

## ГЛАВА 3.4.9.

### ДЕРМАТОФИЛЕЗ

---

#### РЕЗЮМЕ

*Дерматофилез (также известный как стрептотрихоз) – экссудативный, пустулёзный дерматит, который преимущественно поражает КРС, овец и лошадей, а также коз, собак и кошек, многие виды диких млекопитающих, рептилий и даже человека. Тяжелую форму болезни у жвачных животных вызывают иммуномодулирующие действия, индуцированные инфестью клещами, *Amblyomma variegatum*.*

*Лабораторная диагностика дерматофилеза зависит от демонстрации бактерии *Dermatophilus congolensis* в материале, взятом с кожи или из других органов. Редко поражаются другие участки, кроме кожи.*

**Идентификация возбудителя:** *Обычно *Dermatophilus congolensis* поражает эпидермис, вызывая образование струньев. Его можно увидеть в мазках, сделанных из струньев, эмульгированных или размягченных в воде, или в мазках – отпечатках от основания только что удаленных липких струньев. Организм является грамм-положительным, но его морфологию проще оценить с помощью мазков, окрашенных красителем Гимза. В окрашенных мазках организм представляет собой разветвленные нити, содержащие множество рядов кокков. Такой характерный вид является диагностическим. Во влажных или вторично зараженных струньях могут присутствовать только свободные кокки, поэтому требуется окрашивание иммунофлюоресценцией. На гистопатологических секциях *Dermatophilus congolensis* проявляется с помощью окрашивания красителем Гимза или иммунофлюоресценцией. *Dermatophilus cheloniae* может присутствовать у крокодилов, морских черепах и кобр.*

*Выделить *D. Congolensis* из только что удаленных струньев просто, но организм быстро зарастает другими бактериями. При культивировании с зараженных участков необходимо использовать специальные техники, которые включают фильтрацию, хемотаксис или селективную среду.*

*Демонстрация и идентификация *D. Congolensis* с помощью иммунофлюоресценции – это надежный и очень чувствительный метод диагностики, но у лабораторий должны быть свои диагностические антисыворотки, поскольку они коммерчески недоступны. Несмотря на то, что сообщалось об антигенной перекрестной реакции с *Nocardia spp.*, флюоресценция будет слабой. В идеале, необходимо использовать моноклональное специфическое к *D. Congolensis* антитело. Также были описаны характеристики, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР).*

**Серологические тесты:** *При изучении эпизоотологии и патогенеза дерматофилеза используются различные серологические тесты. Антитела можно продемонстрировать во всех типах крови, кроме фетальной, у здоровых жвачных животных, а повышенные*

уровни, связанные с клинической инфекцией, можно использовать для идентификации инфицированных данной болезнью животных.

**Требования к вакцинам и диагностическим препаратам:** Несмотря на идентификацию нескольких вирулентных факторов, в настоящее время вакцины не доступны.

## **А. ВВЕДЕНИЕ**

Дерматофилез (также известный как стрептотрихоз, или “болезнь комковатой шерсти” у овец) - экссудативный, пустулёзный дерматит, который преимущественно поражает КРС, овец и лошадей, а также коз, собак и кошек, многие виды диких млекопитающих, рептилий и даже человека. Дерматофилез вызывает бактерия *Dermatophilus congolensis*, типовой вид рода *Dermatophilus*, который принадлежит отряду Actinomycetales. Дерматофилез – наиболее частая болезнь кожи у крокодилов в Австралии, и оказывает влияние на разведение данного вида (Buenviaje *et al.*, 1998). Он вызван *Dermatophilus cheloniae*, который также был выделен у морских черепах и кобр.

Клинически болезнь проявляется по-разному и поражает разные участки тела. Обычно инфекция приводит к усилению образования толстых струпьев на коже, а в некоторых местах таких, как промежность у жвачных животных и путовая кость у лошадей, могут появиться влажные поражения с утолщенной, складчатой кожей. В таких поражениях можно обнаружить сравнительно тонкие струпья. Там где поражения подвержены длительному намоканию, с вторичной инфекцией или без, нее могут присутствовать экссудативные поражения.

