C. 557-560.

47. Boyanowski, K.J. Isolation of fungal flora from the hair coats of shelter cats in the Pacific coastal USA / K.J. Boyanowski, P.J. Ihrke, K.A. Moriello, P.H. Kass // *Veterinary Dermatology*. – 2000. – T. 11. – №. 2. – C. 143-150.
48. Brilhante, R.S.N. High rate of *Microsporum canis* feline and canine dermatophytoses in Northeast Brazil: epidemiological and diagnostic features / R.S.N. Brilhante, C.S.P. Cavalcante, F. A. Soares-Junior, R.A. Cordeiro, J.J.C. Sidrim, M.F.G. Rocha // *Mycopathologia*. – 2003. – T. 156. – №. 4. – C. 303-308.
49. Brillowska-Dabrowska, A. Five-hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of *Trichophyton rubrum* / A. Brillowska-Dabrowska, D.M. Saunte, M.C. Arendrup // *Journal of clinical microbiology*. – 2007. – T. 45. – №. 4. – C. 1200-1204.
50. Cabanes, F.J. Dermatophytes isolated from domestic animals in Barcelona, Spain / F.J. Cabanes, M.L. Abarca, M.R. Bragulat // *Mycopathologia*. – 1997. – T. 137. – №. 2. – C. 107-113.
51. Cabanes, F.J. Survey of cat and dog dermatophytosis in Europe. / F.J. Cabañes, M.G. Gallo, F. Mancianti, M. Tampieri, L. Pinter, B. Mignon, M. Cutuli // *The ECMM working group report*. – 2003. – C. 22.
52. Cafarchia, C. An improved molecular diagnostic assay for canine and feline dermatophytosis / C. Cafarchia, R.B. Gasser, L.A. Figueredo, S. Weigl, P. Danesi, G. Capelli, D. Otranto // *Medical Mycology*. – 2013. – T. 51. – №. 2. – C. 136-143.
53. Cafarchia, C. Isolation of *Microsporum canis* from the hair coat of pet dogs and cats belonging to owners diagnosed with *M. canis* tinea corporis / C. Cafarchia, D. Romito, G. Capelli, J. Guillot, D. Otranto // *Veterinary dermatology*. – 2006. – T. 17. – №. 5. – C. 327-331.
54. Cafarchia, C. The epidemiology of canine and feline dermatophytoses in southern Italy / C. Cafarchia, D. Romito, M. Sasanelli, R. Lia, G. Capelli, D. Otranto // *Mycoses*. – 2004. – T. 47. – №. 11-12. – C. 508-513.
55. Caicedo, L.D. Dermatofitos en perros de Cali, Colombia / L.D. Caicedo, D. Luz // *Biomédica*. – 2001. – T. 21. – №. 2. – C. 128-133.
56. Carlotti, D.N. Dermatophytosis due to *Microsporum persicolor* (13 cases) or *Microsporum gypsum* (20 cases) in dogs / D.N. Carlotti, E.J.V.D. Bensignor // *Veterinary Dermatology (United Kingdom)*. – 1999. – C. 11-17.
57. Carroll, H.F. Evaluation of dermatophyte test medium for diagnosis of dermatophytosis / H.F. Carroll // *Journal of the American Veterinary Medical Association*. – 1974. – T. 165. – №. 2. – C. 192-195.
58. Chang, S.C. Dermatophytic pseudomycetomas in four cats / S.C. Chang, J.W. Liao, C.L. Shyu, W. Hsu, M.L. Wong // *Veterinary dermatology*. – 2011. – T. 22. – №. 2. – C. 181-187.

59. Chermette, R. Dermatophytoses in animals / R. Chermette, L. Ferreira, J. Guillot // *Mycopathologia*. – 2008. – T. 166. – №. 5-6. – C. 385-405.
60. Chmel, L. Zoophilic dermatophytes and infections in man / L. Chmel // *Med. Mycol.* – 1980. – T. 8. – C. 61-66.
61. Colombo, S. Comparison of two sampling methods for microscopic examination of hair shafts in feline and canine dermatophytosis / S. Colombo, L. Cornegliani, M. Beccati, F. Albanese // *Veterinaria (Cremona)*. – 2010. – T. 24. – №. 3. – C. 27-33.
62. Colombo, S. Dermatophytosis and papular eosinophilic/mastocytic dermatitis (urticaria pigmentosa-like dermatitis) in three Devon Rex cats / S. Colombo, F. Scarpella, L. Ordeix, P. Roccabianca // *Journal of feline medicine and surgery*. – 2012. – T. 14. – №. 7. – C. 498-502.
63. Copetti, M.V. Dermatophytes isolated from dogs and cats suspected of dermatophytosis in Southern Brazil / M.V. Copetti, J.M. Santurio, A.S. Cavalheiro, A.A. Boeck, J.S. Argenta, L.C. Aguiar, S.H. Alves // *Acta Scientiae Veterinariae*. – 2006. – T. 34. – №. 2. – C. 119-124.
64. Cornegliani, L. Canine nodular dermatophytosis (kerion): 23 cases / L. Cornegliani, P. Persico, S. Colombo // *Veterinary dermatology*. – 2009. – T. 20. – №. 3. – C. 185-190.
65. Crozier, W.J. Dermatophyte Test Medium—An Evaluation of DTM for Diagnosis of Dermatophytosis / W.J. Crozier // *Australasian Journal of Dermatology*. – 1977. – T. 18. – №. 1. – C. 39-41.
66. Dahdah, M.J. Dermatophytes / M.J. Dahdah, R.K. Scher // *Current Fungal Infection Reports*. – 2008. – T. 2. – №. 2. – C. 81.
67. Davidson, A.M. Kitten carriers of *Microsporon felineum* and their detection by the fluorescence Test / A.M. Davidson, P.H. Gregory // *Canadian Medical Association Journal*. – 1933. – T. 29. – №. 3. – C. 242.
68. de Hoog, G.S. Atlas of Clinical Fungi 2nd edition / G.S. de Hoog, J. Guarro, J. Gené, M.J. Figueras // *Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)*. – 2000. – C. 159.
69. de Hoog, G.S. Atlas of Clinical Fungi, 4th edition / G.S. de Hoog, J. Guarro, J. Gené, S. Ahmed, A.M.S. Al-Hatmi, M.J. Figueras, R.G. Vitale // *Hilversum*. – 2020. – C. 1610.
70. de Hoog, G.S. Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes / G.S. de Hoog, K. Dukik, M. Monod, A. Packeu, D. Stubbe, M. Hendrickx, Y. Gräser // *Mycopathologia*. – 2017. – T. 182. – №. 1-2. – C. 5-31.
71. Debnath, C. Detection of dermatophytes in healthy companion dogs and cats in eastern India / C. Debnath, T. Mitra, A. Kumar, I. Samanta // *Iranian journal of veterinary research*. – 2016. – T. 17. – №. 1. – C. 20.

72. DeTar, L.G. Descriptive epidemiology and test characteristics of cats diagnosed with *Microsporum canis* dermatophytosis in a Northwestern US animal shelter / L.G. DeTar, V. Dubrovsky, J.M. Scarlett // *Journal of feline medicine and surgery*. – 2019. – T. 21. – №. 12. – C. 1198-1205.
73. d'Ovidio, D. Survey of zoonotic dermatoses in client-owned exotic pet mammals in southern Italy / D. d'Ovidio, D. Santoro // *Zoonoses and public health*. – 2015. – T. 62. – №. 2. – C. 100-104.
74. Drouot, S. Pets as the main source of two zoonotic species of the *Trichophyton mentagrophytes* complex in Switzerland, *Arthroderma vanbreuseghemii* and *Arthroderma benhamiae* / S. Drouot, B. Mignon, M. Fratti, P. Roosje, M. Monod // *Veterinary dermatology*. – 2009. – T. 20. – №. 1. – C. 13-18.
75. Duarte, A. Survey of infectious and parasitic diseases in stray cats at the Lisbon Metropolitan Area, Portugal / A. Duarte, I. Castro, I.M.P. da Fonseca, V. Almeida, L.M.M. de Carvalho, J. Meireles, Y. Vaz // *Journal of feline medicine and surgery*. – 2010. – T. 12. – №. 6. – C. 441-446.
76. Dukik, K. Molecular and phenotypic characterization of *Nannizzia* (Arthrodermataceae) / K. Dukik, G.S. de Hoog, J.B. Stielow, J. Freeke, B.G. van den Ende, V.A. Vicente, S.A. Ahmed // *Mycopathologia*. – 2020. – T. 185. – №. 1. – C. 9-35.
77. Durán-Valle, M.T. Facial skin lesion in an eleven year old child / M.T. Durán-Valle, N. Sanz-Rodríguez, M. Almagro-Moltó, J.L. Gómez-Garcés // *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*. – 2013. – T. 31. – №. 4. – C. 266-267.
78. Ebihara, M. Molecular detection of dermatophytes and nondermatophytes in onychomycosis by nested polymerase chain reaction based on 28S ribosomal RNA gene sequences / M. Ebihara, K. Makimura, K. Sato, S. Abe, R. Tsuboi // *British Journal of Dermatology*. – 2009. – T. 161. – №. 5. – C. 1038-1044.
79. Emmons, C.W. Dermatophytes: natural grouping based on the form of the spores and accessory organs / C.W. Emmons // *Archives of Dermatology and Syphilology*. – 1934. – T. 30. – №. 3. – C. 337-362.
80. Feuilhade de Chauvin, M. New diagnostic techniques / M. Feuilhade de Chauvin // *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. – 2005. – T. 19. – C. 20-24.
81. Gordon, E. Descriptive epidemiology of companion animal dermatophytosis in a Canadian Pacific Northwest animal shelter system / E. Gordon, A. Idle, L. DeTar // *The Canadian Veterinary Journal*. – 2020. – T. 61. – №. 7. – C. 763.
82. Gromadzki, S. Evaluation of new medium for identification of dermatophytes and primary dimorphic pathogens / S. Gromadzki, R. Ramani, V. Chaturvedi // *Journal of clinical microbiology*. – 2003. – T. 41. – №. 1. – C. 467-468.
83. Gruby, D. Mémoire sur une végétation qui constitue la vraie teigne / D. Gruby // *CR Acad Sci*. – 1841. – T. 13. – C. 72-75.

