

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)

*На правах рукописи*

**Самылина Ирина Викторовна**

**Видовой состав, распространенность и характеристика биологических  
свойств оппортунистических грибковых патогенов животных**

**4.2.3 – Инфекционные болезни и иммунология животных**

**ДИССЕРТАЦИЯ**  
на соискание ученой  
степени кандидата  
биологических наук

**Научный руководитель:**

кандидат биологических наук

**Овчинников Роман Сергеевич**

Москва – 2025

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
1. ВВЕДЕНИЕ .....	5
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
2.1 Значимость микозов для медицины и ветеринарии в 21 веке .....	13
2.2 Оппортунистические, факторные инфекции .....	16
2.3 Клиническая значимость грибов рода <i>Candida</i> .....	19
2.4 Клиническая значимость грибов рода <i>Malassezia</i> .....	23
2.5 Клиническая значимость представителей родов <i>Trichosporon</i> , <i>Aureobasidium</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Rhodotorula</i> .....	26
2.6 Факторы патогенности грибов-оппортунистов.....	30
2.7 Методы лабораторной диагностики и идентификации грибов- оппортунистов .....	34
2.7.1 Традиционные методы диагностики .....	34
2.7.2 Молекулярно-генетические методы. Секвенирование грибов.....	36
2.7.3 Метод масс-спектрометрии MALDI-TOF для идентификации грибов ....	37
2.8 Формирование устойчивости к противогрибковым препаратам .....	39
2.9 Механизмы действия противогрибковых препаратов .....	41
2.10 Заключение по обзору литературы.....	42
3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	45
3.1 Материалы .....	45
3.2 Методы.....	48
4. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	60
4.1 Изучение видового состава, распространенности и локализации инфекционно-значимых грибов у животных.....	60
4.1.1 Исследование видового состава мицелиальных (плесневых) оппортунистических грибов у животных .....	63
4.1.2. Идентификация дрожжевых грибов традиционными методами .....	68
4.2 Идентификация грибов с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF MS ..	69
4.2.1 Сравнение методов пробоподготовки дрожжевых грибов для масс- спектрометрического анализа .....	70

4.2.2 Видовая идентификация дрожжевых грибов с помощью масс-спектрометрического анализа MALDI-TOF .....	74
4.2.3 Характеристика биологических свойств нетривиальных дрожжевых грибов .....	77
4.2.4 Получение характерных масс-спектров нетривиальных грибов и внесение их в базу данных масс-спектрометра .....	89
4.3 Исследование видового состава дрожжевых оппортунистических грибов у животных .....	91
4.4 Определение чувствительности дрожжевых грибов к противогрибковым препаратам .....	106
4.5 Определение минимальной ингибирующей концентрации .....	113
4.6 Изучение образования биопленок дрожжевыми грибами .....	119
5. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	121
6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	134
7. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ .....	136
8. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....	137
9. ПРИЛОЖЕНИЯ .....	158

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ед. – единицы;

соавт. – соавторы

pH – водородный показатель;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

ITS - *internal transcribed spacer* - внутренний транскрибируемый участок;

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

MALDI-TOF - *matrix-assisted laser desorption/ionization* - матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

MS – масс-спектрометрия

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute* - Институт клинических и лабораторных стандартов

КОЕ – колониобразующая единица

МПА – мясопептонный агар

RBC – *rose bengal agar* – агар с бенгальским розовым

YGC - *chloramphenicol glucose yeast extract agar* - агар с дрожжевым экстрактом и хлорамфениколом

ВНІВ - *brain heart infusion broth* - бульон с сердечно — мозговым экстрактом

СНСА - *α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid* - α-циано-4-гидроксикоричная кислота

ТФУ – трифторуксусная кислота

БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж

ФА – фосфолипазная активность

НСП – наружный слуховой проход

# 1. ВВЕДЕНИЕ

## Актуальность темы

В последние десятилетия во всем мире отмечается рост заболеваемости микозами как среди людей, так и среди животных. Диагностика грибковых инфекций представляет сложности для практикующих врачей ввиду большого видового разнообразия грибов, их лечение длительное, дорогостоящее, что обуславливает существенные экономические потери [19,30,37]. При этом распространяются заболевания, вызываемые условно-патогенными или оппортунистическими грибами, т.е. грибами с низким для животных уровнем патогенности, которые проявляют патогенные свойства только в определенных условиях, на фоне угнетения естественной резистентности организма-хозяина [27,56,57].

Оппортунистические грибковые патогены вызывают широкий спектр заболеваний животных: от локализованных инфекций до смертельных диссеминированных заболеваний, таких как аспергиллез, мукоморикоз, кандидоз, криптококкоз и инфекции, вызванные меланизированными грибами [57,58]. Некоторые оппортунистические микозы приобретают характер эмерджентных инфекций [27].

Для эффективной борьбы с новыми видами микозов необходимо знать их этиологическую структуру, которая меняется с появлением новых видов возбудителей и выявлением патогенных свойств у грибов, ранее считавшихся безвредными.

Это делает актуальным исследования по идентификации широкого спектра микогенных инфектантов у животных. Эти исследования также важны с точки зрения прогнозирования рисков развития эмерджентных инфекций и выявления потенциальных биологических рисков для животных и человека, что является актуальной задачей для всей ветеринарной науки.

В связи с расширением видового состава грибковых патогенов необходима оптимизация диагностики микогенных инфекций. Появились новые инструментальные методы идентификации микроорганизмов, которые могут

использоваться в рутинной практике ветеринарными, медицинскими и научными специалистами, например, MALDI-TOF MS (матрично-активированная лазерная десорбционно/ионизационная времяпролетная масс-спектрометрия). С недавнего времени проведение MALDI-TOF стало возможным на российских приборах, однако необходима адаптация данного метода применительно к микроскопическим грибам, а также расширение баз данных масс-спектров за счет видов и штаммов, циркулирующих у животных в данном географическом регионе [52; 70].

Наряду с расширением спектра микогенных патологий, обостряется проблема резистентности грибов к противогрибковым препаратам. Арсенал антимикотиков, применяемых в ветеринарии, очень ограничен, при этом мало актуальных данных по эффективности противогрибковых средств терапии в отношении различных видов грибов-оппортунистов.

Нехватка методической литературы, низкая осведомленность как практикующих врачей, так и лабораторных специалистов в вопросах ветеринарной микологии приводят к низкой эффективности диагностики и последующей терапии оппортунистических микозов животных.

Перечисленные выше причины послужили основанием для проведения настоящего исследования.

### **Степень разработанности темы исследования**

Видовой состав патогенных грибов, вызывающих заболевания животных, изучается на протяжении длительного времени во многих странах мира. Огромный вклад в выяснение этиологии многих грибковых инфекций сделали российские (советские) ученые под руководством академика А.Х. Саркисова (ВИЭВ), включая дерматофитозы, актиномикоз и др. Ими заложены основы изучения оппортунистических микозов, таких как аспергиллез и кандидоз. А.Х. Саркисов отмечал, что возбудителей микозов на самом деле в сотни раз больше, чем принято считать. Однако ввиду отсутствия масштабных исследований по выявлению этих грибов, они остаются нераспознанными [36].

По сравнению с зарубежными странами, исследования грибов-

оппортунистов в РФ довольно ограничены. При этом большинство работ посвящено распространенным кандидозам и малассезиозам [8,15,30,37], в то время как практически нет сведений о дрожжевых грибах родов *Trichosporon*, *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, чья инфекционная значимость может недооцениваться в ветеринарии. Кроме того, существует обширная группа «нетривиальных» видов грибов, о распространенности которых в нашей стране нет данных.

Метод масс-спектрометрии MALDI-TOF, позволяющий быстро и с высокой точностью идентифицировать микроорганизмы, активно внедряется в диагностику, в том числе для идентификации грибов [2]. Однако большинство исследований выполняется на импортных масс-спектрометрах, с использованием зарубежных баз данных, в то время как в данный момент остро стоит вопрос по импортозамещению научной приборной базы. Нет исследований по пробоподготовке и идентификации грибов с помощью приборов российского производства. Также необходимо расширение идентификационных баз данных за счет видов и штаммов грибов, выделенных от животных на территории России, что значительно повысит точность диагностических исследований.

Грибы обладают многими факторами патогенности, одним из которых является способность к образованию биопленок. С этой точки зрения хорошо изучены *Candida albicans* и некоторые другие виды кандид [152], и очень слабо изучены другие дрожжевые грибы, в особенности виды и штаммы, выделенные от животных.

Циркулирующие в настоящее время дрожжевые грибы недостаточно охарактеризованы по биологическим свойствам – культуральным, морфологическим, биохимическим, имеющим важнейшее значение для инструментальной идентификации видов. Недостаточно данных о чувствительности оппортунистических грибковых патогенов к противогрибковым препаратам, в то время как эти сведения крайне важны для оптимизации терапии микозов, особенно на фоне растущей резистентности возбудителей к противогрибковым препаратам.

## **Цель работы**

Определить распространенность и современный видовой состав грибов-оппортунистов у животных с признаками инфекционно-воспалительных заболеваний, усовершенствовать методы их идентификации и охарактеризовать биологические свойства.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Изучить распространенность грибов-оппортунистов у животных различных видов с признаками инфекционно-воспалительных заболеваний.
2. Сравнить традиционные и современные методы идентификации грибов на основе масс-спектрометрии, оптимизировать метод масс-спектрометрии применительно к грибам-оппортунистам.
3. Определить современное видовое разнообразие грибов-оппортунистов у животных, включая возбудителей кандидоза, малассезиоза, криптококкоза, и других видов грибов.
4. Охарактеризовать биологические свойства нетривиальных видов грибов, выделенных от животных, включая морфологические, биохимические, ферментативные свойства, а также способность к образованию биопленок.
5. Определить чувствительность выделенных грибов-оппортунистов к противогрибковым препаратам, включая количественное определение минимальной ингибирующей концентрации.

## **Научная новизна**

Получены актуальные данные о распространенности и видовом составе оппортунистических грибковых патогенов у животных, в том числе возбудителей кандидозов, малассезиозов, родоторулезов, трихоспоронозов, феогифомикозов.

Впервые в РФ выделены от животных и охарактеризованы нетривиальные возбудители кандидозов - *C. zeylanoides*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. peltata*, *C. doubushaemulonii*, *C. saitoana*, а также виды рода *Cryptococcus*: *C. albidus*, *C. unigutulatus*, *C. liquefaciens*, *C. ferigula*, *C. oeirensis*, *C. magnum*.

Выделены от животных и охарактеризованы редкие виды дрожжевых грибов *Cutaneotrichosporon moniliiforme*, *Debaryomyces nepalensis*, *Pseudozyma pruni*, *Kazachstania aerobia*, *Kazachstania pintolopesii*, *Cystobasidium pallidum*, *Kwoniella pini*, *Naganishia globosa*.

Определена чувствительность широкого спектра дрожжевых грибов-оппортунистов к противогрибковым препаратам, включая количественное определение МИК.

Получен репрезентативный набор характерных масс-спектров 18 штаммов дрожжевых грибов и внесен в базу российского масс-спектрометра для идентификации методом MALDI-TOF.

Изучено биопленкообразование дрожжевых грибов видов *C. famata*, *C. krusei*, *C. lipolytica*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Aureobasidium pullulans*, *Trichosporon asahii*, выделенных от животных.

### **Теоретическая и практическая значимость**

В результате проведенных исследований разработаны методические рекомендации, одобренные Отделением сельскохозяйственных наук РАН «Лабораторная диагностика кандидозов животных» (Овчинников Р.С. с соавт., 2024), «Лабораторная диагностика малассезиозов животных» (Овчинников Р.С. с соавт., 2024).

Выделены и депонированы в коллекции культур микроорганизмов ФНЦ ВИЭВ РАН три штамма дрожжевых грибов (*Rhodotorula mucilaginosa* «ЗУ/3-23», *Candida dubushaemulonii* «M155-23SnC», *Trichosporon asahii* «M4-23Sn»), а также 140 штаммов включено в исследовательскую коллекцию лаборатории микологии и антибиотиков ФНЦ ВИЭВ РАН.

Получен патент «Штамм дрожжевого гриба вида *Candida duobushaemulonii*, предназначенный для использования в качестве референтного для фенотипической идентификации при лабораторной диагностике кандидозов».

В базу данных российского масс-спектрометра «АЛМАСС-Био» включено 17 новых видов грибов, что значительно улучшило точность идентификации

грибов методом MALDI-TOF и повысило эффективность диагностики микозов животных и человека.

Полученные культуральные, морфологические и биохимические характеристики широкого спектра дрожжевых грибов могут быть использованы для идентификации вновь выделенных патогенов при лабораторной диагностике.

Получены данные о чувствительности грибов к противогрибковым препаратам, включая данные о минимальной ингибирующей концентрации и распространенности полирезистентных штаммов, которые могут использоваться при выборе эффективной противогрибковой терапии.

### **Методология и методы исследования**

Методология диссертационной работы была выстроена в соответствии со структурой и задачами исследования. Объектами научного исследования являлись образцы биоматериала, взятые от животных и выделенные штаммы грибов-оппортунистов. Предметом исследования являлось изучение распространенности и видового состава грибов-оппортунистов среди животных, описание их биологических свойств. Научная литература, касающаяся темы исследования, была проанализирована формально-логическими методами.

В работе были использованы эпизоотологические, клинические, бактериологические, микологические, статистические методы исследований, методы масс-спектрометрии и молекулярные методы идентификации микроорганизмов.

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

1. Данные о распространенности и локализации грибов-оппортунистов у животных с признаками инфекционно-воспалительных заболеваний.
2. Применение метода MALDI-TOF MS с протоколом расширенной пробоподготовки и дополненной базой данных на российском приборе для определения видовой принадлежности дрожжевых грибов.
3. Видовой состав грибов-оппортунистов, ранее не встречавшихся у животных

на территории РФ.

4. Результаты изучения культуральных, морфологических и биохимических свойств и биопленкообразования у дрожжевых грибов.

5. Чувствительность грибов-оппортунистов к противогрибковым препаратам у разных видов животных и распространенность резистентных штаммов.

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

Достоверность результатов, полученных в ходе выполнения диссертационной работы, подтверждена статистической обработкой данных.

Основные положения диссертационной работы доложены на:

- Конференции АНО ВО «МВА» по теме «Инфекционные болезни», 21 декабря 2022 года – Москва;

- XXXI Московском международном ветеринарном конгрессе – Премии «Серебряный микроскоп», 14 апреля 2023 года – Москва;

- Юбилейной конференции по медицинской микологии, 16-18 мая 2023 года – Москва.

- Конференции «Актуальные вопросы ветеринарной медицины и лабораторной диагностики», СПбГУВМ, 25-26 мая 2023 года – Санкт-Петербург.

- Юбилейной Международной научно-практической конференции, посвященной 125-летию со дня создания ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН: «Здоровье животных: Современные научные подходы, направления, тенденции», 26-27 октября 2023 года – Москва.

- 27-ой Пущинской школе-конференции «Биология – наука XXI века», 22-25 апреля 2024 года – Пущино.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 9 научных работ: в журналах, рекомендованных ВАК РФ – 4 статьи; в базах, в сборниках научных трудов – 2 статьи, а также 2 методические рекомендации и один патент на штамм, предлагаемый в качестве референтного.

### **Личный вклад автора**

Автор принимал непосредственное участие в сборе информации по распространенности инфекционно-значимых грибов у животных на территории РФ, проводил микологические, биохимические и культурально-микробиологические исследования материала, получал и обрабатывал данные на масс-спектрометре, проводил оценку чувствительности к противогрибковым препаратам. Принято участие в разработке методических указаний и патента совместно с сотрудниками лаборатории микологии и антибиотиков им. А.Х. Саркисова.

### **Структура и объем диссертации**

Материалы диссертации изложены на 169 листах компьютерного текста и включают: введение, обзор литературы, описание материалов и методов, собственные исследования, обсуждение полученных результатов, заключение с выводами, сведения о практическом использовании результатов исследований, список использованной литературы (196 источник, в т.ч. 153 – иностранных работ). Диссертационная работа содержит 22 таблицы, 38 рисунков и приложения на 11 листах.

## 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 2.1 Значимость микозов для медицины и ветеринарии в 21 веке

Медицинская микология — это научная дисциплина, изучающая патогенные грибы и вызываемые ими заболевания. В середине 19 века во Франции Дэвид Груби показал, что фавус (парша) — это грибковое заболевание. Ранее в том же столетии Агостино Басси продемонстрировал, что *Beauveria bassiana* вызывает заболевание у шелкопрядов. Таким образом, медицинская микология, являющаяся отраслью более широкой дисциплины - микологии, имеет долгую и выдающуюся историю медицинских достижений, насчитывающую более века. Сегодня медицинская микология активно развивается, поскольку изучение грибковых патогенов раскрывает новые фундаментальные проблемы, касающиеся инфекций животных и человека [65].

В настоящее время количество видов микроскопических грибов составляет от 100000 до 200000, из них около 500 видов относится к болезнетворным грибам – возбудителям микозов. Из общего числа болезнетворных грибов около 150 видов считаются облигатно патогенными, а примерно 350 видов – условно патогенными или оппортунистическими для человека и животных. Ежегодно список патогенных грибов пополняется в среднем на 10 видов в год [16].

Медицинская и ветеринарная микология идут в тесной связи друг с другом, поэтому рассматривать их следует во взаимосвязи.

По локализации микозы подразделяют на поверхностные (поражают кожный покров и слизистые оболочки), подкожные (не затрагивают внутренние органы) и глубокие (поражают глубокие ткани и внутренние органы). Самыми распространенными микозами как в медицине, так и в ветеринарии являются дерматомикозы, при которых происходит поражение кожи и ее производных.

Значение грибковых заболеваний резко возросло за последние полвека. В медицинской сфере грибковые заболевания спровоцированы использованием антибиотиков, которые нарушают нормальную микрофлору, препаратами для лечения рака, подавляющими иммунитет, использованием иммунодепрессантов для лечения аутоиммунных заболеваний, а также такими инвазивными

процедурами, как установка внутривенных катетеров и хирургическое вмешательство [65].

Более 300 миллионов человек страдают от серьезных заболеваний, связанных с грибами, при этом от них ежегодно умирает более 1,6 миллиона человек, что больше, чем от малярии, и сопоставимо с количеством смертей от туберкулеза [182]. Грибы и оомицеты уничтожают треть всех продовольственных культур каждый год, что могло бы прокормить 600 миллионов человек. Заражение грибами амфибий привело к самому большому в истории зарегистрированному исчезновению видов, вызванному инфекцией. Также грибы вызывают массовую гибель летучих мышей, пчел и других животных, поражают фруктовые сады, сосновые, и каштановые леса [182].

Грибковые болезни животных являются актуальной проблемой ветеринарии. Одним из ведущих деятелей отечественной ветеринарной микологии является академик А.Х. Саркисов, который занимался, в частности, исследованием микотоксинов грибов и первым ввел термин «микотоксикозы». С 1957 года ак. А.Х. Саркисов заведовал лабораторией микологии и антибиотиков во ВНИИ экспериментальной ветеринарии, которая стала научным флагманом ветеринарной микологии.

Отечественные микологи – пионеры в области разработки иммунобиологических средств терапии и специфической профилактики дерматофитозов. Создание первой в мире эффективной вакцины против трихофитии ЛТФ-130 под руководством академика А.Х. Саркисова заложило принципы, в соответствии с которыми в дальнейшем были созданы живые вакцины против дерматофитозов разных видов животных – лошадей, пушных зверей, верблюдов, овец. Их использование кардинально снизило распространенность дерматофитозов животных в нашей стране и за рубежом [36].

Однако в настоящее время, помимо дерматофитозов, появились новые грибковые заболевания животных, борьба с которыми является важной задачей современной ветеринарной микологии. Важное значение приобрела группа

оппортунистических грибковых заболеваний, вызванных условно-патогенными (оппортунистическими) грибами, в том числе плесневыми и дрожжевыми [22].

На сегодняшний момент в ветеринарии отмечается рост распространенности микозов. Они поражают многие виды животных, включая как животных-компаньонов, так и сельскохозяйственных продуктивных животных. Значение грибов-оппортунистов для животных резко возросло [8,15,18,27,28,30,37]. Ассоциированность микозов с другими заболеваниями создает сложности при их диагностике и лечении. Хронический характер ряда грибковых заболеваний требует длительного лечения, что, в свою очередь, увеличивает риск развития устойчивости к противогрибковым препаратам. При этом и для человека, и для животных возможности терапии крайне ограничены ввиду того, что доступных противогрибковых средств мало, а новые практически не разрабатываются [28,38].

Некоторые виды грибов-оппортунистов все чаще проявляют с устойчивостью к противогрибковым препаратам. Появились новые патогенные грибы, такие как *Candida auris*, которые обладают высокой устойчивостью к существующим противогрибковым препаратам и вызывают вспышки заболеваний, с трудом поддающихся лечению [65].

Последние десятилетия показали, что грибковые инфекции способны представлять угрозу для биоразнообразия планеты, нанося урон целым популяциям животных. В 2006 г. впервые было описано массовое грибковое заболевание летучих мышей, впоследствии получившее название «синдром белого носа» (*white nose syndrome*). Возбудитель – гриб вида *Pseudogymnoascus destructans*, поражающий мышей во время гибернации (спячки) [56].

Также распространяются хитридиомикозы, смертность от которых достигает 95%. Хитридиомицет *Batrachochytrium dendrobatidis* – возбудитель высоколетального микоза у амфибий (жаб, лягушек, саламандр) в дикой природе. Этот вид гриба впервые описан в 1998 г. К настоящему времени возбудитель нанес серьезный урон популяциям амфибий в разных регионах мира [87;187].

У холоднокровных, в том числе у змей также регистрируются грибковые заболевания. Начиная с 2006 года в США отмечается резкий всплеск микозов.

Заболевания регистрируются у змей, пойманных в дикой природе и перемещенных в домашние условия. У разных видов змей клиника может несколько отличаться; четкие патогномоничные признаки на сегодня пока не установлены. Наиболее часто от больных змей выделяют грибок вида *Ophidiomyces ophiodiicola*, ранее относившийся к роду *Chrysosporium* [177]. *O. ophiodiicola* является основным возбудителем «грибковой болезни змей». Болезнь контагиозна и нередко приводит к летальному исходу. Микоз официально зарегистрирован уже в 9 штатах США, но его истинная распространенность может быть гораздо шире. Восприимчивы многие виды змей (гремучие змеи, ужи, водяные змеи и т.д.). Данные по терапии этого микоза очень ограничены. В опубликованных исследованиях возбудитель проявлял устойчивость к терапии кетоконазолом и итраконазолом [28].

Эти примеры наглядно иллюстрируют возросшую значимость грибковых инфекций для животных, которые вызываются в т.ч. новыми, неизвестными ранее патогенными грибами, индикации и идентификации которых следует уделять особое внимание.

Несмотря на негативное влияние грибковых заболеваний на человека, животных и различные экосистемы, царство грибов исследовано меньше, чем бактерии, вирусы и простейшие [182]. Эксперты сходятся во мнении, что грибковые патогены представляют серьезную угрозу для здоровья человека, животных, пищевой биобезопасности и устойчивости экосистем, однако система надзора за заболеваемостью микозами в ветеринарии практически отсутствует, что приводит к росту заболеваемости, распространению новых патогенов и развитию устойчивости к противогрибковым препаратам [182].

Приведенные данные наглядно иллюстрируют значение и актуальность грибковых инфекций для медицины и ветеринарии.

## **2.2 Оппортунистические, факторные инфекции**

В сельском хозяйстве в настоящее время основными заболеваниями продуктивных животных (молочных, мясных, племенных) становятся болезни,

вызванные условно-патогенными или оппортунистическими микроорганизмами, которые вызывают факторные инфекции.

Понимание роли микроорганизмов в возникновении болезней расширяется – многие из них, которые ранее считались безвредными комменсалами организма, сейчас могут участвовать в развитии патологических процессов. Примерами служат открытие этиологической роли микроорганизма *Helicobacter pylori* в язвенной болезни желудка или роли гриба *Malassezia pachydermatis* при отитах у животных. Значительная часть современных инфекций - результат активации собственной «условно-патогенной» микрофлоры организма-хозяина. Приоритеты массовой заболеваемости перешли к эндогенным аутоинфекциям за счет убиквитарных условных патогенов. Основной инфекционной патологией продуктивных животных становятся гнойно-воспалительные процессы (маститы, эндометриты, бурситы), пневмоэнтериты, некробактериоз и т.п., в большинстве своем до сих пор, по инерции, относимые к категории незаразных болезней [8,17].

Существуют монофакторные инфекции, которые подразумевают взаимодействие «возбудитель + восприимчивый организм», где развитие болезни идёт в соответствии с классической триадой Коха. В отличие от первичных патогенов, условно-патогенные микроорганизмы вызывают заболевания не напрямую, а при наличии определенных условий (факторов). Эти условия могут быть связаны с окружающей средой, условиями кормления и содержания животных, с их возрастом, генетическими особенностями и др. Все эти факторы увеличивают риск развития болезней. Возбудитель в этой цепочке играет роль лишь конечного звена, а главную роль в развитии болезни играют внешние и внутренние условия. Такие инфекции называются факторными (также мульти- или полифакторными) [17].

Оппортунистические микроорганизмы (которые могут быть сапрофитами или фитопатогенами), в обычных условиях не вызывают болезни самостоятельно. Они могут приводить к заболеванию только при ослаблении иммунной системы и резистентности организма. Ярким примером таких инфекций служат оппортунистические микозы – кандидоз, аспергиллез, малассезиоз и т.д. В

зависимости от степени ослабления иммунитета, такие инфекции могут быть локальными или распространяться по всему организму, протекать остро или хронически.

Сам термин «оппортунистический» появился в медицине в конце XX века и первоначально использовался для описания заболеваний, вызываемых многими «непатогенными» организмами – простейшими, грибами, бактериями и вирусами. Патогенетические и эпидемиологические особенности оппортунистических инфекций сложно предсказать, особенно в условиях ухудшающейся экологии и влияния антропогенных факторов на окружающую среду [17].

В ветеринарии вследствие контроля острых эпизоотических инфекций основной проблемой для продуктивных животных стали болезни, главной причиной которых являются средовые и иные факторы эпизоотологического риска, включая нарушение условий содержания животных (низкие температуры, сквозняки, плохое кормление, отсутствие гигиены). Эти причины создают условия для развития факторных инфекций у животных [6;17].

В настоящее время ни один вид гриба нельзя считать безвредным, недооценивать его клиническую значимость. Подавляющее большинство микроскопических грибов — оппортунистические патогены, и именно ими вызываются многие эмерджентные инфекции [157]. Оппортунистические грибковые инфекции являются одними из самых распространенных заболеваний, которые появились в последние годы и в настоящее время представляют серьезную проблему для здоровья населения [112].

В качестве возбудителей оппортунистических микозов может выступать широкий круг мицелиальных и дрожжевых грибов, в т.ч. редких и нетривиальных. В медицине частота встречаемости видов *Candida non-albicans* увеличивается по сравнению с *C. albicans*, причем некоторые виды, такие как *C. glabrata* и *C. krusei*, могут быть устойчивы к азольной противогрибковой терапии. Виды *Trichosporon* являются второй по частоте причиной фунгемии у пациентов с гематологическими злокачественными заболеваниями и характеризуются устойчивостью к амфотерицину и эхинокандинам и плохим прогнозом. Виды *Rhodotorula* относятся

к семейству *Cryptococcaceae* и являются причиной катетер-ассоциированных фунгемий, сепсиса и инвазивного заболевания у пациентов с ослабленным иммунитетом. Увеличивается число спорадических случаев инвазивных грибковых инфекций, вызванных *non-neoformans* криптококками. Другие редкие дрожжи, которые могут вызывать оппортунистические микозы, включают роды *Geotrichum*, *Hansenula* и *Saccharomyces*, чья клиническая значимость недооценивается [133].

Оппортунистические микозы регистрируются у большинства видов животных – теплокровных и холоднокровных, позвоночных и беспозвоночных, домашних, диких, промысловых, продуктивных. Данные грибковые инфекции всё чаще встречаются в повседневной ветеринарной практике. Общая распространенность оппортунистических микозов увеличилась с 19,3% в период 1997-2004 гг. до 78,5% в период 2005-2012 гг. [150].

Расширение видового состава грибковых возбудителей также связано с интродукцией на территорию РФ патогенов из других стран и регионов. Так, в лаборатории микологии ФНЦ ВИЭВ был диагностирован гриб *Ophidiomyces ophidiicola*, возбудитель массовой грибковой болезни змей (*snake fungal disease*). Он был выделен от павших змей, импортированных из Малайзии [28]. У морских свинок был диагностирован дерматофит *Trichophyton benhamiae*, вероятно завезенный из стран Западной Европы [27].

Стоит отметить, что диагностика оппортунистических инфекций может являться затруднительной для практикующих специалистов из-за коморбидного состояния организма и неопределенности клинических симптомов. В следующих разделах диссертации будут рассмотрены особенности и сложности диагностики грибов-оппортунистов.

### **2.3 Клиническая значимость грибов рода *Candida***

В настоящее время род *Candida* относится к отделу *Ascomycota*, подотделу *Saccharomycotina*, классу *Saccharomycetes*, порядку *Saccharomycetales* и семейству *Debaryomycetaceae* [72].

Грибы рода *Candida* могут вызывать заболевания у животных, начиная от местных инфекций и заканчивая системными поражениями. Эти инфекции могут существенно ухудшить состояние здоровья животных, привести к снижению их продуктивности, стать причиной гибели, также они могут приводить к значительным экономическим потерям в животноводстве из-за повышенных затрат на лечение и уход за больными животными.

Кандидомикозы животных диагностированы и в разной степени изучены почти у всех видов животных. Большое внимание отечественные исследователи уделяли инфекции у кур, свиней и крупного рогатого скота. Многие аспекты кандидоза других видов животных до сих пор изучены недостаточно [15].

Различные виды грибов рода *Candida* являются обычными обитателями носоглотки, желудочно-кишечного тракта и наружных половых органов у многих видов животных. Они относятся к оппортунистическим патогенам, то есть могут вызывать заболевания при снижении иммунной резистентности организма. К факторам, способствующим развитию кандидозных инфекций, относятся иммуносупрессивные состояния, повреждение слизистых оболочек, длительное использование катетеров и неправильное применение антимикробных препаратов [55;96].

У здоровых животных с активной иммунной системой кандидозы не развиваются и купируются благодаря активности фагоцитов. Однако при ослабленном иммунитете грибы *Candida* могут поражать слизистую оболочку и, благодаря своему полиморфизму, изменять форму с дрожжевой на мицелиальную. Эта мицелиальная форма имеет большие размеры, что затрудняет их поглощение фагоцитами. Проникновению грибов в слизистую оболочку хозяина способствуют ферменты, такие как фосфолипаза, которые секретируются грибами [11].

Среди сельскохозяйственных животных наиболее восприимчивы к инфекциям, вызванным грибами рода *Candida*, поросята и телята в возрасте 10-15 дней, а также цыплята и индюшата до месячного возраста. У заболевших кандидозом поросят чаще всего поражается желудок, у телят – преджелудки и сычуг, а у молодняка птиц – ротовая полость, пищевод и зоб. У серебристо-черных

лисиц, собак и кошек при кандидомикозе регистрируют поражения кожи, проявляющиеся гиперемией, шелушением, разрежением волосяного покрова вплоть до образования локальных алопеций, язв и гиперкератоза. Скопление животных на ограниченных территориях, содержание животных одного вида и возраста, а также увеличение числа патогенных микроорганизмов способствуют распространению грибов рода *Candida*.

В своей работе Сачивкина и др. описывают вспышку кандидоза в одном из хозяйств Пензенской области, где содержались свиньи большой белой породы. Были выделены грибы рода *Candida* из лимфатических узлов 19 из 30 больных животных и идентифицированы как *C. albicans* и *C. africana* с помощью технологии матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI-TOF) [37].

В ходе исследований, проведённых Рысцовой Е.О. и др. в 2018-2019 годах, были диагностированы случаи кандидоза в разных отделах пищеварительного тракта свиней - в ротовой полости (28%), тонком кишечнике (49%) и толстом кишечнике (23%). При этом преобладало выделение вида *C. albicans* (81%). Также выделили виды *Candida non-albicans*: *C. parapsilosis* – 9 %, *C. tropicalis* – 4 %, *C. glabrata* – 2 %. Также была зарегистрирована сочетанная ко-инфекция *C. albicans* – *C. parapsilosis* и *C. albicans* – *C. glabrata* по одному случаю (по 2 %) [31].

Одна из распространённых форм проявления кандидоза у сельскохозяйственных животных — мастит. Впервые кандидозный мастит у крупного рогатого скота был описан *Fleischer* в 1930 году. Виды *Candida* рассматриваются как условно-патогенные микроорганизмы, колонизирующие вымя коров. Развитию дрожжевой колонизации способствуют травмы сосков, использование и злоупотребление антибактериальными средствами и антибиотиками. Источниками инфекции могут быть кожа вымени, руки дояра, доильные аппараты, полы, солома, корма, лекарства и санитарно-гигиенические средства. Грибковый мастит может развиваться при лечении других патогенов из-за использования загрязнённых шприцев, канюлей и другого ветеринарного инструментария [80].

Заболеваемость маститами, вызванными дрожжевыми грибами, за последние десятилетия имеет тенденцию к росту. Распространённость и видовой состав возбудителей грибковых маститов в различных регионах значительно варьирует. В Люблинском регионе Польши грибы были выделены из 9,6% исследованных образцов, наиболее часто встречались виды *C. kefir*, *C. cirferi* и *C. krusei* [117].

Эти данные свидетельствуют о широком видовом разнообразии возбудителей и подчёркивают необходимость тщательного микологического исследования при диагностике инфекционных маститов у крупного рогатого скота.

По данным Шамуковой Д.Ф. и др. встречаемость грибов рода *Candida* у собак с подозрением на грибковые инфекции составила 42% и 47% у кошек, при этом были выделены виды *C. albicans* (94%), *C. tropicalis* (5%) и другие (1%) [43]. При отитах у собак и кошек были выделены виды *C. albicans* и *C. parapsilosis* [7].

Апанасенко Н.А. сообщает о выделении от серебристо-черных лисиц, собак, кошек, рептилий 137 штаммов грибов рода *Candida*: 89 - *C. albicans*, 38 - *C. tropicalis*, 4 - *C. parapsilosis*, 3 - *C. glabrata*, 3 - *C. krusei*. В большинстве случаев *C. albicans* выделяли в ассоциации с другими видами, преимущественно с *C. tropicalis*. Кандидозные поражения обнаруживали в кожных складках (28,3 %), на коже вне складок (25 %), в области наружных половых органов (19,6 %), в ротовой полости, в углах и вокруг рта (11,9 %), вокруг глаз (5,4 %), в наружном слуховом проходе (5,4 %), вокруг сосков у кормящих самок (2,2 %). Чаще поражения наблюдали у собак и серебристо-черных лисиц [3].

Таким образом, наряду с *C. albicans*, в качестве возбудителей всё чаще выявляются другие виды рода *Candida* (*Candida non-albicans*), такие как *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* и другие. Увеличение случаев диагностики этих видов можно объяснить улучшенными методами идентификации, включая использование хромогенных сред для дифференциации видов рода *Candida*, применение масс-спектрометрического анализа (MALDI-TOF), а также внедрение молекулярных методов в рутинную диагностику грибковых инфекций, таких как ПЦР и метагеномное секвенирование [178].

Понимание факторов, способствующих развитию кандидозов, и разработка профилактических мер важны для предотвращения инфекций и поддержания здоровья животных. Учитывая большое видовое разнообразие грибов рода *Candida*, важной диагностической задачей является точная видовая идентификация изолятов, выделенных из клинического материала.

#### 2.4 Клиническая значимость грибов рода *Malassezia*

Дрожжевые грибы рода *Malassezia* принадлежат к отряду *Basidiomycota*, подотряду *Ustilagomycotina*, классу *Malasseziomycetes*, порядку *Malasseziales* и семейству *Malasseziaceae*. К этому роду относятся такие виды, как *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. dermatis*, *M. japonica*, *M. nana*, *M. yamatoensis*, *M. caprae*, *M. equina*, *M. cuniculi*, *M. arunalokei*, *M. vespertilionis*, *M. brasiliensis*, *M. equi*, *M. muris* и *M. psittaci*. В ветеринарии наибольшее значение имеет вид *M. pachydermatis* [72].

Являясь представителями нормальной микобиоты кожи теплокровных животных и человека, при определенных условиях грибы рода *Malassezia* способны вызывать патологический процесс. У людей представители этого рода грибов участвуют в патогенезе кожных заболеваний («пестрый лишай», себорейный дерматит, фолликулиты, расстройства пигментации), а также вызывают системные микозы у лиц с ослабленным иммунным статусом.

Впервые грибы рода *Malassezia* были обнаружены на коже индийского носорога с генерализованным дерматитом [189]. После этого малассезиозы были диагностированы у многих теплокровных животных. У *M. pachydermatis* широкий круг хозяев и данный вид можно выделить от разных видов животных. В то время как некоторые из них видоспецифичны: *M. caprae* для коз, *M. equina* для лошадей, *M. cuniculi* для кроликов [101].

Наиболее подробно *Malassezia* изучена у собак и кошек. Исследования показали, что различные анатомические области могут иметь разную степень колонизации: например, периоральная и межпальцевая зоны у здоровых собак часто колонизируются *M. pachydermatis*, в отличие от подмышечной зоны или

спины. У кошек, помимо *M. pachydermatis*, было идентифицировано несколько видов *Malassezia*. Недавние исследования с использованием методов секвенирования выявили гораздо большее видовое разнообразие грибковых патогенов кожи собак, чем считалось ранее по результатам культурных методов дифференциации [101].

Ветеринарные врачи проявляют интерес к грибам рода *Malassezia*, которые связаны с распространенными дерматологическими заболеваниями, такими как отиты и дерматиты собак и кошек [57].

Особенность строения клетки грибов рода *Malassezia* заключается в том, что она имеет характерную толстую многослойную клеточную стенку, отличающуюся от таковой у большинства других грибов. Кроме того, в ней содержится особенно большое количество (около 70%)  $\beta$ -(1,6)-глюкана по сравнению с другими видами грибов. Это может привести к изменению иммунного распознавания, учитывая важность  $\beta$ -(1,6)-глюкана как паттерна, ассоциированного с патогеном. Также компонентами клеточной стенки грибов рода *Malassezia* являются хитин (5%), хитозан (20%) и  $\beta$ -(1,3)-глюкан (5%) [180].

Еще одной характерной особенностью *Malassezia* является липофильность. Для ее роста требуется добавление в питательную среду твина, бычьей желчи, оливкового масла, моноглицерида стеариновой кислоты или других источников жирных кислот. Липофильность обуславливается наличием липолитических ферментов, способных гидролизовать липиды кожного секрета до свободных жирных кислот. Фосфолипазы играют существенную роль в патогенности *Malassezia spp.* Помимо липаз, *M. pachydermatis* синтезирует протеиназу, сульфатазу, гиалуронидазу, которые также играют роль в пенетрации покровных тканей организма-хозяина. Однако проникновение дрожжевых клеток ограничивается как правило лишь верхними слоями эпидермиса [30].

Одним из биохимических процессов, представляющих особый интерес, является производство коричневых пигментов. Этот процесс хорошо описан в основном для *M. furfur*, тем не менее, другие виды, такие как *M. pachydermatis*, *M. yamatoensis* и *M. slooffiae*, также способны производить пигменты.

Экспериментальные данные показали, что эти пигменты являются производными индола, и как правило участвуют в развитии себорейного дерматита [92,130].

Выявлена связь между заболеваемостью малассезиозами и породной принадлежностью животных. У собак отиты, вызванные *Malassezia*, чаще регистрируются у пород с длинными висячими ушами, такими как бассет-хаунд, коккер-спаниель, пудель, вест-хайленд-уайт-терьер, сеттер, далматин и бигль [58]. Это объясняется анатомическими особенностями их ушей, так как висячие ушные раковины затрудняют вентиляцию слухового прохода. Также относительно высокая заболеваемость малассезиозами наблюдается у таких пород, как французский и английский бульдоги, мопс, шарпей и чау-чау, которые относятся к брахицефалам – породам с укороченной мордой [8].

У кошек к *Malassezia*-инфекциям предрасположены породы с необычным шерстным покровом, например, сфинкс и девон-рекс [46]. Среди крупного рогатого скота интенсивная колонизация слухового прохода грибами рода *Malassezia* чаще обнаруживается у зебувидных пород с характерными висячими ушами [79].

Имеются лишь немногочисленные сообщения о малассезиозах у крупных видов животных, например, *Malassezia*-ассоциированный дерматит у лошадей [190]. У коз регистрировали себорейный дерматит, связанный с *Malassezia* [83,158].

Несмотря на то, что малассезиозы обычно не представляют серьезную угрозу для жизни, они могут существенно ухудшить качество жизни животного и потребовать медицинского вмешательства для лечения.

Малассезиозы являются характерным примером эмерджентных оппортунистических микозов животных, наряду с кандидозами. До 2000-х гг. об их распространенности на территории РФ не было практически никаких сведений. Первое целенаправленное изучение распространенности, этиологической структуры и клинико-эпизоотологических особенностей *Malassezia*-инфекций животных на территории РФ было отражено в работе Ершова П.П. [8].

Этиологическая роль грибов рода *Malassezia* установлена в 80,4% случаев у собак с хроническим отитом, у собак с кожными поражениями (дерматитами) – в 14,8% случаев, у кошек с отитами - в 11,8% случаев. В 83% случаев развитие

*Malassezia*-инфекций наблюдали на фоне первичных патологий, прежде всего пищевых аллергий, иммунопатии, эндокринных заболеваний, при применении гормональных препаратов и антибиотиков. Было установлено, что развитие патологического процесса связано с многократным увеличением популяции грибов рода *Malassezia*.

За короткий промежуток времени грибы рода *Malassezia* стали доминирующими возбудителями поверхностных микозов у мелких домашних животных [150].

## **2.5 Клиническая значимость представителей родов *Trichosporon*, *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula***

Наряду с часто фигурирующими в медицинской и ветеринарной практике грибами рода *Candida* и *Malassezia*, в последнее время имеют тенденцию к распространению редкие виды дрожжевых грибов родов *Aureobasidium*, *Trichosporon*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*. Все эти представители могут встречаться в окружающей среде, в почве, воде и других различных субстратах. Тем не менее, они являются также оппортунистическими патогенами и способны вызывать инфекционный процесс в иммунокомпromетированном организме.

