

**Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Вологодская государственная
молочнохозяйственная академия имени Н.В. Верещагина»**

Факультет ветеринарной медицины и биотехнологии

Кафедра эпизоотологии и микробиологии

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ДЕРМАТОМИКОЗОВ

Методические указания к выполнению лабораторно-практической
работы для студентов факультета ветеринарной медицины и
биотехнологии по специальности 36.02.01 – Ветеринария,
квалификация выпускника - Ветеринарный фельдшер

**Вологда — Молочное
2024**

УДК 619:616.5(071)
ББК 48.73р30
Л 125

Рецензенты:

канд. вет. наук, доцент кафедры
эпизоотологии и микробиологии Закрепина Е.Н.;
канд. вет. наук, доцент кафедры внутренних
незаразных болезней, хирургии и акушерства Рыжакина Е.А.

Воеводина Ю.А.

Л 125 Лабораторная диагностика дерматомикозов Методические указания к выполнению лабораторно-практической работы для студентов факультета ветеринарной медицины и биотехнологии по курсу: «Участие в лабораторных исследованиях в ветеринарной сфере», по специальности 36.02.01 – Ветеринария, квалификация выпускника - Ветеринарный фельдшер
/Ю.А. Воеводина. - Вологда-Молочное: ИЦ Вологодской ГМХА, 2020. – 29 с.

Указания содержат краткие теоретические сведения, описание лабораторной работы, методику выполнения, задания для выполнения и список рекомендуемых источников. Особое внимание уделяется тем диагностическим методикам, которые сможет применять на практике каждый ветеринарный врач.

Издание соответствует федеральному государственному образовательному стандарту и рабочей программе дисциплины «Участие в лабораторных исследованиях в ветеринарной сфере», и предназначено для проведения лабораторных и практических занятий студентов, обучающихся по специальности 36.02.01 – Ветеринария, квалификация выпускника - Ветеринарный фельдшер

Методические указания к выполнению лабораторно-практической работы рассмотрены и рекомендованы к изданию на заседании методической комиссии факультета ветеринарной медицины и биотехнологий (протокол № ___ от января 2024 г.)

УДК 619:616.5(071)
ББК 48.73р30

© Воеводина Ю.А., 2024

© ИЦ ВГМХА, 2024

СОДЕРЖАНИЕ

	Введение	3
1.	Краткие теоретические сведения о заболевании	5
2.	Принципы лабораторной диагностики микотических поражений кожи	8
	2.1. Люминесцентный анализ	9
	2.2. Микроскопическое исследование патологического материала	10
	2.3. Культуральное исследование	11
	2.4. Цитологическое исследование	14
3.	Лабораторная часть	15
	3.1. Материально-техническое обеспечение	15
	3.2. Отбора материала для исследования	15
	3.3. Люминесцентный анализ	17
	3.4. Микроскопическое исследование патологического материала	17
	3.5. Культуральное исследование	18
	Список литературы	20
	Приложения	23

Введение

В последние годы заболевания кожи у домашних животных во всем мире занимают одно из ведущих мест. Инфекционные дерматозы вызываемые патогенными грибами заслуживают особого внимания, так как они занимают ведущее место (до 61%) в патологии кожи животных и ее производных.

У многих животных регистрируется бессимптомное миконительство, масштабы его распространенности носят массовый характер. По данным различных авторов, количество животных миконителей среди кошек достигает 75–88 %, среди собак – 36–66 %,

среди кроликов, грызунов – 26–61 %, среди крупного рогатого скота – 59 %. Распространению миконосительства способствуют контакты с бродячими животными, неудовлетворительные санитарные условия содержания, скученное содержание животных (в питомниках, у заводчиков и т.п.). Большинство домашних животных потенциально подвержено риску вовлечения в бессимптомное миконосительство. Наибольшую эпидемическую опасность представляют животные-миконосители, с которыми контактирует широкий круг лиц – например, лошади в конно-спортивных клубах, животные в «живых уголках» детских дошкольных учреждений и т.п. Именно дети наиболее подвержены риску заражения дерматофитозами при контактах с домашними животными.

Тесный контакт между животными и людьми в условиях городских квартир, рост численности бездомных животных, развитие сети приютов для животных с привлечением для работы большого количество волонтеров, несет не только положительное в их взаимодействии, но и отрицательное в виде выделения собаками и кошками возбудителей болезней, общих для человека и животных, контаминации окружающей среды и др. Последняя становится важным фактором передачи заразных заболеваний для людей и не имеющих никакого отношения к животным, но в полной мере страдающих от них.

Подход к диагностике данной патологии в последние годы существенно изменился: классический подход был направлен на индикацию только грибов-дерматофитов, в настоящее время необходимо принимать во внимание резко возросшее видовое разнообразие потенциальных возбудителей.

Знание видового состава возбудителей необходимо для грамотной постановки диагноза, разработки научно обоснованных мер борьбы с учетом специфики возбудителей, ведения эколого-эпизоотологического мониторинга.

Нередко к врачу специалисту в области ветеринарной дерматологии направляются пациенты, диагностика дерматитов инфекционного и в частности микотического происхождения у которых была проведена некорректно. В следствие некорректности назначения лечение не имеет положительной динамики.

Клиническая картина дерматомикозов очень вариабельна. По этому заболевание следует подозревать почти у всех животных имеющих: алопеции (фокальную или мультифокальную), шелушение и образование корочек; диффузную алопецию, себоррею и шелушение; узлы и свищевые ходы; воспаление, эритему, эрозии и язвы; и фолликулиты и фурункулезы. В отличии от клинически выраженного дерматофитоза, бессимптомное миконосительство может быть диагностировано только путем лабораторного микологического анализа образцов шерстного

покрова животного.

Поэтому при подозрении на поражение кожи инфекционной этиологии диагноз должен быть подтвержден данными лабораторного исследования.

Цель работы: научить студентов постановке диагноза на микотические поражения кожи, вызванные дерматофитами

Задачи работы:

- изучить морфологические и культуральные свойства дерматофитов
- научить студентов отбору материала для проведения исследований;
- освоить принципы лабораторной диагностики дерматофитозов

1.Краткие теоретические сведения о заболевании

Среди патогенных агентов кожи широко распространены грибы (Fungi). На поверхности кожи и шерсти у собак и кошек можно обнаружить целый ряд грибов. У животных часто выделяют *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Chrysosporium*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Penicillium* и *Rhizopus*. У кошек – *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhodotorula* и *Scopulariopsis*. Большинство из этих сапрофитных грибов чаще всего представляют собой контаминацию из воздуха или из почвы. Их присутствие в большинстве случаев не вызывает развития заболеваний.

Среди известных науке, на данный момент, более чем 500000 видов микроскопических грибов, патогенными (контагиозными) из них являются только 50 видов, из них поражают только кожу - 20 видов и 10 видов – кожу и подкожную клетчатку [1,2].

Дерматомикозы занимают ведущее место - 64–73 % в структуре болезней животных с признаками поражений кожи и её производных [3, 4, 5]. Грибы могут быть и обитателями здоровой кожи животных. По данным немецких исследователей у здоровых собак грибки на коже регистрируются в 25 % случаев. У здоровых кошек грибы обнаруживаются лишь у 10 % обследованных животных [6, 7].

В связи с большим видовым разнообразием грибов, их значимости в развитии заболеваний для выбора метода исследования и постановки диагноза необходимо четко представлять их классификацию.

Дерматомикозами принято называть микозы кожи, и её производных вызванные мицелиальными и дрожжеподобными грибами.

Дерматофитозами или дерматофитиями называют микозы кожи и её кератин-содержащих придатков вызванные грбами дерматофитами.

Онихомикозы это микозы ногтей, вызванные мицелиальными и дрожжеподобными грибами.

