

Савинов Василий Александрович

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

4.2.3 – инфекционные болезни и иммунология животных

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН).

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент
Капустин Андрей Владимирович

Официальные оппоненты:

Хисматуллина Зарема Римовна – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Башкирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующая кафедрой дерматовенерологии.

Семикрасова Алла Николаевна – кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства имени В.А. Афанасьева», ведущий научный сотрудник отдела биотехнологий.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский федеральный центр агробиотехнологий Российской академии наук

Защита состоится «___» _____ 2022 г. в _____ на заседании диссертационного совета 24.1.249.01, созданного на базе ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» по адресу: 109428, г. Москва, Рязанский проспект 24, к. 1., тел.: 8(495)970-03-68.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН <http://viev.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2022 г.

**Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук**

И.Ю. Ездакова

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Дерматофитозы животных распространены практически во всем мире, при этом заболеваемость варьирует и зависит от времени года, климата, вида животного, качества ветеринарного надзора. Дерматофитозам подвержены почти все теплокровные животные и птицы, 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 профилактики 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 миконосительство, при котором споры дерматофитов находятся в шерсти в неактивном состоянии, но могут индуцировать инфекционный процесс при благоприятных условиях. Несмотря на отсутствие клинических признаков болезни, миконосители представляют серьезную угрозу как источник заражения здоровых животных и человека. Этот нюанс следует учитывать неравнодушным людям, которые могут забрать домой или в приют бродячих и уличных животных.

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 ДТМ, которые применяют непосредственно в условиях клиники или приюта. На данный момент известен ряд импортных сред ДТМ, среди которых Dermatophytest, Dermakit, Derm-Duet, Mykodermoassay ДТМ и другие, однако среди представленных диагностикумов выбор в России сильно ограничен. Использование импортных аналогов имеет ряд недостатков. Прежде всего, это высокая стоимость, 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.

Задачи исследования:

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 миконительстве 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.РА01.В.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.

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.

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.

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.

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-дерматофитов, являющихся возбудителями дерматофитозов у животных-компаньонов в Московском регионе;

3. Технология изготовления и состав разработанной дифференциально-диагностической питательной среды ДТМ;

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.

Собственные исследования

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).

При изучении эпизоотологической ситуации по дерматофитозам проведен анализ результатов диагностических исследований ветеринарных лабораторий ООО «Неовет» и ООО «Артвет», а также результатов собственных микологических исследований клинического материала, отобранного непосредственно от животных-компаньонов г. Москвы и Московской обл., поступающих на прием к ветеринарным врачам-дерматологам, в том числе содержащихся в приютах и питомниках. Идентификацию полученных изолятов проводили на основании культурально-морфологических особенностей колоний и с помощью секвенирования.

Для разработки и усовершенствования питательной среды «ДТМ-Эксперт» проводили изучение питательных потребностей дерматофитов, подбор пептона, углеводов, ингибирующих добавок, индикатора, уровня pH, а также дополнительных стимулирующих добавок. Апробацию экспериментальной серии диагностической питательной среды «ДТМ-Эксперт» проводили с клиническим материалом, для сравнения посев параллельно проводили на импортные аналоги.

Эпизоотологические особенности дерматофитозов мелких домашних животных

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 одновременным пребыванием 500 бездомных животных, а также результаты собственных исследований за 2017-2021 гг.

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 шиншиллы, подозреваемых на заражение дерматофитами.

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 ДТМ, 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.

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 (таблица 1).

Таблица 1 - 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. 1 данных, всего при исследовании было выявлено 25 животных-миконосителей, что составляет 56,8 % от общего числа обследованных. Отмечено, что в приютах количество миконосителей больше, по сравнению с другими местами обитания.

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 (таблица 2).

Таблица 2 - 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*.

Изучение питательных потребностей и подбор компонентов для экспериментальной среды

При проведении диагностических исследований нами были использованы среда Сабуро и среды ДТМ 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 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. 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.

Следующим этапом исследования являлось изучение влияния углеводного состава питательной среды «ДТМ-Эксперт» на стимуляцию роста контрольных штаммов дерматофитов. 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 (манноза, инозит, маннит, лактоза, арабиноза, адонит, сорбит, дульцит, ксилоза, рамноза, раффиноза, салицин, мальтоза, глюкоза). 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.

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

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 *Penicillium chrysogenum* и на 7 день для *Aspergillus niger*. Среда с глюкозой поменяла цвет на 3 и на 2 сутки при росте *M. canis* и *T. mentagrophytes*, соответственно (таблица 3).

