

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР  
АГРОБИОТЕХНОЛОГИЙ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
(СФНЦА РАН)

НЕКОММЕРЧЕСКОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ КАЗАХСКИЙ  
АГРОТЕХНИЧЕСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ  
САКЕНА СЕЙФУЛЛИНА (НАО «КАЗАХСКИЙ АГРОТЕХНИЧЕСКИЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ С. СЕЙФУЛЛИНА»)

*На правах рукописи*

**Смагулова Айнура Муратовна**

Фенотипические и молекулярно-генетические свойства возбудителей  
дерматомикозов мелких домашних и диких плотоядных животных

4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных

1.5.6. Биотехнология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Научные руководители:**

доктор биологических наук, профессор

**Глотова Татьяна Ивановна**

доктор биологических наук, доцент

**Кухар Елена Владимировна**

Новосибирск – 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

	ВВЕДЕНИЕ	4
1	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1	Определение болезни	11
1.2	Характеристика возбудителей дерматомикозов мелких домашних и диких плотоядных животных	11
1.2.1	Культурально-морфологические и биохимические свойства <i>Microsporium spp.</i>	19
1.2.2	Культурально-морфологические и биохимические свойства <i>Trichophyton spp.</i>	21
1.3	Особенности клинического проявления дерматомикозов мелких домашних и диких плотоядных животных	23
1.4	«Золотой стандарт» диагностики микозов и методы идентификации возбудителей	26
1.4.1	Микроскопия как метод диагностики дерматомикозов мелких домашних и диких плотоядных животных	26
1.4.2	Люминесцентная диагностика дерматомикозов	29
1.4.3	Культурально-морфологическая идентификация дерматомицетов	31
1.5	Серологическая диагностика дерматомикозов	35
1.6	Молекулярно-генетическая характеристика дерматомицетов, выделенных от мелких домашних и диких плотоядных животных	37
2	СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	40
2.1	Материалы и методы	40
2.1.1	Материалы исследований	40
2.1.2	Методы исследований	41
2.2	Результаты собственных исследований	49
2.2.1	Особенности распространения дерматофитозов среди животных-компаньонов в г. Астана за 2012-2023 гг.	49
2.2.2	Особенности клинического проявления атипичной формы дерматомикозову домашних и диких животных	52
2.2.3	Изучение культурально-морфологических свойств штаммов <i>M. canis</i>	63
2.2.4	Культурально-морфологическая идентификация <i>T. benhamiae</i>	66
2.2.5	Сахаролитическая и уреазная активность дерматомицетов	69
2.2.6	Кератинолитическая активность штаммов дерматомицетов,	

	выделенных от мелких домашних и диких плотоядных животных	71
2.2.7	Чувствительность дерматомицетов к противогрибковым препаратам	75
2.2.8	Особенности получения и характеристика антигенов дерматоцитов	77
2.2.9	Отработка параметров постановки непрямого варианта ИФА для диагностики микроспории плотоядных	84
2.2.10	Молекулярно-генетическая характеристика возбудителей дерматомикозов	90
2.2.11	Биоинформационный анализ геномов дерматомицетов	93
3	ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	101
4	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	115
4.1	ВЫВОДЫ	115
4.2	ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ	116
	ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	118
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	119
	ПРИЛОЖЕНИЯ	143
	Приложение А – Справки о депонировании	144
	Приложение Б – Справки о депонировании в Genbank штаммов <i>Trichophyton benhamiae</i>	146
	Приложение В – Протокол постановки полимеразной цепной реакции с ДНК возбудителей дерматомикозов	148
	Приложение Г – Патенты, полученные Смагуловой (Шариловой) А.М.	149
	Приложение Д – Справки о внедрении	152
	Приложение Е – Методические рекомендации	155
	Приложение Ж – Штаммы <i>M. canis</i> , выделенные от животных	159
	Приложение З – Микроморфология штаммов <i>T.benhamiae</i>	163
	Приложение И – Споровые структуры штаммов <i>T.benhamiae</i>	165
	Приложение К – Результаты молекулярно-генетической идентификации дерматомицетов	166
	Приложение Л – Нуклеотидные последовательности, депонированные в базе данных <i>GenBank</i>	173

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность

Дерматофиты – кератинофильные грибы, принадлежащие к семейству Arthrodermataceae (Onygenales, Ascomycota), включающему десятки родственных видов, различающихся в основном по их анаморфам или бес-полым формам, которые объединены в три классических рода: *Trichophyton*, *Microsporum* и *Epidermophyton* (Y. Graser et al., 2008; С.Н. Ковалев и соавт., 2014; А.С. Потоскуева, 2021). Роды *Trichophyton* и *Microsporum* включают антропофильные, зоофильные и геофильные виды дерматофитов, которые способны вызывать инфекцию преимущественно у людей или животных, встречаются в почве в качестве свободно-живущих обитателей. Род *Epidermophyton* включает в себя лишь один вид – *E. floccosum*, который поражает только человека.

Заболевания, вызываемые этими грибами, – дерматофитозы – распространены по всему миру, число случаев заражения ежегодно увеличивается не только у животных, но и у людей. Особое значение имеет распространение дерматофитозов среди мелких домашних животных – кошек и собак, являющихся компаньонами человека. *Microsporum canis* и *Trichophyton mentagrophytes* являются наиболее значимыми видами дерматофитов, выделенных от инфицированных собак, кошек и других плотоядных.

До недавнего времени диагностика дерматофитозов основывалась на анализе клинических признаков заболевания, которые ненадежны из-за изменчивого характера дерматологических поражений и сходства с другими кожными заболеваниями, имитирующими симптомы, характерные для дерматофитозов (М.М. Ibrahim et al., 2023). Прямое микроскопическое исследование проб биологического материала, отобранных из очагов поражений, и изолирование культур дерматофитов на питательных средах являются золотым стандартом диагностики дерматофитозов. Однако в некоторых случаях для видовой идентификации может потребоваться дополнительное изучение биохимических свойств выделенных культур дерматофитов. Поэтому видовой идентификация дерматофитов на основе изучения фенотипических свойств является трудоемким процессом, требующим

больших затрат времени и высокой квалификации исследователей (S.E. Kidd, G.F. Weldhagen, 2022).

Изучению особенностей распространения и проявления дерматомикозов у собак и кошек в условиях города посвятили свои работы многие ученые (В.П. Королева, 1976; А.В. Горбатов, 1984; А.Ю. Ханис, 1989; Т.И. Глотова, 1998; Р.С. Овчинников, 2000; Т.Б. Тугунова, 2004; Ю.Ю. Устинцева, 2011; И.Д. Поляков, Л.Г. Иванова, 2017; В.А. Савинов, 2022).

Молекулярные методы являются перспективными для прямого обнаружения ДНК грибов в клинических образцах и их видовой идентификации (N. Kondori et al., 2013). Особенно актуально это сейчас в связи с ростом заболеваемости оппортунистическими микозами людей и животных (М.Г. Маноян и соавт., 2012; Е.В. Кухар, 2012, 2013; Р.С. Овчинников и соавт., 2014; Г.Е. Байлина, 2023). В настоящее время методы, основанные на определении нуклеотидной последовательности рибосомальных генов, используются для видовой идентификации дерматофитов в некоторых странах (J. Choi, S.H. Kim, 2013). Результаты полностью либо частично секвенированных генов рРНК различных видов микроорганизмов поступают в международные базы данных и могут быть использованы в качестве референтных. Сравнение последовательностей генов и отдельных участков генов, кодирующих рибосомальные РНК, может способствовать выявлению родственных связей между дерматофитами (Л.А. Остроумов и соавт., 2010).

Применение молекулярно-генетических методов для изучения спектра грибов, вызывающих поражения кожи и шерстного покров, позволит значительно расширить видовой состав дерматофитов, патогенных для мелких домашних и диких плотоядных животных.

### **Степень разработанности темы исследования**

Дерматофитозы относятся к инфекционным заболеваниям, не подлежащим строгой отчетности, из-за их низкой опасности для здоровья человека, что затрудняет изучение их распространенности. За рубежом обязательному микологическому исследованию подвергаются все животные с дерматологическими проблемами, а также пациенты ветеринарных клиник с другими патологиями, что позво-

ляет установить объективную картину распространенности дерматофитозов среди животных. Кроме того, в плановом порядке обследуют животных в приютах, зоомагазинах и у частных владельцев, которые могут быть потенциальными источниками скрытого миконосительства. В Российской Федерации и в Республике Казахстан исследования на дерматомикозы проводятся только в случаях выявления клинически больных животных, поступающих в ветеринарные клиники. Диагноз чаще всего основывается на результатах использования УФ-лампы с фильтром Вуда и прямой микроскопии проб биоматериала.

Проведение комплексного клинического и микологического исследования проб биологического материала, полученных от мелких домашних и диких плотоядных животных с поражениями кожи и шерстного покрова, изучение спектра возбудителей дерматофитозов и их биологических свойств, а также обобщение и систематизация фенотипических и молекулярно-генетических свойств возбудителей позволят внести существенный вклад в диагностику дерматофитии плотоядных.

### **Цель и задачи исследований**

Целью настоящей работы является изучение фенотипических и молекулярно-генетических свойств возбудителей дерматомикозов мелких домашних и диких плотоядных животных, а также усовершенствование методов диагностики.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

1. Изучить распространенность и этиологическую роль различных видов дерматофитов в заболевании мелких домашних и диких плотоядных животных.
2. Определить культурально-морфологические свойства выделенных культур дерматофитов.
3. Изучить биохимические, иммунологические свойства дерматофитов, выделенных от мелких домашних и диких плотоядных животных.
4. Усовершенствовать методы лабораторной диагностики дерматофитозов мелких домашних животных.
5. Провести молекулярно-генетические исследования основных возбудителей дерматофитозов и биоинформационный анализ полученных данных.

## Научная новизна

Выделены и охарактеризованы 19 штаммов *Microsporium canis* – возбудителей микроспории плотоядных, продуцентов специфических антител (приложение А).

Впервые выделены, идентифицированы и охарактеризованы два штамма дерматомицета *Trichophyton benhamiae* как возбудители микоза кожи домашних кошек, нуклеотидные последовательности которых депонированы в GenBank (приложение Б).

Разработан способ получения цветного антигена, который используют в модифицированной реакции роз бенгал пробы для диагностики микроспории у кошек и собак.

Отработан непрямой вариант ИФА с антигеном *M. canis* № 13 для диагностики микроскопии плотоядных.

Разработан протокол постановки полимеразной цепной реакции для генетической идентификации грибов *Microsporium canis* и *Trichophyton benhamiae* (приложение В).

Научная новизна исследований подтверждена получением двух патентов на изобретение Республики Казахстан: № 30026 Способ серологической диагностики микроспории плотоядных и № 30172 Штамм гриба *Microsporium canis F-MS-13*, используемый для получения специфических антигенов и антител при разработке методов диагностики микроспории плотоядных, а также Евразийского патента № 029205 Способ серологической диагностики микроспории плотоядных (приложение Г).

**Теоретическая и практическая значимость работы** Результаты исследований представляют теоретическую и практическую ценность, так как дают возможность совершенствования диагностики дерматомикозов домашних и диких животных.

Цветной антиген и иммунная сыворотка используются в качестве компонентов при постановке реакции роз бенгал пробы для экспресса диагностики микроспории кошек и собак в диагностических ветеринарных лабораториях, молекулярно-генетический метод идентификации дерматомицетов применяется в науч-

ном процессе Научно-исследовательской платформы сельскохозяйственной биотехнологии КАТИУ им. С.Сейфуллина и Национального центра биотехнологии МЗ РК (приложение Д).

Нуклеотидные последовательности штаммов грибов *Microsporum canis* и *Trichophyton benhamiae* депонированы в международной базе данных NCBI и могут быть использованы для сравнительного анализа генома возбудителей и биоинформационного анализа мировым научным сообществом.

Разработанные методические рекомендации по выделению и идентификации *Trichophyton benhamiae* – возбудителя дерматомикозов кошек предназначены для использования в работе научно-исследовательских и практических учреждений ветеринарного профиля при диагностике дерматомикозов животных (приложение Е).

#### **Методология и методы исследования**

В работе были использованы клинические, микологические, биохимические, биотехнологические, молекулярно-генетические, статистические методы исследования. Методология диссертационной работы спланирована в соответствии с ее структурой и задачами исследования. Объектами научного исследования являлись изоляты и штаммы грибов-дерматофитов. Научная литература, касающаяся тематики исследования, была проанализирована формально-логическими методами.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Результаты изучения распространения дерматофитозов среди животных-компаньонов в г. Астана за 2012-2023 гг.;
2. Видовой состав и этиологическая значимость грибов, являющихся возбудителями дерматофитозов у мелких домашних и диких плотоядных животных;
3. Культурально-морфологические свойства возбудителей дерматофитозов;
4. Биохимические, иммунологические свойства, анализ чувствительности возбудителей дерматофитозов к противогрибковым препаратам;
5. Результаты усовершенствования методов лабораторной диагностики дерматофитозов мелких домашних животных;



6. Молекулярно-генетический и биоинформационный анализ основных возбудителей, выделенных от мелких домашних и диких плотоядных животных.

### **Степень достоверности и апробация результатов исследования**

Достоверность результатов, полученных в ходе выполнения диссертационной работы, подтверждена статистической обработкой данных, актами комиссионных испытаний, утвержденных в установленном порядке.

Основные результаты исследований были доложены на: Международной научно-теоретической конференции «Роль ветеринарной науки и практики в эффективном развитии животноводства» (Алматы, 2012), научно-теоретической конференции «Сейфуллинские чтения» (Астана, 2012, 2013, 2022), XII Международной научно-практической студенческой конференции «Химия и жизнь» (Новосибирск, 2013), Всероссийской научно-практической конференции по медицинской микологии (Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 2013, 2023), XXI Международной научной конференции «Ломоносов - 2014» (Москва, 2014), Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, биотехнологии, экологии и биобезопасности» (п.г.т. Гвардейский, 2015), Международной конференции «Молекулярная диагностика» (Москва, 2021), Международной научно-практической конференции «Состояние и перспективы развития ветеринарии и животноводства в Республике Казахстан», посвященной 80-летию академика НАН РК, д-ра ветеринар. наук, профессора Сайдулдина Т. (Алматы, 2023), Юбилейной конференции по микологии и микробиологии (Москва, 2023).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликованы 23 научные работы: в журналах, рекомендованных ВАК РФ – 4 статьи; в базах, индексируемых Scopus – 4 статьи, в сборниках научных трудов – 8 статей, тезисы научных конференций – 7 публикаций.

### **Личный вклад автора**

Автор принимала непосредственное участие в сборе информации по распространенности дерматофитозов мелких домашних животных Северного Казахстана и Западно-Сибирского региона, проводила микологические, иммунологиче-

ские, филогенетические и молекулярно-генетические исследования проб биологического материала, написании публикаций.

### **Структура и объем диссертации**

Материалы диссертации изложены на 173 листах компьютерного текста и включают: введение, обзор литературы, описание материалов и методов, собственные исследования, обсуждение полученных результатов, заключение, список использованной литературы (233 источника, в том числе, 118 – на иностранном языке). Диссертационная работа содержит 9 таблиц, 49 рисунков, 11 приложений.

### **Благодарности**

Автор выражает искреннюю благодарность научным руководителям: главному научному сотруднику лаборатории биотехнологии – диагностический центр Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СФНЦА РАН, д-ру биол. н., профес. Глотовой Т.И.; директору научно-исследовательской платформы сельскохозяйственной биотехнологии НАО «Казахский агротехнический исследовательский университет им. С. Сейфуллина», д-ру биол. н., доц. Кухар Е.В.; заведующему лабораторией Биоразнообразия и генетических ресурсов Национального центра биотехнологии МЗ РК, PhD, доц. Кияну В.С., а также канд. мед. н., доценту кафедры микробиологии, вирусологии имени Ш.И. Сарбасовой «Медицинский университет – Астана» Байдуйсеновой А.У. за оказание практической и консультационно-методической помощи.

## 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Определение болезни

Дерматофития (дерматомикоз, дерматофитоз, микоз кожи) – высококонтагиозное и зоопатогенное грибковое заболевание кожи животных и людей, обычно вызываемое грибами видов *Trichophyton*, *Microsporum* и *Epidermophyton* (A.D. Paryuni, et al., 2020).

Дерматомикозы распространены во всем мире, причем ежегодно увеличивается количество случаев заболевания не только у людей, но и у животных. Изучению этого заболевания уделяется особое внимание в здравоохранении и ветеринарии. Особенно пристально дерматомикозы изучаются у кошек и собак (M. Ivaskiene et al., 2016), как у наиболее распространенных возможных источников инфекции для человека (E. Gordon et al., 2020). *Microsporum canis* и *Trichophyton spp.* являются наиболее значимыми видами дерматофитов, выделенных от инфицированных собак, кошек (V. Chupia et al., 2022).

### 1.2 Характеристика возбудителей дерматомикозов мелких домашних и диких плотоядных животных

Возбудители болезней – несовершенные грибы родов *Trichophyton* и *Microsporum*, вызывающие соответственно трихофитию и микроспорию. Они представляют собой группу грибов, приспособившихся в процессе эволюции к паразитированию в кератинизированных тканях у человека и разных видов домашних и диких животных. Известно около 20 видов дерматофитов, которые могут вызывать заболевание у человека и животных (П.Н. Кашкин, 1953; А.Х. Саркисов и соавт., 1972; А.М. Литвинов, 2000).

Раймон Сабуро (1937) разделил дерматофиты на следующие группы:

Первая группа – *Endothrex*. Возбудители располагаются внутри волоса, колонии мучнистые с многочисленными алейриями (микроконидиями) (*Trichophyton crateriforme* и соавт.).

Вторая группа – *Microoides*. Грибы образуют вокруг волоса чехол из спор. Колонии культур грибов этой группы гипсовые, состоящие из веретен (макроко-

нидий), коротких завитков, спиралей и узловатых образований из мицелия (*Tr. gypseum* и соавт.).

Третья группа – *Microsporium*. В основании пораженные волосы покрыты серым чехлом из спор. Споры мелкие и располагаются внутри и вне волоса беспорядочно-мозаично; колонии пушистые, пушисто-мучнистые и состоят из ракетобразного мицелия и многочисленных веретеновидных макроконидий (веретен); микроконидии (алейрии) встречаются редко.

Четвертая группа – *Achorion*. Гриб не заполняет волос целиком; в волосе длинные септированные нити мицелия, состоящие из прямоугольных сегментов; колонии *Achorion*, выделенные от человека, гладкие, а от животных – мучнистые и пушистые с наличием веретеновидных макроконидий (веретен).

Пятая группа – *Ectothrix*. Волос заполнен гифами гриба, наличие цепочек из спор; споры крупные и располагаются как снаружи, так и внутри волоса; колонии гладкие, бархатистые, бархатисто-мучнистые, коротко-пушистые с наличием алейрий (микроконидий) и рудиментов веретен (макроконидий) (Н.А. Спесивцева, 1964).

В 30-е и 40-е годы XIX столетия трое учёных исследователей: Ремак, Груби и Шёнляйн, независимо друг от друга, представили таксономическую классификацию видов грибов, вызывающих поражения кожи и приводящих к распространению заболевания (G.M. Crawford, 1951). Первым из этой группы был открыт возбудитель парши – ахорион. В 1839 г. Шенлейн (Schonlein), впервые доказал «растительную природу» поражений при парше. Независимо от Шенлейна, Груби (Gruby) в 1841 г. открыл и описал этот же грибок, а в 1845 г. Ремаку (Remak) удалось получить чистую культуру ахориона и доказать его патогенную роль. Спустя три года после открытия ахориона Груби описал возбудителей двух других клинических форм – трихофитии и микроспории.

По данным отечественных и зарубежных ученых: Саркисов А.Х. (1968); Woloszyn S. (1973); Османов С. (1974); Abou-Gabal M. (1976); Королева В.П. (1976); Никифоров Л.И. (1981); Конопаткин А.А. (1984); Борисов Л.Б. (1994); Бакулов И.А. (1997); Слугин В.С. (1997); Беляков И.М., Лукьяновский В.А. (1998);

Колычев Н.М., Ощепков В.Г., (2001); Патерсон С., (2001); Майоров А.И. (2001); Sigurgeirsson B. (2001); Linozencic J. (2001); Шагаев Д.В. (2003), дерматомикозы у мелких домашних животных чаще вызывают следующие виды грибов: *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton verrucosum*. Встречаются также дерматомикозы, вызванные *Trichophyton terrestre*, *Microsporum gypseum*, *Microsporum cookei*. Есть сообщения о других возбудителях дерматомикозов у мелких домашних животных, например *T. benhamiae* (L. Ajello, 1973).

Jarjees K.I., Issa N.A. (2022) установили, что распространенность заболевания дерматомикозами среди кошек, собак и людей составила 44,36%, 40,43% и 65,91%, соответственно. Причиной заболевания чаще всего являлся *Microsporum canis*, который был выявлен у 94,92% кошек, 92,11% собак и 100,0% людей, тогда как *Trichophyton mentagrophytes* был выделен только от 5,08% кошек и 7,89% собак. Было установлено, что животные и люди в молодом возрасте были более восприимчивы к инфекции. Среди животных самцы были более восприимчивы, чем самки, в то время как среди людей наблюдалась обратная картина. Риск заражения дерматофитией у домашних кошек был выше, чем у уличных кошек. В то же время риск заражения дерматофитией у собак, выращенных на улице, выше, чем у собак, выращенных в помещении. Контакт с инфицированными кошками и собаками являлся основной причиной распространения заболевания среди людей. Кроме того, было установлено, что пациенты, перенесшие коронавирусную инфекцию в 2019 г. (COVID-19) имели более высокий риск развития дерматофитии, чем те, кто не был инфицирован COVID-19.

***Microsporum canis*** – зоофильный вид. Основным источником инфекции являются кошки и собаки.

Колонии *M. canis*, изолированные на картофельном агаре (КА) при 25°C (КА, 25°C), пушистые, белые, с желтой обратной стороной. У некоторых штаммов пигментация может отсутствовать.

Гифы септированные, бесцветные, с крайне редко встречающимися булаво-видными микроконидиями, 4-6×2-3 мкм. Во множестве присутствуют микроконидии, 35-100×12-25 мкм, веретеновидные, толстостенные и разделенные на 6-

12 клеток. Верхняя шишковидная часть конидии нередко изогнута. При культивировании на питательных средах в факторах роста не нуждается. *M. canis* дает положительный результат в тесте на перфорацию волос (G. Rebell, D. Taplin, 1970; D. Ellis, S. Davis, 1992; G. Germain, R. Summerbell, 1996).

***Microsporium gypseum*** – геофильный вид, способен вызывать заболевания у человека и различных видов животных.

Колонии *M. gypseum* (КА, 25°C) плоские, от порошащихся до зернистых, от темно-кремовых до желто-коричневых с желто-коричневым пигментом. Гифы септированные, бесцветные, с многочисленными булавовидными микроконидиями размером 3-8×2-3 мкм и макроконидиями 25-60×8-15 мкм. Макроконидии симметрично эллиптические, шероховатые и тонкостенные, разделенные на 4-6 частей. Вершина конидий закругленная, основание четко усеченное, часто имеющее кольцевидные оборки.

В факторах роста не нуждается, в тесте на перфорацию волос дает положительный результат (G. Rebell, D. Taplin, 1970; D. Ellis, S. Davis et al., 1992; St. G. Germain, R. Summerbell, 1996).

***Microsporium cookei*** – геофильный вид, часто встречается в почве или как сапрофит на шерсти у мелких животных.

Колонии *M. cookei* (КА, 25°C) могут быть от порошащихся до бархатистых, от белых до желтых или от желто-коричневых до коричневых с красно-коричневой обратной стороной. Гифы – септированные, бесцветные, с редкими или относительно редкими микроконидиями размером 4-6×2-5 мкм. Во множестве образуют макроконидии размером 30-50×10-15 мкм, широкоэллиптические, с толстой шероховатой стенкой, состоящие из 5-10 частей.

При культивировании на питательных средах в факторах роста не нуждается. В тесте на перфорацию волос дает положительный результат (G. Rebell, D. Taplin, 1970; D. Ellis, S. Davis et al., 1992; St. G. Germain, R. Summerbell, 1996).

***Trichophyton mentagrophytes*** – антропофильный и зоофильный вид.

Колонии *T. mentagrophytes* (КА, 25°C) могут быть от порошащихся до зернистых, у зоофильных штаммов – кремовые, у антропофильных штаммов – белые

и пушистые. Пигмент на обратной стороне может быть от желтого до коричневого цвета.

Образует гифы септированные, бесцветные, с многочисленными округлыми или почти шаровидными микроконидиями диаметром до 2 мкм, формирующимися вдоль гиф или в виде виноградной грозди. Могут встречаться спиральные гифы. Изредка наблюдаются булавовидные макроконидии размером 20-40×6-8 мкм с многочисленными перегородками.

В факторах роста не нуждается, обладает уреазной активностью, дает положительный результат в тесте на перфорацию волос (G. Rebell, D. Taplin, 1970; D. Ellis, S. Davis et al., 1992; St. G. Germain, R. Summerbell, 1996).

*Trichophyton verrucosum* – зоофильный вид, на КА при 25°C формирует колонии от белых до кремовых, с очень ограниченным ростом, сильно поднимающиеся над поверхностью питательной среды, с возможным окрашиванием субстратного мицелия в желтый цвет (желтый пигмент обратной стороны). Образует гифы септированные, бесцветные, с редкими булавовидными микроконидиями размером 4-7×2-3 мкм, макроконидии размером 35-45×4-7 мкм многоклеточные в виде нити бус. При культивировании при 37°C чаще всего образуются характерные цепочки хламидоспор. Добавление к питательной среде тиамин при культивировании в таких условиях значительно стимулирует рост гриба. Не вызывает перфорацию волос и не обладает уреазной активностью.

В литературе описаны случаи острой воспалительной инфекции у лиц, находившихся в контакте с инфицированными *T. verrucosum* животными (G. Rebell, D. Taplin, 1970; D. Ellis, S. Davis, 1992; G. Germain, R. Summerbell, 1996).

*Trichophyton terrestre* – геофильный вид, часто выделяется из почвы или встречается в качестве сапрофита на шерсти мелких домашних и диких животных.

*T. terrestre* формирует на КА при 25°C колонии от зернистых до пушистых, от кремовых до желтых. У некоторых штаммов *T. terrestre* наблюдаются пигментация обратной стороны колонии от светло-желтого до красного цвета. Образует гифы септированные, бесцветные, с булавовидными или снабженными ножками

микроконидиями размером 4-7×1-5 мкм, располагающиеся непосредственно на вегетативных гифах или ножках. Отделившиеся микроконидии имеют выраженный рубчик на месте прикрепления. Формирует макроконидии размером 10-50×4-5 мкм, цилиндрические, многоклеточные, с закругленными концами.

*T. terrestre* не нуждается в факторах роста, не обладает кератинолитической активностью, из клинических образцов рост дает редко на питательных средах (G. Rebell, D. Taplin, 1970; D. Ellis, S. Davis et al., 1992; St. G. Germain, R. Summerbell, 1996).

*Trichophyton benhamiae* – зоофильный вид, передающийся человеку в основном от морских свинок и иногда от кроликов, кошек и собак.

Колонии *T. benhamiae* на КА при 25°C могут быть от бархатистых до мучнистых, окрашенных в белый, или оранжево-желтый цвет. Некоторые штаммы гриба вызывают пигментацию обратной стороны в светло-желтый или темно-красный оранжевый цвет.

В соответствии с клинической классификацией Шеклакова Н.Д. (1976) все заболевания, вызываемые грибами – микозы, разделяют на 4 группы:

1. Кератомикозы (разноцветный лишай; узловатая трихоспория (пьедрa));
2. Дерматомикозы (эпидермофития, микоз, обусловленный красным трихофитом, трихофития, микроспория, фавус);
3. Кандидозы (поверхностный кандидоз кожи и слизистых оболочек и соавт.);
4. Глубокие микозы (бластомикоз, споротрихоз, хромомикоз).

*M. canis* чаще всего выделяется от животных и человека. Геофильные разновидности дерматофитов (*M. gypseum* и *T. terrestre*) были изолированы от собак. Частота их выделения составляла от 2,2 до 8,7% в зависимости от климатических условий (изменений температуры и влажности). При обследовании в период с января 1999 г. по декабрь 2002 г. 424 животных (268 собак и 156 котов) с повреждениями кожи (облысение, единичные участки повреждения кожи) из 99 (23,3%) изолировали культуру гриба (20,5% – от собак и 28,2% - от кошек). Чаще всего изолировали культуру гриба *Microsporum canis*, также геофильные дерматофиты –



*M. gypseum*, *Trichophyton terrestre*. Получены статистически достоверные данные по более частому выявлению *M. canis* у молодых животных до года, чем у животных старшего возраста (С. Cafarchia, 2004).

От кошек в 80-98% случаев поражения кожи и шерстного покрова выделяется грибок *M. canis*. Этот дерматофит выявляется у животных во многих странах и на всех континентах (В.В. Андриюшин, 1978; К.Р. Baker, 1970; U. Kaben, 1965; L.K. Georg, 1960; A. Hasegawa, 1976; С. Cafarchia, 2004).

По данным Гордиенко Л.Н. (2007), при обследовании 33653 животных, принадлежащих частным владельцам, заводчикам и служебным питомникам в Омске и Тюмени, у 35% животных были выявлены клинические признаки поражения кожи, в 50% случаев грибной этиологии, из которых 7,5% были вызваны *M. canis*.

По мнению ряда исследователей (З.Г. Степанищева, 1958; I. Alteras, 1961; Ж.В. Степанова, 1970; А.С. Обухова, 1973; В.Р. Bloom, 1974; G. Rabell, 1974; А.М. Ариевич, 1974; Т. Kuschida, 1978; M.F. Simpanya, 1996; A de Q Pinheiro, 1997; A. Hasegawa, 2000; S. Maraki, 2000) основным источником инфекции для человека являются инфицированные кошки.

Особую опасность для человека и домашних животных представляют инфицированные бездомные собаки и кошки (М.Н. Егоров, 1970; И.Л. Бухтоярова, К.Ф. Фомин, 1973; Р.И. Гракович, 1981; С.И. Снигирев, 2001; И.Г. Хожаева, 2001; Н.В. Кузнецова, С.Г. Калачева, 2003).

Описаны так же случаи заражения животных от человека (Э. Фейер и соавт., 1966; Д. Карлсон, 1997; И.А. Бакулов и соавт., 1997; В.П. Шишков, 1998; С.Е. Старченков, 1999; Р.М. Гаскелл, 2000; А.М. Литвинов, 2000; В.М. Рукавишников, 2001; А.В. Цыганко, 2003).

Животные и человек инфицируются путем прямого или непрямого контакта. Описаны случаи заражения через поврежденные участки кожи (микротравмы, трещины, ссадины, царапины) (Н.П. Бацанов, 1992; А.И. Майоров, 2001). Для животных и человека особую опасность представляют шерсть и чешуйки кожи от больных животных.

Факторами передачи возбудителя являются инфицированные помещения,

мебель, оборудование, предметы ухода, амуниция (ошейники, шлейки, намордники, поводки), корма, подстилка загрязненные шерстью больных животных (Н.В. Кузнецова, С.Г. Калачева, 2003).

По мнению Connole M.D. (1965), Вахтер М. (1996), Кашкина П.Н. (1978), Андриасяна С.Г. (1978), Kushida T.A. (1978), Stenwig H. (1985), почва является резервуаром патогенных и условно-патогенных грибов, способствуя возникновению спорадических случаев заболевания у животных и человека. Аналогичного мнения придерживаются Avram A. (1963), Braun W. (1967), Гракович Р.И. (1979), Парманов М.П. (1981).

Возросший за последние годы интерес к редким и декоративным породам, а также развитие отечественной кинологии и фелинологии привели к увеличению миграции собак и кошек из разных регионов и стран. Особенно большой экспорт их отмечается из стран Европы, Северной Америки. Завезенные животные, зачастую являются потенциальными источниками возбудителей дерматомикозов, вступают в контакт с аборигенами и могут быть пусковым звеном развития эпизоотии дерматомикозов среди собак и кошек (Т.Б. Тугунова, 2003). Сообщается о вспышке дерматофитоза, вызванного *Microsporium canis* у свиней на одной из ферм в Боварии (S. Normansdorfer, 1995).

Являясь наиболее близкими человеку животными, собаки и кошки представляют потенциальную опасность как источники заражения человека и других видов животных инфекционными заболеваниями, в частности микроспорией и трихофитией (Н.В. Демидов, 1959; А.И. Генис, 1963; Т.Б. Тугунова, 2004; С. Cafarchia, 2004). Любимые домашние животные могут служить резервуаром зоофильных дерматофитов.

Увеличивающиеся случаи дерматофитий у людей, обусловленных грибом *M. canis* – результат постоянной циркуляции его на животных. Растет число сообщений о том, что *M. canis* теряет свою патогенность для человека в течение четырех пассажей при отсутствии возможности циркуляции на животных (С. Cafarchia, 2004).

Сезонность возникновения и проявления дерматомикозов зависит от при-

родно-климатических условий географической зоны, способствующих выживанию грибков и сохранению их патогенности.

В видовом составе возбудителей дерматомикозов преобладают патогенные дерматомицеты, относящиеся к родам *Microsporium* и *Trichophyton*. Роль условно патогенных грибов в этиологии дерматитов у собак и кошек изучена недостаточно.

### **1.2.1 Культурально-морфологические и биохимические свойства**

#### ***Microsporium spp.***

Считается, что идентификация *M. canis* основана, главным образом, на изучении его культурально-морфологических и биохимических свойств. По мнению других исследователей, видовая идентификация представителей рода *Microsporium*, основанная только на определении фенотипических свойствах возбудителя, несовершенна и существует необходимость разработки более эффективных методов диагностики (Y. Graser et al., 2008). Культурально-морфологические и биохимические свойства дерматофитов могут нередко варьировать вследствие выраженной их видовой изменчивости, что часто усложняет диагностику заболевания.

Graser Y. et al. (2008) сообщают о необходимости использования молекулярно-генетических методов для повышения эффективности диагностики дерматомикозов. Тем не менее в большинстве диагностических лабораторий идентификация *M. canis* обычно проводится на основе фенотипического анализа его макро- и микроморфологии, а также биохимических свойств (R.S.N. Brillhante et al., 2004).

По данным De Hoog G.S. et al., (2000) *M. canis*, как правило, формирует на питательных средах остроконечные, с низкой хлопковой текстурой колонии без, или с варьирующим от канареечно-желтого до охряного пигмента. Морфология колоний *M. canis* описана на агаре Сабуро и картофельном агаре. Были выявлены ватообразные, с апикулированным пигментом; ватообразные, остроконечные без пигмента; ватообразные с пигментом. Это разнообразие морфологии, вероятно, было связано с адаптацией штамма к различным условиям окружающей среды. Эти данные показывают, что особенности колоний не являются патогномичным

признаком для штаммов *M. canis*.

Количественное определение макро- и микроконидий при росте на четырех различных питательных средах позволило заключить, что рисовый агар и картофельный агар индуцировали небольшое количество репродуктивных структур. Эти результаты противоречат ранее опубликованным данным о том, что рисовый агар (G.S. De Hoog et al., 2000) можно использовать для стимуляции образования конидий. Применение Среда картофельно-глюкозного агара не привело к стимулированию адекватного конидиогенеза. При этом отмечали формирование большого количества стерильных гиф у штаммов *M. canis* после разных сроков хранения (R.S.N. Brillhante, 2003).

Лактримель-агар был лучшим для образования микро - и макроконидий, вероятно, из-за богатого углеводного состава. Подтверждая эти данные, Marchisio V.F. et al. (1995) показали, что этот агар является лучшей средой для индукции продукции макроконидий штаммами *M. canis*.

Макроконидии, продуцируемые на рисовом и картофельном агарах, были классифицированы по данным De Hoog G.S. et al. (2000) как классические макроконидии *M. canis*, несмотря на низкое количество индуцируемых репродуктивных структур.

Тест на перфорацию волос *in vitro* и уреазный тест являются важными дополнительными инструментами для идентификации *M. canis* (R.S. Brillhante et al., 2004). По данным De Hoog G.S. et al. (2000) и Brillhante R.S. et al. (2003) рост *M. canis* в питательной среде значительно стимулирует обогащение ее витаминами. Это подтверждено данными о том, что 100% штаммов *M. canis* давшие положительный результат на перфорацию волос *in vitro*, также имели удовлетворительный рост в питательной среде с тиаминном, никотиновой кислотой, инозитолом и гистидином. 80% штаммов были уреазоположительными.

Авторский коллектив Кухар Е.В., Киян В.С., Глотова Т.И., Глотов А.Г. (2020), изучали сахаролитические свойства четырех штаммов *M. canis*, по результатам исследования все четыре штамма активно сбразивали глюкозу, сахарозу, мальтозу, лактозу и маннит.

По мнению ряда авторов (К. Makimura et al., 1999; E. Faggi et al., 2001; R.S. Brilhante et al., 2003 и 2004), дерматофиты при размножении на питательных средах могут легко изменять свойственные им морфологические особенности.

Процесс адаптации вида может быть связан с биотическими и/или абиотическими вариациями в среде его обитания, не являться следствием генетических изменений.

Yu J. et al. (2004) установили генетическую идентичность штаммов *M. canis*, выделенных от кошек, собак и человека, несмотря на наличие разных фенотипических свойств, выявленных у них.

Существующее разнообразие фенотипических проявлений у культур гриба *M. canis* при росте на питательных средах объясняется его адаптацией к условиям культивирования.

По мнению некоторых исследователей *M. canis* является высоко трансмиссивным видом, способным вызывать массовые заболевания среди кошек, содержащихся в частных питомниках, а также – у людей, особенно детей, проживающих рядом с этими животными (M. Watanabe et al., 2022).

### **1.2.2 Культурально-морфологические и биохимические свойства**

#### ***Trichophyton* spp.**

Впервые *Trichophyton benhamiae* был выделен (L. Ajello, 1967) от человека и собак в Северной Америке и описан под названием *Arthroderma benhamiae*.

Наиболее частым хозяином *T. benhamiae* является морская свинка (*Cavia porcellus*), заражение человека может быть связано с контактами с этими животными. *Trichophyton benhamiae* может вызывать сильный воспалительный дерматомикоз в области туловища и волосистой части головы у человека.

*Trichophyton benhamiae* является преимущественно зоофильным патогеном, распространенным по всему миру. Согласно данным Baert F. et al. (2021), комплекс *Trichophyton benhamiae* включает шесть близкородственных видов: зоофильные виды *T. benhamiae*, *T. erinacei*, *T. eriotrephon*, *T. verrucosum*, *T. bullosum* и антропофильный вид *T. concentricum*. По мнению (А. Ымова et al., 2020), эти

патогены в последнее время приобрели большое значение из-за их распространения среди домашних животных и среди их владельцев.

На основе экспериментов по биологической совместимости у *Trichophyton benhamiae* были признаны две расы: «американо-европейская» и «африканская». Среди американо-европейской расы постепенно идентифицировались два фенотипических варианта («желтый» и «белый» фенотип). Инфекции человека, вызванные штаммами желтого фенотипа, передаваемые в основном от морских свинок, увеличились с 2010 г. в различных европейских странах (Т. Bartosch et al., 2018, А. Peano et al., 2022).

Грибок широко распространен в популяциях морских свинок и в зоомагазинах, при этом у животных, как правило, мало признаков болезни или они вообще отсутствуют (Е. Segal et al., 2021).

Число выделений *T. benhamiae* от людей и животных непрерывно увеличивается. За последнее время *T. benhamiae* выделен в Германии, Аргентине, США, Швейцарии, Иране, России, Италии, Финляндии; от кроликов во Франции, Японии, от собак в Швейцарии, Италии и США, от кошек в Бразилии и США (S. Drouot et al., 2009, J. Hiruma et al., 2015, Т. Bartosch et al., 2018, М. Sabou et al., 2018, Setal. Ansari, 2021, В.А. Савинов 2022, Aetal. Peano, 2022).

Морфологически для штаммов *T. benhamiae* описаны два типа колоний, включая желтые и белые колонии. Белые типы колоний зернистые, порошкообразные, лучистые и плоские, иногда слегка желтоватые по краям. Этот фенотип характеризуется быстрой скоростью роста, многочисленными микроконидиями от сферических до булавовидных и редкими булавовидными до сигарообразных макроконидий.

Белый колониальный тип *T. benhamiae* морфологически очень похож на *T. mentagrophytes*, и, учитывая высокую вероятность пропущенного диагноза из-за неправильной идентификации морфологии, возможно, что истинный уровень заболеваемости *T. benhamiae* в мире недооценивается.

Биохимическая характеристика гриба *Trichophyton verrucosum* var. *album* на средах Гисса, наиболее выраженный результат показал при расщеплении сахарозы и

глюкозы, сопровождался изменением цвета среды и активным образованием пузырьков газа, также штамм обладал уреазной активностью (Е.В. Кухар и соавт., 2016).

Газисовой Л.Д. (2017) дан анализ сахаролитической активности штаммов *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes*. По результатам анализа *T. verrucosum* сбраживает лактозу и глюкозу, менее интенсивно мальтозу, сахарозу. Маннит не сбраживает. *T. mentagrophytes* интенсивно сбраживает сахарозу, мальтозу, менее интенсивно – глюкозу и лактозу. Маннит не сбраживает.

### **1.3 Особенности клинического проявления дерматомикозов мелких домашних и диких плотоядных животных**

Дерматомикозы собак и кошек, способные передаваться человеку, являются наиболее распространенной группой кожных заболеваний. Это обширная группа поражений кожных покровов и ее производных, вызываемых патогенными грибами. Возбудители трихофитии и микроспории вызывают заболевания, которые часто называют «стригущий лишай».

К возбудителям трихофитии и микроспории восприимчивы животные всех возрастов, но особенно молодняк с первых дней жизни. Болезнь регистрируется в любое время года. Источником возбудителя являются больные животные. В условиях города основными миконосителями и распространителями возбудителей инфекции являются кошки, особенно бездомные, а также – мышевидные грызуны. Наличие ссадин, царапин и других повреждений кожи являются предрасполагающими факторами для проникновения и распространения возбудителя. При проникновении в глубокие слои кожи возбудитель вызывает развитие воспалительного процесса, который сопровождается зудом, наиболее характерным для трихофитии. При микроспории зуд отсутствует.

Ряд исследователей (А.В. Горбатов, 1984; Н.П. Головина, Ч.П. Колодиев, 1999; Т.Б. Тугунова, 2004) выделяет следующие клинические формы проявления дерматофитозов у собак и кошек:

- классическая, характеризующаяся возникновением на коже единичных очагов поражения правильной округлой формы;

- рассеянно-диффузная, сопровождающаяся облысением, часто обширным, локализующимся в различных участках тела и сопровождающимся часто шелушением кожи;
- эрозионная, при которой на коже отмечают четко ограниченные мокнущие участки;
- атипичная, или бессимптомная, проявляющаяся незначительным постоянным выпадением волос.

Классическая и скрытая формы встречаются у собак в течение всего года. Рассеянно-диффузная регистрируется чаще в весенне-осенний период, преимущественно у собак следующих пород: немецкая и восточноевропейская овчарка, эрдельтерьер, миттельшнауцер. Эрозионная – в весенне-летний период, у ротвейлеров, колли, пуделей. Атипичная форма характерна для чау-чау, шарпеев, пекинесов. Рассеянно-диффузная форма заболевания часто ветеринарными врачами принимается ошибочно за другие заболевания, такие как: экзема, чесотка, гипо- или авитаминозы.

У кошек преобладает бессимптомная и классическая формы заболевания, в редких случаях встречается рассеянно-диффузная и эрозионная (А.В. Горбатов, 1984; Н.П. Головина, Ч.П. Колодиев, 1999; Т.И. Глотова, 1998, 2000; Т.Б. Тугунова, 2004).

Очаги поражения у домашних животных чаще всего локализируются в области головы, лопаток, передних конечностей, реже в области ребер, задних конечностей и хвоста. У взрослых особей могут быть поражения вокруг молочных желез. При рассеянно-диффузной форме количество очагов поражений у одного животного может насчитывать до 15 и более. У кота породы донской сфинкс при рассеянно-диффузной форме микроспории зафиксировали 35 очагов поражения, равномерно распределенных по всему телу животного (Т.И. Глотова, 1998, 2000; Т.Б. Тугунова, 2004).

При трихофитии более выражена воспалительная реакция со стороны кожи, сопровождающаяся ее покраснением, отеком и инфильтрацией (Г.В. Чукашев, 1960; С.В. Петрович, 1982; Т.Б. Тугунова, 2004).



При классической форме инфекции поражаются преимущественно поверхностные кератинизированные ткани. На коже образуются участки облысения – алопеции круглой формы различного размера, с выраженной десквамацией. Воспалительная реакция кожи в форме эритемы возникает редко. Поражение кожи, как правило, распространяется от центра к периферии. При этом поверхность пораженного участка кожи может быть покрыта пустулами, в дальнейшем образуются корки. Поскольку грибы поражают волосяные фолликулы, шерсть у животного теряет свою окраску, становится ломкой, обламывается и легко выщипывается. Если течение заболевания сопровождается выраженным зудом, то дерматофитоз может осложняться гнойным, травматическим дерматитом, так как животное расчесывает пораженные участки тела. Заболевание может быть очаговым и ограничиваться одним или двумя пораженными участками. Чаще всего участки поражения наблюдают в области носа, ушей, глаз или на лапах (Г.В. Чукашев, 1960; С.В. Петрович, 1982; Т.Б. Тугунова, 2004).

Известны случаи поражения когтей у собак и кошек, которые возникают при контакте с зараженной почвой, особенно сильно подвержены этому охотничьи собаки. Возникает онихогрифоз, при котором изменяется внешний вид пластинки, нарушается рост когтей (И.Д. Поляков, Л.Г. Иванова, 2017).

При генерализированной (диссеминированной) форме заболевания, инфицированные участки сливаются и покрывают значительную площадь поверхности кожи. Клинические проявления дерматомикозов могут варьировать в зависимости от вида возбудителя и животного.

В некоторых случаях у животных отмечают само выздоровление, обусловленное состоянием иммунной системы хозяина. При хроническом течении заболевания у животного отмечают наличие незначительных очагов поражений (А.В. Горбатов, 1984; Н.П. Головина, Ч.П. Колодиев, 1999).

Отмечено, что у домашних и диких животных может развиваться состояние миконительства, при котором клинические признаки заболевания отсутствуют. При этом споры грибов находятся в покоящемся состоянии, не проявляя патогенных свойств. Такие животные являются источником инфекции для восприимчи-

вых животных (Т.И. Глотова, 1997, 1998, 2000; Т.Б. Тугунова, 2004).

По данным авторов установлено, что до 60% животных-компаньонов могут быть бессимптомными миконосителями (И.Д. Поляков, Л.Г. Иванова, 2017).

Основную этиологическую значимость бессимптомного миконосительства имеет вид *M. canis*. Кроме того, на шерсти животных могут присутствовать и другие виды дерматофитов: *Nannizzia persicolor* (ранее *M.persicolor*), *Nannizzia gypsea* (ранее *M. gypseum*), комплекс *T. mentagrophytes*.

Помимо классических симптомов, дерматофитозы могут проявляться в виде атипичных форм. Грибы могут проникать в толщину кожи и образовывать так называемые подкожные нодулярные поражения, которые разделяют на: керионы, которые проявляются в виде единичных или множественных узелков, содержащих экссудат и фрагменты волосяного фолликула, и мицетомы, которые сопровождаются гнойным гранулематозным подкожным воспалением (Г.В. Чукашев, 1960; С.В. Петрович, 1982; Т.Б. Тугунова, 2004).

Нодулярный подкожный дерматофитоз встречается крайне редко, имеет хроническое течение и поражает, чаще всего, кошек. Ведущую этиологическую роль в этом занимает *M. canis*.

Грибы образуют большое количество спор, что способствует их широкому распространению. Споры вместе с чешуйками и корочками попадают во внешнюю среду. Заражение происходит при непосредственном контакте со спорами. Инкубационный период заболевания может составлять от 5 до 40 суток (Г.В. Чукашев, 1960; С.В. Петрович, 1982; Т.И. Глотова, 1997; Т.Б. Тугунова, 2004).

## **1.4 «Золотой стандарт» диагностики микозов и методы идентификации возбудителей**

### **1.4.1 Микроскопия как метод диагностики дерматомикозов мелких домашних и диких плотоядных животных**

Микроскопия – это метод диагностики дерматомикозов, позволяющий обнаружить нити мицелия или споры патогенных грибов. Она является одним из основных методов при диагностике микозов (С.В. Петрович, 1982; Т.И. Глотова и

соавт, 2002), а также самым простым и быстрым при идентификации возбудителя болезни (И.А. Голубев, 1970).