84. Guarner, J. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century / J. Guarner, M.E. Brandt // *Clinical microbiology reviews*. – 2011. – T. 24. – №. 2. – C. 247-280.
85. Guillot, J. Evaluation of the dermatophyte test medium RapidVet-D / J. Guillot, L. Latie, M. Deville, L. Halos, R. Chermette // *Veterinary dermatology*. – 2001. – T. 12. – №. 3. – C. 123-127.
86. Hageage, G.J. Use of calcofluor white in clinical mycology / G.J. Hageage, B.J. Harrington // *Laboratory Medicine*. – 1984. – T. 15. – №. 2. – C. 109-112.
87. Haldane, D.J.M. A comparison of calcofluor white, potassium hydroxide, and culture for the laboratory diagnosis of superficial fungal infection / D.J. Haldane, E. Robart // *Diagnostic microbiology and infectious disease*. – 1990. – T. 13. – №. 4. – C. 337-339.
88. Havlickova, B. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide / B. Havlickova, V.A. Czaika, M. Friedrich // *Mycoses*. – 2008. – T. 51. – C. 2-15.
89. Hubka, V. Common and emerging dermatophytoses in animals: well-known and new threats / V. Hubka, A. Peano, A. Cmokova, J. Guillot // *Emerging and Epizootic Fungal Infections in Animals*. – Springer, Cham, 2018. – C. 31-79.
90. Iachini, R. Dermatofitosis: un estudio comparativo en gatos portadores sanos / R. Iachini, M. Madariaga // *Revista Argentina de Zoonosis*. – 2004. – T. 1. – C. 11-4.
91. Kadhim, S.K. In vitro, determination of optimal conditions of growth and proteolytic activity of clinical isolates of *Trichophyton rubrum* / S.K. Kadhim, J.K. Al-Janabi, A.H. Al-Hamadani // *Journal of Contemporary Medical Sciences*. – 2015. – T. 1. – №. 3. – C. 9-19.
92. Kano, R. Confirmed case of feline mycetoma due to *Microsporum canis* / R. Kano, K. Edamura, H. Yumikura, H. Maruyama, K. Asano, S. Tanaka, A. Hasegawa // *Mycoses*. – 2009. – T. 52. – №. 1. – C. 80-83.
93. Kano, R. Direct detection of dermatophytes in skin samples based on sequences of the chitin synthase 1 (CHS1) gene / R. Kano, A. Hirai, M. Muramatsu, T. Watari, A. Hasegawa // *Journal of veterinary medical science*. – 2003. – T. 65. – №. 2. – C. 267-270.
94. Kano, R. *Microsporum gypseum* isolated from a feline case of dermatophytosis / R. Kano, K. Yasuda, Y. Nakamura, A. Hasegawa // *Mycoses*. – 2001. – T. 44. – №. 7-8. – C. 338-341.
95. Kaplan, W. Recent developments in animal ringworm and their public health implications / W. Kaplan, L.K. Georg, L. Ajello // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1958. – T. 70. – №. 3.
96. Kaufmann, R. Comparison between point-of-care dermatophyte test medium and mycology laboratory culture for diagnosis of dermatophytosis in dogs and cats / R. Kaufmann, S.E. Blum, D. Elad, G. Zur // *Veterinary dermatology*. – 2016. – T. 27. – №. 4. – C. 284-e68.
97. Khosravi, A.R. Dermatophytes isolated from domestic animals in Iran / A.R. Khosravi, M. Mahmoudi // *Mycoses*. – 2003. – T. 46. – №. 5-6. – C. 222-225.

98. Kim, J.Y. Identification of dermatophytes using multiplex polymerase chain reaction / J.Y. Kim, Y. Choe, K.J. Ahn, Y.W. Lee // *Annals of dermatology*. – 2011. – T. 23. – №. 3. – C. 304-312.
99. Krzyściak, P. Rare zoonotic infection with *Microsporum persicolor* with literature review / P. Krzyściak, A.M. Al-Hatmi, S.A. Ahmed, A.B. Macura // *Mycoses*. – 2015. – T. 58. – №. 9. – C. 511-515.
100. Kupsch, C. Dermatophyten und Meerschweinchen / C. Kupsch, M. Berlin, Y. Gräser // *Der Hautarzt*. – 2017. – T. 68. – №. 10. – C. 827-830.
101. Lawry, M.A. Methods for diagnosing onychomycosis: a comparative study and review of the literature / M.A. Lawry, E. Haneke, K. Strobeck, S. Martin, B. Zimmer, P.S. Romano // *Archives of dermatology*. – 2000. – T. 136. – №. 9. – C. 1112-1116.
102. Lee, W.J. Decreasing prevalence of *Microsporum canis* infection in Korea: through analysis of 944 cases (1993–2009) and review of our previous data (1975–1992) / W.J. Lee, C.H. Song, S.J. Lee, D.W. Kim, J.B. Jun, Y.J. Bang // *Mycopathologia*. – 2012. – T. 173. – №. 4. – C. 235-239.
103. Lewis, D.T. Epidemiology and clinical features of dermatophytosis in dogs and cats at Louisiana State University: 1981–1990 / D.T. Lewis, C.S. Foil, G. Hosgood // *Veterinary Dermatology*. – 1991. – T. 2. – №. 2. – C. 53-58.
104. Li, H.C. Identification of dermatophytes by an oligonucleotide array / H.C. Li, J.P. Bouchara, M.M.L. Hsu, R. Barton, T. C. Chang // *Journal of clinical microbiology*. – 2007. – T. 45. – №. 10. – C. 3160-3166.
105. Li, X.F. A new medium for diagnosis of dermatophyte infection / X.F. Li, Y.N. Shen, W. Chen, H. Chen, L.V. Gui-Xia, W.D. Liu // *European Journal of Dermatology*. – 2009. – T. 19. – №. 1. – C. 34-37.
106. López, M.F. Frecuencia de dermatofitos en una muestra de felinos del área urbana del Gran Mendoza, Argentina / M.F. López, D. Grilli, S. Degarbo, G. Arenas, A. Telechea // *Revista Iberoamericana de Micología*. – 2012. – T. 29. – №. 4. – C. 238-240.
107. Makimura, K. Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions / K. Makimura, Y. Tamura, T. Mochizuki, A. Hasegawa, Y. Tajiri, R. Hanazawa, H. Yamaguchi // *Journal of clinical microbiology*. – 1999. – T. 37. – №. 4. – C. 920-924.
108. Mancianti, F. Dermatophytes isolated from symptomatic dogs and cats in Tuscany, Italy during a 15-year-period / F. Mancianti, S. Nardoni, S. Cecchi, M. Corazza, F. Taccini // *Mycopathologia*. – 2003. – T. 156. – №. 1. – C. 13-18.
109. Maraki, S. Epidemiology of Dermatophytoses in Crete, Greece a 5-year Survey / S. Maraki, V.E. Mavromanolaki // *Medical mycology journal*. – 2016. – T. 57. – №. 4. – C. E69-E75.