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

Исходя из результатов предыдущего этапа, было решено изучить комбинацию маннита и глюкозы в разных пропорциях. Для этого сделали 2 варианта среды: в одном варианте использовали 5 г маннита и 5 г глюкозы (V), в другом – 10 г маннита и 10 г глюкозы (VI). 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 (таблица 3).

Таблица 3 - Срок изменения цвета экспериментальной среды ДТМ при росте контрольных штаммов (сутки).

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

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.

Подбор селективных добавок

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. Было установлено, что все контрольные штаммы бактерий были высокочувствительны к фторхинолонам (энрофлоксацин, цiproфлоксацин) 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.

Каждый вид полевых изолятов бактерий был представлен 5 штаммами, полученными из коллекции патогенных и вакцинных штаммов микроорганизмов ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ. При определении восприимчивости наиболее часто бактерии оказывались чувствительны к энрофлоксацину, реже к цiproфлоксацину.

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. В ходе исследования была получена концентрация антибиотика, которая составляет 0,1 мг/мл, способная подавлять рост потенциальных бактерий, находящихся на коже животных.

Для обеспечения селективности среды используется циклогексимид. 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.

Установлено, что циклогексимид в концентрации 0,5 мг/мл способен ингибировать рост контрольных штаммов плесневых грибов *A. niger* и *P. chrysogenum*.

Подбор дополнительных питательных добавок для стимуляции роста

На данном этапе нами был полностью воспроизведен и улучшен состав диагностической питательной среды, определены все основные необходимые для роста и дифференциации 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 углевода. В качестве контроля использовали серию среды «ДТМ-Эксперт», в которую вышеназванные дополнительные компоненты не вносились.

В результате проведенного опыта установлено выраженное положительное влияние на скорость роста *M. canis* среды с добавлением 4 комплекса. Выраженный рост колоний наблюдался на 2-3 сутки. 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*.

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.

Питательные компоненты оказывали значительное влияние на индикаторные свойства экспериментальной среды «ДТМ-Эксперт», 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). При этом изменение цвета (покраснение) наблюдали уже через 48-72 ч. после посева, что быстрее, чем в остальных вариантах.

Апробация среды на клиническом материале от больных животных

Первым этапом апробацию среды проводили в сравнении с импортной ДТМ «DermaKit» (Италия). Кроме коммерческой ДТМ, материал от животных высевался на опытный образец «ДТМ-Эксперт», в составе которого были маннит – 5 г., глюкоза – 5 г., мясной пептон – 10 г., феноловый красный – 0,2 г., комплекс углеводов – 7 г., агар-агар – 18 г., циклогексимид – 0,5 г., энрофлоксацин – 0,1 г., уровень рН – 4,8; а в качестве контроля – на среду Сабуро с хлорамфениколом.

Всего было исследовано 40 образцов шерсти, из которых положительных по дерматофитозу было 14. Эффективность среды Сабуро составила 64,3%. Из-за отсутствия в среде Сабуро ингибиторов, часто возникал обильный рост грибов-контаминантов.

Эффективность импортной среды ДТМ составила 92,8%. Начало роста в среднем происходило на 6-8 сутки. 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. 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 среднем на 7-9 сутки. 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 (таблица 4).

Таблица 4 - 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, %
		12	85,7%				
«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 примерно 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, ДТМ HiMedia выявила возбудителя в 13 (86.6%) из 15 случаях. В среднем, скорость покраснения «ДТМ-Эксперт» после посева составила 10 суток, ДТМ HiMedia – 11. Также в испытуемых средах отмечено ложноположительное покраснение на рост плесневых грибов. Из 54 образцов, на экспериментальной среде выявлено 3 (5.56%) ложноположительных случая, покраснение наступало в среднем на 7 сутки, на HiMedia – 5 (9.2%) случаев, покраснение на 7 сутки (таблица 5).

Таблица 5 - 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	-

«ДТМ-Эксперт» 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. Несмотря на то, что видимый рост дерматофитов наступает одновременно или немного позже, чем на импортных ДТМ, цвет экспериментальной среды меняется раньше по сравнению с другими зарубежными аналогами.

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 разделяли на 4 одинаковые части и исследовали различными способами: с помощью лампы Вуда, прямой микроскопии, микроскопии с калькофлюором белым, посевом на среду Сабуро и «ДТМ-Эксперт». В результате из 54 образцов шерсти выделено 16 дерматофитов.