На первом этапе работы производится отбор проб биологического материала, в качестве которого чаще всего берут кожные чешуйки, волосы и т.д. Отбирают патологический материал в количестве, достаточном для повторного анализа. За несколько дней или недель до взятия проб биологического материала всякое лечение прекращается. По сообщениям Родионова А.Н. (2000) даже слабые дезинфицирующие растворы или индифферентные средства могут помешать исследованию.

Для просветления кератинизированных структур используют простые или составные растворы едкой щелочи (KOH, NaOH).

Из кожных поражений материал берется путем соскоба, выдергивания пораженного волоса или с использованием липкой ленты. Перед взятием патологического материала пораженное место обрабатывается тампоном, смоченным 70%-ным спиртом. Это позволяет сократить возможность загрязнения материала посторонней бактериальной микрофлорой, а также повышает шансы обнаружения гриба-возбудителя.

Одним из наиболее эффективных способов отбора проб биологического материала из участков поражений у животных является соскоб. Данный способ предусматривает соскабливание материала, содержащего большое количество жизнеспособных фрагментов грибов с наружного края поражения. При отсутствии шелушения в пораженном месте можно использовать скотч, который прижимают к пораженному месту, затем удаляют и кладут липкой стороной на предметное стекло. Кожные чешуйки необходимо соскабливать с периферии очагов, где чаще всего могут находиться фрагменты мицелия и споры грибов. Транспортировку отобранных проб биоматериала в лабораторию осуществляют в закрытых микропробирках или бумажных пакетах.

Для просветления пробы биоматериала помещают на середину предметного стекла и наносят 1-3 капли 20-30% раствора KOH (NaOH). Далее патологический материал осторожно подогревают над пламенем спиртовки, не допуская кипяче-

ния до появления из кристаллов щелочи нежного белого ободка по периферии капли. После этого предметное стекло накрывают покровным, избегая попадания пузырьков воздуха. После наложения покровного стекла подогревание препаратов не рекомендуется. Длительному хранению данные препараты не подлежат. Лучше всего исследовать препараты рекомендуется в течение первых двух часов с момента приготовления, так как после этого наступает глубокое разрушение тканей или выпадение кристаллов щелочи. Аравийский Р.А. и Горшкова Г.И. (1995) рекомендуют приготовленные для мацерации препараты волос оставлять на 5-10 минут, а ногтевых пластинок на 30-40 минут до микроскопирования.

Просветление препаратов может проводиться без подогревания, с фиксацией их в растворе 20% КОН до 60 минут. Помимо этого, можно использовать другие методы просветления патологического материала, такие как просветление лактофенолом, хлораллактофенолом по Аману; диметилсульфоксид-содержащим и КОН-содержащим раствором. Некоторые лаборатории также практикуют просветление препаратов в 15-30% растворе коммерческих темно-синих чернил фирмы Паркер.

Микроскопическое исследование патологического материала при дерматомикозах проводят как в нативных, так и окрашенных препаратах. Для приготовления неокрашенных препаратов патологический материал размельчают скальпелем или препаровальной иглой и помещают на середину предметного стекла. Для повышения эффективности выявления элементов гриба используют просветление исследуемого материала. Для этого применяют различные вещества, чаще всего едкую щелочь (КОН, NaOH), растворяющие эпидермальные чешуйки, слизь, гной, а также просветляющие пигмент волоса, и тем самым, делающие грибы доступными для исследования. Также для мацерации гриба может быть взята окраска нигрозином или тушью, окраска по Романовскому-Гимзе или Райту, окраска метенаминовым серебряным по Гомори, окраска по Гридли, окрашивание по МакМанусу или перйодной кислотой (А.Ю. Сергеев, Ю.В. Сергеев, 2008).

Микроскопия, как метод, позволяет выявить скопление нитей септированного мицелия (A.R. Khosravi, 2003), по бокам которого имеются овальные или

грушевидные микроконидии. Количество их может колебаться от единичных до многочисленных. Макроконидии, которые встречаются редко, представляют собой узкие и длинные ответвления с тонкими стенками. В старых культурах можно встретить артро- и хламидоспоры. По данным Leng W. et al. (2008) при микроскопии препаратов *T. rubrum* можно увидеть булавовидные и грушевидные микроконидии, цилиндрические макроконидии. Голубев И.А. (1970) отмечает наличие на концах септированного мицелия *T. rubrum* небольших спиралей или гребешков.

Микроскопию препаратов обычно проводят на лабораторном микроскопе без иммерсии. При этом конденсор микроскопа должен быть опущен, а диафрагма сужена. Вначале препарат просматривают при малом увеличении (40×), для более детального исследования производят большее увеличение 100× и 400×.

При микроскопии исследуемого материала учитывают септированность мицелия, структуру его образований – спиралей, гребешковых гифов, фавических канделябров; наличие и способ прикрепления макро- и микроконидий и т.д. Решающего диагностического значения не имеет только наличие и характер хламидоспор.

По данным Аравийского Р.А. и соавт. (2004), Саттон Д. и соавт. (2001) микроскопия является обязательной и может служить основанием для постановки положительного диагноза. Однако при обычной микроскопии выявляются морфологические структуры, характерные как для микроспории, так и для трихофитии, поэтому данный метод может быть использован лишь для подтверждения наличия грибкового заболевания. Помимо этого диагностика микроспории данным методом может быть затруднительна из-за незначительного количества элементов гриба в начальном периоде болезни, слабой контрастности, нарушением или исчезновением морфологических элементов в патологическом материале и т.д.

#### **1.4.2 Люминесцентная диагностика**

В 1925 г. Margaret и Deveze обнаружили, что волосы, пораженные некоторыми дерматофитами, дают характерное свечение в ультрафиолетовых лучах, пропущенных через фильтр Вуда. Причина подобного свечения связана со сдви-

гом реакции среды в щелочную или кислую сторону.

При люминесцентном анализе используется лампа (фильтр) Вуда, которая представляет собой ультрафиолетовую лампу со стеклянным фильтром, который состоит из смеси силиката бария с окисью никеля. Данный фильтр обладает пропускающей способностью длинноволновых ультрафиолетовых лучей длиной до 365 нм. Установлено, что волос продолжает светиться даже после гибели гриба и после экстрагирования материала горячей водой или холодным раствором бромида натрия. Характер и интенсивность свечения зависит от нескольких факторов, главным из которых является рН раствора. Предполагается зависимость флюоресцирующей способности от взаимодействия гриба и растущего волоса (А.Ю. Сергеев, Ю.В. Сергеев, 2008).

Установлено, что флюоресцирующей способностью обладают грибы рода *Microsporum* (*M. canis*, *M. audouinii*, *M. ferrugineum*, *M. distortium*, изредка *M. gypseum*, *M. nanum*), а также *T. schonleinii*. Волосы, пораженные микроспорумами, в особенности *M. canis* и *M. audouinii*, дают наибольшее свечение, в то время как волосы, пораженные *T. schonleinii*, имеют тусклую флюоресценцию. Ханис А.Ю. (1989) установил зависимость вирулентности гриба от яркости его свечения. Флюоресцирующее свечение можно наблюдать только в полностью пораженных грибом волосах. Оно может отсутствовать в свежих очагах поражения. В этих случаях эпилировать волосы следует из краевой или зоны, так как она является наиболее активной.

Люминесцентное обследование, как правило, проводят в затемненной комнате без доступа света. В качестве патологического материала используют волосы с пораженных, но ничем не обработанных участков тела больных животных, предварительно очищенных от корок, остатков мази и т.п. Волосы помещают в пробирки либо чашку Петри. Облучение проводят через 5 минут после включения лампы. Исследуемый материал при этом располагают на расстоянии 20 см от лампы.

Потекаев Н.Н. (2013) сообщает об использовании метода в идентификации возбудителя, определении пораженных волос, оценке результатов терапевтиче-

ского лечения, в контроле над лицами, контактировавшими с больными, определении наличия заболевания или миконосительства. Данный метод диагностики позволяет быстро и легко провести скрининг большого количества животных при подозрении на микроспорию. Необходимо учитывать, что этот метод имеет ряд ограничений в применении: этиологическая роль грибов других видов, имеющих слабую флюоресценцию или других, не флюоресцирующих видов дерматофитов. Помимо этого, люминесцентная диагностика позволяет не только выявлять возбудителя микроспории, но и оценивать эффективность лечения.

Несмотря на высокую специфичность метода и способность дифференцировать диагноз от близких по роду и виду грибов, недостаток метода состоит в том, что не каждая лаборатория имеет подобное аппаратное оснащение, метод не позволяет идентифицировать возбудителя до вида.

### **1.4.3 Культурально-морфологическая идентификация дерматомикозов**

Культуральное исследование является высокочувствительным и специфическим, а также наиболее простым методом, используемым в лабораторной диагностике микозов. Данный метод проводят независимо от полученных результатов микроскопии, потому что он дает возможность выполнить видовую идентификацию возбудителя либо выявить его при отрицательных результатах микроскопии. Следовательно, культуральное исследование позволяет проводить адекватную терапию и профилактику заболевания. Особенно полезен и применим культуральный метод исследования для диагностики миконосительства у клинически здоровых животных. Выделение культур грибов на питательных средах остается порой единственным оптимальным методом для постановки диагноза при дерматомикозах.

Оптимальными питательными средами, используемыми для выделения чистых культур грибов, являются: кровяной агар, агар Сабуро, сусло-агар, имеющие в своем составе углеводы, различные стимулирующие их рост и размножение вещества. При первичном выделении дерматофитов обычно используют плотные, прозрачные питательные среды (глюкозный агар Сабуро, среда Георга, агар Литмана с бычьей желчью). Готовые питательные среды доводят до кипения, разли-

вают в пробирки по 8-10 мл и стерилизуют в течение 15 мин при 1 атм. (К.Н. Суворова и соавт., 1996).

Перед проведением исследования отобранные пробы биологического материала измельчают и переносят на скошенный агар и располагают на расстоянии 1-2 см друг от друга. Для исследования каждой пробы биоматериала используют не менее двух или трех пробирок. Для первичной изоляции грибов лучше всего подходит стандартная агаризованная среда Сабуро с глюкозой или сусло-агар, содержащие антибиотики (пенициллин 50 мкг/мл и 200 мкг/мл, соответственно), антидрожжевой антибиотик актидон 0,1-0,5 мг/мл.

Аравийский Р.А с соавт. (2006) сообщают о положительном влиянии актидона на рост дерматофитов, а также о подавлении роста многих плесневых грибов и дрожжей видов *Candida* и *Cryptococcus*

Карибаева А.Т., Байдуйсенова А.У. (2010) для выделения дерматофитов предлагают использовать селективные питательные среды, в состав которых входят (в г/л): папаиновый перевар соевой муки – 10; глюкоза – 10; феноловый красный – 0,20; агар – 20, а для подавления посторонней микрофлоры (в мг): хлортетрациклин – 50; гентамицин – 50; амфотерицин – 5.

Посев грибов проводят в боксе над пламенем газовой или спиртовой горелки с помощью микологического крючка, платиновой петли или лопаточки из никрома. Держа пробирку в правой руке под углом 40°, проводят над пламенем горелки. В левой руке держат петлю и прокалывают ее докрасна над пламенем, остужая и одновременно увлажняя прикосновением к поверхности среды в стороне от места предполагаемого посева. Затем берут частицу исследуемого материала и наносят ее на поверхность питательной среды. Пробирку закрывают ватной или резиновой пробкой, предварительно обожженной над пламенем. Также производят пересев из пробирки или чашки в другую пробирку. Необходимо, чтобы среда с материалом как можно меньше соприкасалась с окружающим воздухом для предотвращения бактериального или грибкового обсеменения, поэтому крышку следует приподнимать настолько, чтобы в нее могла свободно пройти только петля с патологическим материалом.



Посевы инкубируют при 22-30°C, оптимальной считается температура 28°C. Рост культуры регистрируют на 4-12 день инкубации в месте посева или по краям внесенного материала. Результаты культивирования считаются отрицательными при отсутствии роста в течение 30 дней. При оптимальных условиях первичные культуры многих дерматофитов появляются уже на 7-10 день культивирования. Рост первичных культур идет сравнительно медленно, поэтому чаще всего при появлении роста в первичном посеве необходимо произвести отсев на свежую дифференциальную питательную среду для получения чистой культуры (R.S. Brilhante, 2003).

Для подавления роста посторонней микрофлоры используют различные антибактериальные препараты. Пенициллин, разведенный в физиологическом растворе, использовали для обработки патологического материала. Florian E., Nemeseri L. (1961) применили раствор антиформина и спирта. Georg L.K. (1954) для угнетения посторонних бактерий предлагал пенициллин и стрептомицин, плесневых грибов – циклогексамид. Kachnic M. (1962) использовал комбинацию всех трех веществ. Кашкин П.Н. использовал слабый раствор теллурита калия для этих целей.

При описании колоний учитывают следующие признаки: время появления и скорость роста, размеры колонии, цвет лицевой и обратной сторон сформированных колоний, характер поверхности и ее рельеф, форма и край колонии, консистенция и наличие врастания вглубь питательной среды. Характеризуя колонию, немаловажным является и отличительная особенность культуры от типичных штаммов, что важно для оценки проявления полиморфизма данного вида, а также для выявления атипичных штаммов, новых или редких видов.

Рост грибов-микроспорумов на питательных средах определяется образованием бархатисто-пушистых колоний с небольшим бугорком по центру, с радиальными бороздами и серовато-узкой каймой по периферии. Мицелий гриба прямой, септированный, разветвленный, с редкими перегородками. У старых колоний со временем образуется мучнистый налет, обратная сторона колонии желтая (В.И. Билай, 1982). Петрович С.В. (1982) отмечает, что при первичном выделении

из проб биоматериала *M. canis* формирует плоские, сероватого цвета колонии, с окрашиванием обратной стороны в желтый цвет. Края колонии паутиновые. При пересеве колония приобретает стойкий белый цвет. По окончании выделения чистой культуры возбудителя дополнительным методом диагностики может послужить тест на уреазную активность, образование пигмента на специальных средах и т.д. (А.Ю. Сергеев, 2008).

При необходимости выполняют *in vitro* тест на перфорацию волос в целях дифференциации *T. mentagrophytes* и *M. canis*. Для этого помещают короткие частицы волос или шерсти в чашки Петри, автоклавируют их в течение 10 минут при 120°C, добавляют 25 мл стерильной дистиллированной воды и 2-3 капли 10% стерильного дрожжевого экстракта. Засевают эти чашки различными фрагментами тест-культуры, выращенной на агаре Сабуро с глюкозой. Засеянные чашки Петри выдерживают при 25°C в течение 20-30 суток с регулярным микроскопическим контролем. Обычно волосы покрываются мицелием, под которым можно рассмотреть в микроскопе перфорации (клиновидные – для *T. mentagrophytes* и при отсутствии таковых на волосах от *M. canis*) (L. Ajello, 1967).

Помимо этого, в литературе описан метод выделения дерматофитов по Ван-Брейзегему, осуществляемый по следующей схеме: пробы почвы переносят в бактериологические чашки, прибавляют раствор актидона (0,5 мг в 1 мл), на поверхность раскладывают части простерилизованных человеческих волос. Культивируют при комнатной температуре в течение 30 дней. На 5-6 день обычно регистрируют рост гриба *M. gypseum*. Позже появляется рост других грибов (L. Ajello, 1967).

Мелентьев А.И. и соавт. (2006) с соавт. предложили способ диагностики дерматомикозов путем посева проб биологического материала на плотную селективную питательную среду Сабуро с добавлением антибиотика – левомецетина и гидролизата кератина, полученного из куриного пера. Селективная среда имела следующий состав, г/л: глюкоза – 40,0; пептон – 10,0; агар – 18,0-20,0; гидролизат кератина (в пересчете на сухое вещество) – 10,0-20,0; левомецетин – 50 тыс. ЕД; дистиллированная вода – остальное. Режим культивирования составлял 22-24°C в

течение 4-8 дней с последующей идентификацией выросших колоний грибов до вида. Способ эффективен в отношении не только *M. canis*, но и *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes*.

Культуральный метод позволяет выделить культуру возбудителя и определить его видовую принадлежность. Несмотря на это выделение чистой культуры возбудителя, имеет и свои недостатки. В первую очередь это трудоемкость метода, а также невозможность проведения этого исследования в неспециализированных лабораториях и без квалифицированного персонала.

### 1.5 Серологическая диагностика дерматомикозов

Для диагностики грибковых заболеваний разработан и успешно применяется ряд серологических методов, основанных на выявлении в сыворотке крови животных специфических антител: реакция иммунодиффузии (Т.С. Сайдуллин, 1992, Ш.О. Токеев, 2018), реакция связывания комплемента (Е.Н. Левченко, 2008), иммуноэлектрофорез, реакция пассивной гемагглютинации и метод розеткообразования (Е.В. Кухар, 2001), реакция коаггутинации (РКОА) (Ю.А. Медведев, 1988).

В настоящее время разработаны оптимальные условия и техника постановки твердофазного ИФА для диагностики некоторых грибковых инфекций людей, животных и растений: иммуноферментная тест-система для диагностики кандидоза (М.Г. Маноян, 1991), прямой «сэндвич» вариант ИФА для выявления специфических антигенов гриба *Histoplasma farciminosum* у лошадей в биологических жидкостях (кровь, гной, органно-тканевые суспензии) (З.О. Караев и соавт, 1990), непрямой вариант ИФА для выявления инфекций у людей, связанный с *Trichophyton rubrum* и *Trichophyton mentagrophytes* (Н.Т. Сандыбаев, 2007).

Попытки массового применения серологических методов диагностики дерматомикозов не нашли себя в лабораторной практике. Антигенная структура дерматомицетов очень сложная и включает в себя растворимые углеводные структуры, представляющие собой детерминанты антигенов, сходные для нескольких видов или даже родов (G.L. Aruna et al., 2022). Результаты серологических исследо-

ваний могут быть сомнительными вследствие перекрестного реагирования антигенов различных грибов, обусловленные наличием одних и тех же полисахаридов клеточной стенки. Тем не менее, идентификация антител или циркулирующих антигенов в крови, спинномозговой жидкости или моче позволяет установить диагноз до получения результатов посевов. Наиболее часто применяют реакцию латекс-агглютинации (выявляет IgM), РСК (выявляет IgG) и иммуноферментный метод (Е.П. Феофилова, 1983, Р.А. Аравийский, 2006).

Следует отметить, что антигены дерматомицетов являются сложными антигенными смесями. Получение чисто белковых или полисахаридных антигенов затруднено (Е.В. Кухар, 2010). По-видимому, этим объясняется наличие перекрестных реакций между возбудителями дерматомикозов. Это затрудняет серологическую диагностику дерматомикозов и требует разработки более совершенных тестов. Поэтому проблема поиска и разработки новых способов диагностики дерматофитозов, отличающихся высокой специфичностью и чувствительностью, остается одной из актуальных для микологии.

Кроме классических вариантов серологических тестов для обнаружения у больных животных антител предложены различные варианты иммуноферментного анализа для диагностики дерматомикозов (А.А. Воробьев, 1987, В.С. Киян, 2009, Е.В. Кухар и соавт., 2010, А.Б. Кенжина, 2013, Е.В. Кухар и соавт., 2015), непрямой вариант ТИФА для диагностики трихофитии крупного рогатого скота (Е.В. Кухар и соавт., 2013), непрямой вариант иммуноферментного анализа с использованием гипериммунных сывороток для диагностики трихофитии кроликов (А.Т. Иманов, 2008), реакция агглютинации с корпускулярным антигеном (Е.В. Кухар, 2001, М.Г. Маноян и соавт., 2008, Е.В. Кухар и соавт., 2008), модифицированный вариант роз бенгал пробы с цветным антигеном (Е.В. Кухар и соавт., 2011).

Таким образом, разработка чувствительных и специфичных серологических или иммунохимических тестов, основанных на взаимодействии антиген-антитело, представляется перспективным направлением современной биотехнологии.

## **1.6 Молекулярно-генетическая характеристика дерматомицетов,**

### ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ МЕЛКИХ ДОМАШНИХ И ДИКИХ ПЛОТЯДНЫХ ЖИВОТНЫХ

Еще одним перспективным направлением ветеринарной биотехнологии и микологии является генодиагностика. Особенно актуальным является применение генодиагностики в сложных, сомнительных случаях течения заболевания у животных, при стертых клинических формах проявления болезни, при подозрении на оппортунистические микозы и т.п. (J. Verrier et al., 2017).

Для идентификации грибов используют разные молекулярные методы: полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (M. Kawasaki et al., 1996, I. Pospischil et al., 2022), случайная амплификация полиморфной ДНК (RAPD) (? T. Mochizuki et al., 1997) и полимеразную цепную реакцию (ПЦР), ПЦР дактилоскопию (E. Faggi et al., 2001, I. Heckler et al., 2023). Анализ с участием ДНК и РНК был использован в клинической микробиологии, чтобы помочь в классификации, а также в выявление многих микроорганизмов, в том числе дерматофитов (M. Kawasaki et al., 1996; J. Versalovic et al., 1996). Гены рДНК оказались полезными для идентификации, как рода, так и вида (R. Gutel et al., 1985). Молекулярный анализ используется в ветеринарной микологии для выявления *M. canis* и *M. gypseum* (R. Kano et al., 1998).

Организация генного комплекса рДНК у грибов включает последовательность, кодирующую ген 18S рДНК, внутреннюю транскрибируемую спейсерную область ITS-1, ген 5Æ8S рДНК область кодирования, другую область ITS (называемую ITS-2) и последовательность, кодирующую ген 28S рДНК (J.I. Mitchell et al., 1995). Последовательность гомологии в генах рДНК грибов (18S, 5Æ8S и 28S) и различия внутри спейсерных областях (ITS-1 и ITS-2) являются генетической основой для определения грибов в таксономические группы.

Kaszubiak A. et al. (2004) разработали концепции видообразования у дерматофитов с помощью комплекса *M. canis*. Группа состоит из филогенетически близких анаморф микроскопических грибов *M. audouinii*, *M. ferrugineum* и *M. canis*. Анаморфа – специализированные структуры, связанные с вегетативным размножением и бесполом размножением грибов и грибоподобных организмов. Это исследование было проведено с использованием межгенных спейсеров, не-

транслируемых участков генов, а также гипервариабельных микросателлитных маркеров. Авторы статьи предлагают, чтобы симпатрическое видовое образование происходило в период спаривания, когда появились строго клональные виды грибов, что привело к генетически изолированным клональным видам.

Аmplицировали в реакции участки ITS-1, ITS-2 и субъединицы 5.8S рДНК. Судя по реакции, идентичные ампликоны и профили были видны при обработке ферментами *Sau3A*, *DdeI*, *EcoRI* и *RsaI*. Такие данные согласуются с результатами, полученными Faggi E. et al. (2001), где использовалась ПЦР-дактилоскопия для анализа штаммов *M. canis*, выделенных от собак, кошек и людей. Эти исследователи не наблюдали каких-либо полиморфизмов среди штаммов, несмотря на наличие разных фенотипических вариантов. Makimura K. et al. (1999), анализируя штаммы *Epidermophyton*, *Trichophyton* и *Microsporum*, сообщают о неоднородности в этой группе грибов, демонстрируя эффективность применения анализа области ITS для идентификации штаммов с атипичными фенотипическими характеристиками.

Jin Y. et al. (2004) с использованием метода секвенирования область ITS участка рДНК, не продемонстрировали каких-либо различий среди штаммов *M. canis*, выделенных от пациентов с *Tinea capitis*, и из окружающей среды, с которой больные контактировали. Они предположили, что такие штаммы имеют одинаковую последовательность ДНК в области ITS с небольшими внутривидовыми вариациями. Некоторые исследователи считают, что метод микросателлитного генотипирования, может быть, с успехом использован для молекулярных эпидемиологических исследований, таких как определение путей заражения *M. canis*. В настоящее время методы, основанные на определении нуклеотидных последовательностей рибосомальных генов, используются для видовой идентификации дерматофитов в некоторых странах. Результаты полностью, либо частично секвенированных генов рРНК различных видов микроорганизмов поступают в международные базы данных и могут быть использованы в качестве референтных. Сравнение последовательностей генов и отдельных участков генов, кодирующих рибосомальные РНК, может способствовать выявлению родственных

связей между дерматофитами (R. Chermette, 2008).

Применение метода мультилокусного микросателлитного типирования было использовано для изучения путей распространения и передачи *M. canis* в Японии. Результаты изучения распространенности *M. canis* среди кошек, собак и людей с помощью молекулярно-генетического типирования с применением прямого (ITS1 5'-TC CGTAGGTGAACCTGCGG-3') и обратного праймера (ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') показало, что домашние и уличные животные, а также кошки и собаки с симптомами или без симптомов заболевания, являются основными источниками дерматофитов для человека (Т.Ж. White, 1990). Применение молекулярных методов позволило установить этиологическую структуру дерматофитозов в Иране, которая была представлена следующими видами: *M. canis* – в 78,5%, *M. gypseum* – 10,7% и *T. mentagrophytes* – в 10,7% (S. Colombo, 2010).

#### *Заключение по обзору литературы*

Анализ данных литературы показал, что грибковые заболевания занимают особое место среди всех кожных заболеваний мелких домашних и диких плотоядных животных. Серьезную угрозу как источник заражения здоровых животных и человека представляют животные – миконосители.

Микологический посев остается «золотым стандартом» диагностики, который позволяет выделить культуру гриба и определить его вид. Но данный метод имеет существенный недостаток – длительность получения результата (до 21 дня и более). Наиболее точным и достоверным методом диагностики дерматомикозов в настоящее время является молекулярно-генетическая идентификация возбудителей, занимающая до двух дней.

## 2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводились в период 2012-2023 гг. в ветеринарных клиниках г. Новосибирска Российской Федерации и г. Астана Республики Казахстан, где были отобраны пробы биоматериала от животных с подозрением на микроспорию плотоядных.

Результаты получены в рамках выполнения одной инициативной темы, государственного проекта МСХ РК и грантового финансирования по проекту ИРН AP19678812 МОН РК.

Первичное выделение и идентификация культур грибов проводились в лаборатории биотехнологии - диагностический центр ИЭВСиДВ СФНЦА РАН. Детальное изучение культурально-морфологических и молекулярно-генетических свойств дерматомицетов проводилось в лаборатории коллективного пользования Научно-исследовательской платформы сельскохозяйственной биотехнологии.

### 2.1 Материалы и методы

#### 2.1.1 Материалы исследований

Материалами исследований при выполнении данной диссертационной работы послужили:

- 39 штаммов дерматомицетов рода *Microsporum* – №3, №5, №8, №12, №13, №19, №21, №22, №26, №27, №29, №33, №35, №38, №48, №52, №53, №56, №57, №58, №61, №62, №64, №65, №68, №113, №246, №284, №327, №376, №384, №427, №428, №431, №434, №436, №438, №439, №441;

- 2 штамма дерматомицетов рода *Trichophyton* – №19, №20;

- лабораторные мыши;

- питательные среды: глюкозный агар Сабуро, среды Гисса, среда Кристенсена с добавлением 40% мочевины;

- оборудование: бокс биологической безопасности 2-го класса защиты Esco, 2010; термостат BD-53, Германия, 2017; микроскоп Olympus BX43, 2014; спектрофотометр BioSan MPP-96, 2018; центрифуга Вортекс, 2021; амплификатор



SimpliAmp™ Thermal Cycler, 2016; система для гелевого документирования Gel Doc™ XR+ System Biorad, 2015; секвинатор SeqStudio, 2019.

### 2.1.2 Методы исследований

В работе были использованы клинические, микологические, биотехнологические, молекулярно-генетические и статистические методы исследования.

#### *Отбор проб биоматериала*

От животных с признаками поражений кожи и шерстного покрова отбирали пробы биоматериала (чешуйки и корочки, поврежденный волос) с периферии воспалительных участков методом глубокого соскоба кожи. При инфильтративной форме дерматита, материал отбирали методом смыва с пораженной поверхности стерильным ватным тампоном, который помещали в пробирку со стерильным физиологическим раствором (NaCl 0,9% – 3мл). К пробам исследуемого материала прикрепляли сопроводительный документ, в котором указывали вид, возраст, кличку больного животного, краткую характеристику клинической картины, локализацию очагов поражения, дату взятия материала.

#### *Первичное выделение культуры*

Исследование проб биоматериала от животных проводили в соответствии с руководством: «Методы экспериментальной микологии» (И.А. Дудка и соавт., 1982) и методическими указаниями по лабораторной диагностике возбудителей дерматомикозов (В.П. Королева, 1976; Л.Г. Иванова, 1978; Т.И. Глотова, 2002; Е.Н. Левченко 2008).

Для проведения микологических исследований пробы биоматериала измельчали до 2-4 мм в стерильной чашке Петри, соблюдая правила асептики, и высевали на агар Сабуро, в который предварительно добавляли хлорамфеникол для подавления роста посторонней бактериальной флоры. Пробу биоматериала высевали на 6 пробирок в 2 участка на расстоянии 1-2 см один от другого. Три пробирки культивировали при 28°C, три – при 37°C семь суток, затем три недели при 28°C (при 37°C хорошо развиваются дрожжевая фаза диморфных грибов). Параллельно проводили контрольные посеы проб воздуха бокса методом седимен-

тации.

### *Культурально-морфологическая идентификация грибов*

Выросшие колонии грибов идентифицировали, учитывая характер роста воздушного и субстратного мицелия, морфологию гиф, микро- и макроконидий по методике Rebell and Taplin (1979), а также с помощью «Определителя патогенных и условно патогенных грибов» (Д. Саттон, А. Фотергилл, М. Ринальди, 2001). Для изучения биохимических свойств у выделенных культур грибов использовали среды Гисса с глюкозой, лактозой, маннозой, маннитом, сахарозой (сахаролитическая активность), среду Кристенсена с 40%-ой мочевиной (уреазная активность).

### *Выявление чувствительности к противогрибковым препаратам*

Определение чувствительности грибов к противогрибковым препаратам проводили диско-диффузионным методом согласно инструкции по определению чувствительности микроорганизмов к противомикробным препаратам (EUCAST. Версия 8.0 2018). Использовали противогрибковые препараты: клотримазол, кетоконазол, флюконазол, амфотерицин, нистатин.

Питательные среды для определения чувствительности готовили в соответствии с инструкцией изготовителя. После автоклавирования питательные среды сразу разливали в стерильные чашки Петри. Проводили посев дерматомицетов на поверхность чашки Петри с помощью шпателя для получения суточной культуры. После этого в них асептически вносили мембранные диски, пропитанные противогрибковыми препаратами. Результаты анализа учитывали через 24, 48, 72 часа.

### *Глубинное культивирование дерматомицетов*

Получение биомассы мицелия осуществляли методом глубинного культивирования с использованием термостатируемого шейкера (BioSan ES-20). В процессе культивирования мицелия в колбах контролировали следующие параметры: температура (°C), скорость вращения механической мешалки (об/мин). По истечению двух недель, биомассу отделяли трехкратным низкоскоростным центрифугированием при 2000 об/мин в течение 10 мин. Очистку мицелия осуществляли трехкратным отмыванием сырой мицелиальной массы в физиологическом раство-

ре (0,9% NaCl). Для определения количества биомассы дерматомицета проводили взвешивание.

#### *Получение корпускулярных антигенов дерматомицетов*

Для приготовления антигенов использовали дерматомицеты рода *Microsporium* и *Trichophyton*, реклонированные на средах Сабуро. Для получения антигена мицелий гриба отделяли от плотной среды соскобом. Собранную в фарфоровую ступку грибную массу растирали пестиком с добавлением однократного раствора фосфатно-солевого буфера (1×ФСБ) до получения гомогенной массы. Фильтровали через трехслойный марлевый фильтр и автоклавировали при 1 атмосфере в течение 30 минут или не автоклавировали. Затем разводили 1×ФСБ до 10 ЕД по БОСМ. Для этого антигенный препарат восстанавливали до объема 1 мл разведением 1×ФСБ, после чего в чистые пробирки вносили по 5 мл 1×ФСБ и постепенно добавляли по 1 капле приготовленного антигена.

Для постановки серологических реакций использовали антигены, убитые автоклавированием, в разведении 10 ЕД по бактериальному оптическому стандарту мутности (БОСМ).

#### *Подбор оптимального разведения антигенов*

Для подбора оптимального разведения корпускулярного антигена в постановке серологических реакций препарат ЛТФ-130 доводили до исходного объема и разводили забуференным физраствором до нужной концентрации клеток. В результате исследований выявлено, что оптимальной концентрацией грибных клеток для постановки РА при использовании вакцинного препарата является 100 тыс. кл/мл (Е.В. Кухар, 2002).

Аналогичным способом подобрано разведение корпускулярных нативных и цветных антигенов *T. benhamiae*, *M. canis* и вакцинного препарата Вакдерм для проведения агглютинирующих реакций.

#### *Получение цветных антигенов дерматомицетов*

Для получения корпускулярных цветных антигенов использовался карболовый буфер и краситель розовый бенгальский Rose Bengal (Индия).

Нативную биомассу отделяли от твердой питательной среды, инактивиро-

вали карболовым буфером при 80°C, добавляли краситель и инкубировали при 37°C течение 2 ч. Антигены, полученные из биомассы грибов *T. benhamiae* и *M. canis* окрасились в интенсивно розовый цвет. При хранении биомасса грибов оседала на дно в виде массы розового цвета, буферный раствор имел бледно-розовый цвет. Концентрацию клеток в корпускулярных цветных антигенах для постановки серологических реакций подбирали по стандарту мутности, изготовленному из вакцины ЛТФ-130 с известной концентрацией клеток.

#### *Получение растворимых антигенов дерматомицетов*

Выделение растворимых антигенов белков внешней мембраны грибов модифицированным методом по Tabatabai L. (1979).

Двухнедельную культуру дерматомицетов растирали в ступке до гомогенной массы. После обработки 45%-ным водно-фенольным раствором ресуспендировали буфером для экстракции (0,1 М цитрат натрия, 1,0 М NaCl, 0,1% тритон X-100, pH 6,0) из расчета 2 мл на 1 г клеток (сырую мицелиальную массу). Затем биомассу инкубировали в течение 16-20 часов при температуре 37°C при постоянном перемешивании. После чего клеточную суспензию центрифугировали в течение 20 мин при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость сливали, центрифугировали повторно 20 мин при 3000 об/мин и использовали в качестве антигена.

#### *Определение концентрации белка по Бредфорду*

В лунки первого ряда пластикового 96-луночного планшета вносили по 0,1 мл пробы белка неизвестной концентрации. В качестве контроля использовали бычий сывороточный альбумин в концентрации 1 мг/мл. В лунки следующих рядов вносили по 0,05 мл ФСБ (pH 7,2-7,4). Опытные и контрольные пробы белка титровали в объёме 50 мкл. В каждую лунку вносили по 0,05 мл реактива Бредфорда. Результат учитывали визуально по калориметрической шкале (М.М. Bradford, 1976).

#### *Определение концентрации углеводов пробой Молиша*

Концентрацию углеводов в растворе антигена определяли с помощью пробы Молиша (сернокислотным методом). Готовили калибровочную шкалу стандартного раствора глюкозы и растворы исследуемого антигена. Пробы вносили в

пробирки по 200 мкл. Во все пробирки вносили по 200 мкл дистиллированной воды и 5% раствора фенола. Затем в пробирки добавляли по 1 мл концентрированной серной кислоты. Пробирки оставляли на 10 минут в темном месте, затем выдерживали 10 минут в водяной бане при температуре 25-30°C. Учет реакции проводили визуально.

#### *Получение иммунных сывороток*

В качестве иммунных сывороток использовали сыворотки крови мышей, иммунизированных исследуемыми антигенами по методу Фридлянской И.И. (1988), а также сыворотки крови больных и клинически здоровых кошек и собак.

#### *Капельная реакция агглютинации (КРА)*

Определение агглютинирующих свойств у полученных белковых антигенов проводили на стекле при температуре 18-20°C, смешивая капли сыворотки крови, полученные от иммунизированных мышей и грибные антигены в присутствии электролита. Результат учитывали визуально через 3-5 секунд и 10-15 минут. Результат реакции является качественным и выражается только как положительный – «да» (просветление жидкости, образование мелких или крупных хлопьев), или отрицательный – «нет» (жидкость равномерно мутная).

#### *Постановка модифицированной реакции по типу роз бенгал пробы (РБП) с цветным антигеном*

Для постановки реакции пробы сыворотки крови животных (кошки, собаки, морские свинки) в дозе 0,03 мл помещали на дно чистых сухих эмалированных пластинок. Затем в каждую лунку вносили 0,03 мл окрашенного антигена. В каждой реакции ставили контроль сыворотки и антигена. Учет результатов РБП с цветными антигенами *T.benhamiae* и *M. canis* проводили визуально в течение 5-10 секунд до 1-4 минут.

#### *Реакция иммунодиффузии в агаровом геле (РИД)*

Постановку реакции проводили методом двойной иммунодиффузии по О. Оухтерлони (1958), с использованием микрометода по Башкаеву И.С. (1961) в 1%-ном агарозе. В качестве буфера использовали дистиллированную воду; PBS<sup>x1</sup>; физиологический раствор. Расплавленную агарозу заливали слоем 2-3 мм в чашки

Петри. После полимеризации, штампом вырезали лунки. Периферические лунки заполняли исследуемыми антигенами, в центральную лунку вносили специфические сыворотки. Результаты реакции учитывали визуально через 24, 48 и 72 часов по наличию линий преципитации.

#### *Непрямой вариант твердофазного ИФА*

Для проведения непрямого варианта твердофазного ИФА лунки 96-луночного планшета для иммунологических реакций сенсибилизировали антигеном в концентрации 0,06-0,1 мг/мл в ЗФР (рН 7,2-7,4) при 4°C в течение 8 час. Для удаления не связавшегося антигена планшет отмывали трехкратно ФСБ-Тв. Затем в лунки вносили по 0,1 мл испытуемой сыворотки. Планшет инкубировали при 37°C в течение 60 минут. После инкубирования планшет отмывали для удаления неспецифически связавшихся антител. Затем в лунки планшета вносили кроличьи антитела к иммуноглобулинам мыши, меченые пероксидазой хрена, anti-Mouse (антивидовой конъюгат) в объеме 0,1 мл. Планшет инкубировали при 37°C в течение часа. Процедура отмывки повторяли трехкратно, после чего в лунки вносили субстрат фермента по 0,1 мл раствора. Для этого используется ОФД (ортофенилендиамин) или ТМБ (тетраметилбензидин).

Субстрат ОФД готовится непосредственно перед применением путем растворения 0,01 г (Sigma, США) в 10 мл 1% раствора лимонной кислоты с рН 4,5 и добавлением 0,005 мл 30% перекиси водорода. ТМБ используется в виде готового к применению раствора. Планшет помещали на 10-15 минут при комнатной температуре в темном месте. Положительная реакция характеризовалась окрашиванием раствора субстрата в желто-коричневый цвет при работе с ОФД или в синеголубой цвет – при работе с ТМБ. Для остановки реакции в лунки планшета добавляли раствор 2М серной кислоты. Результаты ИФА учитывали с помощью спектрофотометра при длине волны 492 нм. Реакцию считали положительной, если значения экстинкции исследуемых сывороток в два и более раза превышали величину ОП отрицательного контроля.

#### *Молекулярно-генетический анализ возбудителей дерматомикозов*

Для выделения ДНК использовали 3 метода предварительной пробоподго-

товки с помощью буферных растворов:

- *метод А*: к 2 мл 2М TrisHCl с рН= 8,0 добавляли 1,6 мл 0,5MEDTA, 3,27 г NaCl и 0,8 г СТАВ,

- *метод В*: 4 мл 2М TrisHCl с рН= 8,5 добавляли 2 мл 0,5MEDTA, 0,585 г NaCl и 0,2 г SDS.

- *метод С*: к 50 mMTrisHCl с рН= 8,0 добавляли 2% SDS, 10 мл mMEDTA, 0,75M NaCl.

К 0,1 г лиофилизированного мицелия в ступке добавляли жидкий азот и измельчали клетки. Для выделения геномной ДНК измельченный мицелий переносили в пробирку Эппендорфа и добавляли 700 мкл буфера для лизиса, приготовленные по методу А, В, С. Смесь инкубировали при 65°C в течение 40 мин. Добавляли равный объем хлороформа / изоамилового спирта [24:1 об./об.]. После гомогенизации смеси и центрифугирования при 13000 об/мин в течение 10 минут при + 4°C супернатант ресуспендировали в стерильную пробирку Эппендорфа. ДНК осаждали двумя объемами холодного 2-пропанола с добавлением 10% (мас./об.) натрий ацетатного буфера (3 М, рН 8) при -20°C в течение 2 часов, дважды промывали 500 мкл 70% этанола, просушивали и ресуспендировали в 100 мкл ТЕ-буфера (40 mM Трис / HCl, рН 8,0, 2 mM ЭДТА). Конечную ДНК обрабатывали РНКазой при инкубации при 37°C в течение 30-60 мин. ДНК элюировали в конечном объеме 200 мкл, разводили до концентрации 50 нг / мкл в воде класса ПЦР. Образцы ДНК хранили при -20°C для дальнейшего использования.

*ПЦР-амплификация внутренних транскрибируемых спейсерных (ITS) областей рибосомальной ДНК (рДНК)*

Область ITS1-5.8S-ITS2 кластера генов ядерной рДНК амплифицировали с использованием пары праймеров: ITS1 (5'-TCGGTAGGTGAACCTGCGG-3'); ITS4 (5'-CCTCCGCTTATTGATATGC-3'). ПЦР проводили в общем реакционном объеме 25 мкл, содержащем 5 мкл 5× буфера (Promega), 1 мкл dNTP (20 mM), 1,5 мкл MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,25 U (5 U/мкл) ДНК-полимеразы Taq. 2 мкл праймера (20 пмоль/мкл) и 2 мкл геномной ДНК (50 нг/мкл). Программа амплификации включала в себя начальную денатурацию при 95°C в течение 3 мин, затем 35 цик-

лов денатурации при 95°C (15 сек), отжиг при 59°C (30 сек), удлинение при 72°C (45 сек) и окончательный период продления 10 мин при 72°C в термоциклере SimpliAmp™ Thermal Cycler. После амплификации продукты ПЦР подвергали электрофорезу в 1,5% агарозных гелях, забуференных 0,5× TBE (4,5 мМ Tris, 4,5 мМ борной кислоты и 1 мМ EDTA, pH 8), окрашивали бромидом этидия и фотографировали.

Продукты ПЦР очищали ферментативными методами с использованием ExoI и SAP, а затем последовательности определяли путем секвенирования циклов. Секвенирование проводили с применением BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) согласно инструкции производителя, с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе 3730×1 DNA Analyzer (Applied Biosystems).

#### *Статистические методы обработки данных*

Для обработки полученных нами данных были использованы стандартные классические методы анализа проверки статистических гипотез. Расчеты проводили, используя «Мастер функций» в категории «Статистические» программы Microsoft Excel. Достоверными величинами считали различия при  $P \leq 0,05$ . Статистический анализ результатов серологических исследований проводили по методу Сайдулдина Т.С. (1981) с использованием программы Microsoft Excel.

Среднее значение  $S$  определяли по формуле (1), где  $n$  – число опытов:

$$S = \sum S / n, \quad (1)$$

Ошибку  $S$  ( $m_s$ ) вычисляли по формуле (2) Тамбовцева Е.П. с соавт. (1969), где  $R$  – размах значений  $S$  ( $S_{\max} - S_{\min}$ ):

$$m_s = R / B, \quad (2)$$

Значение  $B$  находили, исходя из числа наблюдений (Т.С. Сайдулдин, 1992).



## 2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.2.1 Особенности распространения дерматофитозов

#### среди животных-компаньонов в г. Астана за 2012-2023 гг.

В период с 2012 по 2023 гг. нами было проанализировано 198 проб биоматериала, отобранных от домашних и диких плотоядных животных на выявление возбудителей микозов кожи. Согласно нашим исследованиям, в 51% случаев от животных были выделены микромицеты. Среди них встречались классические возбудители дерматофитозов *Microsporum* spp. (17,7%) и *Trichophyton* spp. (3,0%), а также возбудители оппортунистических микозов: плесневые грибы и дрожжи различных видов (таблица 1).

Таблица 1 – Заболеваемость дерматомикозами домашних и диких животных за 2012-2023 гг.

n = 198

Наименование животного	Всего, гол.	Выявлено положительных проб/%			
		<i>Microsporum</i> spp.	<i>Trichophyton</i> spp.	Плесневые грибы	Дрожжи
Кошки	110	26	4	31	2
Собаки	71	8	2	18	1
Дикие животные	17	1	0	8	0
Всего:	198	35/17,7	6/3,0	57/28,8	3/1,5

Как видно из таблицы 1, при первичном выделении возбудителей из проб биологического материала только в 20,7% случаев были обнаружены дерматомицеты. При этом грибы рода *Trichophyton* spp. выявлены в 3,0%. Основным возбудителем были грибы рода *Microsporum* – 17,7%.

Анализ данных показывает, что преобладающими возбудителями микозов у домашних животных все чаще становятся оппортунистические плесневые грибы (28,8%). Основными возбудителями были *Mucor* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp. Дрожжи родов *Candida* spp., *Rhodotorula* spp., *Exophiala* spp. выявлены всего в 1,5% случаев. В 48,9% – рост микромицетов отсутствовал (31,2%), либо наблюдался рост бактериальной флоры (16,3%) (рисунок 1).

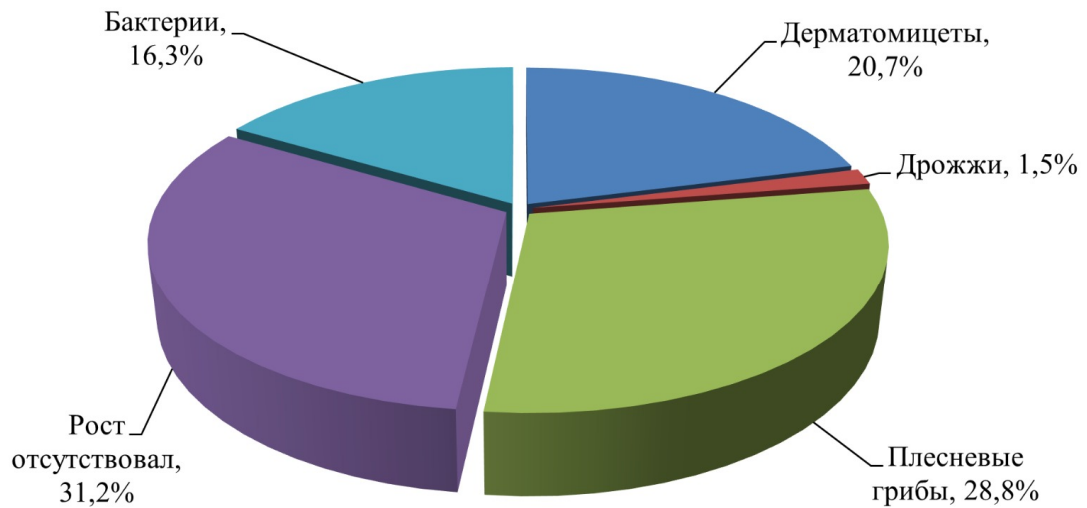


Рисунок 1 – Выделение основных возбудителей кожных болезней у мелких домашних и диких плотоядных животных

Болезнь регистрировали в любое время года, но чаще всего весной и осенью, реже – летом и зимой. Нами были проанализированы данные по сезонности распространения заболевания дерматомикозами у плотоядных за период 2012-2023 гг. (рисунок 2).

