

НАШКІРНА ПРОБА ДЛЯ ОЦІНКИ ВІРУЛЕНТНОСТІ ДЕРМАТОМІЦЕТІВ

А.М. ВОЛКОВ, аспірант*

*Висвітлено метод визначення вірулентності та результати ефективності ідентифікації патогенних дерматоміцетів, виділених від хворих тварин, який заснований на використанні мацерованої шкіри молодих статевонезрілих тварин (миші, щурі, мурчаки, цуценята, кошенята, кроленята, телята тощо), що дає можливість діагностувати дерматомікоз, спричинений дерматоміцетами родів *Microsporium* і *Trichophyton*. Метод визначення вірулентності збудників дерматомікозів тварин є простим у виконанні, доступним для практики, ефективним та перспективним для визначення кандидатів у вакцинні і контрольні штами, які будуть використані під час виготовлення імунобіологічних препаратів для специфічної профілактики дерматомікозів.*

Ключові слова: *Вірулентність, молоді тварини, збудники дерматомікозів, штами, миші, щурі, мурчаки, кошенята, цуценята, кроленята, телята.*

Одним з найважливіших завдань гуманної та ветеринарної медицини ХХІ століття є боротьба з мікозними захворюваннями, значну частину яких становлять хвороби дерматомікозної природи. Дерматомікози (Dermatomycoses) – зооантропоносні інфекції, які характеризуються ураженням шкіри та її похідних. Етіопатогенетичними збудниками є патогенні

** Науковий керівник – доктор ветеринарних наук, професор В.Г. Скибіцький

дерматомицети (дерматофіти, кератоміцети) родів *Microsporum* і *Trichophyton*, класу *Deuteromycetes*, що належать до недосконалих грибів (*Fungi imperfecti*).

На дерматомикози хворіють коти, собаки, коні, свині, хутрові звірі, велика і дрібна рогата худоба, а також людина [9, 3, 2, 5, 4]. Стрижнем у боротьбі з дерматомикозами тварин є специфічна профілактика. На сьогодні створено значну кількість вакцин проти дерматомикозів Триховак, Фунгіканіфел, Триходерм, Полівак–ТМ, Вермет, Вермет F, Біокан-М, Біоофел-М та інші, під час виробництва та контролю яких не враховувалась ступінь вірулентності дерматомицетів збудників дерматомикозів тварин [2,8]. Кількість імунобіологічних препаратів для специфічної профілактики дерматомикозів тварин із року в рік збільшується, а кількість випадків захворювань грибної етіології щорічно зростає. Під час виготовлення вакцин використовують не епізоотичні штами, а як правило, музейні, які не циркулюють на території України. На Україні недостатньо охарактеризована вірулентність патогенних дерматомицетів у великих і дрібних свійських тварин, немає надійних тест-об'єктів щодо її оцінювання [7].

Вперше застосування шкіри як тест-об'єкта започатковано під час оцінювання токсичності плісневих культур грибів та кормів, контамінованих токсигенними грибами. Так, Ятель у 1937-1938 рр. під час розшифрування невідомого захворювання у коней на території України застосував шкіру кролів для визначення токсичності виділеного гриба *Stachybotris alternans* та токсичності грубого корму [4].

Реакція на шкірі кроля дозволяє визначати чотири ступеня токсичності кормів і культур грибів: перший ступінь (дуже слаботоксичні) - почервоніння, підвищена чутливість шкіри, лущення; другий ступінь (слаботоксичні) – почервоніння, болючість, незначне потовщення шкіри, лущення, дрібні одиночні, з просяне зерно або менші, жовтуваті бульбашки; третій ступінь (токсичні) – почервоніння, сильне потовщення, болючість, складчастість шкіри, на всій поверхні вогнища жовтуватих бульбашок, сухий поверхневий

некроз, іноді виразки і суцільний тонкий струп; четвертий ступінь (різкотоксичні) – почервоніння, сильний набряк, який виступає у вигляді валика на нижній межі вогнища, глибокий сухий некроз [9].

