

Науковий вісник Львівського національного університету  
ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького.  
Серія: Ветеринарні науки

Scientific Messenger of Lviv National University  
of Veterinary Medicine and Biotechnologies.  
Series: Veterinary sciences

ISSN 2518–7554 print  
ISSN 2518–1327 online

doi: 10.32718/nvlvet9505  
http://nvlvet.com.ua

UDC 619: 615. 281. 8: 615. 363

## The selection of the concentration of clotrimazole and povidone-iodine as the main active substances of the “Micromar” antifungal agent

Ia.V. Kiser, Yu.V. Martyniv

Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies Lviv, Ukraine

### Article info

Received 02.09.2019  
Received in revised form  
02.10.2019  
Accepted 03.10.2019

Stepan Gzhytskyi National  
University of Veterinary Medicine  
and Biotechnologies Lviv,  
Pekarska Str., 50, Lviv,  
79010, Ukraine.  
Tel.: +38-097-155-47-53  
E-mail: julia\_yush@ukr.net

**Kiser, Ia.V., & Martyniv, Yu.V. (2019). The selection of the concentration of clotrimazole and povidone-iodine as the main active substances of the “Micromar” antifungal agent. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences, 21(95), 27–31. doi: 10.32718/nvlvet9505**

*Microsporia is one of the most common skin diseases of cats, most often provoked by the pathogen *Microsporum canis*. The pathogen of microsporum has highly contagious properties and for a long time remains capable of infection in the environment. It is important for the veterinary doctor not only to carry out complex therapy, but also to prevent the spread of the pathogen in the environment and to prevent the occurrence of secondary pyoderma during the course of microspores. Due to the tendency to the growth of fungal diseases, the development of the pathogen's resistance existing medicines, there is a need for effective antifungal medicines that have fungicidal and fungicidal effect. The development of the antifungal agent “Micromar” will allow to carry out complex treatments for the treatment of microspores in cats. Also, thanks to the properties of basic active ingredient? Th use of “Micromar” will provide acceleration of recovery period. The combination of clotrimazole and povidone iodine will provide an effective antifungal action with an antiseptic effect. Clotrimazole is a broad-spectrum antifungal agent that does not cause pathogen resistance. In turn, povidone iodine will provide antiseptic protection to the affected area of the cat's body with a prolonged effect. The studies were conducted to determine the concentration of clotrimazole and povidone iodine as the main active substances of the antifungal agent “Micromar” in the laboratory in nutrient media during the cultivation of the fungus *Microsporum sanis*. The results of the studies showed that the pure culture of the pathogen is sensitive to clotrimazole at a concentration of 0.25% and iodine povidone 5%. In appropriate concentrations, it is recommended to use clotrimazole and povidone iodine for the manufacture of the antifungal agent Micromar.*

**Key words:** cat, microsporum, clotrimazole, povidone iodine, culture of fungus *Microsporum sannis*, “DERMAKIT” environment, Saburo agar, blood agar, Muller-Hinton agar.

## Підбір концентрації клотримазолу та повідон-йоду як основних діючих речовин протигрибкового засобу “Мікромар”

Я.В. Кісера, Ю.В. Мартинів

Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького,  
м. Львів, Україна

*Мікроспорія є одним з найпоширеніших шкірних захворювань котів, що найчастіше провокується збудником *Microsporum canis*. Збудник мікроспорії має висококонтагіозні властивості і протягом тривалого часу залишається здатним до зараження в навколишньому середовищі. Тому для лікаря ветеринарної медицини важливо не лише провести комплексну терапію, а й запобігти розповсюдженню збудника в навколишньому середовищі та виникненню вторинних піодермій за перебігу мікроспорії. Через тенденцію до росту грибкових захворювань, розвитку стійкості збудника до наявних лікарських засобів виникає потреба в ефективних протигрибкових препаратах, які володіють фунгіцидною та фунгістатичною дією. Розробка протигрибкового засобу “Мікромар” дасть змогу проводити комплексні обробки для лікування мікроспорії у котів. Також завдяки властивостям основних діючих речо-*