Дерматомикозы и онихомикозы, кроме дерматофитов, могут быть вызваны следующими грибами:

Дерматомикозы

1. *Candida* spp.
2. *Fusarium moniliforme*
3. *Trichosporon beigelii*
4. *Hendersonula toruloidea*

Онихомикозы

1. *Scopulariopsis brevicaulis*
2. *Acremonium* sp.
3. *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. glaucus*, *A. teereus*, *A. versicolor*
4. *Fusarium oxysporum*
5. *Geotrichum candidum*
6. *Candida albicans*
7. *Hendersonula toruloidea*
8. *Cephalosporium* sp.

Дерматофитозы - это наиболее распространенная группа поверхностных микозов человека и животных, при которых поражаются кератинсодержащие ткани кожи, а также её производные: волосы и ногти. Они вызываются группой родственных мицелиальных кератинофильных грибов, имеющих общее название «дерматофиты»/«дерматомицеты» и способных использовать кератин в качестве источника питания.

К этой группе относят около 100 грибов, большинство из которых является почвенными кератинофильными грибами, но только 42 вида признано достоверно существующими и действительно связаны с микозами человека. Из них 11 видов наиболее распространены как возбудители дерматофитозов. Предполагается, что в процессе эволюции почвенные грибы адаптировались к определенным хозяевам и постепенно сформировали существующие группы антропо, зоо- и геофильных дерматофитов [1, 8].

Таблица 1 - Экологическая классификация дерматофитов по их первичному резервуару

Антропофильные	Зоофильные	Геофильные
Повсеместно распространенные виды		
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>Interdigitale</i>	<i>Trichophyton equinum</i> (лошади)	<i>Trichophyton ajelloi</i>
<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i> (грызуны, кролики,	<i>Trichophyton terrestre</i>

	дикобразы)	
Trichophyton schoenleinii	Trichophyton verrucosum (кр. рог. скот)	Microsporum fulvum
Trichophyton tonsurans	Microsporum canis (кошки, собаки)	Microsporum gypseum
Trichophyton violaceum	Microsporum equinum (лошади)	Microsporum cookei
Microsporum audouinii	Microsporum gallinae (куриные)	Epidermophyton stockdaleae
Epidermophyton floccosum	Microsporum nanum (свиньи)	
	Microsporum amazonicum	
Географически ограниченные и редкие виды		
Trichophyton concentricum	Trichophyton simii (обезьяны)	
Trichophyton megninii	Microsporum persicolor (грызуны)	
Trichophyton gourvilli	Trichophyton erinacei (ежи, дикобразы)	
Trichophyton yaoundei	Microsporum distartum (кошки, собаки)	
Trichophyton soudanense		
Microsporum ferrugineum		
Trichophyton raubitschekii		
Trichophyton kanei		

Среди инфекционных дерматозов патология вызываемая грибами родов *Microsporum* и *Trichophyton* заслуживает особого внимания.

От мелких домашних животных с поражениями кожи выделяется большое количество дерматомицетов, но ведущее место занимает *Microsporum canis* - 72–74 %, а в доле кожных болезней кошек данный представитель занимает до 90% [9, 10, 11]. Таким образом почти все случаи кошачьего дерматофитоза вызваны *M. canis*. Существует реальная предрасположенность кошек к инфекции именно этим видом дерматофита. Представителей семейства кошачьих считают природным резервуаром *M. canis* [11, 12].

По данным некоторых исследователей в городах наблюдается рост заболеваемости мелких животных трихофитией, вызванной дерматофитом *T. mentagrophytes* [13, 14, 15].

Дикие грызуны являются резервуаром многих редко встречающихся дерматофитов: *T. mentagrophytes*, *M. persicolor* и других

редко встречающихся дерматофитов – *T. erinacei*, *T. terrestre*, *M. cookei*, *M. distortum* [1, 2]. Рост популяции безнадзорных животных, очевидно, способствует их более тесному контакту и межвидовой миграции возбудителя.

Следует отметить, от 60 % до 90 % случаев человеческого дерматофитоза, наблюдаемого у городских жителей вызваны *M. canis*, и источником инфекции были кошки [16, 17, 18]. По данным разных авторов существует возможность заражения человека и от собак [19,20,21,22].

В связи с вышеописанными особенностями современной эпизоотологии дерматофитозов их лабораторная диагностика имеет ряд существенных особенностей. Быстрая постановка диагноза часто представляет значительные трудности для практикующего врача, поэтому далее речь пойдёт о доступных методах лабораторного исследования, требующих минимальных затрат времени и средств для постановки диагноза на микотическую патологию.

Большинство болезней кожи имеют сходную клиническую картину, однако можно выделить девять основных групп характерных дерматологических нарушений:

- зуд
- алопеция
- образование чешуек/корок/себорея
- макулы/папулы/вскрывающиеся пустулы
- узлы/опухоли
- свищи
- язвы
- изменения пигментации
- отиты

Как только врач-клиницист начнет относить каждого пациента к какой-либо из перечисленных выше категорий, ему станет намного проще формировать список дифференциальных диагнозов и разрабатывать диагностический план. Необходимо помнить, что у пациента могут быть сопутствующие болезни в настоящий момент времени, которые затрудняют постановку основного диагноза.

2. Принципы лабораторной диагностики микотических поражений кожи

Алгоритм диагностики дерматофитозов включает в себя простые и быстрые диагностические тесты, используемые на практике:

Диагноз устанавливается на основании учета:

- эпизоотологических факторов
- клинических признаков проявления заболевания
- люминесцентный анализ - ЛЮМ-диагностика (применение

лампы Вуда)

- прямую микроскопию волос (трихограмму);
- культуральное исследование для определения вида возбудителя путем выделения его в чистую культуру (посев на питательные среды)
- цитологическое исследование
- биопсию (при необходимости в случае подозрения на мицетому, формирование последних наиболее характерно у кошек персидской породы. Рекомендуется проверить животное на носительство FeLV-FIV!!!).

Общие методические рекомендации по проведению исследований

2.1. Люминесцентный анализ

Данный метод диагностики микроспории основан на способности волос, пораженных грибами рода *Microsporum* давать яркое зеленое или фиолетовое свечение при облучении ультрафиолетовыми лучами. Способность *M. canis* светиться связана с наличием в его гифах пигмента птеридина.

Для выявления скрытых форм микроспории облучению подвергают весь волосяной покров животного, используя для этих целей переносные лампы. Этот метод важен также для дифференциации микроспории и трихофитии, так как волосы, пораженные грибами рода *Trichophyton*, не люминесцируют.

Объектом исследования на дерматомикозы для ЛЮМ-анализа также являются волосы и корочки. Люминесцентный анализ производят в затемненном помещении.



Рис. 1 - Характерное для микроспории свечение в ультрафиолетовых лучах (лампа Вуда).

На рисунке представлено свечение области поражения во время клинического обследования животного и свечение отдельных волосков при лабораторном исследовании.

Люминесцентное свечение пораженных волосков при использовании лампы Вуда позволяет целенаправленно отобрать их для прямой микроскопии и для посева.

2.2. Микроскопическое исследование патологического материала

Прямая микроскопия патологического материала нередко даёт как ложноположительные, так и ложноотрицательные результаты, ее главным достоинством является быстрота. Также она позволяет специалисту сориентироваться в выборе дальнейших методов исследования.

Для более четкого выявления элемента гриба производят мацерацию (просветление) материала с помощью 10% раствора щелочи (KOH или NaOH). Для лучшей визуализации при просветлении кератина роговых чешуек и волос можно применять: лактофенол (20 г 85 % молочной кислоты, 40 г глицерина, 20 мл дистиллированной воды, 20 г кристаллической карболовой кислоты и 0,05 г хлопчатобумажной синьки).

Гифы грибов набухают и на волосяном стержне хорошо просматриваются утолщенные участки с неровными контурами. Споры гриба образующие вокруг волоса «чехол» или «муфту» придают ему смутные очертания. Часто микроскопическая картина напоминает «мешок с орехами».