Струпья характерно покрывают чередующиеся слои паракератотических кератиноцитов, пораженных разветвленными бактериальными нитями и инфильтратами нейтрофилов в серозном экссудате. Таким образом, окрашенные участки выглядят обособленными. Нити *D. congolensis* прикрепляются к эпидермису и редко инфицируют слой дермы.

Экстенсивную острую форму дерматофилеза непросто воспроизвести в экспериментальных условиях. Сам по себе *Dermatophilus congolensis* не является высокопатогенным, и для развития клинических поражений необходима совокупность факторов. Плохое питание, обильные дожди, а также механические повреждения являются благоприятными факторами для болезни. Однако там где дерматофилез оказывает сильное влияние на экономику, в Восточной и Центральной Африке, а также на некоторых из Карибских островов, главным фактором является инфекация клещами *Amblyomma veriegatum*. Тяжелая форма болезни может быть вызвана иммуномоделирующим действием слюны, выделяемой клещами во время укуса (Ambose *et al.*, 1999), но точные лежащие в основе механизмы непонятны. На восприимчивость к дерматофилезу также сильно влияет генетический аспект пород жвачных животных. Животные из регионов с умеренным климатом и особенно молочный крупный рогатый скот чрезвычайно восприимчивы в угрожаемых районах.

## **В. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ**

### **1. Идентификация возбудителя**

#### **1.1. Наблюдение под микроскопом**

Диагноз можно поставить, продемонстрировав наличие организма в струпьях от поражений или в экссудате под струпьями. При этом организм имеет характерный вид под микроскопом – его септированные, разветвленные нити становятся в продольном, а также в поперечном направлении, они отделены и образуют большое количество рядов полосок сферических или овальных кокков, диаметр каждого из которых около 0,5µм. Такой внешний вид является диагностическим, при условии, что кокки обнаружены в четырех или более поперечных рядах, и легко окрашиваются. Однако характерное строение может быть нарушено при приготовлении мазков для исследования, если материал слишком сильно размазан по стеклу.

Мазки-отпечатки можно сделать из влажных, изрытых поверхностей свежееудаленных струпьев. В ином случае, толстые мазки лучше сделать из струпьев, эмульгированных в стерильной дистиллированной воде. В качестве альтернативного способа можно замочить струпья на ночь в стерильной воде или физиологическом растворе для их увлажнения, чтобы нижнюю часть струпьев можно было использовать для приготовления мазка-отпечатка, путем сильного надавливания этой поверхностью на предметное стекло. Затем мазки высушивают, фиксируют путем нагревания или погружения в метанол на 5 минут и окрашивают. Организм хорошо окрашивается в слабом карболовом фуксине или метиленовом синем. Однако окраска по Граму или еще лучше в разведении красителя Гимза 1:10 в течение 30 минут лучше дифференцирует густые мазки, т.к. темно окрашенные *D. Congolensis* контрастируют с более бледным или розовым окрашенным фоном кератиноцитов и нейтрофилов. Окраска по Граму дает менее эффективные результаты, по сравнению с красителем Гимза, поскольку фон может окраситься слишком сильно, и характерное расположение кокковидных форм будет видно не четко.

Влажные или вторично инфицированные струпья зачастую содержат малое количество интактных нитей, или вовсе не содержат их, поэтому организм может не окраситься как Грам-положительный. В таком материале кокки нельзя дифференцировать морфологически от других кокковидных бактерий, поэтому требуется окрашивание иммунофлуоресценцией. Однако, специфическая антисыворотка для иммунофлуоресценции недоступна в продаже. Используют тонкие, термофиксированные мазки. В сложных случаях и когда инфекции подвержены другие органы кроме кожи, рекомендуется проводить патогистологическое исследование материала биопсии или некропсии проводят окрашивание по Гимзе или иммунофлуоресценцию.