вин використання "Мікрмару" забезпечить прискорення періоду одужання. Поєднання клотримазолу та повідон-йоду забезпечить ефективну протигрибкову дію з антисептичним ефектом. Клотримазол являє собою протигрибковий агент широкого спектру, що не викликає резистентності збудника. Своєю чергою повідон-йод забезпечить антисептичний захист ураженої ділянки тіла kota з пролонгованим ефектом. Дослідження проведені з метою підбору концентрації клотримазолу та повідон-йоду як основних діючих речовин протигрибкового засобу "Мікрмар" в умовах лабораторії на поживних середовищах при культивуванні грибка *Microsporum canis*. Одержані результати досліджень засвідчили, що чиста культура збудника виявляє чутливість до клотримазолу в концентрації 0,25% та повідон-йоду 5%, що підтверджено утворенням радіусу чутливості при внесенні різних концентрацій даних речовин. У відповідних концентраціях рекомендовано використання клотримазолу та повідон йоду для виготовлення протигрибкового засобу "Мікрмар".

**Ключові слова:** кіт, мікроспорія, клотримазол, повідон йод, культура грибка *Microsporum canis*, середовище "DERMAKIT", агар Сабуро, кров'яний агар, агар Мюллера-Хінтона.

## Вступ

Грибкові ураження шкіри в загальній структурі дерматологічних нозологій займають друге місце після піодермій. Провідна роль у виникненні мікозів належить дерматофітам (до 94%). Основним збудником хвороби у котів є *Microsporum canis*, частка якого складає близько 95% усіх дерматофітозів котів (Sparkes et al., 1994; Mancianti et al., 2003; Cafarchia et al., 2006). Мікроспорія – це дерматофітоз, зазвичай поверхневий, що уражає роговий шар епідермісу, рідше – кігті. Дерматофіти передаються при контакті з зараженою шерстю та лусочками або спорами грибів на тваринах. Предмети догляду, транспортні клітки, підстилка є потенційними джерелами первинного або вторинного інфікування. У випадку *Microsporum canis* волосні стержні, що містять інфіковані артроспори, можуть залишатися здатними до зараження в навколишньому середовищі протягом 1,5 року (Sparkes et al., 2000). *Microsporum canis* володіє ферментативними властивостями. Фермент кератиназа сприяє появі запалення та свербіжу. Як наслідок – розчухування уражених ділянок, травмована шкіра вторинно інфікується бактеріями. Лікування мікроспорії потребує комплексного підходу, який включає місцеві обробки та системну терапію (Budumjan & Panova, 2003). Місцеві обробки проводять з метою скорочення термінів лікування, профілактики рецидивів хвороби та розповсюдження збудника в навколишньому середовищі (Ruppel, 2018). При виборі препаратів для місцевих обробок для лікування мікроспорії у котів лікар ветеринарної медицини має підібрати комплексний засіб, який повинен включати протигрибковий та протимікробний компонент.

У зв'язку з тенденцією росту грибкових захворювань, розвитком стійкості збудника до наявних лікарських засобів виникла потреба в ефективних протигрибкових засобах, які володіють фунгіцидною або фунгістатичною дією (Klimko, 2007).

Азоли – найбільш численна група синтетичних протигрибкових засобів. Механізм їхньої дії полягає в порушенні синтезу ергостеролу – основного структурного компонента клітинної мембрани грибів. Ефект пов'язаний з інгібуванням цитохром Р450-залежних ферментів, в тому числі 14-альфа-деметилази (стерол-14-деметилаза), яка каталізує реакцію перетворення ланостеролу в ергостерол, що приводить до порушення синтезу ергостеролу клітинної мембрани грибів і порушення цілісності мембрани клітини грибів.

Клотримазол працює як протигрибковий агент різного спектру дії. Входить до групи азолів – синтетичний антимікотик II покоління. Азоли мають широкий спектр протигрибкової дії, справляють фунгістатичний ефект. Вони діють також на деякі грампозитивні коки та коринебактерії. Клотримазол проявляє помірну активність щодо анаеробів. Протигрибкова дія азолів обумовлена порушенням синтезу ергостеролу – основного структурного компонента клітинної мембрани гриба.

Клотримазол погано адсорбується при пероральному використанні, але має високу проникну здатність з поверхні шкіри, накопичується в роговому шарі епідермісу. Він є високоліпофільною речовиною, що легко проникає крізь шкіру (Kovalenko & Viktorova, 2011). Фармакокінетичні дослідження після дермального використання довели, що клотримазол незначно адсорбується із інтактної або пошкодженої шкіри всередину організму (в кров). Отримані результати кількості клотримазолу в сироватці крові були нижчі ніж 0,001 мкг/мл, що вказує на те, що клотримазол, який застосовують місцево, не справляє патогенного впливу (Krylov, 2001). При оральному застосуванні клотримазолу LD50 для ссавців становить 750 мг/кг (Jaremchuk et al., 2010). Це означає, що навіть за умови вилізуювання обробленої ділянки шкіри kota побічні реакції зведені до мінімуму.