110. Marchisio, V.F. Dermatophytes from cases of skin disease in cats and dogs in Turin, Italy: Dermatophyten als Erreger von Hautkrankheiten bei Katzen und Hunden in Turin, Italien / V.F. Marchisio, M.G. Gallo, V. Tullio, S. Nepote, A. Piscozzi, C. Cassinelli // *Mycoses*. – 1995. – T. 38. – №. 5-6. – C. 239-244.
111. Martinez-Rossi, N.M. Role of pH in the pathogenesis of dermatophytoses / N.M. Martinez-Rossi, G.F. Persinoti, N.T. Peres, A. Rossi // *Mycoses*. – 2012. – T. 55. – №. 5. – C. 381-387.
112. Mattei, A.S. Dermatophytosis in small animals / A.S. Mattei, M.A. Beber, I.M. Madrid // *SOJ Microbiol Infect Dis*. – 2014. – T. 2. – №. 3. – C. 1-6.
113. Metin, B. Sexual reproduction in dermatophytes / B. Metin, J. Heitman // *Mycopathologia*. – 2017. – T. 182. – №. 1-2. – C. 45-55.
114. Mignon, B. Prevalence and characterization of *Microsporum canis* asymptomatic carriage in cats / B. Mignon, B. Losson // 2nd annual Meeting of the European Confederation of Medical Mycology (ECMM). – 1995.
115. Moriello, K.A. Diagnosis and treatment of dermatophytosis in dogs and cats. Clinical Consensus Guidelines of the World Association for Veterinary Dermatology / K.A. Moriello, K. Coyner, S. Paterson, B. Mignon // *Veterinary dermatology*. – 2017. – T. 28. – №. 3. – C. 266-e68.
116. Moriello, K.A. Fungal flora of the haircoat of cats with and without dermatophytosis / K.A. Moriello // *Journal of medical and veterinary mycology*. – 1991. – T. 29. – №. 5. – C. 285-292.
117. Moriello, K.A. Isolation of dermatophytes from the haircoats of stray cats from selected animal shelters in two different geographic regions in the United States / K.A. Moriello, G. Kunkle, D.J. Deboer // *Veterinary Dermatology*. – 1994. – T. 5. – №. 2. – C. 57-62.
118. Mozes, R. Dermatophyte surveillance in cats in three animal shelters in Ontario, Canada / R. Mozes, D.L. Pearl, J. Rousseau, L. Niel, J.S. Weese // *Journal of feline medicine and surgery*. – 2017. – T. 19. – №. 1. – C. 66-69.
119. Muller, A. Dermatophytosis due to *Microsporum persicolor*: a retrospective study of 16 cases / A. Muller, E. Guaguère, F. Degorce-Rubiales, G. Bourdoiseau // *The Canadian Veterinary Journal*. – 2011. – T. 52. – №. 4. – C. 385.
120. Nenoff, P. Trichophyton species of *Arthroderma benhamiae*—a new infectious agent in dermatology / P. Nenoff, S. Uhrlaß, C. Krüger, M. Erhard, U.C. Hippler, F. Seyfarth, Y. Gräser // *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. – 2014. – T. 12. – №. 7. – C. 571-581.
121. Nowicki, R. Dermatophytoses in the Gdansk area, Poland: a 12-year survey / R. Nowicki // *Mycoses*. – 1996. – T. 39. – №. 9-10. – C. 399-402.
122. Nweze, E.I. Dermatophytoses in domesticated animals / E.I. Nweze // *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. – 2011. – T. 53. – №. 2. – C. 94-99.

123. Ogawa, H. Dermatophytes and host defence in cutaneous mycoses / H. Ogawa, R.C. Summerbell, K.V. Clemons, T. Koga, Y.P. Ran, A. Rashid, R. Tsuboi // *Medical mycology*. – 1998. – T. 36. – C. 166-173.
124. Ovchinnikov, R.S. Epidemiological survey of ringworm outbreak in cat shelter / R.S. Ovchinnikov, V.A. Savinov, A.A. Gaynullina, A.V. Kapustin, A.I. Laishevtsev // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. – IOP Publishing, 2020. – T. 421. – №. 8. – C. 082026.
125. Padhye, A.A. *Microsporum persicolor* infection in the United States / A.A. Padhye, F. Blank, P.J. Koblenzer, S. Spatz, L. Ajello // *Archives of dermatology*. – 1973. – T. 108. – №. 4. – C. 561-562.
126. Panasiti, V. Comparison of diagnostic methods in the diagnosis of dermatomycoses and onychomycoses / V. Panasiti, R.G. Borroni, V. Devirgiliis, M. Rossi, L. Fabbri, R. Masciangelo, S. Calvieri // *Mycoses*. – 2006. – T. 49. – №. 1. – C. 26-29.
127. Patel, A. Survey of dermatophytes on clinically normal cats in the southeast of England / A. Patel, D.H. Lloyd, A.I. Lamport // *Journal of small animal practice*. – 2005. – T. 46. – №. 9. – C. 436-439.
128. Pihet, M. Reappraisal of conventional diagnosis for dermatophytes / M. Pihet, Y. Le Govic // *Mycopathologia*. – 2017. – T. 182. – №. 1-2. – C. 169-180.
129. Piri, F. Assessment of a pan-dermatophyte nested-PCR compared with conventional methods for direct detection and identification of dermatophytosis agents in animals / F. Piri, A. Zarei Mahmoudabadi, A. Ronagh, B. Ahmadi, K. Makimura, A. Rezaei-Matehkolaei // *Mycoses*. – 2018. – T. 61. – №. 11. – C. 837-844.
130. Ravisse, P. Les mycétomes du cuir chevelu et de la nuque. Etude histopathologique / P. Ravisse, A.A. Abouzkhani // *Médecine et Maladies Infectieuses*. – 1980. – T. 10. – №. 10. – C. 497-501.
131. Richard, J.L. Advances in veterinary mycology / J.L. Richard, M.C. Debey, R. Chermette, A.C. Pier, A. Hasegawa, A. Lund, M.D. Connole // *Journal of medical and veterinary mycology*. – 1994. – T. 32. – №. suppl. – C. 169-187.
132. Salkin, I.F. A new medium for the presumptive identification of dermatophytes / I.F. Salkin, A. Padhye, M.E. Kemna // *Journal of clinical microbiology*. – 1997. – T. 35. – №. 10. – C. 2660-2662.
133. Salkin, I.F. Dermatophyte test medium: evaluation with nondermatophytic pathogens / I.F. Salkin // *Applied microbiology*. – 1973. – T. 26. – №. 2. – C. 134-137.
134. Savinov, V.A. Development of a differential diagnostic nutrient medium for the express diagnosis of animal dermatophytosis / V.A. Savinov, R.S. Ovchinnikov, A.V. Kapustin, A.I. Laishevtsev, A.M. Gulykin // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. – IOP Publishing, 2019. – T. 315. – №. 2. – C. 022071.

135. Savinov, V.A. Incidence and seasonal variation of pet dermatophytosis in Moscow region / V.A. Savinov, A.V. Kapustin, R.S. Ovchinnikov, P.N. Shastin, A.I. Laishevtsev // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – IOP Publishing, 2020. – T. 548. – №. 7. – C. 072048.
136. Savinov, V.A. Selection of nutritive compounds to improve growth and indicative properties of the DTM-Expert medium for dermatophytic fungi / V.A. Savinov, R.S. Ovchinnikov, A.G. Gaynullina, A.V. Khabarova, A.V. Kapustin // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – IOP Publishing, 2021. – T. 839. – №. 2. – C. 022058.
137. Schauder, S. Von Igeln auf Menschen / S. Schauder, M. Kirsch-Nietzki, S. Wegener, E. Switzer, S.A. Qadripur // Der Hautarzt. – 2007. – T. 58. – №. 1. – C. 62-67.
138. Schoch, C.L. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi / C.L. Schoch, K.A. Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J.L. Spouge, C.A. Levesque // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2012. – T. 109. – №. 16. – C. 6241-6246.
139. Seker, E. Isolation of dermatophytes from dogs and cats with suspected dermatophytosis in Western Turkey / E. Seker, N. Dogan // Preventive veterinary medicine. – 2011. – T. 98. – №. 1. – C. 46-51.
140. Seyedmousavi, S. Emerging and epizootic fungal infections in animals / S. Seyedmousavi, G.S. de Hoog, J. Guillot, P.E. Verweij // Springer. - 2018. – C. 404.
141. Shams, G.M. An epidemiological survey on cattle ringworm in major dairy farms of Mashhad city, Eastern Iran / G.M. Shams, T.F. Mosleh, B.S. Ranjbar, A.M. Razaghi // Iranian journal of microbiology. – 2009. – T. 1. - №. 3. – C. 31-36.
142. Singh, S. Comparative study of different microscopic techniques and culture media for the isolation of dermatophytes / S. Singh, P.M. Beena // Indian journal of medical microbiology. – 2003. – T. 21. – №. 1. – C. 21.
143. Sinski, J.T. Dermatophyte test medium: clinical and quantitative appraisal / J.T. Sinski, J.R. Swanson, L.M. Kelley // Journal of Investigative Dermatology. – 1972. – T. 58. – №. 6. – C. 405-411.
144. Sparkes, A.H. Epidemiological and diagnostic features of canine and feline dermatophytosis in the United Kingdom from 1956 to 1991 / A.H. Sparkes, T.J. Gruffydd-Jones, S.E. Shaw, A.I. Wright, C.R. Stokes // The Veterinary Record. – 1993. – T. 133. – №. 3. – C. 57-61.
145. Starova, A. Dermatophytes in republic of Macedonia / A. Starova, M. Balabanova-Stefanova, M. V'lcikova-Laskoska // Contributions, Sec Biol Med Sci MASA. – 2010. – T. 31. – C. 31.
146. Steindorff, A.S. Fungal metabolic diversity / A.S. Steindorff, G.F. Persinoti, V.N. Monteiro, R.N. Silva // Fungal Biomolecules: Sources, Applications and Recent Developments. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd. – 2015. – C. 239-62.