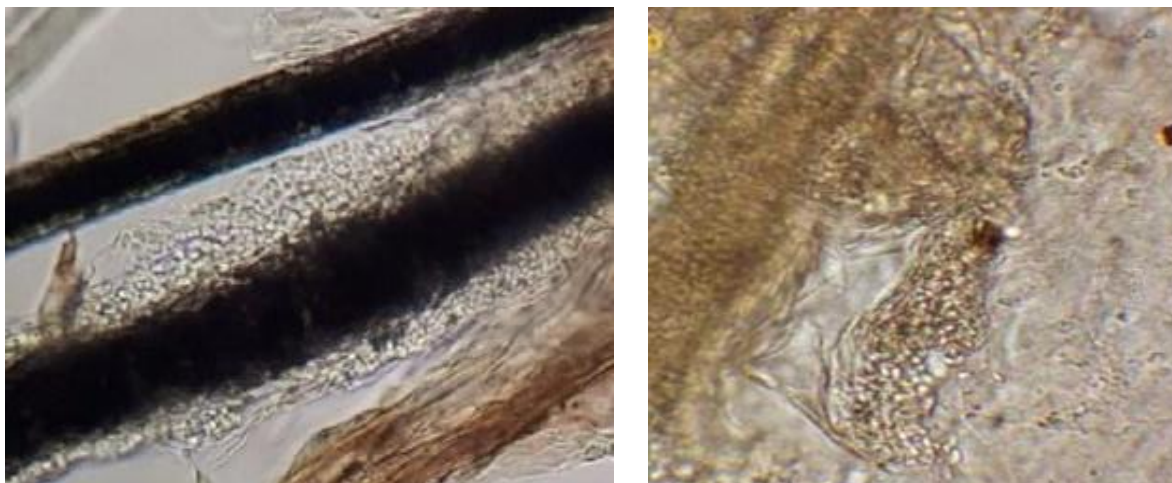


Рис. 2 - Примеры расположения спор дерматофита на стержне волоса. Слева – «чехол» или «муфта» вокруг стержня волоса; справа – сформированный спорами «мешок с орехами»

Элементы гриба в патологическом материале (волосы) располагаются по-разному:

при эктотриксе споры гриба расположены на поверхности волоса в виде чехла;

эндотрикс характеризуется тем, что споры расположены внутри волоса по его длине в виде цепочек;

при неоэндотриксе споры могут располагаться как внутри волоса в виде продольных цепочек, так и снаружи – в виде чехла.

гифы гриба прорастают внутрь волоса, однако не выживают впоследствии, оставляя пустоты (пузырьки воздуха), артроспоры не обнаруживаются.

ВНИМАНИЕ!!! ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ОБНАРУЖЕНИЯ ДЕРМАТОФИТОВ НЕ ПРЕВЫШАЕТ 40%. НЕОБХОДИМО ИССЛЕДОВАТЬ НЕСКОЛЬКО ПРЕПАРАТОВ, ЧТОБЫ ПОВЫСИТЬ НАДЕЖНОСТЬ АНАЛИЗА И НЕ ПОЛУЧИТЬ ЛОЖНОПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ ИЛИ ЛОЖНООТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ.

Так как различные виды грибов могут давать одинаковую микроскопическую картину при прямой микроскопии, в подавляющем большинстве случаев не позволяет определить вид гриба. Также гифы дерматофитов в препаратах трудноотличимы от мицелия дрожжеподобных или плесневых грибов.

В связи с этим микроскопию патологического материала нужно сочетать с получением чистой культуры. При этом образцы патологического материала следует культивировать и при отрицательных результатах микроскопии.

2.3. Культуральное исследование

Данный вид исследования необходим для выделения и идентификации возбудителя; для определения латентного дерматофитоза; носительства дерматофитов здоровыми животными; выявления дерматофитов в окружающей среде и определения чувствительности культуры к химиопрепаратам.

Для выделения грибов дерматофитов в чистую культуру используют различные питательные среды:

- агар Сабуро с глюкозой (2 или 4 % глюкозы),
- агар Сабуро с дифференцирующими добавками: антибактериальные антибиотики (пенициллин: 50 мкг/мл+стрептомицин 50-100 мкг/мл или левомецетин 50 мкг/мл, или биомицин 200 ед/мл, гентамицин); антиплесневый антибиотик актидион (циклогексимид) 0,1-0,4 мг/мл.

Актидион не влияет на рост дерматофитов и подавляет многие плесневые грибы, а также виды *Candida* и *Cryptococcus*. Поэтому при подозрении на этиологическую роль этих грибов посеvy следует производить также и на среду Сабуро без актидиона.

Первичные культуры дерматофитов растут сравнительно медленно и при использовании сред без антибиотиков могут быть подавлены более быстро растущими бактериями и плесневыми грибами. В отличие от последних, колонии дерматофитов никогда не бывают черными, голубыми или зелеными.

В последнее время в ветеринарной практике используют посев на питательную среду DTM контрольная питательная среда для дерматофитов (англ. Dermatophyte test medium).

Она предоставлена в готовом виде в пробирках (флакончиках) и содержит: Сабуро-агар, циклогексимид, гентамицин и хлортетрациклин и индикатор рН-среды фенол-красный. Это селективная среда, по изменению окраски которой, с желтоватого цвета до красного (дерматофиты активно перерабатывают протеины образуя щелочные продукты обмена), идентифицируют их рост. Метаболиты продуцируются в процессе роста колонии, и изменение окраски среды происходит через 2-7 дней после посева (иногда этот процесс занимает 14 дней).

Нейтральные и кислые метаболиты, производимые сапрофитическими грибами не защелачивают среду и цвет ее не изменяется. Правильно интерпретировать результат исследования можно только в случае ежедневного осмотра растущих колоний.





Рис. 3 - Рост грибов на среде DTM

- 1 проба – рост гриба *Aspergillus*, с изменением цвета среды
- 2 проба – типичный рост дерматофита с изменением цвета среды
- 3 проба – рост полностью отсутствует
- 4 проба – рост плесневого гриба без изменения цвета среды
- 5 проба – рост посторонней микрофлоры

Окончательный диагноз можно установить только посредством микроскопии колонии. Родо-видовая идентификация грибов проводится по морфологическим особенностям. При микроскопической характеристике культур следует учитывать септированность мицелия, наличие, характер и способ прикрепления макроконидий и микроконидий, а также структуру мицелия и его образований - спиралей, гребешковых гифов, канделябров. Наличие и характер хламидоспор не имеют решающего диагностического значения.

Для обозначения разных частей грибов используют специальные термины:

- 1. Гифа – нитевидное образование грибов, состоящее из многих клеток.
- 2. Мицелий – это множество гифов.
- 3. Септы – разделения между клетками внутри гифов.
- 4. Конидии – неподвижные споры бесполого размножения у грибов
- 5. Конидиофор – мицелий, на котором расположены конидии.

