

УДК 619: 582.28

ВІДБІР ДЕРМАТОМІЦЕТІВ ЗА СТУПЕНЕМ ВІРУЛЕНТНОСТІ ДЛЯ СТВОРЕННЯ ІМУНОБІОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ

Волков А.М.

Національний університет біоресурсів і природокористування України,
м. Київ, e-mail: volkov142@gmail.com

У статті наведено результати вивчення епізоотичних штамів родів *Microsporium* і *Trichophyton*, виділених від мишей, щурів, морських свинок, котів, собак, коней та великої рогатої худоби з ознаками мікроспорії та трихофітії. Метою цієї роботи було відбір епізоотичних штамів дерматомицетів за ступенем вірулентності, як претендентів у виробничі вакцинні та контрольні штами збудників дерматомикозів під час експериментального зараження щеплених тварин. Відбір епізоотичних штамів дерматомицетів за ступенем вірулентності проводили згідно методики визначення ступеня вірулентності, яка ґрунтується на використанні мацерованої шкіри молодих тварин, що дає можливість оцінювати ступень вірулентності дерматомицету після повторного рецидиву патологічного вогнища, а за характером розвитку дерматомицету в шкіряних покривах і терміном перебігу шкірну реакцію поділяли на чотири ступені вірулентності: високовірулентні, середньовірулентні, слабовірулентні, авірулентні. Результати відбору епізоотичних штамів дерматомицетів за ступенем вірулентності на шкірі молодих тварин свідчать про те, що всі польові ізоляти виділені від тварин мають відповідну ступень вірулентності. Пасажування епізоотичних штамів дерматомицетів через шкіру сприйнятливих до захворювань тварин: кошенята, кроленята, цуценята, телята підвищує ступінь вірулентності у 2–3 рази та дає змогу визначити вакцинні та контрольні штами дерматомицетів, які будуть використані під час створення імунобіологічних препаратів для специфічної профілактики дерматомикозів тварин.

Ключові слова: штами дерматомицетів, молоді тварини, мікроспорія, трихофітія, препарати.

Дерматомикози (дерматофітози) відносяться до зооантропонозних інфекцій. Профілактика та терапія дерматомикозних інфекцій – одна з актуальних проблем ветеринарної медицини, тому що кількість випадків захворювань мікозної етіології щорічно зростає. Дерматомикози вражають великі та дрібні свійські тварини, а також людину [3, 2, 8]. Науковий та практичний пошук засобів специфічної профілактики дерматомикозів розпочався ще на початку ХХ століття. Створення першої вакцини проти трихофітії великої рогатої худоби було початком розвитку ефективної специфічної профілактики та терапії дерматомикозів [3, 4]. Вірулентність це ступінь патогенності дерматофітів стала основою створення дерматомикозних вакцин [5]. Слід зазначити, що переважна більшість робіт присвячена розробці технологій виготовлення вакцин із музейних штамів та з урахуванням концентрацій мікроконідій [7, 1, 6], у той час не враховувалась циркуляція епізоотичних (польових) штамів та їх вірулентних властивостей на поголів'ї тварин, цьому не приділялось достатньої уваги [5].

Мета роботи – відбір епізоотичних штамів дерматомицетів за ступенем вірулентності, як претендентів у виробничі вакцинні та контрольні штами збудників дерматомикозів під час експериментального зараження тварин.

Матеріали та методи. Досліджували відібрані епізоотичні ізоляти збудників дерматомикозів від мишей, щурів, морських свинок, котів, собак, коней та великої рогатої худоби з різних районів міста Києва та Київської, Чернігівської, Полтавської областей.

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

Відбір епізоотичних штамів дерматомицетів за ступенем вірулентності проводили за розробленою нами методикою яка включає наступні етапи:

а) **Приготування суспензії клітин дерматомицетів і підрахунок їх концентрації.** У пробірки з вирощеною впродовж 20 діб культурою дерматомицету на сусло-агарі, добавляли по 5 см³ стерильного фізіологічного розчину, мікологічним гачком розпушували поверхню культури і ретельно перемішували отриману суспензію. Далі готували послідовні розведення суспензії, використовуючи стерильний 0,85 %-й розчин NaCl у співвідношенні 1:10; 1:20 або 1:40, у залежності від її густини. Кількість всіх елементів дерматомицету (макроконідії, фрагмент міцелію, мікроконідії, 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 усіх елементів дерматомицету здійснювали у 5 великих квадратах (4 по кутах та 1 – у центрі).

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

$$K = \frac{P+B}{2} \times P \times 10^4 \times 5;$$

де К – шукане число всіх елементів дерматомицету; П – кількість всіх елементів гриба у 5 великих квадратах першої сітки; В – число всіх елементів дерматомицету у 5 великих квадратах другої сітки; Р – розведення.