Вибір клотримазолу як основної діючої речовини обумовлений тим, що вторинна резистентність грибків до групи азолів розвивається вкрай рідко.

Повідон-йод є комплексом йоду та полімеру полівінілпіролідону, що виділяє йод протягом певного часу після його нанесення на шкіру. Проявляє швидку бактерицидну дію на грампозитивні та грамнегативні бактерії, активний щодо патогенних грибів, вірусів та простіших. Не викликає резистентності. Протимікробна дія базується на пошкодженні йодом клітинної стінки мікроорганізмів. Звільняючись з комплексу із полівінілпіролідонем при контакті з біологічним матеріалом, йод утворює з білками клітини бактерій йодаміни, коагулює їх та викликає загибель мікроорганізмів (Kovalenko & Viktorova, 2011). Механізм дії – вільний йод здійснює швидкий бактерицидний ефект, а полімер є депо для йоду.

Діапазон концентрації повідон-йоду для застосування на покривні тканини коливається від 1% до 10% (Ramsey, 2007).

Тому в комплексі ці діючі речовини (клотримазол та повідон-йод) забезпечать не лише прискорення

періоду одужання, а й можуть запобігти виникненню ускладнень з боку вторинних піодермій.

Антисептичний засіб “Мікромар” на основі повідон-йоду та клотримазолу дасть можливість проводити лікувально-профілактичні обробки тіла тварини з метою запобігання розповсюдження спор збудника мікроспорії в зовнішньому середовищі, прискорення періоду одужання тварини.

*Мета дослідження* – підбір концентрації клотримазолу та повідон-йоду як основних діючих речовин протигрибкового засобу “Мікромар”.

### Матеріал і методи досліджень

Первинна діагностика та забір матеріалу від хворих мікроспорією котів проводився в приватній ветеринарній клініці “Імпульс”. Дослідження проводилась в мікробіологічній лабораторії санітарно-епідеміологічного загону при клінічному госпіталі Державної прикордонної служби України (військова частина 2522) м. Львова.

Для досліджень в умовах клініки використовували ртутно-кварцеву лампу “Вуда” та селективне середовище з рН індикатором “DERMAKIT” фірми Biorpronix.

Забір лусок та шерсті з границі пошкодження проводили з допомогою стерильного леза скальпеля. Відібраний матеріал поміщали на поверхню середовища “DERMAKIT”, не занурюючи в нього. Закрили пробірку, щільно не закупорюючи її, щоб попередити утворення вологи, яка може вплинути на результати дослідження. Витримували при кімнатній температурі 22–25°C протягом періоду тестування.

DERMAKIT – це селективне середовище дерматофітів (DSM), що містить поживні речовини, які прискорюють ріст дерматофітів, вибіркові антибіотики, що сповільнюють ріст непатогенних сапрофітних грибів і бактерій. Індикатор рН, зміною кольору на червоний вказує на присутність дерматофіта в результаті продукування лужних метаболітів родами Мікроспоридії, Епідермофітон і Грибок стригучого лишая. DERMAKIT дає можливість отримання результатів вже через 3 дні. Дане середовище розроблене на основі рецептури Тапліна та співавторів (Taplin et al., 1969).

З отриманої чистої культури *Microsporum canis* було проведено забір в стерильну транспортну пробірку для подальших досліджень в мікробіологічній лабораторії на щільних поживних середовищах: кров’яний агар (TU U 37 219230-001 2011), агар Мюллера-Хінтона для фунгіцидів (TU U 24.4-37219230-001:2011).

Для внесення різних концентрацій клотримазолу та повідон-йоду були підготовлені стерильні диски з фільтрувального паперу в сухо-жаровій шафі, які містилися в крафт-пакеті при температурі 120 °C – 45 хвилин. Для проведення досліді було обрано техніку поверхневого посіву на кров’яному агарі в чашці Петрі. З отриманої культури готували суспензію для визначення чутливості збудника *Microsporum canis* до

клотримазолу та повідон-йоду. Отриману суспензію вносили на агар Мюллера-Хінтона.