Грибы рода *Trichosporon* могут быть частью нормальной микробиоты, колонизируя кожу, желудочно-кишечный тракт и дыхательные пути здорового организма. Однако *T. asahii* также может вызывать поверхностный, подкожный и инвазивный трихоспороноз у животных и людей [118].

Помимо наиболее изученного вида *T. asahii* распространяются и другие представители этого рода – *T. mucoides*, *T. japonicum*, *T. coremiiforme*. Литературные данные о встречаемости *Trichosporon spp.* у различных видов животных очень ограничены. Описана инфекция у кошки, которая проявлялась в форме гранулематозного дерматита и сопровождалась диссеминированной лимфобластной лимфосаркомой. У другой кошки был диагностирован цистит мочевого пузыря, вызванный *T. beigeli* [78]. Вид *T. loubieri* был выделен дважды

также от кошек с различными клиническими признаками, в том числе симптомами ринита и цистита [169].

*T. montevidense* стал причиной менингоэнцефалита, который был диагностирован у 4-летней собаки с быстро прогрессирующими неврологическими симптомами, завершившимися коматозным состоянием. При патологоанатомическом исследовании существенных повреждений не было. При микроскопии в головном мозге было обнаружено несколько участков пиогранулематозного воспаления с непигментированными гифами гриба [59].

У сельскохозяйственных животных также описаны *Trichosporon*-ассоциированные заболевания. У двух овцематок был диагностирован тяжелый пиогранулематозный и некротизирующий ринит с фокальной пиогранулематозной пневмонией. В ноздрях и легких обоих животных был выявлен *Trichosporon spp.* [88].

Обнаружены грибы рода *Trichosporon* и у хладнокровных животных. Так, *T. asahii* стал причиной диссеминированного микоза у оперенного василиска (*Basiliscus plumifrons*), содержащегося в домашних условиях. На левой тазовой конечности наблюдались множественные язвенные узелки неправильной формы размером 0,2–0,5 см. Животное погибло из-за невосприимчивости к лечению. Микроскопическое исследование выявило грибковую инфекцию, которая в первую очередь поразила левую тазовую конечность и правую долю легкого с грибковой эмболией в легких и печени [127].

В медицинской литературе описано много случаев заболеваний, связанных с *T. mucoides* и *T. japonicum*, но случаев, связанных с обнаружением этих видов у животных в литературе обнаружить не удалось. Однако известен случай, при котором *T. asahii* и *T. mucoides* были выделены из ротовой полости здоровой собаки [172].

Грибы рода *Rhodotorula* широко распространены в окружающей среде и находят применение в биотехнологической промышленности. Одной из характерных черт этого рода является наличие розово-кораллового пигмента, благодаря которому колонии легко отличить от других видов дрожжей. Они часто

выделяются с кожных покровов животных как комменсалы. Однако в последние годы в медицине наблюдается рост инфекций, вызванных *Rhodotorula spp.*, которые могут приводить к фунгемии с высокой смертностью. Из-за недостаточного опыта в лечении таких инфекций терапия остается проблематичной [185].

Встречаемость грибов рода *Rhodotorula* у животных изучена слабо. В литературе описаны случаи инфекции дыхательных путей и цистита у кошек с собак [168]. Среди немногих упоминаний о патогенности *Rhodotorula spp.* у животных есть несколько сообщений о вспышках кожных инфекций у кур и морских животных, а также легочных инфекциях и отите у овец и крупного рогатого скота [192]. По сравнению с *R. mucilaginosa*, виды *R. glutinis* и *R. minuta* реже выделяются из естественной среды.

Среди грибов рода *Aureobasidium* самым распространенным видом является *A. pullulans*. Он также, как и предыдущие представители, является оппортунистическим патогеном животных и людей, который может обитать во внешней среде и у иммунокомпрометированных организмов вызывать инфекционные процессы, в том числе и системные феогифомикозы.

Отличительной морфологической особенностью вида является бледно-розовый цвет колоний и появление черного пигмента (меланина) во время инкубации, в силу чего его относят к группе феогифомицетов. При микроскопии колоний наблюдают полиморфные клетки, септированные гифы мицелия, а также многочисленные бластоконидии [72].

Грибы рода *Aureobasidium* могут обнаруживаться на шерсти клинически здоровых собак [63]. Однако также они могут иметь клиническое значение, хотя по литературным данным *Aureobasidium*-ассоциированных инфекций у животных довольно мало. Описан случай подкожного феогифомикоза у собаки с язвенным поражением правой конечности в послеоперационный период кастрации [188]. Также зафиксирован случай идентификации при отитах собак [64] и описан случай глубокой инфекции с поражением почек у плотвы (*Rutilus rutilus*), что говорит о клинической значимости *A. pullulans* для рыб и холоднокровных животных в целом [165].

Грибы рода *Cryptococcus* включают множество видов. Наибольшее клиническое значение для человека имеют виды *C. neoformans* и *C. gattii*. *C. neoformans* распространен по всему миру, в основном в почве и гниющих растениях, особенно в помете голубей. *C. gattii* в основном распространен в тропических и субтропических районах [129].

Вид *C. neoformans* был выделен из гуано некоторых видов птиц, включая кур, попугаев, воробьев, жаворонков, скворцов, канареек и горлиц, а также из верхних дыхательных путей млекопитающих, с симптомами криптококкоза и без них [163]. Предполагается, что почва является менее благоприятной средой для *C. neoformans*, чем птичьи экскременты. Также этот вид обнаруживают в разлагающейся древесине, в дуплах живых деревьев, но значительно реже, чем *C. gattii*. Инкубационный период может длиться месяцы и годы, и источник инфекции часто остается неизвестным. Криптококки могут выступать в качестве первичного, или в качестве оппортунистического патогена. Из верхних дыхательных путей инфекция может распространяться в центральную нервную систему (ЦНС) через решетчатую кость, и реже – в нижние дыхательные пути.

Среди млекопитающих, криптококкоз зарегистрирован у крупного рогатого скота, лошадей, собак, кошек, лис, коз, альпак, морских свинок, коал и других сумчатых, а также различных морских млекопитающих. Среди мелких домашних видов животных, криптококкоз чаще всего наблюдается у кошек [155]. Криптококкоз обычно регистрируется как спорадические случаи. Однако в 2000 г. в Канаде впервые зарегистрирована вспышка криптококкоза, вызванная *C. gattii*, которая затронула людей, сухопутных животных (собаки, кошки, хорьки, ламы, лошади, птицы) и морских млекопитающих (морские свиньи *Phocoenoides dalli*). Диагноз был лабораторно подтвержден у 50 человек и 45 животных [181].

Данные по распространенности криптококкоза человека в РФ ограничены и разрознены. Российские исследования подтверждают присутствие криптококков во внешней среде. Так, в Санкт-Петербурге основным природным резервуаром *C. neoformans* является помет голубей, при этом частота выделения культур криптококков составляет 3,2% [5]. На сегодня нет достоверных данных о

культуральной диагностике видов *C. neoformans*/ *C. gattii* у животных на территории РФ.

Также широко распространенным условно-патогенным видом является *C. albidus* (синоним – *Naganisha albidum*), он считается сапрофитным грибом и редко упоминается как патоген. Тем не менее в последние годы в медицине появляются сообщения о клинических случаях, связанных с *C. albidus*. В 2000 году опубликовано первое сообщение о кожной инфекции, вызванной *C. albidus* у иммунокомпрометированного пациента [141]. Затем было опубликовано ещё шесть случаев кожного криптококкоза у иммунокомпрометированных мужчин в Бразилии, США, Великобритании, Венгрии, Южной Кореи и Иране. [45,102,123,141]. Последний случай опубликован в 2023 году [148]. Описаны клинические случаи диагностирования *C. albidus* при менингите [131], перитоните [162], энцефалите [126], септицемии [128] и др.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что регистрируется все больше и больше оппортунистических инфекций, связанных с криптококками, не относящимися к виду *C. neoformans*. Некоторые виды грибов, которые ранее не считались патогенными и рассматривались как сапрофиты, сейчас нередко ассоциированы с заболеваниями у иммунокомпрометированных пациентов.

В медицине также отмечают распространенность оппортунистических микозов, вызываемых представителями родов *Trichosporon* (трихоспороноз), *Rhodotorula* (родоторулоз), *Aureobasidium* (феогифомикоз), однако в ветеринарии их клиническая значимость недостаточно изучена и требует дальнейших исследований.

Эти данные демонстрируют необходимость пристального внимания к данным микроорганизмам и изучения их распространённости у животных в норме и при патологиях.

## **2.6 Факторы патогенности грибов-оппортунистов**

Потенциальная патогенность грибов обуславливается их свойствами адаптационного характера, позволяющими им противостоять защитным

механизмам организма и осуществлять проникновение через барьеры иммунной системы. Факторы патогенности имеются как у первичных, так и оппортунистических патогенных грибов. Однако это различие не является четким, поскольку первичные патогены, такие как *Coccidioides immitis*, могут вызывать заболевания у лиц с ослабленным иммунитетом, а оппортунистический вид *C. neoformans* может иногда вызывать заболевания у иммунокомпетентных лиц [108].

Кроме этого, оппортунистические грибы обладают высокой степенью адаптации к условиям среды, в том числе и экстремальным, а также полибиотрофностью. Эти особенности позволяют им заполнять различные экологические ниши и распространяться повсеместно [40].

Патогенность грибов определяется комплексом свойств адаптивного характера, позволяющих противостоять защитным механизмам организма и, самое главное, осуществлять инвазию. К этим свойствам относятся: адгезия, экскреция ферментов (протеаз, фосфолипаз, оксидаз), факторы инвазивности, диморфизм грибов и др. По вышеперечисленным признакам можно частично определить степень патогенности грибов. О потенциальной патогенности оппортунистических грибов может свидетельствовать наличие аналогичных факторов патогенности у грибов, являющихся первичными патогенами [1].

По мнению de Hoog [72], для грибов-оппортунистов важны не столько факторы вирулентности, сколько факторы жизнеспособности, позволяющие выживать в неблагоприятных условиях макроорганизма. К таким факторам жизнеспособности относятся термотолерантность, осмоотолерантность, галотолерантность, меланизция, капсулообразование и другие.

Способность расти при повышенной температуре является важным фактором жизнеспособности. Грибы, вызывающие системные инфекции, способны расти при обычной и фебрильной температуре тела. Патогенные грибы могут вырабатывать ферменты, которые нейтрализуют токсичный кислород, выделяемый нейтрофилами и макрофагами. *C. albicans* использует супероксиддисмутазу и HSP, а *C. neoformans* производит медь, цинк и пероксидазу для устойчивости к окислению [50].

Меланин является важным компонентом грибных клеток, который защищает их от различных внешних воздействий (от фунгицидов, излучения, высыхания, радионуклидов и т.д). Были проведены исследования связи патогенности с меланином у грибов на изолятах *C. neoformans*, которые установили, что синтез меланина происходит в процессе инфицирования, а меланинообразующие штаммы более вирулентные, чем «альбино-мутанты» [144;145]. Также меланин играет роль в антибиотикорезистентности - он связывается с каспофунгином и амфотерицином В. Помимо этого меланины повышают вирулентность грибов путем снижения их чувствительности к защитным функциям организма [121].

Помимо *C. neoformans* были проведены исследования с грибами рода *Aspergillus*. Штаммы *A. fumigatus*, которые не вырабатывают пигмент, были менее вирулентны, а также более чувствительны к противогрибковым препаратам. Повышение чувствительности можно связать с тем, что клеточная стенка грибов становится менее прочная из-за отсутствия пигментов и повышается проницаемость клеток. [164].

Еще один фактор патогенности – это полисахариды грибов, которые могут быть внутриклеточные (полисахариды цитоплазмы, мембраны, клеточной стенки) и внеклеточные (полисахариды капсул). Исследования, которые проводили на штаммах *Cryptococcus neoformans* и грибах рода *Candida*, доказали важную роль внеклеточных полисахаридов. Они участвуют в прикреплении клеток *C. albicans* к клетками эпителия и эндотелиальными, тем самым повышая адгезию грибов [176].

Образование биопленки грибами становится важным фактором патогенеза грибковых заболеваний и важным фактором, обуславливающим устойчивость к противогрибковым препаратам. Наиболее изучено образование биопленок у вида *C. albicans*. При этом литературные данные по образованию биопленок у дрожжевых грибов родов *Aureobasidium*, *Trichosporon*, *Rhodotorula* довольно ограничены. О способности *A. pullulans* формировать биопленки сообщают в своих исследованиях Di Francesco *et al.* [76]. *T. asahii* также может формировать биопленки, причем они в 16000 раз более устойчивы к вориконазолу, нежели

планктонные клетки [75]. Биопленкообразование обнаружено и у *R. mucilaginosa* [93].

Одним из наиболее значимых факторов патогенности микроорганизмов являются некоторые гидролитические ферменты. Клетки грибов обладают набором гидролитических ферментов, которые могут разрушать компоненты клеточных мембран организма-хозяина. Этот процесс приводит к нарушению функций клеток и, следовательно, к возможности заражения тканей. Главными целями для таких ферментов являются липиды и белки, которые являются основными строительными блоками клеточных мембран. Протеиназы, направленные на пептидные связи, и фосфолипазы, способные гидролизовать фосфолипиды, представляют наиболее значимые классы этих ферментов. Исследование роли фосфолипаз в патогенности грибов является относительно новым и активно развивающимся направлением в современной медицинской микологии [12].

Ранее было показано, что только вид *C. albicans* продуцирует внеклеточную фосфолипазу. Было установлено, что 79% штаммов *C. albicans* продуцируют фосфолипазы, в то время как штаммы *C. tropicalis*, *C. glabrata* и *C. parapsilosis* этих ферментов не образуют [170]. Количество фосфолипаз у *C. albicans* варьировалось в зависимости от локализации инфекции: штаммы из крови выделяли больше ферментов, чем изоляты из ран или мочи. Но позже было доказано, что другие виды *Candida* также продуцируют внеклеточные фосфолипазы. В исследовании Clancy C.J. et al. 41% штаммов *C. glabrata*, 50% *C. parapsilosis*, 70% *C. tropicalis*, 80% *C. lusitaniae* и 100% *C. krusei* продуцировали фосфолипазы, хотя и в меньших количествах по сравнению с *C. albicans*. Также в этом исследовании была выявлена фосфолипазная активность у *C. glabrata*, что может быть фактором вирулентности при кандидемиях. Исследование показало фосфолипазную активность у 53% изолятов *non-albicans* видов *Candida* (*C. glabrata*, 22; *C. parapsilosis*, 12; *C. tropicalis*, 10; *C. lusitaniae*, 5; *C. krusei*, 2) [66,94].

Известно, что среди представителей рода *Candida* существуют как фосфолипазоположительные, так и фосфолипазоотрицательные штаммы, но

факторы и механизмы, определяющие фосфолипазную активность, изучены недостаточно.

Проблемным является вопрос установления этиологической роли грибов-оппортунистов, обнаруженных в клиническом материале при диагностических исследованиях. Классический метод экспериментального заражения животных не всегда может быть информативным. При заражении здоровых животных большинство грибов-оппортунистов не способно вызвать инфекционный процесс.

В ряде исследований для моделирования инфекции применяют иммуносупрессию животных. Однако данный подход не всегда является информативным, так как сложно подобрать показательные условия [17].

Для грибов-оппортунистов, как отмечалось выше, большую роль играют факторы жизнеспособности, нежели факторы вирулентности. Поэтому характеристиками, косвенно указывающими на патогенный потенциал гриба-оппортуниста, могут являться термотолерантность, способность образовывать биопленки, фосфолипазная активность.

Также факторы патогенности грибов включают в себя различные белки, которые могут вызывать аллергические реакции,  $\beta$ -1,3-глюканы, летучие органические соединения, токсины, вторичные метаболиты и т.д. [133].

## **2.7 Методы лабораторной диагностики и идентификации грибов-оппортунистов**

### **2.7.1 Традиционные методы диагностики**

Лабораторная диагностика при оппортунистических микозах любой локализации включает сбор анамнеза, проведение клинических исследований, микроскопию патологического материала или биоптата, выделение из данного материала чистой культуры возбудителя, идентификацию и определение чувствительности к противогрибковым препаратам. Диагностика микозов довольно сложна и включает как традиционные (фенотипические) методы, так и современные молекулярно-генетические подходы.

При отборе клинического материала от животных с признаками инфекционного заболевания необходимо придерживаться некоторых правил: материал отбирается с патологически измененного участка кожи, слизистых оболочек, а также отбирают смывы с внутренних органов, тканей и биологические жидкости. При этом животные не должны подвергаться местному или системному противогрибковому лечению и медикаментозной обработке.

После отбора проб выполняют микроскопию нативного образца с целью обнаружения тканевых форм грибов и дают приблизительную оценку количества клеток грибов (гифы мицелия, споры) в образце. Цитологическое исследование включает несколько этапов – высушивание мазка, фиксация, окраска различными красителями и непосредственно микроскопия.

Микроскопическое исследование обычно выполняется при увеличении в 400 крат с использованием светового микроскопа, при этом оценивают форму клеток, размер, особенности строения гиф, их окраску, сегментированность, а также особенности строения спор (конидий) - их размеры, форму, цвет, структуру клеточной стенки и сегментацию.

Так, например клетки грибов рода *Malassezia* образуют монополярное почкование, где дочерняя клетка отпочковывается от материнской клетки в определенной точке, или полюсе, придавая клеткам форму, напоминающую отпечаток стопы или земляного ореха. Грибы рода *Candida* могут существовать в виде круглых или овальных клеток - бластоспор, иногда почкующихся, а также в форме псевдомицелия или истинного мицелия, а грибы рода *Trichosporon* образуют цепочки артроконидий, формирующие псевдогифы [72].

В ряде случаев этот метод не используют, переходя сразу к культуральному методу. Культуральный - один из самых важных методов, который превосходит цитологический по чувствительности и эффективности диагностики, но требует определенных условий и навыков [16].

Культуральное исследование направлено на получение чистой культуры гриба, идентификацию и определение чувствительности к антимикотикам. Для этого проводят посеvy на питательные среды, такие как Сабуро, Чапека,

кукурузный, рисовый и картофельно-декстрозный агары, с добавлением антибиотиков и селективных добавок для подавления бактериальной флоры. Для получения чистой культуры дрожжей применяют селективные питательные среды, такие как хромогенные агары. Для идентификации отбирают однотипные колонии грибов, проводят микроскопию и выделяют чистую культуру для дальнейшего анализа.

Классические методы идентификации дрожжевых грибов часто сталкиваются с проблемами из-за морфологической схожести грибов различных видов, что приводит к ошибкам в определении вида. Фенотипическая пластичность дрожжевых грибов также осложняет их идентификацию. Изменения в условиях среды, такие как температура, рН, состав питательной среды, могут изменять фенотипические признаки, что затрудняет их идентификацию на основании традиционных методов.

Для более детальной идентификации определяют биохимические свойства микроорганизмов. Эти исследования включают зимограмму (тест на ферментацию углеводов), тест на утилизацию азота, тест на уреазу, тест на ассимиляцию углеводов, спиртов, на продукцию этанола, тест на каталазу, на  $\beta$ -глюкозидазу и т.д. [73, 159].

Данные методы требуют большого количества вспомогательных материалов - субстратов, индикаторов, тест-систем и, как правило, дополнительного времени. Во многих случаях целесообразно использовать более сложные и дорогостоящие методы, такие как протеомные методы исследования (MALDI-TOF MS) и молекулярно-генетические тесты (ПЦР, секвенирование).

### **2.7.2 Молекулярно-генетические методы. Секвенирование грибов**

Молекулярно-генетические методы играют ключевую роль в идентификации и классификации грибов. Применение этих методов обеспечивает высокую точность и позволяет проводить видовую идентификацию.

Одним из наиболее широко используемых методов для идентификации и классификации грибов является секвенирование рибосомной РНК (рРНК). Этот

метод позволяет анализировать консервативные и переменные участки рРНК. В геномах грибов содержатся рРНК гены, которые обычно используются для секвенирования: 18S рРНК кодирует малую субъединицу рРНК и является очень консервативным, что делает его эффективным для идентификации на высоком таксономическом уровне (род или семейство). ITS регионы (ITS1 и ITS2) – внутренние транскрибируемые участки - находятся между генами рРНК, являются высоко переменными, что делает их идеальными для дифференциации видов. Ген 28S рРНК кодирует большую субъединицу рРНК и содержит как консервативные, так и переменные регионы, что позволяет использовать его для идентификации также на уровне видов. Короткий ген 5.8S рРНК расположен между двумя внутренними транскрибируемыми участками (ITS1 и ITS2) и используется для более точной идентификации [104].

Процесс секвенирования начинается с извлечения геномной ДНК из образцов, что обеспечивает выделение ДНК из всех присутствующих микроорганизмов, включая грибы. Затем ДНК фрагментируется и адаптируется для секвенирования, а баркодирование позволяет проводить одновременное секвенирование множества образцов. Подготовленные библиотеки секвенируются с использованием платформ, таких как Illumina, Ion Torrent или PacBio, которые обеспечивают получение большого количества последовательностей за короткое время. Полученные данные анализируются с использованием биоинформационных программ и баз данных. На этом этапе происходит фильтрация низкокачественных чтений, сборка прочтений и аннотация последовательностей с использованием баз данных, таких как GenBank, SILVA или UNITE. Идентифицированные последовательности используются для оценки генетического разнообразия, анализа сообществ и выявления патогенов [104,184].

### **2.7.3 Метод масс-спектрометрии MALDI-TOF для идентификации грибов**

В современной микробиологии большое значение приобретают протеомные методы, основанные на изучении клеточных белков и позволяющие проводить видовую идентификацию. Современные протеомные подходы включают масс-

спектрометрию, двумерный гель-электрофорез и жидкостную хроматографию в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS).

В начале XXI века метод матрично-активированной лазерной десорбционной/ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии, известный как MALDI-TOF MS приобрел особую значимость. Этот метод позволяет анализировать крупные биомолекулы, включая рибосомальные белки, и проводить идентификацию микроорганизмов по видам. Внедрение MALDI-TOF MS в микробиологию революционизировало процесс идентификации патогенов, делая его ключевым инструментом в клинической, пищевой и промышленной микробиологии. Этот метод обеспечивает быструю и точную идентификацию возбудителей инфекций по характерным пикам массы, что позволяет в короткие сроки поставить точный этиологический диагноз. В микологических исследованиях метод масс-спектрометрии также стал неотъемлемой частью лабораторной практики, так как классические методы идентификации дрожжевых грибов трудоемки и недостаточно точные [70].

Метод MALDI-TOF основан на определении уникального набора белков, характерного для каждого вида микроорганизмов - своего рода "протеомной дактилоскопии". Идентификация происходит по рибосомальным белкам, присутствующим у всех микроорганизмов. Метод позволяет проводить анализ белковой фракции микробной клетки напрямую и получать уникальные масс-спектры с высокой точностью и разрешением, подобно "отпечаткам пальцев"[52].

Для идентификации микроорганизмов требуется база данных, содержащая эталонные спектры, полученные путем усреднения серии индивидуальных спектров. Это обеспечивает большую точность и воспроизводимость анализа. При процедуре идентификации спектр исследуемого образца сравнивается с эталонными спектрами в базе данных, и каждому сравнению присваивается численный рейтинг на основе количества совпадений. Идентификация микроорганизмов происходит по наибольшему совпадению, при этом не происходит идентификация конкретных белков [171].

Протеомные методы могут быть сравнимы с генотипическими по точности и зачастую выигрывают в скорости, стоимости и надежности. Возможность создания специфических масс-спектров для каждого штамма позволяет идентифицировать и дифференцировать штаммы. Масс-спектрометрический анализ обладает преимуществами в экономичности и оперативности [61].

Возрастающая роль MALDI-TOF MS в микологической диагностике упоминается в текущих рекомендациях по диагностике редких грибковых заболеваний [106]. Тем не менее идентификация дрожжевых грибов имеет ряд особенностей, которые связаны с особенностями строения клеточной стенки, которая включает компоненты из хитина и целлюлозы. Такой состав мешает хорошей кристаллизации материала при прямом нанесении на мишень. Чтобы разрушить плотную клеточную стенку необходимо воздействовать на нее комплексом кислот. Данные исследования были проведены на масс-спектрометре MALDI Biotyper v. 3.0, Bruker Daltonics [2,70,161]. Для новых масс-спектрометров, которые производятся в РФ, ещё необходимо провести сравнительные исследования.

Итак, метод MALDI-TOF MS является предпочтительным и информативным способом идентификации грибов, обладая при этом высокой скоростью выполнения. Метод является более дешевым по сравнению с секвенированием. В ситуациях, когда требуется провести множество исследований, использование этого метода становится удобным инструментом в лабораторной диагностике для выявления возбудителей оппортунистических инфекций.

## **2.8 Формирование устойчивости к противогрибковым препаратам**

Как и в случае с антибактериальными препаратами, использование противогрибковых препаратов в медицинской и ветеринарной практике провоцирует усиление устойчивости к противогрибковым препаратам у инфекционно значимых грибов. Помимо усиления устойчивости у уже известных видов грибов, в последние годы появляются высокоустойчивые виды, такие как *Candida auris*, вызывающие госпитальные грибковые инфекции во всем мире [97].

Появление устойчивости к противогрибковым препаратам обычно связано с ситуациями, требующими длительного применения противогрибковых препаратов у лиц с хронической инфекцией, когда препарат оказывает селективное давление на менее восприимчивые варианты. Есть свидетельства того, что использование азолов в сельском хозяйстве приводит к появлению у клинических изолятов пониженной восприимчивости к этим препаратам. Учитывая тенденцию к увеличению числа грибковых заболеваний, есть высокая вероятность того, что проблема устойчивости к противогрибковым препаратам усугубится в ближайшем будущем [65].

В последнее время возрастает частота оппортунистических грибковых инфекций, и проблема резистентности к противогрибковым препаратам становится все более актуальной [64]. К возникновению резистентных штаммов грибов приводит неграмотное использование антимикотиков. Инфекции, вызванные резистентными штаммами, отличаются тяжестью и длительностью течения. При неэффективности препаратов приходится назначать дополнительную антимикотикотерапию. Препараты дополнительного выбора могут быть менее доступны и менее безопасны. Это увеличивает прямые и не прямые экономические затраты и повышает риск распространения резистентных штаммов [9].

Устойчивость к противогрибковым препаратам может быть первичной (природной) или вторичной (приобретенной). Природная резистентность характеризуется отсутствием у данного вида гриба мишени действия антимикотика. В природе она встречается крайне редко, тем не менее важно корректно идентифицировать вид гриба, так как для некоторых видов характерна природная резистентность. Так, например, оппортунистический вид *C. krusei* и виды *Aspergillus spp.* устойчивы к флуконазолу, а патогенный вид *C. neoformans* к эхинокандинам [111].

Приобретенная резистентность развивается у штаммов, которые ранее были восприимчивы к действиям антимикотиков в определенной концентрации. Развитие вторичной устойчивости обусловлено приобретением новой генетической информации или изменением уровня экспрессии собственных генов. Одним из

самых важных факторов формирования устойчивости служит повышение МИК лекарственного препарата. Помимо этого, одной из причин является изменение структуры мишеней действия антимикотика в результате спонтанных мутаций в генах, кодирующих мишени действия препарата, что приводит к снижению (или утрате) способности мишени связываться с антимикотиками. Развитие устойчивости к флуконазолу у видов *C. albicans* и *C. neoformans* иллюстрируют природную резистентность [9,111].

Различные исследования показали низкую чувствительность к амфотерицину В и высокую устойчивость к флуконазолу у *A. pullulans*. В исследованиях Сачивкиной штаммы *Candida spp.* только в 10% были чувствительны ко всем препаратам, а 45% были резистентны к трем и более препаратам [38].

В ветеринарии проблема резистентности к противогрибковым препаратам имеет ключевое значение, поскольку грибковые инфекции у животных, особенно у сельскохозяйственных и домашних животных, становится все труднее лечить. Это приводит к снижению производительности скота, увеличению расходов на лечение и уход. Кроме того, ограниченная доступность противогрибковых препаратов в ветеринарии усугубляет проблему, оставляя меньше вариантов для эффективного лечения.

## 2.9 Механизмы действия противогрибковых препаратов

Одна из самых распространенных групп антимикотиков – азолы, включающие кетоконазол, флуконазол, итраконазол, вориконазол и другие. Они ингибируют биосинтез эргостерола, который входит в состав мембраны грибной клетки. Так, например, устойчивость грибов рода *Candida* связана с активным выведением азолов и мутациями. Мутации в генах Cg CDR1, Cd CDR1, Cd MDR1 у *Candida spp.* активируют системы выведения [154;156]. Против аспергиллезов, фузариозов и кандидозов часто используют итраконазол, однако к нему наблюдается растущая устойчивость. Вориконазол применяют против кандидозов, криптококкозов, трихоспоронозов [75;178;196].

Вторая группа препаратов - полиены, такие как нистатин и амфотерицин В. Они имеют широкий спектр активности против дрожжевых и плесневых грибов, но виды *C. lusitaniae*, *A. terreus*, *A. nidulans* и *Fusarium spp.* устойчивы к ним. Механизм работы полиенов заключается в нарушении мембраны клетки. Устойчивость грибов рода *Candida* к амфотерицину В проявляется редко, но сейчас наблюдается рост устойчивости. Эхинокандины (микафунгин, каспофунгин) ингибируют синтез  $\beta$ -1,3-D глюкана, нарушая клеточную стенку грибов. Они эффективны против *Candida* и *Aspergillus*, но не зигомицетов [111,147].

Третья группа препаратов - аллиламины (тербинафин). Механизм действия заключается в ингибировании биосинтеза эргостерола на ранних стадиях. Их используют для лечения *Microsporum spp.* и *Trichophyton spp.* Устойчивость к этим препаратам также развивается, особенно у новых патогенов.

Устойчивость к противогрибковым препаратам остаётся важной проблемой, требующей учета клинических факторов при назначении терапии. Как подчеркивается в Глобальном отчете Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) о надзоре за устойчивостью к противомикробным препаратам, ресурсы, выделяемые на мониторинг и снижение устойчивости к противогрибковым препаратам, ограничены. У ВОЗ нет программ, специально нацеленных на грибковые заболевания, менее 10 стран имеют национальные программы надзора за грибковыми инфекциями, и менее 20 имеют референтные микологические лаборатории [193]. В ветеринарии исследования в этом направлении носят единичный характер.

Для выбора эффективной антифунгальной терапии врачи должны опираться на количественные данные по МИК конкретного возбудителя к антимикотикам. Получение таких данных, особенно в отношении «новых» и нетипичных грибковых патогенов, является важной задачей ветеринарной микологии.

## 2.10 Заключение по обзору литературы

Данные литературных источников позволяют заключить, что микозы, вызванные дрожжевыми и плесневыми оппортунистическим грибами, имеют

широкое распространение, появляются новые виды, ранее не вызывавшие патологический процесс в организме. Это наносит значительный экономический ущерб. В то же время, данные по распространению микозов домашних, сельскохозяйственных и других видов животных на территории РФ очень ограничены. Нет полноценного понимания этиологической структуры и видового разнообразия возбудителей.

В современных условиях спектр известных грибов-возбудителей постоянно расширяется, при этом изменяются наши представления о безвредных и патогенных микроорганизмах.

Методы классической микологии при постановке диагноза имеют приоритетное значение, так как в этом случае удастся получить наиболее полную информацию о биологических свойствах возбудителя, включая его чувствительность к противогрибковым препаратам. Тем не менее необходимо развивать и другие методы диагностики, такие как MALDI-TOF MS и внедрять их в рутинную диагностику. Для этого важно иметь полноценную базу данных для корректной идентификации вида.

На основании анализа данных литературы можно заключить, что к началу работы были нерешенными следующие вопросы: информации о распространенности и видовом разнообразии возбудителей микозов животных крайне мало; биологические свойства редких дрожжевых грибов изучены слабо, некоторые виды не изучены совсем; нормативные документы по ветеринарной лабораторной диагностике дрожжевых грибов не разработаны; чувствительность к противогрибковым препаратам и МИК для многих дрожжевых грибов изучены недостаточно.

Таким образом, в последние годы наблюдается тревожная тенденция к распространению оппортунистических микозов животных, в том числе и в нашей стране. Эти инфекции влияют на биоразнообразие планеты, сокращая популяции диких животных; наносят экономический ущерб и представляют угрозу для продовольственной и пищевой безопасности, поражая промысловых и продуктивных животных. Некоторые из оппортунистических микозов животных

представляют опасность для заражения человека, что требует внимательного отношения к данной проблеме.

Необходимы исследования по изучению патогенеза грибковых инфекций и устойчивости к лекарственным препаратам, по усовершенствованию диагностических методов, а также по улучшению мониторинга инфекций, поскольку в конечном итоге это даст информацию о новых стратегиях борьбы с грибковыми инфекциями.

### **3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

#### **3.1 Материалы**

Научная работа выполнена в период с 2022 по 2024 гг. в лаборатории микологии и антибиотиков им. А.Х. Саркисова Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН).

Микологическое исследование клинического материала, поступавшего из ветеринарных клиник и лабораторий, и культурально-микробиологическое изучение выделенных культур проводили в условиях лаборатории ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН. Работы по оптимизации пробоподготовки, получению масс-спектров, пополнению базы данных масс-спектрометра и по идентификации грибов методом MALDI-TOF MS проводили на базе ООО «Альгимед Техно».

В работе были использованы коллекционные штаммы и изоляты дрожжевых грибов, дифференциально-диагностические питательные среды, химические реактивы, лабораторная посуда и оборудование, а также бактериологические, микологические, статистические методы исследований, методы молекулярной диагностики и масс-спектрометрии MALDI-TOF.

#### **3.1.1 Штаммы и изоляты микроорганизмов**

В экспериментальной работе использовали 215 изолятов дрожжевых грибов, выделенных от животных с подозрением на инфекционно-воспалительные заболевания на территории Российской Федерации (Центральный, Приволжский, Южный округа).

Во время выполнения работы культуры микроорганизмов хранились и поддерживались нами в лиофилизированном виде в запаянных ампулах, в криогенных пробирках при температуре  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  в смеси глицерина и соевого бульона, а также в нативной форме на питательных средах при температурном режиме  $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Штаммы, которые представляли научный интерес для дальнейших

исследований, были депонированы в коллекцию микроорганизмов ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

Учитывая принадлежность выделенных изолятов дрожжевых грибов к биологическим агентам III-IV группы патогенности, работу с ним проводили в соответствии СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» [39].

### **3.1.2 Питательные среды и компоненты питательных сред**

Для культивирования грибов использовали следующие питательные среды и добавки: агар Сабуро с глюкозой и хлорамфениколом (HiMedia, Индия), агар Сабуро (Оболensk, Россия), бульон Сабуро (Биотехновация, Россия), хромогенный агар для грибов рода *Candida* (HiMedia, Индия), агар Чапека (HiMedia, Индия), агар с бенгальским розовым - Rose Bengal Agar (HiMedia, Индия и HoreBio, Китай), агар картофельный с декстрозой (BioMedia, Россия), мальт-агар (HoreBio, Китай), YGC – агар (HoreBio, Китай), среда для дерматофитов «ДТМ-Эксперт» (ФНЦ ВИЭВ РАН, Россия), сердечно-мозговой агар (HiMedia, Индия), сердечно-мозговой бульон ВНИВ (Sifin, Германия).

Для хранения штаммов при низкотемпературном режиме использовали соевый бульон (HoreBio, Китай) и глицерин (Агат-Мед, Россия).

### **3.1.3 Диагностические наборы**

Для выделения ДНК из грибов использовали набор «DNeasy Plant Mini Kit» (Qiagen, Германия), секвенировали ДНК с помощью набора «Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit», (Applied Biosystems, США).

Для биохимической идентификации изолятов использовали систему идентификации дрожжей «HiCandida Identification Kit» (HiMedia, Индия).

### 3.1.4. Реактивы и химические компоненты

В экспериментальной работе использовали следующие реактивы и химические компоненты: стерильный физиологический раствор, pH 7,2-7,4; спирт этиловый, ректификат 96% и его раствор 70%, Россия; вода дистиллированная.

Для определения фосфолипазной активности использовали следующие реактивы и компоненты: NaCl, CaCl<sub>2</sub>, желточная эмульсия (HiMedia, Индия).

При изучении микроморфологии клеток использовали компоненты: метиленовый синий, 0,3% раствора кристалл-виолета, 10% раствор КОН, калькофлюор белый (Thermo Fisher Scientific, США).

Для определения чувствительности к антимикотикам и МИК использовали:

- наборы дисков для определения чувствительности грибов к антифунгальным препаратам: кетоконазол, итраконазол, клотримазол, вориконазол, флуконазол, нистатин, амотерицин В (HiMedia, Индия)

- полоски с градиентом концентрации для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) противогрибковых препаратов HiComb™ MIC Test: флуконазол, итраконазол, кетоконазол, амфотерицин В (HiMedia, Индия).

Для проведения масс-спектрометрии MALDI-TOF использовали реактивы: ацетонитрил 99% (Concord Technology, Китай), кристаллическая СНСА (α-циано-4-гидроксикоричная кислота); трифторуксусная кислота 98%, (Pallav Chemicals, Индия), муравьиная кислота 98-100% чистая (NeoFroxx, Германия).

### 3.1.5. Лабораторная посуда и оборудование

При выполнении работы использовали следующие приборы, оборудование, посуду и инструменты: световой микроскоп с флуоресцентным блоком (ZEISS Axio Scope.A1, Германия), термостат суховоздушный ТС- 1/80 (СПУ, Россия), холодильник фармацевтический ХФ-400-3 (POZIS, Россия), холодильник бытовой 4°C, -20°C (Elecrolux, Россия), аналитические весы «ОНАУС» (Pioneer, США), центрифуга Micro 185 (Hettich, Германия), аппарат для лиофилизации Christ epsilon 1-4 (Martin Christ, Германия), дозаторы автоматические переменного объема: 0,5-10 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл, (DragonLab, Китай), водяная баня WB-4MS (BioSan,

Латвия), вортекс V-1 plus (BioSan, Латвия), денситометр для определения мутности бактериальной суспензии, 565 нм, 0-15 ед. МкФ, 0,01 ед. МкФ, Den-1B (Biosan, Латвия), термостат твердотельный HT-120 (TAGLER, Россия), масс-спектрометр АЛМАСС-Био 200 (Algimed Techno, Россия), амплификатор CFX96 Touch (Bio-Rad), автоматический секвенатор Illumina MiSeq, фотометр Statfax 4300 (Awareness Technology, США), бокс микробиологической безопасности Neoteric (Lamsystems, Россия).

Лабораторная посуда: сбор клинического материала осуществляли в стерильные пластиковые контейнеры для биологического материала, в пробирки типа «Eppendorf» и с помощью свабов с транспортной средой Эймса. В ходе исследования использовались чашки Петри, пробирки стеклянные лабораторные, пипетки стерильные одноразовые пластиковые, шприцы разных объемов стерильные, бактериологические петли, микологический крючок, горелка спиртовая, стекла предметные, стекла покровные, ножницы, скальпель, пинцеты, 96-луночные планшеты и т.д.

## **3.2 Методы**

### **3.2.1 Изучение видового состава инфекционно-значимых грибов**

Видовой состав инфекционно-значимых грибов изучали путем собственных микологических исследований 3202 образцов биоматериала, который отбирали от животных с клиническими признаками инфекционных заболеваний. Материал поступал на исследование из ветеринарных клиник, лабораторий, фермерских хозяйств, зоопарков Центрального, Приволжского и Южного округов Российской Федерации. Материал исследовали с помощью традиционных микологических методов, молекулярно-генетических и методом масс-спектрометрии.

Изучение морфологических, биохимических, молекулярных свойств, а также определение чувствительности к противогрибковым препаратам и минимальной ингибирующей концентрации проводили методами, описанным ниже.

### **3.2.2 Прямая микроскопия биоматериала, микроскопия с использованием флюорохрома калькофлюора белого**

При проведении прямой микроскопии материал помещали на предметное стекло в каплю 10% КОН, нагревали и затем и сверху помещали покровное стекло. Вначале препарат рассматривали под малым увеличением – х100, затем переходили на большее увеличение – х200-400, для детального изучения. Результат считался положительным, если обнаруживали грибные элементы - споры или мицелий.

В качестве модификации использовали метод с флюорохромным красителем. На предметное стекло помещали каплю 10% раствора гидроксида калия, добавляли каплю раствора калькофлюора, после чего накрывали покровным стеклом и проводили микроскопию на люминесцентном микроскопе с флюоресцирующим фильтром с диапазоном 400-500 нм. Препарат также рассматривали под малым, а затем под большим увеличением. Образец считался положительным в случае обнаружения светящихся изумрудным цветом элементов грибов или спор. Данный метод помогает четче увидеть клетки грибов и отличить их от артефактов [23].

### **3.2.3 Выделение чистой культуры и определение культурально-морфологических свойств**

Посев материала проводили на среду Сабуро с хлорамфениколом, «ДТМ-Эксперт» и при выделении чистой культуры использовали хромогенный агар Candida Chrom Agar. Инкубировали посеvy в аэробных условиях при температуре  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , срок наблюдения - до 21 суток. Культивирование продолжали до формирования колоний с выраженными культуральными и морфологическими признаками [20].

Представляющие интерес колонии грибов выделяли в чистую культуру для детального изучения культурально-морфологических свойств и идентификации. Для изучения микроморфологии готовили препараты методом раздавленной капли и просматривали в световом микроскопе (Zeiss, Германия) при 200-кратном и 400-кратном увеличении.

Культурально-морфологические свойства изучали на плотных питательных средах, преимущественно на среде Сабуро с хлорамфениколом. Определяли форму, цвет, блеск, размер, поверхность, ровность краев, прозрачность и консистенцию колоний [23].

Идентификацию полученных культур проводили на основании макро- и микроморфологических свойств изолятов в сравнении с референтными данными микологического атласа «Atlas of Clinical Fungi» [72].