Характерный вид поражений и организма в мазках в случае типичного дерматофилеза бычьих делает культивирование ненужным в большинстве случаев. Однако в редких случаях, когда мазок, окрашенный по Гимзе, не дает различительного результата, можно провести подтверждающую диагностику путем выделения бактерии. Культуры изготавливают на кровяном агаре и инкубируют при температуре 37°C. Рост ускоряют в микроаэрофильных условиях; неровные, как правило, гемолитические, серо-желтые колонии, диаметром около 1 мм, образуют в среде точечные углубления спустя 24 часа. Инкубация в воздухе приводит к образованию аналогичных точечных колоний, которые вырастают примерно до 1 мм через 48 часов. Неровные колонии формируются разветвленными нитями, а продолжительный рост в воздухе

стимулирует производство кокков, обычно желтого цвета. Колонии имеют гладкий желтоватый вид. Кокки, взятые из молодой культуры, обычно быстро двигаются. Колонии необходимо различать от *Nocardia spp.* и *Streptomyces spp.*, ни один из которых не образует нити, которые разбиваются на многочисленные ряды подвижных кокков.

## 1.2. Культура

Для выделения материал можно нанести в виде полосок непосредственно из влажной нижней поверхности свежееудаленных, неконтаминированных струпьев или из эмульсии струпьев, но относительно медленно растущие *D. congolensis* легко обрастают другими бактериями. Таким образом, требуются специальные техники выделения для контаминированных образцов. В большинстве образцов свободные кокки, подвижные или неподвижные, будут присутствовать в эмульсиях материала. Обычно достаточно профильтровать эмульсию через фильтр с мембраной 0,45μм, чтобы снизить или устранить контаминанты. Эта процедура позволяет выделить из фильтрата, как описано выше. В качестве альтернативы можно использовать метод Naalstra (Naalstra, 1965). Небольшие фрагменты струпьев помещают в пузырек, содержащий 1мл стерильной дистиллированной воды, и оставляют при комнатной температуре на 3-4 часа. Открытый пузырек затем помещают на 15 минут в банку со свечой. Образцы жидкости с поверхности удаляют с помощью бактериологической петли и культивируют. Метод зависит от выхода подвижных кокков *D. congolensis* из струпьев и их хемотрофного тяготения к богатой углекислым газом среде банки со свечой. Можно также использовать селективную среду, состоящую из 1000 единиц/мл полимиксина В в кровяном агаре, которая является эффективной, когда контаминанты чувствительны к данному антибиотику.

## 1.3. Иммунологические методы

Для диагностирования дерматофилеза и идентификации антигенов *D. congolensis* наиболее надежным и чувствительным иммунологическим методом является иммунофлюоресцентное окрашивание мазков или тканей. Поликлональные антитела, полученные от животных, инокулированных *D. congolensis*, можно легко приготовить, используя стандартные методы, однако существует риск перекрестной реакции с некоторыми штаммами *Nocardia spp.* Более предпочтительным является использование моноклональных антител к вид-специфическому антигену (How *et al.*, 1988). Однако моноклональные антитела еще не получили широкого распространения и не были валидированы в ходе межлабораторных испытаний. Окрашивают тонкие термофиксированные мазки эмульсий из струпьев или мазки-отпечатки. Всегда нужно включать известные положительные и отрицательные образцы.

## 1.4. Методы распознавания нуклеиновых кислот

При отсутствии достаточного объема информации о геномной последовательности используют произвольно амплифицированные полиморфные методы ДНК (RAPD), а также гель-электрофорез с импульсным магнитным полем, которые показали себя эффективными для молекулярного типирования *D. congolensis* (Larrasa *et al.*, 2004). Из фрагмента RAPD клонировали щелочной ген церамидазы, а полимеразная цепная

реакция (ПЦР) с использованием праймеров, полученных из нуклеотидной последовательности данного гена, дали продукт амплификации с ДНК *D. congolensis*. Продукт амплификации не наблюдался с *M. bovis*, *C. propinquum* и *D. cheloniae*, что указывает на возможность диагностики и обнаружения *D. congolensis* (Garcia-Sanchez *et al.*, 2004). В качестве альтернативы для подтверждения наличия *D. congolensis* можно использовать 16S рДНК последовательность, полученную после амплификации.

