



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 1/14 (2020.08); C12R 1/645 (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2020118090, 09.04.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
09.04.2020

Дата регистрации:
22.03.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 09.04.2020

(45) Опубликовано: 22.03.2021 Бюл. № 9

Адрес для переписки:
109428, Москва, Рязанский пр-кт, 24, корп. 1,
ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН

(72) Автор(ы):

Савинов Василий Александрович (RU),
Капустин Андрей Владимирович (RU),
Овчинников Роман Сергеевич (RU),
Гайнулина Алла Габбасовна (RU),
Лаишевцев Алексей Иванович (RU),
Гулюкин Алексей Михайлович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ "ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
НАУЧНЫЙ ЦЕНТР - ВСЕРОССИЙСКИЙ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ВЕТЕРИНАРИИ ИМЕНИ К.И.
СКРЯБИНА И Я.Р. КОВАЛЕНКО
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК"
(ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: TH. NABAKUMAR SINGH, et.al.,
Recognition of dermatophytes by dermatophyte
test medium, International journal of Current
Microbiology and Applied Sciences, 2016, v.5, N
10, p. 1125-1129. RAFAL OGOREK et.al., First
report on the occurrence of Dermatophytes of
Microsporium Cookei cladi e and close affinities
to Paraphyton Cookei in the Harmanecka (см.
прод.)

(54) СЕЛЕКТИВНАЯ ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ
ДЕРМАТОФИТОЗОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к ветеринарной
медицине и ветеринарной микробиологии и может
быть использовано для диагностики
дерматофитозов животных, вызванных
мицелиальными грибами видов *Microsporium canis*
и *Trichophyton mentagrophytes*. Селективная
питательная среда для выделения возбудителей
дерматофитозов включает глюкозу, маннитол,

мясной пептон, феноловый красный, агар-агар,
циклогексимид, энрофлоксацин и
дистиллированную воду при заданном
содержании компонентов. Изобретение позволяет
сократить сроки диагностирования
дерматофитозов животных, повысить
достоверность результатов дифференциации
грибов дерматофитов от недерматофитов при

использовании рутинных микробиологических методов и расширить арсенал питательных сред

для выделения возбудителей дерматофитозов. 2 табл., 5 пр.

(56) (продолжение):

cave (Velka fatra Mts., Slovakia), *Diversity* 2019, 11, 191, p.1-13. RU 2275631 C1, 27.04.2006. Методические указания по лабораторной диагностике дерматофитозов животных, М., 2008, с.14.

R U 2 7 4 5 1 5 9 C 1

R U 2 7 4 5 1 5 9 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
C12N 1/14 (2020.08); C12R 1/645 (2020.08)

(21)(22) Application: **2020118090, 09.04.2020**

(24) Effective date for property rights:
09.04.2020

Registration date:
22.03.2021

Priority:

(22) Date of filing: **09.04.2020**

(45) Date of publication: **22.03.2021 Bull. № 9**

Mail address:

**109428, Moskva, Ryazanskij pr-kt, 24, korp. 1,
FGBNU FNTS VIEV RAN**

(72) Inventor(s):

**Savinov Vasilij Aleksandrovich (RU),
Kapustin Andrej Vladimirovich (RU),
Ovchinnikov Roman Sergeevich (RU),
Gajnulina Alla Gabbasovna (RU),
Laishevtsev Aleksej Ivanovich (RU),
Gulyukin Aleksej Mikhajlovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**FEDERALNOE GOSUDARSTVENNOE
BYUDZHETNOE NAUCHNOE
UCHREZHDENIE "FEDERALNYJ
NAUCHNYJ TSENTR - VSEROSSIJSKIJ
NAUCHNO-ISSLEDOVATELSKIJ INSTITUT
EKSPERIMENTALNOJ VETERINARII
IMENI K.I. SKRYABINA I YA.R.
KOVALENKO ROSSIJSKOJ AKADEMII
NAUK" (FGBNU FNTS VIEV RAN) (RU)**

(54) **SELECTIVE NUTRITIONAL MEDIUM FOR ISOLATION OF DERMATOPHYTOSI CAUSES**

(57) Abstract:

FIELD: veterinaty medicine.

SUBSTANCE: invention relates to veterinary medicine and veterinary microbiology and can be used for the diagnosis of animal dermatophytosis caused by filamentous fungi of the species *Microsporum canis* and *Trichophyton mentagrophytes*. Selective nutrient medium for isolation of pathogens of dermatophytosis includes glucose, mannitol, meat peptone, phenol red, agar-agar, cycloheximide, enrofloxacin and distilled

water at a given content of components.