Шкіру кроля, як тест-об'єкта почали використовувати під час вивчення патогенності збудників дерматомікозів тварин для відтворення шкірних захворювань. Було запропоновано два прийоми нанесення культури гриба на шкіру тварин: аплікації та втирання [3]. Суть першого способу полягає в тому, що на гладко вистрижену, неуражену шкіру накладають культуру (плівку) гриба і закривають зверху пластиром або пов'язкою. Цей метод зараження інакше називають аплікаційним. Аплікацію роблять 3 дні поспіль. Спостереження за розвитком патологічного процесу ведуть упродовж 10 діб. Можна використовувати патологічний матеріал (волосся, лусочки) або культуру гриба. Цей матеріал або культуру разом з агаром розтирають між двома листочками наждачного паперу, потім цим листочком обережно (уникаючи появи крові) втирають культуру (патологічний матеріал) в епільовану поверхню шкіри. Під час такого втирання пошкоджується епідерміс шкіри, що сприяє проникненню патогенного гриба.

Суть другого способу полягає в тому, що досліджуваний матеріал розтирають у ступці і наносять на попередньо скарифіковану шкіру. Щоб уникнути зализування чи розчісування, на вражені місця накладають суху пов'язку. Втирання матеріалу здійснюють протягом 2–3 днів, один раз на день. Перші ознаки розвитку патологічного процесу спостерігають на 3–4-й день. Характерна картина ураження настає на 8–10-й день після втирання. Розвиток гриба встановлюють при мікроскопічному дослідженні волосся і лусочок з уражених ділянок. Проте цей метод не дозволяє об'єктивно оцінювати вірулентність штамів грибів, що вивчаються, оскільки при нашкірній аплікації не відоме фактичне число клітин, що спричинило експериментальний дерматомікоз.

Під час встановлення патогенності дерматофітів, виділених від сприйнятливих до дерматомікозів тварин, деякі автори застосовували метод нашкірного зараження мурчаків і кролів [2, 8].

Відомо, що після нашкірного нанесення культур дерматофітів для вивчення напруги імунітету при трихофітії у мурчаків і кролів розрізняють такі клінічні ознаки:

- сильний ступінь ураження – значна гіперемія, масивна інфільтрація, товсті кірочки;
- середній ступінь ураження – значна гіперемія, інфільтрація та ексудативні явища виражені менш яскраво, помітні окремі вогнища;
- слабкий ступінь ураження – незначна гіперемія, поява декількох невеликих вогнищ, значне лущення [5].

Вірулентність – ступінь патогенності інфекційного агента. Це найважливіший біологічний показник активності патогенних дерматоміцетів, знаючи вірулентність, можна визначати наскільки збудник патогенний для організму і в якому ступені стійкий проти дії першого. На сьогодні визначення вірулентності штамів патогенних дерматоміцетів, виділених від хворих тварин, є актуальним і важливим у практичному аспекті.

Проте спроби диференціації вірулентності штамів патогенних дерматоміцетів, збудників дерматомікозів тварин на основі будь-якого тест-критерію практично відсутні у науковій літературі.

Мета роботи – розробка методу визначення вірулентності штамів патогенних збудників дерматомікозів тварин, який можна використати у процесі селекційного добору виробничих і контрольних дерматоміцетів за показником вірулентності та конструюванні імунобіологічних препаратів для специфічної профілактики дерматомікозів тварин, а також визначати ефективність лікувально-профілактичних заходів.

Матеріали і методи дослідження. Епізоотичні ізоляти збудників дерматомікозів відбирали від мишей, щурів, мурчаків, котів, собак, коней та

великої рогатої худоби з різних районів м. Києва та Київської, Чернігівської, Полтавської областей, а також від безпритульних тварин.

При цьому від мишей виділено 15 епізоотичних ізолятів *Microsporum canis* і 9 ізолятів *Trichophyton mentagrophytes*, від щурів відповідно 18 і 10, від мурчаків – 9 і 7, від цуценят і собак – 77 і 16, кошенят та дорослих котів 126 ізолятів *Microsporum canis* та 28 – *Microsporum gypseum*, від коней – 12 ізолятів *Microsporum canis* та 8 – *Microsporum* spp., від великої рогатої худоби 6 ізолятів *Trichophyton verrucosum* та 11 – *Trichophyton mentagrophytes*.

Дослідження проводились з використанням доступних тест-об'єктів – молодих статевонезрілих тварин: миші, мурчаки, цуценята, кошенята, кроленята, телята тощо. У кожному конкретному випадку під час захворювання підбирали відповідний чутливий тест-об'єкт певного виду тварин із високою чутливістю шкіри до комплексної дії всіх елементів гриба: міцелію, мікроконідій, макроконідій, артроспор, хламідоспор (далі суспензій), концентрацію яких доводили до 2-4 млн/см³ всіх елементів дерматомицета. Оцінювання здійснювали після повторного рецидиву патологічного вогнища (через 10-14 діб). Визначали фізичну і економічну доступність тест-об'єктів. При цьому застосовувався гуманітарний підхід, пов'язаний зі збереженням здоров'я тварин.