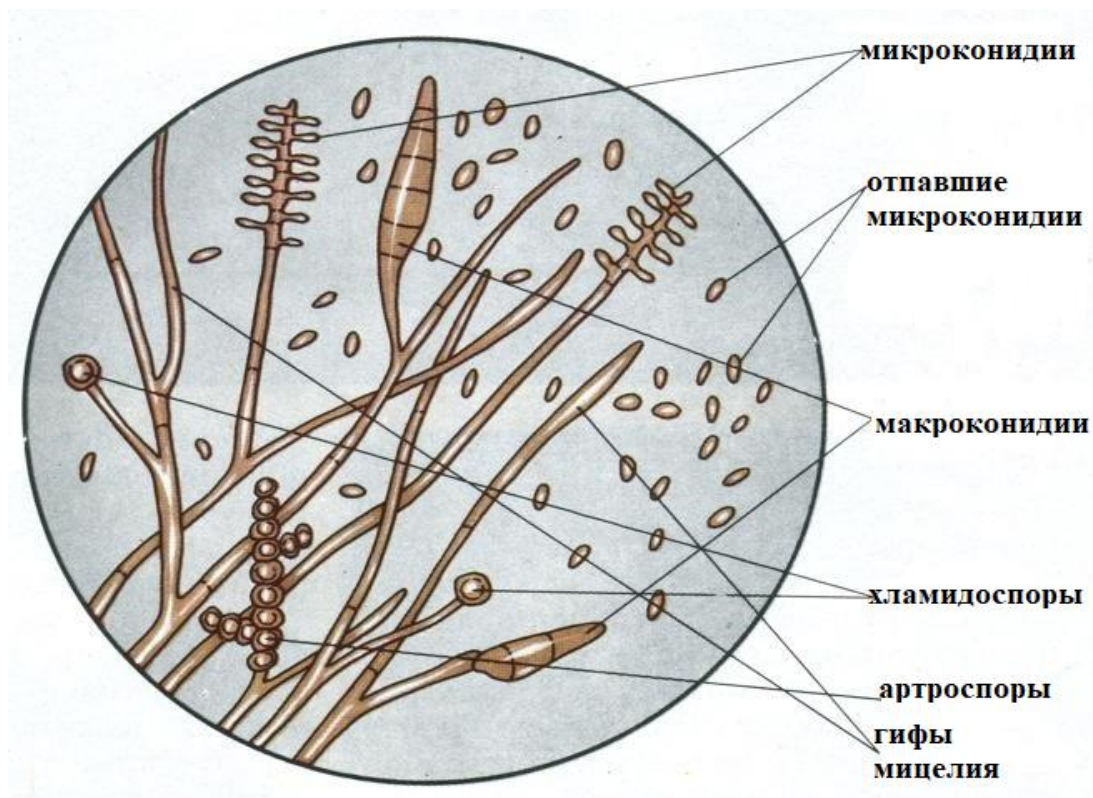


Рис. 4 - Морфология мицелиальных грибов

Культурально-морфологические свойства наиболее значимых в патологии животных представителей дерматофитов отражены в Приложении 1.

При невозможности идентифицировать штаммы, основываясь только на их морфологических особенностях, применяют тесты для определения некоторых проявлений метаболической активности грибов. Для лабораторной практики разработаны методы определения питательных потребностей и методы определения ферментативной активности дерматофитов, наиболее часто оценивают: кератинолитическую активность (тест перфорации волос); гемолитическую активность на среде Сабуро с 5 % дефибрированной бараньей крови (образование вокруг колоний зон просветления альфа (зеленоватая) - или бета (бесцветная) – гемолиза; протеолитическую способность (на среде с молоком и бромкрезолом).

В связи с тем, что в лабораторной диагностике дерматофитозов используются питательные среды с селективными добавками для выделения дерматофитов рост большинства других грибов, в т.ч. оппортунистических патогенов, на таких средах ингибируется. Рекомендуется проводить засев на различные среды для повышения вероятности выделения дерматофитов, а также других потенциально

патогенных микроорганизмов. Исходя из этого, при диагностике поражений кожи инфекционного характера для культурального исследования целесообразно использовать несколько сред, позволяющих выделять как дерматофиты, так и недерматофитные грибы и дрожжи и бактериальные агенты.

В ответе лаборатории необходимо указать: какие виды микроорганизмов выделены, в каком количестве (слабый, умеренный или обильный рост на плотной питательной среде). При выделении ассоциации микроорганизмов в ответе перечисляют все виды микроорганизмов, входящих в ассоциацию, и отмечают, имеется ли преимущественный рост каких либо из представителей.

2.4. Цитологическое исследование

Псевдомицетомы – это редкое проявление дерматофитии, описанное у персидских кошек. Характеризуется одиночной или множественными подкожными нодулами, которые могут изъязвляться [23, 24, 25, 26, 27, 28]. Такие животные могут развивать как классические поражения на остальных частях тела, так и нодулы без других клинических проявлений.

Цитологическая диагностика возможна с нодулярных или мокнущих поражений. Возможно использовать скотч-отпечаток с последующей окраской образца стандартными красителями (типа Дифф-квик). Чаще положительный образец представлен пиогранулематозным воспалением, с наличием спор грибов.

Гистопатологическое исследование. Наиболее диагностичный результат дает PAS-окраска, которая позволяет прокрашивать гифы и споры внутри фолликула и эпидермиса. Не является рутинным методом, но гистопатологическое исследование незаменимо при подозрении на псевдомицетому.

Высокой диагностической ценностью обладают такие методы диагностики как ПЦР, иммуногистохимия, ELISA. Эти методы стали широкодоступны, но в практике повсеместно не используются в связи с высокой стоимостью.

3. Лабораторная часть

3.1. Материально-техническое обеспечение

Оборудование:

Технические средства: термостат, микроскопы, пипетки, чашки Петри, предметные, покровные и часовые стекла, спиртовки, пинцеты, петли бактериологические, скальпели, иглы препаровальные.

Реактивы: вода дистиллированная, гидроксид натрия или калия в форме 10% раствора, глицерин 50%, краски, среды питательные, объекты

исследования, клейкая лента (скотч).

Наглядные пособия: учебные цифровые фильмы, слайды, фотографии, инструкции по работе с приборами, наставления по диагностике инфекционных заболеваний

3.2. Отбора материала для исследования

Успех диагностики определяется во многом зависит от правильного взятия патологического материала, а также выбранных методов диагностики.

При лабораторных исследованиях материалом служат:

- соскобы кожи,
- волосы,
- чешуйки,
- корочки

Корочки соскабливают с активных периферических краев очага поражения, не подвергавшейся лечению. Поверхностные корочки и чешуйки в центре микотических очагов содержат значительно меньше грибных элементов и менее пригодны для исследования. Для взятия материала с шелушащихся очагов на гладкой коже можно применять прозрачную липкую ленту (скотч-тест).

При поражении волос пинцетом извлекают расположенные на периферии очага деформированные, белесоватые, обломанные волосы, изменившие цвет и потерявшие эластичность.

Перед взятием соскоба рекомендуется подстричь шерсть с выбранных участков кожи. Для получения поверхностного соскоба достаточно поскоблить кожу лезвием скальпеля или шпателем, смоченным минеральным маслом. Для получения глубокого соскоба материал соскабливается до появления капель капиллярной крови.

Перед сбором материала для микроскопического исследования и выделения культуры дерматофитов участок кожи обрабатывается 70% спиртом для уменьшения бактериального загрязнения.

При глубоких поражениях кожи рекомендуем производить забор материала с помощью профламбированного скальпеля методом соскоба с дальнейшим помещением взятого материала в среду для транспортировки (стерильный физиологический раствор). Материал необходимо брать из новых поражений или свежевскрытых везикул или пустул. Интактные пустулы разрезают стерильной иглой, и их содержимое собирают на стерильный тампон (зонд-тампон) увлажненной физиологическим раствором.

Взятие материала производится при соблюдении правил асептики. Перед забором пробы стерильным ватным тампоном, увлажненным стерильным физиологическим раствором, обрабатывают пораженный участок кожи, а затем вокруг его. Взятие материала производят

стерильным тампоном, увлажненным стерильным физиологическим раствором, вращательными движениями от центра к периферии поверхности пораженного участка. Необходимо также направить для исследования волоски для выявления культуры дерматофитов. Материал доставляют в лабораторию в день забора пробы.

После взятия соскоба животному следует обрабатывать рану антисептиком.

С пораженных когтей нужно сделать соскоб скальпелем, извлекая рыхлые роговые массы, или состричь поврежденный участок. Для взятия материала используют ножницы, скальпели, пинцет, препаровальные иглы. Получение размельченного патологического материала облегчает дальнейшие исследования.

При бессимптомном носительстве применяется метод *Метод МакКензи*: он основан на вычёсывании шерсти стерильной зубной щеткой с последующим посевом щетинок на питательную среду.

При использовании лампы Вуда для диагностического исследования следует отбирать пробы с участков свечения, что повышает вероятность обнаружения возбудителя микроспории.

Патологический материал можно собирать в стерильные чашки Петри; между двумя предметными стеклами, скрепленными резинками и завернутыми в бумагу; в пакеты из черной бумаги, чтобы лучше видеть чешуйки и волоски, пробирки, пакеты с клипсами и т.д. Следует выбирать способ упаковки препятствующий потере и распространению патогенного материала при разворачивании.