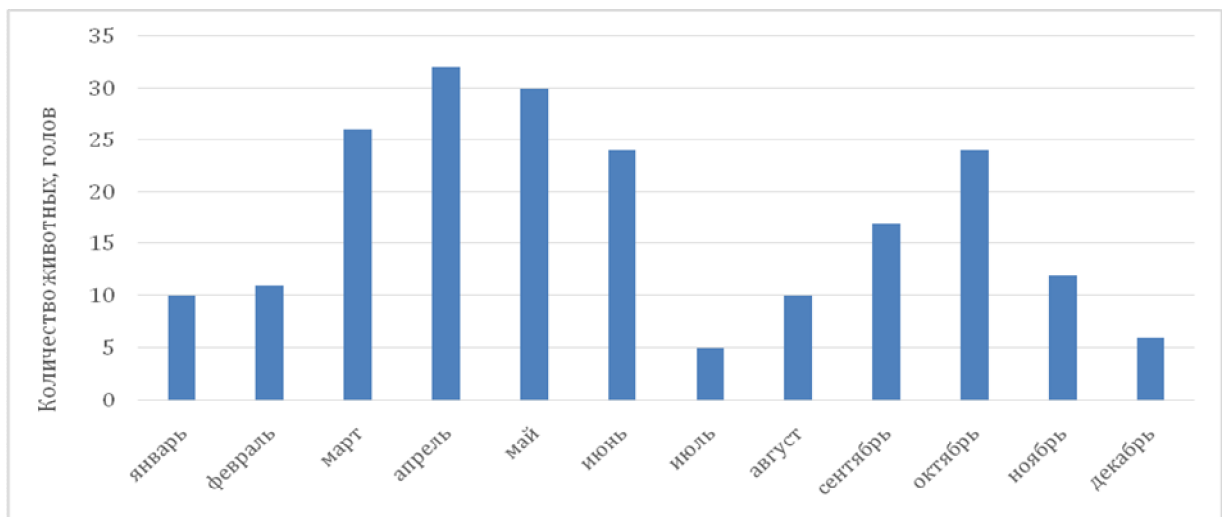


Рисунок 2 – Сезонность распространения заболеваемости дерматомикозами

Как видно из рисунка 2, явно отслеживается сезонность распространения заболеваемости дерматомикозами у плотоядных животных. Рост заболевания наблюдали в марте-апреле и в сентябре-октябре, заметное снижение частоты случа-

ев микроспории приходилось на июль и декабрь.

Статистические данные по заболеванию дерматофитией и микозами кожи иной этиологии кошек и собак по данным ветеринарных клиник за 2012-2018 гг. собрать не удалось, так как все клиники города Астана частные. Согласно требованиям, они не должны отчитываться перед вышестоящими надзорными органами.

Данные некоторых ветеринарных клиник г. Астана по заболеваемости дерматомикозами за период 2019-2023 гг. представлены на рисунке 3.

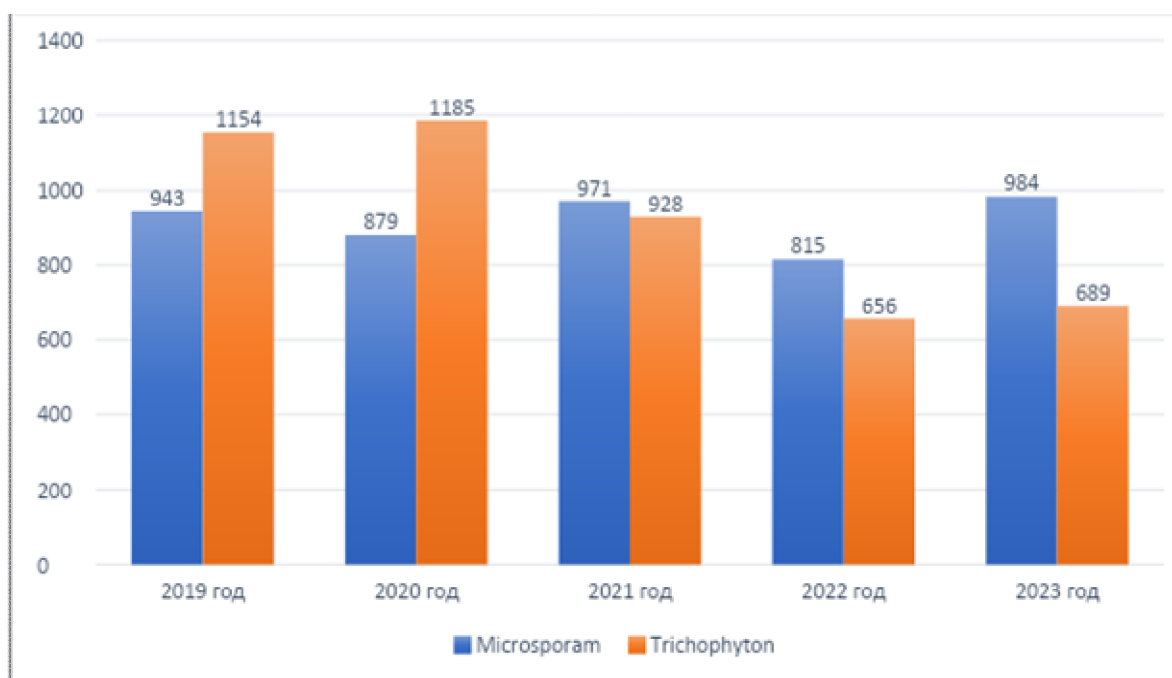


Рисунок 3 – Количество больных дерматомикозами кошек и собак по данным некоторых ветклиник г. Астана в 2019-2023 гг.

Как видно из рисунка 3, в 2019-2020 гг. основным заболеванием, которое регистрировалось у кошек и собак, была трихофития. С 2021 г. наблюдается явная тенденция на возрастание числа больных микроспорией животных. В 2022 г. происходит снижение уровня заболеваемости трихофитией и микроспорией у кошек и собак, вероятно, в связи с принятием Закона ответственности за обращение с животными. Однако в 2023 г. заболеваемость животных дерматомикозами увеличивается. В этот период растет количество обращений с животными в ветеринарные клиники для чипирования и профилактических процедур, в ходе которых выявлялись случаи заболевания микроспорией и трихофитией. Также проблемой

становятся случаи оппортунистических микозов, что затрудняет диагностику и лечение заболеваний кожи.

Таким образом, случаи заболевания микроспорией и трихофитией у собак и кошек регистрируются постоянно, что ставит перед ветеринарией и медициной необходимость разработки и применения в диагностической практике быстрых, высокочувствительных и специфичных методов идентификации возбудителей для выработки стратегии и тактики лечебных и профилактических мероприятий.

Ниже нами представлены результаты изучения некоторых клинических случаев заболевания микозами, выявленных у домашних и диких плотоядных, протекавших в атипичных или стертых формах, что не позволило идентифицировать возбудителей без применения молекулярно-генетических методов исследования.

### **2.2.2 Особенности клинического проявления атипичной формы дерматомикозов у домашних и диких животных**

#### *Дерматомикоз домашней беспородной кошки, вызванный *M. canis**

В ветеринарную клинику г. Астаны была доставлена кошка с алопецией в области живота и задних конечностей, с подозрением на микроспорию. Кошка в возрасте 12 лет, беспородная, была взята в семью по объявлению в двухмесячном возрасте. Ранее не была вакцинирована, стерилизована в девять месяцев. В летнее время обеспечен свободный доступ на улицу. Обработка от гельминтов проводилась однократно в возрасте шести месяцев. Хозяин животного обратился в ветеринарную клинику только спустя два месяца с момента появления первых клинических признаков заболевания в виде зуда, покраснения, расчесов (рисунок 4).

При клиническом осмотре ветеринарным специалистом у кошки выявлены очаги поражения в виде алопеций, пролиферации и гиперемии в области живота и внутренней поверхности задних конечностей. Внешне кожа гладкая, слегка отечная, с покраснениями, расчесами и укусами. Очагов экссудации не выявлено. В местах облысения наблюдали редкие хорошо выраженные чешуйки кожи, по внешнему виду схожие с опилками. По совокупности клинических признаков

симптомы поражения, выявленные у кошки, нехарактерны для микроспории. Поставлен предварительный диагноз себорея, под вопросом – «пищевая аллергия», «демодекоз», «острый генерализованный малассезиоз», «микроспория».



Рисунок 4– Кошка с поражением кожи на брюшке и задних конечностях

При клиническом осмотре ветеринарным специалистом у кошки выявлены очаги поражения в виде алопеций, пролиферации и гиперемии в области живота и внутренней поверхности задних конечностей. Внешне кожа гладкая, слегка отечная, с покраснениями, расчесами и укусами. Очагов экссудации не выявлено. В местах облысения наблюдали редкие хорошо выраженные чешуйки кожи, по внешнему виду схожие с опилками. По совокупности клинических признаков симптомы поражения, выявленные у кошки, нехарактерны для микроспории. Поставлен предварительный диагноз себорея, под вопросом – «пищевая аллергия», «демодекоз», «острый генерализованный малассезиоз», «микроспория».

Сотрудниками ветеринарной клиники был проведен отбор проб биоматериала в виде соскобов и выщипов шерсти с границы пораженного участка и здоровой кожи. Микроскопия волос при первичном приеме показала наличие поражений волоса в виде утолщений и зазубрин (рисунок 5).

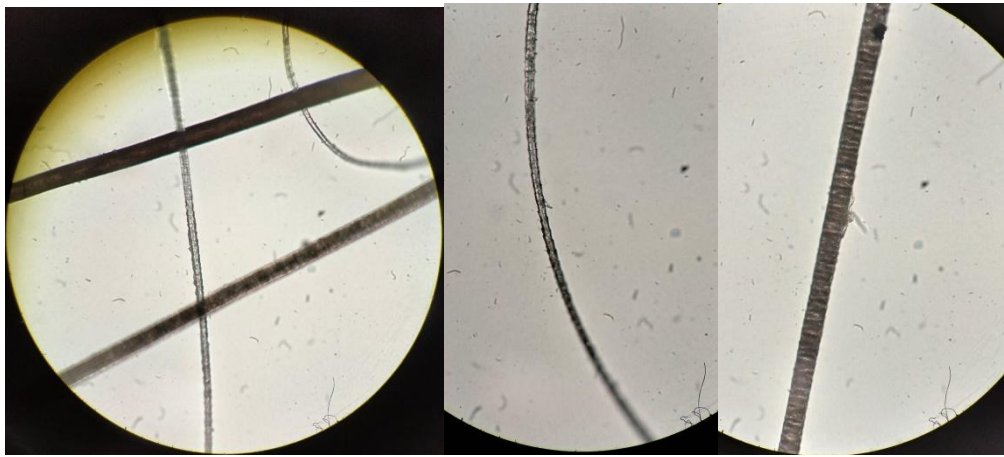
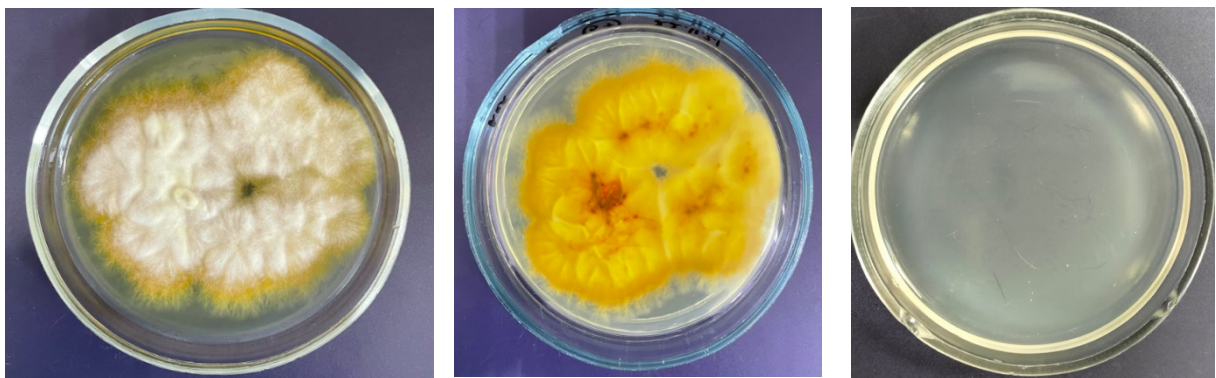


Рисунок 5 – Поражения волос кошки, выявленные при микроскопии

Как видно из рисунка 5, на волосе при микроскопии заметно наличие поражений в виде изъеденности и клиновидных расслоений пушковых волос, поперечной исчерченности остевых волос, не позволяющих идентифицировать возбудителя. Наряду с пораженными встречаются и здоровые волосы.

Поверхностное культивирование проводили при температуре 28°C в течение 14 сут. до образования характерных колоний. Культуральная характеристика первичной культуры позволила установить рост микромицета, напоминающий рост *M. canis* (рисунок 6).



абв

Рисунок 6 – Культура дерматомицета *M. canis* при первичном выделении

При проведении культурально-морфологических исследований проб биоматериала отмечали рост мицелия и начало формирования колонии на пятые сутки после посева.

Как видно из рисунка 6, рост колонии был характерным для *M. canis*. Колония представляла собой плотный стелящийся лучистый мицелий кремово-бежевого цвета, по краям колонии мицелий имеет желто-оранжевый пигмент, поверхность бархатистая. Структура колонии бугристая, морщинистая, колония въедается в питательную среду. Реверзум имеет ярко-желтую окраску, по центру наблюдается пигмент от оранжевого до коричневого цвета. Среда незначительно окрашивается в песочный цвет.

При микроскопии в поле зрения наблюдали септированный, ветвящийся мицелий с веретенообразными макроконидиями. У 20-дневных колоний были обнаружены обильные макроконидии веретенообразной формы с 5-12 перегородками (рисунок 7).



Рисунок 7 – Выявление макроконидий при микроскопии *Microsporium* spp.  
Увеличение  $\times 400$

Это позволило нам идентифицировать выделенную культуру гриба по культурально-морфологическим признакам как *M. canis*. Позднее была проведена ее молекулярно-генетическая идентификация.

#### *Дерматомикоз породистых кошек, вызванный T. benhamiae*

В ветеринарную клинику поступили два кота с подозрением на микроспорию плотоядных. У кошки британской короткошерстной породы в возрасте 3 лет очаг поражения появился на морде, у кота возрастом 1 год породы мейн-кун – на хвосте. По совокупности признаков у животных на коже имелись симптомы поражения, отличающиеся от характерных признаков микроспории. Пораженный

участок кожи у кошки локализовался на голове, на лицевой части мордочки (рисунок 8).

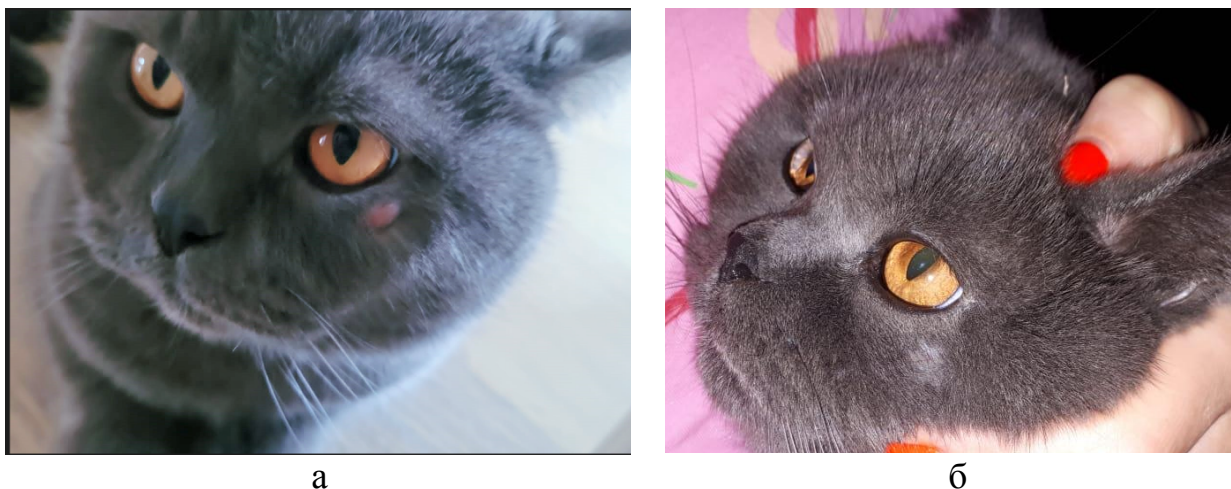


Рисунок 8 – Кошка британской породы, от которой выделен штамм *T. benhamiae* №19 с поражением на морде: а) до лечения, б) после лечения

Пятно имело округлую форму и располагалось у орбиты левого глаза. Очаг поражения имел четко выраженные границы, сопровождался экссудацией, полной потерей волос. Выпадение волос в зоне поражения сильное, участок кожи практически голый, интенсивно красного цвета. Вокруг поражения наблюдалось шелушение кожи, сразу не заметное под шерстным покровом.

Разрастание очага поражения первые недели не вызывало беспокойства у кошки. По мере увеличения очага, заболевание сопровождалось зудом, беспокойством, постоянными расчесами и умыванием области поражения.

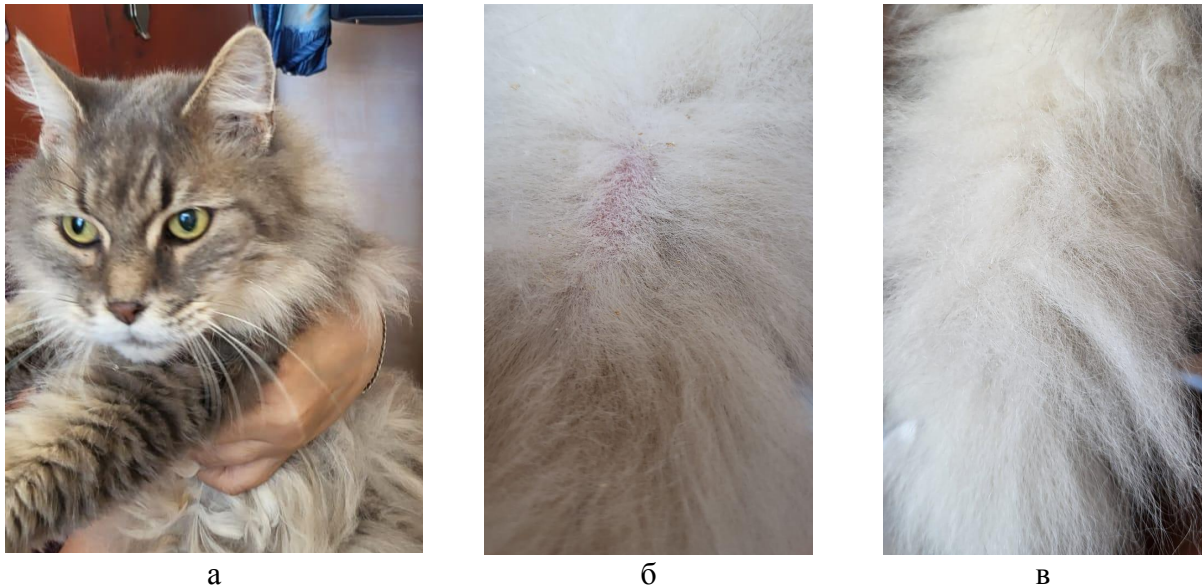
У годовалого кота породы мейн-кун поражение выявлено на вентральной стороне хвоста, равноудаленное с обоих концов (рисунок 9).

На хвосте выявлено нечетко выраженное пятно красного цвета с отрубевидным шелушением. В очаге поражения волосы редкие, истонченные; обломанных волос в виде пеньков, типичных для дерматомикоза, не выявлено. Животные ранее не вакцинировались, лечению не подвергались.

Отбор проб биологического материала в виде волосков шерсти с границы пораженного участка и соскобов кожи проводили сразу от животных, после надлежащей стерилизации пораженного участка 70%-ным спиртом. Пробы биомате-



риала доставлены в лабораторию биотехнологии - диагностический центр Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СФНЦА РАН для проведения микологических исследований. Люминесцентная диагностика не подтвердила наличие *M. canis*.



а) внешний вид животного б) поражение на хвосте до лечения, в) после лечения

Рисунок 9 – Кот породы мейн-кун с очагом дерматомикоза на хвосте, вызванным *T. benhamiae* №20

При первичном выделении возбудителя проводили поверхностное культивирование гриба при температуре 28°C в течение не менее 10-14 сут. до образования характерных колоний. Культуральная диагностика первичной культуры позволила установить рост дерматомицета, сходный с ростом *M. canis*. Внешний вид сформированных колоний имел характерные для дерматомицетов особенности. Внешний вид сформированной колонии имел выраженную зональность: по краю колонии – рост пушистого мицелия, по центру – образование порошистых очагов бежевых оттенков (рисунок 10, 11).

Штамм №19 при пересевах имел культурально-морфологические признаки, более характерные для *Trichophyton mentagrophytes*. Штамм образовывал колонии бархатистые – по центру, пушистые – по периферии. Колония формировалась с образованием нескольких концентрических зон от светло до темно-бежевого цвета.

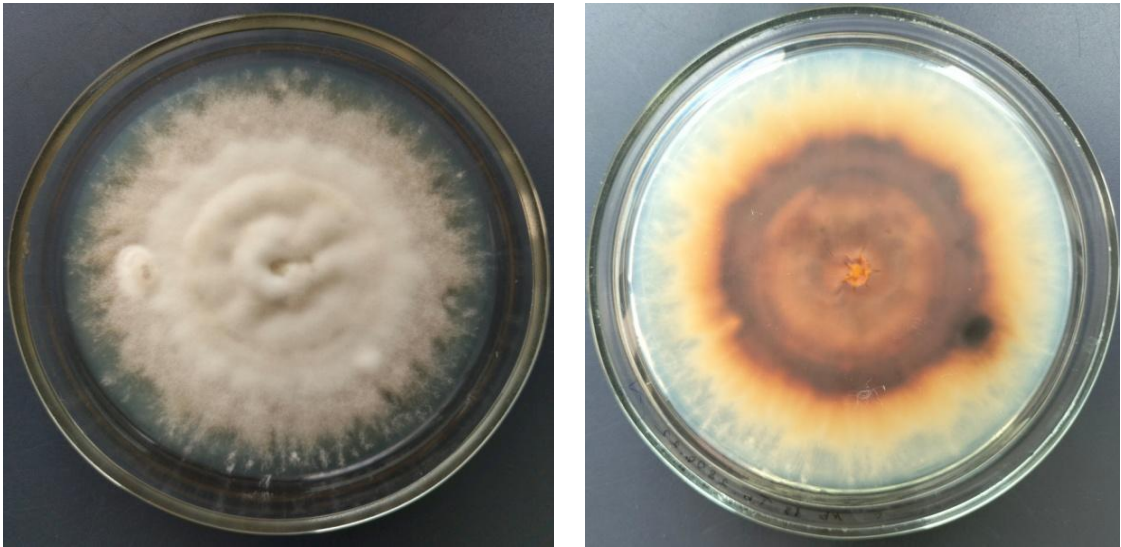


Рисунок 10 – Чистая культура штамма *T. benhamiae* №19

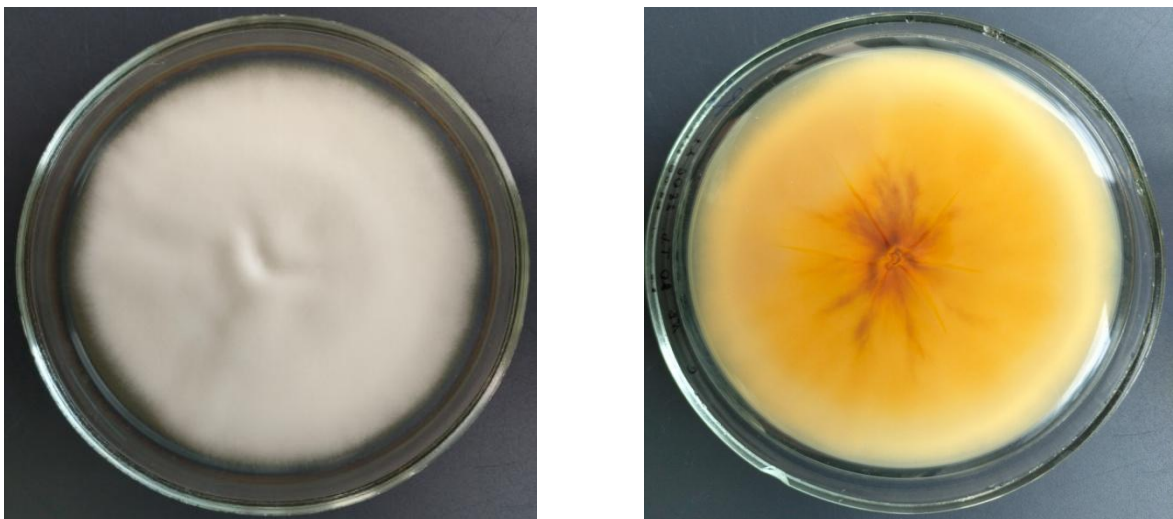


Рисунок 11 – Чистая культура штамма *T. benhamiae* №20

Штаммы формировали бархатистые колонии, поверхность которых была ровная, реже радиально исчерченная, с углублением в центре. Колонии были округлой формы, непрозрачные, консистенция – плотная. Характер роста – сплошной, выражена зональность и слабо выраженные радиальные борозды от центра колонии. Заметный рост колоний начинался с третьих суток, формирование колоний завершилось на 15 сутки. Через 1,5 месяца диаметр колоний достигал от 8,0-8,8 до 8,5-9,0 см. Структура поверхности колоний – плоская с возвышенностями по центру, растущий край – неоднородный пушистый.

Микроскопическая структура штаммов характеризовалась развитием мицелия и характерных морфологических структур для рода *Trichophyton*. Структуры *Trichophyton* spp., подобные мицелию, являются перегородчатыми, ветвящимися и бесцветными в агаровом блоке, что отчетливо видно на третьи сутки. К седьмым суткам мицелий уплотняется, быстро стареющий мицелий становится более коротким с образованием артроспор. Измерительная шкала = 50 мкм (рисунок 12).

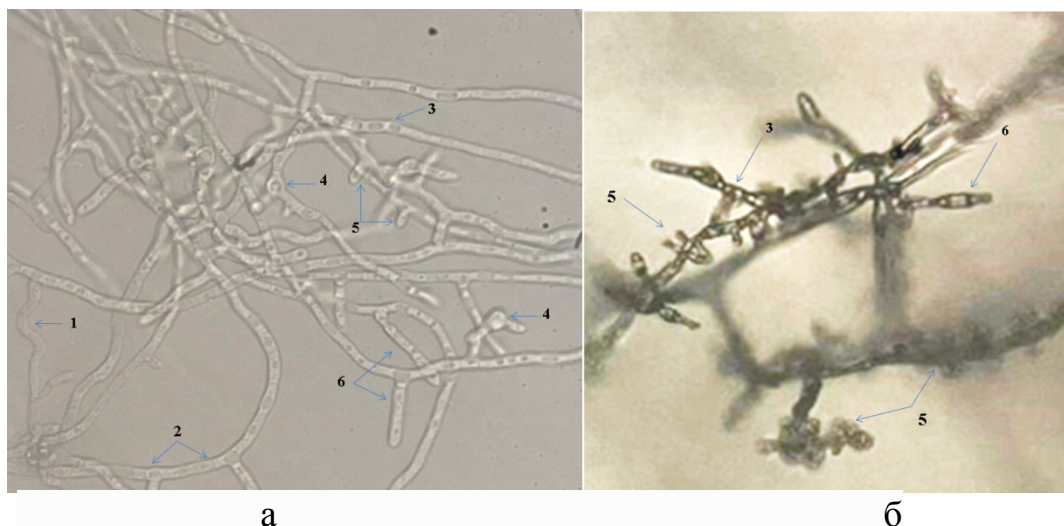


Рисунок 12 – Микроскопические структуры *Trichophyton* spp.: а) третьи сутки, б) седьмые сутки. Измерительная шкала = 50 мкм

На рисунке 12 видно, что молодой мицелий к исходу третьих суток бесцветный, извитой (рис. 12.1) или ровный, септированный (рис. 12.2). На мицелии на третьи сутки начинается формирование микроконидий (рис. 12.5) и характерных макроконидий на короткой ножке (рис. 12.6). Отмечается быстро стареющий мицелий с образованием артроспор (рис. 12.3) и хламидоспор (рис. 12.4) к исходу седьмых суток.

Так как по микроскопии морфологические структуры были охарактеризованы как *Trichophyton* spp., для видовой идентификации были проведены молекулярно-генетические исследования. По результатам которых было установлено, что оба штамма имеют принадлежность к *Trichophyton benhamiae* на 100%.

Таким образом, нами впервые выявлен *T. benhamiae* на территории Западной Сибири. Ранее данный возбудитель был обнаружен на территории России в

г. Москва у морской свинки. Из литературных источников известно, что *T. benhamiae* впервые выделен и описан именно как возбудитель трихофитии морских свинок (I. Maldonado, 2021).

*Клиническое проявление дерматомикоза у тигра, вызванного M. canis*

Пробы биоматериала взяты у молодого самца тигра (*Panthera tigris*) по кличке Лада (помесь уссурийского (80%) и бенгальского тигра) семимесячного возраста с клиническими признаками поражения кожи (рисунок 13).



Рисунок 13 – Внешний вид тигренка с множественными поражениями на морде и лапах в виде алопеций и корочек

Тигренок Лада родился 15 мая 2019 г. в Большереченском зоопарке, г. Барнаул, Россия. Тигренок на 80% уссурийский тигр, мать чистокровная, отец имеет прилитие крови бенгальских тигров. Содержался в цирке г. Астана в одной клетке с тигренком Бэном, ранее вакцинированным от дерматомикозов. Животное предназначено для дрессировки и дальнейшей выступления на арене цирка.

С рождения до 3-х месяцев тигренок питался молоком матери, затем переведен на мясной рацион (говядина). Через 2 недели получал витамины Бреворс Ист Эксел, не вакцинирован. В контакте с тигрятами и львенком постоянно находился щенок Роки (вакцинирован от дерматомикозов). Лада была активной, хорошо кушала говядину и говядину с курицей, внешне не болела, клинические признаки отсутствовали.

Клинические признаки заболевания у Лады появились в первой половине ноября, были невыраженными и нехарактерными для дерматомикозов. Был поставлен предварительный диагноз – стафилококкоз. Однако, после применения антибиотикотерапии (марфлаксин) состояние животного значительно ухудшилось.

Для исключения аллергии были отменены витамины, т.к. в их состав входят пивные дрожжи. Для исключения наличия подкожного клеща был назначен акарицидный препарат. Для лечения дерматофитоза было рекомендовано введение вакцины Вакдерм (Россия) согласно инструкции производителя (четырекратно с интервалом в 10 суток). Через месяц у тигренка шерсть стала тусклой, общее клиническое состояние ухудшилось. У него проявились выраженные клинические признаки дерматита. На момент осмотра ветеринаром шерсть была взъерошенной с участками алопеций, в некоторых очагах поражения – с экссудатом. На животе и внутренней поверхности бедер отмечали гиперемии кожи, облысение. На голове, лапах, хвосте появились участки с типичными очагами стригущего лишая в виде уплотнений, сухих корок, характерных для трихофитии. Был поставлен диагноз: диссеминированная форма дерматофитоза – микроспории плотоядных, осложненная эмерджентными возбудителями.

Для лабораторного исследования были отобраны пробы шерсти, соскобы кожи, кровь. Микроскопия проб биоматериала выявила наличие мицелия и спор грибов, в том числе и в крови (рисунок 14).

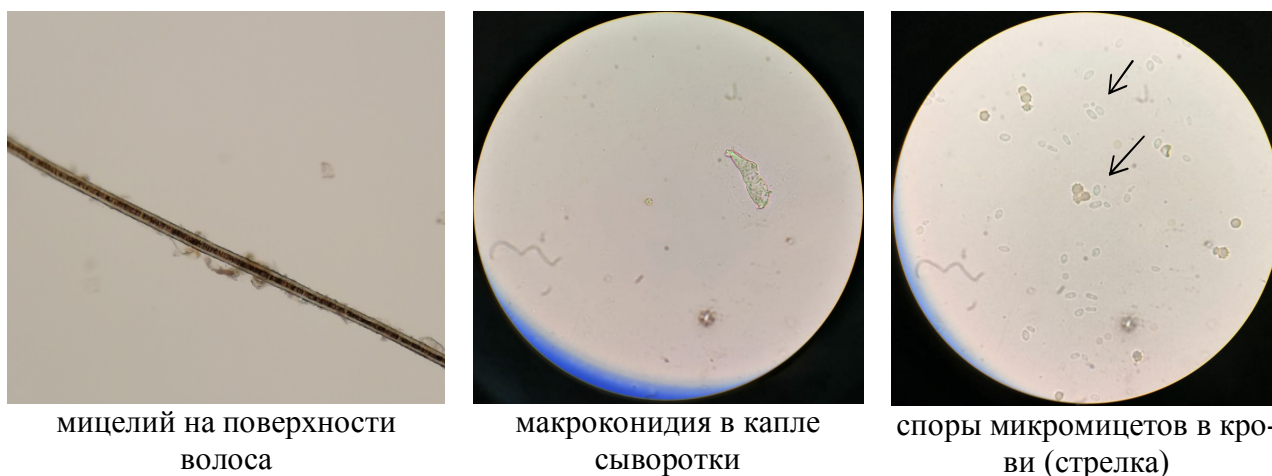


Рисунок 14 – Морфологические структуры микромицетов, выявленные в биоматериале тигренка. Увеличение×400

При первичном выделении возбудителя проводили поверхностное культивирование кусочков волос, сгустков крови и чешуек кожи при температуре 28°C в течение не менее 10-14 сут. до образования характерных колоний. Были получены типичные белые колонии с пушистым стелющимся быстрорастущим мицелием (рисунок 15).

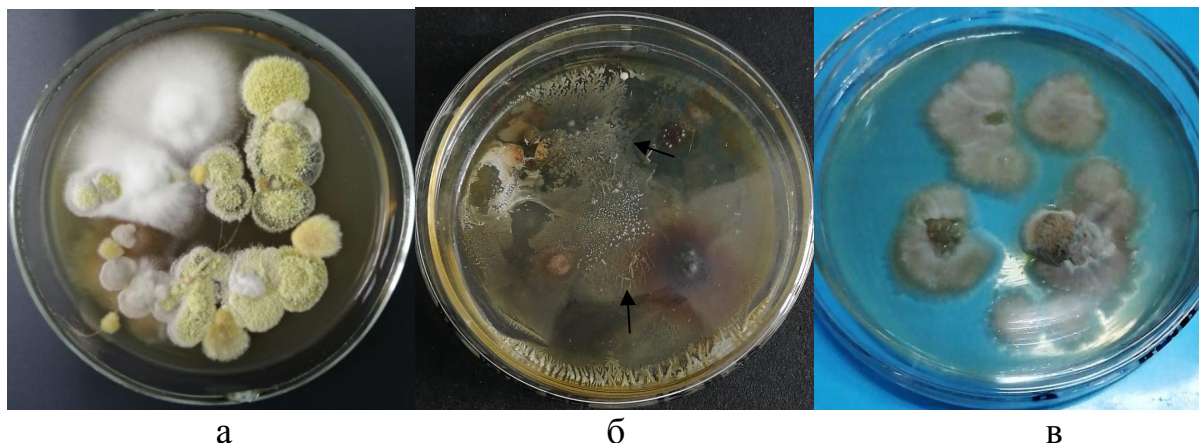


Рисунок 15 – Культура дерматомицета, полученная при первичном выделении из пораженной шерсти тигренка (а), из сгустков крови (б, в)

Как видно из рисунка 15, культура *M. canis*, выделенная из пробы крови, морфологически отличалась от культур, выделенных из пробы шерсти. При дальнейших пересевах колонии чистой культуры имели бархатисто-пушистую белую поверхность. Колония, полученная с очага поражения с лап животного, была бархатисто-пушистая с выраженной зональностью. Колонии гриба, выделенного из пробы крови тигренка, были сначала кожистые, потом слабо опушенные, изрезанные (рисунок 16).

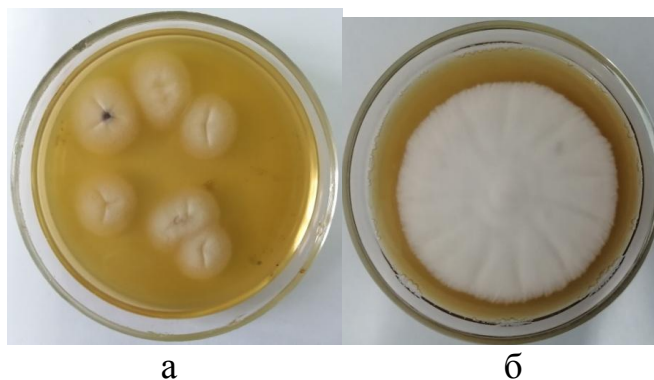
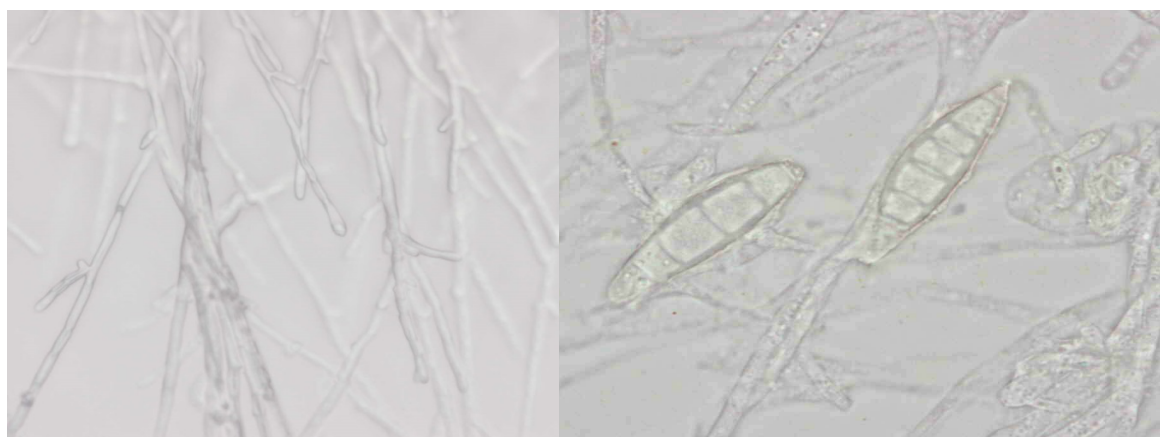


Рисунок 16 – Особенности роста колоний *M. canis*, полученных при выделении чистых культур: а – из сгустков крови тигренка, б – из очага на лапе тигренка

Микроскопия подтвердила наличие ровного бесцветного септированного мицелия, характерных веретенообразных остроконечных многоклеточных конидий и отсутствие микроконидий (рисунок 17).



а

б

Рисунок 17 – Морфологические структуры *M. canis*: мицелий с формирующимися макроконидиями (а), характерная веретенообразная макроконидия (б). Увеличение  $\times 400$

В соответствии с выявленными культурально-морфологическими признаками, выделенная культура гриба была идентифицирована как *M. canis*. Были отмечены особенности роста культуры: скорость – быстрая, текстура от шелковистой до грубо пушистой, радиальные борозды, таллом белого цвета, реверзум – темно-желтый.

Полученные нами результаты микологических исследований позволили уточнить предварительный диагноз и установить генерализованную форму микроспории у тигра, сопровождающуюся циркуляцией возбудителя в кровяном русле.

Таким образом, рассмотренные нами клинические случаи дерматомикозов у домашних и диких плотоядных, подтверждают сложность и длительность установки точного диагноза при атипичных и стертых клинических формах проявления инфекции.

### 2.2.3 Изучение культурально-морфологических свойств *M. canis*

Как уже сообщалось выше, нами было выделено 35 штаммов *M. canis*: 26 – от кошек, 8 – от собак, 1 – от тигра. Характеристика штаммов *M. canis* при пер-

вичном выделении из проб биоматериала показала наличие культурально-морфологических свойств, характерных для данного вида дерматофитов.

Как правило, при первичном выделении возбудителя из проб биоматериала от животных в чашке Петри наблюдается рост одной или нескольких колоний, имеющих характерные признаки: светло-бежевая колония с пушистым мицелием на лицевой части, с различными зонами роста. Обязательным условием является начало роста колонии из пораженных волос или чешуек кожи (указано стрелкой).

Обратная сторона колонии имеет цвет от светло-желтого до ярко-оранжевого с выработкой пигмента различной интенсивности. Пигмент обычно более светлый по краю колонии и интенсивно оранжевой по центру колонии (рисунок 18).

Как видно из рисунка 18, пигмент в питательную среду иногда не выделяется. В субстрате пигмент чаще имеет менее интенсивный оттенок, чем на реверзуме. По центру сформированных колоний накапливаемый пигмент, как правило, приобретает оранжево-коричневый оттенок. Отчетливо видны разрывы питательной среды.

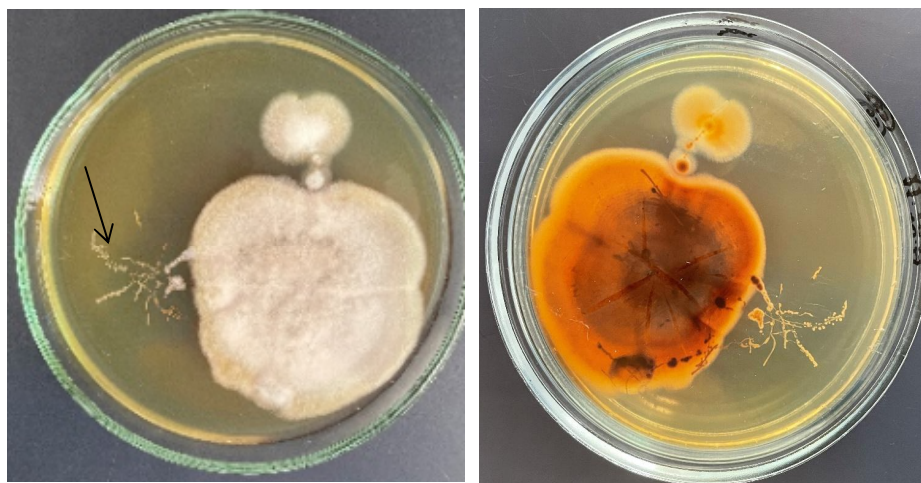


Рисунок 18 – Первичное выделение штаммов *M. canis* с патологического материала

При получении чистых культур *M. canis* отмечали сохранение основных культуральных характеристик дерматомицета. У некоторых штаммов регистрировали признаки полиморфизма, выражающиеся в изменении структуры и характера поверхности колонии, интенсивности пигмента, появление зональности и ради-



альных линий (приложение Ж).

При микроскопии чистых культур в поле зрения просматривали однородный тонкий ровный септированный мицелий, густо прорастающий по центру колоний в толще агаровой среды. По краю колоний отмечали отчетливый рост отдельных слабоветвящихся мицелиальных гиф с хорошо заметным ветвлением. Встречали бамбукообразный мицелий, с ракетовидными утолщениями на концах, по бокам гиф – редкие грушевидные микроконидии. Во всех случаях было выявлено наличие макроконидий с характерной веретенообразной формой, что позволило идентифицировать данные культуры как возбудителя микроспории вида *Microsporium canis*. Каждая конидия имела четко выраженное сегментирование. Количество сегментов составляло от 5 до 7 сегментов, очень редко выявляли восемь сегментов (рисунок 19).

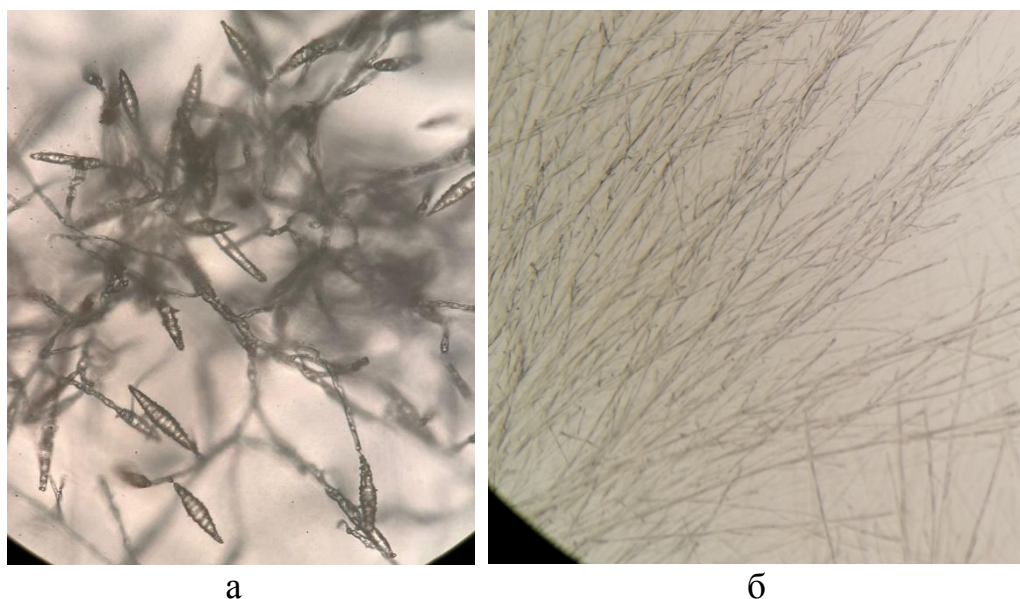


Рисунок 19 – Результаты микроскопии культуры *Microsporium canis*  
(а – макроконидии, б – мицелий)

Как видно из рисунка 19, отчетливо просматриваются макроконидии (а) и тонкий ровный септированный мицелий (б), что характерно для рода *Microsporium*. Это позволяет идентифицировать данного возбудителя как *M. canis*.

Таким образом, при фенотипической идентификации 35 культур зоофильных штаммов *Microsporium spp.* выявлено, что они достоверно являлись представителями

данного рода, так как образовывали характерные макроконидии, имели другие специфические культурально-морфологические особенности (приложение Ж).

#### **2.2.4 Культурально-морфологическая идентификация *T. benhamiae***

Как уже было сказано выше, кроме *M. canis* нами было выделено 6 штаммов *Trichophyton* spp.

При анализе проб биоматериала, полученного в г. Новосибирск от кошек с предварительным диагнозом «микроспория», люминесцентная диагностика не подтвердила наличие *M. canis*. При первичном выделении возбудителя проводили поверхностное культивирование гриба при температуре 28°C в течение не менее 10-30 сут. до образования характерных колоний. Культуральная диагностика первичной культуры позволила охарактеризовать дерматомицет, как *M. canis*. Внешний вид сформированной колонии имел выраженную зональность: по краю колонии – рост пушистого мицелия, по центру – образование порошистых очагов бежевых оттенков, что характерно для возбудителя микроспории.

Позднее, в результате полного микологического исследования проб биоматериала два штамма дерматомицетов были охарактеризованы как *Trichophyton* spp., так как имели сходство с *Trichophyton mentagrophytes*. В дальнейшем при генотипировании штаммы были идентифицированы как *T. benhamiae* (приложение Б).

Культурально-морфологическими исследованиями установлено, что штаммы отличались разнообразием фенотипических признаков (рисунок 20, 21).

Штамм *T. benhamiae* №19 формировал на агаре Сабуро мучнистые круглые с кратеровидным центром колонии со стелющимся бежево-кремового цвета слегка порошистым мицелием. Обратная сторона колонии и субстратный мицелий на агаре Сабуро были окрашены в коричнево-винный цвет. По краю колонии отмечали формирование пушистого мицелия в виде тонких нитей, как на поверхности, так и в глубине агара.

Штамм *T. benhamiae* №20 рос в виде мучнистых, белых, местами кремовых колоний округлой формы с выраженной зональностью. Обратная сторона коло-

ний имела оранжевый цвет. Растущий край колонии *T. benhamiae* был ровным.