### **3.2.4 Определение биохимических свойств**

Биохимические свойства полученных изолятов определяли у культур, выращенных на плотной питательной среде через 24-72 часа инкубации при  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  с помощью коммерческой тест-системы для идентификации дрожжей HiCandida Identification Kit. Для этого готовили взвесь грибных клеток мутностью 0,5 OD при 620 нм. Далее в лунки панели, содержащие различные субстраты, вносили 50 мкл материала и инкубировали при  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ . В основе метода лежит изменение pH среды при утилизации субстратов специфическими ферментами дрожжевых грибов в процессе культивирования. Результаты реакции оценивали визуально, затем их вносили в программу для идентификации, поставляемой с набором. Основное отличие данной системы заключается в наличии субстрата для фермента уреазы в первой лунке, что позволяет определить уреазную активность.

### **3.2.5 Определение фосфолипазной активности**

Фосфолипазную активность грибов измеряли, используя «чашечный метод», разработанный Прайс с соавторами (Price et al., 1982), позволяющий быстро определить общую активность фосфолипаз. При этом использовали среду следующего состава: агар Сабуро, 1M NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 8 % стерильного яичного желтка.

Метод основан на гидролизе липидов, содержащихся в яичном желтке, с последующим образованием кальциевого комплекса и образующимися при этом жирными кислотами, освобождаемыми под действием секретируемого фермента.

После 5 суток инкубирования в термостате при температуре  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  измеряли диаметр колоний и общий диаметр колоний с зоной преципитации. Фосфолипазную активность определяли как отношение диаметра колонии с зоной преципитации к диаметру колонии и выражали в процентах от контроля. Обработку экспериментальных данных проводили с использованием пакета программ Statistica 5.5.

Активность фосфолипазы, т.е. значение Pz, было рассчитано с помощью следующего уравнения:

$$Pz = \frac{\text{диаметр колонии}}{\text{диаметр колонии} + \text{зона преципитации}} \quad (1)$$

На основании значения Pz оценивали активность фосфолипазы, которую классифицировали по 5 типам: значение  $Pz = 1$  означает, что активность фосфолипазы отрицательная, значение  $Pz < 0,90-0,99$  = слабая активность фосфолипазы (+),  $0,80-0,89$  = средняя активность (++),  $0,70-0,79$  = умеренная активность (+++) и  $< 0,70$  = интенсивная фосфолипаза активность (++++) [91].

### 3.2.6. Определение образования биопленок дрожжевых грибов

Дрожжевые грибы выращивали в сердечно-мозговом бульоне ВНІВ при температуре  $37^\circ\text{C}$  в течение суток. Затем 100 мкл переносили в 10 мл свежего стерильного ВНІВ. После 6-8 часов инкубации при  $37^\circ\text{C}$  10 мкл суспензии переносили в лунку с 190 мкл ВНІВ. После внесения культур в лунки планшеты инкубировали в течение  $24-48 \pm 2$  часов при  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ . Использовали стандартные 96-луночные планшеты (Sarsted, Германия).

По окончании культивирования лунки промывали трижды дистиллированной водой и высушивали. Затем в каждую лунку добавляли по 200 мкл 0,3% раствора кристалл-виолета на 10 минут, затем сливали и промывали лунки дистиллированной водой. Высушивали в течение 3 часов, затем добавляли по 200 мкл 70% этанола для извлечения красителя. Интенсивность окрашивания определяли по оптической плотности (ОП) на фотометре Statfax 4300 (Awareness

Technology, США) при длине волны 630 нм. Все опыты проводили в трех повторностях, определяли среднее арифметическое результата [146].

### **3.2.7 Определение чувствительности к противогрибковым препаратам**

Чувствительность изолятов грибов к антифунгальным средствам определяли с помощью диско-диффузионного метода по рекомендациям Института клинических и лабораторных стандартов США (CLSI) и рекомендациям производителя дисков (НИЦФ). Данным методом определяли чувствительность для флуконазола, вориконазола, итраконазола, кетоконазола, клотримазола, нистатина и амфотерицина В.

Определение чувствительности проводили на агаре Сабуро. Суспензии грибов готовили из агаровых культур после 48 часов инкубации, для долго растущих штаммов срок инкубации составлял более 72 часов. Оптическая плотность каждого инокулюма перед использованием составляла 0,5 ед. по шкале МакФарланда, которую определяли с помощью денситометра. Далее на поверхность чашек Петри, заполненных агаризованной средой Сабуро, равномерно распределяли суспензию клеток. Через 15 минут выкладывали диски, пропитанные стандартными концентрациями антибиотиков. Инкубацию посевов проводили 24-48 ± 2 часов, для долго растущих штаммов 72 часа и более при 27 ± 2°С. Диаметр зоны ингибирования роста культур измеряли с помощью штангенциркуля и выражали в миллиметрах. Клинические категории чувствительности грибов (чувствительный, промежуточный или резистентный) интерпретировали исходя из зоны задержки роста штамма в соответствии с референтными значениями, установленными CLSI [67], за исключением результатов для клотримазола и нистатина, для которых использовали рекомендации изготовителя дисков (НИЦФ, Россия).

### 3.2.8 Определение минимальной ингибирующей концентрации

Определение МИК осуществляли с помощью метода E-тест, используя полоски с градиентом концентрации противогрибковых препаратов HiComb™ MIC Test согласно инструкции производителя.

В одной упаковке содержалось два типа полосок, импрегнированных противогрибковыми средствами различной концентрации: полоски А с высокими концентрациями и полоски В с низкими концентрациями.

Проводили определение МИК для следующих противогрибковых средств с диапазонами концентраций (мкг):

1. Амфотерицин В (А: 32-0,25; В: 0,0256-0,002)
2. Флуконазол (А: 256-2; В: 2.048-0.016)
3. Итраконазол (А: 2-0.25; В: 0.256-0.002)
4. Кетоконазол (А: 32-0.25; В: 0.256-0.002)

При определении МИК полоски с антимикотиком помещали на поверхность агара Сабуро, засеянного испытуемой культурой в виде «газона». Далее проводили оценку эллипсовидной зоны задержки роста согласно инструкции производителя [67].

### 3.2.9 Выделение ДНК из клеток грибов

Для выделения ДНК использовали набор DNeasy Plant Mini Kit согласно инструкции производителя. На первом этапе измельчали взвесь грибов в ступке, предварительно обработав культуру жидким азотом. Далее навеску грибов смешивали с лизирующим буфером в присутствии РНКазы, белки и полисахариды осаждали, супернатант смешивали с раствором связывания ДНК. Полученную смесь помещали в очистительную колонку, где выделенная ДНК связывалась с кремнеземной мембранной. Примеси удаляли путем промывки колонки подготовленными промывочными буферами. Затем ДНК вымывали промывочным буфером в условиях низкой ионной силы.

### 3.2.10 Синтез библиотек для секвенирования

Аmplификацию ПЦР продукта, полученного на первом этапе, с целью баркодирования (индексирования) библиотек проводили в объеме 25 мкл в смеси, содержащей 5x KTN-mix (Evrogen) 5мкл, смесь праймеров 2мкл, 50x SYBR(Evrogen) 0,5 мкл, в амплификаторе в реальном времени CFX96 Touch (Bio-Rad) при следующих условиях: первичная денатурация 3 мин при 95°C; 7 циклов: денатурация 30с при 95°C, отжиг 30 с при 55°C, элонгация 30 с при 72°C; заключительная элонгация 5 мин при 72°C. Для амплификации использовали индексы, рекомендованные производителем: Nextera Index Kit (Illumina).

### 3.2.11 Секвенирование на платформе Illumina

Ампликоны после второго этапа очищали с использованием магнитных частиц AMPure XP (KAPA Biosystems) в следующих соотношениях: 1:0,6, где вторая цифра – доля AMPure для очистки продуктов ПЦР с использованием праймеров для амплификации гипервариабельного V3-V4 участка гена 16S рибосомальной РНК и 1:0,7 для очистки продуктов ПЦР с использованием праймеров для амплификации гипервариабельного ITS2 участка гена 18S рРНК. Данные очищенные ампликоны являлись готовыми библиотеками для мультиплексного секвенирования на платформе Illumina. Библиотеки смешивали между собой и доводили до общей концентрации 2nM. К отобранному 5 мкл смеси добавляли 5 мкл 0,2М NaOH и инкубировали в течении 5 мин. К денатурированной ДНК добавляли 990 мкл НТИ и 1мкл 12,5мМ заранее денатурированного PhyX. Анализ библиотек проводили на секвенаторе нового поколения Illumina MiSeq методом парно-концевого чтения генерацией не менее 10 000 парных прочтений на каждый образец с использованием следующих реактивов: MiSeq Reagent Kit v2 nano и MiSeq v2 Reagent Kit (500 Cycles PE).

Полученные данные секвенирования обрабатывали в программе, написанной с использованием алгоритма QIIME 1.9.1, включающего объединение прямых и обратных прочтений, удаление технических последовательностей, фильтрацию последовательностей с низкими показателями достоверности прочтения отдельных

нуклеотидов (качество менее Q30), фильтрации химерных последовательностей, выравнивание прочтений на референсную последовательность рРНК, распределение последовательностей по таксономическим единицам с использованием базы данных Silva версии 132 и Unite v8. Использован алгоритм классификации операционных таксономических единиц (ОТЕ) с открытым референсом (Open-reference OTU), порог классификации 97%.

### **3.2.12 Методы пробоподготовки при проведении масс-спектрометрии MALDI-TOF**

#### **Прямой метод нанесения образца на мишень**

Метод прямого нанесения использовали для подготовки образцов с целью их последующей идентификации масс-спектрометрическим методом. Для наиболее точного результата использовали свежие, чистые культуры дрожжевых грибов.

Исследование проводили, используя 96-луночную мишень для масс-спектрометра. На лунку мишени наносили небольшое количество образца, распределяя от центра к краям. После полного высыхания при комнатной температуре поверх наносили по 1 мкл рабочего раствора реагента «АЛМАСС Био Матрица» и далее проводили идентификацию.

#### **Расширенный метод прямого нанесения с муравьиной кислотой**

При проведении пробоподготовки с помощью расширенного метода прямого нанесения также использовали свежие, чистые культуры. Модификацией данного метода является то, что после полного высыхания образца на планшете сверху наносили 1 мкл 70% водного раствора муравьиной кислоты, и только после этого наносили раствор матрицы. Важно после полного высыхания лунок убедиться в правильном, равномерном распределении образца на мишени.

#### **Метод с экстракцией белков с использованием муравьиной кислоты**

В чистую центрифужную пробирку вносили 300 мкл деионизированной воды, затем в неё помещали колонию гриба. После перемешивания вносили 900 мкл этанола и содержимое перемешивали на вортексе. Затем центрифугировали 2

минуты (примерно 13000 об/мин, но не менее 10 000 г). Отбирали супернатант и оставляли осадок до полного высыхания при комнатной температуре. К осадку добавляли 70% раствор муравьиной кислоты пропорционально количеству внесенной чистой культуры (варьировался от 1 о 80 мкл – таблица 1) и пипетировали полученную смесь. Далее вносили эквивалентный объем ацетонитрила и перемешивали на вортексе.

Затем центрифугировали 2 минуты (~ 13000 об/мин, но не менее 10000g). Отбирали 1 мкл супернатанта и наносили на лунку мишени (не менее 2 лунок на один образец). После полного высыхания наносили раствор матрицы.

Таблица 1 - Пропорции реагентов к отобранной чистой культуре образца (из инструкции производителя)

Реагент	Маленькая одиочная колония	Большая одиочная колония	Микробиологическая петля, 1 мкл	Микробиологическая петля, 10 мкл
Муравьиная кислота, 70%, мкл	1-5	10-20	20-40	40-80
Ацетонитрил, мкл	1-5	10-20	20-40	40-80

Калибровку прибора MALDI «АЛМАСС-Био 200» проводили перед каждым исследованием, согласно инструкции, используя в качестве калибранта рабочий раствор реагента «АЛМАСС Био Стандарт».

### 3.2.13 Проведение масс-спектрометрического анализа

Масс-спектрометрический анализ дрожжевых грибов проводили на масс-спектрометре «АЛМАСС-Био 200». Для визуального контроля масс-спектров использовали программное обеспечение MT Master 2.0 для идентификации совместно с библиотеками Microbe Analysis (версия 1.0.0.0). Программное обеспечение выполняет сглаживание, нормализацию, вычитание базовой линии и выделение пиков, тем самым создавая список наиболее значимых пиков (значение  $m/z$ ) спектра.

Результаты процесса сопоставления с образцом были выражены в виде логарифмических значений (score), которые варьировались от 0 до 3. Логарифмические значения (score)  $\geq 1,7$  обычно указывают на идентификацию на уровне рода, а логарифмические значения (score)  $\geq 2,0$  обычно указывают на идентификацию на уровне вида. В таблице 2 представлена система интерпретации результатов MALDI-TOF.

Таблица 2 - Система интерпретации результатов масс-спектрометрии MALDI-TOF

Трёхбалльная оценка	Стобалльная оценка	Визуальное отображение	Интерпретация результатов идентификации
1,7	<60		Недостовверный результат оценки
1,7–2,0	60–90		Достоверность на уровне рода
$\geq 2,0$	$\geq 90$		Достоверность на уровне вида

Для некоторых образцов масс-спектрометрический анализ проводили на приборе UltrafleXtreme (“Bruker daltonics”), оснащённом Nd:Yag-лазером (355 нм) в линейном режиме. Детектировали положительно заряженные ионы в диапазоне от 2 000 до 20 000 Th при следующих настройках ионного источника: напряжение на IS1 20 кВ, на IS2 19 кВ, на линзах (параметр “Lens”) 4.5 кВ, напряжение питания детектора 2 885 В, коэффициент усиления 12.6.

Спектры снимали в автоматическом режиме с использованием программы Flex Control (v.3.4, build 135). Точки обстрела лазером на мишени выбирали случайным образом. Суммировали 1 200 спектров с 200 точек обстрела при частоте лазера 2 кГц.

Библиотеки спектров каждого образца получали при анализе триплекатов восьми технических повторов. Калибровочным стандартом и положительным контролем служил белковый экстракт *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  с дополнительными белками (РНКаза А [M+N]<sup>+</sup>13 683.2 Да, миоглобин [M+N]<sup>+</sup> 16 952.3 Да)

Полученные спектры обрабатывали с помощью программного комплекса MALDI biotyper Compass Explorer 4.1 (“Bruker Daltonics”) с использованием стандартного метода препроцессинга данных (Biotyper Preprocessing Standard Method). Обработанные спектры образцов сравнивали с референсной базой характеристических спектральных профилей, включающей 6905 записей. Результаты поиска характеристического профиля выражали как логарифм значений. Значения ниже 1.699 соответствовали ненадежному определению рода; 1.700–1.999 – надежному определению рода и, возможно, вида; 2.000–2.299 – надежному определению рода и с высокой вероятностью вида и, наконец, значения 2.300–3.000 соответствовали надёжной идентификации до вида.

### **3.2.14 Внесение новых масс-спектров в базу данных масс-спектрометра**

Для внесения в базу данных прибора MALDI-TOF образцы, подлежащие идентификации, культивировали на среде Сабуро методом истощающего штриха. Отдельные изолированные колонии отбирали для перекрестного анализа при создании библиотеки данных и для подтверждения и идентификации вида/штамма. Сертификация (подтверждение и идентификация) напрямую влияла на качество и точность дальнейшей идентификации, поэтому проводили подтверждение с помощью секвенирования (по ITS).

Для внесения результатов в базу данных получали по 30 масс-спектров грибов (из них три биологических повторности и по десять технических повторностей для каждой биологической). Это необходимо для создания усредненного масс-спектра. Далее в программе Microbe Analysis загружали полученные масс-спектры, выбирали минимальное количество пиков для библиотечного масс-спектра (120), минимальное разращение (в %) и максимально допустимое смещение по массе (1000 ppm).

После этого присваивали штамму родовое и видовое название (согласно результату секвенирования), которое в последствии будет отображаться в библиотеке. После этого добавляли усредненный масс- спектр в базу данных.

### 3.2.15 Определение концентрации клеток грибов

Концентрацию клеток грибов в суспензии определяли визуально по шкале МакФарланда и по стандарту (эталоны) мутности, в соответствии с инструкциями по применению, также путем высева последовательных десятикратных разведений исследуемой суспензии на плотные питательные среды.

Количество живых клеток грибов в 1,0 см<sup>3</sup> исходной грибной суспензии вычисляли по формуле:

$$M = a \times 10n/V \quad (2)$$

где:

M - количество клеток в 1 см<sup>3</sup>;

a - среднее число колоний при высеве разведения;

V - объём суспензии, взятой для посева, в см<sup>3</sup>;

10n - коэффициент разведения.

Помимо этого, для определения концентрации грибных клеток в суспензии использовали денситометр.

### 3.2.16 Статистическая обработка результатов

При анализе и обработке результатов исследований использовали методы классической статистики в компьютерной программе «Statistica for Windows» (StatSoft Russia, 2015 г.).

## **4. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

### **4.1 Изучение видового состава, распространенности и локализации инфекционно-значимых грибов у животных**

Для анализа этиологической структуры и получения объективных данных по распространенности оппортунистических грибов у животных в период с 2022 по 2024 г. было исследовано 3202 образца биоматериала от разных видов животных, с признаками инфекционно-воспалительных заболеваний, в т.ч. 1848 собак, 992 кошки, 196 птиц, 64 грызуна, 26 холонокровных и 76 других видов животных (коровы, лошади, козы, пчелы и т.д.). Материал отбирали в ветеринарных клиниках, лабораториях, питомниках, частных хозяйствах и зоопарках Центрального, Северо-западного, Приволжского и Южного федеральных округов.

Клинический материал от животных включал мазки с кожи, НСП, со слизистых оболочек, а также мочу, фекалии, выпоты и др. Далее проводили полный микологический анализ образцов, который включал прямую микроскопию полученного материала, в том числе люминесцентную микроскопию, посев на плотные питательные среды, выделение чистой культуры, идентификацию и определение чувствительности к противогрибковым препаратам.

Всего проведено микологическое исследование 3202 образцов клинического материала от животных, в т.ч. исследовано 3202 нативных и окрашенных препаратов, сделано 3202 культуральных посевов, выделено 1515 чистых культур грибов, идентифицировано методом MALDI-TOF 327 культуры, методом секвенирования 18 культур, лиофилизировано 3 культуры, криогенно законсервировано 140 культур грибов.

В 1515 случаях (47,3%) выявлены различные виды грибов, включая и истинные патогены – дерматофиты, общий процент которых составил 2,9% (n=92) от общего числа исследований. При этом условно-патогенные (оппортунистические) грибы выделены в 44,4% (n=1424), из них дрожжевые грибы в 28,2% случаях (n=904), а плесневые в 16,2% (n=519). Подробная информация представлена на рисунке 1.

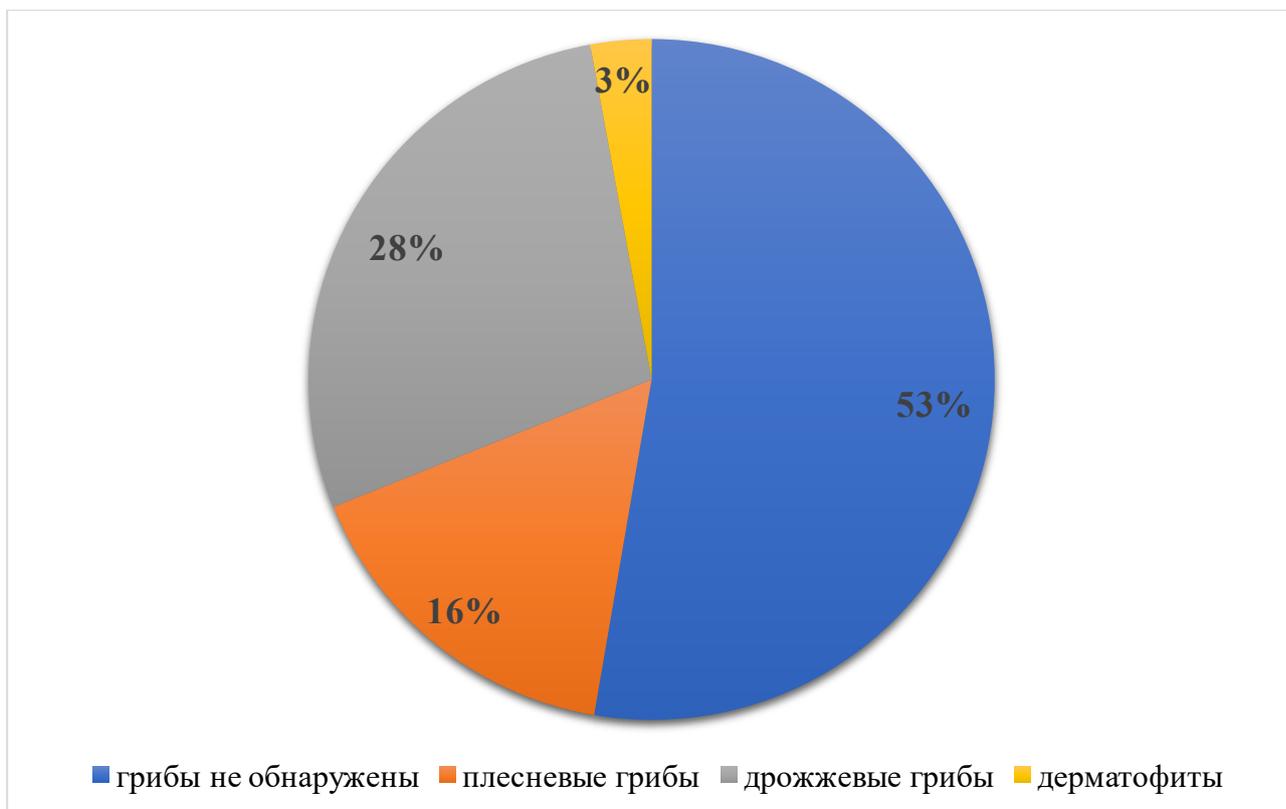


Рисунок 1 - Частота выделения инфекционно-значимых грибов от животных

Далее был проведен анализ встречаемости инфекционно-значимых грибов в каждой категории животных отдельно (рис.2).



Рисунок 2 - Выделенные грибы у разных видов животных

Исходя из данных на рисунке 2 можно сделать вывод, что у собак в 50,5% (n=933) грибы не обнаружены, в 49,5% (n=915) выделены различные виды грибов, при этом доминируют дрожжевые грибы - 33,1% (n=611). У кошек грибы выделены в 38,3% случаев (n=380), доминируют плесневые грибы - 17,8% (n=177). У грызунов и кроликов грибы выявлены в 40,6% (n=26) случаях, при этом у них доминируют плесневые грибы – 23,4% (n=15) и есть случаи выделения грибов-дерматофитов 3,1% (n=2). У холоднокровных грибы выделены в 42,3% (n=11) среди них доминируют дрожжевые грибы – 34,6% (n=9), плесневые грибы выделены только в 7,7% (n=2) случаях и не встречались грибы-дерматофиты. У птиц значительно доминируют в видовом составе дрожжевые грибы – 42,3% (n=83), также как и у группы «другие виды животных» - 68,4% (n=52).

Таким образом, наблюдается широкая распространенность как плесневых, так и дрожжевых грибов-оппортунистов у животных различных видов.

#### **4.1.1 Исследование видового состава мицелиальных (плесневых) оппортунистических грибов у животных**

Видовую идентификацию проводили на основании макро- и микроморфологических признаков в соответствии с микологическими определителями. Всего было выделено 519 изолятов плесневых грибов (34,3% от всех выделенных грибов), при этом у собак идентифицировано 295 изолятов (16% - от общего числа исследований в этой группе животных), у кошек 177 (17,8%), у птиц 10 (5,1%), у грызунов и кроликов 15 случаев (23,4%), у холоднокровных 2 (7,7%) и у других видов животных 20 случаев (26%).

Всего идентифицировано 14 разных родов плесневых грибов-оппортунистов: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Mucor*, *Scopulariopsis*, *Geomyces*, *Geotrichum*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Chaetomium*, *Sporothrix*, *Chrysosporium*.

На рисунке 3 представлены данные о встречаемости различных видов плесневых грибов у животных.

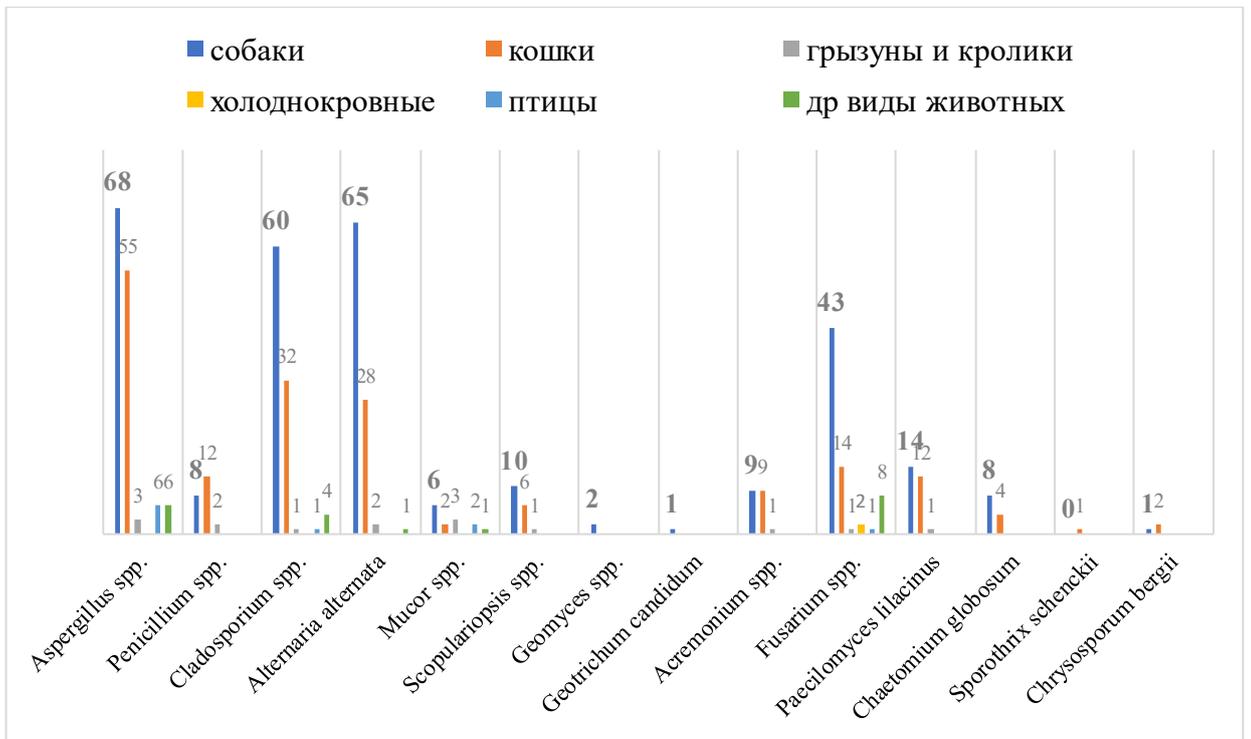


Рисунок 3 – Виды плесневых грибов, выделенных от разных видов животных, n

На рисунке 4 представлены данные по встречаемости плесневых грибов у собак. Изоляты, выделенные от собак, были представлены 13 различными родами. Чаще всего обнаруживали грибы рода *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium* (более 23% каждого). Среди грибов рода *Aspergillus* (68 изолятов) идентифицировали виды *A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus*; род *Cladosporium* (60 изолятов) представлен *C. herbarum*, а среди грибов рода *Alternaria* (65 изолятов) выделен лишь один вид – *A. alternata*. Имелись единичные случаи идентификации видов *Chrysosporium bergii*, *Geotrichum candidum*., *Geomyces spp.*

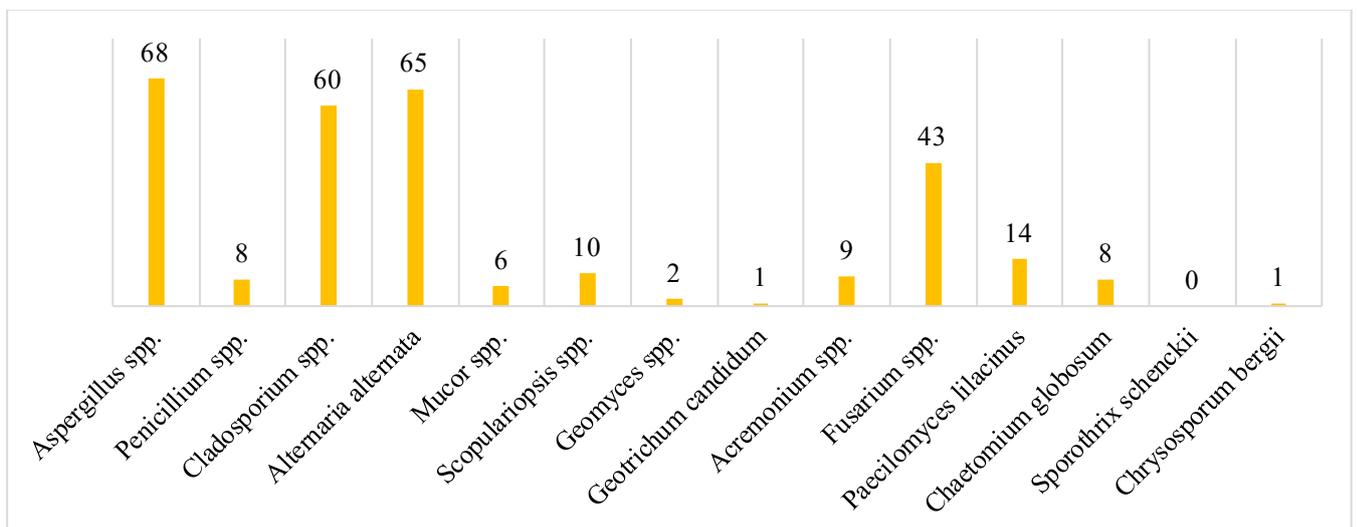


Рисунок 4 – Виды плесневых грибов, выделенных от собак, n

Чаще всего плесневые грибы у собак были выделены с кожных покровов и шерсти, но в 20 случаях (6,7%) это были иные локусы: НСП, носовая полость, раневое отделение, глаз, ректальный смыв. Из этих локусов были выделены грибы рода *Aspergillus*.

У кошек идентифицировано 12 различных родов, среди которых преобладал *Aspergillus spp.* (47%, 55 изолятов), а также часто выделяли *Cladosporium spp.* (27,3%, 32 изолята) и *Alternaria alternata* (23,9%, 28 изолятов). На рисунке 5 представлена диаграмма количественного соотношения плесневых грибов, выделенных от кошек.

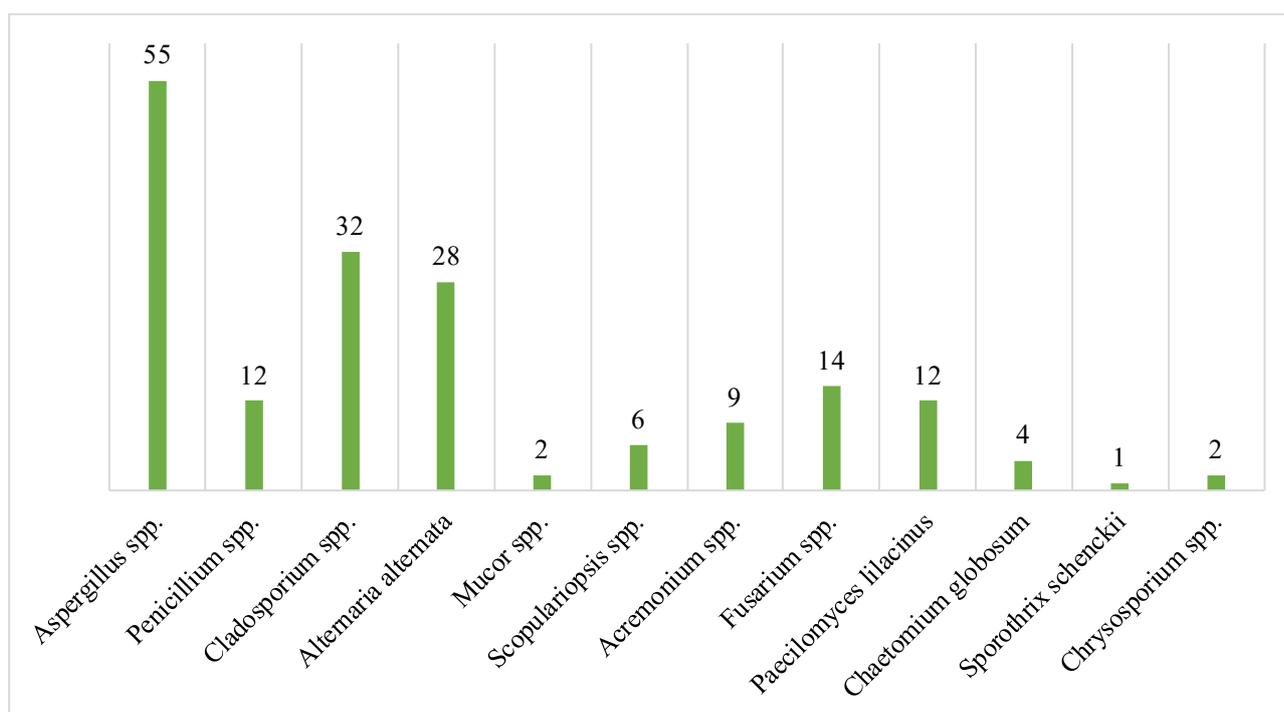


Рисунок 5 – Виды плесневых грибов, выделенных от кошек, n

Исходя из данных, изображенных на рисунке 5, можно отметить единичный случай идентификации *Sporothrix schenckii* – диморфного гриба, вызывающего споротрихоз, который может передаваться от животного человеку. Идентифицировали гриб с помощью оценки характера роста на агаре Сабуро, а также по микроморфологическим признакам.

Большинство изолятов плесневых грибов было выделено с шерсти и кожных покровов, в 9 случаях (5,1%) из иных локусов: раневое отделяемое, БАЛ, носовые

ходы, выделения из глаз. Во всех этих локусах были найдены грибы рода *Aspergillus*.

Среди грызунов и кроликов разнообразие грибов меньше, чем у собак и кошек. Выделено 9 различных видов: *Aspergillus spp.*, *Mucor spp.* - каждый по 3 изолята (20%), *Penicillium spp.*, *A. alternata* – каждый по 2 изолята (13,3%) и *Cladosporium herbarum*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Acremonium chrysogenum*, *Fusarium oxysporum*, *Paecilomyces lilacinus*, каждый по 1 изоляту (6,6%). Плесневые грибы-оппортунисты были выделены от мышей, крыс, морских свинок, хомяков и кроликов.

На рисунке 6 представлены различные виды плесневых грибов, выделенные от грызунов и кроликов.

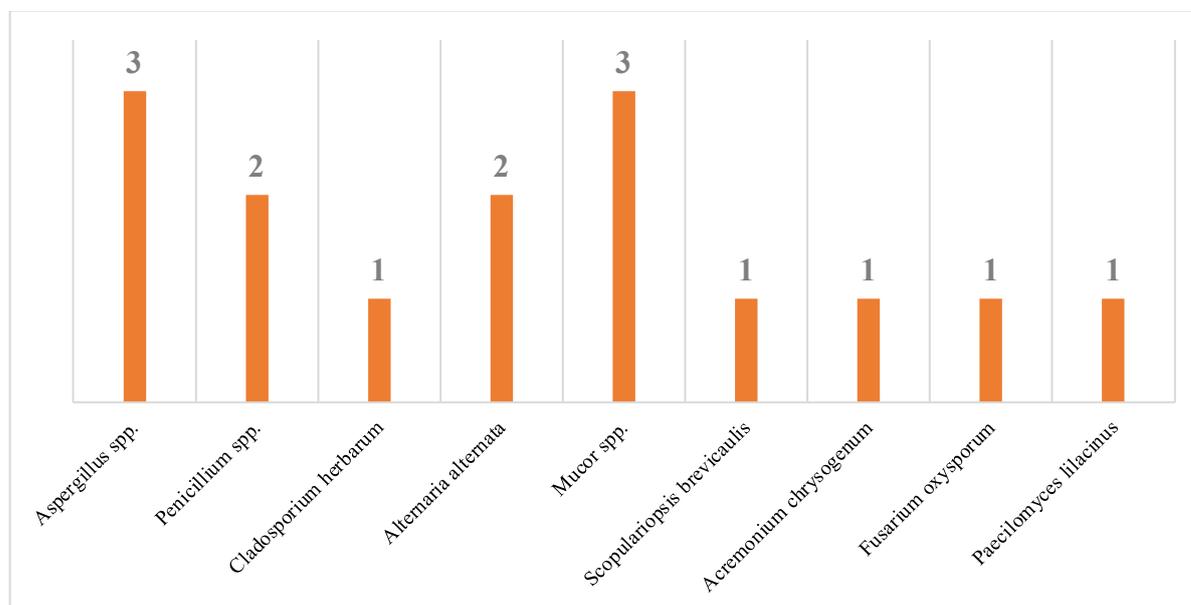


Рисунок 6 – Виды плесневых грибов, выделенных от грызунов и кроликов, и

Все представленные виды грибов выделены с кожных покровов и шерсти при наличии поражений.

У других видов животных представлено 5 различных родов (*Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Mucor*, *Fusarium*), при этом доминировали грибы рода *Fusarium* – 8 изолятов (40%) и *Aspergillus* – 6 изолятов (30%). Более подробная информация представлена на рисунке 7.

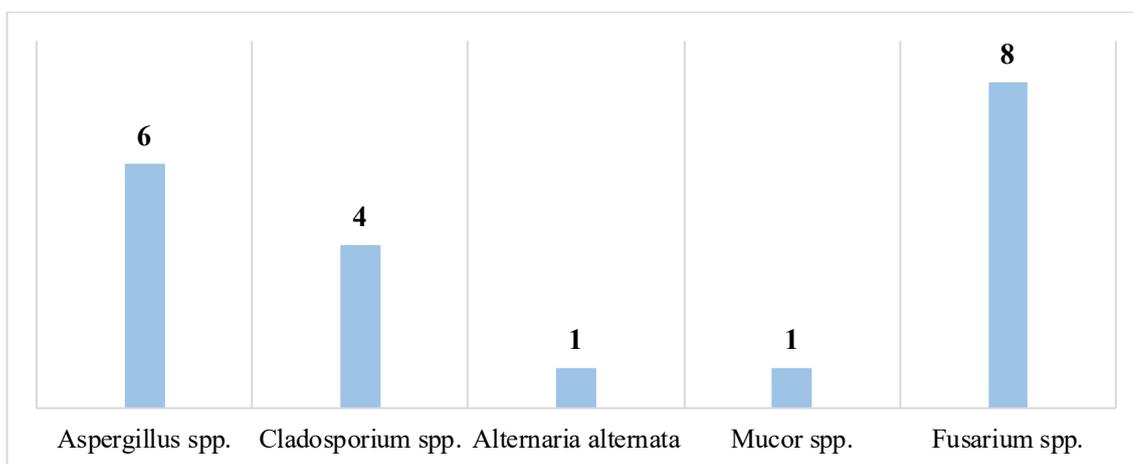


Рисунок 7 – Виды плесневых грибов, выделенных от других видов животных (лошади, коровы, козы), n

Грибы рода *Fusarium* чаще всего были выделены с кожных покровов лошадей – 2 изолята *F. chlamydosporum* и 2 изолята *F. solani*. Остальные 4 изолята *F. chlamydosporum* выделены от коров и коз. При исследовании БАЛ лошадей было выделено 4 изолята *A. niger*; дважды был выделен *A. felis* у лошадей с кожного покрова. Остальные виды выделены с кожных покровов коров и коз.

У птиц идентифицировано 4 различных рода (*Aspergillus*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Fusarium*), среди которых преобладал *Aspergillus* – 6 изолятов (60%). Остальные виды представлены единичными случаями (рис. 8).

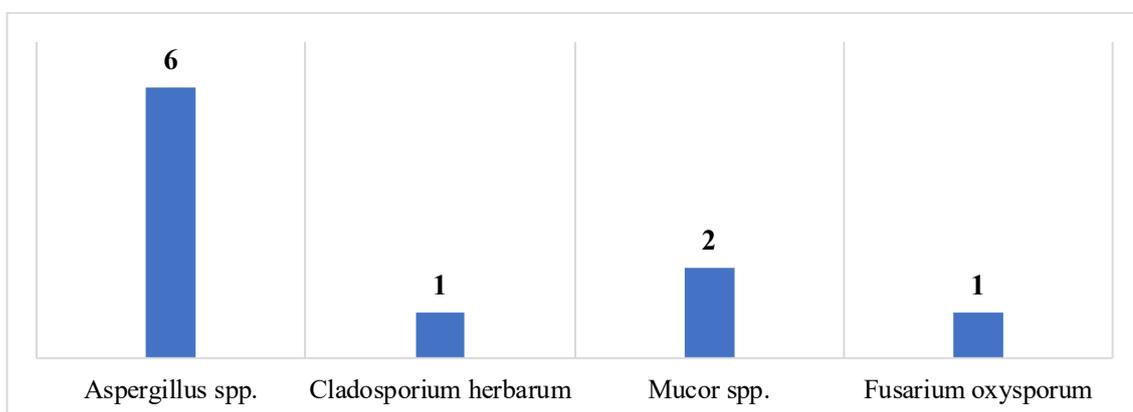


Рисунок 8 – Виды плесневых грибов, выделенных от птиц, n

Локусы выделения были различные, а именно 30% составляли смывы из клоаки, 30% - смывы из зоба или зева и 40% из воздухоносных мешков, при этом из последнего локуса чаще всего выделяли *Aspergillus fumigatus* (5 случаев).

Среди всех исследованных холоднокровных животных (змеи, ящерицы, черепахи, лягушки) диагностировано два случая выделения *F. oxysporum* от змей с кожными поражениями.

#### 4.1.2. Идентификация дрожжевых грибов традиционными методами

Идентификация дрожжевых грибов, в отличие от мицелиальных, базируется на определении биохимических свойств и физиологических тестах.