147. Taplin, D. Isolation and recognition of dermatophytes on a new medium (DTM) / D. Taplin, N. Zaias, G. Rebell, H. Blank // *Archives of dermatology*. – 1969. – T. 99. – №. 2. – C. 203-209.
148. Tchernev, G. Onychomycosis: modern diagnostic and treatment approaches / G. Tchernev, P.K. Penev, P. Nenoff, L.G. Zisova, J.C. Cardoso, T. Taneva, N. Kanazawa // *Wiener Medizinische Wochenschrift*. – 2013. – T. 163. – №. 1. – C. 1-12.
149. Tekin, H.G. Would you like to purchase a rodent with dermatophytes? / H.G. Tekin, V. Sigsgaard, C. Zachariae, R.K. Hare, M.C. Arendrup, D.M.L. Saunte // *Mycoses*. – 2019. – T. 62. – №. 7. – C. 584-587.
150. Vermout, S. Pathogenesis of dermatophytosis / S. Vermout, J. Tabart, A. Baldo, A. Mathy, B. Losson, B. Mignon // *Mycopathologia*. – 2008. – T. 166. – №. 5. – C. 267-275.
151. Verrier, J. Dermatophyte identification in skin and hair samples using a simple and reliable nested polymerase chain reaction assay / J. Verrier, L. Krähenbühl, O. Bontems, M. Fratti, K. Salamin, M. Monod // *British Journal of Dermatology*. – 2013. – T. 168. – №. 2. – C. 295-301.
152. Verrier, J. Identification of infectious agents in onychomycoses by PCR-terminal restriction fragment length polymorphism / J. Verrier, M. Pronina, C. Peter, O. Bontems, M. Fratti, K. Salamin, M. Monod // *Journal of clinical microbiology*. – 2012. – T. 50. – №. 3. – C. 553-561.
153. Wang, M. Z. Correlation between histopathologic features and likelihood of identifying superficial dermatophytosis with periodic acid Schiff-diastase staining: a cohort study / M.Z. Wang, R. Guo, J.S. Lehman // *Journal of cutaneous pathology*. – 2017. – T. 44. – №. 2. – C. 152-157.
154. Weitzman, I. The dermatophytes / I. Weitzman, R.C. Summerbell // *Clinical microbiology reviews*. – 1995. – T. 8. – №. 2. – C. 240-259.
155. White, T.C. Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes / T.C. White, B.G. Oliver, Y. Gräser, M.R. Henn // *Eukaryotic cell*. – 2008. – T. 7. – №. 8. – C. 1238-1245.
156. Wiegand, C. Dermatophytosis caused by rare anthropophilic and zoophilic agents / C. Wiegand, A. Burmester, J. Tittelbach, S. Darr-Foit, S. Goetze, P. Elsner, U.C. Hipler // *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*. – 2019. – T. 70. – №. 8. – C. 561-574.
157. Wisselink, G.J. Trapped in keratin; a comparison of dermatophyte detection in nail, skin and hair samples directly from clinical samples using culture and real-time PCR / G.J. Wisselink, E. Van Zanten, A.M.D. Kooistra-Smid // *Journal of microbiological methods*. – 2011. – T. 85. – №. 1. – C. 62-66.
158. Wright, A.I. Ringworm in dogs and cats / A.I. Wright // *Journal of small animal practice*. – 1989. – T. 30. – №. 4. – C. 242-249.

159. Yager, J.A. Mycetoma-like granuloma in a cat caused by *Microsporum canis* / J.A. Yager, B. Wilcock, J. A. Lynch, A.R. Thompson // *Journal of comparative pathology*. – 1986. – T. 96. – №. 2. – C. 171-176.
160. Yamada, C. *Trichophyton rubrum* infection in a dog / C. Yamada, A. Hasegawa, K. Ono, M. Pal, C. Kitamura, H. Takahashi // *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*. – 1991. – T. 32. – №. 1. – C. 67-71.
161. Zhan, P. Epidemiological changes in tinea capitis over the sixty years of economic growth in China / P. Zhan, D. Li, C. Wang, J. Sun, C. Geng, Z. Xiong, G.S. de Hoog // *Medical mycology*. – 2015. – T. 53. – №. 7. – C. 691-698.
162. Zhan, P. The changing face of dermatophytic infections worldwide / P. Zhan, W. Liu // *Mycopathologia*. – 2017. – T. 182. – №. 1-2. – C. 77-86.
163. Zimmerman, K. Dermal mass aspirate from a Persian cat / K. Zimmerman, B. Feldman, J. Robertson, E.S. Herring, T. Manning // *Veterinary clinical pathology*. – 2003. – T. 32. – №. 4. – C. 213-217.

10. ПРИЛОЖЕНИЯ

К диссертационной работе прилагаются следующие копии документов:

№	Документ	Стр.
1.	Методические указания «Диагностика дерматофитозов животных»	126
2.	Паспорт штамма <i>Microsporum canis</i> «FL 79-18 View»	127
3	Свидетельство о депонировании штамма <i>Microsporum canis</i> «FL 79-18 View»	129
4	Паспорт штамма <i>Trichophyton mentagrophytes</i> «CN 38-18 View»	130
5	Свидетельство о депонировании штамма <i>Trichophyton mentagrophytes</i> «CN 38-18 View»	132
6	Инструкция по ветеринарному применению дифференциально-диагностической питательной среды для диагностики возбудителей дерматофитозов животных «ДТМ-Эксперт»	133
7	СТО 00496165-0001-2021 Дифференциально-диагностическая хромогенная питательная среда для диагностики возбудителей дерматофитозов животных «ДТМ-Эксперт»	136
8	Промышленный технологический регламент на производство хромогенной диагностической питательной среды «ДТМ-Эксперт»	137
9	Протокол испытаний «Дифференциально-диагностической хромогенной питательной среды для диагностики возбудителей дерматофитозов животных «ДТМ-Эксперт»	138
10	Декларация о соответствии требованиям СТО 00496165-0001-2021	139
11	Акт об апробации дифференциально-диагностической питательной среды «ДТМ-Эксперт» для экспресс-диагностики возбудителей дерматофитозов на базе лабораторно-диагностического центра «Неовет»	140
12	Акт об апробации дифференциально-диагностической питательной среды «ДТМ-Эксперт» для экспресс-диагностики возбудителей дерматофитозов на базе ветеринарного центра патоморфологии и лабораторной диагностики доктора Н.В. Митрохиной	142
13	Патент «Штаммы мицелиальных грибов <i>Microsporum canis</i> и <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , предназначенные для контроля ростовых свойств питательных сред»	144
14	Патент «Селективная питательная среда для выделения возбудителей дерматофитозов»	146

Методические указания «Диагностика дерматофитозов животных»

**Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР – ВСЕРОССИЙСКИЙ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ
ИМЕНИ К.И. СКРЯБИНА И Я.Р. КОВАЛЕНКО
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
(ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)**

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель Секции

зоотехнии и ветеринарии

Отделения сельскохозяйственных

наук РАН, академик РАН

 В. В. Калашников

«08.08.21» 2021 г.

Диагностика дерматофитозов животных

Методические указания

Москва 2021

Паспорт штамма *Microsporum canis* «FL 79-18 Viev»МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР - ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ ИМЕНИ К.И. СКРЯБИНА И
Я.Р. КОВАЛЕНКО РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
(ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)Рязанский проспект, д. 24, корпус 1, Москва, 109428
Тел./факс (495) 970-03-69. E-mail: admin@viev.ruПАСПОРТ ШТАММА МИКРООРГАНИЗМА

1. Вид микроорганизма:
Анаморфа: *Microsporum canis* (Bodin) Bodin
Телеоморфа: *Arthroderma otae* (Hasegawa & Usui) McGinnis
Штамм FL 79-18 Viev является анаморфой
2. Номер в других коллекциях: *нет*
3. Основание для депонирования: *контрольный штамм для оценки ростовых свойств питательной среды*
4. Родословная: *нет*
5. Патогенность: *в соответствии с классификацией микроорганизмов - возбудителей инфекционных заболеваний человека, простейших, гельминтов и ядов биологического происхождения по группам патогенности санитарных правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» грибные агенты рода Microsporum относятся к четвертой группе опасности, является зоопатогенным*
6. Способ получения штамма (когда, где и кем получен): *штамм выделен от естественного хозяина при микологическом исследовании клинического материала от кошки с признаками дерматофитоза (г. Москва), в октябре 2018 г., в лаборатории микологии и антибиотиков им. А.Х. Саркисова ФНЦ ВИЭВ РАН, авторами штамма*
7. Где и кем идентифицирована культура: *в лаборатории микологии и антибиотиков им. А.Х. Саркисова ФНЦ ВИЭВ РАН, авторами штамма*
8. Методы идентификации: *штамм идентифицирован на основании изученных морфологических и физиологических свойств в соответствии с микологическими определителями клинически значимых грибов*
9. Культуральные особенности: *культура штамма растет на твердых питательных средах: среда Сабуро, сусло-агар*
10. Морфологические особенности:
 - А. Макроморфологические признаки: *колонии на среде Сабуро бежево-белые, плоские, бархатисто-шерстистые, в центре пуповчатое возвышение. Растущий край ровный, реснитчатый. Реверс охряно-желтый. Воздушный мицелий развит умеренно, белого цвета. Диаметр колонии на 10-ые сутки роста 50-55 мм. Пигмент и экссудат не образует. По мере старения культуры реверс приобретает более темную окраску.*
 - Б. Микроморфологические признаки: *мицелий ровный, ветвящийся, септированный, бесцветный, ширина гиф 1-2 мкм. Макроконидии многочисленные, многоклеточные, веретеновидные с клювовидным кончиком, имеют от 4 до 8 септ. Микроконидии немногочисленные, овальные, грушевидные, размером 1-3 x 1,5-5 мкм, располагаются непосредственно на недифференцированных гифах.*

В. Дополнительные признаки (наличие хламидоспор, артроспор, склероциев и т.д.) не выявлены.