EFFECT: invention makes it possible to shorten the time of diagnosis of dermatophytosis in animals, to increase the reliability of the results of differentiation of fungi of dermatophytes from non-dermatophytes using routine microbiological methods and to expand the arsenal of nutrient media for isolation of pathogens of dermatophytosis.

1 cl, 2 tbl, 5 ex

Изобретение относится к ветеринарной медицине и ветеринарной микробиологии, и может быть использовано для диагностики дерматофитозов животных, вызванных мицелиальными грибами видов *Microsporum canis* и *Trichophyton mentagrophytes*.

Изобретение является улучшенной дифференциально-диагностической средой для выявления грибов-дерматофитов из клинического материала, отобранного от животных с дерматологическими патологиями и/или подозрениями на них.

Дерматофитозы животных, вызванные мицелиальными видами грибов *Microsporum canis* и *Trichophyton mentagrophytes* широко распространены на территории России и мира в целом [Савинов, В.А. Распространенность дерматофитозов у мелких домашних животных / В.А. Савинов // Успехи медицинской микологии. 2018. Т. 19. С. 373-375]. Во многих регионах России заболевание занимает лидирующее место среди дерматологических патологий. Для назначения и проведения эффективного лечения ветеринарным врачам предварительно необходимо определение этиологии болезни. Так, в настоящее время наиболее распространенным методом диагностики дерматофитозов являются люминесцентное исследование образцов с использованием лампы с фильтром Вуда. Кроме того, распространенным подходом при постановке диагноза является проведение микроскопии пораженной шерсти и волос и поиск артроконидий, гиф и мицелия гриба. По ряду причин эффективность приведенных методов низкая, несмотря на их простоту и дешевизну в реализации. «Золотым стандартом» диагностики дерматофитозов по-прежнему является культуральный метод исследования [Овчинников, Р.С. Микологический скрининг домашних животных - важный способ профилактики дерматофитозов человека / Р.С. Овчинников, П.П. Ершов, А.В. Капустин, В.А. Савинов, А.Г. Гайнуллина // Успехи медицинской микологии. 2019. Т. 20. С. 712-716]. Культуральные методы позволяют проводить не только дифференциацию возбудителей дерматофитозов, но и определять их чувствительность к антимикотическим препаратам, что в свою очередь способствует назначению корректной терапии заболевания. Однако реализация культуральных методов диагностики, в отличие от люминесцентного метода и метода микроскопии, возможно только высококвалифицированными сотрудниками с определенной подготовкой и в условиях лаборатории. В свою очередь культуральные методы с использованием известных питательных сред имеют свой недостаток, а именно длительный рост дерматофитов, который позволяет сделать окончательное заключение не ранее, чем через 14-16 дней, что существенно влияет на ход лечения больного животного [Савинов, В.А. Экспресс-диагностика дерматофитозов животных / В.А. Савинов, Р.С. Овчинников, А.В. Капустин, А.А. Гайнуллина // Аграрная наука. 2019. №10. С. 20-24].

Уровень техники

В настоящее время для выделения мицелиальных грибов из патологического и клинического материала наиболее широко используется среда Сабуро. Данная среда обеспечивает рост большинства грибов-микромикетов. Недостатком данной среды, в случае диагностирования дерматомикозов, является ее низкая специфичность. В частности, из-за длительного периода культивирования дерматофитов, на среде в первую очередь начинают расти быстрорастущие сапрофитные плесени из исследуемого материала (грибы-контаминанты), что в последующем затрудняет или полностью исключает рост дерматофитов. Помимо низкой специфичности, использование данной питательной среды требует длительный период культивирования. Так, формирование макроконидий происходит к 14-16 дню, что существенно замедляет сроки постановки окончательного диагноза и назначение необходимой терапии.

Известна питательная среда для культивирования *Microsporum canis* [патент RU

2695675 C1 опубл. 2019.03.05]. Недостатком данной среды стоит считать ограниченный спектр применения.

Известен способ диагностики дерматомикозов и питательная среда для дерматофитов [патент RU 2275631 C1 опубл. 2006.04.14]. Существенным недостатком данной среды является ее не специфичность, и отсутствие индикаторных изменений при культивировании, свидетельствующих о наличии роста дерматофитов.