Изучали следующие характеристики: макро- и микроморфология, тест на ростовую трубку, тест на уреазу, рост на среде без липидов (для рода *Malassezia*), пигментация колоний (*Rhodotorula*, *Aureobasidium*). Результаты идентификации дрожжевых грибов представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Идентификация дрожжевых грибов традиционными фенотипическими методами

Результат идентификации	Микроморфология	Дифференциальный признак	Уровень идентификации (таксон)	Кол-во изолятов, n
<i>Candida albicans</i>	Почкующиеся дрожжевые клетки	Ростовая трубка, цвет на хромогенном агаре (синий)	До вида	92
<i>Malassezia pachydermatis</i>	Монополярное почкование, клетки в форме отпечатка стопы	Микроморфология; рост без источников липидов	До вида	328
<i>Rhodotorula spp.</i>	Почкующиеся дрожжевые клетки	Розовая пигментация колоний	До рода	70
<i>Cryptococcus spp.</i>	Почкующиеся дрожжевые клетки	Образование уреазы	До рода	7
<i>Trichosporon spp.</i>	Псевдомицелий, распадающийся на артроспоры	Микроморфология (артроспоры)	До рода	20
<i>Aureobasidium spp.</i>	Псевдомицелий, бластоконидии	Микроморфология, коричневый пигмент	До рода	42
Всего				559

Также для идентификации использовали тест-наборы для биохимической идентификации HiCandida Identification Kit. Однако учитывая дороговизну наборов, было проведено лишь 40 идентификаций. Из них 7 было

идентифицировано с высокой точностью (*C. albicans*, n=5, *Candida krusei* n=2), 33 теста с недостаточной точностью.

Таким образом, имеющиеся в нашем распоряжении тесты позволили идентифицировать 139 (15,4 %) изолятов дрожжей до уровня рода, и 420 (46,5%) до уровня вида. Часть дрожжей (38,2%, n=345) не удалось идентифицировать даже до уровня рода.

Это вызвало необходимость освоения и адаптации метода MALDI TOF MS, с целью идентификации оставшихся неидентифицированных дрожжевых грибов. Ниже в разделе 4.2 будут изложены результаты работ по внедрению метода MALDI TOF MS, в разделе 4.3 - данные по видовой идентификации дрожжевых грибов этим методом.

## **4.2 Идентификация грибов с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF MS**

Классические методы идентификации дрожжевых грибов имеют множество ограничений. Морфологическая неоднородность и фенотипическая пластичность усложняют определение видов. Биохимические тесты, как показали предыдущие исследования, часто недостаточно специфичны, что приводит к неточной идентификации. Медленный рост и сложности культивирования некоторых видов усложняют их исследование. Отсутствие видоспецифических тестов требует использования мультисистемного тестирования, что увеличивает время и затраты. Для наиболее точной идентификации грибов целесообразно использовать в комплексе с традиционными более современные методы исследования, одним из которых является масс-спектрометрия MALDI-TOF MS.

Клетка грибов имеет сложное строение клеточной стенки - средний слой включает бета-глюканы, которые обеспечивают структурную прочность и гибкость стенки, а внутренний слой содержит хитин, который придает жесткость и устойчивость к внешним воздействиям. В связи с этим классическая пробоподготовка для проведения масс-спектрометрического анализа,

ориентированная на бактерии, может не дать качественные результаты идентификации.

Прежде всего были проведены сравнительные исследования по выбору оптимальной методики пробоподготовки для видового определения дрожжевых грибов с помощью MALDI-TOF MS, чтобы использовать её для дальнейших исследований.

Часть дрожжевых грибов (n=130) была идентифицирована с помощью масс-спектрометра UltrafleXtreme (“Bruker daltonics”, Германия), однако в настоящее время официальная техподдержка и обновление ПО на территории РФ прекращены изготовителем. Это создало необходимость переноса исследований на российский прибор. В связи с этим остальные штаммы (n=215) были идентифицированы с помощью российского прибора «АЛМАСС-Био 200».

#### **4.2.1 Сравнение методов пробоподготовки дрожжевых грибов для масс-спектрометрического анализа**

Для проведения видовой идентификации на масс-спектрометре MALDI-TOF «АЛМАСС-Био 200» (Альгимед-Техно, Россия) было взято 215 штаммов дрожжевых грибов. Предварительно их идентифицировали до рода с помощью традиционных и биохимических тестов, однако до вида идентифицировать эти штаммы данными методами не удалось.

Идентификация методом MALDI-ToF MS с точностью до вида (score  $\geq 2,0$ ) проведена для 197 (90,8%) клинических изолятов. Для 18 изолятов отсутствовали спектры в базе данных. Данные изоляты были исследованы с помощью ITS-секвенирования и в дальнейшем внесены в базу данных масс-спектрометра.

Для идентификации на масс-спектрометре проводили выделение чистой культуры грибов. Далее выполнили сравнительный анализ нескольких различных методов пробоподготовки: метод прямого нанесения образца на мишень, расширенный метод прямого нанесения и метод нанесения с экстракцией белков с использованием муравьиной кислоты и ацетонитрила. Сравнение данных методов провели параллельно на 60 штаммах различных родов дрожжевых грибов,

предварительно определенных до рода – *Malassezia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Aureobasidium*, *Trichosporon*, *Cryptococcus*. Взято по 10 штаммов каждого рода, исходя из предварительной идентификации (всего 60 штаммов).

Из 60 штаммов при прямом методе пробоподготовки до вида (score  $\geq 2,0$ ) идентифицировано 8 штаммов (13,3%), а до рода (score  $\geq 1,7$ ) 15 штаммов (25%). При прямом расширенном методе пробоподготовки до вида идентифицировано 13 штаммов (21,7%), до рода 23 штамма (38,3%). При расширенном методе пробоподготовки до вида идентифицировано 56 штаммов (93,3%), до рода 58 штаммов (96,7%). Подробная информация представлена в таблице 4.

Таблица 4 - Результаты сравнительного изучения трех методов пробоподготовки образцов дрожжевых грибов для масс-спектрометрического анализа

Род грибов	Количество штаммов, n	«Score» идентификации	Прямое нанесение	Прямое расширенное нанесение	Расширенное нанесение (МК+ацетонитрил)
<i>Malassezia</i>	10	$\geq 2,0$	0	1	10
		1,7-<2,0	1	2	0
		<1,7	9	7	0
<i>Candida</i>	10	$\geq 2,0$	2	4	8
		1,7-<2,0	2	3	1
		<1,7	6	3	1
<i>Aureobasidium</i>	10	$\geq 2,0$	0	1	10
		1,7-<2,0	0	1	0
		<1,7	10	9	0
<i>Trichosporon</i>	10	$\geq 2,0$	0	1	8
		1,7-<2,0	0	1	1
		<1,7	10	9	1
<i>Rhodotorula</i>	10	$\geq 2,0$	4	3	10
		1,7-<2,0	2	2	0
		<1,7	4	5	0
<i>Cryptococcus</i>	10	$\geq 2,0$	2	2	10
		1,7-<2,0	2	2	0
		<1,7	6	6	0

Из таблицы 4 можно сделать вывод, что наиболее эффективным является расширенный метод пробоподготовки с экстракцией белков муравьиной кислотой и ацетонитрилом. Вероятно, это может быть связано с особенностями строения клеточной стенки грибов, в которой микрофибрильные скелетные компоненты состоят из хитина и целлюлозы. Такой состав мешает хорошей кристаллизации материала при прямом нанесении на мишень, так как для разрушения плотной клеточной стенки необходимо воздействовать на нее комплексом кислот.

Для сравнения методов пробоподготовки оценивали качество полученных белковых спектров. Критериями оценки являлись отношения сигнал/шум (S/N) мажорных пиков на масс-спектре и их количество. На рисунках 9-11 представлены спектры на примере штамма *C. doubushaemulonii* при трех различных методах пробоподготовки.

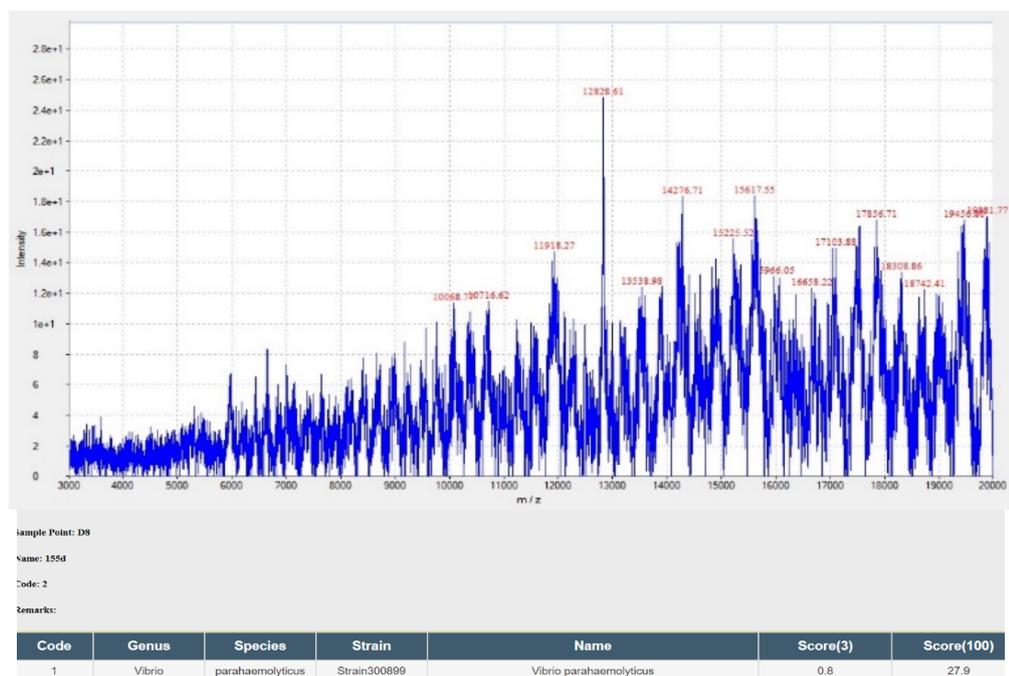
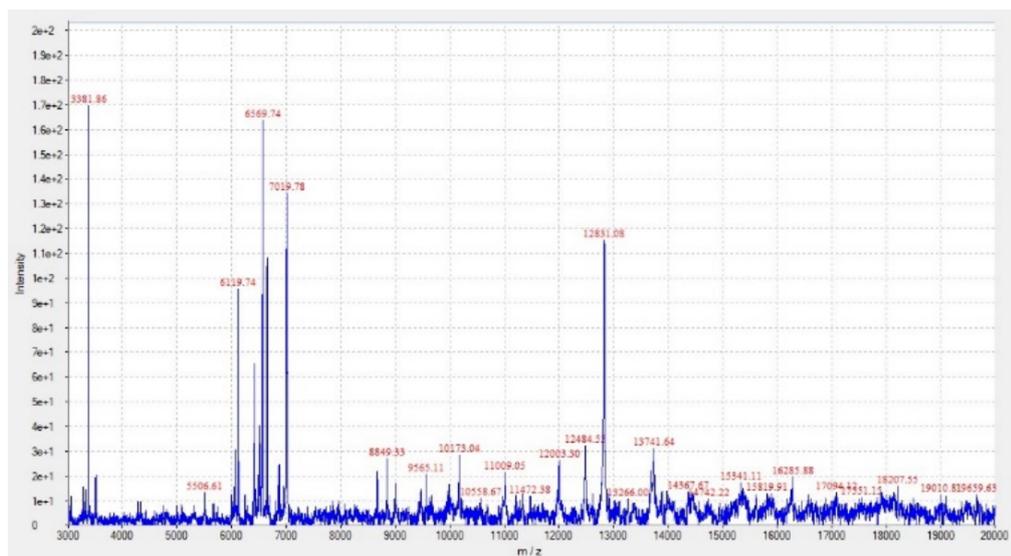


Рисунок 9 - Белковый спектр штамма *C. doubushaemulonii* при прямом методе нанесения образца на мишень



Sample Point: D9  
 Name: 1559p  
 Code: 1  
 Remarks:

Code	Genus	Species	Strain	Name	Score(3)	Score(100)
1	Candida	duobushaemulonii	Strain300112	Candida dubushaemulonii	1.4	50.1

Рисунок 10 - Белковый спектр штамма *C. dubushaemulonii* при прямом расширенном методе нанесения образца на мишень

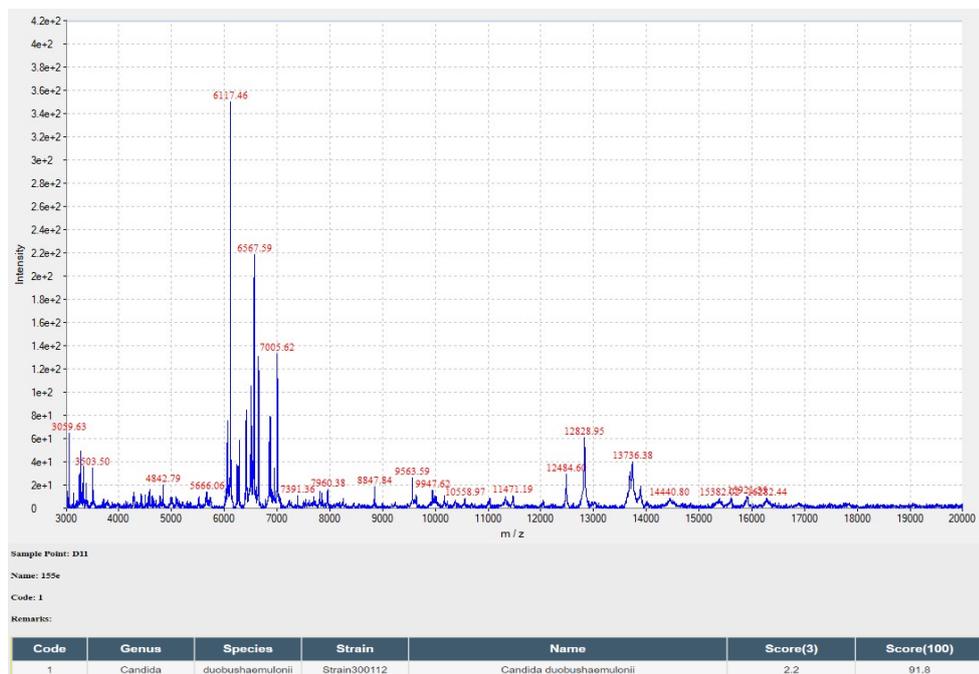


Рисунок 11 - Белковый спектр штамма *C. dubushaemulonii* при расширенном методе нанесения образца на мишень (МК+ацетонитрил)

По шкале абсцисс отложены значения  $m/z$  (масса/заряд), по шкале ординат – относительная интенсивность пиков, регистрируемых при масс-

спектрометрическом анализе. Эти данные позволяют оценить, насколько качественный и достоверный результат был получен.

При прямом нанесении образца наблюдали отсутствие масс-спектрометрических пиков белков, вместо которых была лишь базовая линия, поскольку при прямом нанесении клетка дрожжевых грибов не разрушается и не происходит ионизация белков под воздействием лазерного излучения MALDI-TOF.

При прямом расширенном методе нанесения образца на мишень наблюдали белковые масс-спектрометрические пики малой интенсивности ( $<1,8 \cdot 10^2$  у.е.), что также может быть связано с частичным разрушением клеточной стенки, что позволяет лазерному излучению масс-спектрометра ионизировать имеющиеся белки, однако недостаточно эффективно.

При расширенном методе пробоподготовки с экстракцией белков качество полученных масс-спектров являлось наилучшим, это оценивали по количеству масс-спектрометрических пиков и их значениям сигнал/шум, интенсивность мажорных пиков была более  $1,8 \cdot 10^2$  у.е.

Таким образом, метод с расширенной пробоподготовкой оказался наиболее эффективным, в связи с этим для дальнейших исследований оставшихся 155 образцов мы использовали расширенный метод пробоподготовки.

#### **4.2.2 Видовая идентификация дрожжевых грибов с помощью масс-спектрометрического анализа MALDI-TOF**

С помощью расширенного метода пробоподготовки из 215 образцов идентифицировано до вида 197 образцов, из них 44 изолята относились к роду *Candida* (20,6%), 42 изолята - *Trichosporon* (19,5%), 37 - *Rhodotorula* (17,2%), 31 - *Aureobasidium* (14,4%), 23 - *Cryptococcus* (10,7%), 20 - *Malassezia* (9,3%). Однако 18 изолятов (8,4) были идентифицированы с низким уровнем достоверности. Предварительная идентификация неизвестных штаммов представлена на рисунке 12.

report_145857							
Точка	Наименование	Код	Род	Вид	Наименование	Оценка(3)	Оценка(100)
A1	1	M494-23Md	Candida	tropicalis	Candida tropicalis	1,56	49,33
A2	2	M494-23Md	Candida	lipolytica	Candida lipolytica	1,39	49,06
A3	1	M271-24Ef	Acranobacterium	haemolyticum	Acranobacterium haemolyticum	1,26	44,47
A4	2	M271-24Ef	Candida	tropicalis	Candida tropicalis	1,38	48,71
A5	1	M339-23Fc	Candida	parapsilosis	Candida parapsilosis	1,59	56,12
A6	2	M339-23Fc	Pseudozyma	aphidis	Pseudozyma aphidis	1,08	38,12
A7	1	M117-24Eq	Debaromyces	hansenii	Debaromyces hansenii	1,71	68,12
A8	2	M117-24Eq	Candida	parapsilosis	Candida parapsilosis	1,63	57,53
A9	1	M449-24Ps	Candida	lipolytica	Candida lipolytica	1,18	39,22
A10	2	M449-24Ps	Xanthomonas	campestris	Xanthomonas campestris	1,16	40,94
A11	1	P73-24Ps	Staphylococcus	kloosii	Staphylococcus kloosii	0,96	33,88
A12	2	P73-24Ps	Rhodospiridium	spp.	Rhodospiridium spp.	1,51	53,50
B1	1	M444-24Ps	Candida	magnoliae	Candida magnoliae	1,38	42,88
B2	2	M444-24Ps	Candida	parapsilosis	Candida parapsilosis	1,59	56,12
B3	1	8477-23Bov	Delfita	spp.	Delfita spp.	1,62	59,53
B4	2	8477-23Bov	Candida	boidinii	Candida boidinii	1,12	39,53
B5	1	M182-24Cf	Phanerochaete	chryso sporum	Phanerochaete chryso sporum	1,35	39,53
B6	2	M182-24Cf	Candida	albicans	Candida albicans	1,53	54,00
B7	1	M428-24Ps	Neisseria	weaver	Neisseria weaver	1,25	31,43
B8	2	M428-24Ps	Candida	parapsilosis	Candida parapsilosis	1,59	56,12
B9	1	M445-24Ps	Bacillus	sporothermodurans	Bacillus sporothermodurans	1,08	38,12
B10	2	M445-24Ps	Candida	parapsilosis	Candida parapsilosis	1,31	46,24
B11	1	M434-24Cf	Candida	albicans	Candida albicans	1,07	37,76
B12	2	M434-24Cf	Burkholderia	cepacia	Burkholderia cepacia	1,42	48,12
C1	1	4-24Bov	Burkholderia	gladioli	Candida gladioli	1,17	34,82
C2	2	4-24Bov	Candida	norvegensis	Candida norvegensis	1,25	44,12
C3	1	6-24Owl	Kazachstania	pintolopesii	Kazachstania pintolopesii	1,51	53,29
C4	2	6-24Owl	Staphylococcus	kloosii	Staphylococcus kloosii	0,91	32,12
C5	1	M422-24	Rhodotorula	minuta	Rhodotorula minuta	1,46	51,53
C6	2	M422-25	Clostridium	bifermentans	Clostridium bifermentans	1,51	53,29
C7	1	M511-24Cf	Trichosporon	japonicum	Trichosporon japonicum	1,76	65,59
C8	2	M511-24Cf	Trichosporon	japonicum	Trichosporon japonicum	1,63	57,53
C9	1	Pch20/1-23	Aspergillus	fumigatus	Aspergillus fumigatus	1,50	52,94
C10	2	Pch20/1-24	Xanthomonas	campestris	Xanthomonas campestris	1,16	40,94
C11	1	M116-24Eq	Pseudomonas	sp	Pseudomonas sp	1,08	38,12
C12	2	M116-24Eq	Candida	boidinii	Candida boidinii	1,27	44,82

Рисунок 12 – Копия электронного отчета программы «Microbe Analysis версия 1.0.0.0». Результаты идентификации 18 штаммов с помощью MALDI-TOF MS

Согласно результатам, представленным на рисунке 9, большинство штаммов идентифицированы с низким значением score (менее 1,7), что является недостоверной идентификацией (они выделены красным цветом). Два штамма (M117-24Eq, M511-24Cf) идентифицированы до рода и отмечены на рисунке желтым цветом, что также является неудовлетворительным результатом. При этом спектры белков соответствовали всем критериям для качественного видового определения.

Учитывая, что среди неидентифицированных видов могли быть нетривиальные инфекционно-значимые грибы, было решено выполнить работу по их точной видовой идентификации, характеристике, получению масс-спектров и внесению их в базу данных масс-спектрометра «АЛМАСС-Био 200». Это позволит в дальнейшем идентифицировать более широкий спектр грибов при проведении диагностических исследований.

Для установления вида неидентифицированных методом MALDI-TOF 18 штаммов секвенировали по региону ITS, поскольку на сегодняшний день этот

метод является «золотым стандартом» для идентификации грибов. Результаты секвенирования представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Результаты определения видовой идентификации с помощью секвенирования

№ штамма	Вид	Вид животного	Локус выделения	Номер в базе Genbank NCBI
M494-23Md	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	муравьед	кожа	PP947404.1
M271-24Ef	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	слон	рана	PP998488.1
M339-23Fc	<i>Pseudozyma pruni</i>	кот	ухо	PQ008688.1
M117-24Eq	<i>Candida famata</i> ( <i>Debaromyces hansenii</i> )	лошадь	БАЛ	PQ008689.1
M449-24Ps	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> ( <i>Filobasidium uniguttulatum</i> )	попугай	клоака	PQ008690.1
П73-24Ps	<i>Rhodotorula glutinis</i>	попугай	зев	PQ008691.1
M444-24Ps	<i>Cryptococcus albidus</i> ( <i>Naganishia albida</i> )	попугай	клоака	PQ008692.1
8477-23Bov	<i>Kazachstania aerobia</i> ( <i>Monosporozyma aerobia</i> )	корова	кожа	PQ008694.1
M182-24Cf	<i>Naganishia globosa</i>	собака	рана	PQ008695.1
M428-24Ps	<i>Cryptococcus ferigula</i> ( <i>Cystofilobasidium ferigula</i> )	попугай	зоб	PQ008832.1
M445-24Ps	<i>Cryptococcus oeirensis</i> ( <i>Filobasidium oeirensis</i> )	попугай	зоб	PQ008843.1
M434-24Cf	<i>Cutaneotrichosporon moniliiforme</i>	собака	выделения из глаз	PQ008870.1
4-24Bov	<i>Cystobasidium pallidum</i>	корова	молоко	PQ008928.1
6-24Owl	<i>Kazachstania pintolopesii</i> ( <i>Arxiozyma pintolopesii</i> )	сова	помет	PQ008936.1
M422-24Ps	<i>Cryptococcus magnum</i> ( <i>Filobasidium magnum</i> )	попугай	клоака	PQ008964.1
M511-24Cf	<i>Trichosporon aquatile</i>	собака	ухо	PQ008966.1
Pch20/1-23	<i>Kwoniella pini</i>	пчелы	смыв	PQ008976.1
M116-24Eq	<i>Candida saitoana</i>	лошадь	БАЛ	PQ008985.1

В результате секвенирования 18 изолятов было идентифицировано 17 различных видов (2 из них принадлежали к одному виду). Из них только 3 встречались ранее в наших исследованиях – *Candida famata* (syn. *Debaromyces hansenii*), *Rhodotorula glutinis*, *Cryptococcus albidus* (syn. *Naganisha albida*). Остальные виды ранее не встречались. Идентифицирован один вид рода *Candida* – *C. saitoana*, 1 вид *Trichosporon* – *T. aquatile*. Остальные виды относились к «нетривиальным» родам – *Pseudozyma* (*P. pruni*), *Debaromyces* (*D. nepalensis*), *Kazachstania* (*K. aerobia*, *K. pintolopesii*), *Cystobasidium* (*C. pallidum*), *Kwoniella* (*K. pini*), *Naganishia* (*N. globosa*). Полученные при секвенировании нуклеотидные последовательности были депонированы в базе данных Genbank NCBI.

Далее у всех этих изолятов был изучен комплекс биологических свойств. В частности, изучили макро- и микроморфологические характеристики, биохимические свойства, определили МИК для амфотерицина В, флуконазола, итраконазола и кетоконазола, провели оценку чувствительности к широкой группе противогрибковых препаратов. Затем провели работу по получению характерных масс-спектров изученных штаммов грибов для внесения в базу данных прибора «АЛМАСС-Био 200».

#### **4.2.3 Характеристика биологических свойств нетривиальных дрожжевых грибов**

##### **Морфологическая характеристика штаммов**

Для морфологической характеристики колоний выделенных штаммов посевы были сделаны на агар Сабуро с хлорамфениколом, Сабуро с циклогексимидом, хромогенный агар CHROMagar *Candida*, агар Чапека-Докса, сусло-агар, YGS-агар, RBC-агар. Выращивали культуры 72 часа в аэробных условиях при температуре 26°C Особенности морфологии штаммов на питательных средах представлены в таблице 5.

Таблица 6 - Морфология колоний выделенных изолятов на разных микологических питательных средах

№	№ штамма	Вид	Агар Сабуро с хлорамфениколом	Сабуро с циклогексимином	Хромогенный (цвет колонии)	Чапека	Сусло с глицерином	YGS	RBC
1	M494-23Md	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	белые, гладкие, блестящие округлые колонии с ровным краем,	-	бледно-фиолетовый	матовые, белые	матовые, бежевые	пожелтение среды, колонии белые, матовые	матовые, розовые
2	M271-24Ef	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	кремово-белые, матовые, округлые колонии с ровным краем	-	белый	матовые, белые	матовые, бежевые	матовые, белые	матовые, по краям розовые
3	M339-23Fc	<i>Pseudozyma pruni</i>	светло-розовые колонии, имеют кружевную складчатость, края неровные	-	темно-фиолетовый	блестящие, белые	блестящие, бежевые	светло-розовые, бежевые, блестящие	розовые, складчатые
4	M117-24Eq	<i>Candida famata</i> ( <i>Debaromyces hansenii</i> )	белые, блестящие, округлые колонии с ровным краем	-	светло-фиолетовый	матовые, белые	плохой рост, матовые, бежевые	белые, матовые	скудный рост, матовые, розовые

Продолжение таблицы 6

№	№ штамма	Вид	Агар Сабуро с хлорамфениколом	Сабуро с циклогексимидом	Хромогенный (цвет колонии)	Чапека	Сусло с глицерином	YGS	RBC
5	M449-24Ps	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> ( <i>Filobasidium uniguttulatum</i> )	светло-бежевые, блестящие, округлые колонии с ровным краем	-	бежевый	скудный рост, блестящие	скудный рост, матовые, бежевые	скудный рост, блестящие, белые	скудный рост, блестящие розовые
6	П73-24Ps	<i>Rhodotorula glutinis</i>	коралловые, блестящие, округлые колонии с ровным краем	+	розовый	слизистые, блестящие, розовые	матовые, кораллового цвета	слизистый рост, коралловые	блестящие, красные
7	M444-24Ps	<i>Cryptococcus albidus</i> ( <i>Naganishia albida</i> )	светло-бежевые, блестящие, округлые колонии с ровным краем	-	светло-фиолетовый	блестящие, бежевые	матовые, белые	скудный рост, матовые	матовые, бледно-розовые
8	8477-23Bov	<i>Kazachstania aerobia</i>	серо-белые, блестящие, округлые колонии с ровным краем	+	белый	блестящие, бежевые	матовые, бежевые	белые, матовые	матовые, бледно-розовые

Продолжение таблицы 6

№	№ штамма	Вид	Агар Сабуро с хлорамфениколом	Сабуро с циклогексимидом	Хромогенный (цвет колонии)	Чапека	Сусло с глицерином	YGS	RBC
9	M182-24Cf	<i>Naganishia globosa</i>	светло-розовые, матовые, округлые колонии с ровным краем	-	фиолетовый	бежевые, блестящие	матовые, бежевые	скудный рост, матовые, бежевые	матовые, розовые
10	M428-24Ps	<i>Cryptococcus ferigula</i> ( <i>Cystofilobasidium ferigula</i> )	Розовые, матовые, округлые колонии с неровным краем, может формироваться складчатость	-	фиолетовый	плохой рост, бледно-розовые, матовые	плохой рост, матовые, бледно-розовые	бледно-розовые, матовые	матовые, розовые
11	M445-24Ps	<i>Cryptococcus oeirensis</i> ( <i>Filobasidium oeirense</i> )	Кремowo-белые, матовые, округлые колонии с неровным краем	-	фиолетовый	блестящие	плохой рост, матовые, бежевые	плохой рост, белые, блестящие	плохой рост, блестящие, розовые
12	M434-24Cf	<i>Cutaneotrichosporon moniliiforme</i>	серо-белые, блестящие, плоские колонии с неровным краем	-	синий	слизистые, край реснитчатый	блестящие, белые	блестящие, белые	матовые, розовые

Продолжение таблицы 6

№	№ штамма	Вид	Агар Сабуро с хлорамфениколом	Сабуро с циклогексимидом	Хромогенный (цвет колонии)	Чапека	Сусло с глицерином	YGS	RBC
13	4-24Bov	<i>Cystobasidium pallidum</i>	розовые, блестящие, округлые колонии с ровным краем	-	бежевый	плохой рост, бледно-розовые, матовые	нет роста	нет роста	нет роста
14	6-24Owl	<i>Kazachstania pintolopesii</i>	белые, блестящие, округлые колонии с ровным краем	-	фиолетовый	блестящие, белые, мелкие	плохой рост, бежевые, матовые	плохой рост, белые, блестящие	плохой рост, матовые, темно-розовые
15	M422-24Ps	<i>Cryptococcus magnum</i> ( <i>Filobasidium magnum</i> )	светло-бежевые, блестящие, округлые колонии с ровным краем	-	фиолетовый	блестящие, бежевые	бежевые, матовые, мелкие	бежевые, матовые	плохой рост, матовые, темно-розовые

Продолжение таблицы 6

№	№ штамма	Вид	Агар Сабуро с хлорамфениколом	Сабуро с циклогексимидом	Хромогенный (цвет колонии)	Чапека	Сусло с глицерином	YGS	RBC
16	M511-24Cf	<i>Trichosporon aquatile</i>	кремово-белые, матовые, мучнистые колонии, широкий край с широкими краями с поперечными трещинами	-	голубой	колонии распростертые, плоские, белые, матовые	мелкие, складчатые, бежевые	мелкие, складчатые, выпуклые	маленькие, выпуклые, темнорозовые
17	Pch20/1-23	<i>Kwoniella pini</i>	бежевые, блестящие, округлые колонии с ровным краем	-	белый	слизистые, бежево-белые	выпуклые, блестящие, бежевые	бежевые (желтоватый оттенок), блестящие	блестящие, розовые
18	M116-24Eq	<i>Candida saitoana</i>	Кремово-белые, матовые, округлые колонии с неровным краем	-	синий	матовые, белые	матовые, выпуклые, белые	белые, матовые	матовые, светло-розовые

## Определение биохимических свойств штаммов

Далее определили биохимические свойства выделенных изолятов с помощью набора HiCandida Identification Kit, а именно способность утилизировать различные субстраты, прежде всего углеводы. Результаты определения биохимических свойств представлены в таблице 7 (Обозначения в таблице: «+» - признак выражен; «±» - признак выражен слабо; «-» - признак не выражен).

## Изучение чувствительности к противогрибковым препаратам

Была проведена оценка чувствительности к семи противогрибковым препаратам диско-диффузионным методом, (кетоконазол, итраконазол, клотримазол, вориконазол, нистатин, амфотерицин В, флуконазол). Штаммы по чувствительности классифицировали как чувствительный (S), резистентный (R) или промежуточный дозозависимый (I) исходя из пограничных значений ЗЗР по данным CLSI или инструкции изготовителя. Результаты представлены в таблице 8.

Большинство штаммов обладали множественной устойчивостью к противогрибковым препаратам (устойчивы к двум и более классам антимикотиков).

Штамм *C. famata* M117-24Eq, выделенный из БАЛа лошади, был чувствителен только к вориконазолу и обладал устойчивостью к остальным азолам и полиенам (нистатину, амфотерицину В). Штаммы *D. nepalensis* M494-23Md и M271-24Ef и *C. albidus* M444-24Ps чувствительны только к нистатину и устойчивы ко всем азолам и амфотерицину В.

Таблица 7 - Биохимические свойства выделенных изолятов

№	№ штамма	Вид	Уреаза	Мелибиоза	Лактоза	Мальтоза	Сахароза	Галактоза	Целлобиоза	Инозит	Ксилоза	Дульцит	Раффиноза	Трегалоза
1	M494-23Md	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	±	-	+	-
2	M271-24Ef	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	+	+	-	±	±	±	±	-	-	-	+	-
3	M339-23Fc	<i>Pseudozyma pruni</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
4	M117-24Eq	<i>Candida famata</i> ( <i>Debaromyces hansenii</i> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	M449-24Ps	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> ( <i>Filobasidium uniguttulatum</i> )	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	П73-24Ps	<i>Rhodotorula glutinis</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
7	M444-24Ps	<i>Cryptococcus albidus</i> ( <i>Naganishia albida</i> )	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+
8	8477-23Bov	<i>Kazachstania aerobia</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	M182-24Cf	<i>Naganishia globosa</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
10	M428-24Ps	<i>Cryptococcus ferigula</i> ( <i>Cystofilobasidium ferigula</i> )	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
11	M445-24Ps	<i>Cryptococcus oeirensis</i> ( <i>Filobasidium oeirense</i> )	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	M434-24Cf	<i>Cutaneotrichosporon moniliiforme</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	4-24Bov	<i>Cystobasidium pallidum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	6-24Owl	<i>Kazachstania pintolopesii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	M422-24Ps	<i>Cryptococcus magnum</i> ( <i>Filobasidium magnum</i> )	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
16	M511-24Cf	<i>Trichosporon aquatile</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	Pch20/1-23	<i>Kwoniella pini</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	M116-24Eq	<i>Candida saitoana</i>	-	-	±	+	+	±	-	-	-	-	-	-

Таблица 8 - Чувствительность выделенных изолятов к противогрибковым препаратам

№	№ штамма	Вид	Кетоконазол	Итраконазол	Клотримазол	Вориконазол	Нистатин	Амфотерицин В	Флуконазол
1	M494-23Md	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	R	R	R	R	S	R	R
2	M271-24Ef	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	R	R	R	R	S	R	R
3	M339-23Fc	<i>Pseudozyma pruni</i>	R	I	S	S	S	R	R
4	M117-24Eq	<i>Candida famata (Debaromyces hansenii)</i>	R	R	R	S	R	R	R
5	M449-24Ps	<i>Cryptococcus uniguttulatus (Filobasidium uniguttulatum)</i>	S	R	I	R	S	R	R
6	П73-24Ps	<i>Rhodotorula glutinis</i>	R	R	I	R	S	R	S
7	M444-24Ps	<i>Cryptococcus albidus (Naganishia albida)</i>	R	R	R	R	S	R	R
8	8477-23Bov	<i>Kazachstania aerobia</i>	S	R	S	S	S	S	R
9	M182-24Cf	<i>Naganishia globosa</i>	S	R	S	R	S	S	R
10	M428-24Ps	<i>Cryptococcus ferigula (Cystofilobasidium ferigula)</i>	S	S	S	S	S	R	S
11	M445-24Ps	<i>Cryptococcus oeirensis (Filobasidium oeirensis)</i>	S	R	S	I	S	R	R
12	M434-24Cf	<i>Cutaneotrichosporon moniliiforme</i>	S	R	S	S	S	S	S
13	4-24Bov	<i>Cystobasidium pallidum</i>	S	S	S	S	S	R	I
14	6-24Owl	<i>Kazachstania pintolopesii</i>	S	S	S	S	S	S	R
15	M422-24Ps	<i>Cryptococcus magnum (Filobasidium magnum)</i>	S	S	R	S	S	R	R
16	M511-24Cf	<i>Trichosporon aquatile</i>	S	R	R	S	S	R	S
17	Pch20/1-23	<i>Kwoniella pini</i>	R	R	R	R	S	R	S
18	M116-24Eq	<i>Candida saitoana</i>	S	R	R	R	S	S	R

Обозначения\* - R - устойчивый, I - дозозависимый, S - чувствительный

## Определение минимальной ингибирующей концентрации

Также для выделенных изолятов была изучена МИК амфотерицина В, флуконазола, итраконазола и кетоконазола с помощью полосок с градиентом концентрации препаратов (Е-тест) – таблица 9.

Таблица 9 - Минимальная ингибирующая концентрация для выделенных  
ИЗОЛЯТОВ

№	№ штамма	Вид	Флуконазол, мкг	Итраконазол, мкг	Кетоконазол, мкг	Амфотерицин В, мкг
1	M494-23Md	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	>256 (R)	>32 (R)	8	>32
2	M271-24Ef	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	>256 (R)	>32 (R)	4	>32
3	M339-23Fc	<i>Pseudozyma pruni</i>	16 (R)	1 (R)	0,25	>32
4	M117-24Eq	<i>Candida famata</i> ( <i>Debaromyces hansenii</i> )	64 (R)	>32 (R)	2	>32
5	M449-24Ps	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> ( <i>Filobasidium uniguttulatum</i> )	32 (R)	>32 (R)	0,5	>32
6	П73-24Ps	<i>Rhodotorula glutinis</i>	>256 (R)	>32 (R)	1	>32
7	M444-24Ps	<i>Cryptococcus albidus</i> ( <i>Naganishia albida</i> )	>256 (R)	>32 (R)	>32	>32
8	8477-23Bov	<i>Kazachstania aerobia</i>	32 (R)	>32 (R)	1	0,5
9	M182-24Cf	<i>Naganishia globosa</i>	16 (R)	>32 (R)	2	2
10	M428-24Ps	<i>Cryptococcus ferigula</i> ( <i>Cystofilobasidium ferigula</i> )	4 (I)	2 (R)	0,128	>32
11	M445-24Ps	<i>Cryptococcus oeirensis</i> ( <i>Filobasidium oeirensis</i> )	64 (R)	>32 (R)	1	>32
12	M434-24Cf	<i>Cutaneotrichosporon moniliiforme</i>	2 (S)	1 (R)	0,064	1
13	4-24Bov	<i>Cystobasidium pallidum</i>	16 (R)	0,5 (I)	0,064	0,12
14	6-24Owl	<i>Kazachstania pintolopesii</i>	>256 (R)	1 (R)	0,128	4
15	M422-24Ps	<i>Cryptococcus magnum</i> ( <i>Filobasidium magnum</i> )	32 (R)	8 (R)	0,5	>32
16	M511-24Cf	<i>Trichosporon aquatile</i>	4 (I)	>32 (R)	2	>32
17	Pch20/1-23	<i>Kwoniella pini</i>	4 (I)	>32 (R)	>32	>32
18	M116-24Eq	<i>Candida saitoana</i>	>256 (R)	>32 (R)	2	0,5

**Обозначения:** \* - R - устойчивый, I - дозозависимый, S - чувствительный

Согласно инструкции производителя и данным CLSI интерпретировать, является ли штамм чувствительным (S), резистентным (R) или дозозависимым (I) можно только для флуконазола и итраконазола, ориентируясь на концентрации пограничных значений МИК, известные для дрожжевых грибов. Исходя из этого, к флуконазолу чувствителен один штамм (*C. moniliiforme*), три штамма дозозависимые (*C. ferigula*, *T. aquatile*, *K. pini*), а остальные 14 являются резистентными. К итраконазолу устойчивы все штаммы, кроме *C. pallidum*, который является дозозависимым.

Таким образом, у 77,8% нетривиальных видов дрожжей выявлена множественная устойчивость к противогрибковым препаратам флуконазолу и итраконазолу, которые часто применяются для терапии микозов как в медицине, так и в ветеринарии.

### Определение фосфолипазной активности

В таблице 10 представлены полученные результаты по определению фосфолипазной активности выделенных штаммов.

Таблица 10 – Результаты определения фосфолипазной активности выделенных штаммов

№	№ штамма	Вид	Вид животного	Локус выделения	Наличие фосфолипазной активности
1	M494-23Md	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	муравьед	кожа	+
2	M271-24Ef	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	слон	рана	+
3	M339-23Fc	<i>Pseudozyma pruni</i>	кот	ухо	++
4	M117-24Eq	<i>Candida famata</i> ( <i>Debaromyces hansenii</i> )	лошадь	БАЛ	-
5	M449-24Ps	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> ( <i>Filobasidium uniguttulatum</i> )	попугай	клоака	++
6	П73-24Ps	<i>Rhodotorula glutinis</i>	попугай	зев	++

Продолжение таблицы 10

№	№ штамма	Вид	Вид ивотного	Локус выделения	Наличие фосфолипазной активности
7	M444-24Ps	<i>Cryptococcus albidus</i> ( <i>Naganishia albida</i> )	попугай	клоака	++
8	8477-23Bov	<i>Kazachstania aerobia</i> ( <i>Monosporozyma aerobia</i> )	корова	кожа	-
9	M182-24Cf	<i>Naganishia globosa</i>	Собака	рана	-
10	M428-24Ps	<i>Cryptococcus ferigula</i> ( <i>Cystofilobasidium ferigula</i> )	попугай	зоб	-
11	M445-24Ps	<i>Cryptococcus oeirensis</i> ( <i>Filobasidium oeirense</i> )	попугай	зоб	+++
12	M434-24Cf	<i>Cutaneotrichosporon moniliiforme</i>	собака	выделения из глаз	+++
13	4-24Bov	<i>Cystobasidium pallidum</i>	корова	молоко	++
14	6-24Owl	<i>Kazachstania pintolopesii</i> ( <i>Arxiozyma pintolopesii</i> )	сова	помет	-
15	M422-24Ps	<i>Cryptococcus magnum</i> ( <i>Filobasidium magnum</i> )	попугай	клоака	+++
16	M511-24Cf	<i>Trichosporon aquatile</i>	собака	ухо	++
17	Pch20/1-23	<i>Kwoniella pini</i>	пчелы	смыв	++
18	M116-24Eq	<i>Candida saitoana</i>	лошадь	БАЛ	++

**Обозначения:** \* - "-" фосфолипазная активность не обнаружена; "+" слабая фосфолипазная активность; "++" средняя фосфолипазная активность; "+++ " умеренная фосфолипазная активность; "++++" интенсивная фосфолипазная активность

Из 18 изученных штаммов 5 не обладали фосфолипазной активностью (ФА), 2 штамма со слабой ФА, 8 обладали средней ФА и 3 штамма обладали умеренной ФА.

