

ОЦІНЮВАННЯ ВІРУЛЕНТНОСТІ ДЕРМАТОМІЦЕТІВ У ХВОРИХ ТВАРИН

Висвітлено метод оцінювання вірулентності патогенних дерматомицетів, виділених від хворих тварин, який заснований на використанні мацерованої шкіри молодих статевонезрілих тварин (миші, щурі, мурчакі, цуценята, кошенята, кроленята, телята тощо), що дає можливість діагностувати дерматомікоз спричинений дерматомицетами родів *Microsporium* і *Trichophyton*.

Ключові слова: вірулентність, молоді тварини, збудники дерматомікозів, штами, миші, щурі, мурчакі, кошенята, цуценята, кроленята, телята.

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

Проте спроби диференціації вірулентності штампів патогенних дерматомицетів, збудників дерматомікозів тварин на основі будь-якого тест-критерію практично відсутні у науковій літературі. 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 пісеневих 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 ступені токсичності кормів і культур грибів: перша ступінь (дуже слаботоксичні) – почервоніння, підвищена чутливість шкіри, лущення; друга ступінь (слаботоксичні) – почервоніння, болочість, незначне потовщення шкіри, лущення, дрібні одиночні, з просіяне зерно або менші, жовтуваті бульбашки; третя ступінь (токсичні) – почервоніння, сильне потовщення, болочість, складчастість шкіри, на всій поверхні вогнища жовтуватих бульбашок, сухий поверхневий некроз, іноді виразки і суцільний тонкий струт; четверта ступінь (сильнотоксичні) – 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, неуряжену 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 досліджуваній матеріал розтирають у ступці і наносять на попередньо скарифіковану шкіру. Щоб уникнути зализування чи розчісування, на уражені 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 штампів грибів, що вивчаються, оскільки при напшкірній аплікації не відоме фактичне число клітин, що спричинило експериментальний дерматомікоз.

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

Матеріали і методи дослідження. Епізоотичні (польові) ізоляти збудників дерматомікозів відібрали 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 *Microsporium 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 *Microsporium canis* та 28 – *Microsporium gypseum*, від коней – 12 ізолятів *Microsporium canis* та 8 – *Microsporium* 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, мурчакі, цуценята, кошенята, кроленята, телята, а також статевозрілих тварин зазначених вище видів. 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 проводили 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.

Приготування суспензій клітин дерматомицетів і підрахунок їх концентрацій. В пробірки з вищезгаданою 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 (мікроконідій, макроконідій, фрагменти міцелію, артроспори тощо) підраховували за допомогою камери Горяєва. Спочатку визначали концентрацію

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

Вміст всіх елементів дерматомицету в 1 см³ суспензії визначали за формулою.

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

де К – шукане число всіх елементів дерматомицету; П – кількість всіх елементів дерматомицету у п'яти великих квадратах першої сітки; В – число всіх елементів дерматомицету у п'яти великих квадратах другої сітки; Р – розведення.

Після підрахунку всіх елементів дерматомицету у вихідній суспензії їх концентрацію доводили, додаючи 0,85%-ний розчин NaCl до 1x 10⁸. Далі готували ряд послідовних 10-кратних розведень (1x10⁷; 1x10⁶; 1x10⁵; 1x10⁴; 1x10³). Для цього у п'ять пробірок наливали по 4,5 см³ стерильний 0,85%-ний розчин NaCl. У першу з них вносили 0,5 см³ суспензії всіх елементів дерматомицету, що досліджували, ретельно перемішували і новою піпеткою відбирали 0,5 см³ суспензії цього розведення та перенесли 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 1x10⁷, у другій – 1x10⁶, у третій – 1x10⁵ і т. д. Враховуючи, що при зараженні дослідним тваринам буде нанесено по 0,1 см³ суспензії, загальна доза, що заражує, становитиме 1x10⁶; 1x10⁵ і так далі клітин в 0,1 см³. Об'єм інюлята суспензії всіх елементів дерматомицету, що наносили на шкіру тест-об'єкта тварин (миші, щурі, мурчаки, цуценята, кошенята, кроленята, телята тощо), як правило, збільшували до 1,0 см³ 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 [1, 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 тварин. Зараження статевонезрілих тварин (миші, щурі, мурчаки, цуценята, кошенята, кроленята, телята) та статевозрілих аналогічного виду проводили на шкіру 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. Дві тварини були контрольними. Їм наносили плацебо – розчин 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 дерматомікозу ознаки (гіперемію, утворення лусочок або скориночок, струпів та ін.). Інфікуючу дозу (ІД50) визначали методом Кербера за модифікацією [7].