Известна среда ДТМ (Dermatophyte Test Medium) [Taplin, D. Isolation and recognition of dermatophytes on a new medium (DTM). / D. Taplin, N. Zaias, G. Rebell, H. Blank. // Arch Dermatol 1969 99:203-209]. В состав среды входит папаиновый перевар соевой муки (10,0 грамм), глюкоза (10,0 грамм), циклогексимид (0,5 грамм), индикатор - феноловый красный (0,2 грамма), хлортетрациклин (0,1 грамма), гентамицин (0,1 грамма). Принцип применения питательной среды основан на изменении уровня водородных ионов (рН). Так, в процессе роста грибы-дерматофиты поглощают белковые пептиды, продуцируют щелочь и повышают значение рН, в следствии чего индикатор изменяет окраску среды с желтого на красный. Преимуществом данной среды является то, что посев не требует специальных навыков и его можно проводить в условиях клиники, при этом инкубацию посева можно проводить при комнатной температуре, т.е. при отсутствии специального лабораторного оборудования. Результаты исследования с использованием обозначенной среды можно получить на 7-9 день исследования. Однако к существенным недостаткам данной среды являются зафиксированные случаи возникновения ложноположительной реакции на рост грибов, не относящихся к группе дерматофитов [Savinov, V.A. Development of a differential diagnostic nutrient medium for the express diagnosis of animal dermatophytosis. / V.A. Savinov, R.S. Ovchinnikov, A.V. Kapustin, A.I. Laishevcev, A.M. Gulykin // In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 2019, August, Vol. 315, No. 2, p. 022071. IOP Publishing.]. Кроме того, к антибиотикам, входящим в состав питательной среды, широко распространяется резистентность, что в свою очередь снижает диагностическую ценность среды. Данное явление связано с тем, что рост бактерий закисляет питательную среду, тем самым, не позволяя среде изменить цвет на красный [Kaufer, N.F. Cycloheximide resistance in yeast: the gene and its protein. / N.F. Kaufer, H.M. Fried, W.F. Schwindinger, M. Jasin, J.R. Warner // Nucleic Acids Res. 1983 May 25; 11(10): 3123-3135; Roth, N. The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in Escherichia coli: A global overview. / N. Roth, A. Käsbohrer, S. Mayrhofer, U. Zitz, C. Hofacre, K.J. Domig // Poult Sci. 2019 Apr; 98(4): 1791-1804].

Согласно вышеприведенным характеристикам на существующие и/или ранее используемые питательные среды для диагностики дерматомикозов, среда Dermatophyte Test Medium является наиболее близким аналогом, который мы берем за прототип.

Технической проблемой, на решение которой направлено данное изобретение, является необходимость создания селективной питательной среды, позволяющей с минимальными временными затратами и максимальной диагностической точностью культивировать и дифференцировать возбудители дерматофитозов животных, а именно *Microsporum canis* и *Trichophyton mentagrophytes*.

Раскрытие сущности изобретения

Техническим результатом изобретения является сокращение сроков диагностирования дерматофитозов животных и повышение достоверности результатов дифференциации грибов дерматофитов от недерматофитов при использовании рутинных микробиологических методов, расширение арсенала питательных сред для выделения возбудителей дерматофитозов.

Состав и схема приготовления питательной среды следующие: 10,0±1,0 г/л глюкозы,

10,0±1,0 г/л маннитола, 10,0±1,0 г/л мясного пептона, 0,2±0,02 г/л фенолового красного, 15,0-20,0±1,5 г/л агар-агара, равномерно смешиваются в 949,8-954,8 мл дистиллированной воды (соответственно). С помощью соляной кислоты (HCl) регулируется уровень pH до значения 5,5±0,1. Смесь автоклавируется при температуре 121°C в течение 15 минут.

5 После остывания среды до 55±5,0°C, в нее асептически добавляют циклогексимид 0,5±0,05 г/л, энрофлоксацин 0,1±0,01 г/л, затем разливают в чашки Петри по 22±2,5 мл или в стерильные полимерные контейнеры по 10 мл. Среда пригодна к использованию после застывания и при отсутствии конденсата. Предлагаемое диагностическое средство отличается от своих ранних аналогов улучшенными ростовыми и селективными
10 свойствами, позволяющими сократить сроки диагностики и повысить чувствительность при выявлении возбудителей дерматофитозов животных. Индикаторный компонент, входящий в состав питательной среды, позволяет детектировать рост дерматофитов уже на ранних стадиях диагностики, не прибегая к последующему микроскопированию культуры, что, в свою очередь необходимо в классической диагностике для
15 подтверждения принадлежности культур к дерматофитам.