#### 4.2.4 Получение характерных масс-спектров нетривиальных грибов и внесение их в базу данных масс-спектрометра

После внесения нуклеотидных последовательностей в базу Genbank NCBI, штаммы были внесены в базу данных масс-спектрометра MALDI-TOF Microbe Analysis (версия 1.0.0.0). Для внесения данных в базу получили 30 масс-спектров каждого штамма дрожжевого гриба для создания усредненного характерного масс-спектра (из них три биологических повторности и по десять технических повторностей для каждой биологической). Все масс-спектры были получены с помощью расширенного метода пробоподготовки. При получении масс-спектров обращали внимания на качество пиков белков и отсутствие «шумов».

Далее в программу Microbe Analysis загружали полученные результаты, выбирали соответствующие настройки и согласно полученным результатам секвенирования вносили данные родового и видового наименования дрожжевого гриба. Затем создавали новый раздел в библиотеке с новым полученным штаммом. После нажатия кнопки "Добавить" усредненный масс-спектр был добавлен в библиотеку согласно до этого заданным параметрам. На рисунке 13 показан этап внесения в базу данных усредненного масс-спектра.

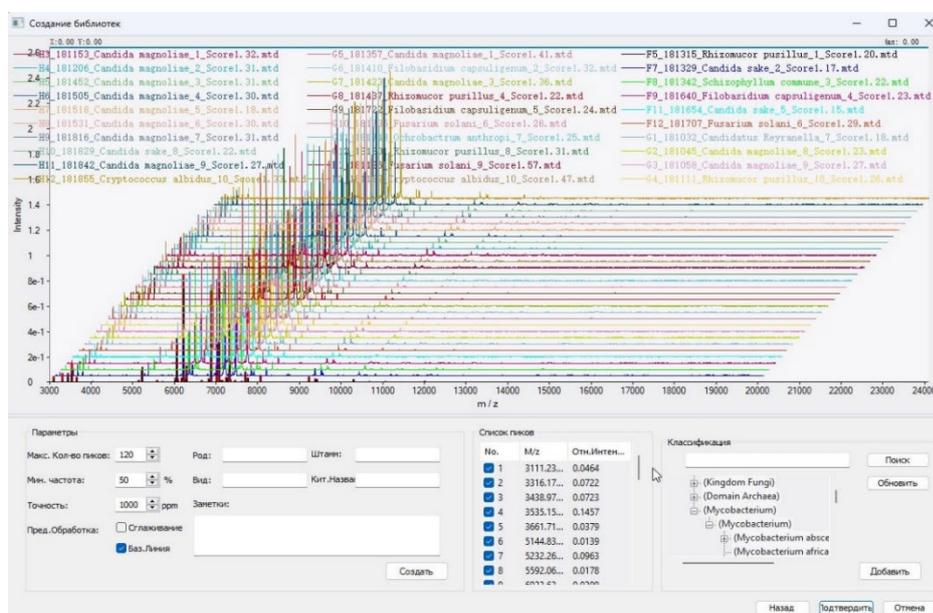


Рисунок 13 – Внесение в базу данных Microbe Analysis усредненного белкового спектра штамма

После внесения специально полученных, обработанных (усреднённых) масс-спектров в базу данных, была проведена контрольная идентификация штаммов. Полученный уровень достоверности ( $score \geq 2,0$ ) и «зеленая зона» свидетельствовали о том, что внесенные масс-спектры грибов гомологичных видов теперь имеют достоверную идентификацию. На рисунке 14 представлены результаты идентификации после внесения в базу данных.

report_145892								
Точка	Наименование	Код	Род	Вид	Штамм	Наименование	Оценка(3)	Оценка(100)
A1	1	M494-23Md	Debaryomyces	Nepalensis	ALG0014	Debaryomyces Nepalensis	2,73	97,30
A2	2	M494-23Md	Debaryomyces	Nepalensis	ALG0014	Debaryomyces Nepalensis	2,77	97,70
A3	1	M271-24Ef	Debaryomyces	Nepalensis	ALG0007	Debaryomyces Nepalensis	2,67	96,70
A4	2	M271-24Ef	Debaryomyces	Nepalensis	ALG0007	Debaryomyces Nepalensis	2,75	97,50
A5	1	M339-23Fc	Pseudozyma	Pruni	ALG0008	Pseudozyma Pruni	2,45	94,50
A6	2	M339-23Fc	Pseudozyma	Pruni	ALG0008	Pseudozyma Pruni	2,33	93,30
A7	1	M117-24Eq	Debaryomyces	Hansenii	ALG0005	Debaryomyces Hansenii	2,56	95,60
A8	2	M117-24Eq	Debaryomyces	Hansenii	ALG0005	Debaryomyces Hansenii	2,30	93,00
A9	1	M449-24Ps	Cryptococcus	Uniguttulatus	ALG0013	Cryptococcus Uniguttulatus	2,31	93,10
A10	2	M449-24Ps	Cryptococcus	Uniguttulatus	ALG0013	Cryptococcus Uniguttulatus	2,28	92,80
A11	1	P73-24Ps	Rhodotorula	Glutinis	ALG0016	Rhodotorula Glutinis	2,91	99,10
A12	2	P73-24Ps	Rhodotorula	Glutinis	ALG0016	Rhodotorula Glutinis	3,00	100,00
B1	1	M444-24Ps	Naganishia	Albida	ALG0011	Naganishia Albida	3,00	100,00
B2	2	M444-24Ps	Naganishia	Albida	ALG0011	Naganishia Albida	2,98	99,80
B3	1	8477-23Bov	Kazachstania	Aerobia	ALG0003	Kazachstania Aerobia	2,89	98,90
B4	2	8477-23Bov	Kazachstania	Aerobia	ALG0003	Kazachstania Aerobia	2,87	98,70
B5	1	M182-24Cf	Naganishia	Globosa	ALG0006	Naganishia Globosa	2,74	97,40
B6	2	M182-24Cf	Naganishia	Globosa	ALG0006	Naganishia Globosa	2,60	96,00
B7	1	M428-24Ps	Cystofilobasidium	Ferigula	ALG0009	Cystofilobasidium Ferigula	2,45	94,50
B8	2	M428-24Ps	Cystofilobasidium	Ferigula	ALG0009	Cystofilobasidium Ferigula	2,39	93,90
B9	1	M445-24Ps	Filobasidium	Oeirensis	ALG0012	Filobasidium Oeirensis	2,39	93,90
B10	2	M445-24Ps	Filobasidium	Oeirensis	ALG0012	Filobasidium Oeirensis	2,20	92,00
B11	1	M434-24Cf	Cutaneotrichosporon	Moniliiforme	ALG0010	Cutaneotrichosporon Moniliiforme	2,80	98,00
B12	2	M434-24Cf	Cutaneotrichosporon	Moniliiforme	ALG0010	Cutaneotrichosporon Moniliiforme	2,85	98,50
C1	1	4-24Bov	Cystobasidium	Pallidum	ALG0001	Cystobasidium Pallidum	2,80	98,00
C2	2	4-24Bov	Cystobasidium	Pallidum	ALG0001	Cystobasidium Pallidum	2,71	97,10
C3	1	6-24Owl	Kazachstania	Pintolopesii	ALG0002	Kazachstania Pintolopesii	2,72	97,20
C4	2	6-24Owl	Kazachstania	Pintolopesii	ALG0002	Kazachstania Pintolopesii	2,85	98,50
C5	1	M422-24	Filobasidium	magnum	ALG0017	Filobasidium magnum	2,45	94,50
C6	2	M422-25	Filobasidium	magnum	ALG0017	Filobasidium magnum	2,39	93,90
C7	1	M511-24Cf	Trichosporon	Aquatile	ALG0015	Trichosporon Aquatile	2,16	91,60
C8	2	M511-24Cf	Trichosporon	Aquatile	ALG0015	Trichosporon Aquatile	2,15	91,50
C9	1	Pch20/1-23	Kwoniella	pini	ALG0018	Kwoniella pini	2,60	96,00
C10	2	Pch20/1-24	Kwoniella	pini	ALG0018	Kwoniella pini	2,45	94,50
C11	1	M116-24Eq	Candida	Saitoana	ALG0004	Candida Saitoana	2,73	97,30
C12	2	M116-24Eq	Candida	Saitoana	ALG0004	Candida Saitoana	2,82	98,20

Рисунок 14 - Копия электронного отчета программы «Microbe Analysis версия 1.0.0.0». Идентификация штаммов с помощью MALDI-TOF MS после внесения в базу данных

Каждый штамм был внесен в базу данных MALDI-TOF Microbe Analysis под своим уникальным номером, который на рисунке 14 отображается в графе «Штаммы».

В дальнейшем эти данные позволят улучшить качество идентификации инфекционно-значимых дрожжевых грибов на российском масс-спектрометре

«АЛМАСС-Био 200» при проведении ветеринарных, а также медицинских диагностических исследований.

#### 4.3 Исследование видового состава дрожжевых оппортунистических грибов у ЖИВОТНЫХ

Дальнейшее изучение видового состава дрожжевых грибов-оппортунистов проводили с применением отработанного метода MALD-TOF MS.

Всего выделено 904 изолята дрожжевых грибов (59,6% от общего числа грибов). При этом от собак получено 611 изолятов (33,1% от всех исследований у собак), от кошек 140 (14,1%), от птиц 83 (42,3%), от грызунов и кроликов 9 случаев (15,6%), от холоднокровных 9 (34,6%) и от других видов животных 52 случаев (68,4%).

Идентифицировано 13 различных родов (*Candida*, *Malassezia*, *Aureobasidium*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Cryptococcus*, *Cutaneotrichosporon*, *Pseudozyma*, *Debaromyces*, *Kazachstania*, *Cystobasidium*, *Kwoniella*, *Naganisha*), среди которых доминируют *Malassezia* и *Candida*. На рисунке 15 представлено соотношение выделенных дрожжевых грибов.

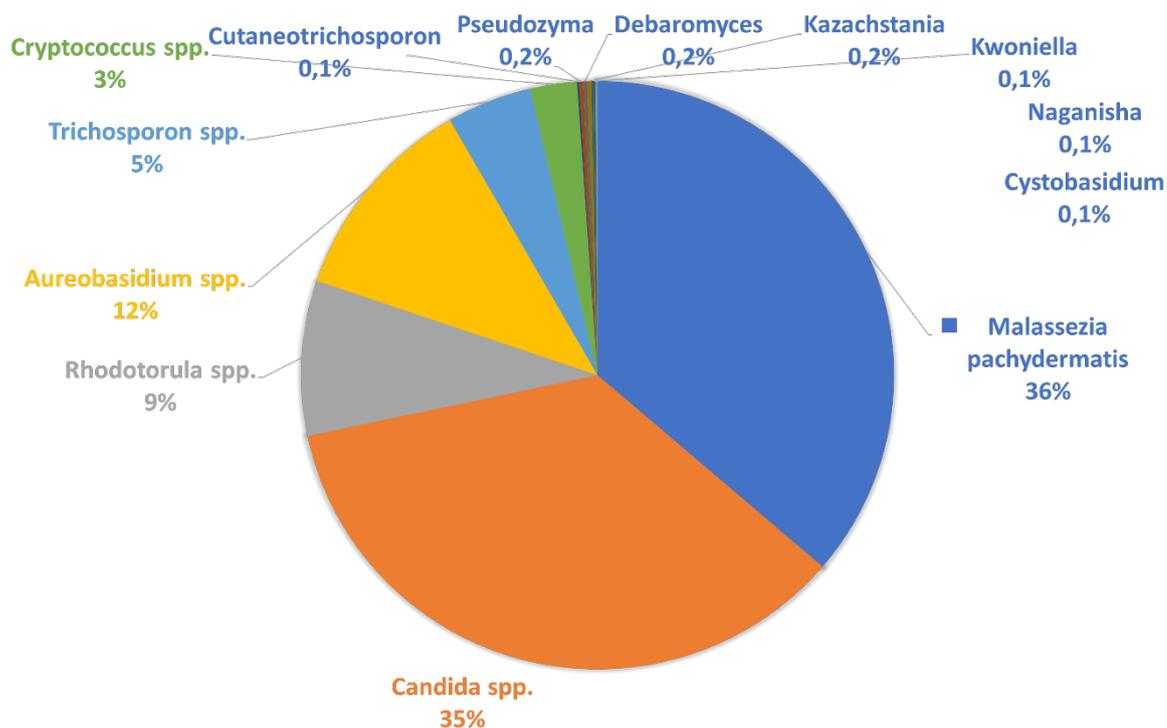


Рисунок 15 - Дрожжевые грибы, выделенные от животных

Грибы рода *Malassezia* у исследованных видов животных представлены одним видом – *M. pachydermatis*. Всего выделено 328 изолятов (36,2% от всех дрожжевых грибов), в том числе у собак - 293 изолята (15,9% от общего числа дрожжевых грибов у собак), у кошек -34 (3,4%) и единичный случай у птицы- от попугая с перьевого покрова (0,5%). Локусом выделения являлись кожные покровы животных, а также смывы из наружного и среднего уха. Более подробная информация о локусах выделения *M. pachydermatis* представлена на рисунке 16.

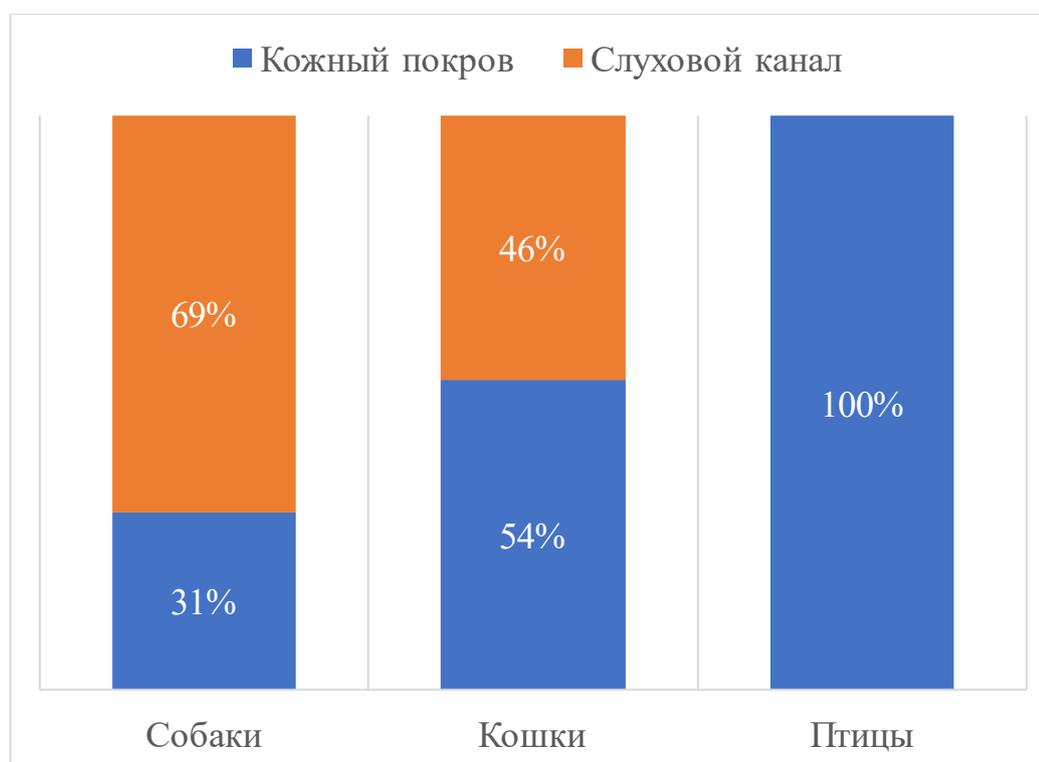


Рисунок 16 - Локусы выделения *M. pachydermatis* у разных видов животных

Чаще всего вид *M. pachydermatis* локализуется у собак в слуховых каналах (69%) при наружных отитах. Также *M. pachydermatis* выделен от собак с клиническими признаками дерматита (31%).

У кошек отмечено примерно равное соотношение выделенных грибов *M. pachydermatis* при наружных отитах и дерматитах (46% и 54% соответственно).

Культивирование грибов рода *Malassezia* проводили при 36°C в течение 24-48 часов на среде Сабуро, однако иногда наблюдали рост спустя 72 часа, с формированием выпуклых, кремовых, матовых колони, мягкой консистенцией и ровными краями, с диаметром 2-4 мм.

При микроскопии наблюдали клетки овоидной формы, размер 3,0-6,5x2,5 мкм., клетки имели монополярное почкование – дочерняя отпочковывается от материнской в одной определенной точке и это придает клеткам форму «отпечатка стопы».

Было выделено 320 изолятов грибов рода *Candida* (35,3% от всех дрожжевых грибов), при этом они встречались у всех видов животных. У собак выделено 160 изолятов (26,2% от общего числа дрожжевых грибов у собак), у кошек 55 изолятов (39,3%), у грызунов и кроликов 7 (77,8%), у холоднокровных 2 (22,2%), у птиц 56 (67,5%) и других животных 40 (78,4%).

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод о том, что грибы рода *Candida* доминируют у всех видов животных кроме собак (у которых доминирует вид *M. pachydermatis*).

Установлено высокое видовое разнообразие грибов рода *Candida* - идентифицировано 16 различных видов, среди которых доминирует *C. albicans* – 139 идентификаций (43,4%). Виды *Candida non-albicans* представлены 15 различными видами: *C. guilliermondii* (12,5%), *C. famata* (11,3%), *C. parapsilosis* (11,3%), *C. zeylanoides* (4,7%), *C. krusei* (4,4%), *C. catenulata* (3,1%), *C. lipolytica* (3,1%), *C. tropicalis* (1,6%), *C. lusitaniae* (1,3%), *C. rugosa* (0,9%), *C. dubliniensis* (0,9%), *C. peltata* (0,6%), *C. membranifaciens* (0,3%), *C. doubushaemulonii* (0,3%), *C. saitoana* (0,3%).

Таблица 11 – Перечень видов рода *Candida*, выделенных от животных

Вид	Количество изолятов, n	Собаки	кошки	птицы	грызуны и кролики	холодно-кровные	другие животные
<i>C.albicans</i>	139	88	30	18	3	-	-
<i>C.guilliermondii</i>	40	18	12	3	1	-	6
<i>C.famata</i>	36	15	3	9	2	-	7
<i>C.parapsilosis</i>	36	21	5	4	-	-	6
<i>C.zevlanoides</i>	15	8	-	2	-	-	5
<i>C.krusei</i>	14	7	2	4	-	-	1
<i>C.catenulata</i>	10	1	2	4	1	-	2
<i>C.lipolytica</i>	10	-	-	7	-	-	3
<i>C.tropicalis</i>	5	2	1	-	-	1	1
<i>C.lusitaniae</i>	4	-	-	-	-	-	4
<i>C.rugosa</i>	3	-	-	3	-	-	-

Продолжение таблицы 11

Вид	Количество изолятов, n	собаки	кошки	птицы	грызуны и кролики	холодно-кровные	другие животные
<i>C. dubliniensis</i>	3	-	-	2	-	-	1
<i>C. peltata</i>	2	-	-	-	-	-	2
<i>C. membranifaciens</i>	1	-	-	-	-	-	1
<i>C. doubushaemulonii</i>	1	-	-	-	-	1	-
<i>C. saitoana</i>	1	-	-	-	-	-	1
Всего выделено изолятов	320	160	55	56	7	2	40

В таблице 11 представлены данные по встречаемости различных видов грибов рода *Candida* среди животных. Из приведенных данных видно, что самым распространенным видом *Candida non-albicans* является *C. guilliermondii* (12,5%), при этом он преобладает у кошек (12 изолятов). Следующими по распространенности являлись *C. famata* и *C. parapsilosis* (по 11,3%). При этом *C. guilliermondii* и *C. famata* выделены от всех видов животных, кроме холоднокровных, а *C. parapsilosis* является доминирующим видом *Candida non-albicans* у собак (21 изолят), но не встречается у холоднокровных животных, грызунов и кроликов. Вид *C. catenulata* был выделен также от всех животных, кроме холоднокровных. У птиц и других видов животных доминирующим видом *Candida non-albicans* является *C. famata* (9 и 7 изолятов соответственно). Вид *C. lusitaniae* был выделен только от пчел и теленка (группа «другие виды животных»), *C. rugosa* только от птиц.

Также были единичные идентификации других видов *Candida non-albicans* – *C. peltata* (2) от пчел, *C. membranifaciens* и *C. saitoana* от лошадей из бронхоальвеолярного лаважа и *C. doubushaemulonii* от змеи с кожными поражениями.

На рисунке 17 обобщены данные по частоте встречаемости видов рода *Candida* у животных.

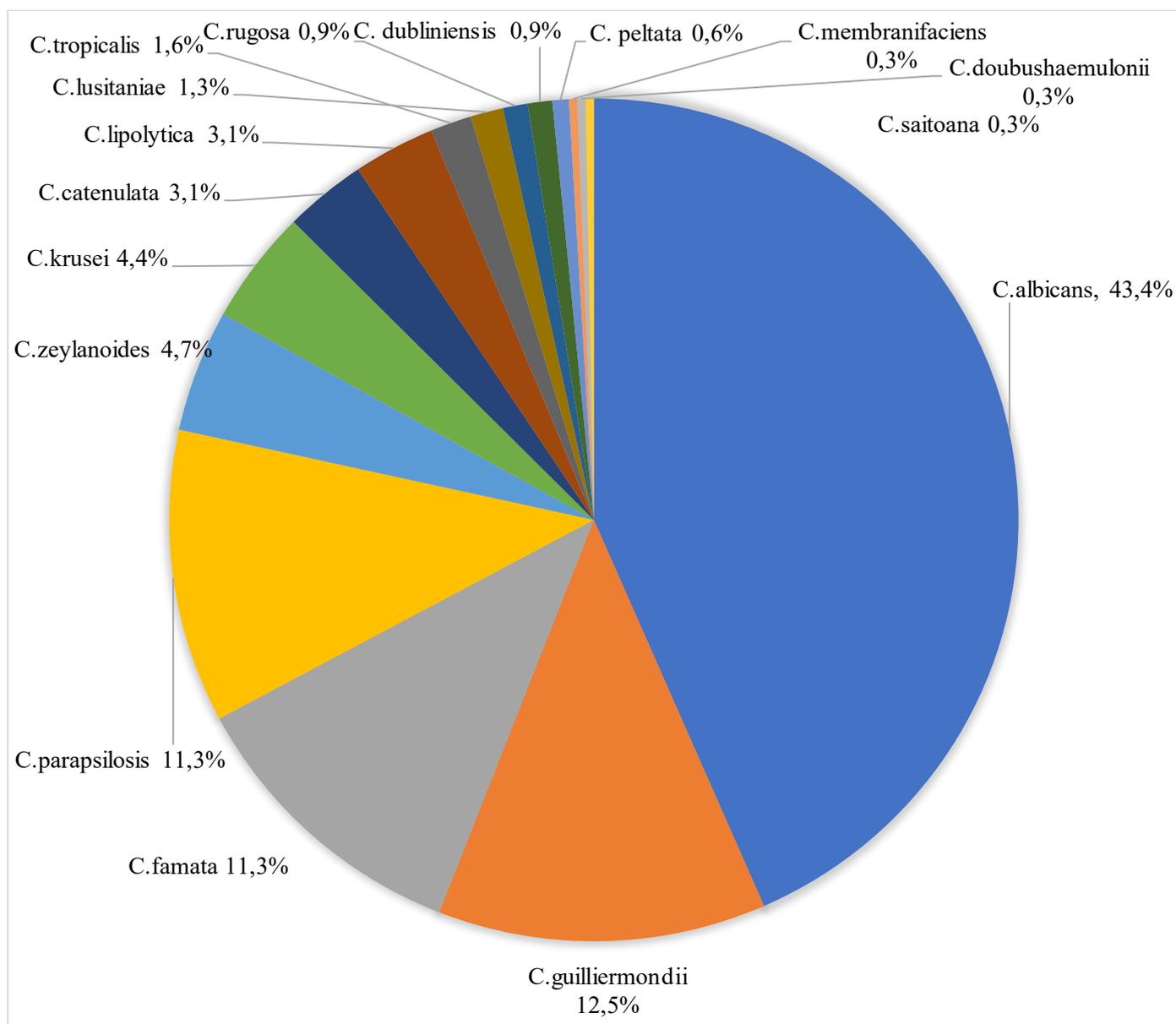


Рисунок 17 - Встречаемость видов рода *Candida* у животных

Грибы были выделены из различных локусов – кожные покровы, НСП, смывы со слизистых оболочек, внутренних органов павших животных, а также БАЛ, выпот, моча, фекалии и т.д.

Морфология колоний и микроскопия грибов рода *Candida* может варьировать в зависимости от вида. В таблице 12 представлены особенности морфологии и микроскопии выделенных нами видов.

Таблица 12 - Морфология колоний и микроскопия различных видов грибов рода *Candida*, выделенных от животных

Вид	Морфология колоний на среде Сабуро	Микроморфология, увеличение x400
<i>C. albicans</i>	Цвет от белого до кремового, гладкие или слегка морщинистые, может появиться мицелиальный край	Почкующиеся бластоконидии от сферических до субсферических, могут встречаться гифы псевдомицелия
<i>C. guilliermondii</i>	Цвет от кремового до желто-бежевого, мелкие и влажные	Почкующиеся бластоконидии, шаровидные или яйцевидные
<i>C. famata</i>	Цвет от серовато-белого до желтоватого, от тусклого до блестящего, гладкие или морщинистые	Мелкие, почкующиеся, сферические клетки
<i>C. parapsilosis</i>	Мелкие, от белых до кремовых и желтых, гладкие или морщинистые	Мелкие, почкующиеся бластоконидии, шаровидные или яйцевидные, могут присутствовать крупные, удлинённые формы
<i>C. zeylanoides</i>	Кремового цвета, гладкие, блестящие, выпуклые	Почкующиеся, мелкие бластоконидии, шаровидные или яйцевидные
<i>C. krusei</i>	Сухие и тусклые, часто линзовидные, распластанные	Удлиненные бластоконидии в виде "длиннозерного риса", обильно-ветвящиеся псевдогифы
<i>C. catenulata</i>	Цвет от белого до кремового цвета, гладкие или морщинистые, матовые	Почкующиеся бластоконидии от яйцевидной до цилиндрической формы
<i>C. lipolytica</i>	Округлые, выпуклые, матовые колонии кремового цвета, край реснитчатый, к периферии становится прозрачным, текстура вязкая, плотная	Сферические, почкующиеся клетки могут наблюдаться ветвящиеся настоящие гифы с редкими бластоконидиями

Продолжение таблицы 12

Вид	Морфология колоний на среде Сабуро	Микроморфология, увеличение x400
<i>C. tropicalis</i>	Мелкие, гладкие или морщинистые, тусклые	Почкующиеся бластоконидии от сферических до субсферических, большое количество гиф псевдомицелия в виде длинных, редко ветвящихся элементов
<i>C. lusitaniae</i>	Цвет от белого до кремового, мелкие, гладкие, блестящие	Почкующиеся бластоконидии, шаровидные или яйцевидные
<i>C. rugosa</i>	Цвет от белого до кремового цвета, гладкие, блестящие	Почкующиеся бластоконидии от эллипсоидных до удлинённых, иногда образуются короткие псевдогифы
<i>C. dubliniensis</i>	Цвет от белого до кремового цвета, гладкие, блестящие	Почкующиеся бластоконидии от сферических до субсферических, образуются хламидоспоры
<i>C. peltata</i>	Цвет от белого до кремового цвета, гладкие, блестящие	Почкующиеся бластоконидии от эллипсоидных до удлинённых
<i>C. membranifaciens</i>	Звездчатый край, белый цвет, в центре округлое возвышение, есть радиальная складчатость	Почкующиеся бластоконидии от сферических до субсферических и овоидных
<i>C. doubushaemulonii</i>	Цвет от белого до кремового цвета, гладкие, блестящие	Почкующиеся бластоконидии, овоидные или шаровидные
<i>C. saitoana</i>	Цвет от кремового-белого до светло-бежевого цвета, выпуклые, блестящие с ровным краем	Почкующиеся бластоконидии сферической формы

Некоторые морфологические признаки и особенности микроскопии позволяют провести дифференциальную диагностику до уровня вида. Так, например, *C. lipolytica* имеет характерную морфологию и текстуру колоний (рис.

18), при микроскопии *C. krusei* можно обнаружить удлиненные клетки (рис. 19), колонии *C. membranifaciens* образуют складчатость и имеют звездчатую форму (рис. 20).



Рисунок 18 - Колонии *C. lipolytica*, выделенные из уха собаки с отитом на агаре  
Сабуро, 72 часа

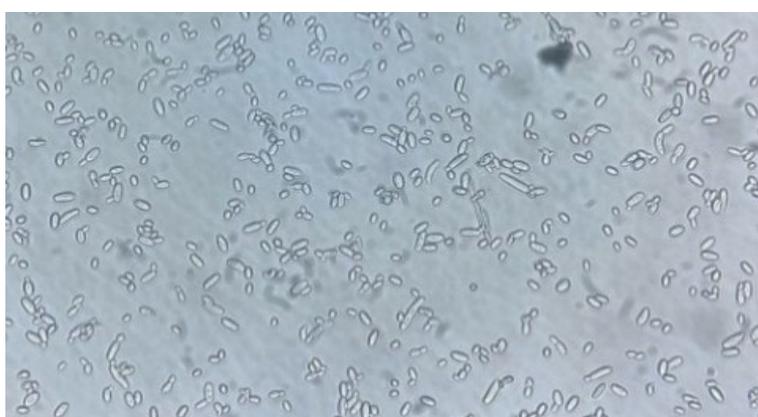


Рисунок 19 - Микроскопия *C. krusei* x400, клетки в виде «длиннозернового риса»



Рисунок 20 - Колонии *C. membranifaciens*, выделенные от лошади из носа на агаре  
Сабуро, 72 часа

Помимо грибов рода *Candida*, нами были идентифицированы представители других родов дрожжевых грибов - *Aureobasidium*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Cryptococcus*, *Cutaneotrichosporon*, *Pseudozyma*, *Debaromyces*, *Kazachstania*, *Cystobasidium*, *Kwoniella*, *Naganishia*.

Грибы рода *Aureobasidium* идентифицированы в 104 случаях (11,5% от всех дрожжевых грибов) и видовое разнообразие представлено только одним видом – *A. pullulans*. От собак выделено 73 изолята (11,9 % от дрожжевых грибов у собак), от кошек 22 изолята (15,7%), от грызунов и кроликов 1 изолят (11,1%), от птиц 6 изолятов (7,3%), от других животных 2 изолята (3,8%). У холоднокровных животных вид *A. pullulans* выделен не был.

Чаще всего гриб встречался у кошек и собак. Основным локусом были кожные покровы. Как правило *A. pullulans* выделяли от животных с клиническими признаками дерматитов и пиодермии.



Рисунок 21 - Изолят *A. pullulans*, выделенный от собаки с клиническими признаками атопического дерматита на среде Сабуро, 7 суток

На рисунке 21 представлена характерная особенность данного вида – черный пигмент, который со временем образуется в культуре. Это происходит в процессе формирования хламидоспор. Из-за образования черного пигмента меланина гриб относится к группе «черных» дрожжей. Этот вид является одним из возбудителей феогифомикозов у человека и животных. Полное формирование колоний происходило на 7-8 сутки. Диаметр колоний был от 1 до 4 см после 7 суток

инкубации на агаре Сабуро, цвет от бледно-розового до пигментированного черного, колонии матовые, плоские, имели неровный край.

Для колоний *A. pullulans* оптимальной температурой роста является +25-30°C, причем на морфологию колоний может влиять множество факторов, например, возраст колонии, температура, субстрат.

При микроскопии колоний, выросших на агаре Сабуро при +28 °С, наблюдали дрожжевые клетки (бластоконидии), по мере формирования колонии становились видны септированные гифы, сначала гиалиновые, затем темно-бурые, толстостенные. На рисунке 22 представлена микроскопия 4-х суточной культуры *A. pullulans*.

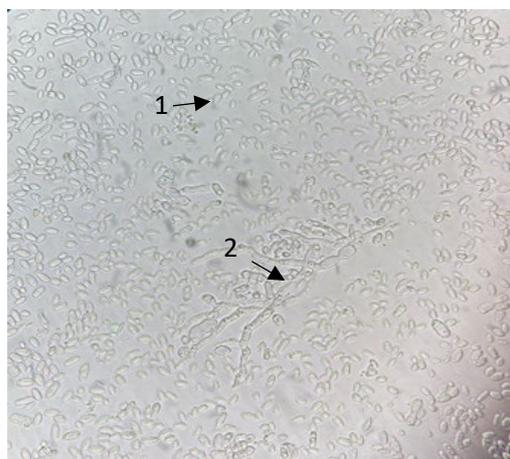


Рисунок 22 - Микроскопия *A. pullulans*, увеличение x400 (1- бластоконидии, 2- гиалиновая гифа мицелия)

Помимо кожных покровов *A. pullulans* был выделен из наружных слуховых проходов (у собак и кошек), носовых ходов (у кошки при гнойном рините), ректальных смывов (у собак) и фекалий (у птиц).

Грибы рода *Rhodotorula* идентифицированы в 77 случаях (8,4% от общего числа дрожжевых грибов) и представлены двумя различными видами – доминирующий вид *R. mucilaginosa* (выделено 73 изолята) и *R. glutinis* (4 изолята). При этом все изоляты *R. glutinis* выделены от попугаев из зоба, зева и респираторного тракта. У собак грибы рода *Rhodotorula* идентифицированы в 58 случаях (9,5% от дрожжевых грибов у собак), у кошек в 13 случаях (9,2%), 1 случай

у кролика (11,1%), 5 случаев у птиц (6,1%). У других видов животных и холоднокровных грибы этого рода идентифицированы не были.

По морфологии грибы рода *Rhodotorula* имели характерную черту – это яркая окраска розового, красного или оранжевого цвета, колонии гладкие, выпуклые, блестящие с ровными краями, иногда наблюдался слизистый рост. На рисунках 23, 24 представлена морфология колоний грибов рода *Rhodotorula*.



Рисунок 23 - Колонии *R. glutinis*, выделенные из респираторного смыва попугая на среде Сабуро



Рисунок 24 - Колонии *R. mucilaginosa*, выделенные из респираторного смыва попугая на среде Сабуро

При микроскопии наблюдали крупные, почкующиеся бластоконидии шаровидной формы, гиф мицелия и псевдомицелия не наблюдали.

Грибы рода *Trichosporon* выделены в 42 случаях (4,6% от общего числа дрожжевых грибов). В 14 случаях (2,3%) *Trichosporon spp.* выявлен у собак, в 7 случаях (5%) у кошек, также в 7 случаях (77,7%) у холоднокровных, в 8 случаях (6,1%) у птиц и в 6 случаев (11,5%) у других видов животных (2 лошади, коза, крыса, олень, корова).

Видовое разнообразие представлено четырьмя различными видами: *T. asahii* (39 изолятов), *T. japonicum*, *T. mucoides* и *T. aquatile* (по одному изоляту каждый). *T. japonicum* был выделен от собаки из свищевого канала, *T. mucoides* от змеи с кожными поражениями, а *T. aquatile* от собаки из наружного слухового прохода. Последний вид был идентифицирован в результате секвенирования по региону ITS.

В 25 случаях (60%) грибы рода *Trichosporon* выделены с кожных покровов, в остальных случаях - из различных локусов организма и биологических жидкостей (отделяемое раны, свищ, прямая кишка, НСП, фекалии, молоко).

Выделенные штаммы имели индивидуальные морфологические особенности на среде Сабуро. Некоторые колонии имели сильную мозговидную складчатость, некоторые были более гладкие, но как правило, со временем «морщинистая» структура колоний становилась более заметной. Цвет также варьировал от белого до кремово-желтого. Отличительные особенности макроморфологии различных видов грибов рода *Trichosporon* представлены на рисунках 25-27 [33].



Рисунок 25 – Морфология *T. asahii*, выделенного от змеи с кожными поражениями

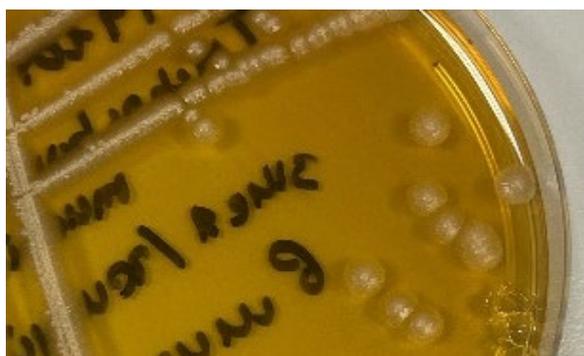


Рисунок 26 – Морфология *T. mucoides*, выделенного от змеи с кожными поражениями



Рисунок 27 – Морфология *T. japonicum*, выделенного из свища собаки

При микроскопии наблюдали гифы, которые распадались на прямоугольные артроконидии с закругленными концами размером примерно 3-4 x 4-7 мкм. Апрессории отсутствовали. На рисунке 28 представлена микроскопия колонии *T. asahii*.



Рисунок 28 - Микроскопия *T. asahii*, выделенного от кошки из отделяемого раны, увеличение x400. Красным выделены цепочки артроспор

Большая доля грибов рода *Trichosporon* выделена от холоднокровных (77,8% от всех дрожжевых грибов у холоднокровных), при этом все изоляты были выделены от змей с кожными поражениями.

Грибы рода *Cryptococcus* выделены в 23 случаях (2,5%), в том числе от собак 11 изолятов (1,8%), от кошек 7 изолятов (5%) и от птиц 5 изолятов (6,1%).

Всего выделено 6 различных видов – *C. albidus* (syn. *Naganishia albida*), *C. uniguttulatus* (syn. *Filobasidium uniguttulatum*), *C. liquefaciens* (syn. *Naganishia liquefaciens*), *C. ferigula* (syn. *Cystofilobasidium ferigula*), *C. oeirensis* (syn. *Filobasidium oeirensis*), *C. magnum* (syn. *Filobasidium magnum*). Следует отметить,

что таксономическое положение видов дрожжевых грибов, включая род *Cryptococcus*, в настоящее время активно пересматривается, в силу чего ряд видов, традиционно относимых к данному роду, были отнесены к другим таксонам и получили новые видовые названия – они представлены в скобках как синонимы.

Сводная информация об источниках выделения грибов рода *Cryptococcus* у животных представлена в таблице 13.

Таблица 13 – Источники выделения грибов рода *Cryptococcus*, выделенные от животных

№	Вид	Количество изолятов, n	Вид животного	Локус
1	<i>C. albidus</i>	5	собака	кожный покров
2	<i>C. albidus</i>	4	собака	НСП
3	<i>C. albidus</i>	2	собака	ректальный смыв
4	<i>C. albidus</i>	6	кот	кожный покров
5	<i>C. albidus</i>	1	попугай	клоака
6	<i>C. unigutulatus</i>	1	попугай	клоака
7	<i>C. liquefaciens</i>	1	кот	ректальный смыв
8	<i>C. ferigula</i>	1	попугай	зоб
9	<i>C. oeiensis</i>	1	попугай	зоб
10	<i>C. magnum</i>	1	попугай	клоака

Среди криптококков чаще всего встречается вид *C. albidus* (78,4%). Остальные виды представлены единичными идентификациями (каждый по 3,6%).

Основным локусом выделения являлся кожный покров (47,8%), помимо криптококки выделяли из наружного слухового прохода (17,5%), ректального смыва и клоаки (26%) и из зоба (8,7%).

По морфологии колоний и по микроскопии грибы рода *Cryptococcus* напоминают грибы рода *Candida*, но нередко колонии имеют матовый блеск и бледно-розовый цвет. На рисунке 29 представлена макроморфология *C. albidus*, выделенного от попугая из зева.



Рисунок 29 - Колонии *C. albidus*, выделенные от попугая из зева на агаре Сабуро

При микроскопии колоний наблюдали крупные почкующиеся бластоконидии шаровидной формы.

Кроме этого, выделено 10 изолятов других родов грибов: *Pseudozyma*, *Debaryomyces*, *Kazachstania*, *Cystobasidium*, *Kwoniella*, *Naganishia*, *Cutaneotrichosporon*. Данные о происхождении выделенных изолятов представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Редкие виды дрожжевых грибов, выделенные от животных

№	Вид	животное	локус
1	<i>Cutaneotrichosporon moniliiforme</i>	собака	отделяемое из глаза
2	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	слон	рана
3	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	муравьед	кожа
4	<i>Pseudozyma pruni</i>	кот	НСП
5	<i>Pseudozyma pruni</i>	кот	НСП
6	<i>Kazachstania aerobia</i>	корова	кожа
7	<i>Kazachstania pintolopesii</i>	сова	помет
8	<i>Naganishia globosa</i>	собака	рана
9	<i>Cystobasidium pallidum</i>	корова	молоко
10	<i>Kwoniella pini</i>	пчелы	смыв из улья

Всего идентифицировано 38 различных видов дрожжевых грибов (род *Malassezia* – 1 вид, *Candida* – 16 видов, *Aureobasidium* – 1 вид, *Rhodotorula* – 2 вида, *Trichosporon* – 4 вида, *Cryptococcus* – 6 видов и 8 видов единичных идентификаций других родов).

#### 4.4 Определение чувствительности дрожжевых грибов к противогрибковым препаратам

Чувствительность изолятов дрожжевых грибов к противогрибковым препаратам (кетоконазолу, клотримазолу, итраконазолу, флуконазолу, вориконазолу, нистатину и амфотерицину В) определяли диско-диффузионным методом по рекомендациям Института клинических и лабораторных стандартов США (CLSI) и согласно инструкциям производителя дисков.

Так как у грибов рода *Candida* (n=320) был выделен широкий видовой спектр, то для каждого вида была проведена оценка чувствительности к противогрибковым препаратам отдельно. Результаты представлены в таблицах 15 и 16.