Для визначення активності антибактеріальних препаратів використовувався диско-дифузійний метод. Чашку Петрі ділили на сектори. В кожен з секторів на поверхню середовища вносили паперові диски просочені, клотримазолом та повідон-йодом різної концентрації. Пригнічення росту відбувалось в результаті дифузії антибактеріального препарату зі збудником, який вносився на поживне середовище. Диско-дифузійний метод дає можливість оцінити антибактеріальну активність досліджуваних речовин (клотримазолу та повідон йоду). Результатом дослідження є критерій чутливості (чутливий, помірно-стійкий, резистентний).

### Результати та їх обговорення

При огляді тіла хворих мікроспорією котів з допомогою лампи “Вуда” виявлено характерне жовто-зелене світіння ділянки кореня хвоста (рис. 1).

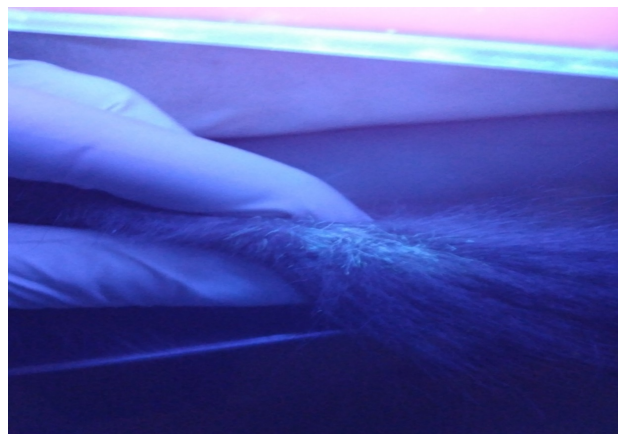


Рис. 1. Специфічне світіння при мікроспорії котів

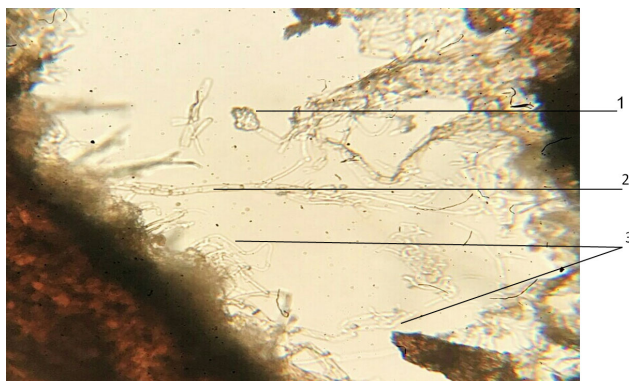
Колонії збудника *Microsporum canis* на селективному середовищі “DERMAKIT” ідентифіковано на 4-й день (рис. 2, 3).



Рис. 2. Культура гриба *Microsporum canis* на селективному середовищі Dermakit

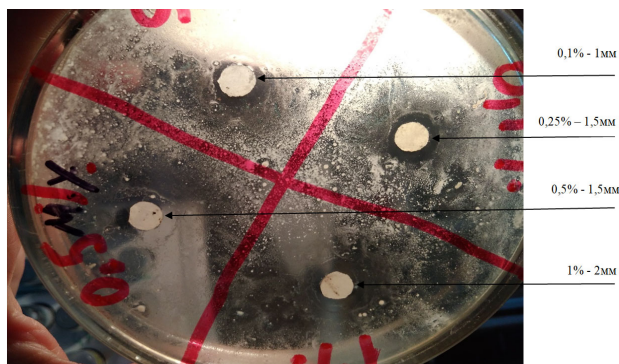
Проведеними дослідженнями з визначення чутливості отриманої культури збудника *Microsporum canis*

до клотримазолу та повідон-йоду в різних концентраціях як основних діючих речовин протигрибкового засобу “Мікромар” встановлено, що для зовнішнього застосування рекомендована концентрація клотримазолу 1%. Відштовхуючись від загальноприйнятих концентрацій клотримазолу як притирибкового компоненту було досліджено його активність в різних розведеннях.



**Рис. 3.** Культура гриба *Microsporium canis*. Нативна мікроскопія збільшення S40/0,65. 1. Хламідоспори. 2. Макроконідії. 3. Міцелій.

На селективне середовище Мюллера-Хінтона в чашці Петрі рівномірно внесли суспензію збудника *Microsporium canis*, поділили на 4 сектори відповідно до концентрації клотримазолу, внесеної на паперові диски (рис. 4).