Отличия между заявляемой средой и прототипом заключаются в составе, а именно в измененном пептоне для повышения ростовых свойств и ускорения самого роста, в добавлении дополнительного углевода, стимулирующего энергию роста, в наборе антибактериальных препаратов, необходимых для снижения вторичного роста
20 бактериальных культур-контаминантов.

На предложенной среде рост культуры *Microsporum canis* демонстрирует характерную для вида белую рыхло-пушистую колонию с умеренно развитым воздушным мицелием. Растущий край ровный, реснитчатый. Начало роста отмечается начиная с 3 суток, а изменение цвета начиная с 5 суток.

25 Рост культуры *Trichophyton mentagrophytes* демонстрирует характерную для вида выпуклую пушистую колонию белого цвета с хорошо развитым воздушным мицелием. Растущий край ровный, реснитчатый. Начало роста на среде отмечается начиная со 2 суток, а изменение цвета начиная с 3 суток.

Осуществление изобретения

30 Приведенные ниже примеры являются иллюстративными и тем самым не ограничивают рамки настоящего изобретения.

Пример №1. При изучении влияния пептонов различного происхождения на скорость роста дерматофитов использовали классическую рецептуру среды Сабуро, в каждой опытной серии среды изменяли разновидность пептона. Так, в исследовании
35 использовали 4 вида пептонов - казеиновый (Casein peptone pancreatic digested), соевый (Soyabean pepton), сухой ферментативный мясной (Dry fermentation pepton), мясной (Meat Pepton). Для изучения энергии роста на различных вариантах среды культуры штаммов дерматофитов высевались уколом в центр чашки. Полученные результаты отражены в таблице №1.

40

45

Таблица №1 – ростовые свойства сред для дерматофитов, содержащие различные виды пептонов.

Вид, штамм гриба	Диаметр колонии на 7 сутки роста, мм / развитие воздушного мицелия, баллы				
	Среда Сабуро	Мясной пептон	Соевый пептон	Сухой ферм. мясной пептон	Казеиновый пептон
M. canis I	22±1 / 2	26±1 / 2	27±2 / 1	26±1 / 1	27±1 / 1
M. canis 71-19	23±2 / 3	31±1 / 2	33±1 / 1	31±2 / 1	32±1 / 1
M. canis K	30±1 / 3	30±2 / 1	31±1 / 1	32±1 / 1	35±3 / 1
Tr. Mentagrophytes #135	37±1 / 3	38±1 / 2	34±2 / 2	36±1 / 2	28±1 / 1

При изучении ростовых свойств, учет роста проводили ежедневно, начиная со второго дня после посева. Измеряли диаметр колоний, интенсивность образования воздушного мицелия. Степень развития воздушного мицелия оценивали в баллах:

- 1 - воздушный мицелий развит плохо, полупрозрачный, паутинистый
- 2 - воздушный мицелий развит умеренно, бархатистый, порошистый
- 3 - воздушный мицелий развит хорошо, шерстистый, пушистый.

Как видно из полученных результатов, наилучшие ростовые качества для всех штаммов показала среда с добавлением мясного пептона. Также на данной среде хорошо формируется воздушный мицелий.

Пример №2. Изучение влияния углеводов на рост дерматофитов проходило аналогично опыту с пептонами, отраженному в примере №1. В опыте участвовало 14 различных углеводов, а именно: манноза, инозит, маннит, лактоза, арабиноза, адонит, сорбит, дульцит, ксилоза, рамноза, раффиноза, салицин, мальтоза, глюкоза. Наилучший рост дерматофитов наблюдался на среде с добавлением маннита. Так, на 7-ые сутки колония M canis #71-19 при росте на среде с добавлением маннита имела диаметр 32 мм, в то время как на средах с другими углеводами диаметр колоний достигал в среднем 29-30 м. Колония Trichophyton mentagrophytes #135 на среде с добавлением маннита имела диаметр 35 мм, на средах с другими углеводами диаметр в среднем был 32 мм.

Пример №3. Оценка ингибирующих свойств предлагаемой среды, в отношении бактерий, проводили с использованием штаммов бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Bacillus subtilis*. Контролем служила среда Сабуро. Установлено, что на предлагаемой среде полностью ингибируются все изученные бактерии, кроме *Pseudomonas aeruginosa* - при посеве наблюдали слабовыраженный рост, не влияющий на диагностические свойства среды в отношении дерматофитов. На среде Сабуро отмечался аналогичный рост *Ps. aeruginosa*.