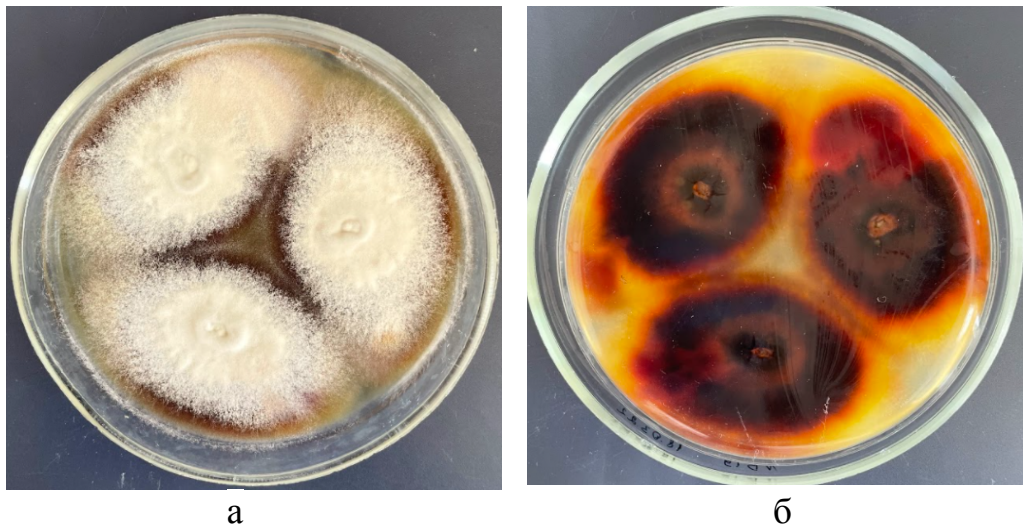


Рисунок 20 – Штамм *T. benhamiae* №19, агар Сабуро, 28°C, 20 суток  
(а – лицевая сторона, б – реверзум)

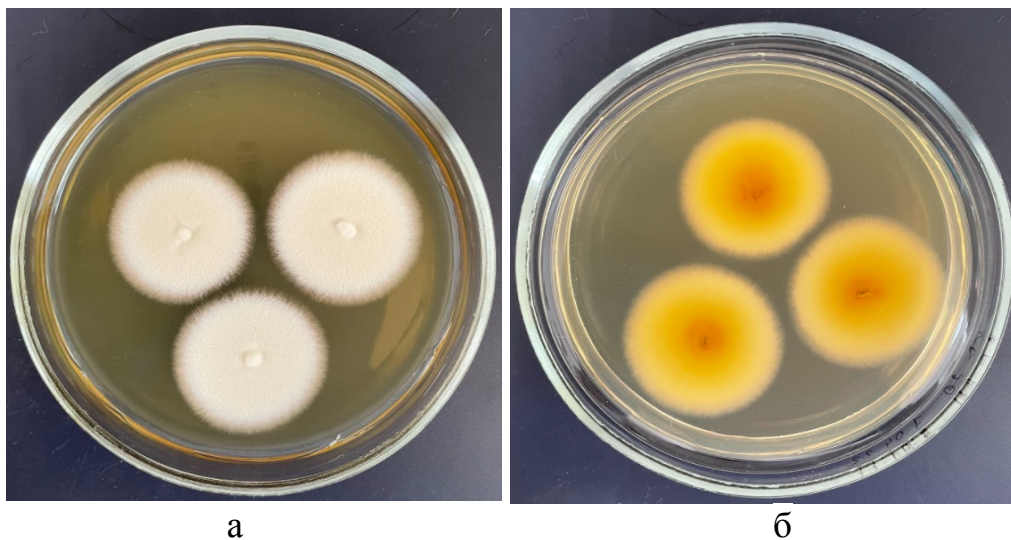


Рисунок 21 – Рост штамма *T. benhamiae* №20, агар Сабуро, 28 °С, 20 суток  
(а – лицевая сторона, б – реверзум)

Микроскопия позволила выявить у обоих штаммов гриба *T. benhamiae* наличие септированного бамбукообразного мицелия с характерным ветвлением и сходных микроструктур: обильные микроконидии, единичные макроконидии с характерными перетяжками формирующихся артроспор, которые показаны на рисунке 22: а – септированный бамбукообразный мицелий; б – ветвление; в – микроконидии; г – макроконидии; д – артроспоры.

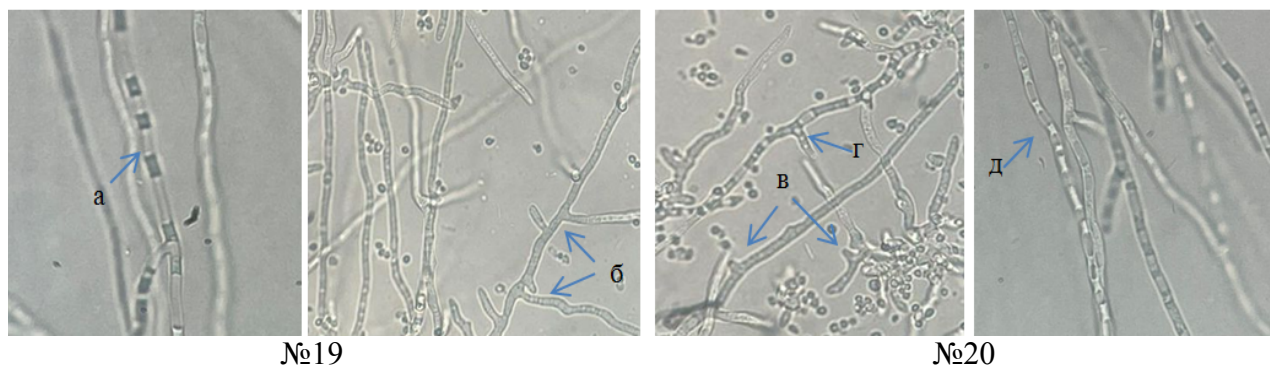


Рисунок 22 – Строение мицелия у штаммов *T. benhamiae*: на агаровых блоках с агаром Сабуро; 28°C; ×400, 3 сут.

При этом штаммы различались некоторыми морфологическими признаками: у *T. benhamiae* №19 выявили септированный ветвящийся бесцветный мицелий, у *T. benhamiae* №20 – бесцветный септированный бамбукообразный мицелий с выраженным ветвлением. У обоих штаммов обнаружены характерные макроконидии с двухконтурной клеточной стенкой с заметной перетяжкой, а также наличие микро- и макроконидий, сидящих на гифах (рисунок 23).

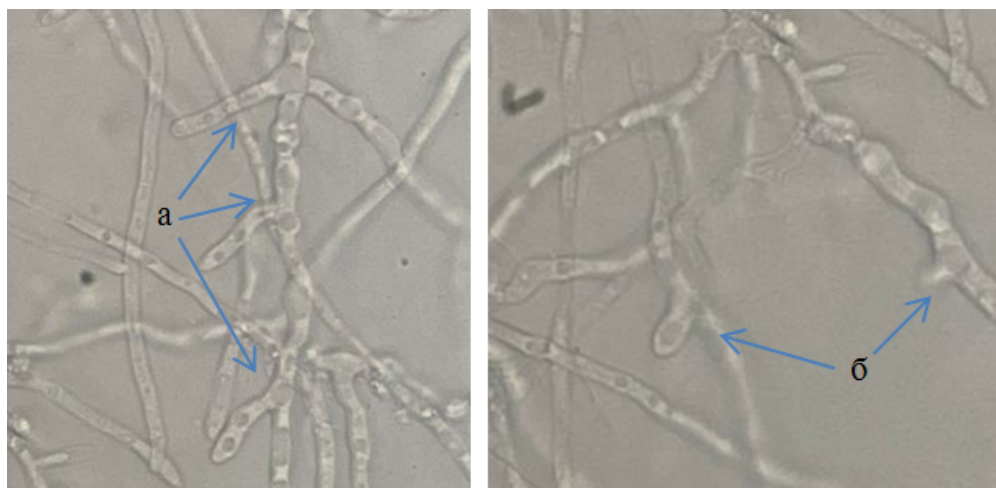


Рисунок 23 –Морфология макроконидий (а) и микроконидий (б) *T. benhamiae*; агаровые блоки Сабуро; 28°C, ×400, 7 сут; стрелкой указаны перетяжки

Таким образом, при изучении культурально-морфологических свойств культур *T. benhamiae*, выделенных от домашних кошек, установили культурально-морфологические особенности штаммов, выявили принципиальные морфологические отличия мицелия (приложение 3) и спорных форм (приложение И) дер-

матомицетов *T. benhamiae* и *M. canis*.

### 2.2.5 Сахаролитическая и уреазная активность дерматомицетов

Сахаролитическую активность выделенных штаммов дерматомицетов *T. benhamiae* и *M. canis* изучали с применением сред Гисса, уреазную активность – среды Кристенсена.

По результатам исследований нами было отмечено изменение цвета среды и образование пузырьков газа различной интенсивности в толще субстрата. Это свидетельствует о наличии сахаролитической активности штаммов, осуществляемой соответствующими ферментами. Ряд штаммов *M. canis* отличались отсутствием способности расщеплять маннит (35) либо лактозу и маннит (53). Штамм *M. canis* №57 имел низкую активность сахаролитических ферментов и не усваивал лактозу, маннит, мальтозу и глюкозу. В тоже время, нами выявлена общая закономерность, свидетельствующая о высокой активности ферментов мальтазы и сахаразы у всех штаммов *M. canis*, при  $n = 35$  (рисунок 24).

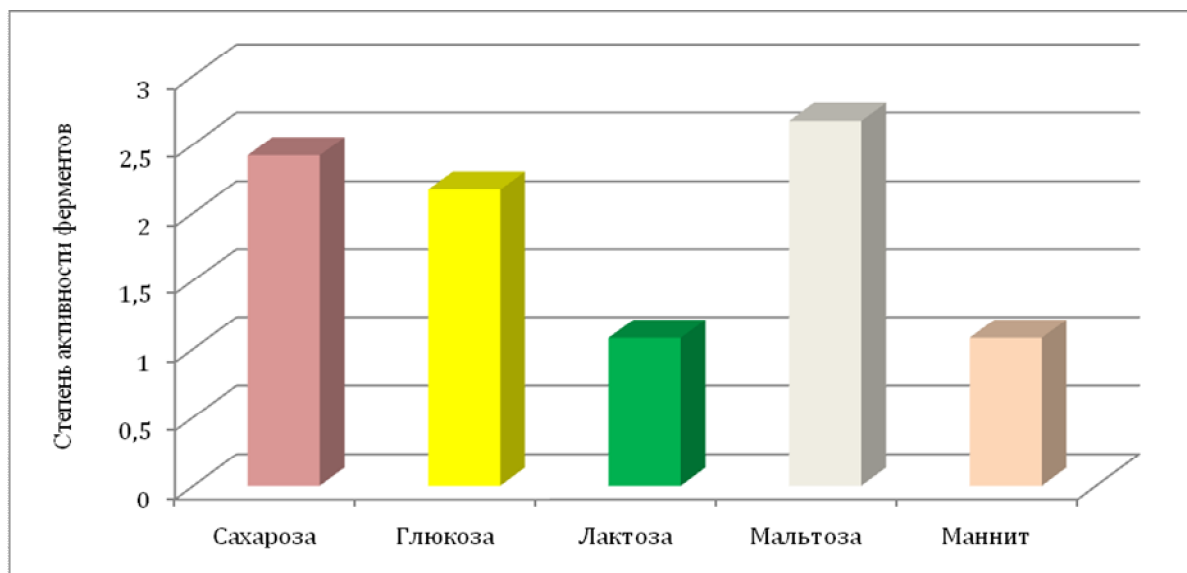


Рисунок 24 – Результаты выявления сахаролитической активности *M. canis*

Как видно из рисунка 24, штаммы *M. canis* имеют выраженную биохимическую активность, расщепляя мальтозу и сахарозу. В меньшей мере расщепляли глюкозу. Маннит и лактозу разлагали незначительно, при этом ряд штаммов не

обладают наличием соответствующих ферментов.

Штаммы *T. benhamiae* (n = 2) также отличались низкой активностью в расщеплении маннита. Оба штамма активно сбраживали сахарозу. Их активность в отношении мальтозы, глюкозы и лактозы была практически одинаковой (рисунок 25).

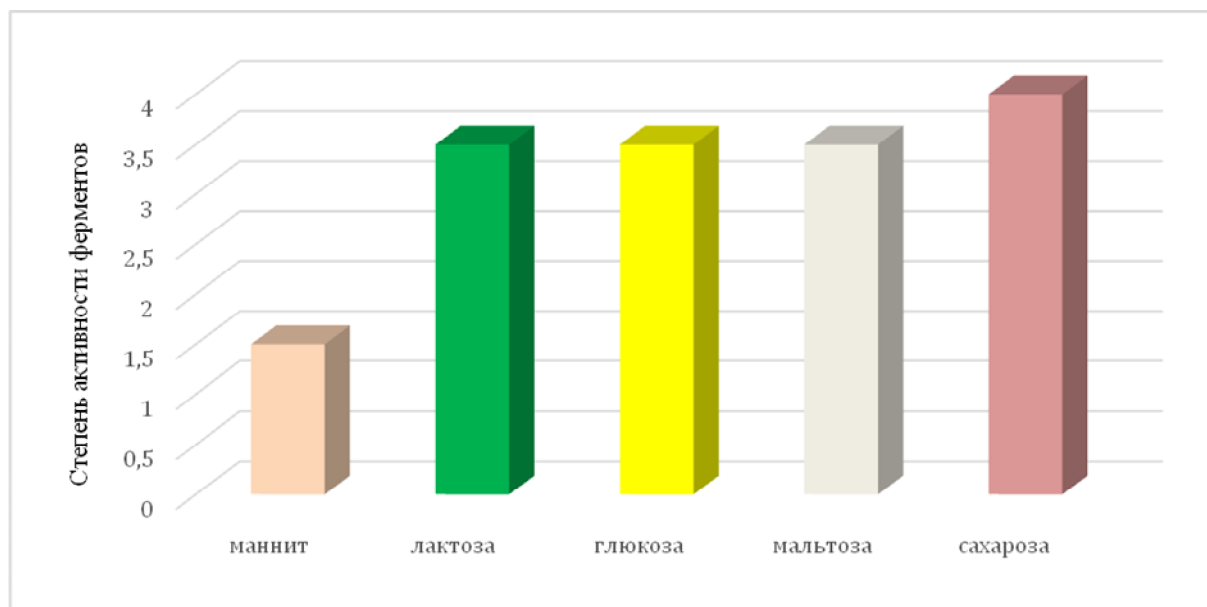


Рисунок 25 – Результаты выявления сахаролитической активности *T. benhamiae*

Анализ способности штаммов дерматомицетов расщеплять мочевинопоказал наличие выраженной активности фермента уреазы у *T. benhamiae* (n = 2). Это сопровождалось изменением цвета всей среды от желтого до розового. Это свидетельствует о более высокой способности этих штаммов, чем других, расщеплять мочевино.

Штаммы *M. canis*, при (n = 6) отличались разнообразием показателей уреазной активности. При этом, часть штаммов имели низкую уреазную активность (67%), либо она совсем не проявлялась (33%), так как цвет среды визуально не отличался от контроля (рисунок 26).

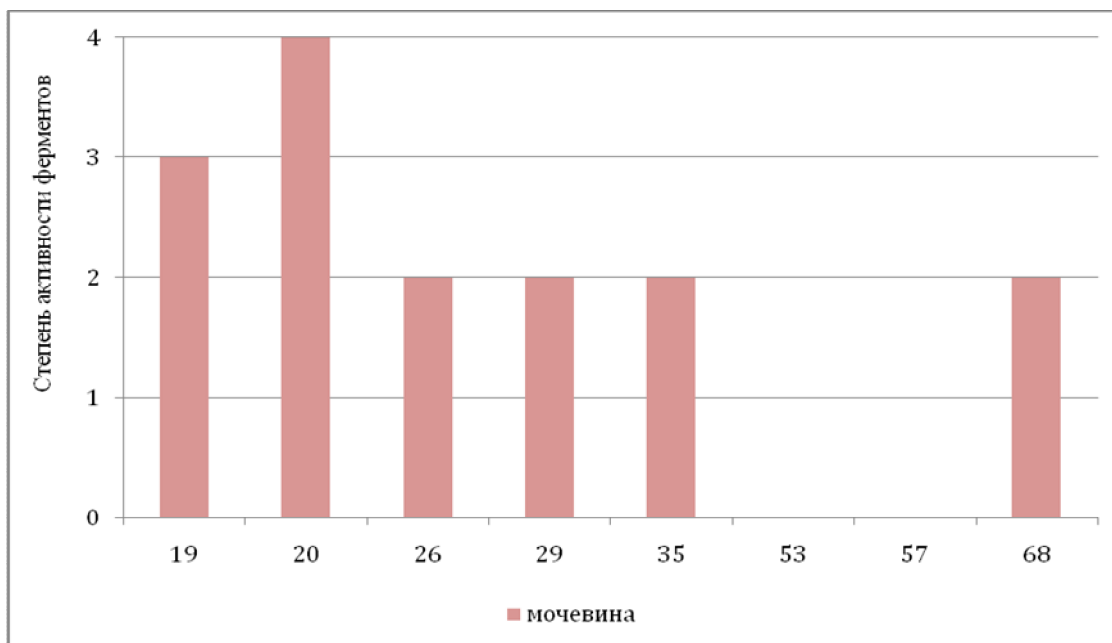


Рисунок 26 – Результаты выявления уреазной активности штаммов *M. canis* и *T. benhamiae*

Таким образом, нами установлены отличительные видовые характеристики ферментативной активности штаммов *M. canis* и *T. benhamiae*.

Штаммы *T. benhamiae* отличались более высокой сахаролитической и уреазной активностью, чем штаммы *M. canis*.

### **2.2.6 Кератинолитическая активность штаммов дерматомицетов, выделенных от мелких домашних и диких плотоядных животных**

Оба штамма *T. benhamiae* проявили выраженные кератинолитические свойства при проведении классического теста на перфорацию волоса, проявляющиеся в обильном росте на поверхности волоса и появлением достаточно заметных «колышков» либо изъеденности поверхности волоса (рисунок 27).

Аналогичные результаты получены на волосах при заражении их *M. canis*. Штаммы *M. canis* проявили выраженные кератинолитические свойства при проведении теста на перфорацию волоса, причем здесь поражение волоса были более явными, чем в опыте с *T. benhamiae* (рисунок 28).

Также для выявления кератинолитических свойств культур дерматомицетов готовили модифицированные среды Сабуро с добавлением гидролизата кератина

из кошачьей шерсти либо мелко измельченной ножницами кошачьей шерсти.



Рисунок 27 – Разрушение волоса под действием ферментов *T. benhamiae*

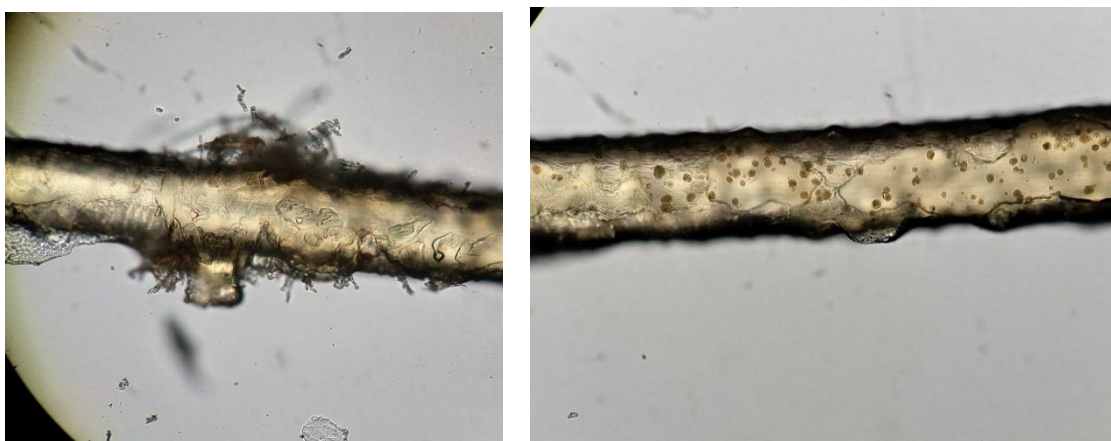


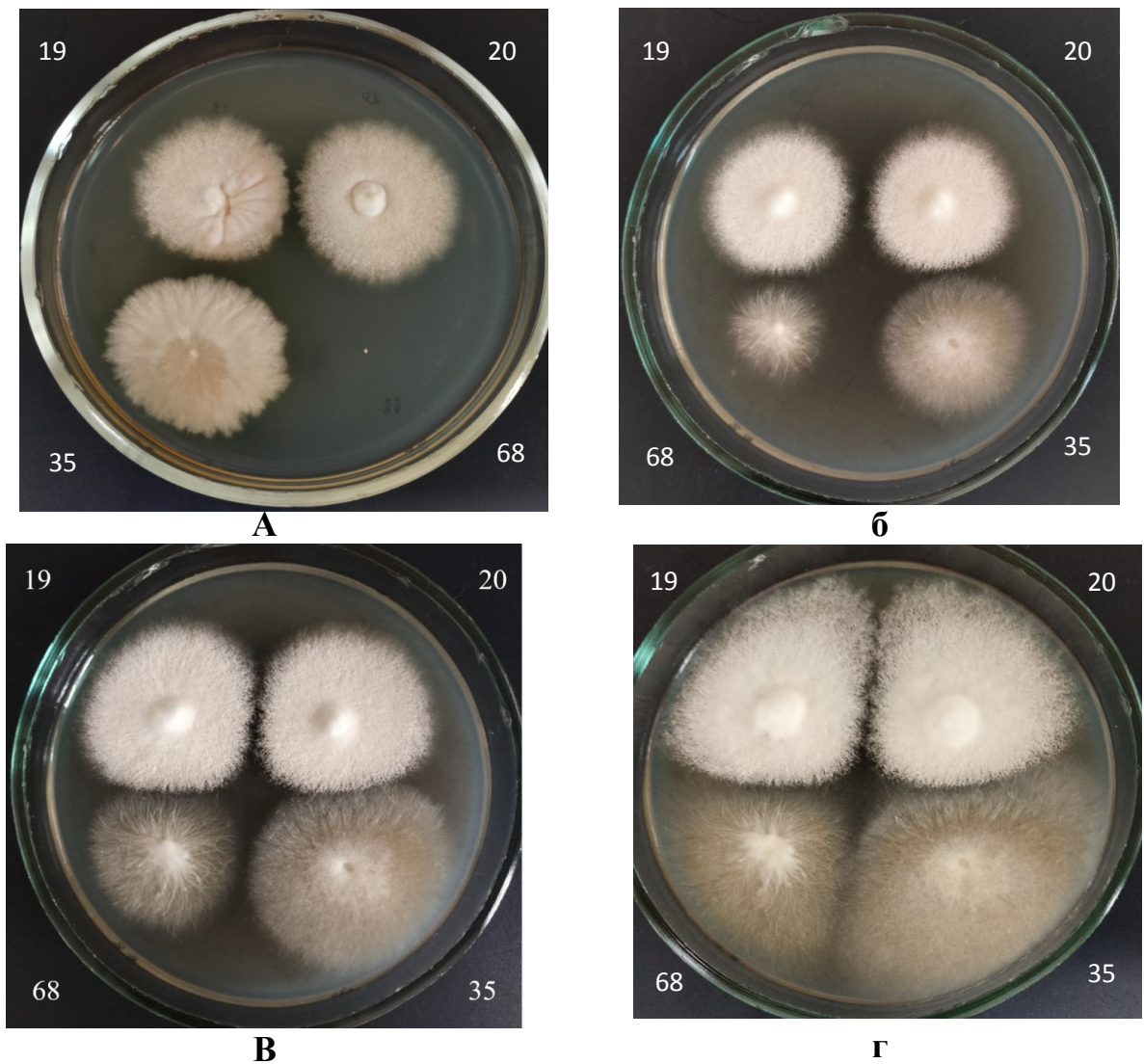
Рисунок 28 – Поражение волос под действием кератинолитических ферментов *M. canis* штамм 53

Нами отмечено, что видовые отличия в проявлении культурально-морфологических характеристик у штаммов грибов при росте на средах с кератином более отчетливо выражены. Поверхность колоний на контрольной среде была более нежно структурированная, бархатистая, на среде с кератином – более зернистая, плотная (рисунок 29).

Как видно из рисунка 29, на средах с добавлением гидролизата кошачьего кератина (б, в, г) штаммы грибов быстрее накапливали биомассу, активнее формировали воздушный и субстратный мицелий и споры, имели другой цвет и структуру колоний, чем на контрольной среде без добавления гидролизата кера-



тина волос (а), что особенно заметно у *T. benhamiae*.



а – контроль, 8 сутки, б – колонии, 8 сутки, в – колонии, 10 сутки, г – колонии, 14 сутки

Рисунок 29 – Рост колоний дерматомицетов на среде Сабуро с добавлением гидролизата кератина

Рост культур дерматомицетов на средах Сабуро при использовании метода с добавлением мелко измельченной кошачьей шерсти также свидетельствует о том, что добавление шерсти оказывает влияние на проявление культуральных свойств у колоний грибов (рисунок 30).

Как видно из рисунка 30, на обратной стороне колоний, что выросли на среде с измельченным волосом (б), более выражена пигментация реверзума, присутствует зональное накопление пигмента, выше интенсивность пигмента, особенно у штаммов *T. benhamiae*.

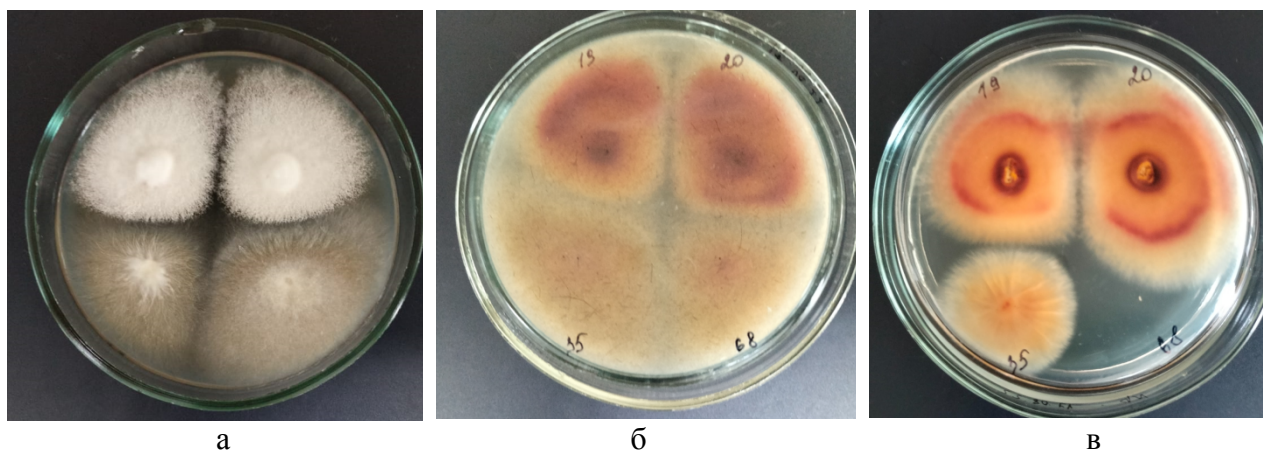


Рисунок 30 – Особенности роста штаммов *T. benhamiae* и *M. canis* на модифицированной среде с добавлением мелко изрезанных волос

Также, по завершению роста и формирования колоний отмечали более выраженную зону прозрачности вокруг каждого штамма, что проявлялось более интенсивным проявлением цветного фона подложки. Считаем, что данный феномен связан с истончением и разрушением кератина волос в толще субстрата под влиянием кератинолитических ферментов грибов, что меняет направление распространения световых лучей. Наличие частиц волоса снижает прозрачность питательной среды, что вызывает преломление света. Отсутствие частиц волос или их истончение позволяет свету частично пройти через границу сред, также меняя при этом направление распространения света. Если среда прозрачна, это визуально проявляется в более интенсивном оттенке подложки.

Также, по завершению роста и формирования колоний отмечали более выраженную зону прозрачности вокруг каждого штамма, что проявлялось более интенсивным проявлением цветного фона подложки. Считаем, что данный феномен связан с истончением и разрушением кератина волос в толще субстрата под влиянием кератинолитических ферментов грибов, что меняет направление распространения световых лучей. Наличие частиц волоса снижает прозрачность питательной среды, что вызывает преломление света. Отсутствие частиц волос или их истончение позволяет свету частично пройти через границу сред, также меняя при этом направление распространения света. Если среда прозрачна, это визуально проявляется в более интенсивном оттенке подложки.

Таким образом, нами выявлена кератинолитическая активность у штаммов грибов *T. benhamiae* и *M. canis* по отношению к человеческим и кошачьим волосам. Наличие выраженных кератинолитических свойств у штаммов является доказательством их этиологической роли в развитии выявленной нами патологии кожи и ее производных у домашних кошек.

### 2.2.7 Чувствительность дерматомицетов к противогрибковым препаратам

Выделенные нами штаммы дерматомицетов, были исследованы на наличие или отсутствие чувствительности к противогрибковым препаратам: клотримазолу, кетоконазолу, флуконазолу, амфотерицину, нистатину.

Для сравнительного анализа результатов чувствительности штаммов к антимикотикам были построены диаграммы с указанием следующих данных: диаметр зоны отсутствия роста в миллиметрах, противогрибковые препараты, время фиксации результатов *T. benhamiae* (19, 20) (рисунок 31) и *M. canis* (26, 68) (рисунок 32).

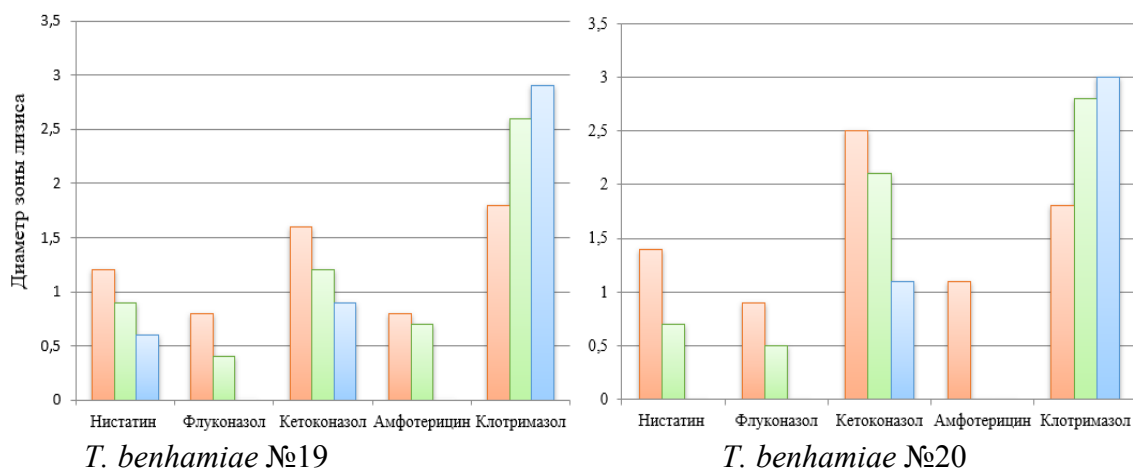


Рисунок 31 – Результат изучения устойчивости штаммов *T. benhamiae* к противогрибковым препаратам

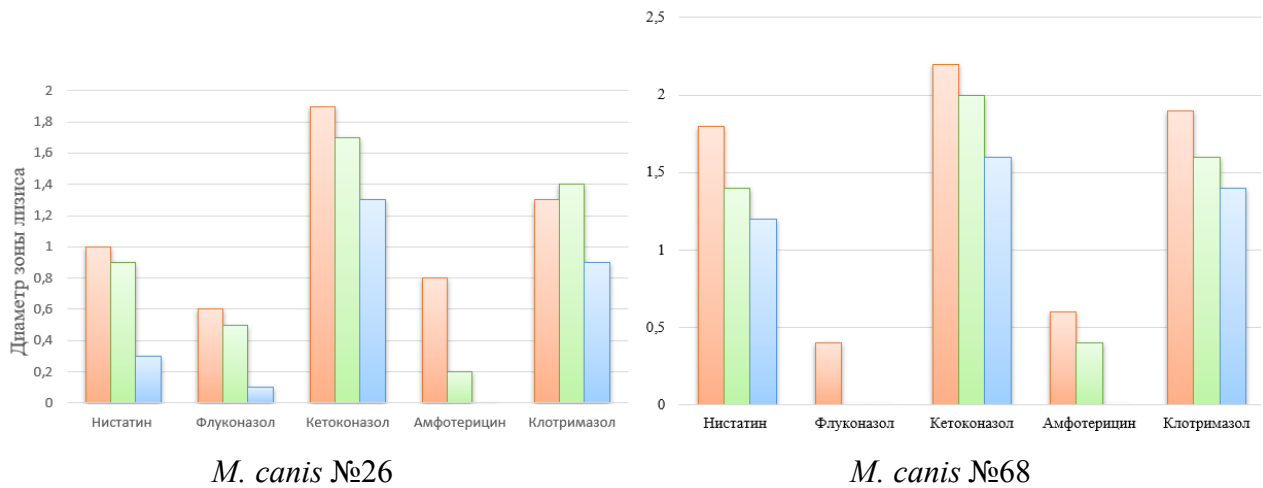


Рис. 32 – Результат изучения устойчивости штаммов *M. canis* к противогрибковым препаратам

Анализ чувствительности штаммов *T. benhamiae* к противогрибковым препаратам показал, что оба штамма высокочувствительны к клотримазолу. Диаметр зоны лизиса у *T. benhamiae* №19 составил 23-30 мм в динамике с увеличением диаметра на третьи сутки. Диаметр зоны лизиса штамма *T. benhamiae* №20 составил 18 мм через 24 часа, 26 мм – через 48 часа, 34 мм – через 72 часа. Также следует отметить, что оба штамма показали достаточно высокую чувствительность к кетоконазолу. Диаметр зоны лизиса *T. benhamiae* №20 составлял 25 мм, а у *T. benhamiae* №19 – 20-21 мм.

Анализ чувствительности штаммов *M. canis* к противогрибковым препаратам показал, что оба штамма высокочувствительны к кетоканазолу, однако на третьи сутки наблюдалось уменьшение диаметра, что говорит о снижении активности препарата (см. рисунок 32). Как видно из рисунка 32, диаметр зоны лизиса у штамма *M. canis* №26 составил 19-21 мм и уменьшился на третьи сутки. Диаметр зоны лизиса штамма *M. canis* №68 составил 22 мм через 24 часа, 20 мм – через 48 часов, 16 мм – через 72 часа.

По результатам исследований видно, что штаммы *M. canis* показали достаточно высокую чувствительность к клотримазолу. Диаметр зоны лизиса *M. canis* №26 составлял 19 мм, а у *M. canis* №68 – 13 мм.

Штамм *M. canis* №68 показал достаточно высокую чувствительность к нис-

татину. Диаметр зоны лизиса штамма *M. canis* №68 равнялся 18 мм через 24 часа, с равномерным уменьшением в последующие сутки.

Таким образом, выявлена высокая чувствительность штаммов *T. benhamiae* и *M. canis* к клотримазолу и кетоканазолу, наименьшая – к нистатину. При этом у всех штаммов чувствительность ко всем противогрибковым препаратам к исходу третьих суток снижалась. Однако, на штаммы *T. benhamiae* клотримазол оказывал более длительный фунгицидный эффект, полностью подавляя их рост и увеличивая зону лизиса выросших культур.

### 2.2.8 Особенности получения и характеристика антигенов дерматомицетов

#### *Получение антигенов дерматомицетов*

Для получения антигенов проводили глубинное культивирование штаммов *T. benhamiae* и *M. canis* при температуре 28°C в течение 15 дней с периодическим перемешиванием при 140 об/мин.

Заметный рост дерматомицетов наблюдали на 5-7 сутки, а на 15 сутки регистрировали образование колоний мицелия на стенках колбы в виде глобул и пристеночных колец. Полученная биомасса грибов использовалась для дальнейшего выделения белковых антигенов (таблица 2).

Таблица 2 – Выход биомассы дерматомицетов при глубинном культивировании

Дерматомицеты	Выход биомассы (г) на 100 мл питательной среды				
	1	2	3	общий вес	M±m
<i>M. canis</i> №26	11,29	12,11	11,65	35,05	11,68±0,28
<i>M. canis</i> №68	11,65	11,71	11,58	34,94	11,64±0,44
<i>T. benhamiae</i> №19	12,54	11,37	11,85	35,76	11,92±0,41
<i>T. benhamiae</i> №20	11,09	11,89	11,59	34,57	11,52±0,28

Как видно из таблицы 2, средний выход биомассы штамма *M. canis* №26 составил 11,68 г; *M. canis* №68 – 11,64 г; *T. benhamiae* №19 – 11,92 г; *T. benhamiae* №20 – 11,52 г. При глубинном культивировании дерматомицетов *M. canis* и *T. benhamiae* не наблюдается отличительной разницы и выход биомассы практи-

чески на одном уровне. Максимальный выход биомассы наблюдался у *T. benhamiae* №19.

Следует отметить, что штаммы гриба *M. canis* №26 и №68 на жидкой среде формировали глобулы более крупных размеров по сравнению с *T. benhamiae* №19 и №20, образующих мелкие глобулы в виде однородной массы.

Полученная сырая биомасса дерматомицетов использовалась для получения корпускулярных и растворимых белковых антигенов.

В полученных растворимых антигенах определяли концентрацию белков и полисахаридов (таблица 3).

Таблица 3 – Концентрация белка в растворимых антигенах при n=10

№	Антигены дерматомицетов	Концентрация белков (мг/мл)	Концентрация полисахаридов (мг/мл)
1	<i>M. canis</i> №26	0,07 ± 0,02	0,05±0,02
2	<i>M. canis</i> №68	0,10 ± 0,03	0,07±0,03
3	<i>T. benhamiae</i> №19	0,07± 0,02	0,06±0,02
4	<i>T. benhamiae</i> №20	0,08 ± 0,04	0,05±0,02

Как видно из таблицы 3, концентрация белка в антигенах *M. canis* №26 и *T. benhamiae* №20 составила 0,07 мг/мл, в антигенах *M. canis* №68 0,10 мг/мл и *T. benhamiae* №19 – 0,08 мг/мл, полисахаридов, соответственно.

Как видно из результатов антиген, полученный модифицированным методом по Tabatabai L. (1979), позволяет получить преимущественно белковые антигены из биомассы дерматомицетов. Объясняется это особенностями строения клеточной стенки дерматофитов, содержащих 80-90% полисахаридов: хитина, глюканов, хитозана, маннана (у дрожжей), связанных с белками и липидами.

#### *Агглютинирующие свойства растворимых антигенов дерматомицетов*

Определение агглютинирующих свойств у полученных белковых антигенов проводили в КРА и РМА. Критериями оценки были степень агрегирования антигена и просветление жидкости. Агглютинацию в два креста и больше оценивали, как положительный результат, в один крест – сомнительный, отсутствие агглютинации – отрицательный результат.

В результате исследований было выявлено:

- растворимый антиген *T. benhamiae* №19 образовывал небольшое количество мелкозернистых хлопьев, наблюдалось едва заметное просветление жидкости. Реакцию оценивали как 25% агглютинацию (+);

- антиген *T. benhamiae* №20 образовывал мелкие хлопья, видимые при встряхивании, наблюдалось незначительное просветление жидкости. По характеру образования агглютината, степени просветления жидкости реакцию оценивали как 50% агглютинацию;

- антиген *M. canis* №26 образовывал мелкие хлопья, видимые при встряхивании, наблюдалось незначительное просветление жидкости (50% агглютинация);

- антиген *M. canis* №68 образовывал небольшое количество мелких хлопьев, наблюдалось едва заметное просветление жидкости (25% агглютинация).

Таким образом, все анализируемые растворимые антигены дерматомицетов обладали агглютинирующими свойствами. При этом, более выраженные агглютинирующие свойства выявлены у антигенов *T. benhamiae* №20 и *M. canis* №26. У антигенов *T. benhamiae* №19 и *M. canis* №68 выявлены слабовыраженные агглютинирующие свойства.

#### *Агглютинирующие свойства корпускулярных антигенов*

На следующем этапе мы получили нативные и цветные корпускулярные антигены и изучили наличие у них агглютинирующих и преципитирующих свойств.

Нами выявлено наличие агглютинирующих свойств у нативных и цветных корпускулярных антигенов дерматомицетов в реакции РКА и в модифицированной реакции по типу роз бенгал пробы.

В РКА с нативным корпускулярным антигеном процесс сопровождался выпадением хлопьев и зерен агглютинации в течение 0,5-1 минуты (рисунок 33).

На рисунке 33 четко видно, что оба антигена обладают агглютинирующими свойствами, так как процесс сопровождался выпадением хорошо заметных на темном фоне хлопьев и зерен агглютинации.

Аналогичные результаты получены и при проведении РБП с иммунными сыворотками и цветными антигенами *M. canis*.

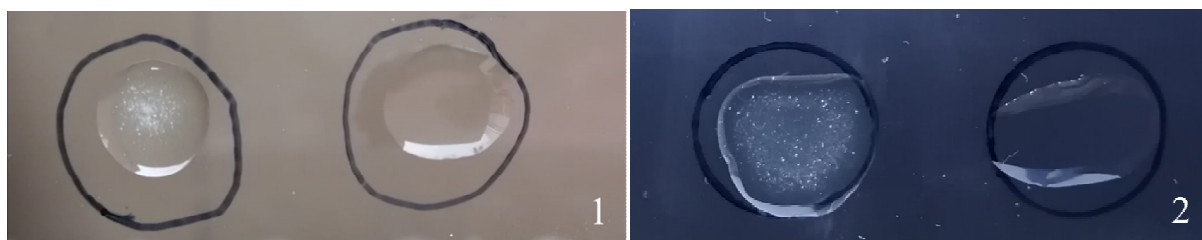
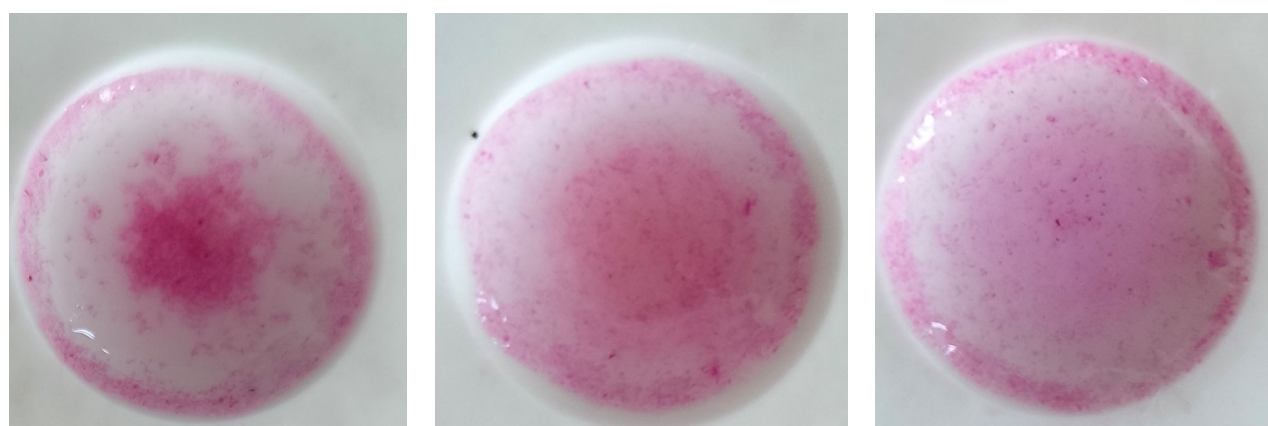


Рисунок 33 – Результаты постановки РКА с антигенами *T. benhamiae* (1) и *M. canis* (2)

Полученные цветные антигены дерматомицетов характеризовались выраженными агглютинирующими свойствами, что проявлялось в образовании хлопьев агглютинации и осадка розового цвета. Причем, более выраженные агглютинирующие свойства отмечали у антигенов *T. benhamiae*.

При учете результатов модифицированной роз бенгал пробы, выраженную агглютинацию окрашенного антигена, которую отмечали как образование мелких или крупных хлопьев розового цвета, учитывали за положительный результат. При появлении кольца на дне лунки результат учитывали как свидетельство того, что животное переболело или находится в инкубационном периоде заболевания. Равномерное распределение антигена в лунке и отсутствия просветления учитывали как отрицательный результат (рисунок 34).



Положительная реакция

Сомнительная реакция

Отрицательная реакция

Рисунок 34 – Учет результатов роз бенгал пробы с сыворотками крови кошек

При постановке модифицированной реакции по типу роз бенгал пробы с сы-



воротками крови больных кошек и цветным антигеном *T. benhamiae* и *M. canis* выявлено образование хлопьев агглютинации в течение 10-15 секунд (рисунок 35).

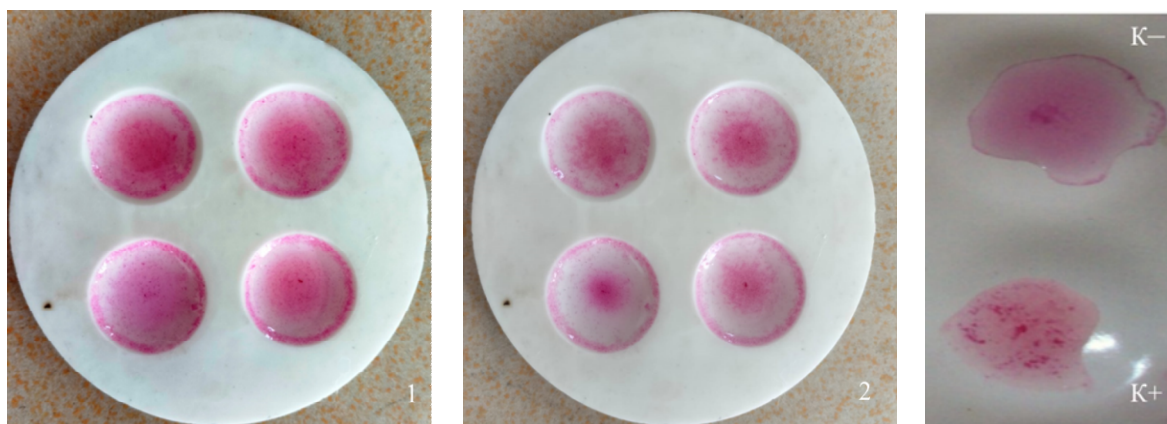


Рисунок 35 – Результаты постановки модифицированной роз бенгал пробы с окрашенными антигенами *T. benhamiae* (1) и *M. canis* (2), контроль (3)

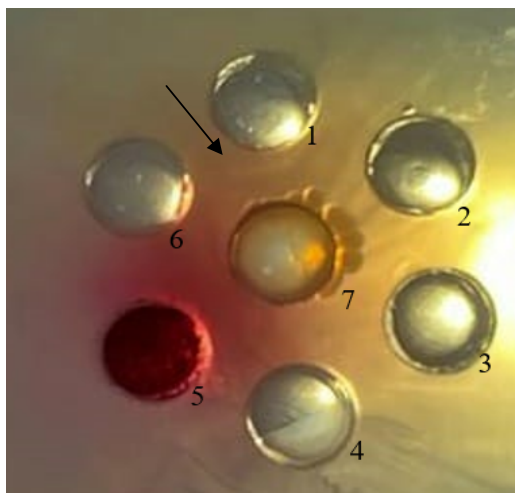
Таким образом, полученные нами антигены обладают высокими агглютинирующими свойствами, которые сохраняются при постановке различных вариантов реакции агглютинации. Считаем, что данные цветные корпускулярные антигены перспективны в разработке диагностических агглютинирующих тестов.

#### *Преципитирующие свойства растворимых антигенов*

При постановке реакции преципитации выявлено, что штаммы *T. benhamiae* обладают слабовыраженными преципитирующими свойствами. У штаммов *M. canis* не выявлено преципитирующих свойств, так как в геле отсутствовали видимые линии преципитации (рисунок 36).

На рисунке 36 видно, что слабовыраженная линия преципитации находится между лунками с иммунной сывороткой и антигеном *T. benhamiae* №19. Линии преципитации между другими антигенами *T. benhamiae* №19 (1), *T. benhamiae* №20 (2), *M. canis* №26 (3), *M. canis* №68 (4), *M. canis* №58 (5), контроль (6) и анти-сывороткой (7) отсутствовали.

Таким образом, были выявлены слабые преципитирующие свойства у белкового антигена *T. benhamiae* №19, у остальных дерматомицетов растворимые антигены не проявили преципитирующих свойств.



*T. benhamiae* №19 (1); *T. benhamiae* №20 (2); *M. canis* №26 (3); *M. canis* №68 (4);  
*M. canis* №58 (5); контроль (6); иммунная сыворотка (7)

Рисунок 36 – Выявление преципитирующих свойств антигенов дерматомицетов с сывороткой крови иммунизированных мышей

Считаем, что наличие преципитирующих свойств у антигенов штамма *T. benhamiae* №19 объясняется его иммуногенностью. На это же указывают более высокая скорость роста, образование более интенсивной пигментации, выраженное проявление активности ферментов в отношении сахаров и мочевины, выявленные нами при изучении культурально-морфологических и биохимических свойств данного штамма.

#### *Иммуногенные свойства антигенов дерматомицетов*

Для изучения иммуногенных свойств антигенов проводилась иммунизация белых лабораторных мышей по Фридлянской И.И. (1988) белковыми антигенами *T. benhamiae* и *M. canis* с концентрацией белка 0,06-0,1 мкг/мл. Анализ иммунных сывороток крови мышей в непрямом варианте ИФА показал наличие достаточно высоких титров специфических антител (таблица 4).