Таблица 15 - Чувствительность распространенных видов грибов рода *Candida* к противогрибковым препаратам, n=300

Противогрибковый препарат	Чувствительность, %	<i>C.albicans</i>	<i>C.farmata</i>	<i>C.guilliermondii</i>	<i>C.parapsilosis</i>	<i>C.zeblanoides</i>	<i>C.krusei</i>	<i>C.catenulata</i>	<i>C.lipolytica</i>
Кетоконазол	S	67,1	72,9	63,4	87,2	95,6	12,4	13,6	21,2
	I	13,2	10,7	11	10,3	0	3,8	16,8	13,2
	R	19,7	16,4	25,6	2,5	4,4	83,8	69,6	65,6
Итраконазол	S	15,4	25,4	42,2	11,4	38,4	10,1	2,1	25,6
	I	11,2	3,7	1,4	12,5	10,1	11,5	2,5	12,6
	R	73,4	70,9	56,4	76,1	51,5	78,4	95,4	61,8
Клотримазол	S	71,2	73,2	12,1	72,8	91,1	17,2	31,5	11,2
	I	11,4	12,5	10,3	4,5	1,4	10,5	13,2	11,4
	R	17,4	14,3	77,6	22,7	7,5	72,3	55,3	77,4
Вориконазол	S	90,2	100	65,5	85,4	96,5	68,4	74,5	63,8
	I	2,3	0	13,3	11,9	0	11,3	7,2	12,3
	R	7,5	0	21,2	2,7	3,5	20,3	18,3	23,9
Нистатин	S	98,2	91,8	98,1	100	84,4	93,5	98,5	65,8
	I	0	0	0	0	0	0	0	0
	R	1,8	8,2	1,9	0	15,6	6,5	1,5	34,2
Амфотерицин В	S	89,4	32,6	13,3	10,2	42,9	10,1	2,5	7,1
	I	5,6	2,3	9,1	0	2,3	0	0	0
	R	5	65,1	77,6	89,8	54,8	89,9	97,5	92,9
Флуконазол	S	68,6	58,9	61,9	82,7	91,6	0	2,3	71,2
	I	12,3	14,5	12,3	0	0	0	0	0
	R	19,1	26,6	25,8	17,3	8,4	100	97,7	28,8

Обозначения: \* - R - устойчивый, I - дозозависимый, S – чувствительный

Таблица 16 - Чувствительность редко встречающихся видов грибов рода *Candida* к противогрибковым препаратам, n=20

Противогрибковый препарат	Чувствительность, %	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. lusitanae</i>	<i>C. rugosa</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. peltata</i>	<i>C. membranaefaciens</i>	<i>C. dubushaemulonii</i>	<i>C. saitoana</i>
Кетоконазол	S	40	100	33,3	50	0	100	100	100
	I	0	0	0	50	0	0	0	0
	R	60	0	66,7	0	100	0	0	0
Итраконазол	S	60	0	33,3	0	0	0	0	0
	I	0	0	0	0	0	0	0	0
	R	40	100	66,7	100	100	100	100	100
Клотримазол	S	0	0	100	0	50	0	0	0
	I	0	0	0	50	0	0	0	0
	R	100	100	0	50	50	100	100	100
Вориконазол	S	0	20	100	33,3	100	100	100	0
	I	0	20	0	33,3	0	0	0	0
	R	100	60	0	33,4	0	0	0	100
Нистатин	S	100	100	100	100	100	100	100	100
	I	0	0	0	0	0	0	0	0
	R	0	0	0	0	0	0	0	0
Амфотерицин В	S	0	0	0	0	0	0	0	0
	I	0	0	0	0	0	0	0	0
	R	100	100	100	100	100	100	100	100
Флуконазол	S	40	0	100	100	0	100	100	0
	I	20	0	0	0	0	0	0	0
	R	40	100	0	0	100	0	0	100

**Обозначения:** \* - *R* - устойчивый, *I* - дозозависимый, *S* - чувствительный

Чувствительность к противогрибковым препаратам значительно варьировала у разных видов рода *Candida*. Установлено, что 90,2% исследованных изолятов *C. albicans* являются чувствительными к вориконазолу, 89,4% чувствительны к амфотерицину В и в 92,2% к нистатину. При этом только 15,4% чувствительны к итраконазолу. К остальным препаратам чувствительность варьировала от 60% до 70%.

Стоит отметить, что 100% исследованных изолятов *C. famata* чувствительны к вориконазолу и 91,8% к нистатину. К итраконазолу чувствительно наименьшее количество изолятов - 25,4%. При этом 98,1% изолятов *C. guilliermondii*

чувствительны к нистатину и только 12,1% и 13,3% к клотримазолу и амфотерицину В, соответственно.

Чувствительность изолятов *C. parapsilosis* к кетоконазолу составила 87,2%, к вориконазолу 85,4%, к нистатину 100%, к флуконазолу 82,7%. Наименьшее количество чувствительных изолятов к итраконазолу – 11,4% и к амфотерицину В – 10,2%.

В отношении *C. zeylanoides* большинство препаратов имели высокую эффективность (более 80%), кроме итраконазола – 38,4% и амфотерицина В – 42,9%. В отношении *C. krusei* наоборот, большинство препаратов имели низкую эффективность (менее 20%), кроме нистатина – 93,5% и вориконазола – 68,4%.

Наибольшее количество изолятов *C. catenulata* чувствительно к нистатину – 98,5% и вориконазолу 74,5%. К остальным препаратам чувствительность изолятов менее 20%. К изолятам *C. lipolytica* большую эффективность проявил флуконазол – 71,2%.

У штаммов распространенных видов рода *Candida* отмечена высокая устойчивость к итраконазолу и амфотерицину В. У редких видов наблюдается схожая тенденция – высокая чувствительность к нистатину и вориконазолу, и резистентность к итраконазолу и амфотерицину В.

Данные по определению чувствительности к противогрибковым препаратам грибов рода *Candida* обобщены на рис. 30.

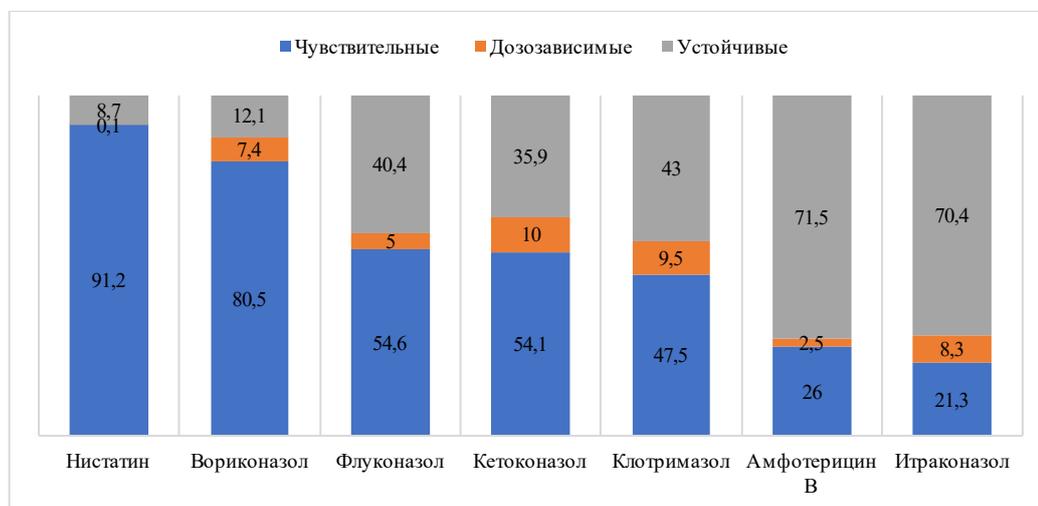


Рисунок 30 - Чувствительность грибов рода *Candida* к противогрибковым препаратам (%),  $n=320$ )

Наибольшей эффективностью в отношении *Candida spp.* обладали нистатин (91,2% изолятов) и вориконазол (80,5%). Флуконазол и кетоконазол по эффективности были практически одинаковы и подавляли 54% изолятов. Наименьшей эффективностью обладали амфотерицин В - 26% и итраконазол. - 21,2% чувствительных изолятов.

Результаты определения чувствительности грибов рода *Malassezia* (n=328), *Aureobasidium* (n=104), *Rhodotorula* (n=77), *Trichosporon* (n=43) *Cryptococcus* (n=23) представлены на рисунках 31-35.

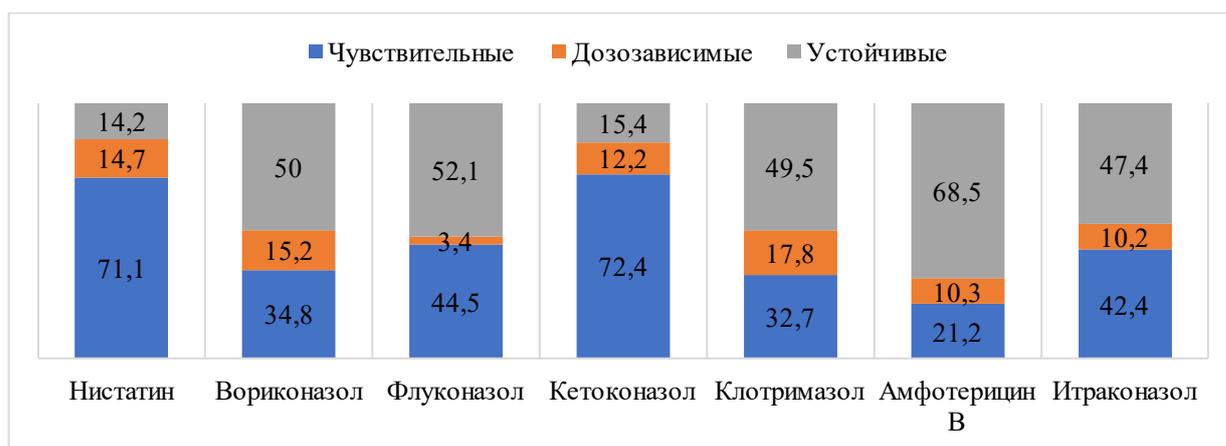


Рисунок 31 - Чувствительность к противогрибковым препаратам *Malassezia pachydermatis*, (% , n=328)

Наиболее широким спектром в отношении изолятов *Malassezia* обладали нистатин (71,1%) и кетоконазол, наименьшим – амфотерицин В (21,2%), клотримазол (32,7%), вориконазол (34,8%).

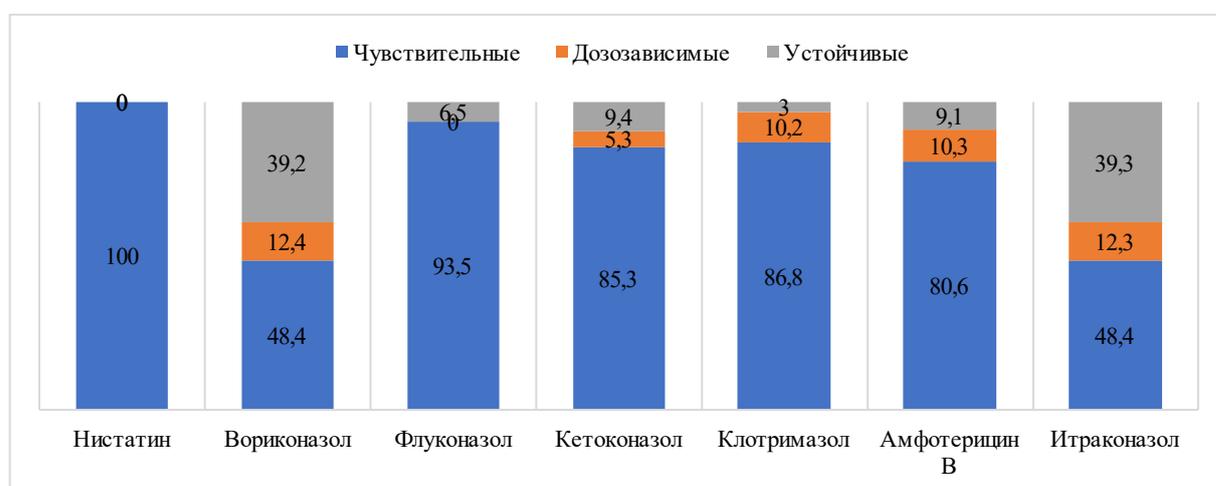


Рисунок 32 - Чувствительность к противогрибковым препаратам грибов *Aureobasidium pullulans*, (% , n=104)

В отношении изолятов видов *A. pullulans* наибольшую эффективность проявили нистатин (100%), флуконазол (93,5%), клотримазол (86,8%) и кетоконазол (85,3%). Примечательно, что амфотерицин В проявил высокую эффективность только в отношении грибов рода *Aureobasidium* (80,6%). Наименьшую эффективность проявили итраконазол и вориконозол (по 48,4%).

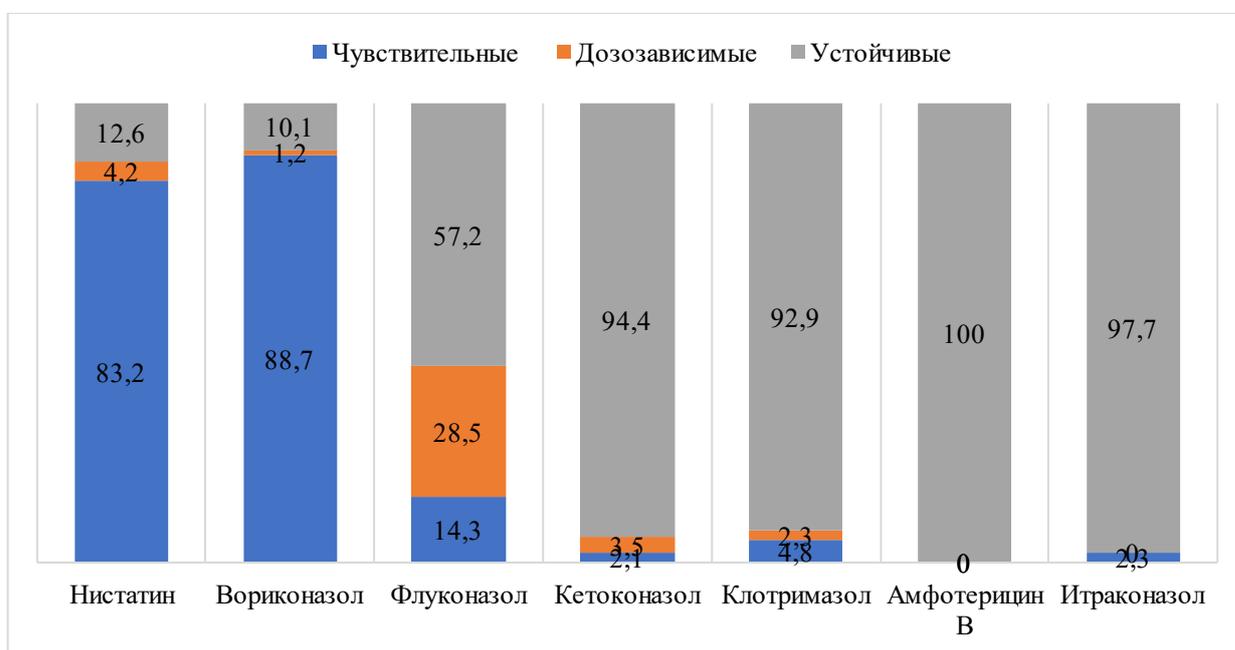


Рисунок 33 - Чувствительность к противогрибковым препаратам грибов рода *Trichosporon*, (% , n=42)

Для грибов рода *Trichosporon* так же, как и для грибов рода *Rhodotorula*, наибольшую эффективность проявили нистатин (83,2%) и вориконозол (88,7%). Эффективность остальных препаратов составила менее 15%, при этом амфотерицин В не эффективен вообще (0%).

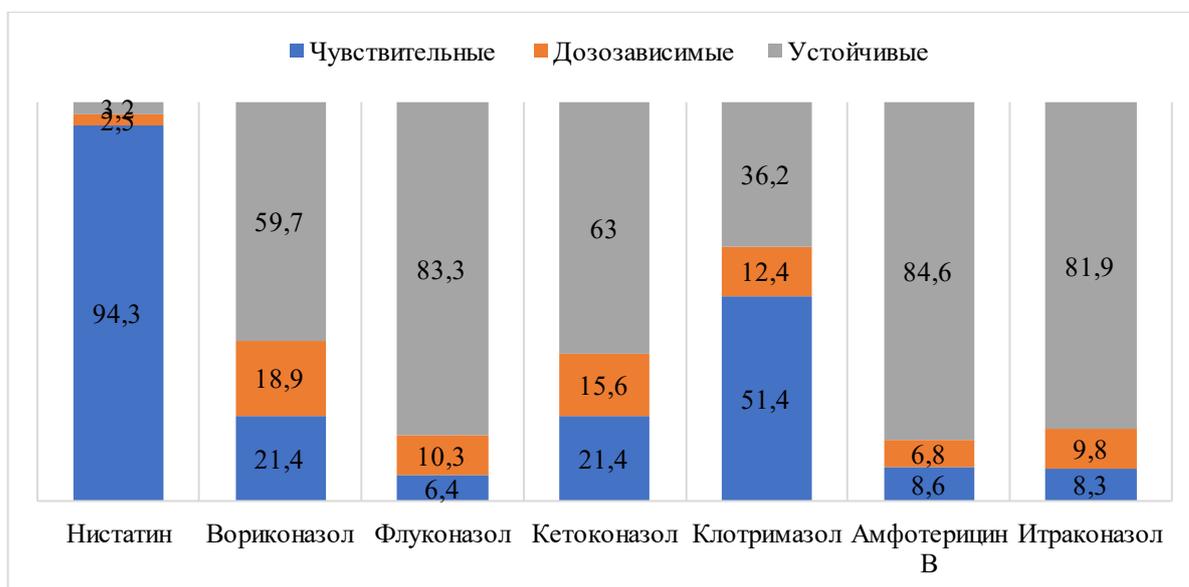


Рисунок 34 - Чувствительность к противогрибковым препаратам грибов рода *Cryptococcus*, (% , n=23)

Для грибов рода *Cryptococcus* наибольшую эффективность проявил нистатин (94,3%), а также клотримазол (51,4%). Эффективность остальных препаратов была менее 25%.

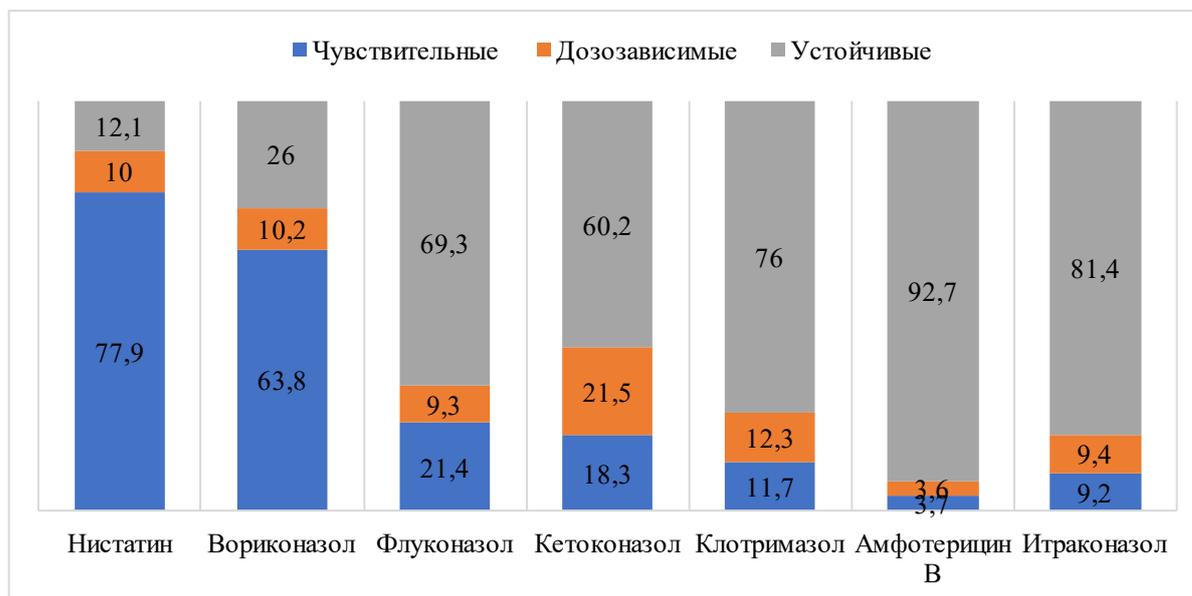


Рисунок 35 - Чувствительность к противогрибковым препаратам грибов рода *Rhodotorula*, (% , n=77)

Для грибов рода *Rhodotorula* наиболее широким спектром обладали нистатин (77,9%) и вориконазол (63,8%). Эффективность остальных препаратов составила менее 25%.



Рисунок 36 –Полирезистентный штамм *R. mucilaginosa*, чувствительный лишь к одному из 7 антимикотиков

Можно сделать вывод о том, что эффективность нистатина для всех представленных родов составила более 70%, а для рода *Aureobasidium* 100%. В свою очередь амфотерицин В проявил наименьшую эффективность из всех препаратов – 21,3% в отношении грибов рода *Candida* 21,2% - в отношении *M. pachydermatis*, 8,6% в отношении *Cryptococcus spp.*, 3,7% в отношении *Rhodotorula spp.* и 0% в отношении *Trichosporon spp.*

Установлена высокая встречаемость полирезистентных штаммов (устойчивых к двум и более классам противогрибковых препаратов одновременно) (табл. 17). В целом среди дрожжевых грибов она варьировала в диапазоне от 24 до 93%, в зависимости от рода. Доля полирезистентных штаммов среди *Candida spp.* составила 43,1%; *M. pachydermatis* - 24,1%, *R. mucilaginosa* - 70,1%, *Trichosporon spp.* - 92,8%, *Cryptococcus spp.* - 69,5%. Среди представителей *A. pullulans* полирезистентных штаммов выявлено не было. В некоторых случаях встречались мультирезистентные штаммы, проявлявшие чувствительность лишь к 1 из 7 изученных антимикотиков. Чаще всего они встречались среди представителей родов *Trichosporon* и *Rhodotorula* (рис. 36).

Таблица 17 – Распространенность полирезистентных штаммов среди различных родов дрожжевых грибов

Род	Количество выделенных штаммов, n	Количество полирезистентных штаммов, n	% полирезистентных штаммов
<i>Candida</i>	320	138	43,1
<i>Malassezia</i>	328	79	24,1
<i>Rhodotorula</i>	77	54	70,1
<i>Trichosporon</i>	42	39	92,8
<i>Cryptococcus</i>	23	16	69,5

Таким образом, наиболее высокая доля полирезистентных штаммов обнаружена среди нетривиальных дрожжевых грибов родов *Rhodotorula*, *Trichosporon* и *Cryptococcus*, которые только недавно стали диагностироваться у животных на территории РФ.

#### 4.5 Определение минимальной ингибирующей концентрации

Для выделенных изолятов дрожжевых грибов родов *Candida*, *Malassezia*, *Aureobasidium*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* и *Cryptococcus* была определена МИК противогрибковых препаратов с помощью метода Е-тест. В таблицах 18-22, представленных ниже, приведены значения МИК (мкг/мл) для представителей дрожжевых грибов различных родов.

Таблица 18 – Минимальная ингибирующая концентрация противогрибковых препаратов для грибов рода *Candida*

№	Вид	Флуконазол, мкг/мл	Итраконазол, мкг/мл	Кетоконазол, мкг/мл	Амфотерицин В, мкг/мл
1	<i>Candida albicans</i>	0,512 (S)	0,032 (S)	0,008	0,128
2	<i>Candida albicans</i>	0,512 (S)	0,064 (S)	0,064	0,128
3	<i>Candida albicans</i>	>256 (R)	1 (R)	0,064	0,032
4	<i>Candida albicans</i>	>256 (R)	>32 (R)	32	1
5	<i>Candida albicans</i>	>256 (R)	0,128 (S)	>32	0,5
6	<i>Candida albicans</i>	>256 (R)	>32 (R)	0,032	0,256
7	<i>Candida albicans</i>	64 (R)	32 (R)	1	>32
8	<i>Candida albicans</i>	0,512 (S)	0,032 (S)	>32	0,128
9	<i>Candida catenulata</i>	>256 (R)	32 (R)	2	>32
10	<i>Candida duobushaemulonii</i>	32 (R)	1 (R)	16	>32
11	<i>Candida famata</i>	4 (I)	>32 (R)	0,128	0,064
12	<i>Candida famata</i>	8 (R)	>32 (R)	0,5	>32
13	<i>Candida famata</i>	16 (R)	>32 (R)	2	>32
14	<i>Candida guilliermondii</i>	32 (R)	>32 (R)	1	>32
15	<i>Candida guilliermondii</i>	128 (R)	>32 (R)	2	>32
16	<i>Candida guilliermondii</i>	32 (R)	>32 (R)	2	>32
17	<i>Candida guilliermondii</i>	8 (R)	>32 (R)	0,5	1
18	<i>Candida guilliermondii</i>	16 (R)	>32 (R)	1	>32
19	<i>Candida krusei</i>	32 (R)	2 (R)	2	>32
20	<i>Candida krusei</i>	256 (R)	>32 (R)	32	>32
21	<i>Candida lipolytica</i>	8 (R)	1 (R)	1	4
22	<i>Candida lipolytica</i>	16 (R)	>32 (R)	2	>32
23	<i>Candida membranifaciens</i>	32 (R)	>32 (R)	1	>32
24	<i>Candida parapsilosis</i>	2 (S)	0,064 (S)	0,128	0,5
25	<i>Candida parapsilosis</i>	4 (I)	1 (R)	0,5	>32
26	<i>Candida parapsilosis</i>	4 (I)	>32 (R)	1	4
27	<i>Candida parapsilosis</i>	2 (R)	0,25 (I)	0,25	>32
28	<i>Candida parapsilosis</i>	4 (I)	1 (R)	0,064	1
29	<i>Candida parapsilosis</i>	2 (S)	0,25 (I)	0,5	>32
30	<i>Candida parapsilosis</i>	>256 (R)	0,25 (I)	0,5	>32
31	<i>Candida tropicalis</i>	64 (R)	>32 (R)	16	>32
32	<i>Candida zeylanoides</i>	32 (R)	32 (R)	1	>32

Примечание\* - R - устойчивый, I - дозозависимый, S – чувствительный

У изолятов грибов рода *Candida* МИК кетоконазола варьировала в диапазоне 0,008-32 мкг/мл, у 2х изолятов МИК >32 мкг/мл. У большинства изолятов (75%, n=24) МИК не превышала 2 мкг/мл. Что касается амфотерицина В, то МИК для

большинства изолятов составила >32 мкг/мл, что говорит о нецелесообразности его применения для терапии кандидозов животных.

Таблица 19 – Минимальная ингибирующая концентрация противогрибковых препаратов для *A. pullulans*

№	Вид	Флуконазол, мкг/мл	Итраконазол, мкг/мл	Кетоконазол, мкг/мл	Амфотерицин В, мкг/мл
1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	>256 (R)	>32 (R)	1	4
2	<i>Aureobasidium pullulans</i>	2 (S)	2 (R)	0,256	4
3	<i>Aureobasidium pullulans</i>	2 (S)	0,128 (S)	1	>32
4	<i>Aureobasidium pullulans</i>	2 (S)	2 (R)	16	>32
5	<i>Aureobasidium pullulans</i>	2 (S)	0,128 (S)	1	2
6	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0,512 (S)	0,128 (S)	32	>32
7	<i>Aureobasidium pullulans</i>	2 (S)	2 (R)	0,5	>32
8	<i>Aureobasidium pullulans</i>	2 (S)	0,25 (I)	1	>32
9	<i>Aureobasidium pullulans</i>	2 (S)	0,25 (I)	1	2
10	<i>Aureobasidium pullulans</i>	2 (S)	>32 (R)	0,256	>32
11	<i>Aureobasidium pullulans</i>	2 (S)	>32 (R)	1	2
12	<i>Aureobasidium pullulans</i>	2 (S)	0,128 (S)	2	2
13	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0,512 (S)	0,128 (S)	16	4
14	<i>Aureobasidium pullulans</i>	2 (S)	0,128 (S)	1	4
15	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0,512(S)	0,128 (S)	1	4

**Примечание\*** - R - устойчивый, I - дозозависимый, S - чувствительный

Для большинства изолятов *A. pullulans*, МИК флуконазола не превышала 2 мкг/мл, и только в одном случае более 256 мкг/мл. МИК итраконазола в большинстве случаев составила 0,128 мкг/мл. МИК кетоконазола была в диапазоне 0,256 – 1,0 мкг/мл, и лишь у 3х изолятов – 16 мкг/мл и выше. МИК амфотерицина В для 60% изолятов варьировала от 2 до 4 мкг/мл, для остальных изолятов составила >32 мкг/мл.

Таблица 20 – Минимальная ингибирующая концентрация противогрибковых препаратов для грибов рода *Cryptococcus*

№	Вид	Флуконазол, мкг/мл	Итраконазол, мкг/мл	Кетоконазол, мкг/мл	Амфотерицин В, мкг/мл
1	<i>Cryptococcus albidus</i>	>256 (R)	>32 (R)	>32	2
2	<i>Cryptococcus albidus</i>	>256 (R)	>32 (R)	>32	1
4	<i>Cryptococcus albidus</i>	32 (R)	>32 (R)	2	>32
5	<i>Cryptococcus albidus</i>	2 (S)	0,128 (S)	0,064	1
6	<i>Cryptococcus albidus</i>	16 (R)	0,5 (I)	0,064	0,12
7	<i>Cryptococcus albidus</i>	4 (I)	2 (R)	0,128	>32
8	<i>Cryptococcus albidus</i>	64 (R)	>32 (R)	2	>32
9	<i>Cryptococcus albidus</i>	16 (R)	>32 (R)	0,256	>32

Продолжение таблицы 20

10	<i>Cryptococcus albidus</i>	>256 (R)	>32 (R)	8	>32
11	<i>Cryptococcus albidus</i>	>256 (R)	>32 (R)	4	>32
12	<i>Cryptococcus albidus</i>	4 (I)	0,5 (I)	0,64	>32
13	<i>Cryptococcus albidus</i>	64 (R)	>32 (R)	1	>32
14	<i>Cryptococcus albidus</i>	32 (R)	>32 (R)	0,5	>32
15	<i>Cryptococcus albidus</i>	32 (R)	>32 (R)	0,5	>32

**Примечание\*** - R - устойчивый, I - дозозависимый, S – чувствительный

Для большинства изолятов *Cryptococcus albidus* МИК флуконазола превышала 4 мкг/мл, что говорит об устойчивости к этому препарату. Для итраконазола также выявлена высокая резистентность; МИК кетоконазола варьировала от 0,128 мкг/мл до 8 мкг и только в двух случаях >32 мкг/мл; МИК амфотерицина В для большинства изолятов *C. albidus* (66,6%) составила >32 мкг/мл, что говорит о неэффективности препарата.

Таблица 21 – Минимальная ингибирующая концентрация противогрибковых препаратов для грибов рода *Trichosporon*

№	Вид	Флуконазол, мкг/мл	Итраконазол, мкг/мл	Кетоконазол, мкг/мл	Амфотерицин В, мкг/мл
1	<i>Trichosporon asahii</i>	16 (R)	8 (R)	2	16
2	<i>Trichosporon asahii</i>	32 (R)	>32 (R)	16	>32
3	<i>Trichosporon asahii</i>	16 (R)	>32 (R)	4	>32
4	<i>Trichosporon asahii</i>	4 (I)	>32 (R)	1	>32
5	<i>Trichosporon asahii</i>	16 (R)	>32 (R)	4	>32
6	<i>Trichosporon asahii</i>	4 (I)	0,128 (S)	2	16
7	<i>Trichosporon asahii</i>	4 (I)	16 (R)	4	>32
8	<i>Trichosporon asahii</i>	4 (I)	8 (R)	1	>32
9	<i>Trichosporon asahii</i>	16 (R)	32 (R)	16	>32
10	<i>Trichosporon asahii</i>	32 (R)	8 (R)	4	>32
11	<i>Trichosporon asahii</i>	16 (R)	>32 (R)	2	8
12	<i>Trichosporon asahii</i>	2 (S)	>32 (R)	1	16
13	<i>Trichosporon asahii</i>	2 (S)	>32 (R)	16	8
14	<i>Trichosporon japonicum</i>	16 (R)	>32 (R)	4	>32
15	<i>Trichosporon mucoides</i>	4 (I)	>32 (R)	1	>32

**Примечание:** \* - R - устойчивый, I - дозозависимый, S - чувствительный

Для изолятов грибов рода *Trichosporon* МИК кетоконазола была высокой и варьировала в диапазоне 1-16 мкг/мл, МИК амфотерицина В для большинства выделенных изолятов был >32 мкг/мл (60%), то есть препарат не эффективен против грибов рода *Trichosporon*.

Таблица 22 – Минимальная ингибирующая концентрация противогрибковых препаратов для грибов рода *Rhodotorula*

№	Вид	Флуконазол, мкг/мл	Итраконазол, мкг/мл	Кетоконазол, мкг/мл	Амфотерицин В, мкг/мл
1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	>256 (R)	>32 (R)	1	>32
2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	>256 (R)	2 (R)	0,128	2
3	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	64 (R)	2 (R)	>32	>32
4	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	>256 (R)	>32 (R)	>32	8
5	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	>256 (R)	>32 (R)	0,5	>32
6	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	4 (I)	0,128 (S)	1	2
7	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0,128 (S)	0,064 (I)	1	2
8	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0,128 (S)	>32 (R)	0,5	8
9	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0,128 (S)	2 (R)	0,128	>32
10	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	>256 (R)	2 (R)	>32	2
11	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	>256 (R)	4 (R)	>32	>32
12	<i>Rhodotorula glutinis</i>	64 (R)	0,064 (I)	0,128	8
13	<i>Rhodotorula glutinis</i>	4 (I)	2 (R)	0,5	2
14	<i>Rhodotorula glutinis</i>	16 (R)	>32 (R)	>32	8
15	<i>Rhodotorula glutinis</i>	16 (R)	>32 (R)	>32	>32

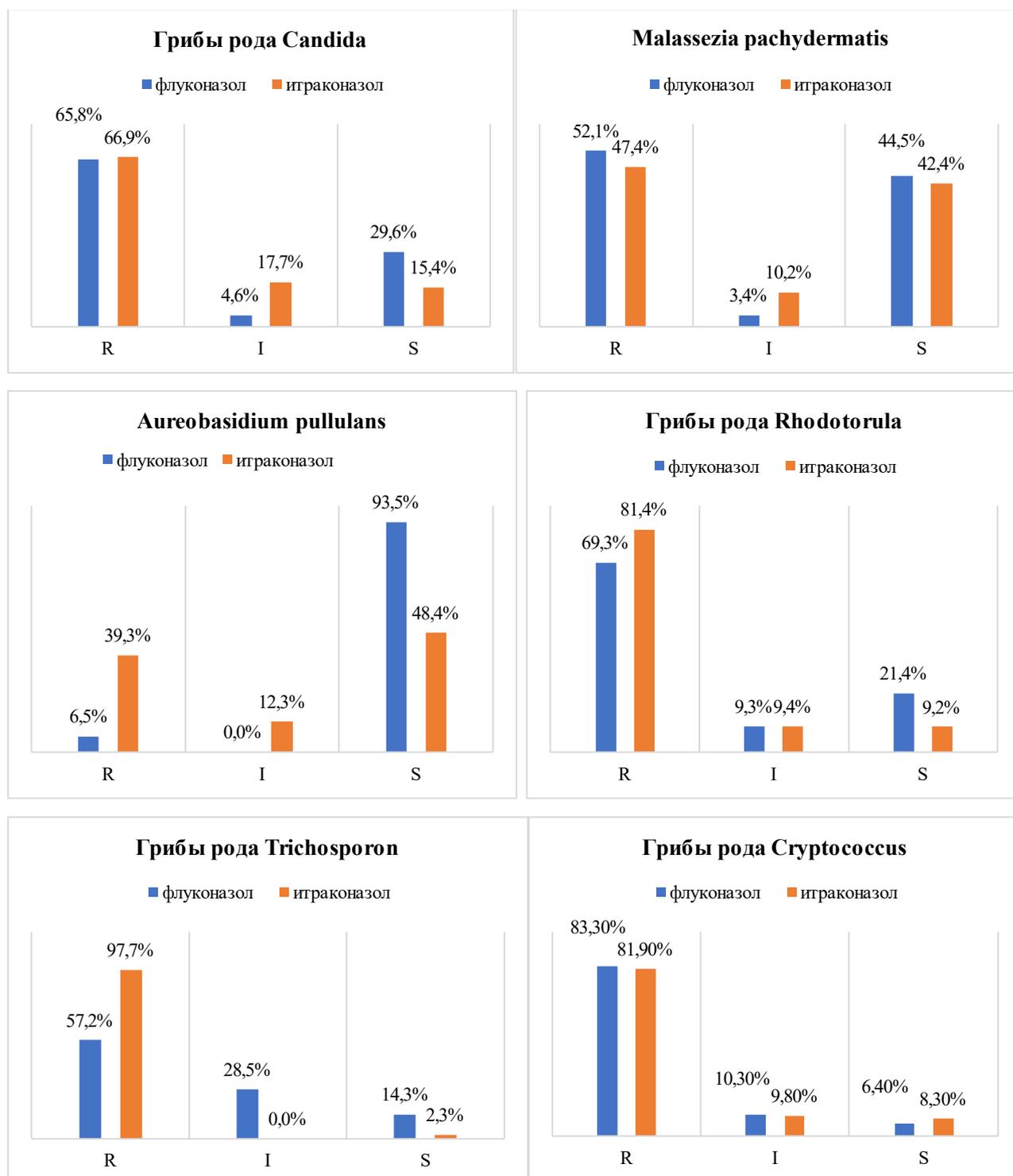
**Примечание:** \* - R - устойчивый, I - дозозависимый, S - чувствительный

Для изолятов грибов рода *Rhodotorula* МИК кетоконазола в 60% составила от 0,128 до 1 мкг/мл. В остальных случаях МИК превышала 32 мкг/мл. МИК для амфотерицина В варьировала в диапазоне от 2 до 8 мкг в 60%, в остальных превышала 32 мкг/мл.

Обобщенные данные по чувствительности дрожжей к итраконазолу и флуконазолу, которые наиболее широко применяются для терапии дрожжевых микозов, представлены на рисунке 37. Грибы рода *Candida* оказались чувствительны к флуконазолу в 29,6%, дозозависимыми в 4,6% и в 65,8% устойчивыми. Итраконазол проявил себя как менее эффективный препарат - чувствительных штаммов 15,4%, дозозависимых 17,7%, а устойчивых 66,9%. Для грибов рода *Malassezia* препараты оказались более эффективными, доля чувствительных штаммов составила 44,5% (для флуконазола) и 42,4% (для итраконазола), устойчивых - 52,1% и 47,4% соответственно, а 3,4% и 10,2% штаммов были дозозависимыми.

В отношении *A. pullulans* флуконазол проявил хорошую эффективность - 93,5% штаммов были чувствительны и 6,5% устойчивы. Итраконазол менее

эффективен – чувствительность составила 48,4%, устойчивость - 39,3%. Для грибов родов *Rhodotorula*, *Trichosporon* и *Cryptococcus* флуконазол и итраконазол являются неэффективными препаратами, их эффективность составила менее 20%.



Примечание: \* - R - устойчивый, I - дозозависимый, S – чувствительный

Рисунок 37 - Чувствительность разных родов дрожжевых грибов к итраконазолу и флуконазолу

Наибольшую эффективность флуконазол и итраконазол проявили в отношении грибов рода *Aureobasidium*, причем флуконазол был более эффективен. Для грибов рода *Candida* и *Malassezia* эффективность препаратов составила менее 50% и для грибов родов *Rhodotorula*, *Trichosporon* и *Cryptococcus* - менее 20%, что не позволяет рекомендовать их для эмпирической терапии.

#### 4.6 Изучение образования биопленок дрожжевыми грибами

Способность бактерий и грибов к образованию биопленок рассматривается как один из патогенетических факторов инфекционного заболевания и свидетельствует о патогенном потенциале микроорганизма. Исходя из этого была поставлена задача изучить биопленкообразование у дрожжевых грибов, выделенных от животных. В существующих исследованиях по биопленкам дрожжей основное внимание сконцентрировано на грибах вида *C. albicans*, в то время как другие виды рода *Candida*, а также другие роды инфекционно-значимых грибов (*Rhodotorula*, *Aureobasidium*, *Trichosporon* и др.) изучены в этом аспекте гораздо хуже. Способность образовывать биопленки может служить подтверждением патогенного потенциала для тех видов грибов, чья инфекционная значимость в настоящее время недооценивается или недостаточно изучена.

Биопленкообразование изучали у 10 видов и штаммов дрожжей: *Candida albicans* M40/2-22, *C. famata* M449, *C. famata* M43, *C. krusei* 431, *C. lipolytica* 2455, *C. parapsilosis* 2878, *C. guilliermondii* M456-22, *Rhodotorula mucilaginosa* M608-22, *Aureobasidium pullulans* M711-22, *Trichosporon asahii* M485-22.

На рисунке 38 представлены данные по интенсивности образования биопленок у изученных видов и штаммов, выраженные в единицах оптической плотности (OD).