Після підрахунку всіх елементів дерматомицету у вихідній суспензії концентрацію останніх доводили, додаючи 0,85 %-й розчин NaCl, до 10⁻⁸. Далі готували ряд послідовних 10-кратних розведень (10⁻⁷; 10⁻⁶; 10⁻⁵; 10⁻⁴; 10⁻³). Для цього у 5 пробірок наливали по 4,5 см³ стерильний 0,85 %-й розчин NaCl. У першу з них вносили 0,5 см³ суспензії мікроконідій, що досліджуються, ретельно перемішували і новою піпеткою відбирали 0,5 см³ суспензії цього розведення та переносили у наступну пробірку і т. д., щоразу використовуючи нову стерильну піпетку. Таким чином, концентрація клітин у кожній наступній пробірці зменшується в 10 разів і становить у першій 10⁻⁷, у другій – 10⁻⁶, у третій – 10⁻⁵ і т. д. Враховуючи, що при зараженні дослідним молодим тваринам буде нанесено по 0,1 см³ суспензії, загальна доза, що заражує, складатиме 10⁻⁶; 10⁻⁵ і так далі клітин у 0,1 см³.

На відміну від загальноприйнятих методів визначення концентрації, де підраховують лише мікроконідії [3], у запропонованій методиці враховуються всі елементи гриба (макроконідії, міцелій, мікроконідії, артроспори, тощо), все що зустрічається в полі зору, оскільки вони також є носіями вірулентності. Цей прийом дозволяє найбільш точно оцінювати вірулентність дерматомицетів.

б) *Зараження молодих тварин* (миші, шури, морські свинки, цуценята, кошенята, кроленята, телята тощо) проводять на шкірно в ділянці спини, за лопатками. Заздалегідь, залежно від виду тварини, ділянку розміром від 0,5х0,5 см до 6х6 см, вистригали та голили. Шкіру обробляли 70 %-м розчином етилового спирту та мацерували зворотною стороною скальпеля до прояву ознак виразної гіперемії. Далі кожне розведення інфікуючого матеріалу суспензії комплексом елементів гриба (міцелій, мікроконідій, макроконідій, артроспори тощо) в об'ємі 0,1 см³ наносили на підготовлену ділянку шкіри та легенько втирали шпателем. Кожним розведенням заражали не менше 4 тварин. Дві тварини були контрольними. Їм вводили плацебо – розчин 0,85 % NaCl.

Результати зараження визначали на 10–14-ту добу з моменту інфікування та після повторного рецидиву патологічного вогнища, спостереження здійснювали через кожні 3 доби до зникнення клінічних ознак хвороби. У разі позитивного результату зараження, у місці аплікації суспензії виявляли характерні ознаки дерматомікозу (гіперемія, утворення лусочок або скориночок, струпів та ін.). Інфікуючу дозу (ІД50) визначають за методикою Кербера та за її модифікацією [5].

в) *Оцінювання ступеню вірулентності штамів патогенних дерматомицетів*. У залежності від вірулентності штаму дерматомицету, розрізняли у заражених тварин різний прояв захворювання і термін перебігу. За цією характеристикою штами збудників дерматомицетів поділяли на високовірулентні, середньовірулентні, слабовірулентні, авірулентні.

Високовірулентні штами (+++) – обумовлюють 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.

Результати досліджень. Відбір 4-х епізоотичних штамів (*Microsporium canis* № BC, *Microsporium gypseum* № 311, *Trichophyton mentagrophytes* № 412, *Trichophyton verrucosum* № 22) дерматомицетів проводили у кожному випадку підбираючи відповідний до виду тест-об'єкт, використовуючи шкіру молодих, сприйнятливих до захворювань тварин (цуценята, кошенята, кроленята, телята). Результати відбору епізоотичних штамів дерматомицетів за ступенем вірулентності на шкірі молодих тварин (3 групи по 4 голови на кожен штам) свідчить про те, що всі епізоотичні ізоляти виділених від тварин мають відповідну ступінь вірулентності. Послідуочий відбір шляхом пасажування значно підвищував ступінь вірулентності в 2–3 рази, що дало змогу відібрати вакцинні та контрольні штами дерматомицетів. Результати відбору епізоотичних штамів дерматомицетів за ступенем вірулентності на шкіри молодих (кошенята, кроленята, цуценята, телята) тварин наведені в таблиці 1.