Как видно из таблицы 4, у мышей, иммунизированных растворимыми антигенами *T. benhamiae* и *M. canis*, наработаны специфические антитела, выявляемые при разведении сыворотки до 1:6400.

Таблица 4 – Результаты исследования проб сыворотки крови от мышей, иммунизированных растворимыми антигенами *T. benhamiae* и *M. canis*, в непрямом ИФА

№	Антиген	Титр антител в сыворотках крови от мышей		
		1	2	3
1	<i>T. benhamiae</i> №19	1:6400	1:6400	1:3200
2	<i>T. benhamiae</i> №20	1:800	1:400	1:400
3	<i>M. canis</i> №26	1:3200	1:6400	1:3200
4	<i>M. canis</i> №68	1:6400	1:6400	1:3200

Результаты тестирования растворимых антигенов в различных серологических реакциях представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Результаты тестирования растворимых антигенов в различных серологических реакциях

Белковые антигены дерматомицетов	Свойства белковых антигенов			
	РА	РБП	РИД	ИФА
<i>T. benhamiae</i> №19	+	++	+	1:6400
<i>T. benhamiae</i> №20	+	+	-	1:800
<i>M. canis</i> №26	+	+	-	1:6400
<i>M. canis</i> №68	+	+/-	-	1:6400

Примечание: «-» - реакция отрицательная; «+» - реакция положительная; «+/-» - реакция сомнительная

Таким образом, по результатам изучения антигенных и иммунологических свойств штаммов дерматомицетов можно сделать заключение о том, что:

- все полученные антигены обладают агглютинирующими свойствами;
- антиген, полученный из биомассы штамма №19 *T. benhamiae*, обладает слабо выраженными преципитирующими свойствами;
- белковые растворимые антигены, выделенные из биомассы различных дерматомицетов, обладают антигенностью, иммуногенностью, активностью в ИФА;
- штамм *T. benhamiae* №19 и штаммы *M. canis* проявляют выраженные иммуногенные свойства;
- штаммы №№ 26 и 68 *M. canis* имеют низкие показатели иммуногенной активности.

## 2.2.9 Обработка параметров постановки непрямого варианта ИФА для диагностики микроспории плотоядных

Дальнейшая работа была направлена на обработку параметров постановки непрямого варианта ИФА для диагностики микроспории плотоядных у домашних и диких животных с полученным нами растворимым антигеном *M. canis*.

Для этого подбирали оптимальную концентрацию антигена, время и условия сенсibilизации носителя, определяли диагностический титр. В качестве исследуемых сывороток использовали сыворотки мышей, иммунизированных антигеном *M. canis*. Результаты анализа учитывали с помощью спектрофотометра с вертикальным потоком света (BioSan MPP-96, 2018) при длине волны 492 нм.

Концентрацию антигена подбирали на примере вакцинного препарата ЛТФ-130 по следующей схеме (рисунок 37).

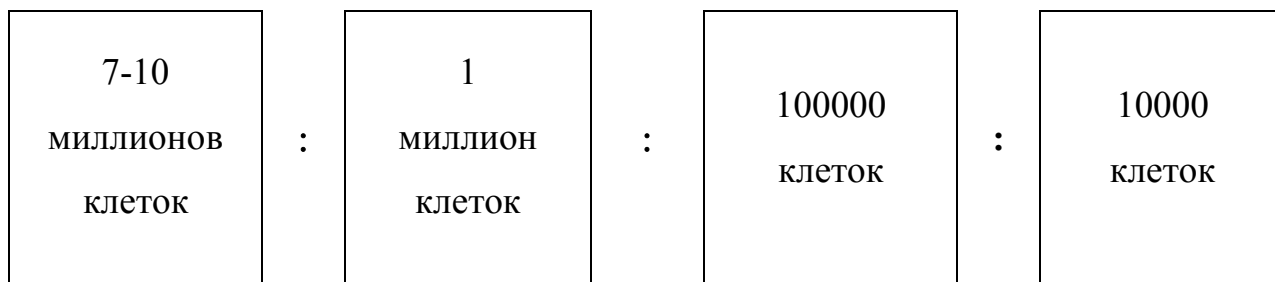


Рисунок 37 – Разведение вакцинного препарата

При обработке параметров постановки непрямого варианта ИФА для выявления в сыворотке крови мышей специфических видовых антител против возбудителя микроспории использовали готовый конъюгат Anti-Mouse фирмы Sigma, который вносили в разведении 1:5000, согласно инструкции производителя. В дальнейшем, при анализе сывороток крови от кошек и собак, использовали готовые конъюгаты Anti-Cat и Anti-Dog, соответственно, в таких же разведениях.

Для подбора времени и условий сенсibilизации носителя обрабатывали условия инкубации, предложенные ранее: в течение 2 часов при температуре 37°C и в течение 16-18 часов при температуре 4-5°C.

В ходе исследований было установлено, что принципиальной разницы между продолжительностью сенсibilизации антигена не существует. При инкубации планшета в течение 2 часов при температуре 37°C и в течение 16-18 часов при температуре 4-5°C получены практически аналогичные результаты:  $1,052 \pm 0,84$  и  $0,984 \pm 0,39$ , соответственно. В дальнейшем использовали оба режима сенсibilизации антигена, учитывая время поступления проб.

При подборе оптимальной концентрации антигена в лунки 96-луночного планшета его вносили в концентрации белка 0,05-0,1-0,15 мг/мл. Добавляли сыворотки крови в разведениях от 1:100 до 1:12800. Антитела против структурных белков дерматомицета определяли количественно по расщеплению субстрата на спектрофотометре.

В ходе работы установлено, что оптимальной является концентрация антигена 0,10 мг/мл, позволяющая выявлять титры антител в пробах сыворотки крови от мышей до 1:542, от кошек до 1:6523, от собак до 1:12231 с показателем ОП до 1,200-2,102. Подобные показатели выявлены и при использовании антигена в концентрациях 0,15 мг/мл с той лишь разницей, что при употреблении антигена в этой концентрации показатель ОП увеличивается до 2,721. Следовательно, использование антигена в концентрации 0,10 мкг/мл позволяет учитывать реакцию в среднестатистических параметрах, а увеличение концентрации антигена является нерациональным, т.к. ведет к дополнительному расходу компонентов реакции при тех же показателях.

Антиген с концентрацией белка 0,05 мг/мл также позволил выявить наличие специфических антител против возбудителя микроспории, однако показатель оптической плотности имеет низкие значения и титр выявляемых антител регистрируются в разведениях сыворотки от 1:100 до 1:400. Данные титры имеют низкое диагностическое значение, поэтому концентрация 0,05 мг/мл не рекомендована нами к использованию при постановке непрямого варианта ИФА для диагностики заболевания (таблица 6).

Таблица 6 –Показатели выявленных титров антител в сыворотках крови иммунизированных мышей

при n = 3

Концентрация антигена	Титр антител в сыворотках крови иммунизированных мышей			M±m
	1	2	3	
0,050 мг/мл	1:200	1:400	1:200	1:267±0,22
0,100 мг/мл	1:6400	1:12800	1:12800	1:10667±0,22
0,150 мг/мл	1:3200	1:1600	1:12800	1:5866±0,56

В результате постановки ИФА с антигеном различной концентрации выявили наличие высоких титров антител, при этом лучшие результаты регистрировали при концентрации белка 0,1 мг/мл.

Таким образом, нами отработаны параметры постановки непрямого варианта твердофазного иммуноферментного анализа для выявления специфических антител против микроспории. Согласно полученным данным оптимальным является использование в ИФА белкового растворимого антигена с концентрацией 0,10 мг/мл, что позволяет выявлять титры антител у белых мышей до 1:12800. Также установлено, что принципиальной разницы между продолжительностью сенсibilизации антигена не существует. Установлено, что применение конъюгата в разведении 1:5000 позволяет проводить корректный учет реакции.

После отработки схемы постановки ИФА провели испытание его диагностической эффективности путем исследования проб сывороток крови, отобранных от кошек и собак.

Как известно, титр – это предельное разведение сыворотки крови, при котором могут быть обнаружены антитела (Р.М. Хаитов, 2015). Соответственно, диагностический титр – это определенное количество антител на какой-то объем сыворотки, позволяющее точно ответить на вопрос о заражении животного возбудителем микроспории и наличии инфекционного процесса в его организме.

Диагностический титр в непрямом варианте ИФА, предназначенном для выявления специфических противотрихофитийных антител в сыворотке крови крупного рогатого скота, был установлен как 1:200 (Е.В. Кухар, 2011). Следовательно, исходя из описанных выше результатов, полученные нами антигены вы-

являют специфические антитела в пределах диагностического титра для дермато-микозов, а именно для микроспории.

Корректность данного утверждения при диагностике микроспории была проверена при анализе сывороток крови, отобранных от кошек и собак с клиническими признаками микроспории.

Активность антигена проверяли в непрямом ИФА с использованием проб сывороток крови от здоровых и больных микроспорией кошек, больных микроспорией собак: сыворотки 23 проб крови кошек, в том числе, 11 – от здоровых животных, 12 – от заболевших животных; 6 сывороток крови – от собак, больных микроспорией.

Результаты анализа тестируемых нами сывороток крови здоровых кошек и кошек с клиническими признаками микроспории представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Результаты непрямого ИФА с сыворотками крови от здоровых и больных кошек

n = 3, при P < 0,05

Сыворотки крови здоровых кошек	Показатели титров	Показатель ОП сывороток при 1:100	Сыворотки заболевших животных	Показатели титров	Среднее значение оптической плотности
1	1:100	0,132±0,14	1	1:400	0,329±0,23
2	1:200	0,262±0,17	2	1:800	0,340±0,21
3	1:100	0,201±0,15	3	1:6400	0,578±0,32
4	1:200	0,264±0,18	4	1:400	0,298±0,16
5	1:200	0,298±0,21	5	1:12800	1,166±0,27
6	1:200	0,291±0,22	6	1:6400	0,626±0,24
7	1:200	0,218±0,19	7	1:6400	0,678±0,26
8	1:200	0,235±0,23	8	1:800	0,315±0,19
9	1:400	0,342±0,27	9	1:12800	1,298±0,33
10	1:200	0,214±0,16	10	1:6400	0,602±0,19
11	1:400	0,285±0,21	11	1:1600	0,492±0,18
			12	1:800	0,421±0,17
K <sup>+</sup> ср.= 0,393					
K <sup>-</sup> ср.= 0,032					

Результаты исследования свидетельствуют о том, что в сыворотках крови здоровых кошек в двух случаях титр антител составил 1:100, в семи случаях – 1:200, в двух случаях – 1:400. В сыворотках больных кошек титры антител со-

ставляли от 1:400 до 1:12800. При этом показатель ОП у всех больных животных превышал значение ОП отрицательного контроля в 9 и более раз.

Результаты исследования проб сыворотки крови, полученных от больных микроспорией собак, представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Результаты исследования проб сыворотки крови собак в непрямом ИФА

№	Сыворотки крови собак	Показатель титров	Показатель ОП сывороток при 1:100
1	1 – собака Анталия, 6 лет	1:6400	0,467±0,25
2	3 – собака Рося, 4 года	1:800	0,358±0,27
3	9 – собака Бастер, возраст не указан	1:400	0,228±0,16
4	18 – собака Бленди, возраст не указан	1:25600	1,171±0,31
5	1.2 – собака Ника, 10 лет	1:100	0,185±0,14
6	3.1 – собака, возраст не указан	1:25600	1,142±0,31
K <sup>+</sup> ср.= 0,385			
K <sup>-</sup> ср.=0,069			

Согласно данным, представленным в таблице 8, в пробах сыворотки крови от собак выявлено наличие титров антител от 1:100 до 1:25600. Высокие показатели титров антител свидетельствуют о высокой активности и чувствительности полученного нами антигена. При этом показатель ОП у всех больных собак превышал значение ОП отрицательного контроля в 2,6 и более раз.

Анализ данных таблиц 7-8 показал, что у всех больных животных с выраженными клиническими признаками микроспории выявляются высокие титры антител к возбудителю *M. canis* (1:400 и выше). Также следует заметить, что у клинически здоровых кошек с выявленными титрами 1:400 (см. таблицу 7), на 21-25 дни наблюдения отмечали проявления признаков дерматомикозов. Это свидетельствует об отражении текущего или раннего инфицирования животных и выявлении преинфекционных антител. Исходя из этого, считаем, что показатель титра антител 1:400 может быть установлен как диагностический при выявлении зараженных и при диагностике больных микроспорией животных в данном варианте ИФА.



Возможность выявления титров антител к возбудителю *M. canis* в разведении сывороток до 1:25600 с помощью растворимого белкового антигена, полученного по модифицированному методу Tabatabai L. (1979), указывает на высокую его активность, поэтому он может быть использован при постановке непрямого ИФА для диагностики микроспории у животных.

Схема постановки непрямого ИФА для выявления антител с помощью меченых антивидовых иммуноглобулинов приведена на рисунке 38.

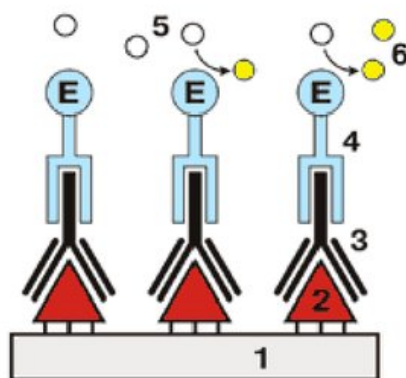


Рисунок 38 – Схема постановки непрямого ИФА для выявления антител (<https://ppt-online.org/620557>)

К адсорбированному на полистероловой планшете (1) антигену (2) добавляют исследуемую антителосодержащую сыворотку крови (3). После инкубации и удаления несвязавшихся антител вносят антивидовой конъюгат (4). После удаления избытка антивидового конъюгата (5) определяют концентрацию метки, связанной с твердой фазой с помощью субстрата для данного фермента. Содержание ферментного конъюгата на носителе, измеряемое после добавления субстрата (6), пропорционально концентрации специфических антител в исследуемом образце. Таким образом, разработанный непрямой вариант ИФА с растворимым антигеном обладает высокой активностью и чувствительностью.

Это позволяет рекомендовать его для использования в качестве диагностического теста в ветеринарной лабораторной практике.

## 2.2.10 Молекулярно-генетическая характеристика возбудителей дерматомикозов

Для подтверждения результатов видовой идентификации выделенных нами культур дерматомицетов по результатам изучения их культурально-морфологических, биохимических и кератинолитических свойств провели их исследование молекулярно-генетическими методами.

Выделение ДНК проводили по трем методам (методы А, В, С), отличающимся различным составом экстрагирующего буфера, рН и концентрацией реагентов. При сравнении результатов установлено, что оптимальный выход ДНК получен при использовании метода А (средняя концентрация ДНК – 586 нг/мл). При использовании метода В концентрация ДНК составляла в среднем – 503 нг/мл, метода С – 198 нг/мл. С учетом полученных результатов для дальнейшей работы по выделению ДНК из дерматомицетов использовали метод А.

В дальнейшем подбирали праймеры для идентификации дерматомицетов, основываясь на публикации отечественных и зарубежных авторов (таблица 9).

Таблица 9 – Последовательности олигонуклеотидных праймеров для ПЦР

№ п/п	Маркерный участок	Последовательность праймера	Источник
1	ITS4/ITS5	FTCCTCCGCTTATTGATATGC RGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	Schoch C. L. et al., 2012
2	ITS1/ITS4	F: TCCGTAGGTGAACCTGCGG R: TCCTCCGCTTATTGATATGC	White T.J. et al., 1990
3	SSU (NS1/NS4)	F: GTAGTCATATGCTTGTCTC R: CTTCCGTCAATTCCTTAAAG	White T.J. et al., 1990
4	26S (D1/D2)	F: CTTGGTCATTTAGAGGAAGTA R: GGTCCGTGTTTCAAGACGG	Мокроносова М.А. и соавт., 2012

После постановки ПЦР с использованием всех пар праймеров ITS4-ITS5, ITS1/ITS4, 26S (D1/D2), SSU (NS1/NS4) пробы ДНК очищали для секвенирования.

После расшифровки ДНК, результаты вносили в международную базу данных на сайте [www.ncbi.com](http://www.ncbi.com) с использованием BLAST и проводили сравнительный анализ полученных нами результатов с референтными последовательностями.

По результатам типирования с использованием праймеров ITS видно, что дерматомицеты идентифицированы до вида (рисунок 39, 40).

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Microsporium canis isolate M.c-3-Kz internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, co...	Microsporium canis	845	845	100%	0.0	100.00%	457	OQ592850.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Microsporium canis strain CBS 217.69 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene,...	Microsporium canis	832	832	100%	0.0	99.56%	624	KT155830.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Microsporium ferrugineum genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA and ITS2, strain: IFM 60499	Microsporium ferr...	833	833	99%	0.0	99.78%	669	AB663240.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Microsporium ferrugineum genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA and ITS2, strain: IFM 60479	Microsporium ferr...	833	833	99%	0.0	99.78%	691	AB663224.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Microsporium canis strain AUMC 14458 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene...	Microsporium canis	828	828	99%	0.0	99.56%	710	MT632048.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Microsporium canis strain AUMC 14221 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed...	Microsporium canis	828	828	99%	0.0	99.56%	720	MT632638.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Microsporium canis strain RCPF 1173 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, c...	Microsporium canis	828	828	99%	0.0	99.56%	612	MT534183.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Microsporium canis strain KU20019.59 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed s...	Microsporium canis	828	828	99%	0.0	99.56%	720	MT487850.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Microsporium canis strain KU20017.26 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed s...	Microsporium canis	828	828	99%	0.0	99.56%	735	MT487818.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Microsporium canis strain KU20017.25.2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed...	Microsporium canis	828	828	99%	0.0	99.56%	734	MT487817.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Microsporium canis strain KU20017.25.1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed...	Microsporium canis	828	828	99%	0.0	99.56%	737	MT487816.1

Рисунок 39 – Данные типирования дерматомицетов по праймеру ITS1/ITS4

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Microsporium canis isolate M.c-22-Kz internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, co...	Microsporium canis	948	948	100%	0.0	100.00%	513	OQ592896.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Microsporium canis strain AUMC 14458 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene...	Microsporium canis	933	933	100%	0.0	99.42%	710	MT632048.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Microsporium canis strain AUMC 14221 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed s...	Microsporium canis	933	933	100%	0.0	99.42%	720	MT632638.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Microsporium canis strain KU20019.59 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp...	Microsporium canis	933	933	100%	0.0	99.42%	720	MT487850.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Microsporium canis strain KU20017.26 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp...	Microsporium canis	933	933	100%	0.0	99.42%	735	MT487818.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Microsporium canis strain KU20017.25.2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed...	Microsporium canis	933	933	100%	0.0	99.42%	734	MT487817.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Microsporium canis strain KU20017.25.1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed...	Microsporium canis	933	933	100%	0.0	99.42%	737	MT487816.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Microsporium canis strain KU20017.24 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp...	Microsporium canis	933	933	100%	0.0	99.42%	740	MT487815.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Microsporium canis strain KU20017.21 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp...	Microsporium canis	933	933	100%	0.0	99.42%	732	MT487812.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Microsporium canis strain KU20017.20 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp...	Microsporium canis	933	933	100%	0.0	99.42%	732	MT487811.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Microsporium canis strain KU20017.19 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp...	Microsporium canis	933	933	100%	0.0	99.42%	735	MT487810.1

Рисунок 40 – Данные типирования дерматомицетов по праймеру ITS4/ITS5

По результатам типирования с использованием праймеров маркерного генома SSU видно, что дерматомицеты идентифицированы до генетически близких родов, семейств и родственных разновидностей грибов, чьи последовательности имеют сходство между собой (рисунок 41).

Результаты расшифровки нуклеотидной последовательности генотипированные по праймерам D1/D2 не дали сходства с референтными последовательностями на платформе BLAST (рисунок 42).

Согласно полученным результатам, представленным на рисунках 39-42, универсальные праймеры ITS1/ITS4 и ITS4/ITS5 позволили идентифицировать возбудителей при проведении молекулярно-генетических исследований.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Microsporium audouinii strain CBS 109478 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Microsporium au...</a>	1832	1832	98%	0.0	100.00%	1637	<a href="#">GU733362.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Nannizzia gypsea CBS 118893 18S ribosomal RNA (MGYG_10016)_rRNA</a>	<a href="#">Nannizzia gypse...</a>	1820	1820	100%	0.0	99.40%	1799	<a href="#">XR_001951136.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Microsporium canis strain BMU02865 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer...</a>	<a href="#">Microsporium canis</a>	1820	1820	98%	0.0	100.00%	2366	<a href="#">EF631606.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Microsporium canis strain ATCC 36299 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spac...</a>	<a href="#">Microsporium canis</a>	1820	1820	98%	0.0	100.00%	2366	<a href="#">EF631605.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Microsporium canis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Microsporium canis</a>	1818	1818	98%	0.0	100.00%	1648	<a href="#">AY083227.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Nannizzia incurvata gene for 18S rRNA, partial sequence, isolate S1477</a>	<a href="#">Nannizzia incurv...</a>	1816	1816	99%	0.0	99.40%	1686	<a href="#">AB015770.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Arthroderma uncinatum 18S ribosomal RNA (GIQ15_r0007)_rRNA</a>	<a href="#">Arthroderma un...</a>	1814	1814	100%	0.0	99.30%	1799	<a href="#">XR_004500576.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Arthroderma curreyi partial 18S rRNA gene, strain CBS 138_26</a>	<a href="#">Arthroderma cur...</a>	1812	1812	100%	0.0	99.30%	1697	<a href="#">AJ315165.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Arthroderma melbournense CBS 145858 18S rRNA gene, partial sequence, from TYPE material</a>	<a href="#">Arthroderma me...</a>	1807	1807	99%	0.0	99.50%	1620	<a href="#">NG_087872.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Trichophyton rubrum TWCC 57922 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and com...</a>	<a href="#">Trichophyton ru...</a>	1797	1797	100%	0.0	99.00%	3055	<a href="#">LC369522.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Nannizzia lorica strain ATCC 38556 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer...</a>	<a href="#">Nannizzia lorica</a>	1797	1797	98%	0.0	99.59%	2316	<a href="#">EF631613.1</a>

Рисунок 41 – Данные типирования дерматомицетов по праймеру NS1/NS4


<b>Query ID</b>	Icl Query_9811
<b>Description</b>	None
<b>Molecule type</b>	dna
<b>Query Length</b>	612
<b>Other reports</b>	<a href="#">?</a>
 No significant similarity found. For reasons why, <a href="#">click here</a>	

Рисунок 42 – Данные типирования дерматомицетов по праймеру D1/D2

Таким образом, нами были подобраны праймеры для генотипирования дерматомицетов в полимеразной цепной реакции.

Для предотвращения образования шлейфа и димеризации праймеров нами были отработаны температурные режимы отжига праймеров для каждого рода *Microsporium ssp.* и *Trichophyton ssp.* Так для *Microsporium ssp.* оптимальным режимом был температурный режим отжига – 59°C, а для *Trichophyton ssp.* – 57,5°C (приложение В).

На следующем этапе проводили постановку ПЦР с подобранными праймерами и отработанными параметрами температурного режима отжига праймеров. Результат анализа представлен в виде электрофореграммы (рисунок 43).

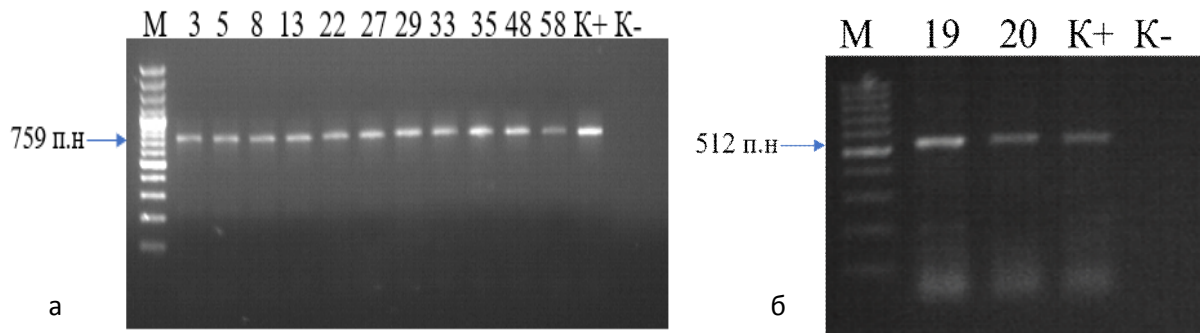


Рисунок 43 – Результат постановки ПЦР: а) *M. canis*; б) *T. benhamiae*

Анализ результатов, представленных на рисунке 43, показал, что отработанные параметры постановки ПЦР, позволяют получить ампликоны с молекулярной массой на уровне 759 пар нуклеотидов для ДНК, выделенной от *M. canis*, и на уровне 512 пар нуклеотидов – от *T. benhamiae*.

На следующем этапе ампликоны очищали и готовили для постановки мультилокусного сиквенс-типирования для расшифровки нуклеотидных последовательностей (приложение К).

Генетическую идентификацию возбудителей проводили по методу Сэнгера. Далее сравнивали полученные нуклеотидные последовательности с референтными последовательностями из международной базы данных NCBI. Расшифрованные нуклеотидные последовательности были депонированы в базе данных GenBank (приложение Л).

С целью изучения эволюционной связи между разными видами выявленных дерматомицетов, имеющих общего предка, дальнейшие исследования были проведены с помощью биоинформационного анализа.

### 2.2.11 Биоинформационный анализ геномов дерматомицетов

Эволюционный анализ геномов дерматомицетов проводили для выявления родства отдельных возбудителей дерматомикозов, выделенных и идентифицированных нами в ходе выполнения диссертационной работы.

Филогенетический анализ проводили в программе математического моделирования MEGA X с использованием ранее депонированных нами нуклеотидных

последовательностей.

Эволюционное родство штаммов, было выведено с использованием метода Neighbor-Joining (объединения соседей). Дерево построено в масштабе, показывающем эволюционное расстояние, соответствующее 14-ти заменам на каждые 100 нуклеотидов. Эволюционные расстояния были вычислены с использованием метода максимального составного правдоподобия и выражены в единицах количества замен оснований на сайт. Все неоднозначные позиции были удалены для каждой пары последовательностей (опция попарного удаления). В итоговом наборе данных было в общей сложности 1419 позиций.

Филогенетическое дерево, основанное на анализе структур фрагментов последовательности *ITS4F/ITS5R*, отражающие родственные связи дерматомицетов рода *Microsporum* и *Trichophyton*, показано на рисунке 44.

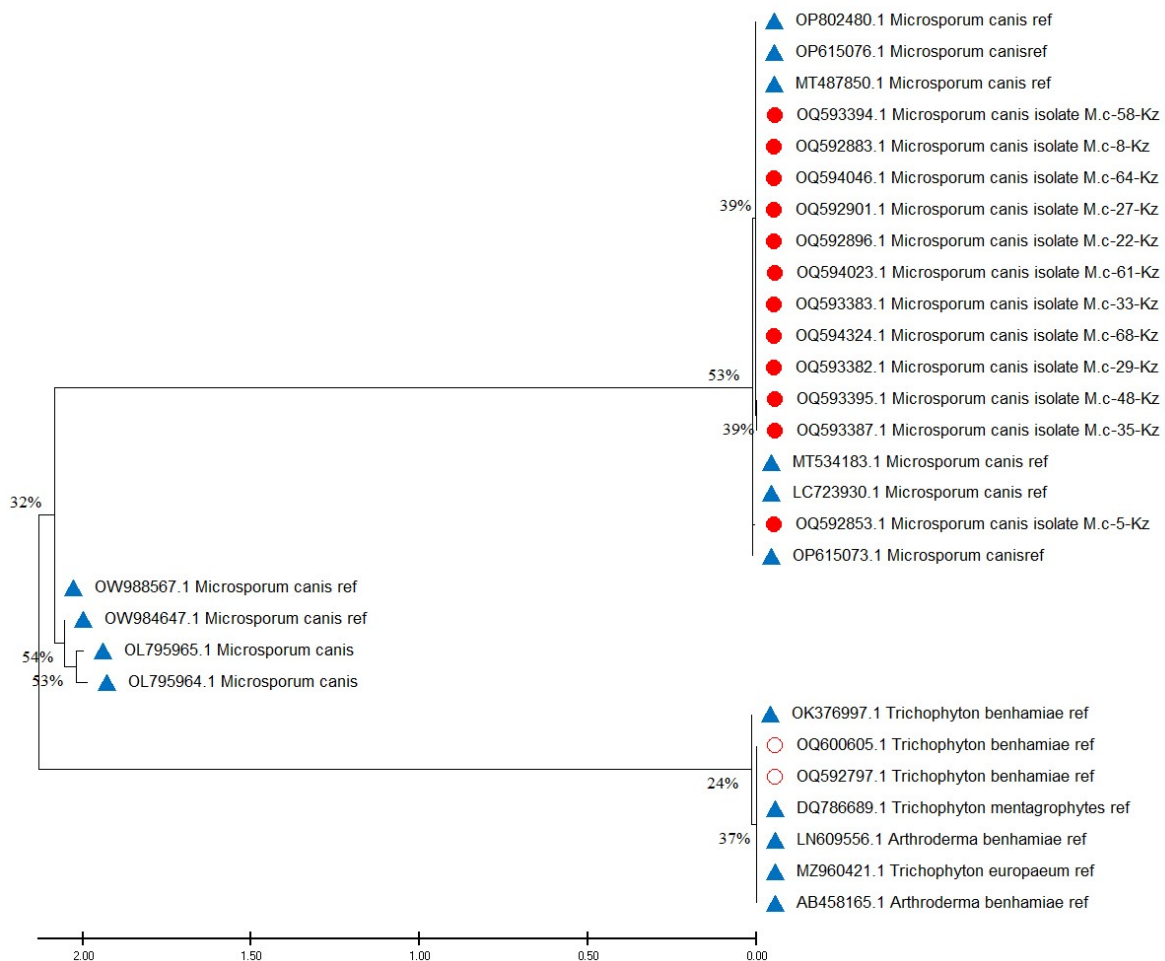


Рисунок 44 – Филогенетическое дерево, основанное на анализе структур фрагментов последовательности *ITS4F/ITS5R*

Представленный на рисунке 44 оптимальный вариант дерева построен в масштабе, показывающим эволюционное расстояние, соответствующее 200 заменам на каждые 100 нуклеотидных последовательностей. Анализ включал 29 нуклеотидных последовательностей (на рисунке *M. canis* выделены красными цветом, *T. benhamiae* – белым цветом). Включенные позиции кодонов были 1-м+2-м+3-м+некодирующими. Все неоднозначные позиции были удалены для каждой пары последовательностей (опция попарного удаления). В итоговом наборе данных было в общей сложности 1152 позиции. Эволюционный анализ был проведен в программе MEGA11.

Таким образом, эволюционное происхождение всех проанализированных нами штаммов *M. canis* имеет азиатские корни. Штаммы *T. benhamiae* эволюционно происходят от европейских предков.

Филогенетическое дерево, основанное на анализе структур фрагментов последовательности *ITS1F/ITS4R*, отражающие родственные связи дерматомицетов рода *Microsporum* и *Trichophyton* (наши последовательности отмечены красным кружочком), показано на рисунке 45.

Эволюционное дерево на рисунке 45 было получено путем применения метода соединения соседей к матрице попарных расстояний, эволюционным расстоянием, соответствующим 250 заменам на каждые 100 нуклеотидных последовательностей. В этом анализе участвовали 23 нуклеотидных последовательности (на рисунке 45 *M. canis* выделены красными цветом, *T. benhamiae* – зеленым цветом). Включенные позиции кодонов были 1-й+2-й+3-й+некодирующий. Всего в окончательном наборе данных было 1337 позиций.

Построение филогенетического дерева, основанное на отражении родственных связей дерматомицетов, показало, что независимо от использования разных пар праймеров возбудители рода *Microsporum* и *Trichophyton* во всех случаях достоверно распределены по разным кладам.

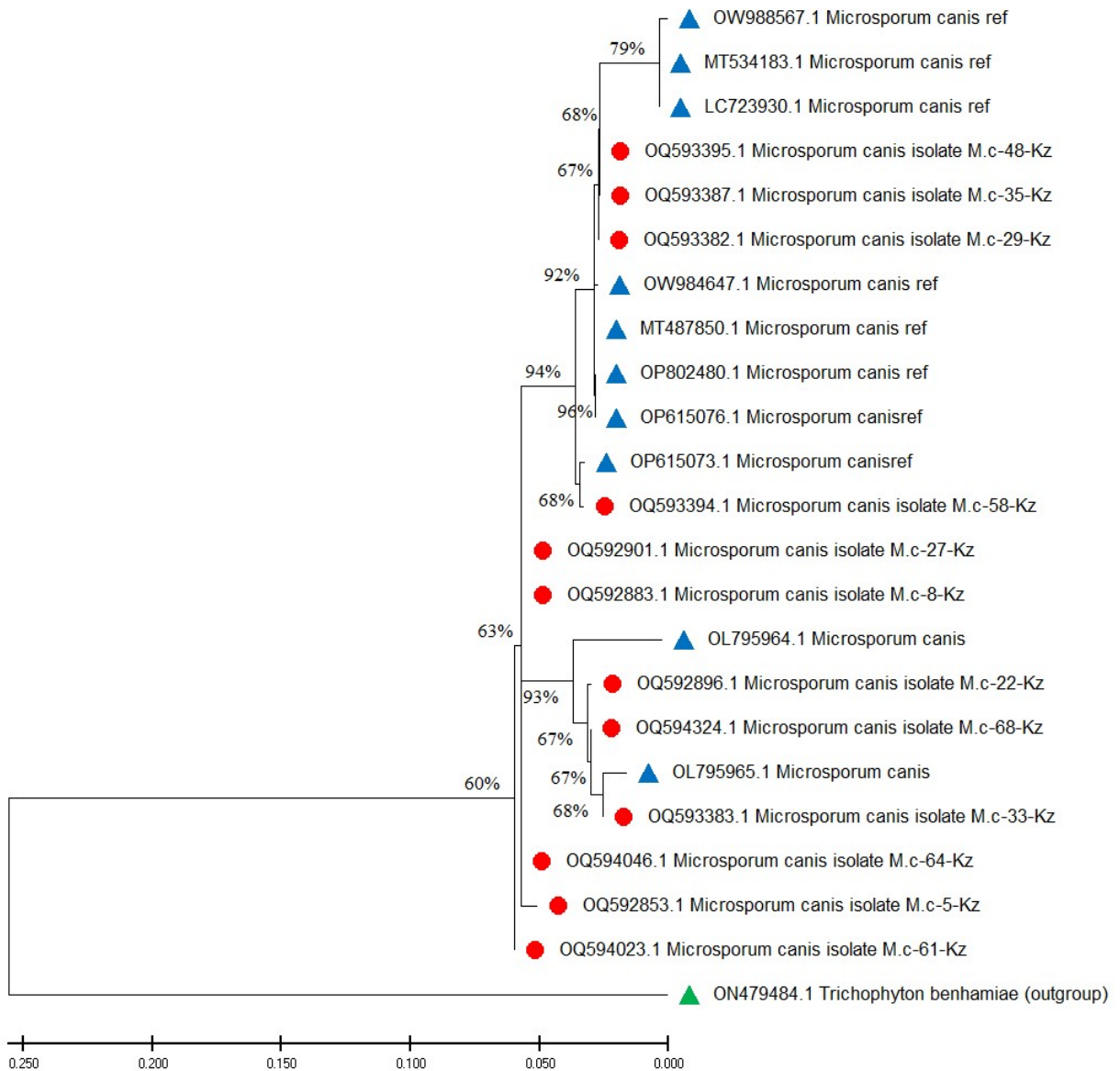


Рисунок 45 – Филогенетическое дерево, основанное на анализе структур фрагментов последовательности *ITS1F/ITS4R*, отражающие родственные связи дерматомицетов рода *Microsporium* и *Trichophyton*

Для сравнения релевантной последовательности рДНК межгенной области видов *M. canis* были подобраны последовательности из внешней группы исследуемых видов (рисунок 46).



OL795965.1	GAACCTGCGGAAGGATCATTAACGCGCAAGAGGTCGAAGTTGGCCCCCGAAGCTCTT
OL795964.1	GAA—CTGCGGAAGGATCA—TAACGCGCAAGAGGTCGAAGTTGG—CCCCGAAGCTCTT
LC723930.1	GAACCTGCGGAAGGATCATTAACGCGCAAGAGGTCGAAGTTGCCCCCGAAGCTCTT
MT487850.1	GAACCTGCGGAAGGATCATTAACGCGCAAGAGGTCGAAGCTGGCCCCCGAAGCTCTT
MT534183.1	GAACCTGCGGAAGGATCATTAACGCGCAAGAGGTCGAAGTTGGCCCCCGAAGCTCTT
OP615073.1	GAACCTGCGGAAGGATCATTAACGCGCAAGAGGTCGAAGTTGGCCCCCGAAGCTCTT
OP615076.1	GAACCTGCGGAAGGATCATTAACGCGCAAGAGGTCGAAGTTGGCCCCCGAAGCTCTT
OP802480.1	GAACCTGCGGAAGGATCATTAACGCGCAAGAGGTCGAAGTTGGCCCCCGAAGCTCTT
OW984647.1	GAACCTGCGGAAGGATCATTAACGCGCAAGAGGTCGAAGTTGGCCCCCGAAGCTCTT
OW988567.1	GAACCTGCGGAAGGATCATTAACGCGC—AGAGGTCGAAGTTGGCCCCCGAAGCTCTT
OQ594324.1*	GAA—CTGCGGAAGGATCATTAACGCGCAAGAGGTCGAAGTTGGCCCCCGAAGCTCTT

Рисунок 46 – Участки нуклеотидных последовательностей 5.8, 18, 28S рДНК межгенной области видов *M. canis*, содержащие нуклеотидные замены

На рисунке 46 виден высокий уровень гомологии последовательностей 5.8, 18, 28S рРНК межгенной области видов *M. canis*. Последовательности LC723930.1 и MT487850.1 имеют всего по одной нуклеотидной замене, что указывает на точечную мутацию. У OL795964.1 выявлены три мононуклеотидные вставки (т.е. полиморфизм). Наличие всего одной вставки выявлено у OW988567.1 и у последовательности казахстанского штамма OQ594324.1 (указано \*).

Аналогично сравнивали релевантные последовательности рДНК межгенной области видов *T. benhamiae* (рисунок 47).

DQ786689.1	CCCCCACGATAGG—GACCAACGTTCCGTCA—GGGGTGTGCAG—ATGTGCGCCGGC
NR 182327.1	CCCCCACGATAGG—GACCAACGTTCCGTCA—GGGGTGTGCAG—ATGTGCGCCGGC
MZ960421.1	CCCCCACGATAGG—GACCAACGTTCCGTCA—GGGGTGTGCAG—ATGTGCGCCGGC
OW986609.1	CCCCCACGATAGG—GACCAACGTTCCGTCA—GGGGTGTGCAG—ATGTGCGCCGGC
OP614985.1	—CCCCCACGATAGG—GACCAACGTTCCGTCA—GGGGTGTGCAG—ATGTGCGCCGGC
MK922519.1	—CCCCCACGATAGG—GACCAACGTTCCGTCA—GGGGTGTGCAG—ATGTGCGCCGGC
MK625725.1	—CCCCCACGATAGG—GACCAACGTTCCGTCA—GGGGTGTGCAG—ATGTGCGCCGGC
MF152781.1	CCCCCACGATAGG—GACCAACGTTCCGTCA—GGGGTGTGCAG—ATGTGCGCCGGC
LR794134.1	CCCCCACGATAGG—GACCAACGTTCCGTCA—GGGGTGTGCAG—ATGTGCGCCGGC
KT155967.1	CCCCCACGATAGG—GACCAACGTTCCGTCA—GGGGTGTGCAG—ATGTGCGCCGGC
OQ600605.1*	CCCCCACGATAGG—GACCAACGTTCCGTCA—GGGGTGTGCAG—ATGTGCGCCGGC
OQ592797.1*	—CCCCCACGATAGG—GAGACCAACGTTCCGTCA—GGGGTGTGCAG—TATGTGCGCCGGC
OK376997.1	CCCCCACGATAGG—AATCAACGTTCCATCA—GGGGTGTGCAG—ATGTGCGCCGGC
LN609556.1	CCCCCACGATAGG—GACCAACGTTCCGTCA—GGGGTGTGCAG—ATGTGCGCCGGC
AB458165.1	CCCCCACGATAGG—GACCAACGTTCCGTCA—GGGGTGTGCAG—ATGTGCGCCGGC
AB458188.1	CCCCCACGATAGG—GACCAACGTTCCGTCA—GGGGTGTGCAG—ATGTGCGCCGGC

Рисунок 47 – Участки нуклеотидных последовательностей 5.8, 18, 28S рДНК межгенной области видов *T. benhamiae*, содержащие нуклеотидные замены

Из рисунка 47 видно, что штамм *T. Benhamiae* №20 не содержит замен нуклеотидов полностью гомологичен референтным штаммам. В последовательности OQ592797.1 (указано \*) штамма *T. benhamiae* №19 имеются дополнительные нуклеотидные вставки, указывающие на полиморфизм. Точечные мутации также выявлены в последовательностях штаммов OP614985.1, MK922519.1, MK625725.1. Нуклеотидная последовательность штамма OK376997.1 имеет две замены, что также свидетельствует о точечных мутациях (выделено красным цветом). Для сравнения релевантной последовательности рДНК межгенной области видов *M. canis* были подобраны последовательности из внешней группы исследуемых видов (рисунок 48).

OW988573.1	GTCTCCCCCCCCGGGCCTCCCGGGGAGG-TTGCGGGCGGCGAGGGGTGCCTCCGGCCGC
OW987261.1	GTCT-CCCCCCCCGGGCCTCCCGGGGAGG-TTGCGGGCGGCGAGGGGTGCCTCCGGCCGC
OW985344.1	GTCT-CCCCCCCCGGGCCTCCCGGGGAGG-TTGCGGGCGGCGAGGGGTGCCTCCGGCCGC
OW984872.1	GTCT-CCCCCCCCGGGCCTCCCGGGGAGG-TTGCGGGCGGCGAGGGGTGCCTCCGGCCGC
OP802482.1	GTCT-CCCCCCCCGGGCCTCCCGGGGAGG-TTGCGGGCGGCGAGGGGTGCCTCCGGCCGC
OP802480.1	GTCT-CCCCCCCCGGGCCTCCCGGGGAGG-TTGCGGGCGGCGAGGGGTGCCTCCGGCCGC
OP227145.1	GTCT-CCCCCCCCGGGCCTCCCGGGGAGG-TTGCGGGCGGCGAGGGGTGCCTCCGGCCGC
OL795928.1	GTCT-CCCCCCCCGGGCCTCCCGGGGAGG-TTGCGGGCGGCGAGGGGTGCCTCCGGCCGC
MW767025.1	GTCT-CCCCCCCCGGGCCTCCCGGGGAGG-TTGCGGGCGGCGAGGGGTGCCTCCGGCCGC
ON527776.1*	--TCTCCCCCCCCGGGCCTCCCGGGGAGG-TTGCGGGCGGCGAGGGGTGCCTCCGGCCGC
LC623726.1	GTCT-CCCCCCCCGGGCCTCCCGGGGAGG-TTGCGGGCGGCGAGGGGTGCCTCCGGCCGC

Рисунок 48 – Участки нуклеотидных последовательностей 5.8, 18, 28S рДНК межгенной области видов *M. canis*, содержащие нуклеотидные замены

На рисунке 48 видно, что девять из одиннадцати представленных последовательностей, имеют единичный случай полиморфизма, одна последовательность имеет мутацию. Анализируемая нами последовательность (выделено звездочкой\*) имеет три нуклеотидные замены.

Сравнительный анализ релевантных последовательностей рДНК межгенной области видов *T. benhamiae* с помощью праймеров *ITS4F/ITS5R* показал следующее (рисунок 49).

На рисунке 49 видно, что все нуклеотидные последовательности штаммов *T. benhamiae* практически гомологичны. Три последовательности (MT261760.1, KU496914.1 и OK376997.1) имеют по одной мутации в каждой.

ON479484.1	TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAAATCAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTGGT
ON479483.1	TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAAATCAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTGGT
OK376997.1	TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAAATCAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTGGT
MT261760.1	TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAAATCAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTT <b>AG-</b>
MF152781.1	TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAAATCAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTGGT
LS444190.1	TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAAATCAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTGGT
LN874020.2	TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAAATCAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTGGT
LC388864.1	TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAAATCAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTGGT
KU496914.1	TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAAATCAGTTAAAACCTTTCAACAACGGAT <b>-TCTT<b>AG-T</b></b>
KU257463.1	TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAAATCAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTGGT
JN134088.1	TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAAATCAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTGGT
AB458165.1	TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAAATCAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTGGT

Рисунок 49 – Участки нуклеотидных последовательностей 5.8, 18, 28S рДНК межгенной области видов *T. benhamiae*, содержащие нуклеотидные замены

Две нуклеотидные вставки выявлены у штаммов *T. mentagrophytes* MT261760.1 и KU496914.1. Данные штаммы находятся в одной кладе, не являются представителями вида *T. benhamiae*, что достоверно повышает специфичность диагностического теста и позволяют дифференцировать представителей одного рода.

Штамм OK376997.1 является представителем вида *T. benhamiae*, выделенным от морской свинки. В сравнении с анализируемыми штаммами *T. benhamiae*, выделенными от кошек, нуклеотидные последовательности штамма OK376997.1 имеет одно отличие в виде точечной мутации. Однако, наличие точечной мутации не повлияло на результаты идентификации штаммов, которые отнесены к одному виду, хотя и относятся к разным кладям.

Таким образом, нами проведен эволюционный анализ геномов дерматомицетов для выявления родства отдельных возбудителей дерматомикозов. В ходе проведения исследования были подобраны пары праймеров, подобран температурный режим отжига для дерматомицетов рода *Microsporum* и *Trichophyton*, позволяющий с высокой точностью проводить видовую идентификацию. На основе полученных индивидуальных номеров нуклеотидных последовательностей были построены филогенетические деревья, определено эволюционное родство штаммов. Расшифрованные нуклеотидные последовательности в количестве 21 были депонированы в международной базе данных GenBank.

Исходя из полученных нами данных, следует отметить важность идентификации и дифференциации видов возбудителей дерматофитозов. Особенно актуальным это является для вида *T. benhamiae* – нового возбудителя дерматомикоза кошек, впервые выделенного на территории России.

### 3 ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Заболевания, вызываемые дерматомицетами, – дерматофитозы – распространены по всему миру, число случаев заражения ежегодно увеличивается не только у животных, но и у людей. Особое значение имеет распространение дерматофитозов среди мелких домашних животных – кошек и собак, являющихся компаньонами человека (С.П. Ковалева, 2014; А.С. Потоскуева, 2021; М.М. Ibrahim, 2023). Следовательно, микроспория и трихофития, как зооантропонозные инфекции, имеют, как экономическое, так и социальное значение. Знание особенностей биологии возбудителей, быстрая и высокоэффективная диагностика этих заболеваний позволят предотвратить распространение инфекции среди домашних животных и предупредить заражение людей.

От домашних питомцев в разное время выделялись возбудители дерматофитии (микроспория и трихофития), кандидоза и малассезиоза. *Microsporum canis* и *Trichophyton mentagrophytes* являются наиболее значимыми видами дерматофитов, выделенными от инфицированных собак, кошек и других плотоядных (В.П. Королева, 1976; E. Kidd Sarah, 2022). Однако, все же основным возбудителем дерматофитии кошек и собак был и остается *M. canis*. При этом частота дерматофитий у кошек вдвое выше, чем у собак (Ю.Ю. Устинцева, 2011; И.Д. Поляков, Л.Г. Иванова, 2017; В.А. Савинов, 2022).

О выделении *M. canis* от диких млекопитающих упоминается достаточно часто (Т.И. Глотова, 1998; Р.С. Овчинников, 2000; Т.Б. Тугунова, 2004; Е.В. Кухар, 2020). Описаны бессимптомные и клинически выраженные случаи дерматофитоза у нескольких видов диких псовых: дикой лисы (W. Knudtson, 1980), рыжей лисы (A. Malmasi, 2009), серого волка (O. Fischman, 1987), гривастого волка (K.N.N.P. Pereira, 2018). Гораздо чаще описываются случаи дерматофитоза у диких кошачьих животных: лев, пума, тигр, оцелот. При этом упоминается о выявлении возбудителя микроспории от диких или цирковых кошачьих животных, таких как тигры, львы, пантеры, ягуары и другие (K. Takatori, 1981; H.D.L. Ventubo, 2006; J.M. Sykes, 2007).