3.3. Люминесцентный анализ

Ход исследования:

➤ Лампу (ртутно-кварцевая стационарная или переносная лампа типа ПРК-4, со светофильтром, задерживающим видимую часть лучей и пропускающим ультрафиолетовые лучи) включить в электросеть и спустя 5-10 минут приступают к исследованию

➤ Изучаемый объект поместить в пробирку, бактериологическую чашку и поставить под ртутно-кварцевую лампу для облучения под ртутно-кварцевую лампу на расстоянии 20 см от светофильтра.

➤ Зарегистрировать наличие/отсутствие характерного свечения

ВНИМАНИЕ!!! У ЖИВОТНЫХ ЧЕРНОЙ МАСТИ ПОРАЖЕННЫЕ ВОЛОСЫ ЧАСТО НЕ ЛЮМИНЕСЦИРУЮТ. ФЛЮОРЕСЦИРУЮТ ТАКЖЕ МЕРТВЫЕ ВОЛОСЫ, ЧЕШУЙКИ КОЖИ, ПРЕПАРАТЫ СОДЕРЖАЩИЕ ВАЗЕЛИН, САЛИЦИЛОВУЮ КИСЛОТУ, ЭТАКРИДИНА ЛАКТАТ (РИВАНОЛ, ACRICIDUM, ACRINOL, ACRINOLIN, ETHODIN, RIVANOLUM), ПОЭТОМУ ИССЛЕДОВАНИЕ НАДО ПРОВОДИТЬ ДО ОБРАБОТКИ ЖИВОТНЫХ РАЗЛИЧНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ.

При поражении бактериями рода *Pseudomonas* – можно также наблюдать ярко-зеленую флюоресценцию, *Corynebacterium* – красную.

3.4. Микроскопическое исследование патологического материала

Ход выполнения работы

Первый способ:

➤ исследуемый материал (волосы, чешуйки или корочки) поместить на чашку Петри (или часовое стекло) и залить 10%-м раствором гидроксида натрия

➤ поместить материал на 15...20 мин в термостат при 37°C

➤ необходимое количество материала переносят на предметное стекло в каплю 50%-го раствора глицерина, накрывают покровным стеклом и исследуют под микроскопом.

Второй способ:

➤ кожные чешуйки размельчить препаровальными иглами

➤ длинные волосы разделить на короткие фрагменты ребром нагретого скальпеля или прокаленной препаровальной иглой

➤ материал поместить на середину предметного стекла, нанести 1—2 капли 10 % КОН и слегка подогреть над пламенем спиртовки до появления белесоватого ободка по краю капли, **не доводя до кипения** накрыть покровным стеклом и оставить на 5-10 мин для мацерации и просветления.

ВНИМАНИЕ!!! НЕ СЛЕДУЕТ ПЕРЕГРЕВАТЬ ИЛИ ПЕРЕДЕРЖИВАТЬ ПРЕПАРАТ В ТЕРМОСТАТЕ, СИЛЬНО НАДАВЛИВАТЬ НА СТЕКЛА - ПРОИСХОДЯТ ДЕФОРМАЦИЯ ВОЛОС И НАРУШЕНИЕ РАСПОЛОЖЕНИЯ СПОР И МИЦЕЛИЯ ГРИБА.

Исследование препарата начинают с малого увеличения (10×) с опущенным конденсором или с прикрытой апертурной диафрагмой для затемнения поля зрения; затем избранные места просматривают при большом увеличении системы (40×, 100×) с приподнятым конденсором. Примеры расположения дерматофитов представлены на рисунке 2.

Морфология грибов рода *Trichophyton* в патологическом материале: гифы мицелия с перегородками, располагаются правильными рядами по длине волоса. Споры одноклеточные круглые или овальные. Характерной особенностью грибов рода трихофитон является расположение спор в виде цепочек на волосе или внутри его и образование чехла (муфты) из спор у основания волоса.

Морфология грибов рода *Microsporum* в патологическом материале: мицелий не прямой, ветвистый, перегородки редкие. Споры округлые, одноклеточные, резко преломляющие свет, располагаются внутри волоса, вне его и на его поверхности беспорядочно-мозаично.

Размер спор от 3 до 4,5 микрона в диаметре.

В чешуйках кожи, пораженной дерматофитами, можно видеть гифы септированного ветвистого мицелия иногда цепочки из округлых или многоугольных артроспор.

Следует отличать от элементов гриба такие артефакты, возникающие в препаратах, как:

«мозаичный гриб» (располагается по границам эпителиальных клеток, состоит из фрагментов органической природы различного размера)

удлиненные кристаллы щелочи (полигональная форма) - исчезают при промывании препарата, для чего с одной стороны наносят каплю воды, а с другой помещают кусочек фильтровальной бумаги и осторожно, чтобы не потерять материал, повторяют 2-3 раза

капли жира (различные размеры, отсутствие внутренней структуры), нити ваты, марли (размер, гомогенность, неправильная форма, кисточка на конце волокон).

При просмотре препаратов под микроскопом, следует не только установить наличие возбудителей дерматофитов но и обратить внимание на иные потенциально патогенные объекты. Эти данные важны также для разработки стратегии дальнейшей диагностики и лечения животного.

3.5. Культуральное исследование

Ход выполнения работы

➤ пораженные волосы освободить от корочек (в связи с их потенциальной высокой обсемененностью посторонней микрофлорой; при необходимости корочки можно высевать отдельно)

➤ прокалить над пламенем спиртовки предметное стекло

➤ измельчить на нем волос (можно использовать стерильную чашку Петри)

➤ петлей перенести волос на поверхность питательной среды. В пробирки засевают 1 - 2 кусочка волоса 1 - 2 мм длины на расстоянии 1 см один от другого. Засевают 8 - 10 пробирок (можно использовать чашки Петри, их следует герметизировать парафиновой лентой; при их использовании объём засеваемого материала увеличивают)

➤ посеvy поместить в термостате при 25-30-37° С (можно проводить инкубацию одной пробы при различных температурных режимах)

➤ при использовании для исследования среды ДТМ пробирку плотно не закупоривать, во избежание образования влаги, что может исказить результат. Выдержать при комнатной температуре (22-25°С) на протяжении периода тестирования (3 - 10 дней). Ежедневно проверять изменение цвета среды и рост колонии.

➤ в первую неделю посева осматривать ежедневно, далее еженедельно до 4 недель. Первые признаки роста дерматофитов отмечают с 4 по 12 день инкубации в точках посева по краям внесенного материала. При отсутствии роста в течение 30 дней результаты культивирования считают отрицательными.

При обнаружении роста культур провести макро- и микроскопию выросших колоний в следующем порядке:

➤ при малом увеличении и сильном освещении через стекло пробирки исследовать край колонии для оценки наличия и расположения характерных морфологических элементов (конидии, спирали). Возможно использование стереомикроскопа, бинокулярной лупы

➤ провести микроскопическое исследование двумя способами:

1. стерильной петлей снять кусочек мицелия вдоль краев колоний, положить его на предметное стекло в каплю 50 % раствора глицерина или каплю краски (типа «Дифф-квик», метилновый синий и т.п.), и исследовать сначала под малым (10×), а затем под большим увеличением микроскопа (40×) в сухой системе
2. выполнить скотч-тест: на предметное стекло нанеси каплю красителя, липкой стороной ленты прикоснуться к краю колонии и поместив отпечатком вниз в краситель плотно приклеить к стеклу. Подготовить два скотч препарата: с краю колонии и из её центра. Препарат микроскопировать при различных увеличениях в том числе использовать иммерсию.

➤ провести идентификацию культуры. Для идентификации выросших колоний воспользоваться приложениями 1 и 2.