Таблиця 1 – Результати відбору епізоотичних штамів дерматомицетів за ступенем вірулентності на шкірі молодих тварин (n= 4)

Пасаж відбору	Ступінь вірулентності у штамів дерматомицетів			
	<i>Microsporium canis</i> BC	<i>Microsporium gypseum</i> 311	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> 412	<i>Trichophyton verrucosum</i> 22
	кошенята	кроленята	цуценята	телята
Епізоотичний	++	+	++	++

ізолят				
1-а пасаж відбору	++	++	++	+++
2-а пасаж відбору	+++	+++	+++	+++
3-я пасаж відбору	+++	+++	+++	+++

Примітки: «+++» – високовірулентні; «++» – середньовірулентні; «+» – слабовірулентні; «±» – авірулентні.

Висновки. 1. Пасажування штамів збудників дерматомікозів через шкіру сприйнятливих молодих тварин підвищувала ступінь вірулентності в 2–3 рази.

2. Відбір епізоотичних штамів дерматоміцетів за показником вірулентності є ефективним та перспективним для визначення кандидатів у вакцинні та контрольні штами, які будуть використані під час виготовлення імунобіологічних препаратів для специфічної профілактики дерматомікозів тварин.

Перспективи подальших досліджень. Необхідно продовжити дослідження щодо визначення залежності ступеня вірулентності від імуногенних властивостей епізоотичних штамів збудників дерматомікозів тварин.

Список літератури

1. Головина Н.П. Разработка и использование метода селекции по признаку спорообразования у трихофитонов при использовании вакцины ТФ-130 ВИЭВ / Н.П. Головина // Бюл. ВИЭВ. – М.: ВИЭВ, 1984. – Вып.54. – С.14-17.
2. Головки В.О. Планування та організація ветеринарних заходів з профілактики і лікування хвороб домашніх тварин в зоні діяльності приватної клініки/ Головки О.В., Смолянінова В.К., Северин Р.В., Савенко М.М., Глущенко Ю.С., Смолянінова І.В. // Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини.: Збірник наукових праць Харківської державної зооветеринарної академії. –Х.: РВВ ХДЗДА, 2013. – Випуск 26, Ч.2 «Ветеринарні науки». – С.211-215.
3. Петрович С.В. Микотические заболевания животных / С.В. Петрович. – М.: Россельхозиздат, 1982. – 192 с.
4. Саркисов А.Х. Основные пути и средства искоренения дерматомикозов в странах мира: достигнутое и задачи // Вестник сельскохозяйственной науки. – М.: Промиздат, 1991. – №1. – С.109-117.
5. Скибіцький В.Г. Визначення вірулентності збудників дерматомікозів тварин. Методичні рекомендації / В.Г.Скибіцький, А.М. Волков. – К.: НУБіП України, 2013. – 11 с.
6. Скрипник В.Г. Селекція дерматофітів за показником спороутворення / Ветеринарна біотехнологія. Бюлетень. – К : Аграрна наука, 2004. – № 5. – С.136-139.
7. Курасова В.В. Методы исследования в ветеринарной микологии / В.В. Курасова, В.В. Костин, Л.С. Малиновская. – М.: Колос, 1971. – 119 с.
8. Харченко С.М. Специфічна профілактика та лікування дерматомікозів собак і котів / С.М. Харченко, А.М. Волков // Матеріали конференції професорсько-викладацького складу, наукових співробітників і аспірантів Навчально-наукового інституту ветеринарної медицини та якості і безпеки продукції тваринництва 11-12 березня 2008 р. – К.: НАУ, 2008. – С.145-146.

SELECTION DERMATOMITSETIV BY THE OF VIRULENCE FOR CREATING IMMUNOBIOLOGICAL PREPARATIONS

Volkov A.M.

National University of bioresources prirodokoristuvannya of Ukraine, Kyiv

The results of the study states epizootic genera Microsporum and Trichophyton, isolated from mice, rats, guinea pigs, cats, dogs, horses and cattle with signs of microspores and trihofitii. The aim of this work was the selection of epizootic strains dermatomitsetiv the degree of virulence as contenders in vaccine production and control strains of dermatomycoses during experimental infection of vaccinated animals. Selection of epizootic strains dermatomitsetiv the degree of virulence was performed according to the methodology for determining the degree of virulence, based on the use of macerated skin of young animals, which makes it possible to assess the degree of virulence dermatomitsetu after repeated recurrence of the pathological focus, and the nature of dermatomitsetu in leather cover and term course of skin reaction were separated four degrees of virulence: of highly, serednovirulentni, slabovirulentni, avirulentni. Selection results epizootic strains dermatomitsetiv the degree of virulence of the skin of young animals indicate that all field isolates isolated from animals with a certain degree of virulence. Pasazhuvannya epizootic strains dermatomitsetiv the skin susceptible to diseases of animals, cats, rabbits, puppies, calves increases the virulence of 2-3 times and helps identify and control vaccine strains dermatomitsetiv that will be used to create immunobiological products for specific prevention dermatomycoses animals.

Keywords: dermatomitsetiv strains of young animals, microspores, trichophytosis, drugs.