Полученные нами результаты показали, что для зоны Западной Сибири и Северного Казахстана дерматофитозы по-прежнему актуальны, особенно для кошек и собак (Т.И. Глотова, 2000; Н.А. Никитушкина, 2008; Е.В. Кухар, 2020).

В России и Казахстане изучению распространения дерматофитозов среди мелких домашних животных уделяется недостаточное внимание (Т.Б. Тугунова, 2004; Е.В. Кухар, 2016). Это обусловлено отсутствием государственной системы контроля распространения инфекции. Несмотря на то, что «Правила по профилактике и ликвидации дерматофитозов животных» предусматривают ведение отчетности, данные о заболеваемости, зачастую, не выходят за пределы ветеринарного пункта или лаборатории.

В последнее время в развитии методов диагностики дерматомикозов наметилась тенденция их стандартизации, попытки сделать их доступными для любой диагностической ветеринарной лаборатории. Разработаны питательные среды для ускоренной идентификации дерматофитов – *Dermatophyte Test Medium* (ДТМ), хромогенная питательная среда, предложены РСК для диагностики микроспории кошек и ПЦР для диагностики онихомикозов. Для выявления антител к дерматомицетам используют иммуноферментный анализ, реакцию латекс-агглютинации, иммунохроматографический анализ (Е.Н. Левченко, 2008; А.Ю. Сергеев, 2008; С. Greenacre, 2017; В.А. Савинов, 2022).

Диагностика дерматомикозов в настоящее время включает эпизоотологический анализ, клинические и лабораторные исследования. По мнению Савинова В.А. (2022), микологический посев остается «золотым стандартом» диагностики, который позволяет выделить культуру гриба и определить его вид. Данный метод имеет существенный недостаток – время получения результата, которое может составлять до 21 дня и более. Ряд авторов к трудностям лабораторной диагностики относят медленный рост возбудителей дерматомикозов, морфологическое сходство с другими грибами-дерматофитами (В.П. Королева, 1976; А.В. Горбатов, 1984; А.Ю. Ханис, 1989; Т.И. Глотова, 1998; Р.С. Овчинников, 2000; Т.Б. Тугунова, 2004; Устинцева Ю.Ю., 2011, И.Д. Поляков, Л.Г.Иванова, 2017; В.А. Савинов, 2022).

Как альтернатива микологическому посеву предложены серологические методы диагностики болезней и идентификации возбудителя. Серологическая диагностика дерматомикозов также затруднена, т.к. общепринятые серологические реакции (РА, РСК) при дерматомикозах не обладают высокой специфичностью, для их постановки необходимо иметь специфические антигены (Т.М. Кокушина, 1967, Е.Н. Левченко, 2008; Е.В. Кухар, 2010, А.Б. Кенжина, 2013, Е.В. Кухар, 2015). Нередко встречаются перекрестные неспецифические реакции, не позволяющие дать видовую характеристику возбудителя (G.L. Aruna, 2022).

Для более точной и достоверной диагностики микозов кожи в настоящее время предложено применение молекулярно-генетических методов, которые позволяют определить возбудителя за 2-3 дня, что значительно сокращает сроки диагностики и дает возможность назначить своевременное эффективное лечение.

Как видно из анализа литературы, грибковые заболевания занимают важное место в структуре всех кожных заболеваний мелких домашних и диких плотоядных животных. Несмотря на отсутствие клинических признаков болезни, миконотители представляют серьезную угрозу как источник заражения здоровых животных и человека (И.А. Голубев, 1970). Поэтому знание биологических особенностей развития дерматомицетов в коже разных видов животных, во внешней среде и в лабораторных условиях; совершенствование имеющихся средств и методов диагностики дерматомикозов; диагностика атипичных форм микроспории и выявление больных животных в короткие сроки, весьма актуальны.

В рамках выполнения диссертационной работы проанализированы пробы биоматериала от 198 домашних и диких животных, выделены различные возбудители микозов кожи. При этом, грибы рода *Trichophyton* spp. выявлены в 3,0%, *Microsporum* spp. – в 17,7%. Среди дерматомицетов основным возбудителем был *Microsporum* spp., что согласуется с публикациями (А.Ю. Ханис, 1989; Т.И. Глотова, 1998; Л.Г. Иванова, 2017; А.Д. Paryuni, 2020).

Выявленная сезонность распространения заболеваемости дерматомикозами у плотоядных животных по г. Астана. Рост заболевания отмечали в апреле и октябре, заметное снижение частоты случаев микроспории приходится на июль и

декабрь. Об ежегодном повышении уровня заболеваемости микроспорией кошек в весенне-осенние сезоны сообщали (Т.Б. Тугунова, 2004; Н.А. Никитушкина, 2008).

В тоже время была установлена тенденция на изменение спектра возбудителей микозов кожи, как среди домашних, так и среди диких плотоядных животных. Об этой же проблеме сообщали другие авторы. При этом преобладающими возбудителями микозов у домашних животных все чаще становятся оппортунистические плесневых грибы (R. Ovchinnikov, 2014; В.А. Савинов, 2020; Г.Е. Байлина, 2021). В нашем случае плесневые грибы были выявлены в 30,3% случаев. Основными возбудителями были *Mucor spp.*, *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Alternaria spp.*. Оппортунистические дрожжи *Candida spp.*, *Rhodotorula spp.*, *Exophiala spp.* выявлены всего в 1,5% случаев. В остальных случаях рост микромицетов либо отсутствовал (31,2%), либо наблюдался рост бактериальной флоры (16,3%). Наши данные согласуются с данными зарубежных ученых, которые также заявляли об изменении спектра возбудителей у животных, в том числе у домашних (М.С. Fisher, 2012; D. Elad, 2018; S. Seyedmousavi, 2018).

До недавнего времени диагностика дерматофитозов основывалась на анализе клинических признаков заболевания, которые ненадежны из-за изменчивого характера дерматологических поражений и сходства с другими кожными заболеваниями, имитирующими симптомы, характерные для дерматофитозов (R.S.N. Brillhante, 2003). Прямое микроскопическое исследование проб биологического материала, отобранных из очагов поражений, и изолирование культур дерматофитов на питательных средах являются золотым стандартом диагностики дерматофитозов. Однако в некоторых случаях для видовой идентификации может потребоваться дополнительное изучение биохимических свойств выделенных культур дерматофитов. Поэтому видовой идентификация дерматофитов на основе изучения фенотипических свойств является трудоемким процессом, требующим больших затрат времени и высокой квалификации исследователей (Н.Н. Потеев, 2013).

Проведение микологического посева позволило выделить 26 штаммов



*M. canis* от кошек, 8 штаммов – от собак, 1 штамм – от тигра. Лабораторные исследования в некоторых случаях позволили сразу уточнить предварительный диагноз и диагностировать различные формы микроспории плотоядных. В ряде случаев диагноз дерматомикоз домашних и диких плотоядных, который изначально ставился специалистами ветклиник как микроспория, вызванная *M. canis*, оказался ошибочным.

Как правило, при первичном выделении возбудителя из проб биоматериала от животных в чашке Петри наблюдают рост одной или нескольких колоний грибов, имеющих характерные видовые признаки. Характеристика штаммов *M. canis* при первичном выделении из проб биоматериала показала наличие характерных морфологических признаков: быстрая скорость роста, светло-бежевые колонии с пушистым мицелием на лицевой части, текстура – от шелковистой до грубо пушистой, зональность, радиальные борозды, таллом белого цвета, реверзум – темно-желтый. При микроскопии чистых культур в поле зрения просматривали однородный тонкий ровный септированный мицелий с хорошо заметным ветвлением и различными видоизменениями: бамбукообразный мицелий, ракетовидные утолщения, редкие грушевидные микроконидии.

Нами впервые выделены и идентифицированы два штамма *T. benhamiae*, возбудители оппортунистических микозов *Mucor* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp., *Candida* spp., *Rhodotorula* spp., *Exophiala* spp., представители Царства бактерий, которые нами не идентифицировались.

Полученные нами результаты подтверждают то, что основной проблемой изучения этиологии дерматофитозов является использование в качестве основного и, часто, единственного метода диагностики дерматофитозов прямой микроскопии (Н.П. Елинов, 2008). Как описано выше (п. 2.2.2) результаты NaOH микроскопии позволили выявить поражение волос, но не позволило определить вид возбудителя.

Ошибочными оказались также полученные нами результаты классического микологического посева, описанного в диссертационной работе в некоторых

спорных клинических случаях. Определение вида возбудителя только по морфологии культуры оказалось недостаточным. Только применение секвенирования, которое практически не используется в рутинной диагностике, позволило поставить правильный диагноз (А.Ю. Сергеев, 2008).

При фенотипической идентификации культур зоофильных штаммов *Microsporium* spp. достоверно установлено, что они являлись представителями данного рода, так как имели характерные видовые морфологические признаки – 5-7 сегментные макроконидии, как утверждают (И.А. Голубев, 1970; R.S. Brillhante et al., 2004). В то же время колонии разных штаммов *M. canis* характеризовались выраженным видовым полиморфизмом, возможно связанным с экологическими факторами, формой проявления и течением заболевания, самостоятельным лечением животных владельцами, что затрудняло классическую идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим характеристикам.

О наличии ошибок в диагностике дерматомикозов сообщается довольно часто (А.В. Горбатов, 1984; А.Ю. Ханис, 1989; Т.И. Глотова, 1998; Р.С. Овчинников, 2000; Т.Б. Тугунова, 2004; Ю.Ю. Устинцева, 2011; И.Д. Поляков, Л.Г. Иванова, 2017). Не удалось избежать данной проблемы и нам. В ходе анализа биоматериала от кошек с предварительным диагнозом «микроспория», не подтвердилось присутствие *M. canis* в двух пробах. И хотя первичные культуры дерматомицетов по наличию характерных признаков сформированной колонии были охарактеризованы как *M. canis*, полное микологическое исследование биоматериала не подтвердило это. Отсутствие веретенообразных макроконидий и наличие завитков мицелия, а также ряд других признаков, позволило охарактеризовать штаммы как *Trichophyton* spp. Это было подтверждено при дальнейшем применении молекулярно-генетических методов исследования и последующего секвенирования выделенных культур грибов, которые были идентифицированы как *T. Benhamiae* (А.М. Смагулова, 2023)

*T. benhamiae* – зооантропонозный дерматофит. За последние 15 лет распространение дерматомицета значительно увеличилось во всем мире, включая Западную Европу. Появление данного возбудителя в Российской Федерации, вероятнее

всего, связано с завозом инфекции из соседних европейских либо азиатских стран (S. Drouot, 2009; K.A. Moriello, 2012; J. Tan, 2020; S. Ansari, 2021).

Чаще всего этот вид вызывает дерматофитозы у морских свинок, реже у животных других видов (S.H.M. Aljabre 2011; C. Kupsch, 2017; A. Štoková, 2020). В доступной литературе отсутствуют сведения о выделении *T. benhamiae* от кошек в России (В.А. Савинов, 2020). В течение последнего десятилетия *T. benhamiae* включен в состав перечня представителей комплекса *T. mentagrophytes* под названием *Trichophyton spp.* либо *Arthroderma benhamiae* (U. Sieklucki, 2014). Благодаря анализу последовательности *ITS-rDNA* региона, *T. benhamiae* как самостоятельный вид включен в новую предложенную таксономию дерматофитов (A. Peano, 2022).

При изучении ферментативной активности штаммов дерматомицета *T. benhamiae* на стандартных средах Гисса с сахарозой, глюкозой, лактозой, мальтозой и маннитом нами было установлено, что штаммы №19 и №20 обладают высокой активностью при расщеплении углеводов: мальтозы, сахарозы, глюкозы, слабо усваивает лактозу, не ферментируют маннит (А.М. Смагулова, 2023).

Штаммы *M. canis* имеют выраженную биохимическую активность, расщепляя мальтозу и сахарозу и в меньшей мере – глюкозу. Маннит и лактозу разлагают незначительно, при этом ряд штаммов не обладают наличием соответствующих ферментов. Аналогичные результаты получены Газисовой Л.Д. (2017). Очевидно, что штаммы *T. benhamiae* отличаются более выраженной сахаролитической и уреазной активностью, чем *M. canis*, что косвенно указывает на более высокую патогенность штаммов *T. benhamiae*.

При изучении кератиолитических свойств у дерматофитов выявлены характерные повреждения волоса, что свидетельствует о том, что у *T. benhamiae* ярко выражена ферментативная активность при расщеплении кератина волос и его принадлежность к комплексу *Trichophyton mentagrophytes* (А. Štoková, 2020). Штаммы дерматомицетов *M. canis* проявили выраженные кератиолитические свойства, причем поражения волос были более явными при проведении теста на перфорацию, чем в опыте с *T. benhamiae*. Полученные результаты дополняют

данные Štoková A. (2020) и Ajello L. (1967), которые писали о перфорации волос и образовании колышков под воздействием кератиназы *T. mentagrophytes* и *M. canis*.

Несмотря на использование широкого спектра системных противогрибковых препаратов, включая тербинафин, итраконазол, вориконазол и гризеофульвин, лечение дерматомикозов является сложной задачей, и нередко сообщается о неэффективности лечения (Gabal M. Abou, 1976). Дерматофиты в основном чувствительны к большинству противогрибковых препаратов, как в условиях *in vitro*, так и *in vivo* (Р.С. Овчинников, 2012, N. Kondori, 2013, Т. Yamada, 2017). Сообщалось о резистентности дерматофитов к тербинафину (Т.Б. Тугунова, 2003). В то же время известно о их способности в течение короткого срока приобретать резистентность к противогрибковым препаратам, что ведет к необходимости частой смены препаратов при проведении лечения (А.Ю. Сергеев, 2008).

Исследование чувствительности штаммов *T. mentagrophytes* и *M. canis* к противогрибковым препаратам позволило выявить, что *T. Benhamiae* и *M. canis* высокочувствительны к клотримазолу и кетоконазолу, менее чувствительны – к нистатину. При этом у всех штаммов чувствительность ко всем противогрибковым препаратам к исходу третьих суток снижается. Однако, по нашим данным штаммы *T. Benhamiae* показали высокую чувствительность к клотримазолу (А.М. Смагулова, 2023).

В дальнейшей работе нами изучены антигенные и иммуногенные свойства у штаммов дерматомицетов, выделенных от животных. Учитывая, что наличие агглютинирующих свойств приводит к склеиванию микробных клеток между собой с помощью специфических антител, то есть приводит к проявлению визуального эффекта агглютинации (Феофилова Е.П., 1983, Аравийский Р.А., 2006), это может быть использовано в разработке нового либо модификации известного агглютинирующего теста для диагностики микроспории плотоядных.

Для изучения антигенных и иммуногенных характеристик выделенных штаммов нами проведено глубинное культивирование штаммов *T. benhamiae* и *M. canis*, получена их биомасса, нативные и цветные корпускулярные антигены, а

также растворимые, преимущественно белковые, антигены дерматомицетов. О наличии агглютинирующих свойств у дерматомицетов и отработке реакции агглютинации для диагностики дерматомикозов сообщалось ранее (Е.В. Кухар, 2001; М.Г. Маноян, 2008; Е.В.Кухар, 2008). Наличие агглютинирующих свойств у всех нативных корпускулярных антигенов дерматомицетов было подтверждено нами капельной реакцией агглютинации (А.М. Смагулова, 2023).

Анализируя результаты исследований, выполненные согласно поставленным задачам, можно отметить, что цветные антигены, полученные нами для разработки диагностической экспресс роз бенгал пробы, обладают выраженной активностью и специфичностью, поэтому предлагаются к использованию для диагностики микроспории плотоядных. Их применение позволяет в течение минуты выявлять наличие агглютинирующих антител к цветным антигенам *T. benhamiae* и *M. canis* в модифицированной реакции по типу роз бенгал пробы в сыворотках крови, полученных от больных кошек. В некоторых случаях образование хлопьев агглютинации отмечали в течение первых 10-15 секунд после внесения компонентов реакции в лунки планшета (А. Несипбаева, 2022).

Выявленные ранее Акимбаевой А.Е. (2010) агглютинирующие свойства у белковых антигенов *T. rubrum*, полученных модифицированным методом по Tabatabai L. (1979), имеет большое значение. Нами изучено наличие агглютинации у растворимых белковых антигенов *M. canis* и *T. benhamiae*, которые были получены тем же способом с дополнительной предварительной обработкой мицелия раствором фенола перед непосредственным выделением белка. Полученные антигены использовали для постановки КРА и РМА. В результате исследований нами подтверждено, что белковые антигены обладают слабо выраженными агглютинирующими свойствами. Наличие агглютинирующих свойств у растворимых белковых антигенов были также описаны ранее Имановым А.Т. (2008), Кухар Е.В. (2010). Преципитирующие свойства выявлены только у одного антигена при постановке РИД, в которой регистрировали одну слабо выраженную линию преципитации. Сравнительный анализ полученных нами результатов показал существенное отличие от

результатов, полученных Maifrede S.B. (А.И. Дроздов, 1978), но сопоставимы с другими данными (Ю.А. Медведев, 1988).

Анализ иммуногенных свойств показал, что у мышей, иммунизированных растворимыми антигенами *T. Benhamiae* №19, вырабатываются специфические антитела, выявляемые при разведении сыворотки до 1:6400. У мышей, иммунизированных растворимым антигеном *T. benhamiae* №20, выявлены более низкие значения титров антител: 1:400 – 1:800. При этом, штамм *T. benhamiae* №19 проявил выраженные иммуногенные свойства, что вызвало образование специфических антител в ответ на введение растворимого антигена в более высоких титрах, чем антиген штамма *T. benhamiae* №20. Результаты иммунизации мышей растворимыми антигенами из штаммов *M. canis* свидетельствуют о том, что иммуногенными свойствами обладали два штамма № 26 и №68.

Для обнаружения специфических антител в сыворотке крови используют следующие серологические реакции: агглютинации, преципитации, связывания комплемента, иммунофлюоресценции с соответствующими антигенами. Однако широкого применения в практической ветеринарии эти реакции не получили. Реакция связывания комплемента при диагностике дерматомикозов отличается достаточной чувствительностью и специфичностью, однако сложна в постановке и нередко сопровождается проявлением феномена антикомплемментарности (П.И. Левченко, 1978). Реакция преципитации не отличается достаточной специфичностью (А.Б. Каркенова, 2014). Посредством реакции агглютинации положительные показания улавливаются в период появления клинических признаков и через один – два месяца после инфицирования животных. Результаты серологических реакций нередко бывают сомнительными вследствие перекрестного реагирования с антигенами различных грибов. Тем не менее, выявление антител позволяет установить диагноз до получения результатов микологических исследований проб биоматериала, отобранных от больных животных.

В настоящее время разработаны оптимальные условия и техника постановки твердофазного ИФА для диагностики различных грибковых инфекций у людей, животных и растений. Имеются публикации по апробации иммунофермент-

ного анализа для выявления антител к возбудителям трихофитии и микроспории в сыворотках крови людей и разработки тест-системы для дифференциации возбудителя (Е.В. Кухар, А.К. Акимбаева, В.С. Киян, 2010; А.Б. Каркенова, 2014).

Успешно применяется непрямой вариант иммуноферментного анализа с использованием поликлональных (гипериммунных) сывороток в диагностике дерматомикозов кроликов, разработанный Zrimšek P. (1999). ИФА выявляет *IgG* к *T. mentagrophytes* у иммунизированных кроликов 5-, 7- и 11-недельного возраста, и обладает высокой чувствительностью и специфичностью (P. Zrimšek, 1999).

Непрямой вариант ИФА для диагностики трихофитии крупного рогатого скота позволяет выявить специфические антитела у животных в инкубационный период, что позволяет его использовать для ранней диагностики трихофитии у зараженных животных (С.З. Ескендинова, 2006; А.Т. Иманов, 2008).

В ходе отработки параметров постановки непрямого варианта ИФА для диагностики микроспории у домашних и диких животных с полученным нами растворимым антигеном *M. canis* подбирали оптимальную концентрацию антигена, время и условия сенсibilизации носителя, определяли диагностический титр. В качестве исследуемых сывороток использовали сыворотки крови мышей, иммунизированных антигеном *M. canis*, больных и здоровых кошек, собак.

Принцип предлагаемого нами варианта ИФА основан на взаимодействии растворимого антигена *M. canis*, адсорбированного на поверхности полистироловых планшетов, с антителами в сыворотках крови животных, с последующим выявлением специфического комплекса с помощью антивидовых антител, меченных пероксидазой хрена. Разработанный непрямой вариант ИФА с растворимым антигеном обладает высокой чувствительностью, что позволяет выявлять титры специфических антител в разведении сывороток до 1:6400-1:25600. Аналогичные титры антител были выявлены при проведении длительной гипериммунизации в сыворотках крови телят (Е.В. Кухар, 2010). Это указывает на высокую чувствительность разработанного нами метода. Полученные результаты позволяют рекомендовать разработанный непрямой вариант иммуноферментного анализа с рас-

творимым антигеном *M. canis* в качестве диагностического теста в ветеринарной лабораторной практике для постановки диагноза на микроспорию плотоядных.

В большинстве исследований, связанных с видовой идентификацией возбудителей, применяют не только культурально-морфологические, но и молекулярные методы (Y. Graser 1998; D. Liu, 2000; R. Chermette, 2008). Молекулярные методы являются перспективными для прямого обнаружения ДНК грибов в клинических образцах и их видовой идентификации (Sarah E. Kidd, 2022).

В настоящее время методы, основанные на определении нуклеотидных последовательностей рибосомальных генов, используются для видовой идентификации дерматофитов в разных странах (S. Normansdorfer, 1995; Т.Б. Тугунова, 2003; А.Ю. Сергеев, 2008; С.Л. Alexander, 2011; P. Nenoff, 2014). Результаты полностью либо частично секвенированных генов рРНК различных видов микроорганизмов поступают в международные базы данных и используются в качестве референтных. Сравнение последовательностей генов и отдельных участков генов, кодирующих рибосомальные РНК способствуют выявлению родственных связей между дерматофитами (А.Ю. Сергеев, 2008; Е.В. Кухар. 2020; F. Vaert, 2020).

Применение метода мультилокусного микросателлитного типирования было использовано для изучения путей распространения и передачи *M. canis* в Японии (К. Makimura, 1999). Результаты изучения распространенности *M. canis* среди кошек, собак и людей с помощью молекулярно-генетического типирования с применением прямого (*ITS1* 5'-TC CGTAGGTGAACCTGCGG-3') и обратного (*ITS4* 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') праймеров показало, что домашние и уличные животные, а также кошки и собаки с симптомами или без симптомов заболевания являются основными источниками дерматофитов для человека (Т.Т. White, 1990). Применение молекулярных методов позволило установить этиологическую структуру дерматофитозов в Иране, которая была представлена следующими видами: *M. canis* – 78,5%, *M. gypseum* – 10,7% и *T. mentagrophytes* – 10,7% (S. Colombo, 2010).

При проведении молекулярно-генетических исследований были подобраны специфичные праймеры для генотипирования дерматомицетов в полимеразной



цепной реакции. Согласно полученным результатам, для дальнейшего генотипирования возбудителей нами предлагается использование пары праймеров ITS1/ITS4, так как при их использовании выше процент идентичности при меньшем количестве пар нуклеотидов (T.J. White, 1990; C.L. Schoch, 2012). Праймеры SSU (NS1/NS4) позволяют идентифицировать возбудителей только до рода или семейства, что не позволяет идентифицировать возбудителя со 100% достоверностью (T.J. White, 1990). Праймеры D1/D2 оказались не пригодны для генетической идентификации дерматомицетов, вероятно потому, это изначально были предложены для идентификации дрожжей и дрожжеподобных грибов (М.А. Мокроносова и соавт., 2012).

Для предотвращения образования шлейфа и димеризации праймеров нами были отработаны температурные режимы отжига праймеров для каждого рода *Microsporum ssp.* и *Trichophyton ssp.* Так для *Microsporum ssp.* оптимальным режимом был температурный режим отжига – 59°C, а для *Trichophyton ssp.* – 57,5°C. С подобранными праймерами и отработанными параметрами температурного режима отжига праймеров проводили постановку ПЦР. В результате установлено, что отработанные параметры постановки ПЦР, позволяют получить ампликоны с молекулярной массой на уровне 759 пар нуклеотидов у ДНК для *M. canis*, и на уровне 512 пар для *T. benhamiae*. Проведенное мультилокусное сиквенс-типирование для расшифровки нуклеотидных последовательностей по методу Сэнгера позволило идентифицировать полученные нуклеотидные последовательности с референтными последовательностями на платформе BLAST международной базы данных NCBI и депонировать их в GeneBank. Аналогичным способом проводили генотипирование другие авторы, которым удалось получить достоверные результаты с 95-98% совпадением (U. Kimura, 2015).

На основе полученных индивидуальных номеров нуклеотидных последовательностей были построены филогенетические деревья, определено эволюционное родство штаммов. Построение филогенетического дерева, основанное на отражении родственных связей дерматомицетов, показало, что независимо от использования разных пар праймеров возбудители рода *Microsporum* и *Trichophyton*

во всех случаях достоверно распределены по разнымкладам. Анализ структур фрагментов последовательности *ITS4F/ITS5R* позволил выявить генетическое родство двух штаммов *T. benhamiae*, впервые выделенных нами от кошек на территории России, с российским штаммом, выделенным от морской свинки (В.А. Савинов, 2022). О выделении *T. benhamiae* от кошек на территории других стран сообщали Normansdorfer S., 1995; Сергеев А.Ю. 2008; Alexander C.L., 2011; Nenoff P., 2014. Идентификация возбудителей стала возможной благодаря применению молекулярно-генетических методов (A.D. Paryuni, 2020).

Полученные нами результаты позволили на 98-99% идентифицировать выделенные штаммы грибов и сравнить их с референтными нуклеотидными последовательностями (А.М. Смагулова, 2021, 2023). Считаем, что отсутствие 100% гомологии нуклеотидных последовательностей у отдельных штаммов может свидетельствовать об изменении качественных характеристик дерматомицетов, например, ферментативной активности, степени патогенности, вирулентности. Это требует дальнейших исследований генома (V. Hubka, 2020; A. Peano, 2022).

Выявленное сходство нуклеотидных последовательностей в сравнительном аспекте с референтными штаммами указывает на достоверность полученных результатов и возможность применения молекулярной диагностики для постановки диагноза на дерматомикозы.

## 4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### 4.1 ВЫВОДЫ

1. В результате проведенных микологических исследований 198 проб биоматериала от домашних и диких животных из 3,0% проб выделены грибы рода *Trichophyton* spp., а из 17,7% – *Microsporum* spp. Из 28,8% проб биоматериала выделены оппортунистические плесневые грибы (*Mucorspp.*, *Penicillium*spp., *Aspergillus*spp., *Alternariaspp.*); из 1,5% – дрожжеподобные грибы (*Candidaspp.*, *Rhodotorulaspp.*, *Exophialaspp.*). Из 31,2% проб биоматериала микромицеты не выделены, а из 16,3% – изолированы бактерии.

2. Изучение культурально-морфологических свойств возбудителей дерматофитозов выявило у них характерные видовые особенности и разнообразие фенотипических признаков. Основным отличием *T. benhamiae* и *M. canis* является характер роста колоний на питательных средах, окраска реверзума, характер накопления и цвет пигмента, особенность морфологических микроструктур. Установлено, что дерматофитии, вызванные *T. benhamiae* и *M. canis* у плотоядных могут иметь схожие клинические признаки, что затрудняет диагностику заболевания.

3. Впервые на территории Западной Сибири выделен, идентифицирован и описан новый вид дерматофитов – *T. benhamiae*, как возбудитель дерматофитии кошек. Изучены его культурально-морфологические, биохимические, антигенные и молекулярно-генетические свойства.

4. Выявлена резистентность штаммов *T. benhamiae* и *M. canis* к противогрибковым препаратам. 90% штаммов грибов были устойчивыми к амфотерицину и флуконазолу, большинство – слабочувствительны к нистатину. Для лечения дерматофитии кошек и собак, вызванной *T. Benhamiae*, следует использовать препараты, относящиеся к азоловой группе: клотримазол и кетоконазол.

5. Получены растворимые преимущественно белковые антигены с концентрацией белка 0,125 мг/мл, корпускулярные нативные и цветные антигены с концентрацией белка в среднем 0,09 мг/мл. Они обладают выраженной иммуногенностью, проявляют активность в непрямом варианте ИФА, позволяют выявлять тит-

ры специфических антител в пробах сыворотки крови переболевших и иммунизированных животных в разведениях от 1:200 до 1:6400.

6. Корпускулярные и растворимые антигены дерматомицетов обладают выраженными агглютинирующими и слабыми преципитирующими свойствами. Наличие агглютинирующих свойств подтверждено капельной реакцией агглютинации и при постановке модифицированной роз бенгал пробы. Преципитирующие свойства выявлены только у антигенов *T. benhamiae* №19 при постановке РИД.

7. Генетическая идентификация возбудителей по методу Сэнгера со сравнительным анализом полученных нуклеотидных последовательностей с референтными последовательностями дерматомицетов из базы данных NCBI позволила идентифицировать их до вида. Нуклеотидные последовательности выделенных нами штаммов *M. canis* и *T. benhamiae* депонированы в базу данных GenBank.

8. Сравнительный анализ геномов грибов рода *Microsporum* и *Trichophyton* с референтными штаммами установил невысокий уровень внутривидового полиморфизма и точечных мутаций нуклеотидных последовательностей генов 5.8, 18, 28S рРНК ITS-области, которые можно использовать для выявления дерматомицетов родов *Trichophyton* и *Microsporum* в пробах биоматериала.

#### 4.2 ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Депонированные штаммы дерматомицетов *M. canis* и депонированные в GenBank их нуклеотидные последовательности рекомендуются в качестве референтных при идентификации возбудителей дерматомикозов.

2. Цветные корпускулярные антигены *M. canis* могут быть использованы в качестве компонента в модифицированной реакции по типу роз бенгал пробы для экспресса диагностики микроспории плотоядных.

3. Непрямой вариант ИФА с использованием в качестве специфического компонента растворимого белкового антигена *M. canis* рекомендуется использовать для серологической диагностики микроспории плотоядных.

4. Отработанный протокол постановки ПЦР предлагается для молекулярно-генетической диагностики *T. benhamiae* и *M. canis*.

5. Разработаны «Методические рекомендации по выделению и идентификации *Trichophyton benhamiae* – возбудителя дерматомикозов кошек», утвержденные ученым советом СФНЦА РАН протокол №1 от 16.02.2023.

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АГ	–	антигены
АТ	–	антитела
BSA	–	бычий сывороточный альбумин
ВОЗ	–	Всемирная организация здравоохранения
ДМСО	–	диметилсульфоксид
ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
ЗФР	–	забуференный физиологический раствор
ЗФР-Тв	–	забуференный физиологический раствор с 0,05% твином-20
ИФА	–	иммуноферментный анализ
ЛТФ	–	лиофилизированный вакцинный штамм гриба <i>T. faviforme</i>
НАФ	–	неполный адъювант Фрейнда
ПАФ	–	полный адъювант Фрейнда
ПЦР (PCR)	–	полимеразная цепная реакция
РА	–	реакция агглютинации
РП	–	реакция преципитации
ФСБ	–	фосфатно-солевой буфер
атм.	–	атмосфера
г	–	грамм
имп/мин	–	количество импульсов в минуту
кг	–	килограмм
кДа	–	килодальтон
кл/мл	–	количество клеток в миллилитре
М	–	молярность раствора
мг	–	миллиграмм
мкг	–	микрограмм
мл	–	миллилитр
мкл	–	микролитр
мм	–	миллиметр
нм	–	нанометр
об/мин	–	количество оборотов в минуту
pH	–	водородный показатель
тыс.	–	тысяча
°C	–	градус Цельсия
Ig	–	иммуноглобулины
M.	–	<i>Microsporium</i>
spp.	–	представители рода
T.	–	<i>Trichophyton</i>
EDTA	–	ethylene diamine tetraacetic acid
СТАВ	–	cetrimethylammonium bromide
SDS	–	sodium dodecyl sulfate

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Аимбаева, А.К. Разработка иммуноферментной тест-системы на основе моноклональных антител для диагностики рубромикоза: автореф. дис. ... канд. биол. наук / А.К. Акимбаева. – Астана, 2010. – 34. – С. 139.
2. Акимбаева, А.К. Отработка параметров постановки иммуноферментного анализа с использованием моноклональных антител для диагностики рубромикоза / А.К. Акимбаева, К.К. Муканов, Е.В. Кухар // Биотехнология. Теория и практика. Астана. – 2009. – №3. – С. 79-84.
3. Андриасян, С.Т. Эпидемиологические особенности зооантропонозной микроспории, вызванной *M. canis* /С.Т. Андриасян // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. –1978. – №10. – С 14-20.
4. Андриюшин, В.В. Возрастная восприимчивость лошадей к микроспории // В.В. Андриюшин / Бюлл. ВИЭВ. – 1978. – Вып.32. – С. 38.
5. Аравийский, Р.А. Диагностика микозов / Р.А. Аравийский, Н.Н. Климко, Н.В. Васильева // – СПб.: Изд. дом СПбМАПО. – 2006. – С. 8-77.
6. Ариевич, А.М. О микроспории у детей / А.М. Ариевич, А.С. Обухова, В.Е.Зисерман // Педиатрия. – 1974. – №10. – С.55-56.
7. Байлина, Г.Е. Спектр оппортунистических возбудителей микозов кожи лошадей Акмолинской области / Г.Е. Байлина, Е.В. Кухар // Мат. Межд. научно – теорет. Конф. «Сейфуллинские чтения – 17: – Астана. – 2021. – Т.1, Ч.1 – С. 329-330.
8. Бакулов, И.А. Эпизоотология с микробиологией / И.А Бакулов, В.А Ведерников, А.Л Семенихин // – М. – 1997.– С 481.
9. Беляков, И.М. Болезни собак / И.М. Беляков, В.А. Лукьяновский // – М. – 1998. – С 347.
10. Билай, В.И. Методы экспериментальной микологии / В.И. Билай // Справочник. К.: Наукова думка, – 1982. – С. 502.
11. Борисов, Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология / Л.Б. Борисов, А.М. Смирнова, И.С. Фрейндлин. и др // – М. – 1994. – С 528.
12. Бухтоярова, И.И. Структура и динамика заболеваемости у детей по дан-

ным поликлиники / И.И. Бухтоярова, К.Ф. Фомин // Вестник дерматологии. – 1973. – №6. – С. 50-53.

13. Воробьев, А.А. Современное состояние и перспективы совершенствования иммуноферментного анализа для решения задач клинической диагностики / А.А. Воробьев, И.В. Виха // ЖМЭИ. – 1987. – № 9. – С. 3-8.

14. Газисова, Л.Д. Подбор и характеристика штаммов-продуцентов для глубокого культивирования / Л.Д. Газисова //Мат. Респ. научно-теорет. конф. «Сейфуллинские чтения – 13. – 2017. – Т.II, Ч.4. – С.368-371

15. Гаскелл, Р.М. Справочник по инфекционным болезням собак и кошек /Р.М. Гаскелл, М. Беннет // – М. – 2000. – С 224.

16. Генис, А.И. Собака и заразные болезни человека / А.И. Генис // – Медгиз, М. –1963.– С.32.

17. Глотова, Т.И. Дерматомикозы мелких домашних животных: распространение, клиническое проявление, диагностика / Т.И. Глотова // Сб. науч. тр./РАСХН. Сиб. отд-ние. ИЭВСиДВ.–Новосибирск, –2000.– С.259-261.

18. Глотова, Т.И. Дерматомикозы собак и кошек в условиях города / Т.И. Глотова // Ветеринария.–1998.– №1.– С.32-36.

19. Глотова, Т.И. Вспышка микроспории у домашних кошек /Т.И. Глотова // Ветеринария. – 1997. – №11. – С.47-50.

20. Глотова, Т.И. Лабораторная диагностика дерматомикозов собак и кошек /Т.И. Глотова, Т.Б. Тугунова, Н.Е. Панова// Методические рекомендации. – Новосибирск, 2002. –20 с.

21. Головина, Н.П. Роль возбудителей дерматофитозов при дерматитах собак и кошек / Н.П.Головина, Ч.П. Колодиев // Ветеринария. – 1999. – № 1. – С.51-54.

22. Голубев, И.А. Дерматомикозы животных / И.А. Голубев // – М.: Колос. – 1970. – С. 5-7, 84-92.

23. Горбатов, А.В. Дерматофитозы мелких домашних животных: автореф. дис... канд. ветеринар. наук / А.В. Горбатов. – Москва, 1984.– С. 22.

24. Гордиенко, Л.Н. Этиологическая структура дерматитов у мелких до-



машних животных в условиях Сибири / Л.Н. Гордиенко // Мат. восьмого межд. конгр. по проблемам ветеринарной медицины мелких домашних животных. М.: 2007. - С. 86-87.

25. Гракович, Р.И. Основные факторы эпидемических подъемов заболеваемости микроспорией, обусловленной *M. canis* / Р.И.Гракович // Вестник дерматологии и венерологии.– 1979.–№1.– С.53-57.

26. Де Хога, Г.С. Атлас клинических грибов, 2-е издание / Г.С. Де Хога // Центральное бюро по шиммелькультурам (CBS). – 2000. – С. 159.

27. Демидов, Н.В. Собаки и кошки в быту / Н.В. Демидов //– М.: Медгиз, – 1959.– 63 с.

28. Дудка, И.А. Методы экспериментальной микологии / И.А.Дудка, С.П. Вассер, И.А. Эланская // Справочник. К.:Наукова думка, –1982. – 55 с.

29. Егоров, М.Н. Динамика возбудителей микозов волосистой части головы в Удмурдской АССР (1959-1968) / М.Н.Егоров //Вестник дерматологии и венерологии.–1970.– №12.– С. 42-45.

30. Егорова, Т.А. Основы биотехнологии / Т.А.Егорова, С.М.Клунова, Е.А. Живухина // Уч. пособие. – М.: Академия, – 2003. – С. 72-102.

31. Елинов, Н.П. Дерматомикозы или поверхностные микозы кожи и её придатков – волос и ногтей. Лабораторная диагностика /Н.П.Елинов, Н.В.Васильева, К.И. Разнатовский // Пробл. мед. микологии. – СПб., –2008. – Т.10, №1. – С. 27-34.

32. Ескендинова, С.З. Отработка параметров постановки иммуноферментного анализа для диагностики дерматомикозов. / С.З. Ескендинова, Е.В. Кухар // Мат. IV межд. науч.-практ. конф. молодых ученых «Современные тенденции развития аграрной науки в России», посв. 70-лет. НГАУ. –Новосибирск. –2006, – С. 193-195.

33. Иванова, Л.Г. Систематика, морфологическая характеристика и биологические свойства возбудителей дерматофитов, общих для животных и человека / Л.Г. Иванова // автореф... доктор биол. наук. – М., –1992. – С. 3-15.

34. Иванова, Ю.А. Клинико-микологический профиль поверхностных мико-

зов в Алтайском краевом кожно-венерологическом диспансере / Ю.А.Иванова, О.В.Райденко // Проблемы медицинской микологии. – Т.14. – 2012. – № 3. – 38 с.

35. Иманов, А.Т. Выявление агглютинирующих антител к дерматофитам в реакции микроагглютинации / А.Т. Иманов // Мат. Респ. научно-теор. конф. «Сейфуллинские чтения – 4» – Астана. – Т.1.–2008. – С. 117-118.

36. Караев, З.О. Антигенные препараты для иммунодиагностики кандидоза / З.О.Караев, Г.А.Бабенко, С.М.Игнатъева, Г.И. Соловьева // ЖМЭИ. – 1990. – №7. – С. 104-110.

37. Карибаева, А.Т. Способ выделения возбудителей трихофитии и микроспории / А.Т.Карибаева, А.У. Байдуйсенова // Проблемы медицинской микологии. – 2010. – №2. – 94 с.

38. Кашкин, П.Н. Дерматомикозы / П.Н. Кашкин // Ленинград.–1953.– С.276.

39. Кашкин, П.Н. Руководство по медицинской микологии / П.Н. Кашкин, Н.Д. Шеклаков // –М., –1978. –С 328.

40. Кенжина, А.Б. ИФА в диагностике микроспории / А.Б. Кенжина // Сельскохозяйственный журнал, – Т.3, №. 6, –2013,–С. 118-120.

41. Китуашвили, Т.А. Эпидемиологический анализ трихомикозов в Грузии / Т.А.Китуашвили, Г.М.Твалиашвили, И.В. Бучукури и соавт. // Современная микология в России. Тезисы докладов второго съезда микологов России. – 2008. – Т. 2. – С. 430-433.

42. Киян, В.С. Возможности использования моноклональных антител для выявления антигенов и антител против возбудителя трихофитии крупного рогатого скота / В.С. Киян// Труды ВИЭВ, Т. 75. Мат. Межд. научно-практ. конф., посв. 100-лет. со дня рожд. ак. ВАСХНИЛ А.Х.Саркисова. М.– 2009. – С. 336-340.

43. Ковалева, С.П. Клиническая диагностика внутренних болезней животных [Электронный ресурс] : учебник / под ред. Ковалева С.П., Курдеко А.П. и Мурзагулова К.Х.. СПб.: Лань, –2014. –544 с. Режим доступа: <http://e.lanbook.com>.

44. Кокушина Т.М. Использование серологических реакций в диагностике грибковых заболеваний. Ленинградское отд. Медицина. –1967. –С. 18-27.

45. Колычев, Н.М. Зоопатогенные бактерии и меры борьбы с ними /Н.М.Колычев, В.Г. Ощепков // – Омск, –2001. –С. 526-542.

46. Конопаткин, А.А. Эпизоотология и инфекционные болезни с/х. животных / А.А.Конопаткин // –М.: «Колос» –1984. – С.15

47. Королева, В.П. Распространенность возбудителей дерматомикозов животных в разных зонах Союза / В.П. Королева // Бюлл. ВИЭВ, –1976, вып.25. – С. 49-52.

48. Кухар, Е.В. Патент №24631 РК Способ получения латексного антигена для постановки реакции латекс-агглютинации / Е.В.Кухар,Е.Б.Никитин, О.Д.Парийчук // «НИИС» Комитета по правам интеллектуальной собственности МЮ РК.– Астана.– 2011. – Оpubл. 15.09.2011, Бюлл. №9.

49. Кухар, Е.В. Антигенные свойства компонентов клеточной стенки возбудителя трихофитии и их использование в разработке иммуноферментной тест-системы /Е.В. Кухар // автореф. ... канд. вет. наук.: 16.00.03. – Астана,– 2001. – 25 с.

50. Кухар, Е.В. Биотехнологические основы совершенствования диагностических препаратов при дерматомикозах /Е.В. Кухар // Дисс. на ... докт. биол. наук по спец. 03.00.23 – Биотехнология. 2010. 255 с.

51. Кухар, Е.В. Реакция микроагглютинации в диагностике трихофитии крупного рогатого скота /Е.В. Кухар // Вестник Семипалатинского Государственного университета имени Шакарима. –№ 3. –2002 г. –С. 102-109.

52. Кухар, Е.В. Реакция микроагглютинации при диагностике трихофитии /Е.В. Кухар // Проблемы научного обеспечения сельского хозяйства республики Казахстан, Сибири и Монголии: мат. 4-й Межд. научно- практ. конфер. (г.Улан-Батор 9-10 июля 2001). – Алматы: Бастау, – 2001. – С. 323-324.

53. Кухар, Е.В. Дерматомикозы кожи и ее производных: рекомендации по иммуноферментной диагностике/ Е.В.Кухар, Б.Г.Щурихин, А.К.Акимбаева, В.С.Киян // – Астана: ЕНУ им. Л.Н. Гумилева, – 2015. – 74 с.

54. Кухар, Е.В. Подбор компонентов и отработка непрямого варианта ИФА для диагностики микроспории кошек / Е.В.Кухар,Т.И. Глотова, Т.Б. Тугунова //

Сельскохозяйственные науки и агропромышленный комплекс на рубеже веков – №4, –2013, – С. 163-168.

55. Кухар, Е.В. ИФА-диагностика микроспории /Е.В.Кухар, А.Б.Кенжина, А.Г.Глотов, Т.Б.Тугунова, Т.И. Глотова // методическое пособие Новосибирск: ГНУ ИЭВСиДВ Россельхозакадемии. – 2012. – 29 с.

56. Кухар, Е.В. Фенотипические и молекулярно-генетические свойства *Microsporum canis* /Е.В.Кухар, В.С.Киян,Т.И. Глотова, А.Г. Глотов //Сибирский вестник сельскохозяйственной науки.– 2020. –50(1)– С. 48-56.

57. Кухар, Е.В. Методические рекомендации по диагностике трихофитии крупного рогатого скота методом ИФА на основе моноклональных антител / Е.В.Кухар, В.С.Киян, М.А.Куйбагаров, С.Н. Боровиков // –Астана. – 2010. – 22 с.

58. Кухар, Е.В. Изменение традиционного спектра возбудителей трихофитии крупного рогатого скота в Казахстане // Мат. межд. научн.-практ. конф. /Е.В.Кухар, Б.А.Курманов, В.С.Киян, Е.В.Егорчева, А.П.Муранец, А.М.Шарипова, Н.А.Панченко, А.И. Никулина // – Алматы, –2012. – С. 333-340.

59. Кухар, Е.В. Возбудители дерматомикозов, выделенные от крупного рогатого скота в хозяйствующих субъектах Алматинской области / Е.В.Кухар, Р.С.Саттарова, Ф.А.Бакиева, А.М. Смагулова // Сборник научных трудов КазНИ-ВИ. Проблемы теории и практики современной ветеринарной науки. – Алматы – 2016. – Том LXII. – С. 117-125

60. Кухар, Е.В. Разработка различных вариантов ИФА с моноклональными антителами для выявления специфических антител против *Trichophyton verrucosum*/Е.В.Кухар, В.С. Киян. //Проблемы медицинской микологии. – 2008– 10.2 – С.59-60.

61. Лакин, Г.Ф. Биометрия /Г.Ф. Лакин //– М.: Высшая школа,–1990. – С. 113.

62. Левченко Е.Н. Применение РСК при диагностике микроспории у домашних кошек / Е.Н. Левченко // Вестник науки КазАТУ им. С.Сейфуллина. Спец. выпуск (мат. межд. конференции). – Астана. – 2008. – С. 299-303.

63. Литвинов, А.М. Дерматофитозы кошек и собак (профилактика и лече-

ние) /А.М. Литвинов //Ветеринария.– №11.– 2000.– С. 51-53.

64. Маноян, М.Г. Антигенные и иммуногенные связи возбудителей трихофитии парнокопытных /М.Г.Маноян // автореф. ... канд. вет. наук.: 16.00.03. – М., –1991. – С. 5-20.

65. Маноян, М.Г. Современные средства специфической профилактики и терапии дерматофитозов животных /М.Г.Маноян, А.Н.Панин, Р.С.Овчинников // Современная микология в России. Том 2. Мат. 2-го Съезда микологов России. – М.: Национальная академия микологии. –2008. – С. 354-355.

66. Медведев, Ю.А. Молекулярно-клеточные механизмы иммуногенеза при зоонозной трихофитии / Ю.А.Медведев // автореф. ... докт. мед. наук. – М. – 1988. – С. 4-27.

67. Мелентьев, А.И. Патент № 2275631 С1 Российская Федерация, МПК G01N 33/48, С12N 1/14, С12N 1/38. Способ диагностики дерматомикозов и питательная среда для дерматофитов / А.И.Мелентьев, О.Р.Мухамадеева, И.А. Басченко и соавт. // № 2004129925/15: заявл. 14.10.2004: опубл. 27.04.2006; заявитель Институт биологии Уфимского научного центра Российской Академии Наук (ИБ УНЦ РАН). – EDN DTWLYJ.

68. Методы общей бактериологии. Под ред. Ф. Герхардта. Т. 2. – М.: Мир, – 1984. – С. 221-228.

69. Мокроносова, М.А. Клещи рода *Demodex* и дрожжи рода *Malassezia* у пациентов с себорейным дерматитом / М.А.Мокроносова, А.М.Глушакова, Е.В.Гольшева, Т.М.Желтикова // Вестник дерматологии и венерологии. –2012; – №3– С.92-98.

70. Несипбаева, А.Е. Получение цветного антигена *Microsporum canis* и его активность в агглютинирующем тесте /А.Е. Несипбаева, А.М.Смагулова // Мат. Межд. научно-теор. конф. «Сейфуллинские чтения – 18. – Астана, –2022. – Т.1., Ч. 3. – С. 10-12.