Результати досліджень та їх обговорення.

Приготування суспензії клітин дерматомицетів і підрахунок їх концентрації. В пробірки з вирощеною впродовж 15-20 діб культурою гриба на сусло-агарі, добавляли по 5 см³ стерильного фізіологічного розчину, мікологічним гачком розпушували поверхню культури і ретельно перемішували та отримували суспензію. Далі готували послідовні розведення суспензії, використовуючи стерильний 0,85%-ний розчин NaCl у співвідношенні 1:10; 1:20 або 1:40, залежно від її густини. Кількість всіх елементів дерматомицету (мікроконідії, макроконідії, фрагменти міцелію, артроспори тощо) підраховували за допомогою камери Горяєва. Спочатку

визначали концентрацію всіх елементів дерматоміцету в найменшому розведенні, а, за необхідності, коли вона надто велика, – у наступних розведеннях. Підрахунок всіх елементів дерматоміцету в суспензії здійснювали у п'яти великих квадратах (чотирьох по кутах та одному - у центрі).

Вміст всіх елементів дерматоміцету в 1 см^3 суспензії визначали за формулою.

$$K = \frac{P+V}{2} \times P \times 10^4 \times 5,$$

де K – шукане число всіх елементів дерматоміцету; P – кількість всіх елементів дерматоміцету у п'яти великих квадратах першої сітки; V – число всіх елементів дерматоміцету у п'яти великих квадратах другої сітки; P – розведення.

Після підрахунку всіх елементів дерматоміцету у вихідній суспензії їх концентрацію доводили, додаючи 0,85%-ний розчин NaCl до 1×10^8 . Далі готували ряд послідовних 10-кратних розведень (1×10^7 ; 1×10^6 ; 1×10^5 ; 1×10^4 ; 1×10^3). Для цього у п'ять пробірок наливали по $4,5 \text{ см}^3$ стерильний 0,85%-ний розчин NaCl. У першу з них вносили $0,5 \text{ см}^3$ суспензії всіх елементів дерматоміцету, що досліджували, ретельно перемішували і новою піпеткою відбирали $0,5 \text{ см}^3$ суспензії цього розведення та переносили у наступну пробірку і т. д., щоразу використовуючи нову стерильну піпетку. Таким чином, концентрація клітин у кожній наступній пробірці зменшувалася в 10 разів і становила у першій 1×10^7 , у другій – 1×10^6 , у третій – 1×10^5 і т. д. Враховуючи, що при зараженні дослідним тваринам буде нанесено по $0,1 \text{ см}^3$ суспензії, загальна доза, що заражує, становитиме 1×10^6 ; 1×10^5 і так далі клітин в $0,1 \text{ см}^3$. Об'єм інокулята суспензії всіх елементів дерматоміцету, що наносили на шкіру тест-об'єкта тварин (миші, щурі, мурчаки, цуценята, кошенята, кроленята, телята тощо), як правило, збільшували до $1,0 \text{ см}^3$ і більше

залежно від виду тварин, але концентрація суспензії була без змін, а її доза дорівнювала 2-4 млн/см³.

На відміну від загальноприйнятих методів визначення концентрації, де підраховують лише мікроконідії [2, 8], в запропонованій методиці враховуються всі елементи дерматомицету (макроконідії, міцелій, мікроконідії, артроспори, тощо), зокрема все що зустрічається в полі зору, оскільки вони також є носіями вірулентності. Цей прийом дозволяє найбільш точно оцінювати вірулентність дерматомицетів.

Зараження молодих тварин. Зараження молодих тварин (миші, щурі, мурчаки, цуценята, кошенята, кроленята, телята тощо) проводили на шкірно в ділянці спини, за лопатками. Заздалегідь, залежно від виду тварини, ділянку розміром від 0,5x0,5 см до 6x6 см, вистригали та голили. Шкіру обробляли 70%-ним розчином етилового спирту та мацерували зворотним боком скальпеля до прояву ознак виразної гіперемії. Далі кожне розведення інфікуючого матеріалу комплексної суспензії всіх елементів гриба (міцелій, мікроконідій, макроконідій, артроспори тощо) в об'ємі 0,1 см³ (до 1,0 см³ і більше) наносили на підготовлену ділянку шкіри та легенько втирали шпателем. Кожним розведенням заражали не найменше чотирьох 4 тварин і не менше двох тварин залишали контрольними. Їм наносили плацебо – розчином 0,85% -ного NaCl.