Культурально-морфологические признаки штамма являются типичными для вида *Microsporium canis*.

11. Молекулярно-генетические характеристики штамма: у штамма проведено секвенирование участков внутреннего транскрибируемого спейсера гена рибосомальной РНК (ITS) и гена β -тубулина. Филогенетический BLAST-анализ подтвердил принадлежность штамма к виду *Microsporium canis*.

12. Условия культивирования: культура штамма выращивается на агаре Сабуро или сусло – агаре (рН 6,2-6,8) при температуре от 26-28 °С. Срок инкубирования 7-14 сут.

13. Условия хранения: культуры штамма хранятся в лиофилизированном состоянии под вакуумом в ампулах, при температуре от 4 до 6 °С или в пробирках на агаре Сабуро под ватно-марлевыми пробками при температуре от 4 до 6 °С. Периодичность пересевов из пробирок один раз в 6 месяцев, из ампул – один раз в 5 лет.

14. Литературные ссылки:

Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М. Определитель патогенных и условно-патогенных грибов. М., «Мир», 2001, 468 стр.

de Hoog G., Guarro J., Gene J. Atlas of clinical fungi. Utrecht/Reus, 2000, 1126 pp.

15. Организация-депозитор: Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко российской академии наук (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН). Российская Федерация, 109428, г. Москва, Рязанский проспект д. 24, корпус 1. Тел./факс (495) 970-03-69. E-mail: admin@viev.ru

16. Авторы: Капустин А.В., к.в.н.; Овчинников Р.С. к.б.н.; Савинов В.А., Гайнуллина А.Г., Лапшевцев А.И., к.б.н.

17. Форма депонирования: национальное патентное депонирование

«13» декабря 2019 г.

Директор ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН



Гулюкин А.М.

Приложение 3.

Свидетельство о депонировании штамма *Microsporium canis* «FL 79-18 View»

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР - ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ ИМЕНИ К.И. СКРЯБИНА И
Я.Р. КОВАЛЕНКО РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
(ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)

Рязанский проспект, д. 24, корпус 1, Москва, 109428
Тел./факс (495) 970-03-69. E-mail: admin@view.ru

СВИДЕТЕЛЬСТВО О ДЕПОНИРОВАНИИ

№ 161

«13» декабря 2019 года

Всероссийская государственная коллекция патогенных и вакцинных штаммов
микроорганизмов-возбудителей инфекционных болезней животных
депонировала для целей национальной патентной процедуры
13 декабря 2019 года
авторский штамм микроорганизма *Microsporium canis* «FL 79-18 View»

Область применения штамма: контрольный штамм

Депозитор: Российская Федерация, 109428, г. Москва, Рязанский проспект д. 24, корпус 1., Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко российской академии наук» (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)
Тел./факс (495) 970-03-69. E-mail: admin@view.ru

Автор (ы): Капустин А.В., Овчинников Р.С., Савинов В.А., Гайнуллина А.Г., Лаишевцев А.И.

Штамму присвоен регистрационный номер: F-81

Свидетельство выдано для подачи заявки на изобретение.

Директор ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ, к.б.н.



/ А.М. Гулюкин

Заведующий лабораторией
микробиологии с музеем типовых
культур, к.в.н.

/ А.В. Горбатов

Приложение 4.

Паспорт штамма *Trichophyton mentagrophytes* «CN 38-18 Viev»

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР - ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ ИМЕНИ К.И. СКРЯБИНА И
Я.Р. КОВАЛЕНКО РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
(ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)

Рязанский проспект, д. 24, корпус 1, Москва, 109428
Тел./факс (495) 970-03-69. E-mail: admin@viev.ru

ПАСПОРТ ШТАММА МИКРООРГАНИЗМА

1. Вид микроорганизма:
Анаморфа: *Trichophyton mentagrophytes* (Robin) Blanchard
Телеоморфа: *Arthroderma benhamiae* (Ajello et Cheng) Gräser et de Hoog
Штамм CN 38-18 Viev является анаморфой.
2. Номер в других коллекциях: *нет*
3. Основание для депонирования: *контрольный штамм для оценки ростовых свойств питательной среды*
4. Родословная: *нет*
5. Патогенность: *в соответствии с классификацией микроорганизмов - возбудителей инфекционных заболеваний человека, простейших, гельминтов и ядов биологического происхождения по группам патогенности санитарных правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» грибные агенты рода Trichophyton относятся к четвёртой группе опасности, является зоопатогенным*
6. Способ получения штамма (когда, где и кем получен): *штамм выделен от естественного хозяина при микологическом исследовании клинического материала от собаки с признаками дерматофитоза (Московская обл.), в июне 2018 г., в лаборатории микологии и антибиотиков им. А.Х. Саркисова ФНЦ ВИЭВ РАН, авторами штамма*
7. Где и кем идентифицирована культура: *в лаборатории микологии и антибиотиков им. А.Х. Саркисова ФНЦ ВИЭВ РАН, авторами штамма*
8. Методы идентификации: *штамм идентифицирован на основании изученных морфологических и физиологических свойств в соответствии с микологическими определителями клинически значимых грибов*
9. Культуральные особенности: *культура штамма растет на твердых питательных средах: среда Сабуро, сусло-агар*
10. Морфологические особенности:
А. Макроморфологические признаки: колонии на среде Сабуро белые, выпуклые, бархатисто-пушистые, в центре кратерообразное углубление. Растущий край ровный, реснитчатый. Реверс охряно-коричневый. Воздушный мицелий развит хорошо, белого цвета. Диаметр колонии на 10-ые сутки роста 60-65 мм. Пигмент и экссудат не образует. По мере старения культуры рельеф становится более плоским.
Б. Микроморфологические признаки: мицелий изогнутый, септированный, ветвящийся, бесцветный. Микроконидии многочисленные, овальные или булавовидные, располагаются непосредственно на гифах, одиночно или гроздьями. Макроконидии единичные, встречаются редко, сигаровидной формы.
В. Дополнительные признаки (наличие хламидоспор, артроспор, склероциев и т.д.) не выявлены.

Культурально-морфологические признаки штамма являются типичными для вида *Trichophyton mentagrophytes*.

11. Молекулярно-генетические характеристики штамма: у штамма проведено секвенирование участков внутреннего транскрибируемого спейсера гена рибосомальной РНК (ITS) и гена β -тубулина. Филогенетический BLAST-анализ подтвердил принадлежность штамма к виду *Trichophyton mentagrophytes*.
12. Условия культивирования: культура штамма выращивается на агаре Сабуро или сусло – агаре (рН 6,2-6,8) при температуре от 26-28 °С. Срок инкубирования 7-14 сут.
13. Условия хранения: хранятся в лиофилизированном состоянии под вакуумом в ампулах, при температуре от 4 до 6 °С или в пробирках на Сабуро агар под ватно-марлевыми пробками при температуре от 4 до 6 °С. Периодичность пересевов из пробирок один раз в 6 месяцев, из ампул – один раз в 5 лет.
14. Литературные ссылки:
Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М. Определитель патогенных и условно патогенных грибов. М., «Мир», 2001, 468 стр.
de Hoog G., Guarro J., Gene J. Atlas of clinical fungi. Utrecht/Reus, 2000, 1126 pp.
15. Организация-депозитор: Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко российской академии наук (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН). Российская Федерация, 109428, г. Москва, Рязанский проспект д. 24, корпус 1. Тел./факс (495) 970-03-69. E-mail: admin@viev.ru
16. Авторы: Капустин А.В., к.в.н.; Овчинников Р.С. к.б.н., Савинов В.А., Гайнуллина А.Г., Лашиевцев А.И., к.б.н.
17. Форма депонирования: национальное патентное депонирование

«13» декабря 2019 г.

Директор ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН



Гулюкин А.М.

Приложение 5.

Свидетельство о депонировании штамма *Trichophyton mentagrophytes* «CN 38-18 View»

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР - ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ ИМЕНИ К.И. СКРЯБИНА И
Я.Р. КОВАЛЕНКО РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
(ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)

Рязанский проспект, д. 24, корпус 1, Москва, 109428
Тел./факс (495) 970-03-69. E-mail: admin@viev.ru

СВИДЕТЕЛЬСТВО О ДЕПОНировании

№ 162

«13» декабря 2019 года

Всероссийская государственная коллекция патогенных и вакцинных штаммов
микроорганизмов-возбудителей инфекционных болезней животных
депонировала для целей национальной патентной процедуры
13 декабря 2019 года
авторский штамм микроорганизма *Trichophyton mentagrophytes* «CN 38-18 View»

Область применения штамма: контрольный штамм

Депозитор: Российская Федерация, 109428, г. Москва, Рязанский проспект д. 24, корпус 1., Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко российской академии наук» (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)
Тел./факс (495) 970-03-69. E-mail: admin@viev.ru

Автор (ы): Капустин А.В., Овчинников Р.С., Савинов В.А., Гайнуллина А.Г., Лаишевцев А.И.

Штамму присвоен регистрационный номер: F-82

Свидетельство выдано для подачи заявки на изобретение.

Директор ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ, к.б.н.



/ А.М. Гулюкин

Заведующий лабораторией
микробиологии с музеем типовых
культур, к.в.н.