71. Никитушкина, Н.А. Клинико-эпизоотологические и этиологические особенности дерматомикозов у собак и кошек, совершенствование схем их лечения: дис. ... канд. ветеринар. наук / Н.А. Никитушкина. – Новосибирск, 2008. – С. 124.

72. Обухова, А.С. В кн.: Всесоюзный съезд дерматовенерологов 6-ой // Тезисы докладов. –М., 1973.– С. 170-171.
73. Овчинников, Р.С. Этиология микозов экзотических рептилий /Р.С.Овчинников, М.Г.Маноян, А.Г.Гайнуллина // VetPharma. –2012. №4. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/etiologiya-mikozov-ekzoticheskikh-reptiliy> (дата обращения: 19.12.2023).
74. Овчинников, Р.С. Биологические свойства возбудителей дерматофитозов/ Р.С. Овчинников // автореф. дис. . канд. биол. наук –М., –2000. – 26 с.
75. Османов, С. Грибы-возбудители инфекционных заболеваний животных / С. Османов // Материалы III Дагестанской научно-технической конференции по охране природы. Махачкала, –1974. –С. 31-33.
76. Остроумов, Л.А. Филогенетический анализ типовых штаммов плесеней *Roqueforti*, *Camemberti* рода *Penicillium* / Л.А.Остроумов, Т.Н.Садовая, К.В. Беспоместных // Техника и технология пищевых производств. –2010; – Т. 3 (18)– С.107–111.
77. Оухтерлони, О.Диффузионные гелевые методы иммунологического анализа» /О.Оухтерлони // Прогресс аллергии. – Т. 5. –1958– С.1-78. PMID13578996.
78. Парманов, М.П. Трихофития овец в Узбекистане /М.П. Парманов // Бюллетень ВИЭВ, вып. 42 –М.– 1981.– С. 11.
79. Петрович, С.В. Микотические заболевания животных /С.В. Петрович // М.- россельхозиздат.– 1982.– С.192.
80. Поляков, И.Д. Дерматофитозы собак и кошек. В кн. Диагностика и профилактика инфекционных болезней собак и кошек: Руководство для практикующих ветеринарных врачей/ И.Д. Поляков, Л.Г. Иванова //Под ред. Проф. Алипера Т.И. –Изд-во «ЗооВетКнига», 2017, С.145-155.
81. Потехаев Н.Н. Клинические рекомендации и алгоритмы для практикующих врачей /Н.Н.Потехаев // Дерматология. – 2013. – №13. – С. 34-37.
82. Потоскуева, А. С. Клинический случай: дерматофитоз у кошки / Внутренние незаразные заболевания сельскохозяйственных и мелких домашних животных / А.С. Потоскуева // Сборник клинических случаев. – Екатеринбург:

УГАУ, – 2021. – С. 69-70.

83. Правила по профилактике и ликвидации дерматофитозов животных (утв. Департаментом ветеринарии Минсельхозпрода РФ 11 июля 2000 г. [Электронный ресурс] N ВП 13.4.1416-00). <https://base.garant.ru/73793451/05.12.23>.

84. Родионов, А.Н. Грибковые заболевания кожи. 2 издание / А.Н. Родионов // – Санкт-Петербург: Питер, –2000. – С. 9-13, 16-17.

85. Рукавишникова, В.М. Современные особенности клиники и лечения микроспории/В.М.Рукавишникова //Лечащий врач.– 2001. – №4.– С.16-18.

86. Савинов, В.А. Заболеваемость дерматофитозами мелких домашних животных в Москве / В.А. Савинов // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2020. – №. 11. – С. 35-41.

87. Савинов, В.А. Разработка отечественной хромогенной питательной среды «ДТМ-Эксперт» для диагностики дерматофитозов мелких домашних животных / В.А. Савинов // диссертация ... кандидата биологических наук: 4.2.3– М. – 2022.– 147 с.

88. Савинов, В.А. Новые виды возбудителей в этиологии дерматофитозов животных-компаньонов в Московском регионе / В.А.Савинов, Р.С.Овчинников,А.Г. Южаков,А.В. Хабарова, А.Г.Гайнуллина // Ветеринария, зоотехния и биотехнология, –2021 –№9. –С. 15-25.

89. Сайдулдин, Т.С. Основы серологии /Т.С.Сайдулдин // – Алма-Ата, – 1992. – С. 141-238.

90. Сандыбаев, Н.Т. Изучение физико-химических свойств антигенов гриба *Histoplasma farciminosum* для диагностики заболевания / Н.Т. Сандыбаев // автореф. ... канд. б иол. наук: 03.00.07. – Астана, –2007. – 25 с.

91. Саркисов, А.Х. Специфическая профилактика трихофитии пушных зверей /А.Х.Саркисов, Л.И. Никифоров // Бюллетень ВИЭВ, –вып.42 –М. –1972. – С. 32.

92. Саттон, Д. Определитель патогенных и условно патогенных грибов /Д.Саттон, А. Фотергилл, М.Ринальди // – М.: Мир.–2001. – 250 с.

93. Сергеев, А.Ю. Грибковые инфекции / А.Ю.Сергеев, Ю.В. Сергеев // Ру-

ководство для врачей.– М.: БИНОМ, –2008. – С. 35-37, 42-44.

94. Смагулова, А.М. Молекулярно-генетические свойства *Microsporium canis*/ А.М. Смагулова, Т.И. Глотова, Е.В. Кухар, В.С. Киян, А.Г. Готов // В сб. Межд.конф.: Молекулярная диагностика. Коллектив авторов. – М., – 2021. – С. 177-178.

95. Смагулова, А.М. Биологические и молекулярно-генетические свойства *Trichophyton benhamiae* – нового возбудителя дерматомикозов кошек /А.М.Смагулова, Е.В. Кухар, Т.И.Глотова, А.Г. Готов // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2023. – Т. 53.№1. – С. 53–61. <https://doi.org/10.26898/0370-8799-2023-1-7>.

96. Смагулова, А.М. Анализ чувствительности нового возбудителя дерматофитии кошек *Trichophyton benhamiae* к фунгицидным препаратам / А.М. Смагулова // Сборник материалов международной научно-практической конференции «Состояние и перспективы развития ветеринарии и животноводства в Республике Казахстан», посв. 80-лет. академика НАН РК, д.в.н., профессора Сайдулдина Глеуберды. – 2023; – Алматы; С. 445-453.

97. Смагулова, А.М. Спектр возбудителей микозов кожи у домашних и диких животных в Казахстане и Западно-Сибирском регионе России / А.М. Смагулова, Т.И. Глотова, Е.В. Кухар // Успехи медицинской микологии. Материалы юбилейной конференции медицинской и микробиологии. Том XXV. Москва 17-18 май 2023. – С. 37-41.

98. Смагулова, А.М. Филогенетический анализ дерматофитов, выделенных от мелких домашних животных / А.М. Смагулова, Е.В. Кухар, Т.И. Глотова, А.Г. Готов // Ветеринария сегодня. 2023. Т. 12. № 3. С. 259-264.

99. Смагулова, А.М. Методические рекомендации по выделению и идентификации *Trichophyton benhamiae* – возбудителя дерматомикозов кошек / А.М. Смагулова, Е.В. Кухар, В.С. Киян, Т.И. Глотова, А.Г. Готов.// – Новосибирск: Агронаука, 2023. – 44 с. ISBN 978-5-6049742-4-7

100. Спесивцева, Н.А. Микозы и микотоксикозы / Н.А.Спесивцева // – М.: Колос, –1964. – С. 44-55, 458-460, 480-484.



101. Степанищева, З.Г. Экспериментальные материалы к эпидемиологии, микроспории и биологии пушистого микроспорума / З.Г. Степанищева // Автореф. дис... докт. мед. наук. – М.–1958.– С.35.

102. Степанова, Ж.В. К вопросу эпидемиологии и лечения микроспории, обусловленной пушистым микроспорумом: Автореф. дис... канд. мед. наук / Ж.В. Степанова. – М.,1970. – с .24. 33

103. Суворова, К.Н. Детская дерматовенерология: Руководство для врачей-курсантов последипломного образования / К.Н. Суворов, В.Т. Куклин, В.М. Руковишникова. –Казань, 1996. – 441 с.

104. Токеев, Ш.О. Приготовление антигена для постановки серологической реакции против трихофитии верблюдов из штамма *Trichophyton sarkisovii* F-0080 / Ш. О. Токеев, М. Умитжанов, Э. К. Акматова // Актуальные научные исследования в современном мире. – 2018. – № 5-8(37). – С. 110-112;

105. Тугунова, Т.Б. Клинико-эпизоотологические и этиологические особенности проявления дерматофитозов собак и кошек в условиях крупного города, совершенствование схем лечения кошек при микроспории: Автореф. дис... канд. ветеринар. наук / Т.Б. Тугунова. – Новосибирск, 2003. – С. 22.

106. Тугунова Т.Б. Эффективность применения гризеофульвина, кетоконазола и тербинафина при микроспории кошек / Т.Б. Тугунова, Т.И. Глотова / Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – № 1(9). – Барнаул, – 2003. – С. 192-193.

107. Усенова, А.А. Апробация методов экспресс диагностики дерматомикозов у крупных цирковых хищников / А.А. Усенова, Е.В. Кухар // Мат. межд. науч.-теоретической конф. «Сейфуллинские чтения – 17: – 2021.– Т.2, Ч.1. – С. 62-66.

108. Устинцева, Ю.Ю. Дерматофитозы мелких домашних животных Якутии: дис. ... канд. ветеринар. наук / Ю.Ю. Устинцева // 06.02.02. – Якутск, 2011.– 144 с.

109. Фейер, Э. Медицинская микология и грибковые заболевания /Э.Фейер, Д. Олах //АН Венгрия, Будапешт.– 1966.–С.58.

110. Феофилова, Е.П. Клеточная стенка грибов / Е.П. Феофилова // – М., – 1983. – С. 151-152.
111. Фридлянская, И.И. Получение моноклональных антител (гибридомная технология). Методы культивирования клеток / И.И. Фридлянская // – Л.: Наука. –1987. – С. 194-205.
112. Хаитов, Р.М. Иммунология:учебник/ Р.М.Хаитов// - 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, – 2015. – 521 с.
113. Ханис, А.Ю. Иммунизация животных антигенами, приготовленными из дерматофитов: автореф. дисс. ... канд. ветеринар. наук / А.Ю. Ханис. – М., 1989. – 23 с.
114. Цыганко, А.В. Микроспория кошек и собак / А.В. Цыганко // Ветеринарная клиника.–№1(08).–2003.–С.21-25.
115. Черногубов, А.Н. Новые данные в учении о трихофитии / А.Н.Черногубов, А.Я. Пелевина // Русский вестник дерматолога, – 1926. – Т. 4, № 1, с. 2, № 2, – С. 111, № 3, – С. 216.
116. Чукашев, Г.В. Исследования по микроспории домашних животных: Автореф. дис. ... канд. ветеринар. наук / Г.В. Чукашев. – М., 1960. – С. 18.
117. Шагаев, Д.В. Болезни кожи у собак / Шагаев Д.В., Посашкова Е.С. // Ветеринария. – 2003. – № 4. – С. 51-52.
118. Яковлев, А.Б. Современные данные об этиологии, патогенезе, клинической картине, лечении и профилактике микроспории / А.Б. Яковлев // Terra medica. – 2011. – №3. – 38 с.
119. Abou-Gabal, M. Animal ringworm in upper Egypt. Sabouraudia / M. Abou-Gabal, G.A. El-Galil, E.A. El-Nor, D.A. El-Rehim // 1976. – Vol. 14(1). – P. 33-36.
120. Aho, R. Pathogenic dermatophytes recovered from the hair of domestic animals in Finland between 1977 and 1980 / R. Aho // Suomen Elainlaakarilehti – 1980. – Vol.86. – P. 487-506.
121. Ajello, L. The Perfect State of Trichophyton Mentagrophytes / L. Ajello, S. Cheng // – Sabouraudia. – 1967; – Vol.5– P. 230–234.
122. Alexander, C.L. Introduction of a dermatophyte polymerase chain reaction

assay to the diagnostic mycology service in Scotland / C.L. Alexander, G.S. Shankland, W. Carman, C. Williams // *British Journal of Dermatology*. – 2011. – T. 164. – Vol. 5. – P. 966-972.

123. Aljabre, S.H.M. Germination of *Trichophyton mentagrophytes* on human stratum corneum in vitro / S.H.M. Aljabre, M.D. Richardson, E.M. Scott, G.S. Shankland // *Journal of medical and veterinary mycology*. – 1992. – T. 30. – Vol. 2. – P. 145-152.

124. Alteras, I. Грибковая флора Бухарской области/ I.Alteras, A.Avram // *Вестник дерматовенерологии*. – 1961. – Vol. 2. – P.89.

125. Ansari, S Familial Cases of *Trichophyton benhamiae* Infection Transmitted from a Guinea Pig in Iran / S. Ansari, B. Ahmadi, et.all. // *Mycopathologia*. – 2021. – Vol.186(1) – P. 119-125. doi: 10.1007/s11046-020-00513-1.

126. Aruna, G.L. Development of indirect ELISA and its evaluation in comparison with KOH hydrolysis and fungal culture for the immuno diagnosis of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* infection in humans /G.L. Aruna, B. Ramalingappa. // *Acta Tropica*, – 2022,– Vol. 235. – P. 106590.

127. Avram, A. Microsporie observe chez un group a lious en capiti/A. Avram, I.Alteras, L. Cariewchi // *Mycopath. Appl.*–1963. –Vol.4.– P.49.

128. Baert, F. Updating the taxonomy of dermatophytes of the BCCM/IHEM collection according to the new standard: a phylogenetic approach / F. Baert, D. Stubbe, E. D’hooge, A. Packeu, M. Hendrickx // *Mycopathologia*. – 2020. – T. 185. – Vol. 1. – P. 161-168.

129. Baker, K.P. Parasitic skin diseases of dogs and cats / K.P. Baker // *Veter. Record*. – 1970. – Vol.87. – P.452-740.

130. Baxter, M. Isolation of fungi from the pelage of cats and dogs using the hairbrush technique / M.Baxter, M.F. Simpanya // *Mycopathologia*. – 1996.– Vol.134(3).– P. 129-133.

131. Baert, F. A Polyphasic Approach to Classification and Identification of Species within the *Trichophyton benhamiae* Complex / F. Baert, P. Lefevere, E. D'hooge, D. Stubbe, A.Packeu// *J Fungi (Basel)*. 2021. – Vol.7(8). – P.602. doi:

10.3390/jof7080602.

132. Bartosch, T. *Trichophyton benhamiae* and *T. mentagrophytes* target guinea pigs in a mixed small animal stock / T. Bartosch, A. Frank, C. Günther // Medical Mycology Case Reports. – 2018. – Vol. 23. – P. 37-42. doi:10.1016/j.mmcr.2018.11.005

133. Bentubo, H.D.L. Isolation of *Microsporum gypseum* from the haircoat of health wild felids kept in captivity in Brazil / H.D.L Bentubo, J.D. Fedullo, S.H.R. Corrêa, R.H.F. Teixeira, S.D.A.Coutinho // Brazilian Journal of Microbiology. – 2006.– Vol.37(2).– P. 148-152.

134. Bloom, B.R. Методы изучения in vitro клеточного иммунитета (перевод с англ.) / B.R. Bloom, R.R. Glade // – М.: Медицина. – 1974. – С. 302.

135. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // Analytical Biochemistry. – 1976. – Vol.72, – P. 248-254.

136. Braun, W. New views on immunobiology in trichophytoses / W. Braun // Recent Advances of Human and Animal Mycology.– Bratislava.– 1967.– P. 301-303.

137. Brilhante, R.S. High rate of *Microsporum canis* feline and canine dermatophytoses in Northeast Brazil: epidemiological and diagnostic features / R.S.N. Brilhante, C.S.P. Cavalcante, F. A. Soares-Junior, R.A. Cordeiro, J.J.C. Sidrim, M.F.G. Rocha // Mycopathologia. – 2003. – T. 156. – Vol. 4. – P. 303-308.

138. Brilhante, R.S. Evaluation of *Microsporum canis* in different methods of storage / R.S. Brilhante, C.S. Cavalcante, F.A. Soares-Júnior, A.J. Monteiro, E.H. Brito, R.A. Cordeiro, J.J. Sidrim, M.F. Rocha // Med Mycol. – 2004. – Vol. 42(6). – P. 499-504. doi: 10.1080/13693780410001712052.

139. Cafarchia, C. The epidemiology of canine and feline dermatophytoses in southern/ C. Cafarchia, D. Romito, M. Sasanelli, R. Lia, G. Capelli and D. Otranto // Mycoses.– 2004.– Vol.47.– P. 508-513.

140. Carlotti, D.N. Dermatophytosis due to *Microsporum persicolor* (13 cases) or *Microsporum gypseum* (20 cases) in dogs / D.N. Carlotti, E.J.V.D. Bensignor // Veterinary Dermatology (United Kingdom). – 1999. – P. 11-17.

141. Carroll, H.F. Evaluation of dermatophyte test medium for diagnosis of der-

matophytosis / H.F. Carroll // Journal of the American Veterinary Medical Association. – 1974. – T. 165. – Vol. 2. – P. 192-195.

142. Chermette, R. Dermatophytoses in animals / R. Chermette, L. Ferreiro, J. Guillot // Mycopathologia. – 2008. – T. 166. – Vol. 5-6. – P. 385-405.

143. Chmel, L. Zoophilic dermatophytes and infections in man / L. Chmel // Med. Mycol. – 1980. – Vol. 8. – P. 61-66.

144. Choi, J. Fungal plant cell wall-degrading enzyme database: a platform for comparative and evolutionary genomics in fungi and Oomycetes / J. Choi, K.T. Kim, J. Jeon // BMC Genomics. – 2013. – Vol. 14. – P. 5-7.

145. Chupia, V. Prevalence of *Microsporum Canis* from pet cats in small animal hospitals / V. Chupia, J. Ninsuwon, K. Piyarungsri, C. Sodarath, W. Prachasilchai, W. Suriyasathaporn and S. Pikulkaew // Chiang Mai, Thailand. Vet. Sci., – 2022. – Vol. 9(1)– P. 21.

146. Čmoková, A. Resolving the taxonomy of emerging zoonotic pathogens in the *Trichophyton benhamiae* complex / A. Čmoková, M. Kolařík, R. Dobiáš, // Fungal Diversity – 2020. – Vol. 104. – P. 333–387. <https://doi.org/10.1007/s13225-020-00465-3>.

147. Colombo, S. Comparison of two sampling methods for microscopic examination of hair shafts in feline and canine dermatophytosis / S. Colombo, L. Corneigliani, M. Beccati, F. Albanese // Veterinaria (Cremona). – 2010. – T. 24. – Vol. 3. – P. 27-33.

148. Connole, M.D. Keratinophilic fungi on cats and dogs / M.D. Connole // Sabouradia. – 1965. – Vol. 4. – P. 45-48.

149. Crawford, G.M. Roentgen Therapy in Acne / G.M. Crawford, R.H. II Linkart, R.F. Tiley // The New England Journal of Medicine – 1951. – Vol. 245. – P. 726-728.

150. De Freitas, R.S. First report of tinea corporis caused by *Arthroderma benhamiae* in Brazil / R.S. De Freitas, T.H.P. De Freitas, L.P.M. Siqueira, V.M.F. Gimenes, G. Benard // Brazilian Journal of Microbiology. – 2019 – Vol. 50(4). – P. 985-987.

151. De Hoog, G.S. Atlas of Clinical Fungi 2nd edition / G.S. de Hoog, J. Guarro, J. Gené, M.J. Figueras // Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS). – 2000. – P. 159.

152. Drouot, S. Pets as the main source of two zoonotic species of the *Trichophyton mentagrophytes* complex in Switzerland, *Arthroderma vanbreuseghemii* and *Arthroderma benhamiae* / S. Drouot, B. Mignon, M. Fratti, P. Roosje, M. Monod // *Veterinary Dermatology*. – 2009. – Vol. 20. – P. 13-18.
153. Elad, D. Diagnostic Aspects of Veterinary and Human Aspergillosis / D. Elad, E. Segal // *Front Microbiol*. – 2018. – Vol. 9. – P. 1303.
154. Ellis, D. Descriptions of medical QAP fungi / D. Ellis, S. Davis // *Adelaide Children's Hospital*. – 1992. – 456 p.
155. Faggi, E., Pini G., Campisi E., Bertellini C., Difonzo E., Mancianti F. Application of PCR to distinguish common species of dermatophytes. *J Clin Microbiol*. – 2001. – Vol.39(9). – P. 3382-3385.
156. Fisher, M.C. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health / M.C. Fisher, D.A. Henk, C.J. Briggs // *Nature*. – 2012. – Vol.484(7393). – P. 186-194.
157. Fischman, O. *Microsporum gypseum* infection in a gray wolf (*Canis lupus*) and a camel (*Camelus bactrianus*) in a zoological garden / O. Fischman, P.A. Siqueira, G. Baptista // *Mycoses*. – 1987. – Vol. 30(7). – P. 295-297.
158. Florian, E., Nemeseri L. Studies on the possibilities of prevention of dermatomycoses transmitted from animals. *Orv Hetil*. – 1961. – Vol. 102. – P.1738-1740.
159. Fumeaux, J. First report of *Arthroderma benhamiae* in Switzerland / J. Fumeaux, M. Mock, B. Ninet, I. Jan, O. Bontems, B. Léchenne, D. Lew, R.G. Panizzon, O. Jousson, M. Monod // *Dermatology*. – 2004. – Vol. 208(3) – P. 244-50. doi: 10.1159/000077311.
160. Georg, L.K. Animal ringworm in public health / L.K. Georg // *U.S. Dept. Realth Education*. – 1960. – Vol.74. – P.14.
161. Georg, L.K. The relationship between the downy and granular forms of *Trichophyton mentagrophytes*. *J Invest Dermatol*. 1954. – Vol.23(2). – P.123-141.
162. Gordon, E. Descriptive epidemiology of companion animal dermatophytosis in a Canadian Pacific Northwest animal shelter system / E. Gordon, A. Idle, L. DeTar // *Can. Vet. J*. – 2020. – Vol. 61(7). – P. 763-770.
163. Graser, Y. The new species concept in dermatophytes – A polyphasic ap-

proach /Y. Graser, J. Scott, R. Summerbell // Mycopathologia. – 2008. – Vol. 166. – P. 239-256.

164. Graser, Y. Identification of common dermatophytes (Trichophyton, Microsporum, Epidermophyton) using polymerase chain reactions/ Y. Graser, M. El Fari, W. Presber, W. Sterry, H.J. Tietz // Br J Dermatol. – 1998. – Vol.138. – P. 576-582.

165. Greenacre, C. Avian and Exotic Animal Dermatology / C. Greenacre // Small Animal Dermatology. – 2017. – P. 490–549. doi:10.1016/b978-0-323-37651-8.00015-8.

166. Gutel, R. Comparative anatomy of 16S-like ribosomal RNA / R. Gutel, B. Weiser, C.R. Woese, H.F. Noller // Nucleic Acids Res. – 1985. – Vol. 32. – P. 155-216.

167. Hasegawa, A. Canine and Feline dermatophytosis and their possible relation to human infection / A. Hasegawa // Recent advances in medical and veterinary mycology University of Tokyo. – 1976. – P. 135-142.

168. Hasegawa, A. Dermatophytes from animals / A. Hasegawa // Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi. – 2000. – Vol. 41(1). – P. 41.

169. Heckler, I. The need for fast and accurate detection of dermatomycosis / I. Heckler, M. Sabalza, A. Bojmehrani, I. Venkataraman, C. Thompson // Medical Mycology. – 2023. – Vol. 61. – P. 5.

170. Hiruma, J. Occurrence of *Arthroderma benhamiae* Genotype in Japan / J. Hiruma, R. Kano, K. Harada // Mycopathologia. – 2015. – Vol. 179. – P. 219-223.

171. Hormansdorfer, S. Microsporum canis als Ursache einer Bestandsenzootie beim Schwein. Ein Fallbericht / S. Hormansdorfer, K. Heinritzi // J. Bauer Tierarztl Prax. – 1995. – Vol. 23(5). – P. 465-468.

172. Hubka, V. Common and emerging dermatophytoses in animals: well-known and new threats / V. Hubka, A. Peano, A. Cmokova, J. Guillot // Emerging and Epizootic Fungal Infections in Animals. – Springer, Cham, – 2020. – P. 31-79.

173. Ibrahim, M.M. Suggested Guidelines for the Treatment of Mycosis Fungoides in Countries with Limited Resources / M.M. Ibrahim, N.A. Eltayeb // Dermatology Research and Practice – 2023. – Vol. 31. – P. 1360740.

174. Ivaskiene, M. Efficacy of topical therapy with newly developed terbinafine and econazole formulations in the treatment of dermatophytosis in cats / M. Ivaskiene, A.P. Matusевичius, A. Grigonis, G. Zamokas, L. Babickaite // Polish Journal of Veterinary Sciences. –2016. – Vol. 19(3). – P. 535–543.

175. Jin, Y. Molecular typing study of the *Microsporum canis* strains isolated from an outbreak of *Tinea capitis* in a school / Y. Jin, W. Zhe, W. Chen, W. Wang, R. Li // Mycopathologia. – 2004. – Vol. 157. – P. 37-41.

176. Kaben, U. Beitrag zum vorkommen von *Microsporum canis* in Deutschland / U. Kaben, L. Bohnenstengel // Mykosen. –1965. – Vol. 8. – P. 120-124.

177. Kaplan, W. Recent developments in animal ringworm and their public health implications / W. Kaplan, L.K. Georg, L. Ajello // Annals of the New York Academy of Sciences. – 1958. – Vol. 70. – P. 3.

178. Kachnic, M. Dynamics of the appearance of zoophilic dermatophytes in the former Kosice region. Cesk Dermatol. – 1962. – Vol. 37. – P. 103-107.

179. Kano, R., Identification of clinical isolates of *Microsporum canis* and *Microsporum gypseum* by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and southern hybridization analyses / R. Kano, Y. Nakamura, T. Watari, S. Watanabe, H. Takahashi, H. Tsujimoto, A. Hasegawa // Mycoses. – 1998. – Vol. 41. – P. 139-143.

180. Kaszubiak, A. Population structure and evolutionary origins of *Microsporum canis*, *M. ferrugineum* and *M. audouinii* / A. Kaszubiak, S. Klein, G.S. de Hoog, Y. Graser // Infect Genet Evol. – 2004. – Vol. 4. – P. 179-186.

181. Kawasaki, M. Phylogeny of *Epidermophyton floccosum* and other dermatophytes / M. Kawasaki, M. Aoki, H. Ishizaki, K. Nishimura, M. Miyaji // Mycopathologia. – 1996. – Vol. 134. – P. 121–128.

182. Khosravi, A.R. Dermatophytes isolated from domestic animals in Iran / A.R. Khosravi, M. Mahmoudi // Mycoses. – 2003. – T. 46. – Vol. 56. – P. 222-225.

183. Kidd Sarah, E. Diagnosis of dermatophytes: from microscopy to direct PCR / E. Kidd Sarah, F. Weldhagen Gerhard // Microbiology Australia – 2022. – Vol. 43. – P. 9-13.

184. Kim, J.Y. Identification of dermatophytes using multiplex polymerase chain



reaction / J.Y. Kim, Y. Choe, K.J. Ahn, Y.W. Lee // *Annals of dermatology*. – 2011. – T. 23. – Vol. 3. – P. 304-312.

185. Kimura, U. Tinea faciei caused by *Trichophyton mentagrophytes* (molecular type *Arthroderma benhamiae*) mimics impetigo: a case report and literature review of cases in Japan / U. Kimura, K. Yokoyama, M. Hiruma, R. Kano, K. Takamori, Y. Suga // *The Journal of Medical Mycology*. – 2015 – Vol. 56. – P. E1-E5.

186. Knudtson, W. *Trichophyton mentagrophytes* dermatophytosis in wild fox / W. Knudtson, C. Gates, G. Ruth, L.D. Hadley // *Journal of Wildlife Diseases*. – 1980. – Vol. 16(4). – P. 465-468.

187. Kondori, N. Comparison of dermatophyte PCR kit with conventional methods for detection of dermatophytes in skin specimens / N. Kondori, P.A. Tehrani, L. Strömbeck, J. Faergemann // *Mycopathologia*. – 2013. – Vol. 176. – P. 237-241.

188. Khosravi, A.R. Dermatophytes isolated from domestic animals in Iran. / A.R. Khosravi, M. Mahmoudi // *Mycoses*. 2003. – Vol. 46(5-6). – P. 222-225.

189. Krzyściak, P. Rare zoonotic infection with *Microsporum persicolor* with literature review / P. Krzyściak, A.M. Al Hatmi, S.A. Ahmed, A.B. Macura // *Mycoses*. – 2015. – T. 58. – Vol. 9. – P. 511-515.

190. Kupsch, C. Dermatophyten und Meerschweinchen / C. Kupsch, M. Berlin, Y. Gräser // *Der Hautarzt*. – 2017. – T. 68. – Vol. 10. – P. 827-830.

191. Kushida, T.A. Survey on Canine and Feline Ringworm / T.A. Kushida // *The Bulletin of The Nippon Veterinary and Zootechnical College*. – 1978. – P. 33-46.

192. Kushida, T.A. *Trichophyton* reaction on dogs dermatophytoses // *The Journal of Veterinary Medical Science*. – 1978. – Vol. 33. – P. 3.

193. Lee, W.J. Decreasing prevalence of *Microsporum canis* infection in Korea: through analysis of 944 cases (1993–2009) and review of our previous data (1975–1992) / W.J. Lee, C.H. Song, S.J. Lee, D.W. Kim, J.B. Jun, Y.J. Bang // *Mycopathologia*. – 2012. – T. 173. – Vol. 4. – P. 235-239.

194. Leng, W. Proteomic profile of dormant *Trichophyton rubrum* conidia / W. Leng, T. Liu, R. Li, J. Yang, C. Wei, W. Zhang, Q. Jin // *BMC Genomics*. 2008. – Vol. 9. – P. 303. doi: 10.1186/1471-2164-9-303.

195. Lewis, D.T. Epidemiology and clinical features of dermatophytosis in dogs and cats at Louisiana State University: 1981–1990 / D.T. Lewis, C.S. Foil, G. Hosgood // *Veterinary Dermatology*. – 1991. – T. 2. – Vol. 2. – P. 53-58.

196. Liu, D. Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi / D. Liu, S.Coloe, R. Braird, J.Peterson, // *J Med Microbiol*. – 2000. – Vol.49. – P. 493-497.

197. López, M.F. Frecuencia de dermatofitos en una muestra de felinos del área urbana del Gran Mendoza, Argentina / M.F. López, D. Grilli, S. Degarbo, G. Arenas, A. Telechea // *Revista Iberoamericana de Micología*. – 2012. – T. 29. – Vol. 4. – P. 238-240.

198. Mochizuki, M. Antigenic and plaque variations of serotype II feline infectious peritonitis coronaviruses. / M. Mochizuki, Y. Mitsutake, Y. Miyanojima, T. Higashihara, T. Shimizu, T. Hohdatsu // *J. Vet. Med. Sci*. – 1997. – Vol. 59(4). – P. 253-258.

199. Makimura, K. Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions / K. Makimura, Y. Tamura, T. Mochizuki, A. Hasegawa, Y. Tajiri, R. Hanazawa, H. Yamaguchi // *Journal of clinical microbiology*. – 1999. – T. 37. – Vol. 4. – P. 920-924.

200. Maldonado, I. *Trichophyton benhamiae*, un dermatofito zoofilico emergente en Argentina con reservorio en cobayos: descripción de 7 casos en un hospital de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires / I. Maldonado, M.E. Elisiri, M. Monaco, A. Hevia, M. Larralde, B. Fox, L. Fernández-Canigia // *Revista Argentina de Microbiología*. 2022. – Vol. 54(3). – P. 203-208.

201. Malmasi, A. Microsporum canis infection in a red fox (*Vulpes vulpes*) / A.Malmasi, A.R. Khosravi, M.Selk Ghaffari, A.Shojaee Tabrizi // *Iranian Journal of Veterinary Research*. –2009. – Vol. 10(2). – P. 189-191.

202. Maraki, S. Survey on the epidemiology of Microsporum canis infections in Crete, Greece over a 5-year period / S. Maraki, Y. Tselentis // *Int J Dermatol*. – 2000. – Vol. 39(1). – P. 21-22.

203. Marchisio, V.F. Dermatophytes from cases of skin disease in cats and dogs

in Turin, Italy / V.F.Marchisio, M.G. Gallo, V. Tullio, S. Nepote, A. Piscozzi, C. Cassinelli // *Mycoses*. – 1995. – Vol.38 (5-6). – P. 239-44.

204. Mitchell, J.I. Sequence or structure? A short review on the application of nucleic acid sequence information to fungal taxonomy / J.I. Mitchell, J.R. Peter, T.M. Stephen // *Mycologist*. – 1995. – Vol.9. – P. 67-75.

205. Nakamura, Y. Case report. First report on human ringworm caused by *Arthroderma benhamiae* in Japan transmitted from a rabbit / Y. Nakamura, R. Kano, E. Nakamura, K. Saito, S. Watanabe, A. Hasegawa // *Mycoses*. – 2002. – Vol. 45. – P. 129-131.

206. Nenoff, P. Kerion caused by the zoophilic dermatophyte *Trichophyton* species of *Arthroderma benhamiae* in a child: a new emerging pathogen of dermatomycoses in Germany / P. Nenoff, I. Schulze, S. Uhrlass, C. Krüger // *Hautarzt Z Dermatol Venerol Verwandte Geb*. – 2013. – Vol. 64. – P. 846-849.

207. Ovchinnikov, R. Emergent fungal infections in animals: new aetiological agents / R. Ovchinnikov, M. Manoyan, A. Panin // *J VetPharma*. – 2014. – Vol.2(18). – P. 66-73.

208. Padhye, A.A. *Microsporum persicolor* infection in the United States / A.A. Padhye, F. Blank, P.J. Koblenzer, S. Spatz, L. Ajello // *Archives of dermatology*. – 1973. – T. 108. – Vol. 4. – P. 561-562.

209. Paryuni, A.D. Dermatophytosis in companion animals / A.D. Paryuni, S. Indarjulianto, S. Widayarni // A review. *Vet. World*. – 2020. – Vol. 13(6). – P. 1174-1181.

210. Peano, A. Cases of dermatophytosis caused by *Trichophyton benhamiae* var. *luteum* and *T. europaeum*, newly described dermatophytes within the *T. benhamiae* complex / A. Peano, V. Hubka, P. Cavana, // *Vet Dermatol*. – 2022. – Vol. 33(5). – P. 440-445.

211. Pereira, K.H.N.P. Dermatophytosis Caused by *Microsporum canis* in a Free-Living Maned Wolf (*Chrysocyon brachyurus*) / K.H.N.P. Pereira, E.L.R. Oliveira, R.A.B. Gonçalves // *Acta Scientiae Veterinariae*. – 2018. – Vol. 46(Suppl 1). – P. 262.

212. Pinheiro, A de Q. Dermatophytoses in the urban environment and the coex-

istence of man with dogs and cats// J.L. Moreira, J.J. Sidrim.- Rev Soc Bras Med Trop.– 1997.– Vol. 30(4).– P. 287-294.

213. Pospischil, I. Identification of Dermatophyte and Non-Dermatophyte Agents in Onychomycosis by PCR and DNA Sequencing-A Retrospective Comparison of Diagnostic Tools / I. Pospischil, C. Reinhardt, O. Bontems // J Fungi (Basel). – 2022. – Vol. 27. – 8(10). – P. 1019.

214. Rabell, G. Dermatophytes the recognitional identification / G. Rabell, D. Taplin // Florida. – 1974. – P.124.

215. Raja, H.A. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community /H.A. Raja, A.N. Miller, C.J. Pearce, N.H.Oberlies //Journal of Natural Products. – 2017. – Vol. 80(3). – P. 756-770.

216. Sabou, M. Molecular identification of *Trichophyton benhamiae* in Strasbourg, France: a 9-year retrospective study / M. Sabou, J. Denis, N. Boulanger, F. Forouzanfar, I. Glatz, D. Lipsker, Ph. Poirier, E. Candolfi, V. Letscher-Bru // Medical Mycology, – 2018. – Vol. 56 (6). – P. 723–734.

217. Schoch, C.L. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi / C.L.Schoch, K.A.Seifert,S. Huhndorf, V.Robert,J.L. Spouge,C.A. Levesque, P.W. Crous // Proceedings of the National Academy of Sciences, – 2012– Vol. 109(16).– P. 6241–6246.

218. Smagulova, A.M. // First record of *Trichophyton benhamiae* isolated from domestic cats in Russia / A.M.Smagulova, Ye.V. Kukhar, T.I.Glotova, A.G. Glotov, A.S. Kim // Med Mycol Case Rep. – 2023. – Vol. 40. – P. 16-21.

219. Segal E. Human and Zoonotic Dermatophytoses: Epidemiological Aspects / E. Segal, D.Elad //Front Microbiol. – 2021. – Vol. 12. P. 713532.

220. Seyedmousavi, S. Emerging and Epizootic Fungal Infections in Animals /S. Seyedmousavi, S. Hoog, J. Guillot, P. Verweij, // Product Flyer. – 2018. – p.404.

221. Sieklucki, U. Frequent isolation of *Arthroderma benhamiae* from dogs with dermatophytosis/ U. Sieklucki, S.H. Oh, L.L. Hoyer // Vet ermatol.–2014–Vol. 25. P. 39–41.

222. Simpanya, M.F. Isolation of fungi from the pelage of cats and dogs using the

hairbrush technique /M.F.Simpanya, M. Baxter // Mycopathologia.–1996. – Vol. 134(3). – P. 129-133.

223. Sykes, J.M. Attempted treatment of tigers (*Panthera tigris*) infected with *Microsporum canis* / J.M. Sykes, E.C. Ramsay // Journal of Zoo and Wildlife Medicine. – 2007. – Vol. 38(2): –P. 252-257.

224. Symoens, F. The dermatophyte species *Arthroderma benhamiae*: intraspecies variability and mating behaviour / F. Symoens, O. Jousson, A. Packeu // J Med Microbiol.–2013. – Vol. 62(Pt3). – P. 377-385.

225. Takatori, K. Dermatophytosis of tiger caused by *Microsporum canis* / K. Takatori, S. Ichijo, H. Kurata // Mycopathologia. – 1981. – Vol. 73(2). – P. 105-108.

226. Tekin, H.G. Would you like to purchase a rodent with dermatophytes? / H.G. Tekin, V. Sigsgaard, C. Zachariae, R.K. Hare, M.C. Arendrup, D.M.L. Saunte // Mycoses. – 2019. – T. 62. – Vol. 7. – P. 584-587.

227. Versalovic, J. Nucleic acid sequencing studies of microbial pathogens: insight into epidemiology, virulence, drug resistance and diversity / J. Versalovic, D.S. Swanson, J.M.Musser // In PCR Protocols for Emerging Infections Diseases, 1st edn ed. Persing, D.H. Washington, DC: ASM Press.– 1996. – P. 59-88.

228. Verrier, J. Diagnosis of Dermatophytosis Using Molecular Biology / J. Verrier, M. Monod // Mycopathologia. – 2017. – Vol. 182(1-2). – P. 193-202. doi:10.1007/s11046-016-0038-z.

229. Watanabe, S. Ringworm caused by *Trichophyton* in a cat and the owner / S. Watanabe // Japanese Journal of Medical Mycology.– Vol.10.– 1969.– P.232-233.

230. White, T.J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics /T.J. White, T. Bruns, S. Lee, J.W.Taylor // San Diego, CA: Academic Press; – 1990.– P. 315-322.

231. Yu, J. Molecular typing study of the *Microsporum canis* strains isolated from an outbreak of tinea capitis in a school / J. Yu, Z. Wan, W. Chen, W.Wang, R. Li // Mycopathologia. 2004. – Vol.157 (1). – P. 37-41.

232. Yamada, T. Terbinafine resistance of *Trichophyton* clinical isolates caused by specific point mutations in the squalene epoxidase gene / T. Yamada, M. Maeda,

M.M. Alshahni// Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2017; – Vol. 61(7). – P. 00115-00117.

233. Zrimšek, P. Detection by ELISA of the humoral immune response in rabbits naturally infected with *Trichophyton mentagrophytes* / P. Zrimšek, J. Kos, L. Pinter, M. Drobnič-Košorok // Veterinary Microbiology. – 1999. – Vol. 70, Is. 1-2. – P. 77-86.

ПРИЛОЖЕНИЯ

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

КАЗАХСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ  
БҒЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ  
ҒЫЛЫМ КОМИТЕТІНІҢ  
«БИОЛОГИЯЛЫҚ ҚАУІПСІЗДІК  
ПРОБЛЕМАЛАРЫНЫҢ ҒЫЛЫМИ-  
ЗЕРТТЕУ ИНСТИТУТЫ»  
ШАРУАШЫЛЫҚ ЖҮРГІЗУ  
ҚҰҚЫҒЫНДАҒЫ РЕСПУБЛИКАЛЫҚ  
МЕМЛЕКЕТТІК КӘСІПОРЫНЫ



РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
ПРЕДПРИЯТИЕ НА ПРАВЕ  
ХОЗЯЙСТВЕННОГО ВЕДЕНИЯ  
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ  
БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ»  
КОМИТЕТА НАУКИ  
МИНИСТЕРСТВА ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

080409, Жамбыл облысы, Қордай ауданы, Гвардейский құк  
Тел.: 8 (72636) 7-22-28, тел./факс: 8 (72636) 7-11-57  
e-mail: ribsp@biosafety.kz WEB: www.biosafety.kz

080409, Жамбылская область, Кордайский район, пгт Гвардейский  
Тел.: 8 (72636) 7-22-28, тел./факс: 8 (72636) 7-11-57  
e-mail: ribsp@biosafety.kz WEB: www.biosafety.kz

24.12.2013 № 09-05/1040

## СПРАВКА

о депонировании штамма «F-Mc-13» возбудителя *Microsporium canis*

Авторы: Кухар Е.В., Панченко Н.А., Шарипова А.М. (АО «Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина» МОН РК)

Штамм «F-Mc-13» возбудителя *Microsporium canis* выделен из патологического материала (пораженные волосы) больной кошки в 2012 г. доставленного из г. Астана.

Штамм «F-Mc-13» возбудителя *Microsporium canis* относится к семейству *Arthrodermataceae*, роду *Microsporium* и его предполагается использовать для получения специфических антигенов и тест-систем при диагностике дерматомикозов.

Дата депонирования 23.12.2013 г. Штамму «F-Mc-13» возбудителя *Microsporium canis* присвоен регистрационный номер М-58-13/D Коллекции микроорганизмов Республиканского государственного предприятия «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (080409, Жамбылская область, Кордайский район, п.г.т. Гвардейский. Тел.: (72636) 7-23-33, (72636) 7-22-28).

Генеральный директор  
РГП НИИПБ КН МОН РК

А. Сансызбай

Заведующий лабораторией  
коллекции микроорганизмов  
РГП НИИПБ КН МОН РК

М. Мамбеталиев

0003877



КАЗАХСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ  
БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ  
ҒЫЛЫМ КОМИТЕТІНІҢ  
“БИОЛОГИЯЛЫҚ ҚАУПСІЗДІК  
ПРОБЛЕМАЛАРЫНЫҢ ҒЫЛЫМИ-  
ЗЕРТТЕУ ИНСТИТУТЫ”  
ШАРУАШЫЛЫҚ ЖҮРГІЗУ  
ҚҰҚЫҒЫНДАҒЫ РЕСПУБЛИКАЛЫҚ  
МЕМЛЕКЕТТІК КӘСІПОРЫНЫ



РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
ПРЕДПРИЯТИЕ НА ПРАВЕ  
ХОЗЯЙСТВЕННОГО ВЕДЕНИЯ  
“НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ  
БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ”  
КОМИТЕТА НАУКИ  
МИНИСТЕРСТВА ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

080409, Жамбыл облысы, Кордай ауданы, Гвардейский құк  
Тел.: 8/72636/ 7-22-28  
e-mail: ribsp@biosafety.kz

080409, Жамбылская область, Кордайский район, п.г.т. Гвардейский  
Тел.: 8/72636/ 7-22-28  
e-mail: ribsp@biosafety.kz

14 12 20 14 ж.  
№ 09-06/1101

## СПРАВКА

о депонировании штамма «№428 *Microsporium canis*»

Авторы: Кухар Е.В., Киян В.С., Никулина А.И., Шарипова А.М.

Штамм «№428 *Microsporium canis*» возбудителя дерматофитии человека и животных выделен в 2014 году из патологического материала (пораженные волосы) больной кошки.

Штамм «№428 *Microsporium canis*» относится к роду *Microsporium*, виду *Microsporium canis* и его предполагается использовать в качестве контрольного и референтного штамма.

Дата депонирования 22.12.2014 г. Штамму «№428 *Microsporium canis*» присвоен регистрационный номер М-35-14/D Коллекции микроорганизмов Республиканского государственного предприятия «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (080409, Жамбылская область, Кордайский район, п.г.т. Гвардейский. Тел.: (72636) 7-23-33, (72636) 7-22-28).

Генеральный директор

А.Сансызбай

Заведующий лабораторией  
коллекции микроорганизмов

М.Мамбеталиев

## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Справки о депонировании в Genbank штаммов *Trichophyton benhamiae*

- [GenBank](#)

[Send to:](#)

**Trichophyton benhamiae isolate T.ben\_NB20 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence**

GenBank: OQ600605.1

[FASTA Graphics](#)

LOCUS OQ600605 498 bp DNA linear PLN 14-MAR-2023  
 DEFINITION Trichophyton benhamiae isolate T.ben\_NB20 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence.  
 ACCESSION OQ600605  
 VERSION OQ600605.1  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Trichophyton benhamiae  
 ORGANISM [Trichophyton benhamiae](#)  
 Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Onygenales; Arthrodermataceae; Trichophyton.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 498)  
 AUTHORS Smagulova,A.M., Glotova,T.I., Koteneva,S.V., Kukhar,Y.V. and Glotov,A.G.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (09-MAR-2023) microbiology and biotechnology, Kazakh Agro Technical University, Zhenis avenue, 62, Astsna 010000, Kazakhstan  
 COMMENT ##Assembly-Data-START##  
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing  
 ##Assembly-Data-END##  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..498  
 /organism="Trichophyton benhamiae"  
 /mol\_type="genomic DNA"  
 /isolate="T.ben\_NB20"  
 /isolation\_source="Lesions in the tail zones"  
 /host="Felis catus"  
 /db\_xref="taxon:63400"  
 /country="Kazakhstan: Astana"  
 /collection\_date="02-Dec-2021"  
[misc RNA](#) <1..>498  
 /note="contains internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, and internal transcribed spacer 2"

## ORIGIN

```

1  attaacgcgc aggccggagg ctggccccc acgatagga ccaacgttc gtcaggggtg
61  tgcagatgtg cgccggcctt acgcccatt cttgtctacc ttactcgggt gcctcggcgg
121 gccgcgctct cctgggagag tcgtccggcg agcctctttg ggggctttag ctggatcgcg
181 cccgccggag gacagacatc aaaaaatctt ggaaagctgt cagtctgagc gttagcaagt
241 aaaatcagtt aaaactttca acaacggatc tcttggttcc ggcacgatg aagaacgcag
301 cgaatgcga taagtaatgt gaattgcaga attccgtgaa tcatcgaatc tttgaacgca
361 cattgcgccc tctggtattc cggggggcat gcctgttcga gcgtcatttc aaccctcaa
421 gcccgcttg tgtgatggac gaccgtccgg cccctcttt cgggggcggg acgcgccgca
481 aaagcagtg ccaggccg

```

- [GenBank](#)

[Send to:](#)

**Trichophyton benhamiae isolate T.ben\_NB19 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence**

GenBank: OQ592797.1

[FASTA Graphics](#)[Go to:](#)

LOCUS OQ592797 478 bp DNA linear PLN 14-MAR-2023

DEFINITION Trichophyton benhamiae isolate T.ben\_NB19 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence.

ACCESSION OQ592797

VERSION OQ592797.1

KEYWORDS .

SOURCE Trichophyton benhamiae

ORGANISM [Trichophyton benhamiae](#)

Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Onygenales; Arthrodermataceae; Trichophyton.