Результати зараження визначали на 10–14-ту добу з моменту інфікування, спостереження здійснювали через кожні 3 доби, до зникнення клінічних ознак хвороби. В разі зараження, у місці аплікації суспензії виявляли характерні для дерматомикозу ознаки (гіперемію, утворення лусочок або скориночок, струпів та ін.). Інфікуючу дозу (ІД50) визначали методом Кербера за модифікацією [7].

Оцінювання ступеня вірулентності штамів патогенних дерматомицетів. Штам дерматомицету залежно від вірулентності не призводить до дерматомикозу або ж зумовлює у заражених тварин різний прояв захворювання. Як правило, оцінювання ступеня вірулентності дерматомицету

проводили після повторного рецидиву патологічного вогнища (через 10-14 діб). За цією характеристикою штами збудників дерматоміцетів поділяли на високовірулентні, середньовірулентні, слабковірулентні, авірулентні.

Високовірулентні штами (+++) зумовлюють яскраві клінічні ознаки захворювання, з утворенням великих струпів та лусочок, значну гіперемію.

Середньовірулентні (++) – розвиток патологічного процесу, з утворенням великих і дрібних лусочок, гіперемію.

Слабовірулентні (+) – ледь помітні ознаки дерматомікозу - утворення дрібних лусочок, незначну гіперемію.

Авірулентні (-) штами ознак захворювання не проявляють.

Порівняльні результати оцінювання ступеня вірулентності патогенних дерматоміцетів на молодих статевонезрілих тваринах на 10-14 – ту добу спостережень після зараження їх суспензією – комплексом всіх елементів дерматоміцету дозою 2-4 млн/см³ наведені в таблиці.

Результати оцінювання ступеня вірулентності дерматоміцетів (n=4)

| Вид молодих тварин | Ступінь вірулентності дерматофітів | | | |
|--------------------|------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| | Trichophyton verrucosum, штам 22 | Trichophyton mentagrophytes, штам 412 | Microsporum canis, штам ВС | Microsporum gypseum, штам 311 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Миші | ++ | +++ | +++ | +++ |
| Щурі | ++ | +++ | +++ | +++ |
| Мурчаки | ++ | +++ | +++ | ++ |
| Кроленята | ++ | +++ | ++ | ++ |
| Кошенята | ++ | +++ | +++ | +++ |
| Цуценята | ++ | +++ | +++ | +++ |
| Телята | +++ | +++ | ++ | + |

Примітка: +++ – високовірулентні; ++ – середньовірулентні; + – слабковірулентні; – авірулентні штамі.

Таким чином, проведені нами дослідження і апробація в умовах виробництва показали, що метод визначення вірулентності збудників дерматоміцетів можна рекомендувати для застосування під час постановки діагнозу та в процесі селекції виробничих і контрольних штамів – продуцентів ефективних протективних антигенів дерматоміцетів під час створення засобів специфічної профілактики, а також визначати ефективність лікувально-профілактичних заходів.

Висновки

1. Запропоновано метод визначення вірулентності збудників дерматомікозів тварин, який простий у виконанні, доступний для практиків, ефективний та перспективний для визначення кандидатів у вакцинні і контрольні штами, що використовуватимуть під час виготовлення та контролю імунобіологічних препаратів для специфічної профілактики дерматомікозів тварин.

2. Розроблено метод визначення вірулентності збудників дерматомікозів тварин, який ґрунтується на застосуванні шкіри молодих статевонезрілих тварин, що дає можливість оцінювати ступень вірулентності дерматоміцета після повторного рецидиву патологічного вогнища, а за характером розвитку дерматоміцету в шкірних покривах і терміном перебігу шкірну реакцію поділяють на чотири ступеня вірулентності: високовірулентні, середньо-вірулентні, слаборірулентні, авірулентні.

3. Метод визначення вірулентності дерматоміцетів можна використати під час діагностики дерматомікозів спричинених дерматоміцетами роду *Microsporum* і *Trichophyton*, а також під час відбору та в процесі селекції виробничих і контрольних штамів.

4. Порівняльні результати оцінювання ступеня вірулентності патогенних дерматоміцетів на статевонезрілих тваринах на 10-14-ту добу спостережень після зараження їх суспензією комплексом всіх елементів дерматоміцету дозою 2-4 млн/см³, свідчать про те, що в кожному випадку слід підбирати

відповідний до виду тест-об'єкт, використовуючи шкіру молодих статевонезрілих, сприйнятливих до захворювань тварин.