/ А.В. Горбатов

Инструкция по ветеринарному применению дифференциально-диагностической питательной среды для диагностики возбудителей дерматофитозов животных «ДТМ-Эксперт»

УТВЕРЖДАЮ:
Директор ФГБНУ ФНЦ ВЕТЭВ РАН
А.М. Гулюкин
12 АПР 2021

ИНСТРУКЦИЯ

по применению дифференциально-диагностической хромогенной питательной среды «ДТМ-Эксперт» для диагностики возбудителей дерматофитозов животных

(организация-разработчик - ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко» РАН)

1. Общие сведения

1.1. Торговое наименование – «ДТМ-Эксперт»

Международное непатентованное наименование – дифференциально-диагностическая хромогенная питательная среда для диагностики возбудителей дерматофитозов животных.

1.2. Питательная среда представляет собой комплекс специально подобранных компонентов в агаровом геле, и обеспечивает специфические питательные потребности грибов-дерматофитов (возбудителей дерматофитозов). Также среда содержит хромогенные и селективные добавки, ингибирующие рост контаминантов.

1.3. По внешнему виду среда представляет собой плотную однородную агаризованную массу (гель) от темно-желтого до светло-коричневого цвета. Срок годности среды – 6 месяцев от даты выпуска. По истечении срока годности среда к применению не пригодна.

1.4. Среда расфасована во флаконы с резьбовой крышкой или в чашки Петри. Каждый флакон предназначен для посева одного образца клинического материала. Флаконы упакованы в картонные или пенопластовые коробки (ящики). В каждую коробку со средой вложена инструкция по ее применению.

1.5. Среда «ДТМ-Эксперт» хранят и транспортируют в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2°C до 8°C.

1.6. Среда следует хранить в местах, недоступных для детей.

1.7. Среда во флаконах без этикеток, с нарушением целостности и укупорки, измененным внешним видом, содержащую посторонние примеси, подвергшуюся замораживанию, выбраковывают и утилизируют.

1.8. Среда отпускается без рецепта.

2. Область применения

2.1. Среда предназначена для *in vitro* диагностики в ветеринарии.

2.2. Среда «ДТМ-Эксперт» предназначена для ускоренной индикации и дифференциации патогенных грибов-дерматофитов и диагностики дерматофитозов животных путем выделения возбудителей из клинического материала. Среда обеспечивает

селективный рост дерматофитов, при одновременном изменении окрашивания среды, что обеспечивает своевременную и наглядную индикацию присутствия возбудителя.

2.3. Среду «ДТМ-Эксперт» используют для культурального исследования (посева) клинического материала от животных, подозрительных на дерматофитоз, а также для выявления скрытого (бессимптомного) миконосительства у клинически здоровых животных (мелкие домашние животные, пушные звери, крупный и мелкий рогатый скот, лошади, верблюды, грызуны).

3. Порядок применения

3.1. Для посевов клинического материала используют среду комнатной температуры.

3.2. При проведении всех манипуляций соблюдают общепринятые в клинической микробиологии правила асептики, антисептики и меры предосторожности. Материал (волосы с корнем, корочки) отбирают пинцетом с периферии очага поражения. Посев проводят, помещая пинцетом отобранный материал на поверхность среды «ДТМ-Эксперт» и слегка прижимая к поверхности.

3.3. Также возможен отбор материала путем вычесывания шерсти с помощью зубной щетки (метод Маккензи). Новой щеткой из упаковки делают счесы с поверхности тела, в особенности с мест наиболее вероятной локализации возбудителя. Посев проводят, прижимая щетину зубной щетки к поверхности среды, делают 1-2 таких отпечатка на поверхности среды «ДТМ-Эксперт».

3.4. После посева резьбовую крышку флакона со средой закручивают не полностью, чтобы не перекрыть доступ воздуха и предотвратить образование конденсата. На этикетке указывают индивидуальный номер образца и дату посева.

3.5. Посевы на среде выращивают в термостате при температуре $28 \pm 2^\circ\text{C}$.

3.6. Просмотр посевов проводят ежедневно, отмечая изменение цвета среды (покраснение) и начало роста грибных колоний. Также проверяют, чтобы крышки флаконов были закручены свободно, для обеспечения доступа воздуха.

3.7. Грибы-дерматофиты, если они присутствуют в материале, в процессе роста вызывают изменение pH среды (защелачивание), и содержащийся в среде «ДТМ-Эксперт» индикатор изменяет цвет среды с темно-желтого на красный. Изменение цвета происходит на ранних стадиях роста грибных колоний, или же тогда, когда колония еще незаметна. На данной среде дерматофиты образуют характерные колонии светлой окраски.

3.8. Плесневые грибы, которые могут присутствовать в материале в качестве контаминантов, обычно не вызывают изменение окраски среды, т.е. при наличии роста колонии среда «ДТМ-Эксперт» остаётся исходного цвета. В некоторых случаях может наблюдаться покраснение среды, но это происходит тогда, когда колония уже выросла (обычно после 7 сут.). Также плесени отличаются от дерматофитов насыщенной окраской колоний.

3.9. В случае роста наиболее распространенных возбудителей (*M. canis*, *M. gypsum*, *T. mentagrophytes*) положительные результаты посева становятся заметны как правило после 3-х сут. роста (72 ч). Наблюдают покраснение среды и рост характерных колоний, которые приобретают характерное строение на 5-7 сут. роста. Однако может потребоваться более длительное выращивание посевов (10-14 дней), что зависит от ряда

факторов (степень заболевания, количество засеянного инфицированного материала и т.п.) Медленно растущие виды дерматофитов, например *T. verrucosum*, требуют до 3 недель инкубирования.

3.10. Для получения наиболее достоверных результатов диагностики дерматофитозов следует применять комплекс клинических и лабораторных диагностических методов, наряду с посевом на среду «ДТМ-Эксперт». Постановка окончательного диагноза является прерогативой и ответственностью ветеринарного врача.

4. Утилизация и обеззараживание

4.1. Утилизация и обеззараживание посевов на среде «ДТМ-Эксперт» по окончании исследования проводится в соответствии с требованиями, предусмотренными для ПБА III-IV групп патогенности (см. «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами», СанПиН 2.1.7.2790-10).

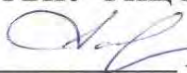
4.2. Обеззараживание различных объектов, контаминированных в ходе диагностического исследования (лабораторное оборудование, посуда, инструменты, спецодежда и т.д.) проводят в соответствии с правилами «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» (СанПин 1.3.2322-08).

СТО 00496165-0001-2021 Дифференциально-диагностическая хромогенная питательная среда для диагностики возбудителей дерматофитозов животных
«ДТМ-Эксперт»

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР - ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ ИМЕНИ К.И. СКРЯБИНА И
Я.Р. КОВАЛЕНКО РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
(ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)

СОГЛАСОВАНО

Первый заместитель директора
ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН


А.В. Капустин
« 07 » апреля 2021 г.

УТВЕРЖДАЮ

Директор
ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН


А.М. Гулюкин
« 08 » апреля 2021 г.

СТАНДАРТ ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН

Дифференциально-диагностическая хромогенная питательная
среда для диагностики возбудителей дерматофитозов животных
«ДТМ-ЭКСПЕРТ»

СТО 00496165-0001-2021

Промышленный технологический регламент на производство хромогенной
диагностической питательной среды «ДТМ-Эксперт»

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР – ВСЕРОССИЙСКИЙ
НАУЧНО- ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ ИМЕНИ К.И. СКРЯБИНА
и Я.Р. КОВАЛЕНКО РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
(ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)**

УТВЕРЖДАЮ:
Директор ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН

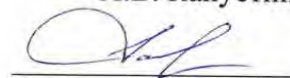

А.М. Гулюкин
«30» апреля 2021 г.

ПРОМЫШЛЕННЫЙ РЕГЛАМЕНТ

**ХРОМОГЕННАЯ ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА
«ДТМ-ЭКСПЕРТ»**

РЕКОМЕНДОВАНО
к утверждению

Первый заместитель директора
А.В. Капустин



«30» апреля 2021 г.

Москва - 2021 г.

Протокол испытаний «Дифференциально-диагностической хромогенной питательной среды для диагностики возбудителей дерматофитозов животных «ДТМ-Эксперт»

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

**«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР - ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ ИМЕНИ К.И. СКРЯБИНА И
Я.Р. КОВАЛЕНКО РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
(ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)**

Рязанский проспект, д. 24, корпус 1, Москва, 109428
Тел./факс (495) 970-03-69. E-mail: admin@viev.ru

Протокол испытаний № 1/3.3

от 19 мая 2021 г.

**Дифференциально-диагностическая хромогенная питательная среда для
диагностики возбудителей дерматофитозов животных «ДТМ-ЭКСПЕРТ»**

СТО 00496165-0001-2021

Изготовитель: ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, г. Москва

Серия: 04 Дата изготовления: 05.2021 г.