**Рис. 4.** Радіус чутливості клотримазолу на селективному середовищі Мюллера-Хінтона

Утворена прозора ділянка навколо диска (радіус чутливості) свідчить про протигрибкову активність клотримазолу щодо збудника *Microsporium canis*. Проведена оцінка величини мінімальної інгібуючої концентрації при підборі клотримазолу (табл. 1) засвідчила, що при концентрації клотримазолу 0,1% радіус чутливості 1 мм, критерій оцінки – помірно-стійкий; при концентрації клотримазолу 0,25% радіус чутливості 1,5 мм, критерій оцінки – чутливий; при концентрації клотримазолу 0,5% радіус чутливості 1,5 мм, критерій оцінки – чутливий; при концентрації клотримазолу 1% радіус чутливості 2 мм, критерій оцінки – чутливий.

**Таблиця 1**

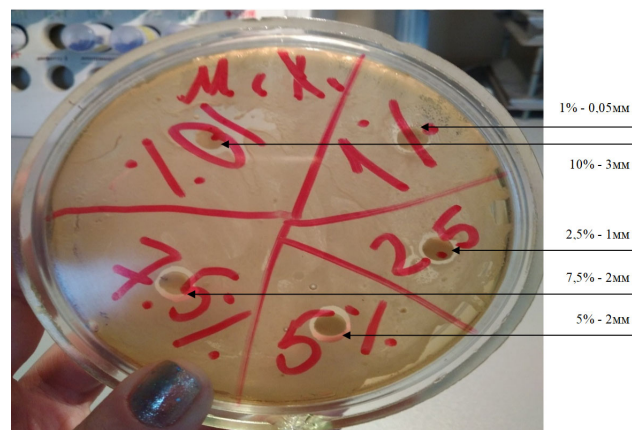
Оцінка величини МІК при підборі концентрації клотримазолу. Середовище Мюллера-Хінтона для фунгіцидів

Концентрація клотримазолу (%)	Радіус чутливості (мм)	Критерій оцінки
0,1	1 мм	Помірно-стійкий
0,25	1,5 мм	Чутливий
0,5	1,5 мм	Чутливий
1	2мм	Чутливий

МІК – мінімальна інгібуюча концентрація

Радіус чутливості при концентраціях 0,25 та 0,5% становить 1,5 мм. Беручи до уваги, що ефективність при обох концентраціях однакова рекомендовано 0,25% клотримазол як компонент протигрибкового засобу “Мікромар”.

Повідон-йод як антисептичний компонент має широкий спектр застосування: від 1% до 10% розчину Найменша концентрація повідон-йоду може використовуватися для обробок слизових оболонок, а найбільша – при обробці шкіри під час проведення хірургічних втручань. Враховуючи показання до використання повідон-йоду було проведено визначення його чутливості до збудника *Microsporium canis* в таких концентраціях: 1%, 2,5%, 5%, 7,5% та 10%. Чашку Петрі поділили на 5 секторів, в кожен з яких було внесено відповідну концентрацію повідон-йоду (рис. 5).



**Рис. 5.** Радіус чутливості повідон-йоду на селективному середовищі Мюллера-Хінтона

Утворена прозора ділянка навколо диска (радіус чутливості) свідчить про протигрибкову активність повідон-йоду щодо збудника *Microsporium canis*. Проведена оцінка величини МІК при підборі концентрації повідон-йоду (табл. 2) засвідчила, що при концентрації 1% радіус чутливості 0,05 мм, критерій оцінки – помірно-стійкий; при концентрації 2,5% радіус чутливості 1,0 мм, критерій оцінки – помірно-стійкий; при концентрації 5% радіус чутливості 2,0 мм, критерій оцінки – чутливий; при концентрації 7,5% радіус чутливості 2,0 мм, критерій оцінки – чутливий; при кон-

центрації 10% радіус чутливості 3,0 мм, критерій оцінки – чутливий.

**Таблиця 2**

Оцінка величини МІК при підборі концентрації повідон-йоду. Середовище Мюллера-Хінтона для фунгіцидів

Концентрація повідон-йоду (%)	Радіус чутливості (мм)	Критерій оцінки
1	0,05	Помірно-стійкий
2,5	1	Помірно-стійкий
5	2	Чутливий
7,5	2	Чутливий
10	3	Чутливий

МІК – мінімальна інгібуюча концентрація

Радіус чутливості при концентраціях 5% та 7,5% становить 2,0 мм. Беручи до уваги, що ефективність при обох концентраціях однакова, рекомендовано 5% повідон-йод як компонент протигрибкового засобу “Мікромар”.