Оцінювання ступеня вірулентності штамів патогенних дерматомицетів. У залежності від вірулентності штаму дерматомицету, розрізняли у заражених тварин різний прояв захворювання і термін перебігу. Як правило, оцінювання ступеня вірулентності дерматомицету проводили після повторного рецидиву патологічного вогнища (через 10-14 діб). За цією характеристикою штами збудників дерматомицетів 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 дерматомицетів на молодих статевонезрілих тваринах на 10-14 – ту добу спостережень після зараження їх суспензією – комплексом всіх елементів дерматомицету дозою 2-4 млн/см³ наведені в таблиці. 1.

Таблиця 1

Результати оцінювання ступеня вірулентності дерматомицетів (n=4)

Статевонезрілі тварин	Ступінь вірулентності дерматомицетів			
	Trichophyton verrucosum, штама 22	Trichophyton mentagrophytes, штама 412	Microsporum canis, штама BC	Microsporum gypseum, штама 311
1	2	3	4	5
Миші	++	+++	+++	+++
Щурі	++	+++	+++	+++
Мурчаки	++	+++	+++	++
Кроленята	++	+++	++	++
Кошенята	++	+++	+++	+++
Цуценята	++	+++	+++	+++
Телята	+++	+++	++	+

Примітки: +++ – високовірулентні; ++ – середньовірулентні;

+ – слабковірулентні; – авірулентні штами.

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

Результати оцінювання ступеня вірулентності дерматомицетів (n=4)

Статевозрілі тварини	Ступінь вірулентності дерматомицетів			
	Trichophyton verrucosum, штам 22	Trichophyton mentagrophytes, штам 412	Microsporium canis, штам ВС	Microsporium gypsum, штам 311
1	2	3	4	5
Миші	+	++	++	++
Щури	+	++	++	++
Мурчаки	+	++	++	+
Кролі	+	++	+	+
Коти	+	++	++	++
Собаки	+	++	++	++
Велика рогата худоба	++	++	+	-

Примітки: +++ – високовірулентні; ++ – середньовірулентні; + – слабовірулентні; – авірулентні штами.

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

Висновки.

1. Метод оцінювання вірулентності дерматомицетів можна використати під час діагностики дерматомикозів, викликаних дерматомицетами роду *Microsporium* і *Trichophyton*, а також під час відбору та в процесі селекції виробничих і контрольних штамів.

2. Порівняльні результати оцінювання ступеню вірулентності патогенних дерматомицетів на статевонезрілих та статевозрілих тваринах на 10-14 добу спостережень після зараження їх суспензією комплексом всіх елементів дерматомицету 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 дерматомикозів тварин.

Список використаної літератури

1. Диагностика грибных болезней (микозов и микотоксикозов) животных / [Саркисов А.Х., Королева В.П., Квапшина 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. – М. : 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.И. 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., Смолянкінова 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 дерматомикозів 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.

ОЦЕНКА ВИРУЛЕНТНОСТИ ДЕРМАТОМИЦЕТОВ У БОЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ / А.Н. Волков

*Освещен метод оценки вирулентности патогенных дерматомицетов, выделенных у 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 *Microsporium* и *Trichophyton*.*

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

THE VIRULENCE DERMATOMITSETAMI PATIENTS WITH ANIMALS / A.M. Volkov

Illuminated method for estimating the virulence of pathogenic dermatomisetov isolated from sick animals. The method is based on the use of macerated skin young immature animals (mice, rats, guinea pigs, puppies, kittens, rabbits, calves), which makes it possible to diagnose ringworm caused by Microsporum genera dermatomisetami and Trichophyton.

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

Рецензент – кандидат ветеринарних наук **В.П. Сапейко**