Контролируемые показатели качества по СТО 00496165-0001-2021:

Наименование показателя	Характеристика и норма	Результаты контроля
Внешний вид, цвет	Плотная агаризованная среда с гладкой поверхностью, полупрозрачная, однородная. Цвет от темно-желтого до светло-коричневого	Плотная агаризованная среда с гладкой поверхностью, полупрозрачная, однородная, цвет темно-желтый
Наличие посторонней примеси, трещин контейнеров, нарушение маркировки, качества укупорки	Не допускается	Наличие посторонних примесей, трещин контейнеров, нарушение маркировки, качества укупорки не выявлено
Концентрация водородных ионов (pH), в пределах	4,6-5,6	5,0
Стерильность	Должна быть стерильной	Стерильная
Ростовые свойства для грибов-дерматофитов (<i>Microsporum</i> spp., <i>Trichophyton</i> spp.)	Должна обеспечивать эффективный рост и образование типичных колоний	Соответствует СТО
Хромогенные (индикаторные) свойства для дерматофитов и плесневых грибов	Должна выдержать испытания	Соответствует СТО
Ингибирующие свойства в отношении бактерий и плесневых грибов	Должна полностью или частично ингибировать рост бактерий и плесневых грибов	Соответствует СТО

Заключение. Дифференциально-диагностическая хромогенная питательная среда «ДТМ-Эксперт» серии 04 по контролируемым показателям качества соответствует СТО 00496165-0001-2021.

Подпись должностного лица:

Первый заместитель директора
ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН



Капустин А.В.

Декларация о соответствии требованиям СТО 00496165-0001-2021



ДЕКЛАРАЦИЯ О СООТВЕТСТВИИ

Заявитель: ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ "ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР - ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ ИМЕНИ К.И. СКРЯБИНА И Я.Р. КОВАЛЕНКО РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК", ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН зарегистрирован Межрайонная инспекция Федеральной налоговой службы № 46 по г. Москве 01.01.2008 ОГРН: 1037700258870, место нахождения: 109428, РОССИЯ, ГОРОД МОСКВА, ПРОСПЕКТ РЯЗАНСКИЙ, 24, 1, телефон: +7 4959700369, адрес электронной почты: org@viev.ru

В лице: ДИРЕКТОР ГУЛЮКИН АЛЕКСЕЙ МИХАЙЛОВИЧ

заявляет, что Дифференциально-диагностическая хромогенная питательная среда для диагностики возбудителей дерматофитозов животных «ДТМ-Эксперт»
Фасовка: среда расфасована по 8 см 3 в полимерные контейнеры по ТУ 9298-070-44942795-2013; общий объем контейнеров 50 см 3; контейнеры со средой упакованы в картонные коробки с разделительными перегородками по 20 шт.

Документ, в соответствии с которым изготовлена продукция: СТО 00496165-0001-2021 от 08.04.2021 - Дифференциально-диагностическая хромогенная питательная среда для диагностики возбудителей дерматофитозов животных «ДТМ-Эксперт»;

код ОКПД2: 21.10.60.196, код ТН ВЭД: 3822000000, Серийный выпуск.

Изготовитель: ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ "ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР - ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ ИМЕНИ К.И. СКРЯБИНА И Я.Р. КОВАЛЕНКО РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК", место нахождения: 109428, РОССИЯ, ГОРОД МОСКВА, ПРОСПЕКТ РЯЗАНСКИЙ, 24, 1,

Соответствует требованиям: СТО 00496165-0001-2021 - Дифференциально-диагностическая хромогенная питательная среда для диагностики возбудителей дерматофитозов животных «ДТМ-Эксперт»

Декларация о соответствии принята на основании протокола 1/3.3 выдан 19.05.2021 г. испытательной лабораторией "Лаборатория ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН";

Инструкция по применению № 6/н, от 12.04.2021

схема декларирования: 1д

Дата принятия декларации

28.05.2021

Декларация о соответствии действительна до

24.05.2024



ГУЛЮКИН АЛЕКСЕЙ МИХАЙЛОВИЧ
инициалы, фамилия

Сведения о регистрации декларации о соответствии

Регистрационный номер декларации о соответствии

РОСС RU Д-RU.PA01.B.79702/21

Дата регистрации

28.05.2021

Приложение 11.

Акт об апробации дифференциально-диагностической питательной среды «ДТМ-Эксперт» для экспресс-диагностики возбудителей дерматофитозов на базе лабораторно-диагностического центра «Неовет»

Утверждаю
Директор по науке
Ветеринарного лабораторно-диагностического
Центра Неовет

Куриленкова Ирина Юрьевна

г. Москва

«07» сентября 2019 г.

АКТ

об апробации дифференциально-диагностической питательной среды «ДТМ-Эксперт» для экспресс-диагностики возбудителей дерматофитозов

Мы, ниже подписавшиеся, директор по науке ветеринарного лабораторно-диагностического центра Неовет Куриленкова И.Ю.; ведущий научный сотрудник лаборатории микологии и антибиотиков им. А.Х. Саркисова ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, к.б.н. Овчинников Р.С. и научный сотрудник лаборатории микологии и антибиотиков им. А.Х. Саркисова ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН Савинов В.А., составили настоящий акт о нижеследующем:

В период с июля по сентябрь 2019 г. нами была проведена лабораторная апробация экспериментальной серии дифференциально-диагностической питательной среды «ДТМ-Эксперт» для выделения грибов-дерматофитов. Данная среда была разработана и изготовлена в лаборатории микологии и антибиотиков им. А.Х. Саркисова ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН и предназначена для диагностики дерматофитозов животных в условиях ветеринарных клиник и лабораторий.

Целью работы являлась практическая апробация среды «ДТМ-Эксперт» в условиях диагностической ветеринарной лаборатории, изучение возможности использования данной среды для диагностики дерматофитозов животных в условиях повседневной практики.

Для посева на среду было использовано 19 образцов клинического материала, поступившего в лабораторию Неовет для посева на наличие грибов-дерматофитов. Материал был отобран в различных ветклиниках Москвы от 16 кошек и 3 собак с проявлениями кожных поражений.

Посев проводили одновременно на среду «ДТМ-Эксперт» и на коммерческую среду Mykodermoassay DTM (Хема) аналогичного назначения. Посевы выращивали при 28 °С, ежедневно отмечая наличие роста грибных колоний и изменение цвета среды.

Из 19 посеянных образцов, в 5 случаях был обнаружен рост колоний дерматофита *Microsporum canis*, и в 1 случае – *Trichophyton mentagrophytes*. Дерматофиты росли как на среде «ДТМ-Эксперт», так и на Mykodermoassay DTM, однако скорость роста была лучше на «ДТМ-Эксперт». Рост колоний на ней был отмечен на 3-5 сут. после посева. Покраснение среды при росте дерматофитов отмечали на 4-5 сут. на обеих средах, хорошо заметным оно становилось на 7е сут. К этому же времени колонии приобретали характерную для дерматофитов морфологию. Контаминирующие микроорганизмы в положительных образцах либо отсутствовали, либо были сильно ингибированы.



В остальных 13 образцах рост дерматофитов отсутствовал на обеих средах. На «ДТМ-Эксперт» в 6 случаях были выделены плесневые грибы, в 2х — бактериальная микрофлора, в 5 образцах рост микроорганизмов не обнаружен. Рост плесневых грибов был заметно подавлен, колонии росли медленно, изменения цвета среды не наблюдали. Схожие результаты получены на среде Mykodermoassay DTM.

Заключение

Среда «ДТМ-Эксперт» обеспечивает селективное выделение грибов-дерматофитов *M. canis* и *T. mentagrophytes* из клинического материала, что сопровождается покраснением среды на 3-5 сут. и образованием типичных колоний на 7-8 сут. Среда «ДТМ-Эксперт» хорошо подавляет рост бактериальных и плесневых контаминантов. По своим селективным и хромогенным качествам она не уступает коммерческой среде Mykodermoassay DTM (Хема). Преимуществом среды «ДТМ-Эксперт» является удобная фасовка, позволяющая проводить посев зубной щеткой по методу Маккензи, а также более высокая скорость роста дерматофитов.

Директор по науке ветеринарного
лабораторно-диагностического центра
Неовет

В.н.с. лаборатории микологии и
антибиотиков им. А.Х. Саркисова, к.б.н.

Н.с. лаборатории микологии и
антибиотиков им. А.Х. Саркисова



И.Ю. Куриленкова

Р.С. Овчинников

В.А. Савинов

Акт об апробации дифференциально-диагностической питательной среды «ДТМ-Эксперт» для экспресс-диагностики возбудителей дерматофитозов на базе ветеринарного центра патоморфологии и лабораторной диагностики доктора Н.В. Митрохиной

Утверждаю



Директор Ветеринарного центра патоморфологии и лабораторной диагностики доктора Н. В. Митрохиной
Митрохина Н.В.

г. Москва

«17» ноября 2021 г.

Акт

об апробации дифференциально-диагностической питательной среды «ДТМ-Эксперт» для экспресс-диагностики дерматофитов

Мы, нижеподписавшиеся, директор Ветеринарного центра патоморфологии и лабораторной диагностики доктора Н. В. Митрохиной, к.в.н. Митрохина Н.В.; ведущий научный сотрудник лаборатории микологии и антибиотиков им. А.Х. Саркисова ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, к.б.н. Овчинников Р.С. и научный сотрудник лаборатории микологии и антибиотиков им. А.Х. Саркисова ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН Савинов В.А., составили настоящий акт о нижеследующем.