➤ сопоставить два предложенных метода микроскопического исследования, сделать выводы об их диагностической ценности

Список литературы

1. Кузнецов, А. Ф. Ветеринарная микология : учебное пособие для вузов / А. Ф. Кузнецов. — 2-е изд., испр. и доп. — Москва : Издательство Юрайт, 2016. — 417 с. — (Высшее образование). — ISBN 978-5-9916-7119-4. — Текст : электронный // ЭБС Юрайт [сайт]. — URL: <https://urait.ru/bcode/390813> (дата обращения: 06.01.2020).

2. Госманов, Р.Г. Микология и микотоксикология : монография / Р.Г. Госманов, А.К. Галиуллин, Ф.М. Нургалиев. — Санкт-Петербург : Лань, 2019. — 168 с. — ISBN 978-5-8114-3820-4. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/116372> (дата обращения: 06.01.2020). — Режим доступа: для авториз. пользователей.

3. Гордиенко Л.Н. Этиологическая структура дерматитов у мелких домашних животных в условиях Сибири // Мат. VIII межд. конгресса по

проблемам ветеринарной медицины мелких домашних животных. – М., 2000. – С. 86–87.

4. Руководство по микробиологии и иммунологии: учеб. пособие / Л.Г. Белов, Р.Г. Госманов, В.Н. Кисленко [и др.]. — 2-е изд. — Москва : ИНФРА-М, 2018. — 230 с. + Доп. материалы [Электронный ресурс; Режим доступа: <https://znanium.com>].— (Высшее образование: Бакалавриат). - ISBN 978-5-16-102482-9. - Текст : электронный. - URL: <https://znanium.com/catalog/product/972160>

5. Маноян М. Г., Овчинников Р. С., Панин А. Н. Бессимптомное миконосительство и его значение в распространении дерматофитозов животных и человека // VetPharma. 2012. №3. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/bessimptomnoe-mikonositelstvo-i-ego-znachenie-v-rasprostranении-dermatofitozov-zhivotnyh-i-cheloveka> (дата обращения: 06.01.2020).

6. Roos M. Vergleichende Untersuchungen zum Vorcommen von Staphylokokken und Hefen auf der Haut von Hung und Katze: Inaugural-Dissertation Doctor Medicinæ Veterinariæ. – Hannover, 1991. – 167 p.

7. Gabal M.A. Antifungal activity of Ketoconazole with emphasis of zoophilic fungal pathogens // Amer. J. Vet. Res. – 1986. – Vol. 47. – P. 1229–1234.

8. Обзорные лекции по ветеринарной микробиологии и микологии : 2019-08-14 / Составители: Госманов Р.Г., Галиуллин А.К.. — Казань : КГАВМ им. Баумана, 2018. — 97 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/122943> (дата обращения: 06.01.2020). — Режим доступа: для авториз. пользователей.

9. Современная микология в России / Под ред. Е. Н. Биланенко, Е. Ю. Воронина, Ю. Т. Дьяков и др. — Т. 7. — Национальная академия микологии М, 2017.

10. Богомолова Евгения Валентиновна, Уханова Ольга Петровна, Санеева Ирина Викторовна Микологические факторы риска в городской среде // Известия Самарского научного центра РАН. 2016. №2-3. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/mikologicheskie-factory-riska-v-gorodskoy-srede> (дата обращения: 06.01.2020).

11. Поляков И.Д. Клиническое проявление дерматомикозов у собак и кошек // Мат. XII межд. вет. конгресса по болезням мелких домашних животных. – М., 2004. – С. 100–101.

12. Овчинников Р.С., Плеских С.А., Мохина Т.Н. Грибы, изолированные из кожных поражений собак и кошек // Мат. X межд. вет. конгресса по болезням мелких домашних животных. – М., 2002. – С. 282–283.

13. Ваğсигил А. F., İkiz S., Özgür N. Y., Ilgaz A. Выделение дерматофитов с инструментов для ухода за шерстью в ветеринарных

клиниках и парикмахерских салонах для животных // JSAP/Российское издание. 2010. №1. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vydelenie-dermatofitov-s-instrumentov-dlya-uhoda-za-sherstyu-v-veterinarnyh-klinikah-i-parikmaherskih-salonah-dlya-zhivotnyh> (дата обращения: 04.01.2020).

14. Сергеев, А. Ю. Факторы резистентности и иммунитет при грибковых инфекциях кожи и слизистых оболочек / А. Ю.Сергеев, Ю. В. Сергеев // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2004. – № 1. – С. 6–14.

15. Куляев К. А., Епифанова А. Ю., Каткова И. О., Каракаева А. В., Слесаренко Н. А., Еремина М. Г., Давтян В. А., Колпакова Н. Н. Клинико-диагностические параллели инфильтративно-нагноительной микроспории и глубокой трихофитии // Саратовский научно-медицинский журнал. 2013. №3. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/kliniko-diagnosticheskie-paralleli-infiltrativno-nagnoitelnoy-mikrosporii-i-glubokoju-trihofitii> (дата обращения: 06.01.2020).

16. Райц М.И., Ларионов С.В. Дерматомикозы домашних плотоядных: лечение и профилактика// Ветеринарные и медицинские аспекты зооантропонозов: Мат. научно-практической конф.. – Покров, 2003. – С. 332–335.

17. Овчеренко Н.А., Гордиенко Л.Н., Селиванова Д.М. Видовой состав грибковой микрофлоры, персистирующей на коже животных с признаками дерматомикоза // Мат. XII межд. вет. конгресса по болезням мелких домашних животных. – М., 2004. – С. 97–99.

18. Щелкунова, О. А. Клинико-эпидемиологические особенности микроспории и трихофитии, подходы к лечению//автореф.дис....к.м.н., Новосибирск, 2013

19. Адаскевич В.П., Шафранская Т.В., Козловская В.В. Эпидемиологическая и клиническая характеристика больных микроскопией // Современные проблемы общей, медицинской и ветеринарной паразитологии: Тр. IV межд. науч. конф. – Витебск, 2004. – С. 267–270.

20. Иванова Л.Г. Микрофлора очагов поражений кожи у животных подозреваемых в заболеваниях дерматомикозами // Бюллетень ВНЭВ. – 1989. – вып. 72. – С. 16–22.

21. Scott D. W., Miller W.H., Griffin C.E. Muller and Kirk's Small Animal Dermatology // 6 th Ed, W. B. Saunders. – Philadelphia, 2001. – P. 334–441.

22. Поляков И.Д. Клиническое проявление дерматомикозов у собак и кошек // Мат. XII межд. вет. конгресса по болезням мелких домашних животных. – М., 2004. – С. 100–101.

23. Abramo, A. Vercelli, F. Mancianti. Two cases of dermatophytic pseudomycetoma in the dog: an immunohistochemical study. *Vet Dermatol*, 12 (2001), pp. 203-207

24. R. Bond, A.M. Pocknell, C.E. Toze. Pseudomycetoma caused by *Microsporium canis* in a Persian cat: lack of response to oral terbinafine. *J Small Anim Pract*, 42 (2001), pp. 557-560

25. R. Kano, K. Edamura, H. Yumikura, H. Maryuama, K. Asano, S. Tanaka, *et al.*

26. Confirmed case of feline mycetoma due to *Microsporium canis*. *Mycoses*, 52 (2008), pp. 80-83 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01518.x>

27. Carlotti D.N., Guinot P. et al. Eradication of feline dermatophytosis in a shelter: a field study. *Veterinary Dermatology*. 2010; 21(3): 259–66.