## **2. Серологические тесты**

Клиническое диагностирование лучше всего проводить, используя методы, описанные выше, а не серологические. Антитела можно обнаружить во всех типах крови, кроме фетальной от здоровых животных, однако, уровни повышаются после клинической инфекции. Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) является чувствительной и удобной техникой исследования, а рост титров над исходным уровнем можно использовать при изучении эпизоотий для идентификации животных, у которых была данная болезнь (Martinez *et al.*, 1993). Поскольку исследование основано на неочищенном антигене, может возникнуть перекрестная реактивность с другими бактериями, как при иммунофлюоресценции. В настоящее время ИФА является методом исследования и расследования. Серология, с помощью ИФА или более старых методов, таких как гемагглютинация и встречный иммуноэлектрофорез, не используется для рутинной диагностики дерматофилеза, где легко сразу обнаружить наличие бактерии.

## **С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ И ДИГНОСТИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ**

*Dermatophilus congolensis* продуцирует вирулентные факторы, такие как гемолизин, фосфолипазы, церамидазы и протеолитический фермент, которые могут преодолеть эпидермальный барьер и начать взаимодействовать с воспалительной реакцией хозяина. Данные вирулентные факторы считаются кандидатными антигенами для вакцин. Ведется исследование вакцин для профилактики дерматофилеза (How *et al.*, 1990; Sutherland & Robertson, 1988); однако, в настоящее время вакцины не доступны. Исследование в этой области затрудняется по причине невозможности воспроизведения болезни в экспериментальных условиях и плохого понимания кожного иммунитета. Основной акцент, таким образом, делается на борьбе с клещами и идентификации перспективных генетических маркеров резистентности или чувствительности у КРС (Maillard *et al.*, 2003).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- AMBROSE N., LLOYD D.H. & MAILLARD J.C. (1999). Immune responses to *Dermatophilus congolensis* infections. *Parasitol. Today*, 15, 295–300.
- BUENVIAJE G.N., LADDS P.W. & MARTIN Y. (1998). Pathology of skin disease in crocodiles. *Aust. Vet. J.*, 76, 357–363.
- GARCIA-SANCHEZ A., CERRATO C., LARRASA J., AMBROSE C.N., PARRA A., ALONSO J.M., HERMOSO-DE-MENDOZA M., REY J.M. & HERMOSO-DE-MENDOZA J. (2004). Identification of an alkaline ceramidase gene from *Dermatophilus congolensis*. *Vet. Microbiol.*, 99, 67–74.
- HAALSTRA R.T. (1965). Isolation of *Dermatophilus congolensis* from skin lesions in the diagnosis of streptothricosis. *Vet. Rec.*, 77, 824–825.
- HOW S.J., LLOYD D.H. & LIDA J. (1988). Use of a monoclonal antibody in the diagnosis of infection by *Dermatophilus congolensis*. *Res. Vet. Sci.*, 45, 416–417.
- HOW S.J., LLOYD D.H. & SANDERS A.B. (1990). Vaccination against *Dermatophilus congolensis* infection in ruminants: prospects for control. In: *Advances in Veterinary Dermatology*, Volume 1, Von Tscherner C. & R.E.W. Halliwell, eds. Bailliere Tindall, London UK.
- LARRASA J., GARCIA-SANCHEZ A., AMBROSE C.N., PARRA A., ALONSO J.M., REY J.M., HERMOSO-DE-MENDOZA M. & HERMOSO-DE-MENDOZA J. (2004). Evaluation of randomly amplified polymorphic DNA and pulsed field gel electrophoresis techniques for molecular typing of *Dermatophilus congolensis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 240, 87–97.
- MAILLARD J.C., BERTHIER D., CHANTAL I., THEVENON, S., SIDIBE I., STACHURSKI F., BELEMSAGA D., RAZAFINDRAIBE H & ELSSEN J.M. (2003). Selection assisted by a BoLA-DR/DQ haplotype against susceptibility to bovine dermatophilosis. *Genet. Sel. Evol.*, 35, 193–200.
- MARTINEZ D., AUMONT G., MOUTOUSSAMY M., GABRIEL D., TATAREAU J.C., BARRE N., VALLEE F. & MARI B. (1993). Epidemiological studies on dermatophilosis in the Caribbean. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, 46, 323–327.
- SUTHERLAND S.S. & ROBERTSON G.M. (1988). Vaccination against ovine dermatophilosis. *Vet. Microbiol.*, 18, 285–288.