Пример №4. Влияние количественного состава питательной среды на ее ростовые свойства.

При изучении влияния количественного состава питательной среды на ее ростовые свойства, были произведены две серии питательной среды с минимальным и максимальным количеством компонентов, указанных в рецептуре. Таким образом, первая серия среды имела следующий состав: 9 г/л глюкозы, 9 г/л маннитола, 9 г/л мясного пептона, 0,18 г/л фенолового красного, 13,5 г/л агар-агара, 0,45 г/л циклогексимида, 0,09 г/л энрофлоксацина. Вторая серия среды включала в себя 11 г/л глюкозы, 11 г/л маннитола, 11 г/ мясного пептона, 0,22 г/л фенолового красного, 21,5 г/л агар-агара, 0,55 г/л циклогексимида, 0,11 г/л энрофлоксацина. При оценке ростовых свойств двух серий среды, достоверных отличий выявлено не было. Так, на обеих сериях среды рост культуры *Microsporum canis* демонстрировал характерную для вида белую

рыхло-пушистую колонию с умеренно развитым воздушным мицелием. Растущий край ровный, реснитчатый. Начало роста отмечается с 3 суток, а изменение цвета начиная с 5 суток. Культура *Trichophyton mentagrophytes* демонстрировала, на обоих вариантах среды, характерную для вида выпуклую пушистую колонию белого цвета с хорошо развитым воздушным мицелием. Растущий край ровный, реснитчатый. Начало роста на среде отмечается со 2 суток, а изменение цвета возникает с 3 суток.

Пример №5. Для сравнительной оценки специфичности и чувствительности предлагаемой среды, коммерческой среды ДТМ, и среды Сабуро, на них был произведен посев 40 образцов клинического материала. Методика посева не отличалась. Процент положительных выделений дерматофитов с использованием вновь предлагаемой среды составил 31,0%, для импортной среды 32,5%, а для агара Сабуро 22,5% соответственно. Видимый рост дерматофитов быстрее всего появился на среде Сабуро, и практически одновременно на опытной среде и ДТМ зарубежного производства с разницей 1-2 дня. Покраснение среды при росте дерматофитов на опытной и импортной среде наступало также практически одновременно - на 6-9 сут., и становилось ярко-выраженным на 10-11 сутки, но при этом на предлагаемой среде, рост фиксировался раньше, чем на известной среде ДТМ на 1-2 суток. Активный рост плесневых грибов-контаминантов, препятствующий росту дерматофитов, обнаружен в 27% посевов на среде Сабуро, с чем очевидно связана наименьшая частота выделения дерматофитов на данной среде. Плесневые грибы были представлены родами *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Alternaria*, *Cladosporium*. На предлагаемой среде рост плесеней наблюдали лишь в 15% проб, в то время как на импортной ДТМ было контаминировано 23,5% посевов. Важно отметить, что на импортной среде ДТМ в 13,2% посевов наблюдали покраснение при росте плесневых грибов, т.е. получали ложноположительный результат, который ведет к диагностическим ошибкам в условиях реальной практики. На разрабатываемой среде ДТМ ложного покраснения, вызванного плесневыми грибами, не наблюдали.

	Выделено дерматофитов, %	Видимый рост, день	Изменение цвета, день	Выраженный рост грибов-контаминантов, %	Ложноположительное покраснение среды, %
Изобретенная ДТМ-среда	31,0	5-7	6-8	15,0	0
Импортная ДТМ среда	32,5	6-8	7-9	23,5	13,2
Среда Сабуро с хлорамфениколом	22,5	4-6	-	27,0	-

(57) Формула изобретения

Селективная питательная среда для выделения возбудителей дерматофитозов, включающая глюкозу, агар-агар, белковый компонент, циклогексимид и дополнительные антибактериальные компоненты среды, феноловый красный, отличающаяся тем, что дополнительно содержит маннитол, в качестве белкового компонента мясной пептон, а в качестве дополнительного антибактериального компонента среды - энрофлоксацин при следующем содержании компонентов:

глюкоза	10±1,0 г
маннитол	10±1,0 г

RU 2 745 159 C1

	мясной пептон	10±1,0 г
	феноловый красный	0,2±0,02 г
	агар-агар	20,0±1,5 г
	циклогексамид	0,5±0,05 г
	энрофлоксацин	0,1±0,01 г
5	вода дистиллированная	49,8-954,8 мл

10

15

20

25

30

35

40

45