28. Márcia de O.N., Eduardo N.M., et al. Disease progression of dermatophytic pseudomycetoma in a Persian cat/ *Revista Iberoamericana de Micología*. - Vol. Núm. 27 (2). (Abril - Junio 2010) páginas 98-100

29. Бондарева М.В. Дерматофития собак и кошек//*VetPharma №2* (март – апрель 2016). – с. 38-42

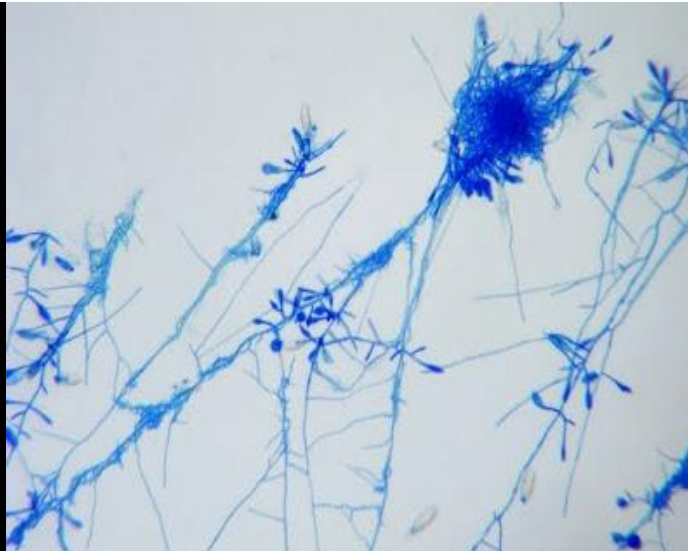
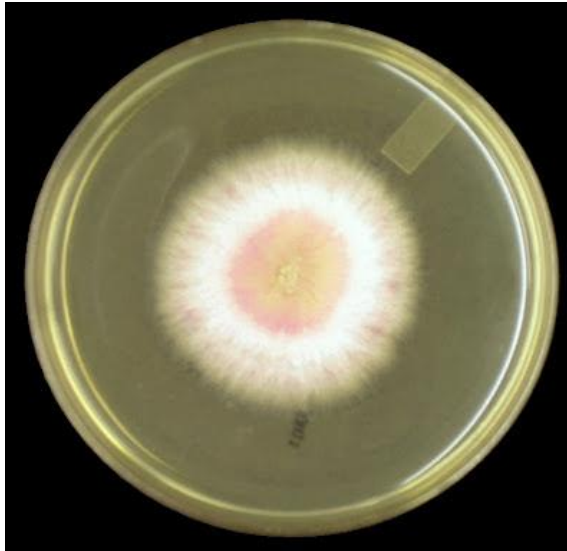
Приложение 1

Дифференция основных возбудителей дерматофитозов

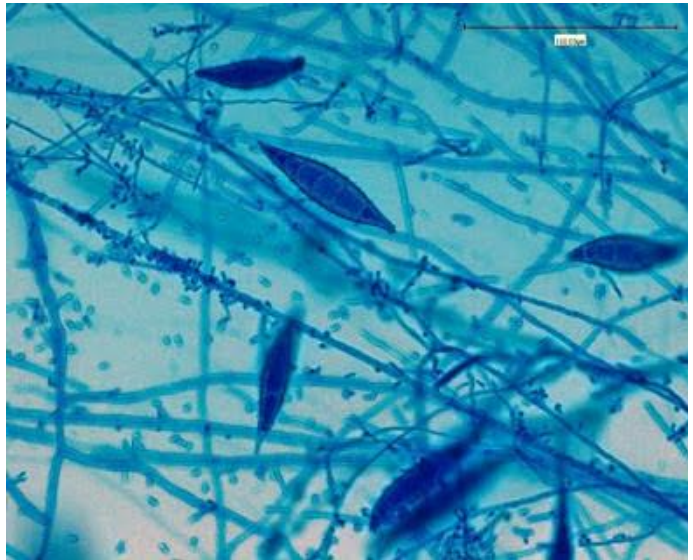
Microsporium canis

Внешний вид колонии

Общий вид мицелия (×100) на краю
стекла



Макроконидия ($\times 1000$)

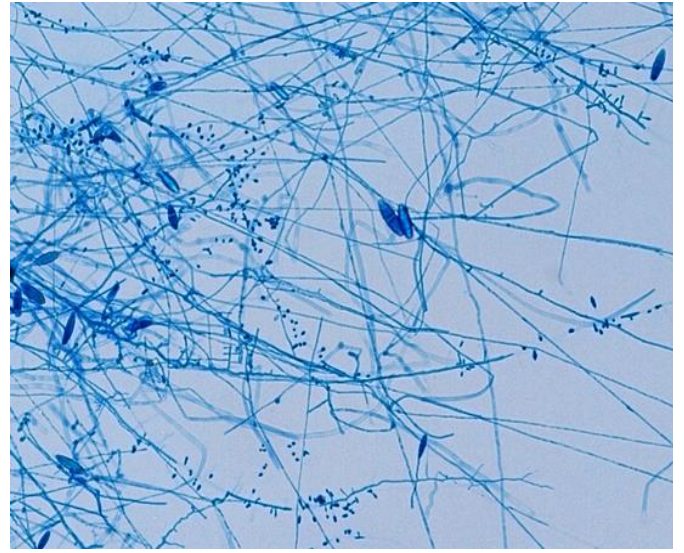


Макро- и микроконидии ($\times 400$)

Microsporium gypseum

Внешний вид колонии

Общий вид мицелия ($\times 100$) на краю
стекла



Макроконидия ($\times 1000$)



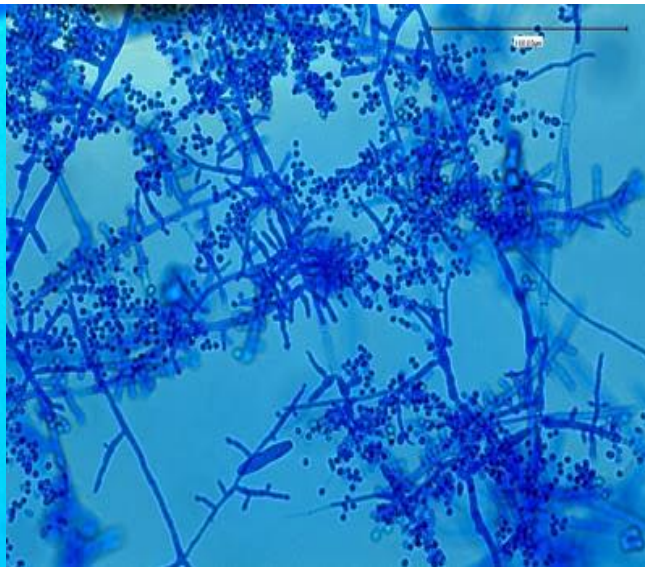
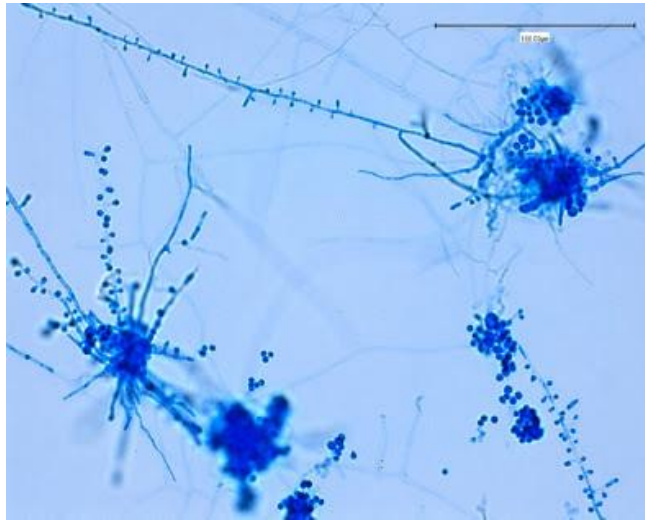
Макро- и микроконидии ($\times 400$)

Trichophyton mentagrophytes (gypseum)

Внешний вид колонии

Общий вид мицелия ($\times 100$) на краю

стекла



Макроконидия ($\times 1000$)

Макро- и микроконидии ($\times 400$)

Приложение 2

Морфологические свойства некоторых часто встречающихся представителей плесневых грибов