REFERENCE 1 (bases 1 to 478)

AUTHORS Smagulova,A.M., Glotova,T.I., Koteneva,S.V., Kukhar,Y.V. and Glotov,A.G.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (09-MAR-2023) microbiology and biotechnology, Kazakh Agro Technical University, Zhenis avenue, 62, Astsna 010000, Kazakhstan

COMMENT ##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..478

/organism="Trichophyton benhamiae"

/mol\_type="genomic DNA"

/isolate="T.ben\_NB19"

/isolation\_source="Lesions in the ear zones"

/host="Felis catus"

/db\_xref="taxon:63400"

/country="Russia: Novosibirsk"

/collection\_date="02-Dec-2021"

[misc RNA](#)

&lt;1..&gt;478

/note="contains internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, and internal transcribed spacer 2"

ORIGIN

```

1  ggcccccca cgataggag accaacgtt cgtcagggg tgtgcagtat gtgcgccggc
61  cttacgccc attcttgtt accttactc gttgcctcg cggcccgcg tctcctggga
121 gagtcgtcc gcgagcctt ttgggggct tagctggatc gcgcccgcc gaggacagac
181 atcaaaaaa cttgaaaag tgtcagtcg agcgtagca agtaaatca gttaaaactt
241 tcaacaacg atctcttgg tccgcatcg atgaagaac cagcgaaatg cgataagtaa
301 tgtgaattg agaattccg gaatcatcg atctttgaa gcacattgcg ccctctggta
361 ttccggggg catgcctgt cgagcgtca ttcaaccct caagccggc ttgtgtgatg
421 gacgaccgtc cggccccctc tttcggggg gggacgcgc cgaaaagcag tggccagg

```

//

## ПРИЛОЖЕНИЕ В

Протокол постановки полимеразной цепной реакции с ДНК возбудителей  
дерматомикозов

Компоненты	Расчет на 1 образец	Программа для <i>M. canis</i>	Программа для <i>T. benhamiae</i>	
PCR- mix				
Buffer ×10	5 µl	95°C - 3 мин	95°C - 3 мин	
MgCl <sub>2</sub> (2,5 mM)	1.5 µl	95°C - 15 сек	95°C - 15 сек	35 циклов
dNTP (2 mM)	1 µl	59°C - 30 сек	57,5°C - 30 сек	
Primer ITS 1-F; ITS 4-F	0,8 µl	72°C - 45 сек	72°C - 45 сек	
Primer ITS 4-R; ITS 5-R	0,8 µl	72°C - 5 мин	72°C - 5 мин	
Taq-polymerase	0,25 µl	10°C - ∞	10°C - ∞	
MQ-water	13.65µl	-	-	
Matrix DNA	2 µl	-	-	

Детекцию результатов ПЦР-анализа проводят в 1,5% агарозном геле, забуференном 0,5× TBE (4,5 mM Tris, 4,5 mM борной кислоты и 1 mM EDTA, pH 8), окрашивали бромидом этидия.

## ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Патенты, полученные Смагуловой (Шариповой) А.М.



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) KZ (13) В (11) 30026

(51) A61K 39/40 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

## К ПАТЕНТУ

(21) 2013/1797.1

(22) 29.11.2013

(45) 15.06.2015, бюл. №6

(72) Кухар Елена Владимировна (KZ); Киян Владимир Сергеевич (KZ); Шарипова Айнуур Муратовна (KZ); Глотова Татьяна Ивановна (RU); Тугунова Татьяна Борисовна (RU); Паламарчук Анна Владимировна (KZ)

(73) Акционерное общество "Казахский агротехнический университет им. Сакена Сейфуллина"

(56) KZ 20706 A4, 15.01.2009

KZ 20406 A, 15.12.2008

RU 94029852 A, 27.09.1995

RU 98104502 A, 20.02.2000

(54) СПОСОБ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ МИКРОСПОРИИ ПЛОТЯДНЫХ

(57) Изобретение относится к ветеринарии, а именно к диагностике инфекционных болезней животных.

Технической задачей способа является разработка ИФА для совершенствования диагностики микроспории плотоядных, которая

достигается тем, что при постановке реакции в качестве антигена для сенсibilизации планшета используют антиген, выделенный из возбудителя микроспории гриба *Microsporium canis* №М-58-13/D, а выявление в сыворотке крови кошек и собак, специфичных к названному антигену, антител класса IgG, образование которых характерно для микроспории, осуществляют с помощью меченных ферментом иммуноглобулинов кролика против видового анти-IgG. Результаты ИФА проявляют хромогеном и оценивают спектрофотометрически или визуально. Положительными считают пробы сывороток крови, средняя величина ОП которых не менее чем в 2 раза превосходит среднюю ОП отрицательного контроля.

Процент выявления больных животных по клиническим признакам составил 30%, в РМА - 74%, в предлагаемом ИФА - 88%. Титры антител иммунизированных животных равны 1:100-1:800, у больных кошек - 1:200-1:6400, у больных собак - 1:800-1:3200.

Использование предлагаемого варианта ИФА позволит повысить качество диагностики микроспории.

(19) KZ (13) В (11) 30026



(19) **МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

(12) **ПАТЕНТ**

(11) **№ 30172**

**НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(54) **НАЗВАНИЕ:** Штамм гриба *Microsporium canis* F-МС-13, используемый для получения специфических антигенов и антител при разработке методов диагностики микроспории плотоядных

(73) **ПАТЕНТООБЛАДАТЕЛЬ:** Акционерное общество "Казахский агротехнический университет имени Сакена Сейфуллина"

(72) **АВТОР (АВТОРЫ):** Кухар Елена Владимировна; Панченко Надежда Александровна; Шарипова Айнур Муратовна; Никулина Анастасия Игоревна

(21) **Заявка № 2014/0017.1**

(22) **Дата подачи заявки 10.01.2014**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Республики Казахстан 19.06.2015г.

Действие патента распространяется на всю территорию Республики Казахстан при условии своевременной оплаты поддержания патента в силе.

**Заместитель министра юстиции  
Республики Казахстан**

**Э. Азимова**

Сведения о внесении изменений приводятся на отдельном листе в виде приложения к настоящему патенту

(19)  Евразийское патентное ведомство (11) 029205 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента 2018.02.28 (51) Int. Cl. G01N 33/547 (2006.01)  
C12N 1/14 (2006.01)  
C12Q 1/28 (2006.01)

(21) Номер заявки 201400374

(22) Дата подачи заявки 2013.12.27

(54) СПОСОБ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ МИКРОСПОРИИ ПЛОТЯДНЫХ

(31) 2013/1797.1 (56) BAGUT E.T. et al. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Serodiagnosis of Ringworm Infection in Cattle. Clinical and Vaccine Immunology, August 2013, Vol. 20, No. 8, p. 1150-1154  
KZ-A-20406

(32) 2013.11.29

(33) KZ

(43) 2015.06.30

(96) KZ2013/055 (KZ) 2013.12.27

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
АКЦИОНЕРНОЕ  
ОБЩЕСТВО "КАЗАХСКИЙ  
АГРОТЕХНИЧЕСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ САКЕНА  
СЕЙФУЛЛИНА" (KZ)

(72) Изобретатель:  
Кухар Елена Владимировна, Киян  
Владимир Сергеевич, Шарипова  
Айнур Муратовна (KZ), Глотова  
Татьяна Ивановна, Тугунова Татьяна  
Борисовна (RU), Паламарчук Анна  
Владимировна (KZ)

(57) Изобретение относится к ветеринарии, а именно к диагностике инфекционных болезней животных. Технической задачей способа является разработка иммуноферментного анализа для совершенствования диагностики микроспории плотоядных, которая достигается тем, что при постановке реакции в качестве антигена для иммобилизации полистиролового планшета используют антиген клеточной стенки гриба *Microsporium canis* № 13, регистрационный № М-58-13/ D, а выявление в сыворотке крови кошек и собак, специфичных к названному антигену, антител класса IgG, образование которых характерно для инфекционного процесса при микроспории, осуществляют с помощью меченных ферментом иммуноглобулинов кролика против видового анти-IgG. Результаты ИФА проявляют хромогеном и оценивают спектрофотометрически или визуально. Положительными считают пробы сывороток крови, средняя величина оптической плотности которых не менее чем в 2 раза превосходит среднюю оптическую плотность отрицательной контрольной сыворотки.

029205 B1

029205 B1

## ПРИЛОЖЕНИЕ Д

«С.СЕЙФУЛЛИН атындағы ҚАЗАК  
АГРОТЕХНИКАЛЫҚ ЗЕРТТЕУ  
УНИВЕРСИТЕТІ» КОММЕРЦИЯЛЫҚ  
ЕМЕС АКЦИОНЕРЛІК ҚОҒАМЫ



**SEIFULLIN**  
UNIVERSITY

NON-COMMERCIAL  
JOINT STOCK COMPANY  
«SAKEN SEIFULLIN KAZAKH  
AGROTECHNICAL RESEARCH  
UNIVERSITY»

010011, Астана қаласы, Жәніс данғылы, 62-үй  
Тел.: (7172) 393-918, факс: (7172) 316-072  
e-mail: office@kazatu.edu.kz, www.kazatu.edu.kz

010011, Astana city, Zhenis avenue  
tel.: (7172) 393-918, fax: (7172) 316-072  
e-mail: office@kazatu.edu.kz, www.kazatu.edu.kz

С.С. Сейфуллин, № 1/15/19-1/38  
№ \_\_\_\_\_ ге

**СПРАВКА  
О ВНЕДРЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ НИР СМАГУЛОВОЙ А.М.  
В НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ПРОЦЕСС**

Результаты научно-исследовательской работы соискателя Смагуловой А.М., м.т.н., ведущего научного сотрудника НАО «Казахского агротехнического исследовательского университета им. С.Сейфуллина», полученные в ходе выполнения диссертационной работы «Фенотипические и молекулярно-генетические свойства возбудителей дерматомикозов мелких домашних и диких плотоядных животных» раскрывают особенности биологических свойств патогенных возбудителей трихофитии и микроспории плотоядных, описывают характеристику нового возбудителя трихофитии кошек *T. benhamiae*, впервые выделенного на территории Сибири и Северного Казахстана.

Материалы исследований, отраженные в научных статьях и учебных пособиях, методических рекомендациях по совершенствованию диагностики дерматомикозов, используется в научно-исследовательском процессе сотрудниками Научно-исследовательской платформы сельскохозяйственной биотехнологии при выполнении заданий в рамках грантового финансирования, в учебном процессе при чтении лекций и проведении лабораторно-практических занятий по дисциплинам «Микробиология», «Биотехнология микроорганизмов», «Биотехнология грибов», на кафедре «Микробиологии и биотехнологии» факультета ветеринарии и технологии животноводства.

**И.о. Член Правления – Проректор  
по научной и инновационной  
деятельности**

**С.К. Омаров**

0000818



«ҰЛТТЫҚ БИОТЕХНОЛОГИЯ  
ОРТАЛЫҒЫ»  
ЖАУАПКЕРШІЛІГІ ШЕКТЕУЛІ  
СЕРІКТЕСТІГІ

010000, Астана қ., Есіл ауданы,  
Корғалжын тас жолы, 13/5  
телефон: +7(7172) 70-75-65  
e-mail: info@biocenter.kz



ТОВАРИЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ  
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР  
БИОТЕХНОЛОГИИ»

010000, г. Астана, Есильский район,  
Шоссе Корғалжын, 13/5  
телефон: +7(7172) 70-75-65  
e-mail: info@biocenter.kz

№ 01.01/2/4-650-1

«12» 12 2023 ж.

### СПРАВКА О ВНЕДРЕНИИ результатов исследовательской работы в научную деятельность

Соискателем ученой степени кандидата биологических наук, м.т.н. Смагуловой А.М. в рамках выполнения диссертационной работы проведен анализ биологических свойств и генетическая идентификация возбудителей дерматомицетов, выделенных от домашних и диких животных в период с 2012 по 2023 годы.

В результате проведенных исследований были разработаны питательная среда, обогащенная кератином для выявления кератинолитических свойств дерматомицетов; получен цветной антиген для разработки экспресс-теста на выявление возбудителя микроспории; подобраны праймеры, позволяющие достоверно идентифицировать дерматомицеты до вида; модифицирован метод выделения ДНК с высоким выходом нуклеиновых кислот; проведена отработка параметров постановки ПЦР-анализа для молекулярно-генетической идентификации дерматомицетов; депонированы 23 последовательности ДНК возбудителей дерматомикозов домашних, сельскохозяйственных и диких животных в базе данных NCBI.

Отработанные соискателем Смагуловой А.М. методы исследований и полученные научные данные отражены в методических рекомендациях, научных статьях отечественных журналов рекомендованных КОКНВО и зарубежных изданиях, входящих в базу данных Web of Science и Scopus.

Разработанные протокола микробиологических исследований, иммунологических реакций и молекулярно-генетической идентификации микозов внедрены в научный процесс лаборатории биоразнообразия и генетических ресурсов Национального центра биотехнологии.

Управляющий директор по науке,  
к.б.н., профессор

Огаев В.Б.

Заведующий лабораторией биоразнообразия  
и генетических ресурсов,  
PhD, ассоциированный профессор

Киян В.С.



КАЗАКСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ  
ДЕНСАУЛЫҚ САҚТАУ МИНИСТРЛІГІ

“АСТАНА МЕДИЦИНА  
УНИВЕРСИТЕТІ”  
КОММЕРЦИЯЛЫҚ ЕМЕС  
АКЦИОНЕРЛІК ҚОҒАМЫ



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

НЕКОММЕРЧЕСКОЕ  
АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО  
“МЕДИЦИНСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ АСТАНА”

БИН 080940008218, КБс: 16, ИИК: KZ676010111000020760 в АО “Народный Банк Казахстана”, БИК: HSBKZKX

Казахстан Республикасы, 010000, Астана қ., Сарыарқа даңғылы, 95(33)  
Тел: +7 (7172) 53-94-24, e-mail: rektorai@amu.kz

Республика Казахстан, 010000, г. Астана, проспект Сары-Арка, 95(33)  
Тел: +7 (7172) 53-94-24, e-mail: rektorai@amu.kz

95(33), Saryarka str. Astana, 010000, Republic of Kazakhstan  
Tel: +7 (7172) 53-94-24, e-mail: rektorai@amu.kz

№ 4.1.1.-01

2024 ж. «08» сәуіре

Справка  
о внедрении результатов НИР Смагуловой А.М.  
в научно-исследовательский процесс

Результаты научно-исследовательской работы Смагуловой А.М., полученные в ходе выполнения диссертационной работы «Фенотипические и молекулярно-генетические свойства возбудителей дерматомикозов мелких домашних и диких плотоядных животных» дополняют научные данные о биологических свойствах патогенных и условно-патогенных грибов – зооантропонозных возбудителей трихофитии и микроспории плотоядных, раскрывают возможность совершенствования имеющихся методов идентификации дерматомицетов классическими и современными методами.

Материалы исследований, отраженные в научных статьях, методических рекомендациях по совершенствованию диагностики дерматомикозов, учебных пособиях используется в научно-исследовательском процессе при выполнении заданий в рамках грантового финансирования сотрудниками кафедры, в учебном процессе при чтении лекций и проведении лабораторно-практических занятий по дисциплинам «Микробиология», «Биотехнология микроорганизмов», «Медицинская микология», «Биотехнология микозов», «Экологическая микология» и «Прикладная микология» на кафедре «Микробиологии и вирусологии им. Ш.И. Сарбасовой».

Проректор по научной работе и  
стратегическому развитию  
НАО «Медицинский университет Астана»

В. Койков

003567

ПРИЛОЖЕНИЕ Е  
Методические рекомендации



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР АГРОБИОТЕХНОЛОГИЙ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

**А.М. Смагулова, Т.И. Глотова,  
Е.В. Кухар, В.С. Киян, А.Г. Готов**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ  
ПО ВЫДЕЛЕНИЮ И ИДЕНТИФИКАЦИИ  
*TRICHOPHYTON VENHAMIAE* – ВОЗБУДИТЕЛЯ  
ДЕРМАТОМИКОЗОВ КОШЕК**

АГРО  НАУКА  
ИЗДАТЕЛЬСТВО

Новосибирск 2023

УДК: УДК 619:616.5-002.828:579.62:636.8(083.132)  
 ББК 48.735я8+48.715.4я8  
 М54

- М54 Методические рекомендации по выделению и идентификации *Trichophyton benhamiae* – возбудителя дерматомикозов кошек: методические рекомендации / Смагулова А.М., Глотова Т.И., Кухар Е.В., Киян В.С., Глотов А.Г.; СФНЦА РАН. – Новосибирск: СФНЦА РАН, 2023. – 45 с.

**Рецензенты:**

доктор ветеринарных наук, академик РАН К.А. Лайшев,  
 доктор сельскохозяйственных наук Ю.Г. Юшков

Рассмотрены и утверждены ученым советом СФНЦА РАН  
 (протокол № 1 от 16.02.2023)

ISBN 978-5-6049742-4-7

В методических рекомендациях дана характеристика *Trichophyton benhamiae* – возбудителя дерматомикозов животных. Описаны биологические свойства штаммов *T. benhamiae*, клинический случай дерматомикоза у кошек, вызванный данным возбудителем, выявленный в России впервые, а также культурально-морфологические, биологические и генетические свойства штаммов *T. benhamiae*, выделенных в России, и даны рекомендации по диагностике дерматомикозов, вызванных *T. benhamiae*.

Рекомендации предназначены для студентов вузов по специальности «Ветеринария», а также аспирантов, сотрудников НИУ и диагностических лабораторий и врачей ветеринарных клиник.

Рис. 13 Табл. 5 Библиограф. 29 назв.

УДК: УДК 619:616.5-002.828:579.62:636.8(083.132)  
 ББК: 48.735я8+48.715.4я8

ISBN978-5-6049742-4-7

© СФНЦА РАН, 2023

© А.М. Смагулова, Т.И. Глотова,

Е.В. Кухар, В.С. Киян, А.Г. Глотов, 2023

## СОДЕРЖАНИЕ

Термины, определения .....	4
Перечень сокращений.....	7
Введение .....	8
1. Характеристика <i>Trichophyton benhamiae</i> – возбудителя дерматомикозов кошек .....	10
2. Биологические свойства <i>Trichophyton benhamiae</i> .....	13
3. Первый клинический случай дерматомикоза кошек в России, вызванный <i>T. benhamiae</i> .....	18
4. Биологическая и генетическая характеристика штаммов <i>T. benhamiae</i> , выделенных в России .....	21
5. Рекомендации по диагностике дерматомикозов, вызванных <i>T. benhamiae</i> .....	31
Золотой стандарт диагностики микозов.....	31
Серологическая диагностика дерматомикозов.....	34
Заключение .....	39
Список литературы.....	41

## ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

Штаммы *M. canis*, выделенные от животных  
А) от кошек



№3



№5



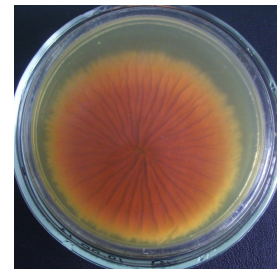
№8



№12



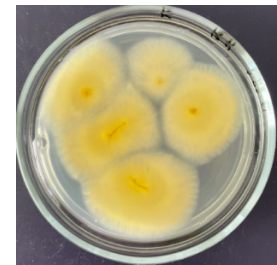
№13



№19



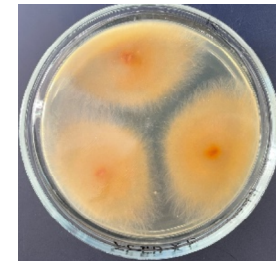
№21



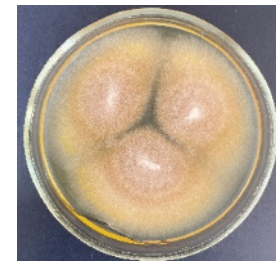
№25

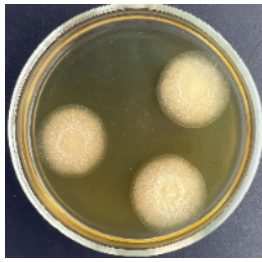


№26

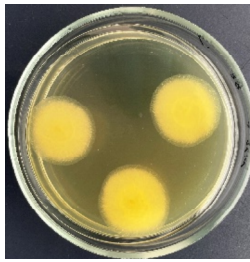


№35





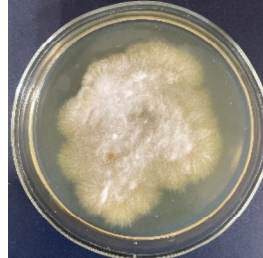
№38



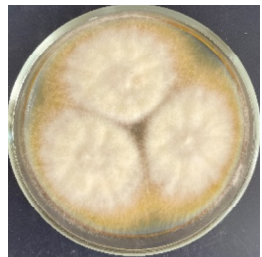
№52



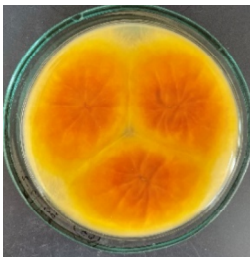
№61



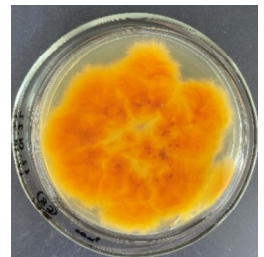
№62



№65



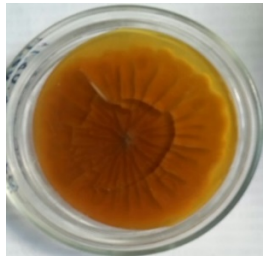
№68



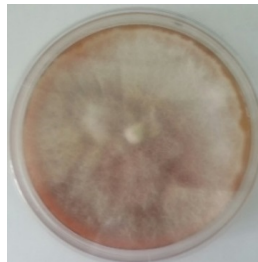
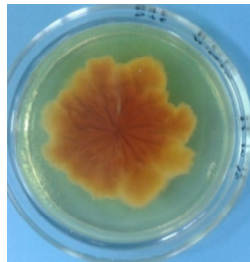
№284



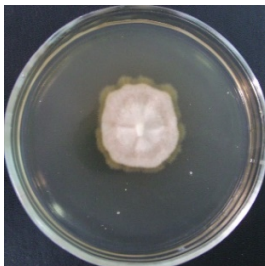
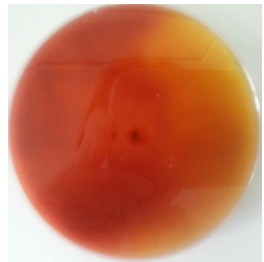
№327



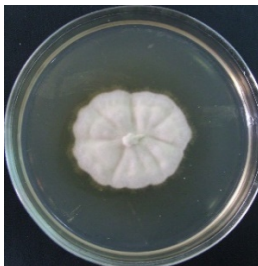
№376



№384



№426



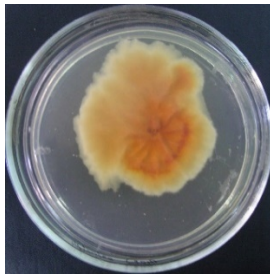
№427



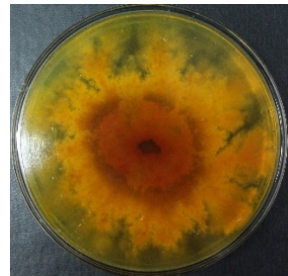




№428



№431



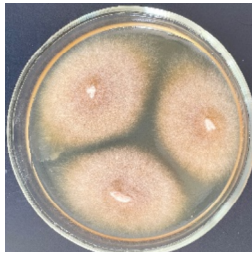
№436



№441



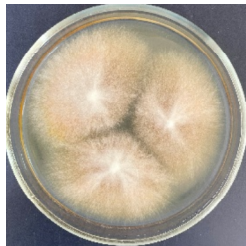
Б) от собак



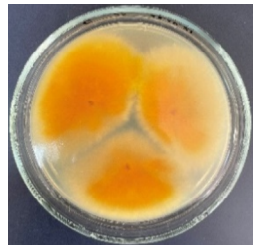
№27



№29



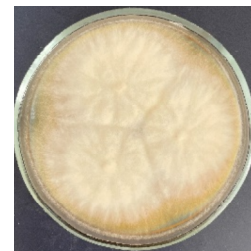
№33



№48



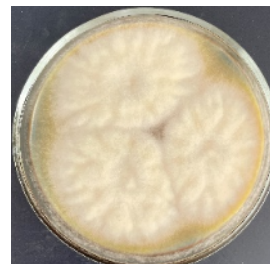
№53



№57



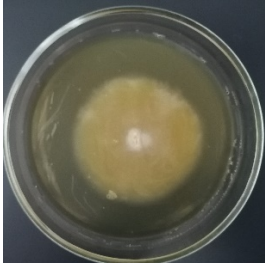
№58



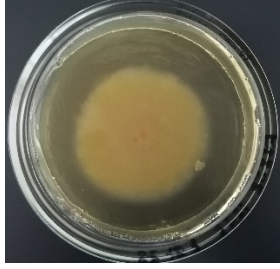
№64



В) от тигра



№438 с крови

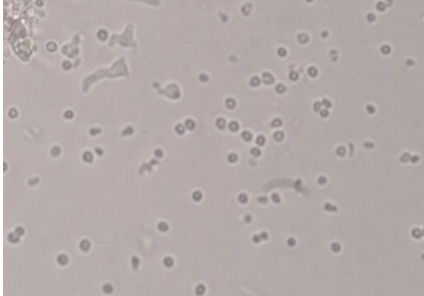
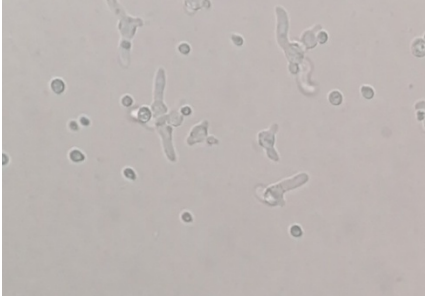



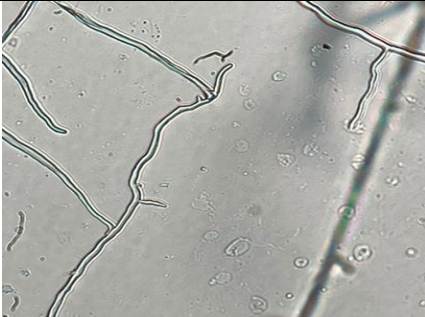








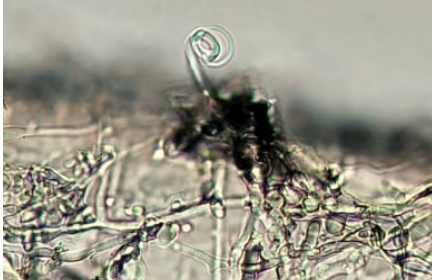

№439 с шерсти











## Приложение 3

Микроморфология штаммов *T.benhamiae*

Структурный элемент	Штамм <i>T.benhamiae</i> №19	Штамм <i>T.benhamiae</i> №20
Споры и образование ростовых трубок к концу первых суток		
Прямой мицелий		
Извитой мицелий		
«Мостики» между гифами		
Макроконидии		

Микроконидии			
«Спирали» и «завитки»			

Споровые структуры штаммов *T.benhamiae*

Структурный элемент	Штамм <i>T.benhamiae</i> №19	Штамм <i>T.benhamiae</i> №20
Артроспоры		
Артроспоры		
Гроздевидные скопления спор		
Хламидоспоры		

## Приложение К

## Результаты молекулярно-генетической идентификации дерматомицетов

№ культуры	Последовательность фрагмента 16S r RNA гена	Идентификация нуклеотидных последовательностей в международной базе данных ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a> ) алгоритм BLAST	
		Наименование штамма	% совпадения
3	AACGTCTCCCCCGGGCCTCCCGGGGAGGTTGCGGGCGGCG AGGGGTGCCTCCGGCCGCACGCCATTCTTGTCTACTGACCC GGTTGCCTCGGCGGGGCCGCGCCTGCTTGTGCTACAGCGGCC GTTCGGGGGGGACGCCTGAGGGGACTCTTGTTTCCTAGGCC ACGCCCCGGGCAGCGCTCGCCGGAGGATTACTCTGGAAAACA CACTCTTGAAGAACAATACCGTCTGAGCGAGCAACGCAAATC AGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGA TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG AATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCC CTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAAC CCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCCC	<i>Microsporum canis</i>	100
5	AACGCGGCAGAGGTCGAAGTTGGCCCCGAAGCTCTTCCGTC TCCCCCGGGCCTCCCGGGGAGGTTGCGGGCGGCGAGGGGT GCCTCCGGCCGCACGCCATTCTTGTCTACTGACCCGGTTGCC TCGGCGGGCCGCGCCTGCTGTGCTACAGCGGCCGTTCCGGGGG GGACGCCTGAGGGGACTCTTGTTCCAGGCCACGCCCCGGG CAGCGCTCGCCGGAGGATTACTCTGGAAAACACACCGAAAG AACATACCGCGAGCGAGCAACGCAAATCAGAAAACCTTTCAA CAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA AATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATC GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGG CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCGGCTTG TGTGATGGACGACCGTCC	<i>Microsporum canis</i>	100
8	TTAACGCGCAGAGGTCGAAGTTGGCCCCGAAGCTCTTCCGT CTCCCCCGGGCCTCCCGGGGAGGTTGCGGGCGGCGAGGGG TGCCTCCGGCCGCACGCCATTCTTGTCTACTGACC CGGTTGCCTCGGCGGGGCCGCGCCTGCTGTGCTACAGCGGCCG TTCGGGGGGGACGCCTGAGGGGACTCTTGTTTCCTAGGCCA CGCCCCGGGCAGCGCTCGCCGGAGGATTACTCTGGA AAACACACTCTTGAAGAACAATACCGTCTGAGCGAGCAACGC AAATCAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGC ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT TGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC GCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATT TCAACCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCCC CCTCCCCAGTAACCACCCACCGCTTAGGGGG	<i>Microsporum canis</i>	100

21	<p>GGGAGGTTGCGGGCGGCGAGGGTGCCTCCGGCCGCACGCC  CATTCTTGTCTACTGACCCGGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCCTG  CTGTGCTACAGCGGCCGTTCCGGGGGGGACGCCTGA  GGGGACTCTTGTTCCTAGGCCACGCCCCGGGCAGCGCTCG  CCGGAGGATTACTCTGGAAAACACACTCTTGAAAGAACATAC  CGTCTGAGCGAGCAACGCAAATCAGTTAAACTTTCAACAAC  GGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG  CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAAT  CTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATG  CCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCCCAGCTTGTGTG  ATGGACGACCGTCCCCCTCCCAGTAACCACCCACCGCTTA  GGGGGTGGGAGGGAGGGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGT  CAGGCCGCGATTCCGGCTCCTGGGCGAATGGGACATACCACC  GCCTCCAGGACCGGCCGGCAGGCTGGCCTAACGCACCATGTT  AC</p>	<i>Microsporum canis</i>	100
22	<p>AACGCGCAAGAGGTCTGAAGTTGGCCCCGAAGCTCTTCCGTC  TCCCCCGGGCCCCGGGGAGGTTGCGGGCGGCGAGGGGT  GCCTCCGGCCGCACGCCATTCTTGTCTACGACCCGG  TTGCCTCGGCGGGCCGCGCCTGCTGTGCTACAGCGGCCGTTT  GGGGGGGACGCCTGAGGGGGACTCTTGTTCCTAGGCCACGC  CCGGGCAGCGCTCGCCGGAGGATTACTCTGGAAAA  CACACTCTTGAAAGAACATACCGTCTGAGCGAGCAACGCAAA  TCAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCG  ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGAATGTGAATTGCAG  AATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCC  CTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAAC  CCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCCCCTCC  CCAGTAACCACCCACCGCTTA</p>	<i>Microsporum canis</i>	100
27	<p>TTAACGCGCAGAGGTCTGAAGTTGGCCCCGAAGCTCTTCCGT  CTCCCCCGGGCCTCCCGGGAGGTTGCGGGCGGCGAGGGG  TGCCTCCGGCCGCACGCCATTCTTGTCTACTGACCCGGTTGC  CTCGGCGGGCCGCGCCTGCTGTGCTACAGCGGCCGTTCCGGG  GGGACGCCTGAGGGGGACTCTTGTTCCTAGGCCACGCCCCG  GGCAGCGCTCGCCGGAGGATTACTCTGGAAAACACACTCTTG  AAAGAACATACCGTCTGAGCGAGCAACGCAAATCAGTTAAA  ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAA  CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGT  GAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATT  CCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAG  CCGGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCCCCTCCCAGTAAC  CACCCACCGCTTAGGGGGGTGGGAGGGA</p>	<i>Microsporum canis</i>	100

29	<p>GCAGAGGTCGAAAGTTGGCCCCGAAGCTCTTCCGTCTCCCC          CCGGGCCTCCCGGGGAGGTTGCGGGCGGCGAGGGGTGCCTC          CGGCCGCACGCCATTCTTGTCTACTGACCCGGTTG          CCTCGGCGGGCCGCGCCTGCTGTGCTACAGCGGCCGTTCCGGG          GGGGACGCCTGAGGGGGACTCTTGTTCCTAGGCCACGCCCC          GGGCAGCGCTCGCCGGAGGATTACTCTGGAAAACAC          ACTCTTGAAAGAACATAACCGTCTGAGCGAGCAACGCAAATCA          GTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGAT          GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGA          ATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCT          GGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCC          CTCAAGCCC GGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCCCCTCCCC          AGTAACCACCCACCGCTTAGGGG</p>	<i>Microsporium canis</i>	100
33	<p>GATCATTACGCGCAAGAGGTCGAAGTTGGCCCCGAAGCTCT          TCCGTCTCCCCCGGGCCTCCCGGGGAGGTTGCGGGCGGCG          AGGGGTGCCTCCGGCCGCACGCCATTCTTGTCTACTGACCC          GGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCCTGCTGTGCTACAGCGGCCGT          TCGGGGGGACGCCTGAGGGGGACTCTTGTTCCTAGGCCAC          GCCCCGGGCAGCGCTCGCCGGAGGATTACTCTGGAAAACACA          CTCTTGAAAGAACATAACCGTCTGAGCGAGCAACGCAAATCAG          TTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATG          AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAA          TTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTG          GCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCC          TCAAGCCC GGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCCCCTCCCCA          GTAACCACCCACCGCTTA</p>	<i>Microsporium canis</i>	100
35	<p>TTACGCGCAGAGGTCGAAAGTTGGCCCCGAAGCTCTTCCGT          CTCCCCCGGGCCTCCCGGGGAGGTTGCGGGCGGCGAGGGG          TGCCTCCGGCCGCACGCCATTCTTGTCTACTGACCCGGTTGC          CTCGGCGGGCCGCGCCTGCTGTGCTACAGCGGCCGTTCCGGG          GGGACGCCTGAGGGGGACTCTTGTTCCTAGGCCACGCCCCG          GGCAGCGCTCGCCGGAGGATTACTCTGGAAAACACACTCTTG          AAAGAACATAACCGTCTGAGCGAGCAACGCAAATCAGTAAA          ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAA          CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGT          GAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATT          CCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAG          CCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCCCCTCCCCAGTAAC          CACCCACCGCTTAGGG</p>	<i>Microsporium canis</i>	100
48	<p>TTACGCGCAAGAGGTCGAAGTTGGCCCCGAAGCTCTTCCGT          CTCCCCCGGGCCTCCCGGGGAGGTTGCGGGCGGCGAGGGG          TGCCTCCGGCCGCACGCCATTCTTGTCTACTGACC          CGGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCCTGCTGTGCTACAGCGGCCG          TTCGGGGGGGACGCCTGAGGGGGACTCTTGTTCCTAGGCCA          CGCCCCGGGCAGCGCTCGCCGGAGGATTACTCTGGA          AAACACACTCTTGAAAGAACATAACCGTCTGAGCGAGCAACGC          AAATCAGTAAA ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGC          ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT          TGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC          GCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATT          TCAACCCCTCAAGCCC GGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCCC          CCTCCCCAGTAACCACCCACCGCTTAGGG</p>	<i>Microsporium canis</i>	100



53	<p>TTAACGCGCAAGAGGTCGAAGTTGGCCCCGAAGCTCTTCCG  TCTCCCCCGGGCCTCCCGGGGAGGTTGCGGGCGGCGAGGG  GTGCCTCCGGCCGCACGCCATTCTTGTCTACTGAC  CCGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCCTGCTGTGCTACAGCGGCC  GTTTCGGGGGGGACGCCTGAGGGGGACTCTTGTTTCCTAGGCC  ACGCCCCGGGCAGCGCTCGCCGGAGGATTACTCTGG  AAAACACACTCTTCAAAGAACAACATACCGTCTGAGCGAGCAAC  GCAAATCAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCG  GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA  ATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT  GCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCA  TTTCAACCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCC  CTCCTCCCAGTAACCACCACCGCTTAGGGGGG</p>	<i>Microsporum canis</i>	100
57	<p>TCTCCCCCGGGCCTCCCGGGGAGGTTGCGGGCGGCGAGGGG  TGCCTCCGGCCGCACGCCATTCTTGTCTACTGACCCGGTTGC  CTCGGCGGGCCGCGCCTGCTGTGCTACAGCGGCCG  TTCGGGGGGGACGCCTGAGGGGGACTCTTGTTTCCTAGGCCA  CGCCCCGGGCAGCGCTCGCCGGAGGATTACTCTGGAAAACAC  ACTCTTCAAAGAACAACATACCGTCTGAGCGAGCAACGC  AAATCAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGC  ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT  TGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC  GCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATT  TCAACCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCCC  CCTCCCCAGTAACCACCACCGCTTAGGGGGGTGGGAGGGAG  GGGGACGCGCCGAAAAGCAGTGGTCAGGCCGCGATTCCGG  CTCCTGGGCGAATGGGACATAACCACCGCCTCCAGGACCGGCC  GGCAGGCTGGCCTAACGC</p>	<i>Microsporum canis</i>	100
58	<p>TTAACGCGCAAGAGGTCGAAGTTGGCCCCGAAGCTCTTCCG  TCTCCCCCGGGCCTCCCGGGGAGGTTGCGGGCGGCGAGGG  GTGCCTCCGGCCGCACGCCATTCTTGTCTACTGAC  CCGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCCTGCTGTGCTACAGCGGCC  GTTTCGGGGGGGACGCCTGAGGGGGACTCTTGTTTCCTAGGCC  ACGCCCCGGGCAGCGCTCGCCGGAGGATTACTCTGG  AAAACACACTCTTCAAAGAACAACATACCGTCTGAGCGAGCAAC  GCAAATCAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCG  GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA  ATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT  GCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCA  TTTCAACCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCC  CTCCTCCCAGTAACCACCACCGCTTAGGGGGG</p>	<i>Microsporum canis</i>	100
61	<p>TCTCCCCCGGGCCTCCCGGGGAGGTTGCGGGCGGCGAGGG  GTGCCTCCGGCCGCACGCCATTCTTGTCTACTGACCCGGTTG  CCTCGGCGGGCCGCGCCTGCTGTGCTACAGCGGCCGTTCCGGG  GGGGACGCCTGAGGGGGACTCTTGTTTCCTAGGCCACGCCCC  GGGCAGCGCTCGCCGGAGGATTACTCTGGAAAACACACTCTT  GAAAGAACAACATACCGTCTGAGCGAGCAACGAAATCAGTTAA  AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGA  ACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCG  TGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATT  CCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCACCCCTCAAG  CCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCCCCTCCCAGTAAC  CACCCACCGCTTAAGGGGGTGGGA</p>	<i>Microsporum canis</i>	100

64	<p>AACGCGCAGAGGTCGAAGTTGGCCCCGAAGCTCTTCCGTCT  CCCCCGGGCCTCCCGGGGAGGTTGCGGGCGGCGAGGGGT  GCCTCCGGCCGCACGCCATTCTTGTCTACTGACCCG  GTTGCCTCGGCGGGCCGCGCCTGCTGTGCTACAGCGGCCGTT  CGGGGGGACGCCTGAGGGGGACTCTTGTTTCCTAGGCCACG  CCCCGGGCAGCGCTCGCCGGAGGATTACTCTGGAAA  ACACACTCTTGAAAGAACATAACCGTCTGAGCGAGCAACGCAA  ATCAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATC  GATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC  AGAATTCGGTGAATCATCGAATCTTGAACGCACATTGCGCC  CCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCA  ACCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCCCCT  CCCAGTAACCACCCAC</p>	<i>Microsporum canis</i>	100
68	<p>ACGCGCAGAGGTCGAAGTTGGCCCCGAAGCTCTTCCGTCTC  CCCCCGGGCCTCCCGGGGAGGTTGCGGGCGGCGAGGGGTG  CCTCCGGCCGCACGCCATTCTTGTCTACTGACCCGG  TTGCCTCGGCGGGCCGCGCCTGCTGTGCTACAGCGGCCGTT  GGGGGGGACGCCTGAGGGGGACTCTTGTTTCCTAGGCCACGC  CCCGGGCAGCGCTCGCCGGAGGATTACTCTGGAAAA  CACACTCTTGAAAGAACATAACCGTCTGAGCGAGCAACGCAA  TCAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCG  ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCA  GAATTCGGTGAATCATCGAATCTTGAACGCACATTGCGCCC  CCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAA  CCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCCCCTC  CCCAGTAACCACCCACCGCTTAGGG</p>	<i>Microsporum canis</i>	100
376	<p>CCCTTTAATAGTTACATGCGGAGATCATTAAACGCGCAAGAG  GTCGAAGTTGGCCCCGAAGCTCTTCCGTCTCCCCCGGGCC  CCGGGGAGGTTGCGGGCGGCGAGGGGTGCCTCCGGCCGCAC  GCCATTCTTGTCTACTGACCCGGTTGCCTCGGCGGGCCGCGC  CTGCTGTGCTACAGCGGCCGTTCCGGGGGGACGCTCGCACGG  GGAATCTTGTTTCCTAGGCCACGCCCCGGGCAGCGCTCGCCG  GAGGATTACTCTGGAAAACACTCTTGAAAGAACATAACCGT  CTGAGCGAGCAACGCAAATCAGTTAAAACCTTCAACAACGGA  TCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGA  TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTT  TGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCT  GTTGAGCGTCATTTCAACCTCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATG  GACGACCGTCCCCCTCCCCAGTAACCACCCACCGCTTAGGG  GGGTGGGAGGGAGGGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGTCAG  GCCGCGATTCCGGCTCCTGGGCGAATGGGACATAACCACCGCC  TCCAGGACCGCCGGCAGGCTGGCCTAACGCACCATGTATTA  TTCAGGTTGACCTCGGATCAGTAGGGATACCCGCTGAACTTA  AGCATATCAATAAGGCGAGAGGA</p>	<i>Microsporum canis</i>	100

438	<p>CCCGAGGKGAACCTSGAGGATCATAACGCAAGGTCGAATTGAC  CTGAGCTTACGTTCCCCCTGCTTCAGGAAGTTGCGCGCGAT  GATGCTCGCGCACGCCATTCTTGTYTTMTGACCCGTTGCCTC  GCGGGCCGCSCTGCTGTGCTACAGCGGCCGTTGCGGGGGGAC  GCCTGAGGGGGACTCTTGTTTCATAGGCCACGCCCCGGGCAG  CGCTCGCCGGAGGATTACTCTGGAAAACACACTCTTGAAAGA  ACATACCGTCTGAGCGAGCAACGCAAATCAGTTAAAACCTTC  AACAAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGC  GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCA  TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGG  GGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTCAACCCCTCAAGCCCGGC  TTGTGTGATGGACGACCGTCCCCCTCCCCAGTAACCACCCA  CCGCTTAGGGGGGTGGGAGGGAGGGGGACGCGCCCGAAAAG  CAGTGGTCAGGCCGCGATTCCGGCTCCTGGGCGAATGGGACA  TACCACCGCTCCAGGACCGGCCGGCAGGCTGGCCTAACGCA  CCATGTATTATTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGAWCCC  CCGC</p>	<i>Microsporum canis</i>	100
439	<p>TACCTCGCGAAGTAYMTTAACGCAAGGTCGAATGACCTGAG  CTTCCGTTCCCCGCTACAGGAAGTACCGCCGCGACATCCTCC  GCCGCACGCCCCATCTTKTYTACTGACCCCGTTGCCTCGCGGC  CGCCSCTGCTGTGCTACAGCGGCCGTTGCGGGGGGGACGCCT  GAGGGGGACTCTTGTTTCCTAGGCCACGCCCCGGGCAGCGCT  CGCCGGAGGATTACTCTGGAAAACACACTCTTGAAAGAACAT  ACCGTCTGAGCGAGCAACGCAAATCAGTTAAAACCTTCAACA  ACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA  TGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGA  ATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCA  TGCCTGTTTCGAGCGTCATTCAACCCCTCAAGCCCGGCTTGTG  TGATGGACGACCGTCCCCCTCCCCAGTAACCACCCACCGCT  TAGGGGGGTGGGAGGGAGGGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTG  GTCAGGCCGCGATTCCGGCTCCTGGGCGAATGGGACATACCA  CCGCCTCCAGGACCGGCCGGCAGGCTGGCCTAACGCACCATG  TATTATTCAGGTTGACCTCGGATCAGGT</p>	<i>Microsporum canis</i>	100
NB19	<p>GGCCCCCCACGATAGGGAGACCAACGTTCCGTCAGGGGGTG  TGCAGTATGTGCGCCGGCCTTACGCCCCATTCTTGCTACCTT  ACTCGGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCTCTCCTGGGAGAGTCGT  CCGGCGAGCCTCTTTGGGGGCTTTAGCTGGATCGCGCCCCGCC  GGAGGACAGACATCAAAAAATCTTGAAAGCTGTCAGTCTG  AGCGTTAGCAAGTAAAATCAGTTAAAACCTTCAACAACGGAT  CTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT  AAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTT  GAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTG  TTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGG  ACGACCGTCCGGCCCCCTCTTTCGGGGGCGGGACGCGCCCGA  AAAGCAGTGGCCAGG</p>	<i>Trichophyton benhamiae</i>	100

NB20	<p>ATTAACGCGCAGGCCGGAGGCTGGCCCCCACGATAGGGAC  CAACGTTCCGTCAGGGGTGTGCAGATGTGCGCCGGCCTTACG  CCCCATTCTTGTCTACCTTACTCGGTTGCCTCGGCGGGCCGCG  CTCTCCTGGGAGAGTCGTCCGGCGAGCCTCTTTGGGGGCTTT  AGCTGGATCGCGCCCGCCGGAGGACAGACATCAAAAAATCTT  GGAAAGCTGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAAATCAGTTAA  AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGA  ACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCG  TGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATT  CCGGGGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTCAACCCCTCAAG  CCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCGGCCCCCTCTTTCGG  GGCGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCG</p>	<p><i>Trichophyton  benhamiae</i></p>	100
------	--	---	-----

## ПРИЛОЖЕНИЕ Л

Нуклеотидные последовательности, депонированные в базе данных *GenBank*

№ п/п	Название организма	Название последовательности	№ в GenBank
1	<i>Microsporium canis</i>	M.c-3-Kz	OQ592850
2	<i>Microsporium canis</i>	M.c-5-Kz	OQ592853
3	<i>Microsporium canis</i>	M.c-8-Kz	OQ592883
4	<i>Microsporium canis</i>	M.c_21_Kz	ON527774
5	<i>Microsporium canis</i>	M.c-22-Kz	OQ592896
6	<i>Microsporium canis</i>	M.c-27-Kz	OQ592901
7	<i>Microsporium canis</i>	M.c-29-Kz	OQ593382
8	<i>Microsporium canis</i>	M.c-33-Kz	OQ593383
9	<i>Microsporium canis</i>	M.c-35-Kz	OQ593387
10	<i>Microsporium canis</i>	M.c-48-Kz	OQ593395
11	<i>Microsporium canis</i>	M.c_53_Kz	ON527775
12	<i>Microsporium canis</i>	M.c_57_Kz	ON527776
13	<i>Microsporium canis</i>	M.c-58-Kz	OQ593394
14	<i>Microsporium canis</i>	M.c-61-Kz	OQ594023
15	<i>Microsporium canis</i>	M.c-64-Kz	OQ594046
16	<i>Microsporium canis</i>	M.c-68-Kz	OQ594324
17	<i>Microsporium canis</i>	376Kz	MN661346
18	<i>Microsporium canis</i>	438-Kz	MT490877
19	<i>Microsporium canis</i>	439-Kz	MT490879
20	<i>Trichophyton benhamiae</i>	T.ben_NB19	OQ592797
21	<i>Trichophyton benhamiae</i>	T.ben_NB20	OQ600605