С помощью прямой микроскопии дерматофитозы подтвердили только в 56,3 % (9 из 16) случаях. Ложноположительных результатов 7.4% (4 из 54). 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. Микроскопия с калькофлюором выявила возбудитель в 15 случаях, что составило 93,8%. При этом было 5 (9,3%) ложноположительных результатов. 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. Количество ложноположительных изменений цвета среды составило 5,6% (3 из 54). Во всех случаях изменение вызывали плесени из рода *Alternaria*.

Таким образом, наилучшую эффективность показали два метода: посев на ДТМ, выявив все положительные образцы, и прямая микроскопия с добавлением флюорохромного красителя калькофлюора.

Заключение

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 миконосительства, 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 превалирующее 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 ДТМ: прямая микроскопия позволяет выявить 7,4% больных, посевы на среду Сабуро - 6,5%, среда ДТМ - 27,7%.

5. Разработана и внедрена в практику диагностическая питательная среда «ДТМ-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 миконосительства 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».

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.РА01.В.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.

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.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Овчинников Р.С., Капустин А.В., Лаишевцев А.И., **Савинов В.А.** Диагностика дерматофитозов животных // Методические указания. – 2021. – С. 31.
2. **Савинов В.А.** Распространенность дерматофитозов у мелких домашних животных // Успехи медицинской микологии. – 2018. – Т. 19. – С. 373-375.
3. Овчинников Р.С., **Савинов В.А.**, Капустин А.В. Современные аспекты диагностики дерматофитозов мелких домашних животных // Успехи медицинской микологии. – 2019. – Т. 20. – С. 721-726.
4. Овчинников Р.С., Ершов П.П., Капустин А.В., **Савинов В.А.**, Гайнуллина А.Г. Микологический скрининг домашних животных-важный способ профилактики дерматофитозов человека // Успехи медицинской микологии. – 2019. – Т. 20. – С. 712-716.
- 5.* **Савинов В.А.**, Овчинников Р.С., Южаков А.Г., Хабарова А.В., Гайнуллина А.Г. Новые виды возбудителей в этиологии дерматофитозов животных-компаньонов в Московском регионе // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2021. – №. 9. – С. 15-25.
- 6.* **Савинов В.А.**, Овчинников Р.С., Капустин А.В., Гайнуллина А.Г. Экспресс-диагностика дерматофитозов животных // Аграрная наука. – 2019. – №. 10. – С. 20-24.
- 7.* **Савинов В. А.** Заболеваемость дерматофитозами мелких домашних животных в Москве // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2020. – №. 11. – С. 35-41.
8. **Савинов В.А.**, Овчинников Р.С., Капустин А.В., Шастин П.Н. Оптимизация углеводного состава среды ДТМ для стимуляции роста дерматофитов // Успехи медицинской микологии. – 2020. – Т. 21. – С. 60-64.
9. **Savinov V.A.**, Ovchinnikov R.S., Kapustin A.V., Laishevtsev A.I., Gulykin A.M. Development of a differential diagnostic nutrient medium for the express diagnosis of animal dermatophytosis // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – IOP Publishing, 2019. – Т. 315. – №. 2. – С. 022071.
10. Ovchinnikov R. S., **Savinov V.A.**, Gaynullina A.G., Kapustin A.V., Laishevtsev A.I. Epidemiological survey of ringworm outbreak in cat shelter // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – IOP Publishing, 2020. – Т. 421. – №. 8. – С. 082026.
11. **Savinov V.A.**, Kapustin A.V., Ovchinnikov R.S., Shastin P.N., Laishevtsev A.I. Incidence and seasonal variation of pet dermatophytosis in Moscow region // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – IOP Publishing, 2020. – Т. 548. – №. 7. – С. 072048.
12. **Savinov V.A.**, Ovchinnikov R.S., Gaynullina A.G., Khabarova A.V., Kapustin A.V. Selection of nutritive compounds to improve growth and indicative

properties of the DTM-Expert medium for dermatophytic fungi // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – IOP Publishing, 2021. – Т. 839. – №. 2. – С. 022058.

13. Патент на изобретение RU 2741097, - 09.04.2020. // Штаммы мицелиальных грибов *Microsporum canis* и *Trichophyton mentagrophytes*, предназначенные для контроля ростовых свойств питательных сред / Капустин А.В., Овчинников Р.С., Гайнуллина А.Г., Лаишевцев А.И., **Савинов В.А.**, Якимова Э.А., Иванов Е.В., Исаев Ю.Г.

14. Патент на изобретение RU 2745159, - 09.04.2020. // Селективная питательная среда для выделения возбудителей дерматофитозов / **Савинов В.А.**, Капустин А.В., Овчинников Р.С., Гайнуллина А.Г., Лаишевцев А.И., Гулюкин А.М.

* - журналы из списка ВАК