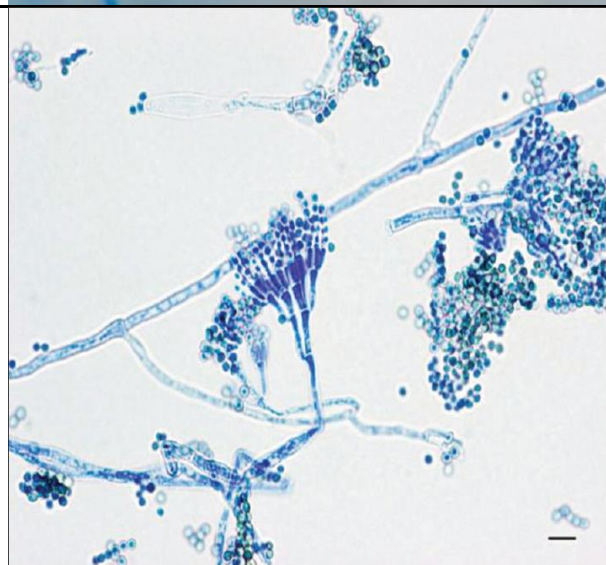
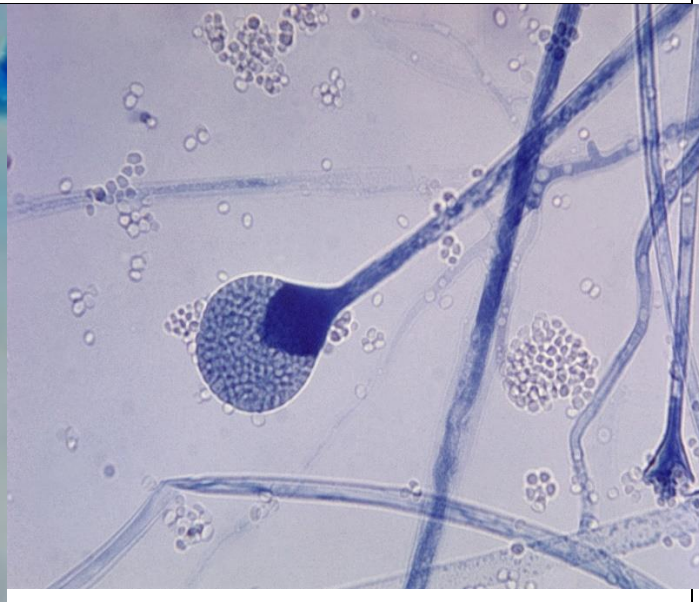
Aspergillus fumigatus (×400)

Конидиеносцы на верхушке с бутыльчатым вздутием в верхней части несущие одноярусные конидии, расположенные параллельно оси конидиеносца.



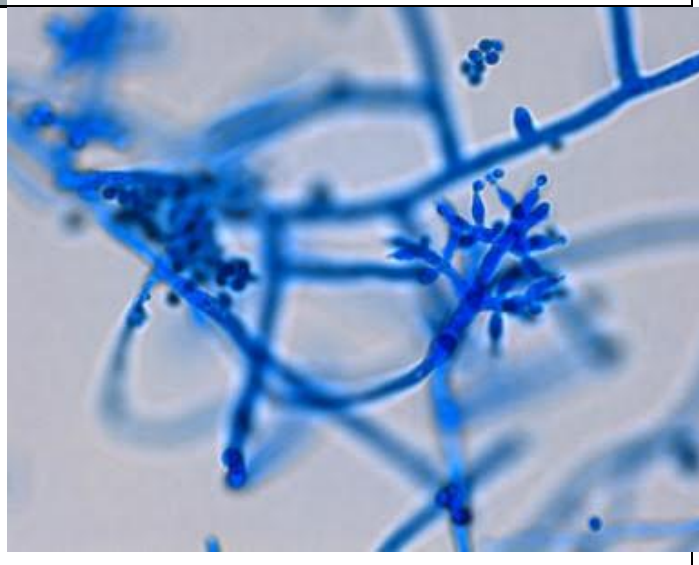
Mucor species (×400)

Одиночные спорангиеносцы, на вершине развивается по одному спорангию в форме сферической головки.
Гифы не септированные



Penicillium species (×400)

Гифы септированные, конидиеносцы септированные, на конце несут кисточку (одно-или двухярусную)



Trichoderma sp (×1000)

гифы гладкие, конидиеносцы пирамидальные, с супротивными веточками в узлах, с мутовками 2—5 фляговидных фиалид. Конидии почти шаровидные до яйцевидных, гладкостенные.

Культурально-морфологические свойства некоторых представителей дерматофитов

Вид возбудителя	Морфологическая характеристика колоний	Мицелий	Споры			
			Макроконидии, мкм	Микроконидии, мкм	Артроспоры, мкм	Хламидоспоры, мкм
M.canis	- быстрорастущие (2-3 день) мощные, мучнистые в центре, рыхло-пушистые по периферии - обратная сторона колоний красно-коричневой окраски, отчего общий вид колоний приобретает лососевый оттенок	бамбуковидный, клетки ракетообразные, гифы септированные;	11-16 x 53-85 многочисленные, веретенообразные, имеют зубчато-ворсинчатую оболочку, шиповатые, многокамерные (4-12), оболочка 2-х контурная.	1-3 x 1,5-5 микроконидии одноклеточные образования округлой или грушевидной формы, располагаются одиночно или группами.	-	округлой формы.
M.gypseum	- быстрорастущие (2-4 день), порошковидные, в центре в образует возвышение бархатистого вида. - некоторые штаммы образуют белый, ворсистый воздушный мицелий с радиальными бороздками - цвет светло-желтый до светло-коричневого, обратная сторона красновато-коричневого (до оранжевого) цвета.	мицелий тонкий, ветвящимися с редкими перегородками, иногда обнаруживают мицелий в виде спиралей, узловатых органов	25-60 x 12-18,5 многочисленные, 4-6 клеточные, эллипсоидные, внутренние перегородки тонкие, в первичных культурах макроконидии немногочисленные, одноклеточные, булавовидные	3-5 x 2,5-3,5 микроконидии многочисленные, имеют овальную или грушевидную форму	-	-

<i>M. equinum</i>	-быстрорастущие (на 3-5 день) кожистые, складчатые, плотно прилегающие к среде, покрыты серо-белым септированным воздушным мицелием. Зрелые колонии желтые, коричневые, обратная сторона ее желтая	мицелий прямой, разветвленный, септированный в виде гребня или розеткообразный	15-20 x 12-17 веретеновидные, многоклеточные, с 6-12 перегородками, немногочисленные	1-2 x 3-5 грушевидные		Интеркалярные, реже терминальные
<i>T. mentagrophytes (gypseum)</i>	-быстрорастущие, образуются (4 - 6 день) - форма правильная округлая, -морфология вариабельна: мучнисто-порошковатые, зернистые, пушистые -цвет белый или кремовый, обратная сторона колонии желтая или коричневая	мицелий разветвленный, септированный, концы имеют форму спиралей, узлов и колец	12-45 x 4-6 веретенообразные состоят из 3 - 8 клеток	2-4,2 большое количество в мучнистых колониях мелкие, круглые расположенные гроздьями и одиночно на гифах	-	обнаруживаются редко
<i>T. verrucosum (faviforme)</i>	медленнорастущие, образуются (10-30 день), бугристые, складчатые, иногда с периферической мучнистой зоной -белые (вариант <i>album</i>); кожистые, гладкие, желтые, коричневые (вариант <i>discoides</i>) - дают глубокие, мощные	лучистый рост мицелия в питательный субстрат -мицелий септированный, разветвленный, ровный или ракетообразный	32-50 x 6-7 разделены поперечной перегородкой на 5-6 клеток образуются на специальных средах.	2,5-5x1,5-2 образуются на специальных средах	многочисленные круглые или многогранные артроспоры расположены	-

	ветвления в субстрат				цепочкой	
T.equinum	Медленнорастущие (на 14-16 день) белые, бархатистые, плоские, гладкие, радиально бороздчатые, по периферии мицелий образует в питательном субстрате лучистые отростки.		4-6,5 x 14-35 удлинённые, овальные с 1-3 перегородками (рудиментарные)	2,5-5 x 3-8,5 многочисленные, округлые, овальные грушевидные на коротких ножках, возникают по бокам гиф	8-12 округлые	