Перспективою подальших досліджень є визначення кореляції вірулентних та імуногенних (антигенних) властивостей епізоотичних ізолятів збудників дерматомікозів тварин.

Список літератури

1. Диагностика грибных болезней (микозов и микотоксикозов) животных / [Саркисов А.Х., Королева В.П., Квашнина Е.С., Грезин В.Ф.] – М.: Колос, 1971. – 142 с.
2. Иванова Л. Г. Результаты сравнительного изучения патогенности дерматофитозов на лабораторных животных / Л.Г. Иванова. – // Бюллетень ВИЭВ, 1978. – № 32. – С.40–42.
3. Курасова В.В. Методы исследования в ветеринарной микологии / Курасова В.В., Костин В.В., Малиновская Л.С. – М.: Колос, 1971. – 119 с.
4. Методы экспериментальной микологии / под ред. В.Й. Билай. – К.: Наукова думка, 1991. – 320 с.
5. Петрович С.В. Экспериментальное изучение иммунитета при трихофитии / С.В. Петрович // Вестн. Дерматологи и венерологи. – 1976. – № 5. – С.36-40.
6. Планування та організація ветеринарних заходів з профілактики і лікування хвороб домашніх тварин в зоні діяльності приватної клініки / [Головко О.В., Смолянїнова В.К., Северин Р.В., та ін.] // Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини. : Збірник наукових праць Харківської державної зооветеринарної академії «Ветеринарні науки». – Х. : РВВ ХДЗДА, 2013. – Вип. 26, ч.2 . – С.211-215.
7. Скибіцький В.Г. Визначення вірулентності збудників дерматомікозів тварин. Методичні рекомендації / В.Г.Скибіцький, А.М.Волков. – К. : ВЦ НУБіП Україна, 2013. – 11 с.

8. Скрипник В.Г. Патогенність дерматофітів *Trichophyton verrucosum*, виділених в Україні для лабораторних тварин / В.Г. Скрипник. – *Ветеринарна біотехнологія*, ІВМ. – К.: Аграрна наука, 2006. – Бюл. №8. – С.246–251.

9. Спесивцева Н.А. Микозы и микотоксикозы / Н.А. Спесивцева. – М.: Сельхозгиз, 1964. – 517 с.

10. Харченко С.М. Справочник по микозам и микотоксикозам сельскохозяйственных животных / Харченко С.М., Литвин В.П., Тарабара И.М. – К.: Уражай, 1982. – 167 с.

КОЖНАЯ ПРОБА ДЛЯ ОЦЕНКИ ВИРУЛЕНТНОСТИ ДЕРМАТОМИЦЕТОВ А.Н. Волков

*Освещен метод определения вирулентности и результаты эффективности идентификации патогенных дерматомицетов, выделенных от больных животных. Метод основан на использовании мацерированной кожи молодых неполовозрелых животных (мыши, крысы, морские свинки, щенки, котята, крольчата, телята), что дает возможность диагностировать дерматомикоз вызванный дерматомицетами родов *Microsporum* и *Trichophyton*. Метод определения вирулентности возбудителей дерматомикозов животных является простым в исполнении, доступным для практики, эффективным и перспективным для определения кандидатов в вакцинные и контрольные штаммы, которые будут использованы при изготовлении иммунобиологических препаратов для специфической профилактики дерматомикозов животных.*

Ключевые слова: *Вирулентность, молодые животные, возбудители дерматомикозов, штаммы, мыши, крысы, морские свинки, котята, щенята, крольчата, телята.*

Kozhnae test for the estimation of virulence of dermatomycetov A. M. Volkov

*Deals with a method of determining virulence and efficacy results of identification of pathogenic dermatomycetiv isolated from sick animals, which is based on the use of macerated skin young immature animals (mice, rats, murchaky, puppies, kittens, rabbits, calves, etc.), which makes it possible to diagnose dermatomycosis caused dermatomycetamy families *Microsporum* and *Trichophyton*.*

The method of determining virulence of pathogens dermatomycoses of animals is simple in execution, available to practice effective and promising for determining candidates for vaccine and control strains to be used in the manufacture of immunological drugs for specific prevention of dermatomycoses.

Keywords: Virulence, young animal dermatomycoses pathogens, strains of mice, rats, murchaky, kittens, puppies, rabbits, calves.