В период с мая по ноябрь 2021 года в условиях Ветеринарного центра патоморфологии и лабораторной диагностики доктора Н. В. Митрохиной нами была проведена апробация экспериментальной серии дифференциально-диагностической питательной среды «ДТМ-Эксперт» для выделения грибов-дерматофитов (серия 04 от 05.2021 г.). Данная среда была разработана и изготовлена в лаборатории микологии и антибиотиков ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ и предназначена для диагностики дерматофитозов животных в условиях ветеринарных клиник и лабораторий.

Целью работы являлась практическая апробация среды «ДТМ-Эксперт» в условиях ветеринарного диагностического центра, изучение возможности использования данной среды для диагностики дерматофитозов животных в условиях повседневной практики.

За указанный интервал времени на апробируемую среду был посеян 81 образец клинического материала (волосы), отобранного от 58 кошек и 23 собак с признаками дерматологических заболеваний.

Посев проводили одновременно на среду «ДТМ-Эксперт» и на импортную среду «DermaKit» («Agrolabo Biopronix», Италия) аналогичного назначения. Посевы выращивали при комнатной температуре, ежедневно отмечая наличие роста грибных колоний и изменение цвета среды. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. Результаты апробации среды «ДТМ-Эксперт»

Среда	Выделено дерматофитов	Покраснение среды при росте <i>M. canis</i> , сут. в среднем	Обильный рост контаминирующих микроорганизмов в образцах	Ложноположительные результаты
«ДТМ-Эксперт»	35 из 81 (43,2%)	6,2	3	1
«DermaKit»	32 из 81 (39,5%)	7,3	12	5

На среде «ДТМ-Эксперт» выделено 35 дерматофитов, на среде «DermaKit» - 32. Единственным обнаруженным видом на обеих средах был *Microsporum canis*.

Отмечено, что среда «ДТМ-Эксперт» не уступала коммерческой по скорости роста дерматофитов – в среднем рост начинался на 2-3 сутки после посева на обеих средах. Изменение цвета при росте дерматофитов на среде «DermaKit» в среднем происходило на 6-8 сутки, в то время как на «ДТМ-Эксперт» покраснение начиналось на 5-6 сутки. К 7-8 суткам на обеих средах формировались типичные для *M.canis* колонии. На апробируемой среде в 3 случаях наблюдали рост контаминирующих микроорганизмов, в то время как на импортной среде в 12 образцах наблюдался рост грибов-контаминантов. В 5 случаях на среде «DermaKit» возникало изменение цвета, вызванное плесневыми грибами, т.е. получали ложно-положительный результат. На среде ДТМ-Эксперт был получен только 1 ложно-положительный результат.

Заключение.

В ходе проведения апробации было установлено, что среда «ДТМ-Эксперт» обладает хорошими хромогенными и селективными свойствами, которые обеспечивают выделение дерматофитов из клинического материала и наглядный визуальный учет за счет изменения цвета среды. Средняя скорость постановки диагноза «дерматофитоз» – 5-6 дней. При этом отмечается преимущество перед зарубежным аналогом – в исследуемой среде зафиксирован только 1 ложноположительный случай, тогда как на среде «DermaKit» было выявлено 5 случаев изменения цвета при росте плесневых грибов-контаминантов. Среда «ДТМ-Эксперт» может быть рекомендована для широкого применения в ветеринарной диагностике.

Директор Ветеринарного центра
патоморфологии и лабораторной
диагностики доктора Н. В. Митрохиной,
к.в.н.

В.н.с. лаборатории микологии и
антибиотиков им. А.Х. Саркисова, к.б.н.

Н.с. лаборатории микологии и
антибиотиков им. А.Х. Саркисова



Митрохина Н.В.

Овчинников Р.С.

Савинов В.А.

Патент «Штаммы мицелиальных грибов *Microsporum canis* и *Trichophyton mentagrophytes*, предназначенные для контроля ростовых свойств питательных сред»

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19)

RU (11)

2 741 097 (13) C1

(51) МПК

C12N 1/14 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 1/14 (2020.08); C12R 1/645 (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2020116817, 09.04.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
09.04.2020

Дата регистрации:
22.01.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 09.04.2020

(45) Опубликовано: 22.01.2021 Бюл. № 3

Адрес для переписки:
109428, Москва, Рязанский пр-кт, 24, корп. 1,
ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН

(72) Автор(ы):

Капустин Андрей Владимирович (RU),
Овчинников Роман Сергеевич (RU),
Гайнулина Алла Габбасовна (RU),
Лаишевцев Алексей Иванович (RU),
Савинов Василий Александрович (RU),
Якимова Эльвира Алексеевна (RU),
Иванов Евгений Валерьевич (RU),
Исаев Юрий Геннадьевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ "ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
НАУЧНЫЙ ЦЕНТР - ВСЕРОССИЙСКИЙ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ВЕТЕРИНАРИИ ИМЕНИ К.И.
СКРЯБИНА И Я.Р. КОВАЛЕНКО
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК"
(ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2074252 A, 27.09.1995 RU
2013444 C1, 30.05.1994 RU 2013445 C1,
30.05.1994.

(54) ШТАММЫ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ *MICROSPORUM CANIS* И *TRICHOPHYTON MENTAGROPHYTES*, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЕ ДЛЯ КОНТРОЛЯ РОСТОВЫХ СВОЙСТВ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

(57) Реферат:

Изобретение относится к области ветеринарной и медицинской микологии и может быть использовано для оценки ростовых свойств питательной среды. Для контроля ростовых свойств питательных сред, предназначенных для диагностики дерматофитозов, вызванных мицелиальными грибами видов *Microsporum canis* и *Trichophyton mentagrophytes*, предложены штамм *Microsporum canis* «FL 79-18 Viev», депонированный во Всероссийской государственной коллекции патогенных и

вакцинных штаммов микроорганизмов-возбудителей инфекционных болезней животных ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН под номером F-81, а также штамм *Trichophyton mentagrophytes* «CN 38-18 Viev», депонированный во Всероссийской государственной коллекции патогенных и вакцинных штаммов микроорганизмов-возбудителей инфекционных болезней животных ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН под номером F-82. Штаммы являются слабопатогенными для лабораторных животных и обладают типичными

Стр: 1

RU 2 741 097 C1

RU 2 741 097 C1

для вида культуральными свойствами, позволяют оценивать ростовые свойства используемой питательной среды, тем самым подтверждать пригодность ее к использованию, повышая достоверность получаемых результатов.

Преимуществом изобретения является повышение стабильности и достоверности результатов лабораторной диагностики дерматофитозов, а также сокращение сроков диагностирования дерматофитозов животных. 2 н.п. ф-лы, 9 пр.

RU 2 7 4 1 0 9 7 C 1

RU 2 7 4 1 0 9 7 C 1

Патент «Селективная питательная среда для выделения возбудителей дерматофитозов»

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19)

RU

(11)

2 745 159 (13) C1

(51) МПК

C12N 1/14 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 1/14 (2020.08); C12R 1/645 (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2020118090, 09.04.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
09.04.2020Дата регистрации:
22.03.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 09.04.2020

(45) Опубликовано: 22.03.2021 Бюл. № 9

Адрес для переписки:

109428, Москва, Рязанский пр-кт, 24, корп. 1,
ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН

(72) Автор(ы):

Савинов Василий Александрович (RU),
Капустин Андрей Владимирович (RU),
Овчинников Роман Сергеевич (RU),
Гайнулина Алла Габбасовна (RU),
Лаишевцев Алексей Иванович (RU),
Гулюкин Алексей Михайлович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ "ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
НАУЧНЫЙ ЦЕНТР - ВСЕРОССИЙСКИЙ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ВЕТЕРИНАРИИ ИМЕНИ К.И.
СКРЯБИНА И Я.Р. КОВАЛЕНКО
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК"
(ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН) (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: TH. NABAKUMAR SINGH, et.al.,
Recognition of dermatophytes by dermatophyte
test medium, International journal of Current
Microbiology and Applied Sciences, 2016, v.5, N
10, p. 1125-1129. RAFAL OGOREK et.al., First
report on the occurrence of Dermatophytes of
Microsporum Cookei cladi e and close affinities
to Paraphyton Cookei in the Harmanecka (см.
прод.)

(54) СЕЛЕКТИВНАЯ ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ДЕРМАТОФИТОЗОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к ветеринарной медицине и ветеринарной микробиологии и может быть использовано для диагностики дерматофитозов животных, вызванных мицелиальными грибами видов *Microsporum canis* и *Trichophyton mentagrophytes*. Селективная питательная среда для выделения возбудителей дерматофитозов включает глюкозу, маннитол,

мясной пептон, феноловый красный, агар-агар, циклогексимид, энрофлоксацин и дистиллированную воду при заданном содержании компонентов. Изобретение позволяет сократить сроки диагностирования дерматофитозов животных, повысить достоверность результатов дифференциации грибов дерматофитов от недерматофитов при

Стр.: 1

RU 2 745 159 C1

RU 2 745 159 C1

использовании рутинных микробиологических методов и расширить арсенал питательных сред для выделения возбудителей дерматофитозов. 2 табл., 5 пр.

(56) (продолжение):

cave (Velka fatra Mts., Slovakia), *Diversity* 2019, 11, 191, p.1-13. RU 2275631 C1, 27.04.2006. Методические указания по лабораторной диагностике дерматофитозов животных, М., 2008, с.14.

R U 2 7 4 5 1 5 9 C 1

R U 2 7 4 5 1 5 9 C 1