Отже, комбінація 0,25% клотримазолу та 5% повідон-йоду в протигрибковому засобі “Мікромар” забезпечить стійку фунгіцидну та пролонговану антибактеріостатичну дію.

**Висновки**

1. Культура грибка *Microsporum canis* чутлива до клотримазолу та повідон-йоду, що підтверджено утворенням радіусу чутливості при внесенні різних концентрацій даних речовин при культивуванні збудника на агарі Мюллера- Хінтона.

2. Чиста культура *Microsporum canis* виявляє чутливість до клотримазолу в концентрації 0,25% та повідон-йоду 5%, які взяті за основу для виготовлення протигрибкового засобу “Мікромар”.

*Перспективи подальших досліджень.* У перспективі будуть продовжені дослідження з апробації протигрибкового засобу “Мікромар” на мурчаках та порівняння його дії з іншими протигрибковими засобами.

**References**

Budumjan, T.M., & Panova, E.O. (2003). Jetiologija i lechenie zooantropoznoj mikrosporii. Rossijskij zhurnal kozhnyh i venericheskikh boleznej, 6, 33–35 (in Russian).

Cafarchia, C., Romito, D., Capelli, G., Guillot, J., & Otranto, D. (2006). Isolation of *Microsporum canis* from the hair coat of pet dogs and cats belonging to owners diagnosed with *M. canis* tinea corporis. *Vet. Dermatol*, 17, 327–331. doi: 10.1111/j.1365-3164.2006.00533.x.

Jaremchuk, A.A., Polovko, N.P., & Strilec, O.P. (2010). Sravnitel'noe izuchenie protivogribkovoju aktivnosti lekarstvennyh sredst. *Zhurnal Vestnik farmacii. Izdatel'stvo: Vitebskij gosudarstvennyj medicinskij universitet (Vitebsk)*, 56–60 (in Russian).

Klimko, N.N. (2007). Mikozy: diagnostika i lechenie: Rukovodstvo dlja vrachej. M.: Prem'er MT (in Russian).

Kovalenko, V.N., & Viktorova, A.P. (2011). Kompendium 2011 – Lekarstvennye preparaty. K.: Morion (in Russian).

Krylov, Ju.F. (2001). Jenciklopedija lekarstv. M. (in Russian).

Mancianti, F., Nardoni, S., Corazza, M., D'achille, P., & Ponticelli, C. (2003). Environmental detection of *Microsporum canis* arthrospores in the households of infected cats and dogs. *J. Feline Med. Surg.*, 5, 323–328. doi: 10.1016/S1098-612X(03)00071-8.

Ramsey, I. (2007). Small animal formulary. BSAVA. 6th edition. Reprinted with corrections.

Ruppel', V.V. (2018). Dermatofitija. Kak diagnostirovat' i lechit' v uslovijah veterinarnoj kliniki. *Veterinarnyj Peterburg*, 2. <https://spbvet.info/zhurnaly/2-2018/dermatofitiya-kak-diagnostirovat-i-lechit-v-usloviyakh-veterinarnoy-kliniki> (in Russian).

Sparkes, A.H., Robinson, A., MacKay, A.D., & Shaw, S.E. (2000). A study of the efficacy of topical and systemic therapy for the treatment of feline *Microsporum canis* infection. *J. Feline Med. Surg.*, 2, 135–142. doi: 10.1053/jfms.2000.0093.

Sparkes, A.H., Werrett, G., Stokes, C.R., & Gruffydd-Jones, T.J. (1994). *Microsporum canis*: Inapparent carriage by cats and the viability of arthrospores. *J. Small Anim. Pract.*, 35, 397–401. doi: 10.1111/j.1748-5827.1994.tb03861.x.

Taplin, D., Zaias, N., Rebell, G., & Blank, H. (1969). Isolation and recognition of dermatophytes on a new medium (DTM). *Arch Dermatol.*, 99(2), 203–209. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5763202>.

TU U 24.4-37219230-001:2011 (2011). Metod pryhotuvannia aharu Miullera-Khintona dlja funhitsydiv (in Ukrainian).

TU U 37 219230-001 2011 (2011). Metod pryhotuvannia krovianoho aharu (in Ukrainian).