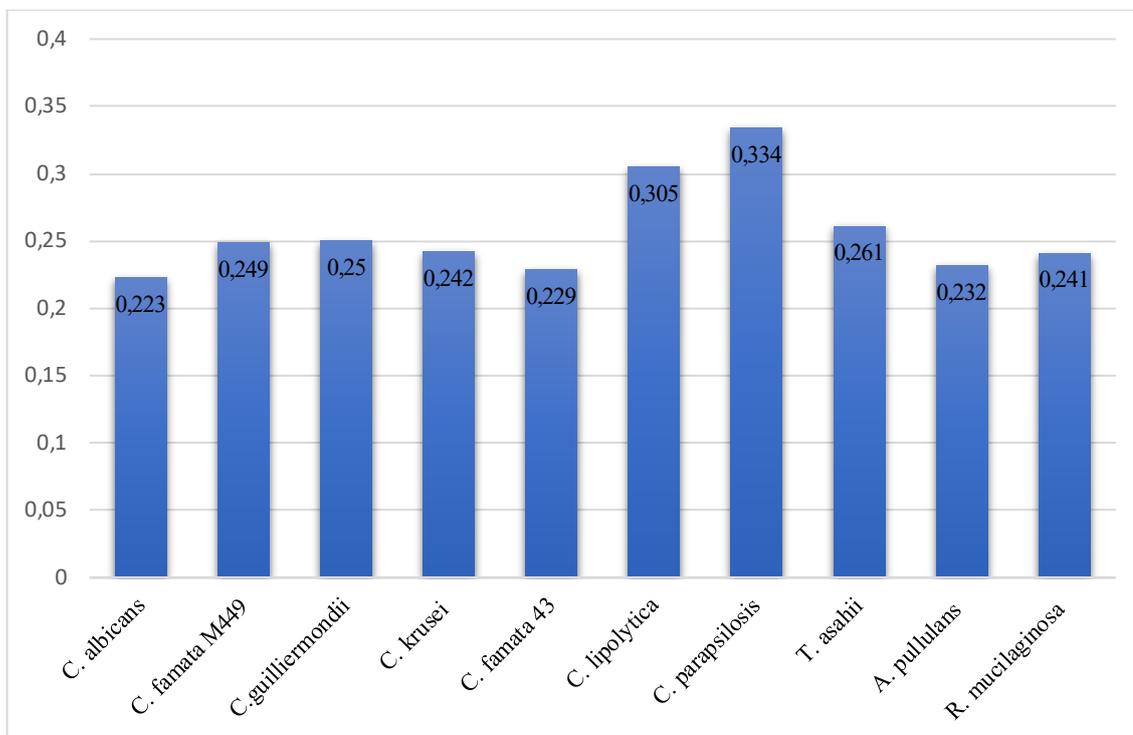


Рисунок 38 - Образование биопленок дрожжевыми грибами (в единицах оптической плотности, OD) [149]

Интенсивность биопленкообразования, выраженная в единицах оптической плотности, варьировала у грибов от 0,223 OD у *C. albicans* до 0,334 OD у *C. parapsilosis*. Клиническое значение *C. parapsilosis* в последние годы резко возросло – вид признан вторым по частоте встречаемости при инфекции кровотока. Инфекции, вызванные видом *C. parapsilosis* особенно поражают новорожденных и пациентов отделений интенсивной терапии. Одним из важнейших факторов вирулентности *C. parapsilosis* является образование биопленок, что позволяет грибу колонизировать медицинские устройства [152].

Также высокий уровень образования биопленок обнаружили у *C. lipolytica* (0,305 OD). Клиническое значение *C. lipolytica* не столь велико, однако данный вид встречается как возбудитель инфекций кровотока у лиц с ослабленным иммунитетом и часто вызывает системные инфекции, связанные с использованием внутривенного катетера. В исследовании Abbes S. et al отмечено, что биопленкообразование *C. lipolytica* было ниже (0,25 OD), чем у *C. albicans* (0,37 OD). Однако в наших исследованиях штамм *C. lipolytica* проявил высокий уровень образования биопленок – 0,30 ед.

Что касается других видов *Candida* (*C. famata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*), то они проявили биопленкообразование на уровне 0,22 – 0,26 OD, что сопоставимо с *C. albicans* (0,22 OD). При этом в исследованиях других авторов *C. albicans* доминирует над другими видами в образовании биопленок [44].

Виды *A. pullulans*, *T. asahii*, *R. mucilaginosa* наряду с видами *Candida*, активно образовывали биопленки, по интенсивности превосходя *C. albicans*. Литературные данные по биопленкообразованию у этих видов дрожжевых грибов довольно ограничены. О способности *A. pullulans* формировать биопленки сообщают Di Francesco, A. et al [76]. *T. asahii* также может формировать биопленки, причем они в 16000 раз более устойчивы к вориконазолу, нежели планктонные клетки [75]. Биопленкообразование обнаружено и у *R. mucilaginosa*, что соотносится с нашими результатами [93].

Таким образом, впервые получены данные по образованию биопленок для штаммов, выделенных от животных, т.к. в большинстве исследований изучаются штаммы, выделенные от человека. Особую новизну представляют данные относительно видов *A. pullulans*, *T. asahii*, *R. mucilaginosa*.

## 5. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Оппортунистические грибковые заболевания — это инфекции, вызываемые грибами-оппортунистами, которые в нормальных условиях не представляют угрозы, но могут проявить патогенные свойства при ослабленном иммунитете организма и других предрасполагающих факторах.

Оппортунистические микозы могут быть вызваны представителями различных родов грибов, таких как *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* и др. Грибы-оппортунисты имеют разный уровень вирулентности и могут поражать животных с ослабленным иммунитетом. Вызванные ими инфекции могут вызывать серьезные осложнения, включая системные микозы, которые трудно поддаются лечению и могут быть смертельными [116].

Оппортунистические грибковые патогены характеризуются широким видовым разнообразием, которое у животных изучено еще недостаточно.

Например, род *Candida* включает более 150 видов, из которых наиболее известным патогеном является *C. albicans*, часто вызывающим кандидозы у животных и людей, но виды *Candida non-albicans* также активно распространяются в качестве патогенов животных и человека. Выявление новых, нетривиальных видов патогенных грибов позволяет ветеринарам и микробиологам разрабатывать методы диагностики и лечения, специфичные для каждого вида.

Оппортунистические грибковые инфекции могут наносить значительный ущерб сельскому хозяйству и животноводству. Болезни, вызванные этими патогенами, снижают продуктивность животных, приводят к потере приплода и увеличению затрат на лечение. Например, *Aspergillus spp.* вызывает аспергиллез домашней птицы, что приводит к снижению яичной продуктивности и увеличению смертности. Следовательно, раннее выявление и лечение оппортунистических грибковых инфекций поможет снизить потери и повысить продуктивность животных [14]. Диагностические исследования помогают предотвратить и контролировать такие случаи, снижая риски для общественного здравоохранения.

Изучение оппортунистических инфекций позволяет разрабатывать и совершенствовать антимикробные препараты и методы лечения. Понимание механизмов патогенности и факторов вирулентности различных грибов помогает создавать более эффективные средства профилактики и терапии микозов, исследование фосфолипазной активности у различных видов *Candida* позволяет понять, какие из них обладают большей вирулентностью и представляют большую опасность для животных.

Полученные в процессе выполнения научно-исследовательской работы результаты позволяют судить о распространенности и видовом составе условно-патогенных, инфекционно-значимых грибов у животных.

Встречаемость инфекционно-значимых грибов у животных с признаками инфекционно-воспалительных заболеваний составила 47,3%, из них доля патогенных грибов-дерматофитов составила лишь 2,9%, доля грибов-оппортунистов – 44,4%. Грибы-оппортунисты были представлены мицелиальными

(«плесневыми») грибами (34,3% от общего числа грибов) и дрожжевыми грибами (59,6%).

Мицелиальные грибы чаще всего встречались у сельскохозяйственных животных (лошади, коровы, козы), грызунов и кроликов, реже – у животных-компаньонов и декоративных птиц. Наиболее распространены грибы родов *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*. По литературным данным, грибы рода *Aspergillus* поражают в основном птиц, реже, собак, кошек, лошадей, пчел, обезьян. Наиболее патогенным считается вид *A. fumigatus*, однако другие виды - *A. niger*; *A. flavus*, *A. terreus*, *A. nidulans* также способны вызывать инфекции [74].

Оппортунистические микозы, вызываемые плесневыми грибами, вызывают всё большую озабоченность в ветеринарной практике. Они являются не только потенциальными инфекантами, но и способны вызывать аллергические реакции у животных и человека, а также проявлять токсигенные свойства [108]. Важную профилактическую роль играет деконтаминация среды обитания животных, а также кормов, от спор плесневых грибов.

Учитывая, что среди грибов-оппортунистов доминировали дрожжевые грибы (59,6%), дальнейшие исследования были сфокусированы на этой группе, как наиболее значимой для ветеринарии.

В диагностической практике видовая идентификация дрожжевых грибов представляет собой сложную задачу, учитывая увеличивающееся видовое разнообразие. Традиционные методы, основанные на морфологических, биохимических и физиологических характеристиках, позволили нам определить до уровня вида лишь 15,4% дрожжевых грибов. По литературным данным стандартные биохимические методы способны идентифицировать лишь около 60% изолятов грибов, выделенных от животных [54].

Это подчёркивает необходимость внедрения современных инструментальных методов идентификации, среди которых наиболее перспективным является масс-спектрометрия MALDI-TOF. Данный метод демонстрирует высокую точность в идентификации дрожжевых грибов и уже успешно применяется в медицинской диагностике [122].

Нередко для видовой идентификации дрожжевых грибов используют полуавтоматические биохимические анализаторы, однако преимущества MALDI-TOF MS в идентификации дрожжевых грибов перед ними являются очевидными. Проведенные сравнительные исследования показали, что биохимические анализаторы часто допускают ошибки в определении видовой идентификации. Например, *Cryptococcus gattii* нередко ошибочно идентифицируется как *Cryptococcus neoformans* (анализатор Microscan), *Candida zeylanoides* как *Saccharomyces cerevisiae* (Phoenix Yeast ID, VITEK 2), *Candida nivariensis* как *Candida glabrata* (Microscan, VITEK 2, Phoenix Yeast ID), *Candida orthopsilosis* как *C. parapsilosis* (VITEK 2, Microscan), а *Candida tropicalis* как *Candida viswanathii* (Phoenix Yeast ID). MALDI-TOF MS позволяет избегать таких ошибок, обеспечивая более точную идентификацию [122]. Внедрение MALDI-TOF MS позволяет достоверно идентифицировать большинство дрожжевых грибов, что способствует корректной диагностике микозов.

Однако, при проведении исследований, мы столкнулись с тем, что часть изолятов от животных (8,4%) не удалось достоверно идентифицировать методом MALDI-TOF, т.к. в базе данных масс-спектрометра «АЛМАСС-Био 200» отсутствовали соответствующие виды. По литературным данным, данный метод позволяет правильно идентифицировать 89% изолятов грибов от животных при использовании стандартных баз данных производителя [54]. Это вызвало необходимость исследований по дополнению базы данных путем внесения масс-спектров новых видов грибов, выделенных от животных.

Для повышения точности идентификации дрожжевых грибов был проведен сравнительный анализ нескольких методов пробоподготовки: метод прямого нанесения образца на мишень, расширенный метод прямого нанесения и метод нанесения с экстракцией белков с использованием муравьиной кислоты и ацетонитрила. Установлено, что наиболее эффективным является расширенный метод пробоподготовки с экстракцией белков муравьиной кислотой и ацетонитрилом. При использовании расширенного метода пробоподготовки

качество полученных масс-спектров являлось наилучшим количеству масс-спектрометрических пиков и соотношению сигнал/шум.

Далее 18 неизвестных штаммов дрожжевых грибов были идентифицированы методом секвенирования по региону ITS, который на сегодня является референтным методом идентификации грибов [142;173]. Было идентифицировано 17 нетривиальных видов дрожжевых грибов родов *Candida*, *Rhodotorula*, *Naganishia*, *Trichosporon*, *Pseudozyma*, *Debaromyces*, *Kazachstania*, *Cystobasidium*, *Kwoniella*. Обнаружение этих грибов у животных представляет большой научный интерес, в связи с чем они были охарактеризованы по макро- и микроморфологическим, биохимическим свойствам, а также по чувствительности к противогрибковым препаратам, включая определение МИК. Полученные морфологические характеристики и биохимические профили можно будет использовать в дальнейшем для фенотипической идентификации данных видов.

Некоторые нетривиальные виды проявили полирезистентность к противогрибковым препаратам, в частности *Debaryomyces nepalensis*, *Candida famata* и *Cryptococcus albidus* устойчивы к 6 из 7 антимикотиков, *Kwoniella pini* к 5 из 7, *Candida saitoana* к 4 из 7.

При определении МИК было установлено, что 14 из 18 штаммов были устойчивы к флуконазолу и 17 из 18 штаммов были устойчивы к итраконазолу. Данные антимикотики азолового ряда не могут быть рекомендованы для терапии оппортунистических микозов, вызываемых нетривиальными дрожжевыми грибами.

При изучении фосфолипазной активности, она была обнаружена у 13 из 18 изученных штаммов. Фосфолипаза известна как один из факторов вирулентности у дрожжевых грибов наряду с протеазами и гемолизинами [44]. Отмечено, что высоким уровнем фосфолипазной активности обладают более инвазивные штаммы *Candida* spp. [114]. В наших исследованиях фосфолипазная активность была наиболее выражена у *Cryptococcus oeyrensis*, *Cryptococcus magnum* и *Cutaneotrichosporon moniliiforme*.

Наряду с наличием фосфолипазы (фактора вирулентности), патогенный потенциал нетривиальных дрожжевых грибов подтверждается клиническими случаями, описанными в медицинской и ветеринарной литературе [45; 101;123;126;131]. Пополнение базы данных российского масс-спектрометра «Алмасс-Био» нетривиальными видами грибов-оппортунистов повысит точность идентификации, а, следовательно, и диагностики оппортунистических грибковых инфекций как в ветеринарной, так и в медицинской практике.

Таким образом, нами была отработана идентификация изолятов грибов, выделенных от животных, методом MALDI-TOF на российском масс-спектрометре. Этот метод был использован в дальнейшей работе по изучению видового состава дрожжевых грибов-оппортунистов у животных.

Было установлено широкое видовое разнообразие дрожжей – они были представлены 13 родами и 38 видами. Доминировали представители родов *Malassezia* и *Candida*.

Если род *Malassezia* был представлен одним видом *M. pachydermatis*, то грибы рода *Candida* были представлены 16 различными видами. Из них в 43,4% встречается *C. albicans*, остальные виды относились к группе *Candida non-albicans*: *C. guilliermondii*, *C. famata*, *C. parapsilosis*, *C. zeylanoides*, *C. krusei*, *C. catenulata*, *C. lipolytica*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. rugosa*, *C. dubliniensis*, *C. peltata*, *C. membranifaciens*, *C. dubushaemulonii*, *C. saitoana*. Некоторые из этих видов широко известны как возбудители микозов животных и человека, в то время как клиническая значимость других мало описана в литературе.

Комплекс *C. parapsilosis*, состоящий из криптических видов *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* и *C. metapsilosis*, часто связывают с внутрибольничными инфекциями человека. В ветеринарии инфекции *C. parapsilosis* были зарегистрированы у разных видов животных. Вид проявляет факторы вирулентности, включая образование биопленки и выработку протеаз, фосфолипаз, липаз и других гидролитических ферментов. Кроме того, *C. parapsilosis* проявляет противогрибковую резистентность, особенно к производным

азола и эхинокандинам [69]. По результатам исследований Foley G et al. *C. parapsilosis* был обнаружен в плаценте коров при абортах [89].

*Candida tropicalis* вызывает инвазивные кандидозы человека, в т.ч. кандидемией и кандидурию. Также вид часто выделяют от здоровых животных [68]. Помимо колонизации, *C. tropicalis* ассоциирован с различными инфекциями у широкого круга животных, включая желудочно-кишечные заболевания у свиноматок, мастит у крупного рогатого скота, оральный мукозит у стервятников, инфекции мочевыводящих путей у собак и кошек, инфекций половых путей у кобыл [125].

Вид *C. guilliermondii* - довольно плохо изученный патоген, способный развивать устойчивость к противогрибковым средствам, встречается достаточно редко, на его долю приходится лишь 1 – 3 % от общего числа кандидозов человека [153]. В доступной литературе описаны случаи выделения у животных, в том числе при кожных кандидозах, дерматозах и инфекции суставов у собак [60;137].

*C. famata* принадлежит к группе так называемых "флавиногенных дрожжей", способных к сверхсинтезу рибофлавина в условиях дефицита железа и долгое время использовался для промышленного производства рибофлавина в США. Клинических случаев описано немного: есть случаи идентификации у собаки при хронической диарее [135], а также в фекалиях у птиц [47].

Комплекс *C. haemulonii* приобретает всё большее значение при инфекциях у человека, однако эпидемиологические данные ограничены. Представителей этого комплекса часто изолируют от пациентов с ослабленным иммунитетом: новорождённых и пожилых людей. Клинические проявления включают фунгемии, системные инфекции, онихомикоз, перитонит и др. В комплекс *C. haemulonii* входят виды *C. haemulonii sensu stricto*, *C. duobushaemulonii* и *C. haemulonii var. vulnera*. Филогенетически близки к этому комплексу виды *C. auris*, *C. pseudohaemulonii* и *C. vulturna*, некоторые авторы также включают их в этот комплекс. Распространенность комплекса *C. haemulonii* у животных практически не изучена.

Дрожжевой гриб *C. auris*, распространённый по всему миру, был впервые идентифицирован в Японии в 2009 году. Одной из главной особенностью этого вида

является проявление множественной лекарственной устойчивости, что делает его серьезной проблемой в медицине [97].

Следует отметить, что клиническая значимость многих видов плохо освещена в литературе, включая *C. zeylanoides*, *C. catenulata*, *C. peltata*, *C. membranifaciens*, *C. doubushaemulonii*, *C. saitoana*. Судя по доступной литературе, виды *C. doubushaemulonii*, *C. saitoana*, ранее у животных на территории России обнаружены не были.

Таким образом, благодаря применению современных методов идентификации, таких как секвенирование и MALDI-TOF MS, был охарактеризован современный видовой состав грибов рода *Candida*, потенциальных возбудителей кандидоза у животных. Установлены виды животных-хозяев, а также предпочтительные локализации в организме (кожные покровы, НСП, смывы со слизистых оболочек, внутренних органов павших животных, БАЛ, выпот, моча, фекалии).

Значительный интерес представляет диагностика других дрожжевых грибов, помимо рода *Candida*, многие из которых плохо изучены в ветеринарной микологии, являются редкими и нетривиальными. К ним относятся представители родов *Aureobasidium*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Cryptococcus*, *Cutaneotrichosporon*, *Pseudozyma*, *Debaromyces*, *Kazachstania*, *Cystobasidium*, *Kwoniella*, *Naganisha*.

Доля грибов рода *Aureobasidium* составила 11,5%, рода *Rhodotorula* - 8,4% от общего числа дрожжевых грибов. Ранее грибы родов *Rhodotorula* и *Aureobasidium* у животных на территории РФ, судя по доступным источникам, не диагностировали.

Клиническая значимость этих грибов в литературе освещена довольно скудно. Грибы рода *Aureobasidium* являются сапротрофами и широко распространены в окружающей среде. Род включает 14 видов, среди них *A. pullulans* – единственный хорошо изученный. В медицине он известен как возбудитель оппортунистических микозов (феогифомикозов), чаще всего поверхностных. Были описаны инфекции различных локусов, включая перитонит (среди пациентов на перитонеальном диализе), кожные инфекции, пневмонии,

менингиты, инфекции роговицы и склеры, абсцессы в селезенке и челюсти, а также системные инфекции. В основном данный микоз встречается на фоне иммуносупрессии, но описаны единичные случаи у иммунокомпетентных лиц [48].

Сведения о его патогенности для животных очень ограничены, он отмечен как возбудитель феогифомикозов у мелких домашних животных, может вызывать кератомикоз, легочный микоз с сепсисом, кожные микозы у животных [4;195]. Один из немногочисленных случаев феогифомикоза собаки, вызванный *A. pullulans*, описан в 2021 г. [188]. Также данный вид выделяли из клоаки диких перелетных птиц [90], из помета голубей [49].

На наш взгляд, данный дрожжевой грибок, известный как возбудитель феогифомикозов, заслуживает внимания в качестве оппортунистического патогена растущей распространенности.

Оппортунистические дрожжи рода *Rhodotorula* широко распространены во внешней среде, но довольно редко вызывают микозы у животных. Имеются сообщения о вспышке кожных инфекций у цыплят и сообщения о легочной инфекции у овец, вызванных *R. mucilaginosa*. *Rhodotorula* была диагностирована как возбудитель эпидидимита у собаки, кожных поражений у морского льва и дерматита у кошки. Установлено наличие грибов в ушном канале коров с наружным отитом (4,4%). *Rhodotorula* spp. обнаружен как колонизирующий агент в ротоглотке и клоаке страусов, в образцах фекалий и клоаки диких птиц и голубей в городских и пригородных районах [192]. В целом есть основания рассматривать грибы рода *Rhodotorula* как эмерджентные грибковые патогены человека и животных, а вызываемый ими родоторулёз – как микоз возрастающей значимости [150].

Литературные данные о встречаемости *Trichosporon* spp. у различных видов животных очень ограничены. Описана инфекция у кошки, которая проявлялась в форме гранулематозного дерматита и сопровождалась диссеминированной лимфобластной лимфосаркомой. У другой кошки был диагностирован цистит мочевого пузыря, вызванный *T. beigeli* [78]. Вид *T. loubieri* был выделен дважды также от кошек с различными клиническими признаками, в том числе симптомами ринита и цистита [169].

*T. montevidense* стал причиной менингоэнцефалита, который был диагностирован у 4-летней собаки с быстро прогрессирующими неврологическими симптомами, завершившимися коматозным состоянием. При микроскопии в головном мозге было обнаружено несколько участков пиогранулематозного воспаления с не пигментированными грибковыми гифами [59].

У сельскохозяйственных животных также описаны случаи *Trichosporon*-ассоциированных заболеваний. У двух овцематок был диагностирован тяжелый пиогранулематозный и некротизирующий решетчатый ринит с фокальной пиогранулематозной пневмонией. В ноздрях и легких обоих животных был выявлен *Trichosporon* spp. [88].

Обнаружены грибы рода *Trichosporon* и у хладнокровных животных. Так, *T. asahii* стал причиной диссеминированного микоза у пернатого василиска, содержащегося в домашних условиях. На левой задней лапе наблюдались множественные язвенные узелки неправильной формы размером 0,2–0,5 см. Животное погибло из-за невосприимчивости к лечению. Микроскопическое исследование выявило грибковую инфекцию, которая в первую очередь поразила левую заднюю лапу и правую долю легкого с грибковыми эмболиями в легких и печени [127].

В медицинской литературе описано много случаев заболеваний, связанных с *T. mucoides* и *T. japonicum*, но в ветеринарной литературе нам не удалось обнаружить сведений о взаимосвязи этих видов с заболеваниями животных. Однако известен случай, при котором *T. asahii* и *T. mucoides* были выделены из ротовой полости здоровой собаки [172].

Значимым микозом растущей значимости является криптококкоз, поражающий животных и человека. К криптококкозу восприимчивы многие виды млекопитающих: кошки, собаки, хорьки, козы, овцы, крупный рогатый скот, а также дельфины, коалы и другие виды сумчатых, птицы. Длительное время криптококкоз животных расценивался как редкое, спорадическое заболевание, однако в последние годы эпизоотическая ситуация меняется. Возбудители криптококкоза

обнаруживаются в новых климатических зонах, где раньше эти грибы не встречались [25].

В доступной литературе нет сведений о встречаемости видов *C. neoformans* и *C. gattii* у животных в РФ, однако имеются устные сообщения ветеринарных специалистов о диагностике криптококкоза у кошек в Санкт-Петербурге (В.В. Руппель, 2019). Важно отметить, что *C. neoformans* обнаруживали в помете голубей на территории Санкт-Петербурга (3,2% изученных проб) [5].

Примечательно, что основных возбудители криптококкоза животных – *C. neoformans* и *C. gattii* нам обнаружить не удалось, однако были выделены другие виды рода *Cryptococcus* - *C. albidus*, *C. unigutulatus*, *C. liquefaciens*, *C. ferigula*, *C. oeiensis*, *C. magnum*.

Виды *Cryptococcus (Naganishia) albidus* и *Cryptococcus (Papiliotrema) laurentii* ответственны за почти 80% зарегистрированных случаев заражения криптококковой инфекцией людей видами *Cryptococcus non-neoformans/non-gatti*. У животных также встречаются инфекции, вызываемые *Cryptococcus albidus*, в частности системные инфекции у собак [120].

Стоит отметить, что мониторинг присутствия криптококков у животных и во внешней среде является важной задачей здравоохранения, т.к. животные и продукты их жизнедеятельности являются резервуаром и источником заражения криптококкозом для человека.

Таким образом, получены актуальные данные о распространенности и этиологии малассезиозов, кандидозов, а также других редких дрожжевых грибов у домашних животных. Установлено значительное видовое разнообразие этиологической структуры кандидозов, часть видов диагностирована в РФ впервые.

Обнаружение перечисленных выше дрожжевых грибов у животных с инфекционно-воспалительными заболеваниями, их соответствие диагностическим критериям Волша-Инглиша позволяет предположить клиническую роль этих грибов в патологическом процессе, однако этот вопрос требует дальнейшего изучения с учетом новых диагностических данных.

Остро стоит проблема устойчивости грибов к противогрибковым препаратам, которая заключается в снижении эффективности лечения из-за развития резистентности у возбудителей. Основные группы антимикотиков, такие как азолы, полиены, эхинокандины и аллиламины, теряют эффективность из-за мутаций, активного выведения препаратов и изменений в биосинтезе клеточных компонентов у грибов рода *Candida*, *Aspergillus* и других. Вторичная резистентность растет, что требует тщательного мониторинга чувствительности грибов к препаратам. Клиническая устойчивость также усугубляется из-за некорректного диагноза, иммуносупрессии и бесконтрольного применения лекарств. В связи с этим мы изучили чувствительности выделенных нами дрожжевых грибов к антифунгальным препаратам полуколичественным и количественным методом.

С помощью диско-диффузионного метода была охарактеризована чувствительность к наиболее распространенным противогрибковым препаратам – нистатин, амфотерицин вориконазол, кетоконазол, итраконазол, клотримазол, флуконазол. Установлено, что профиль чувствительности значительно варьировал у различных родов дрожжевых грибов.

В отношении грибов рода *Candida* наибольшую эффективность проявил вориконазол. Также он проявил высокую эффективность против грибов рода *Trichosporon* (88,7%) и против грибов рода *Rhodotorula* (63,8%), для остальных родов чувствительность была более 20%, но менее 50%.

Кетоконазол является эффективным препаратом против грибов рода *Malassezia* (72,4%) и *Aureobasidium* (85,3%). Самая низкая эффективность у препарата против грибов рода *Trichosporon* (2,1%). Клотримазол проявил высокую эффективность только в отношении рода *Aureobasidium* (86,8%). Эффективность итраконазола для всех представленных родов составила менее 50%, что не позволяет рекомендовать его для эмпирической терапии.

В целом можно сделать вывод, что чувствительность дрожжевых грибов-оппортунистов к противогрибковым препаратам варьирует в широких пределах, однако наиболее широкий спектр действия выявлен у нистатина. Нистатин –

препарат полиеивной группы, полученный в 1950-х гг. Важным его преимуществом для ветеринарии являются невысокая цена и то, что он производится в России.

Нистатин может быть рекомендован для эмпирической терапии широкого спектра дрожжевых микозов, однако необходимо учитывать, что это препарат местного действия. Вориконазол, наиболее современный из изученных азоловых препаратов, обладающий системным действием, может быть рекомендован для терапии кандидозов, трихоспоронозов, родоторулозов, а кетоконазол – для терапии малассезиозов. Для терапии феогифомикозов, вызываемых *Aureobasidium spp.*, помимо нистатина могут применяться флуконазол, кетоконазол, клотримазол, в то время как вориконазол недостаточно эффективен. Для эрадикации грибов рода *Cryptococcus* может быть рекомендован только нистатин. Однако необходимо учитывать, что данные по чувствительности грибов *in vitro* не всегда будут коррелировать с эффективностью реальной противогрибковой терапии *in vivo*.

Также в ходе проведения исследования были выделены полирезистентные штаммы дрожжевых грибов. Для разных родов дрожжевых грибов полирезистентность варьировала: *Candida spp.* - 43,1%; *M. pachydermatis* - 24,1%, *R. mucilaginosa* - 70,1%, *Trichosporon spp.* - 92,8%, *Cryptococcus spp.* - 69,5%. При этом среди *A. pullulans* полирезистентных штаммов не обнаружено.

Полирезистентные штаммы грибов представляют собой серьёзную угрозу в ветеринарии, поскольку развитие устойчивости к нескольким классам противогрибковых препаратов ограничивает возможности эффективного лечения грибковых инфекций у животных. С каждым годом фиксируются новые случаи развития устойчивости этих патогенов к противогрибковым препаратам, таким как флуконазол, итраконазол и вориконазол. По данным ряда исследований, отмечается увеличение распространённости полирезистентных штаммов, что требует пересмотра подходов к лечению грибковых инфекций у животных [50;55].

Распространение полирезистентных штаммов в ветеринарной практике приводит к необходимости увеличения дозы препаратов, что, в свою очередь, может вызвать побочные эффекты и токсичность. Это также усложняет диагностику и лечение грибковых инфекций у домашних и сельскохозяйственных животных,

особенно у животных с ослабленным иммунитетом. В связи с этим важным направлением является разработка новых антимикотиков, а также внедрение систем контроля за рациональным применением препаратов.

Для широкого спектра дрожжевых грибов, значимых для ветеринарии, определены значения минимальной ингибирующей концентрации. Хотя МИК определяется *in vitro*, она коррелирует с клинической эффективностью препарата. Низкая МИК обычно указывает на высокую вероятность успешного лечения, тогда как высокая МИК предполагает недостаточный терапевтический эффект. Также МИК позволяет скорректировать дозировку антимикотика применительно к конкретному возбудителю. Так, при назначении кетоконазола следует учитывать, что его МИК в отношении *Candida spp.* обычно не превышает 2 мкг/мл. Аналогичным образом получены количественные значения МИК для других родов дрожжевых грибов.

Полученные данные по чувствительности могут быть использованы врачами-клиницистами для эмпирического назначения противогрибковых препаратов при выявлении редких дрожжевых грибов, к которым чувствительность к антимикотикам изучена недостаточно.

## 6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных исследований были сделаны следующие выводы:

1. Грибы-оппортунисты широко распространены среди животных с признаками инфекционно-воспалительных заболеваний (47,3%) с преобладанием дрожжевых грибов над мицелиальными (59,6% и 40,4% соответственно). Встречаемость грибов-оппортунистов варьирует у животных разных видов.

2. В результате оптимизации пробоподготовки и внесения в базу российского масс-спектрометра «АЛМАСС-Био 200» 17 нетривиальных видов грибов, метод MALDI-TOF может более эффективно применяться для идентификации широкого спектра грибов-оппортунистов и диагностики грибковых инфекций животных.

3. Установлено, что современный спектр грибов-оппортунистов у животных характеризуется широким видовым разнообразием, включая 38 видов грибов, относящихся к 13 различным родам.

4. Выявлено значительное расширение видового состава потенциальных возбудителей кандидоза животных. Он включает 16 видов, в том числе 6 видов, новых для РФ (*C. zeylanoides*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. peltata*, *C. doubushaemulonii*, *C. saitoana*).

5. Было идентифицировано 6 видов рода *Cryptococcus* (*C. albidus*, *C. unigutulatus*, *C. liquefaciens*, *C. ferigula*, *C. oeirensis*, *C. magnum*), ранее не встречавшихся в РФ, при этом вид *C. neoformans*, основной возбудитель криптококкоза, обнаружить не удалось.

6. Впервые выявлены слабо изученные у животных грибы-оппортунисты, способные вызывать феогифомикоз (11,5%), трихоспороноз (4,6%), и родоторулоз (8,4%), а также 8 редких видов дрожжевых грибов, что создает предпосылки для распространения новых форм микозов у животных.

7. Для дрожжевых грибов *C. famata*, *C. krusei*, *C. lipolytica*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *R. mucilaginosa*, *A. pullulans*, *T. asahii*, выделенных от животных, установлена способность формировать биопленки, что подтверждает их инфекционную значимость.

8. Изучены культурально-морфологические особенности 18 видов нетривиальных дрожжевых грибов на наборе микологических сред, установлены различия в пигментации колоний на хромогенной среде. У 12 видов грибов выявлена фосфолипазная активность, являющаяся важным фактором вирулентности дрожжевых грибов.

9. Установлена высокая вариабельность чувствительности грибов-оппортунистов к противогрибковым препаратам и высокая распространенность полирезистентных штаммов (24,1 - 92,8%). Наиболее широкий спектр действия выявлен у нистатина, наименьший – у амфотерицина В и итраконазола.

## **7. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ**

1. Использование отечественного масс-спектрометра «АЛМАСС-Био 200» с обновленной и расширенной базой данных для идентификации грибов методом MALDI-TOF позволит упростить и ускорить определение видовой принадлежности оппортунистических патогенов животных.
2. При проведении диагностических исследований на кандидозы и малассезиозы предлагается руководствоваться разработанными и утвержденными в установленном порядке методическими рекомендациями «Лабораторная диагностика кандидозов животных», «Лабораторная диагностика малассезиозов животных».
3. Полученные морфологические и биохимические характеристики нетривиальных видов дрожжевых грибов могут быть использованы для диагностических целей.
4. При выборе стратегии терапии грибковых инфекций животных предлагается ориентироваться на полученные современные данные о МИК антимикотиков в отношении различных микогенных инфектантов.
5. Полученные нами штаммы грибов, которые были охарактеризованы и депонированы в коллекции микроорганизмов и обладают всеми свойствами референтных культур, можно использовать для дальнейших практических и научно-исследовательских работ.

### **Благодарность**

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю, заведующему лабораторией микологии и антибиотиков им. А.Х. Саркисова, к.б.н. Овчинникову Р.С.; заместителю директора ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, д.б.н. Капустину А.В.; председателю диссертационного совета ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, д.в.н, профессору, академику РАН Гулюкину М.И., ученому секретарю диссертационного совета Ездаковой И.Ю., а также сотруднику ООО «Альгимед Техно» Фролову И.С. и сотрудникам НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи за оказание практической и консультационно-методической помощи.

## 8. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андрюков, Б.Г. Эволюция понятия сапронозы и трансформация экологической концепции паразитизма в инфектологии / Б.Г. Холдеева, Л.М. Сомова, Н.Ф. Тимченко // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2017. - №. 5. - С. 119–126.
2. Анисимова, А.С. Особенности идентификации грибов рода *Candida* с помощью масс-спектрометрического анализа (MALDI-ToF MS) / А.С. Анисимова, М.В. Полеева, Н.В. Аронова, М.В. Цимбалистова, Н.В. Павлович // Клиническая лабораторная диагностика. – 2022. – Т.67. – №. 4. – С. 244-249.
3. Апанасенко, Н.А. Грибковые инфекции: от исследований эпидемиологии и возбудителей к новым методам диагностики, лечения и профилактики / Н.А. Апанасенко // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2010. – №. 1. – С. 145-182.
4. Багирова, Н.С. Место *Aureobasidium pullulans* среди возбудителей оппортунистических инфекций человека (обзор литературы). / Н.С. Багирова // Лабораторная служба. – 2018. -№ 7(2). – С. 12 – 18.
5. Босак, И.А. Выделение и характеристика изолятов *Cryptococcus neoformans* из окружающей среды г. Санкт-Петербурга / И.А. Босак // Проблемы медицинской микологии. – 2009. – Т. 11.– №. 3. – С. 43–46.
6. Давыдовский, И.В. Проблемы причинности в медицине (этиология) / И.В. Давыдовский // Госмедгиз. –1962. – С.176.
7. Ермаков, В.В. Биологические свойства микроорганизмов, выделенных от собак и кошек с отитами / В.В. Ермаков // Известия Самарской государственной сельскохозяйственной академии. – 2017. – №. 3. – С. 50-55.
8. Ершов, П.П. Этиологическая значимость дрожжевых грибов рода *Malassezia* при кожных заболеваниях животных // Дисс...канд. вет. наук. / П.П. Ершова – Москва – 2008 г. – С.162.
9. Иванова, Л.В. Резистентность грибов-патогенов к антимикотикам (обзор) / Л.В. Иванова, Е.П. Баранцевич, Е.В. Шляхто // Проблемы медицинской микологии. – 2011.–Т. 13. – №. 1. – С.14-17.

10. Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матричноактивированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) для индикации и идентификации возбудителей I—II групп патогенности: МР 4.2.0089-14
11. Карасов, И.А. Особенности взаимодействия грибов рода *Candida* с иммунокомпетентными клетками /И.А. Карасов // Международный студенческий научный вестник. – 2018. – №. 1.
12. Карпунина, Т.И. Фосфолипазы оппортунистических грибов: их возможная роль в патогенезе и диагностике микозов / Т.И. Карпунина, А.А. Олина, М.Г. Машуров, Н.В. Чемурзиева, В.А. Драбкова // Проблемы медицинской микологии. – 2006. – №. 4.
13. Левитин, М.М. Арутюн Христофорович Саркисов — основоположник отечественной ветеринарной микологии и микотоксикологии (к 110-летию со дня рождения) / М.М. Левитин // Российский ветеринарный журнал. — 2019. — №. 2. — С. 45–47.
14. Левшенюк, А. Аспергиллез птиц / А. Левшенюк, Н. Кузнецов // Животноводство России. – 2017. – № 11. – С. 11-14. – EDN ZRQJQB.
15. Литвинов, А. М. Поверхностный кандидоз плотоядных животных / А. М. Литвинов, Н. А. Апанасенко // Ветеринария. – 2010. – №. 7. – С. 3-5.
16. Литусов, Н.В. Медицинская микология / Н.В. Литусов // Электронное учебное пособие. Екатеринбург: УГМУ – 2022. – С.53.
17. Макаров, В.В. Факторные болезни / В.В. Макаров // Российский ветеринарный журнал. – 2017. – №. 4. – С. 22-27.
18. Маноян, М.Г. Дрожжевые грибы в этиологии микозов животных / М.Г. Маноян, А.С. Гуршева, Н.А. Габузян, А.Н. Панин // Международный вестник ветеринарии. – 2024.– №. 1. – С. 202-214.
19. Медведева, Т.В. Подкожные микозы: сложности в диагностике и лечении / Т. В. Медведева, Ю. Л. Авдеенко, В. С. Митрофанов [и др.] // Санкт-Петербургские дерматологические чтения : Сборник тезисов XI Научно-практической конференции дерматовенерологов и косметологов, Санкт-Петербург, 26–28 октября

2017 года / Под редакцией А.В. Самцова, Е.В. Соколовского, К.И. Разнатовского. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургская общественная организация «Человек и его здоровье», - 2017. – С. 59-61.

20. Методические рекомендации. «Микологические культуральные исследования»/ Васильева Н.В., Елинов Н.В., Богомолова Т.С. и др. // Санкт-Петербург: ГБОУ ВПО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России. – 2013. – 56 С.

21. Герхард, Ф. Методы общей бактериологии / Ф. Герхард // Москва: Мир – 1983. – Т. 3. – С.264.

22. Овчинников, Р.С. Возрастающая значимость грибов - оппортунистов в этиологии микозов животных / Р. Овчинников, М. Г. Маноян, П. Ершов, А. Гайнулина // Современная микология в России : Материалы 2-го Съезда микологов России. - 2008. – №2. – С. 356-357.

23. Овчинников, Р.С. Диагностика дерматофитозов животных / Р. С. Овчинников, А. В. Капустин, А. И. Лаишевцев, В. А. Савинов. – Москва : Реглет, 2021. – 31 с.

24. Овчинников, Р.С. Клинически значимые грибы у диких и экзотических животных / Р. С. Овчинников, А. Г. Гайнулина, И. В. Самылина, А. В. Капустин // Ветеринария. – 2023. – №. 11. – С. 28-32.

25. Овчинников, Р.С. Криптококкоз животных и человека: аспекты взаимосвязи / Р.С. овчинников, А.Г. Гайнулина, В.А. Савинов, А.В. Капустин, А.М. Гулюкин // Успехи медицинской микологии. - 2021. - №22. - С. 422-429.

26. Овчинников, Р.С. Оппортунистические дрожжевые грибы у животных-компаньонов в Московском регионе / Р. С. Овчинников, И. В. Самылина, А. Г. Гайнулина, В. А. Савинов // Ветеринария. – 2023. – №. 4. – С. 13-19.

27. Овчинников, Р. С. Эмерджентные грибковые инфекции животных: новые виды возбудителей / Р. С. Овчинников, М. Г. Маноян, А.Н. Панин // VetPharma. – 2014. – №. 2(3). – С. 66-73.

28. Овчинников, Р. С. Этиология микозов экзотических рептилий / Р. С. Овчинников, М. Г. Маноян, А. Г. Гайнулина // VetPharma. – 2012. – №. 4(9). – С. 30-33.

29. Попов, С.В. Анализ регуляторных Т-лимфоцитов при грибковых инфекциях / С.В. Попов, И.Ю. Шмельков, С.В. Хайдуков // Медицинская иммунология. – 2020. – Т. 22. – №. 6. – С. 1055-1064.
30. Родченко Ю. В. Грибы *Malassezia furfur* у новорождённых отделений хирургии, реанимации и интенсивной терапии: оптимизация микробиологической диагностики: дис. ... канд. мед. наук: 03.00.00 / ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России. – Москва, 2020. – 120 с.
31. Рысцова, Е.О. Кандидоз желудочно-кишечного тракта свиней / Е. О. Рысцова, Н. П. Сачивкина, Е. В. Куликов и др. // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2019. – Т. 77. – №. 3. – С. 214-216.
32. Самылина, И. В. Выявление оппортунистического дрожжевого гриба *Aureobasidium pullulans* у домашних животных / И. В. Самылина // Успехи медицинской микологии. – 2023. – Т. 25. – С. 33-36.
33. Самылина, И.В. Детекция и идентификация грибов рода *Trichosporon* у животных / И.В. Самылина // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2024. - №7. – С.86-92
34. Самылина, И. В. Распространенность и видовой состав клинически значимых грибов у животных / И. В. Самылина, Р. С. Овчинников // Биология - наука XXI века: Сборник тезисов 27-й Пущинской школы-конференции молодых ученых с международным участием. - 2024. – С. 224.
35. Самылина, И. В. Редкие и атипичные виды дрожжевых грибов у животных / И. В. Самылина, А. Г. Гайнуллина, Р. С. Овчинников // Ветеринария и кормление. – 2023. – №. 6. – С. 60-64.
36. Саркисов, А.Х. Микология. Микотоксикозы. Дерматомикозы / А.Х. Саркисов // Избранные труды. – 2000. – С.414.
37. Сачивкина, Н. П. Диагностика кандидоза у свиней / Н. П. Сачивкина, Е. М. Ленченко, А. В. Лисейцев // Ветеринария. – 2018. – №. 11. – С. 26-30.
38. Сачивкина, Н. П. Устойчивость к противогрибковым препаратам кандид от собак / Н. П. Сачивкина, Е. В. Куликов // Инновации в медицинской,

фармацевтической, ветеринарной и экологической микробиологии: к 135-летию со дня рождения академика В.М. Аристовского: Всероссийская научно-практическая конференция. – 2017. – С.215.

39. СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»: утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 15 октября 2021 г. – Москва, 2021. – 40 с.

40. Феофилова, Е. П. Фундаментальные основы микологии и создание лекарственных препаратов из мицелиальных грибов / Е.П. Феофилова, А.И. Алехин, Н.Г. Гончаров, И.С. Мысякина, Я.М. Сергеева // Национальная академия микологии– 2013. – С.152.

41. Фролова, Я.Н. Видовой спектр и чувствительность к противогрибковым препаратам дрожжей рода *Candida*, выделенных из разных источников / Я.Н. Фролова, М.А. Морозова, И.В. Диденко // Гигиена и санитария. – 2018 – Т. – 97. – №. 3. – С. 204-207.

42. Халдеева, Е.В. Микобиота кожных покровов и шерсти домашних животных как потенциальный источник возбудителей дерматомикозов / Е.В. Халдеева, С.А. Лисовская, Н.И. Глушко // Проблемы медицинской микологии. – 2019. – Т. 21. – №. 4. – С. 54-56.

43. Шамукова, Д. Ф. Морфология грибов рода *Candida* и вопросы дифференциальной диагностики у собак и кошек / Д. Ф. Шамукова, А. М. Яковлева, Н. П. Сачивкина // Инновационные процессы в АПК : сборник статей VI Международной научно-практической конференции преподавателей, молодых ученых, аспирантов и студентов. –2014. – С. 201-203.

44. Abbes, S. Analysis of virulence factors and in vivo biofilm-forming capacity of *Yarrowia lipolytica* isolated from patients with fungemia / S. Abbes, I. Amouri, H. Trabelsi, S. Neji, H. Sellami, F. Rahmouni, F. Makni, T. Rebai, A. Ayadi, // *Medical Mycology*. - 2017. – Vol. 55. – Issue 2. – P.193–202.

45. Aghaei-Gharehbolagh, S. First case of superficial infection due to *Naganishia albida* (formerly *Cryptococcus albidus*) in Iran: a review of the literature / S. Aghaei-

Gharehbolag, M. Nasimi, S. Agha Kuchak Afshari, Z. Ghasemi, S. Rezaie // *Curr Med Mycol.* – 2017. – N 3. – P. 33–37.

46. Ahman, S. Carriage of *Malassezia* spp. yeasts in healthy and seborrhoeic Devon Rex cats / S. Ahman, N. Perrins, R. Bond // *Medical Mycology.* –2007. – Vol. 45. – N 5. – P. 449–455.

47. Al-Seraih, A. Characterization of *Candida famata* Isolated from Poultry Feces for Possible Probiotic Applications / A. Al-Seraih, C. Flahaut, F. Krier // *Probiotics Antimicrob Proteins.* – 2015. – Vol.7. – N 4.– P. 233-41.

48. Alami, S. Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Aureobasidium Pullulans* in an immunocompetent carpenter / S. Alami, I. Sekkal, S. Aoufi, M. Lyagoubi, L. Benzekri L, K. Senouci // *Med Mycol Case Rep.* - 2022. - Vol. 36. - P. 1-4.

49. Alrubayae, I. Molecular identification of *Aureobasidium pullulanus* isolated from pigeon droppings in Basra / I. Alrubayae, A. Almusa, F. Jafar // *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare.* - 2016. - Vol. 6. - No. 20. - P. 94-98.

50. Angiolella, L. Virulence Regulation and Drug-Resistance Mechanism of Fungal Infection / L. Angiolella // *Microorganisms.* – 2022. – Vol.10. – N 2. P. 409.

51. Abarca, M.L. *Trichophyton erinacei* in pet hedgehogs in Spain: occurrence and revision of its taxonomic status / M.L. Abarca, G. Castellá, J. Martorell, F.J. Cabañes // *Medical mycology.* – 2017. – Vol. 55. – N 2. – P. 164-172.

52. Baar, B.V. Characterisation of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation and Electrospray Mass Spectrometry / B.V. Baar // *FEMS Microbiology Rev.* – 2000. – Vol. 24 – N. 2. – P. 193-219.

53. Bader, O. Accurate Identification of Clinical Yeast Isolates by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry and a New Extended In-House Database / O. Bader // *Journal of Clinical Microbiology.* – 2011. - Vol. 49. - No. 8. – P. 2846-2851.

54. Becker, P Identification of fungal isolates by MALDI-TOF mass spectrometry in veterinary practice: validation of a web application / P. Becker, A. Normand, G. Vanantwerpen et al. // *J Vet Diagn Invest.* – 2019. - Vol. 31.- №3. – P. 471-474.

55. Bezhenar, M. Antifungal drug resistance *Candida* spp. mechanisms in recurrent genital candidiasis / M. Bezhenar, K. Plakhova // *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. – 2020. – Vol. 38 – N. 1. – P. 15-23.
56. Blehert, D. Bat white-nose syndrome: An emerging fungal pathogen? / D. Blehert, A. Hicks, M. Behr et al. // *Science*. – 2009. – Vol. 323(5911) – P. 227.
57. Bond, R. Biology, diagnosis and treatment of *Malassezia* dermatitis in dogs and cats. / R. Bond, D. Morris, J. Guillot et al // *Vet. Dermatol.* – 2020. – Vol. 31– P. 73–77.
58. Bond, R. Factors associated with elevated cutaneous *Malassezia pachydermatis* populations in dogs with pruritic skin disease. / R. Bond, E. Ferguson, C. Curtis // *J. small anim. Pract.* – 1996. – Vol. 37– N. 3.– P. 103–107.
59. Bryan, L. Meningoencephalitis in a dog due to *Trichosporon montevidense*. / L. Bryan, B. Porter, B. Wickes et al. // *J Comp Pathol.* – 2014. – Vol. 151. – N. 2-3. – P. 157-61.
60. Bufalari, A. Management of *Candida guilliermondii* joint infection in a dog. / A. Bufalari, C. Maggio, G. Moretti at al. // *Acta Vet Scand.* – 2016. Vol. 8;58. – N. 1. – P. 47.
61. Lohmann, C. Comparison between the Biflex III-Biotyper and the Axima-SARAMIS systems for yeast identification by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry / C. Lohmann [et al.] // *J. Clin. Microbiology*. – 2013. – Vol. 51. – N. 4. – P. 1231-1236.
62. Cabañes, F. J. Seasonal study of the fungal biota of the fur of dogs. / F.J. Cabañes, M.L. Abar, M.R. Bragulat, G. Castellá // *Mycopathologia*. – 1996. – Vol. 133. – N. 1. – P. 1-7.
63. Campbell, J.J. Evaluation of fungal flora in normal and diseased canine ears. / J.J. Campbell, K.S. Coyner, S.C. Rankin, T.P. Lewis, A.E. Schick, A.K. Shumaker // *Vet Dermatol.* – 2010. – Vol. 21. – N. 6. – P. 619-25.
64. Cardo, D. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report. / D. Cardo, T. Horan, M. Andrus et al // *J. Infect. Control.* – 2004. – Vol. 32. – P. 470-85.
65. Casadevall, A. Fungal Diseases in the 21st Century: The Near and Far Horizons. / A. Casadevall // *Pathog Immun.* – 2018.– Vol. 3. –N. 2. – P. 183-196.

66. Clancy, C. Programs Abstr. 36th Annu. Meet. / C.J. Clancy, M.A. Ghannoun, M.M. Nguyen // Infect. Dis. Soc. Am., abstr. – 1998. – P. 317.
67. Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved guideline. 2nd ed. M44-A2. – Wayne, PA: CLSI, 2009. – 56 p.
68. Cordeiro, R. *Candida tropicalis* isolates obtained from veterinary sources show resistance to azoles and produce virulence factors / R. Cordeiro, J. Oliveira, D. Castelo-Branco et al. // *Med Mycol.* – 2015. – N 53(2). – P. 145-52.
69. Cordeiro, R. *Candida parapsilosis* complex in veterinary practice: A historical overview, biology, virulence attributes and antifungal susceptibility traits / R. Cordeiro, J. Sales, D. Castelo-Branco // *Veterinary Microbiology.* – 2017. – Vol. 212. – P. 22–30.
70. Croxatto, A. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. / A. Croxatto, G. Prod'hom, G. Greub // *Microbiol Rev.* – 2012. – Vol. 36. – N. 2. – P. 380-407.
71. De Casia dos Santos, R. Isolation of *Candida* spp. from mastitic bovine milk in Brazil / R. De Casia dos Santos, J. Marin // *Mycopathologia.* – 2005. – Vol. 159, No. 2. – P. 251–253.
72. De Hoog, G. Guarro J., Gené J., Ahmed S., Al-Hatmi A., Figueras M., Vitale R. *Atlas of Clinical Fungi.* 4th ed. Hilversum, 2020, 779 p.
73. Deak, T. *Handbook of Food Spoilage Yeasts* / T. Deak // — Moscow: Publisher, 2008. — 300 p.
74. Desoubeaux, G., *Animal models of aspergillosis* / G. Desoubeaux, C. Cray // *Comparative Medicine.* - 2018. - Vol. 68. - No. 2. - P. 109-123
75. Di Bonaventura, G. Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: development, architecture, and antifungal resistance. / G. Di Bonaventura, A. Pompilio, C. Picciani, M. Iezzi et al. // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2006. – Vol. 50. – N. 10. – P. 3269-76.
76. Di Francesco, A. Biocontrol Activity and Plant Growth Promotion Exerted by *Aureobasidium pullulans* Strains. / A. Di Francesco, M. Di Foggia, M. Corbetta et al. // *J Plant Growth Regul.* – 2021. – Vol. 40. – P. 1233–1244.

77. Donnelly, K.A. Gastrointestinal Disease Associated with Non-albicans Candida Species in Six Birds. / K.A. Donnelly, J.R. Wellehan JFX, K.J. Quesenberry // *Avian Med Surg.* – 2019. – Vol. 33. – N. 4. – P. 413-418.
78. Doster, A. Trichosporonosis in two cats. /A. Doster, E. Erickson, F. Chandler // *J Am Vet Med Assoc.* – 1987. – Vol. 190.– N. 9. – P. 1184
79. Duarte, E. Factors associated with the prevalence of *Malassezia* species in the external ears of cattle from the state of Minas Gerais, Brazil. / E. Duarte, R. Batista, R. Hahn // *Med. Mycol.*– 2003. – Vol. 41. – N. 2. – P. 137–142.
80. Dworecka-Kaszak, B. High prevalence of *Candida* yeast in milk samples from cows suffering from mastitis in Poland. / B. Dworecka-Kaszak, A. Krutkiewicz, D. Szopa et al.// *Scientific World Journal.* – 2012. 2012:196347.
81. Dworecka-Kaszak, B. Occurrence of various pathogenic and opportunistic fungi in skin diseases of domestic animals: a retrospective study / B. Dworecka-Kaszak, M.J. Biegańska, I. Dąbrowska // *BMC Veterinary Research.* – 2020. – Vol. 16. – P. 248.
82. Eckmann, L. *Entamoeba histolytica* trophozoites induce an inflammatory cytokine response by cultured human cells through the paracrine action of cytolytically released interleukin-1Ct / L. Eckmann, S.L. Reed, J.R. Smith, M.F. Kagnoff // *Journal of Clinical Investigation.* – 1996. – P. 1269–1279.
83. Eguchi-Coe, Y. Putative *Malassezia* dermatitis in six goats. / Y. Eguchi-Coe, B.A. Valentine, E. Gorman, A. Villarroel // *Veterinary Dermatology.* – 2011. – Vol. 22.– N. 6. – P. 497-501.
84. Ellis, D. Amphotericin B: spectrum and resistance / D. Ellis // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* – 2002. – Vol. 49.
85. Espinel-Ingroff, A. In vitro antifungal activities of anidulafungin and micafungin, licensed agents and the investigational triazole posaconazole as determined by NCCLS methods for 12,052 fungal isolates: review of the literature. / A. Espinel-Ingroff // *Revista Iberoamericana de Micología* – 2003. – Vol. 20. – P. 121-36.
86. Fernández-García, O. Immunology of Fungal Infections / O. Fernández-García, J. Cuellar-Rodríguez // *Infectious Disease Clinics of North America.* – 2021. – Vol. 35, No. 2. – P. 373–388.

87. Fisher, M. *Batrachochytrium* sp. and the panzootic of amphibian chytridiomycosis. In 1st International Veterinary Mycology Course – 4–8 November 2013; Radboudumc, Nijmegen, The Netherlands. – 2013.
88. Fredriks, D. Nasal trichosporonosis in 2 mixed-breed ewes / D. Fredriks, G. Grissett-Hardwick, W. Baumgartner // *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. – 2023. – Vol. 35, No. 5. – P. 559–562.
89. Foley, G. *Candida* abortion in cattle / G. Foley, D. Schlafer // *Veterinary Pathology*. – 1987. – Vol. 24, No. 6. – P. 532–536.
90. Francesca, N. Yeasts vectored by migratory birds collected in the Mediterranean island of Ustica and description of *Phaffomyces usticensis* f.a. sp. nov., a new species related to the cactus ecoclade / N. Francesca, C. Carvalho, C. Sannino et al. // *FEMS Yeast Research*. – 2014. – Vol. 14, No. 6. – P. 910–921
91. Fule, S. Detection of phospholipase activity of *Candida albicans* and non-*albicans* isolated from women of reproductive age with vulvovaginal candidiasis in rural area / S. Fule, D. Das, R. Fule // *Indian Journal of Medical Microbiology*. – 2015. – Vol. 33, No. 1. – P. 92–95.
92. Gaitanis, G. AhR ligands, malassezin, and indolo[3,2-b]carbazole are selectively produced by *Malassezia furfur* strains isolated from seborrheic dermatitis / G. Gaitanis, P. Magiatis, K. Stathopoulou et al. // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2008. – Vol. 128. – P. 1620–1625.
93. Gattlen, J. Biofilm formation by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: process, repeatability and cell attachment in a continuous biofilm reactor / J. Gattlen, M. Zinn, S. Guimond, E. et al. // *Biofouling*. – 2011. – Vol. 27, No. 9. – P. 979–991.
94. Ghannoum, M. Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal Pathogenesis / M. Ghannoum // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2000. – Vol. 13, No. 1. – P. 122–143.
95. Ghannoum, M. Characterization of the Oral Fungal Microbiome (Mycobiome) in Healthy Individuals / M. Ghannoum // *PLoS Pathogens*. – 2010. – Vol. 6, No. 1. – e1000713.

96. Gnat, S. A global view on fungal infections in humans and animals: opportunistic infections and microsporidiosis / S. Gnat, D. Łagowski, A. Nowakiewicz, M. Dyląg // *Journal of Applied Microbiology*. – 2021. – Vol. 131, No. 5. – P. 2095–2113.
97. Gómez-Gaviria, M. *Candida haemulonii* Complex and *Candida auris*: Biology, Virulence Factors, Immune Response, and Multidrug Resistance / M. Gómez-Gaviria, J. Martínez-Álvarez, J. Chávez-Santiago, et al. // *Infection and Drug Resistance*. – 2023. – Vol. 16. – P. 1455–1470.
98. Gottfredsson, M. Fungal phospholipase activity and susceptibility to lipid preparations of amphotericin B / M. Gottfredsson, C. J. Jessup, G. M. Cox, et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2001. – Vol. 45. – P. 3231–3233.
99. Grzybowski, A. Robert Remak (1815–1865): discoverer of the fungal character of dermatophytoses / A. Grzybowski, K. Pietrzak // *Clinical Dermatology*. – 2013. – Nov-Dec. – Vol. 31, No. 6. – P. 802–805.
100. Guarro, J. *Diagnostic Microscopy for Fungal Infections* / J. Guarro // *Human Pathology*. — 1999. — Vol. 30, No. 12. — P. 1435-1445.
101. Guillot, J. *Malassezia* yeasts in veterinary dermatology: an updated overview / J. Guillot, R. Bond // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2020. – Vol. 10. – P. 79.
102. Gyimesi, A. Cutaneous *Cryptococcus albidus* infection / A. Gyimesi, A. Bátor, P. Görög, E. et al. // *International Journal of Dermatology*. – 2017. – Vol. 56. – P. 452–454.
103. Hager, D. Western Blotting for the Detection of Antibodies to *Candida* Species in Human Serum / D. Hager // *Journal of Immunological Methods*. — 2000. — Vol. 243, No. 1-2. — P. 109-119
104. Hibbett, D. Progress in Molecular and Morphological Taxonomy of Fungi / D. S. Hibbett // *Fungal Biology Reviews*. – 2011. – Vol. 25, No. 1. – P. 38–47.
105. Hirayama, T. Clinical and Microbiological Characteristics of *Candida guilliermondii* and *Candida fermentati* / T. Hirayama, T. Miyazaki, Y. Yamagishi, et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2018. – May 25. – Vol. 62, No. 6. – e02528-17

106. Hoenigl, M. Global guideline for the diagnosis and management of rare mold infections: an initiative of the ECMM in cooperation with ISHAM and ASM / M. Hoenigl, J. Salmanton-García, T. J. Walsh et al. // *Lancet Infectious Diseases*. – 2021. – Aug. – Vol. 21, No. 8. – P. 246–257.
107. Ianiri, G. Jr. *Malassezia*: A Commensal, Pathogen, and Mutualist of Human and Animal Skin / G. Ianiri, S. LeibundGut-Landmann, T. L. Dawson Jr. // *Annual Review of Microbiology*. – 2022. – Sep 8. – Vol. 76. – P. 757–782.
108. Iyalla, C. A review of the virulence factors of pathogenic fungi / C. Iyalla // *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*. – 2017. – Vol. 18, No. 1. – P. 53–58.
109. Jang, K. Molds isolated from pet dogs / K. Jang, Y. Yun, H. Yoo, S. Kim // *Mycobiology*. – 2007. – Vol. 35, No. 2. – P. 100–102.
110. Jones, K. Global trends in emerging infectious diseases / K. Jones, N. Patel, M. Levy // *Nature*. – 2008. – Feb 21. – Vol. 451, No. 7181. – P. 990–993.
111. Kanafani, Z. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact / Z. A. Kanafani, J. R. Refrect // *Clinical Infectious Diseases*. – 2008. – Vol. 46. – P. 120–128.
112. Kangabam, N. An overview of opportunistic fungal infections associated with COVID-19 / N. Kangabam, V. Nethravathy // *3 Biotech*. – 2023. – Vol. 13. – Article 231.
113. Kant, R. A review on emerging fungal infections and their significance / R. Kant, T. Kaur, S. Gupte, et al. // *Journal of Bacteriology & Mycology*. – 2015. – Vol. 1, No. 2. – P. 39–41.
114. Kantarcioglu, A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains / A. Kantarcioglu, A. Yücel // *Mycoses*. – 2002. – Jun. – Vol. 45, No. 5-6. – P. 160–165.
115. Karas, M. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds / M. I. Karas // *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*. – 1987. – Vol. 78. – P. 53–68.
116. Kordossis, T. First report of *Cryptococcus laurentii* meningitis and a fatal case of *Cryptococcus albidus* cryptococcaemia in AIDS patients / T. Kordossis, A. Avlami, A. Velegraki, et al. // *Medical Mycology*. – 1998. – Oct. – Vol. 36, No. 5. – P. 335–339.

117. Krukowski, H. Survey of yeast mastitis in dairy herds of small-type farms in the Lublin region, Poland / H. Krukowski, M. Tietze, T. Majewski // *Mycopathologia*. – 2001. – Vol. 150, No. 1. – P. 5–7.
118. Kruschewsky, W. *Trichosporon asahii* causing subcutaneous mycoses in an immunocompetent patient: case report and a minireview / W. Kruschewsky, P. Massaroni-Peçanha, S. Maifrede, et al. // *Brazilian Journal of Microbiology*. – 2022. – Sep. – Vol. 53, No. 3. – P. 1221–1229.
119. Kurtzman, C. Identification of Clinically Important Ascomycetous Yeasts Based on Nucleotide Divergence in the 5' End of the Large-Subunit (26S) Ribosomal DNA Gene / C. P. Kurtzman, C. J. Robnett // *Journal of Clinical Microbiology*. — 1997. — Vol. 35, No. 5. — P. 1216–1223.
120. Labrecque, O. *Cryptococcus albidus* infection in a Doberman Pinscher / O. Labrecque, D. Sylvestre, S. Messier // *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. – 2005. – Nov. – Vol. 17, No. 6. – P. 598–600.
121. Langfelder, K. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi / K. Langfelder, M. Streibel, B. Jahn, et al. // *Fungal Genetics and Biology*. – 2003. – Vol. 38. – P. 143–158.
122. Lau, A. F. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight for Fungal Identification / A. F. Lau // *Clinical Laboratory Medicine*. – 2021. – Jun. – Vol. 41, No. 2. – P. 267–283.
123. Lee, Y. First report of *Cryptococcus albidus*-induced disseminated cryptococcosis in a renal transplant recipient / Y. A. Lee, J. K. Hee, W. L. Tae, et al. // *Korean Journal of Internal Medicine*. – 2004. – Vol. 19. – P. 53–57.
124. Leidich, S. Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans* / S. D. Leidich, A. S. Ibrahim, Y. Fu, et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – Vol. 273. – P. 26078–26086.
125. Lima, R. The emerging threat antifungal-resistant *Candida tropicalis* in humans, animals, and environment / R. Lima, F. C. Ribeiro, A. L. Colombo, J. N. de Almeida Jr. // *Frontiers in Fungal Biology*. – 2022. – Aug. 15. – Vol. 3, Article 957021.

126. Liu, Y. Cryptococcus albidus encephalitis in newly diagnosed HIV-patient and literature review / Y. Liu, S. Ma, X. Wang, W. Xu, J. Tang // *Medical Mycology Case Reports*. – 2013. – Nov. 23. – Vol. 3. – P. 8–10.
127. Lo, C. Disseminated Fungal Infection and Fungemia Caused by *Trichosporon asahii* in a Captive Plumed Basilisk (*Basiliscus plumifrons*) / C. Lo, C. Kang, P. Sun, et al. // *Journal of Fungi (Basel)*. – 2021. – Nov. 24. – Vol. 7, No. 12. – Article 1003.
128. Loison, J. First report of *Cryptococcus albidus* septicaemia in an HIV patient / J. Loison, J. P. Bouchara, E. Gueho, et al. // *Journal of Infection*. – 1996. – Sep. – Vol. 33, No. 2. – P. 139–140.
129. Mada, P. K., Jamil, R. T., Alam, M. U. *Cryptococcus* / P. K. Mada, R. T. Jamil, M. U. Alam // *StatPearls [Internet]*. – 2023. – Aug. 7. – Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan.
130. Magiatis, P. *Malassezia* yeasts produce a collection of exceptionally potent activators of the Ah (dioxin) receptor detected in diseased human skin / P. Magiatis, P. Pappas, G. Gaitanis, et al. // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2013. – Vol. 133. – P. 2023–2030.
131. Melo, J. *Cryptococcus albidus* meningitis / J. C. Melo, S. Srinivasan, M. L. Scott, M. J. Raff // *Journal of Infection*. – 1980. – Mar. – Vol. 2, No. 1. – P. 79–82.
132. Messer, S. International surveillance of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp.: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2003) / S. A. Messer, R. N. Jones, T. R. Fritsche // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2006. – Vol. 44. – P. 1782–1787.
133. Miceli, M. Emerging opportunistic yeast infections / M. H. Miceli, J. A. Díaz, S. A. Lee // *Lancet Infectious Diseases*. – 2011. – Feb. – Vol. 11, No. 2. – P. 142–151.
134. Miller, J. Fungal secondary metabolites as harmful indoor air contaminants: 10 years on / J. D. Miller, D. R. McMullin // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2014. – Vol. 98. – P. 9953–9966.
135. Milner, R. Chronic episodic diarrhoea associated with apparent intestinal colonisation by the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida famata* in a German

- shepherd dog / R. J. Milner, J. Picard, R. Tustin // *Journal of the South African Veterinary Association*. – 1997. – Dec. – Vol. 68, No. 4. – P. 147–149.
136. Mitrović, S. Antifungal drug resistance: mechanisms of resistance, frequency, prevention, and control of resistance / S. Mitrović, A. Džamić, V. Arsić-Arsenijević, et al. // *Srpski Arhiv za Celokupno Lekarstvo*. – 2007. – Jul-Aug. – Vol. 135, No. 7-8. – P. 486–494.
137. Mueller, R. Cutaneous candidiasis in a dog caused by *Candida guilliermondii* / R. S. Mueller, S. V. Bettenay, M. Shipstone // *Veterinary Record*. – 2002. – Jun. 8. – Vol. 150, No. 23. – P. 728–730.
138. Mukherjee, P. Reintroduction of the PLB1 gene into *Candida albicans* restores virulence in Vwo 11 / P. K. Mukherjee, K. R. Seshan, S. D. Leidich, et al. // *Microbiology*. – 2001. – Vol. 147. – P. 2585–2597.
139. Naglik, J. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis / J. R. Naglik, S. J. Challacombe, B. Hube // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2003. – Vol. 67. – P. 400–428.
140. Najafzadeh, M. In vitro activities of eight antifungal drugs against 104 environmental and clinical isolates of *Aureobasidium pullulans* / M. J. Najafzadeh, D. A. Sutton, M. S. Keisari, et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2014. – Sep. – Vol. 58, No. 9. – P. 5629–5631
141. Narayan, S. Cutaneous cryptococcus infection due to *C. albidus* associated with Sézary syndrome / S. Narayan, K. Batta, P. Colloby, C. Y. Tan // *British Journal of Dermatology*. – 2000. – Vol. 143. – P. 632–634.
142. Nilsson, R. Improving ITS Sequence Data for Identification of Plant Pathogenic Fungi / R. H. Nilsson, et al. // *Fungal Diversity*. – 2012. – Vol. 50, No. 1. – P. 167–181.
143. Nilsson, R. The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies / R. H. Nilsson, M. Ryberg, K. Abarenkov, E. Sjökvist, E. Kristiansson // *FEMS Microbiology Letters*. – 2009. – Jul. – Vol. 296, No. 1. – P. 97–101.

144. Nosanchuk, J. Budding of melanized *Cryptococcus neoformans* in the presence or absence of L-dopa / J. D. Nosanchuk, A. Casadevall // *Microbiology*. – 2003. – Vol. 149. – P. 1945–1951.
145. Nosanchuk, J. Fungal melanin: what do we know about structure / J. D. Nosanchuk, R. E. Stark, A. Casadevall // *Frontiers in Microbiology*. – 2015. – Vol. 6. – Article 1463.
146. O'Toole, G. Microtiter dish biofilm formation assay / G. A. O'Toole // *Journal of Visualized Experiments*. – 2011. – Jan 30. – Issue 47. – Article 2437
147. Odds F. The evolution of antifungal resistance in *Candida* species// *Microbiology today*.
148. Oliveira, V. Cutaneous *Naganishia albida* (*Cryptococcus albidus*) infection: a case report and literature review / V. F. Oliveira, A. P. Funari, M. Taborda, et al. // *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. – 2023. – Dec. 4. – Vol. 65. – Article e60
149. Ovchinnikov, R. Mutual relationships between bacteria and fungi of veterinary significance / R. S. Ovchinnikov, V. A. Savinov, I. V. Samylina // *International Journal of Veterinary Science*. – 2025. – Vol. 14, No. 1. – P. 138–145.
150. Ovchinnikov, R. New and emerging fungal pathogens in companion animals in Russia / R. S. Ovchinnikov, M. G. Manoyan, A. G. Gaynullina, A. N. Panin // *Mycoses*. – 2013. – Vol. 56 (Suppl. 1). – P. 87.
151. Pal, M. Rhodotoruliosis: an emerging opportunistic mycosis of humans and animals / M. Pal, K. Paula, K. Gutama, S. Ruiz, et al. // *Journal of Mycology: Mycological Sciences*. – 2021. – Vol. 4, No. 2. – Article 000148.
152. Pannanusorn, S. Characterization of biofilm formation and the role of BCR1 in clinical isolates of *Candida parapsilosis* / S. Pannanusorn, B. Ramírez-Zavala, H. Lünsdorf, et al. // *Eukaryotic Cell*. – 2014. – Apr. – Vol. 13, No. 4. – P. 438–451.
153. Papon, N. *Candida guilliermondii*: biotechnological applications, perspectives for biological control, emerging clinical importance and recent advances in genetics / N. Papon, V. Savini, A. Lanoue // *Current Genetics*. – 2013. – Vol. 59. – P. 73–90.
154. Peman, J. Antifungal drug resistance mechanisms / J. Peman, E. Canton, A. Espinel // *-Ingroff*. – 2009.

155. Pennisi, M. Cryptococcosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management / M. G. Pennisi, et al. // *Journal of Feline Medicine and Surgery*. – 2013. – Jul. – Vol. 15, No. 7. – P. 611–618.
156. Perlin, D. Antifungal drug resistance: do molecular methods provide a way forward? / D. S. Perlin // *Current Opinion in Infectious Diseases*. – 2009. – Vol. 22. – P. 568–573.
157. Pfaller, M. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: Concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* / M. A. Pfaller, D. J. Diekema // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2004, Oct. – Vol. 42. – P. 4419–4431.
158. Pin, D. Seborrhoeic dermatitis in a goat due to *Malassezia pachydermatis* / D. Pin // *Veterinary Dermatology*. – 2004, Feb. – Vol. 15, No. 1. – P. 53–56.
159. Pincus, D. Yeast Identification — Past, Present, and Future Methods / D. H. Pincus, S. Orega, S. Chatellier // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2007. – Vol. 45, No. 12. – P. 123–135.
160. Prakobphol, A. Specific adherence of *Candida tropicalis* to lysophospholipids / A. Prakobphol, H. Leffler, S. J. Fisher // *Biochemistry*. – 1998. – Vol. 33. – P. 9496–9503
161. Quintilla, R. MALDI-TOF MS as a tool to identify foodborne yeasts and yeast-like fungi / R. Quintilla, A. Kolecka, S. Casaregola, et al. // *International Journal of Food Microbiology*. – 2018, Feb 2. – Vol. 266. – P. 109–118.
162. Ragupathi, L. Case Report of *Cryptococcus Albidus* Peritonitis in a Peritoneal Dialysis Patient and a Review of the Literature / L. Ragupathi, M. Reyna // *Peritoneal Dialysis International*. – 2015. – Vol. 35, No. 4. – P. 421–427.
163. Refai, M. Monograph On Cryptococcosis in domestic & wild animals and birds: A guide for postgraduate students in developing countries / M. K. Refai. – 2017. – Cairo University
164. Rementeria, A. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence / A. Rementeria, N. Lopez-Molina, A. Ludwig, et al. // *Revista Iberoamericana de Micología*. – 2005. – Vol. 22, No. 1. – P. 1–23.

165. Řehulka, J. A renal mycosis of roach (*Rutilus rutilus*) caused by the *Aureobasidium pullulans* / J. Řehulka, V. Hubka // *Medical Mycology Case Reports*. – 2024, May 8. – Vol. 44. – Article 100652.
166. Ripeau, J. Effect of the echinocandin caspofungin on expression of *Candida albicans* secretory aspartyl proteinases and phospholipase in vitro / J. Ripeau, F. Aumont, P. Belhumeur, et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2002. – Vol. 46. – P. 3096–3100.
167. Sabatelli, F. In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts / F. Sabatelli, R. Patel, P. A. Mann, et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2006. – Vol. 50. – P. 2009–2015
168. Saika, H. Molecular typing and antifungal drug susceptibility profile of *Rhodotorula mucilaginosa* from canine skin and ear canal / H. Saika, N. Murayama, R. Kano // *Journal of Veterinary Medical Science*. – 2021. – Vol. 83, No. 10. – P. 1545–1548.
169. Sakamoto, Y. First isolation of *Trichosporon domesticum* from a cat / Y. Sakamoto, R. Kano, Y. Nakamura, et al. // *Mycoses*. – 2001 Dec. – Vol. 44, No. 11-12. – P. 518–520.
170. Samaranayake, Y. Phospholipase B enzyme expression is not associated with other virulence attributes in *Candida albicans* isolates from patients with human immunodeficiency virus infection / Y. H. Samaranayake, R. S. Dassanayake, J. A. Jayatilake, et al. // *Medical Microbiology*. – 2005. – Vol. 54. – P. 583–593.
171. Sandrin, T. R. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review / T. Sandrin, J. Goldstein, S. Schumaker // *Mass Spectrometry Reviews*. – 2013. – Vol. 32, No. 3. – P. 188–217.
172. Santin, R. Clinical and mycological analysis of dog's oral cavity / R. Santin, A. S. Mattei, S. B. Waller, et al. // *Brazilian Journal of Microbiology*. – 2013. – Vol. 44, No. 1. – P. 139–143.
173. Schoch, C. Fungal Barcoding Consortium. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi / C. L. Schoch, K. A. Seifert, S. Huhndorf, et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* – 2012 Apr 17. – Vol. 109, No. 16. – P. 6241–6246.

174. Seebacher, C. Outstanding personalities in German-speaking mycology / C. Seebacher, T. Lotti, M. G. Rocca, et al. // Wiener Medizinische Wochenschrift. – 2017. – Vol. 167 (Suppl. 1). – P. 8–19.
175. Seshan K.R., Vitullo J.C., Leidich S.D., et al. A genetically defined phospholipase B-deficient *Candida albicans* mutant is less virulent in the oral-intragastric infant mouse model. Submitted for publication.
176. Sheppard, D. Biofilm exopolysaccharides of pathogenic fungi: lessons from bacteria / D. C. Sheppard, P. L. Howell // Journal of Biological Chemistry. – 2016. – Vol. 291, No. 24. – P. 12529–12537.
177. Sigler, L. Molecular Characterization of Reptile Pathogens Currently Known as Members of the *Chrysosporium* Anamorph of *Nannizziopsis vriesii* Complex and Relationship with Some Human-Associated Isolates / L. Sigler, et al. // Journal of Clinical Microbiology. – 2013. – Vol. 51, No. 10. – P. 3338–3357..
178. Silva, S. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance / S. Silva, M. Negri, M. Henriques, et al. // FEMS Microbiological Reviews. – 2012 Mar. – Vol. 36, No. 2. – P. 288–305.
179. Smith, J. W. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Detection of Fungal Antigens in Serum / J. W. Smith, et al. // Journal of Clinical Microbiology. – 2002. – Vol. 40, No. 5. – P. 1494–1500..
180. Stalhberger, T. Chemical organization of the cell wall polysaccharide core of *Malassezia restricta* / T. Stalhberger, C. Simenel, C. Clavaud, et al. // Journal of Biological Chemistry. – 2014. – Vol. 289. – P. 12647–12656.
181. Stephen, C. Multispecies outbreak of cryptococcosis on southern Vancouver Island, British Columbia / C. Stephen, S. Lester, W. Black, et al. // Canadian Veterinary Journal. – 2002 Oct. – Vol. 43, No. 10. – P. 792–794.
182. Stop neglecting fungi / Nature Microbiology. – 2017. – Vol. 2. – Article 17120.
183. Surain, P. *Candida*, a human pathogen and major types of candidiasis / P. Surain, N. K. Aggarwal // International Journal of Pharmaceutical Sciences & Research. – 2019. – Vol. 11, No. 1. – P. 41–67.

184. Tedersoo, L. Global Diversity and Geography of Soil Fungi / L. Tedersoo, et al. // *Science*. – 2014. – Vol. 346, No. 6213. – P. 1078–1088.
185. Thomson, P. Virulence and antifungal therapy of murine disseminated infection by *Rhodotorula mucilaginosa* / P. Thomson, L. López-Fernández, J. Guarro, et al. // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. – 2017 Sep. – Vol. 89, No. 1. – P. 47–51.
186. Tortorano, A. The European Confederation of Medical Mycology (ECMM) survey of candidaemia in Italy: in vitro susceptibility of 375 *Candida albicans* isolates and biofilm production / A. M. Tortorano, A. Prigitano, E. Biraghi, M. A. Viviani // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2005. – Vol. 56. – P. 777–779.
187. Voyles, J. Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines / J. Voyles, S. Young, L. Berger, et al. // *Science*. – 2009. – Vol. 326, No. 5952. – P. 582–585.
188. Waller, S. Subcutaneous phaeohyphomycosis due to *Aureobasidium pullulans* infection in a dog / S. B. Waller, M. R. A. Ferreira, A. D. R. Gomes, et al. // *Veterinaria Italiana*. – 2021 Jul 27. – Vol. 57, No. 3.
189. Weidman, F. Exfoliative dermatitis in the Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*) with description of a new yeast species, *Pityrosporium pachydermatis* / F. D. Weidman // In Report of the Laboratory and Museum of Comparative Pathology of the Zoological Society of Philadelphia. 1925– ed. H. Fox. – P. 36–46.
190. White, S. *Malassezia* species isolated from the intermammary and preputial fossa areas of horses / S. D. White, S. I. Vandenabeele, N. L. Drazenovich, et al. // *Journal of Veterinary Internal Medicine*. – 2006 Mar-Apr. – Vol. 20, No. 2. – P. 395–398..
191. White, P. Evaluation of a Commercial Lateral Flow Assay for Detection of Fungal Antigens in Bronchoalveolar Lavage Fluid / P. White // *Clinical and Vaccine Immunology*. — 2013. — Vol. 20, No. 9. — P. 1473-1477.
192. Wirth, F. Epidemiology of *Rhodotorula*: an emerging pathogen / F. Wirth, L. Goldani // *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. – 2012. – Vol. 2012. – Article 465717.

193. World Health Organization. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. – Geneva: WHO, 2014. – 256 p.
194. Iriart, X. Routine identification of medical fungi by the new Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight system with a new time-effective strategy / X. Iriart, et al. // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2012. – Vol. 50, No. 6. – P. 2107–2110.
195. Yang, G. Transcription Factors in *Aureobasidium* spp.: Classification, Regulation and a Newly Built Database / G. Yang, Y. Wang, Y. Fang, et al. // *Journal of Fungi (Basel)*. – 2022. – Vol. 8, No. 10. – P. 1096.
196. Yang, L. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact / Yang Liu, Shaolin Ma, Xuebin Wang, et al. // *Clinical Infectious Diseases*. – 2008 Jan 1. – Vol. 46, No. 1. – P. 120–128.

## 9. ПРИЛОЖЕНИЯ

К диссертационной работе прилагаются следующие копии документов:

№	Документ	Стр
1.	Свидетельство о депонировании штамма <i>Candida dubushaemulonii</i> «M155-23SnC»	159
2.	Паспорт штамма штамма <i>Candida dubushaemulonii</i> «M155-23SnC»	160
3	Свидетельство о депонировании штамма <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> «ЗУ/3-23»	161
4	Паспорт штамма штамм <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> «ЗУ/3-23»	162
5	Свидетельство о депонировании штамма <i>Trichosporon asahii</i> «M4-23Sn»	163
6	Паспорт штамма штамма <i>Trichosporon asahii</i> «M4-23Sn»	164
7	Методические рекомендации «Лабораторная диагностика кандидозов животных»	165
8	Методические рекомендации «Лабораторная диагностика малассезиозов животных»	166
9	Патент «Штамм дрожжевого гриба вида <i>Candida duobushaemulonii</i> , предназначенный для использования в качестве референтного для фенотипической идентификации при лабораторной диагностике кандидозов»	167
10	Информационное письмо о проведенных работах в рамках соглашения о научном сотрудничестве №18-01/07 от 25.07.2024	168

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)**

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)**

Рязанский проспект, д. 24, корпус 1, Москва, 109428  
Тел./факс (495) 970-03-69. E-mail: admin@viev.ru

## СВИДЕТЕЛЬСТВО О ДЕПОНИРОВАНИИ

№ 53

«31» мая 2024 года

Всероссийская государственная коллекция патогенных и вакцинных штаммов микроорганизмов-возбудителей инфекционных болезней животных депонировала для целей национальной патентной процедуры

31 мая 2024 года

авторский штамм микроорганизма *Candida dubushaemulonii* «M155-23SnC»

**Область применения штамма:** диагностический штамм

**Депозитор:** Российская Федерация, 109428, г. Москва, Рязанский проспект д. 24, корпус 1., 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)

Тел./факс (495) 970-03-69. E-mail: admin@viev.ru

**Автор (ы):** Капустин А.В., Овчинников Р.С., Самылина И.В., Савинов В.А.

**Штамму присвоен регистрационный номер:** F-89

Свидетельство выдано для подачи заявки на изобретение.

Заместитель директора по научной работе  
ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, д.б.н.

 / А.В. Капустин

Заведующий лабораторией диагностики и  
контроля антибиотикорезистентности  
возбудителей наиболее клинически  
значимых инфекционных болезней  
животных, к.б.н.

 / А.И. Лаишевцев

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

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)

Рязанский проспект, д. 24, корпус 1, Москва, 109428  
Тел./факс (495) 970-03-69. E-mail: admin@viev.ru

ПАСПОРТ ШТАММА МИКРООРГАНИЗМА

1. **Номер штамма в «Всероссийской государственной коллекции патогенных и вакцинных штаммов микроорганизмов-возбудителей инфекционных болезней животных»:** F-89
2. **Вид микроорганизма:** *Candida dubushaemulonii*
3. **Основание для депонирования:** референтный штамм для лабораторной диагностики кандидозов
4. **Патогенность:** в соответствии с классификацией микроорганизмов – возбудителей инфекционных заболеваний человека, простейших, гельминтов и ядов биологического происхождения по группам патогенности санитарных правил СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» грибы рода *Candida* относятся к четвертой группе патогенности.
5. **Заключение о группе патогенности:** не проверялось
6. **Дата, источник и место выделения:** июнь 2023 г., выделено с кожного покрова змеи, Москва
7. **Где идентифицирована культура:** лаборатория микологи и антибиотиков им. А.Х. Саркисова ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН
8. **Метод идентификации:** посредством изучения ферментативных свойств и масспектральным анализом
9. **Морфологические признаки:** сферические клетки, почкующиеся, могут формировать гифы псевдогипцилия
10. **Культуральные особенности:** на агаре Сабуро формируют округлые, белые, блестящие, выпуклые колонии с ровным краем.
11. **Биохимические свойства:** глюкоза +, мелибиоза -, лактоза -, мальтоза -, сахароза +, галактоза -, целлобиоза -, инозит -, ксилоза-, дульцит -, раффиноза +, трегалоза +, уреазная активность -.
12. **Серологические свойства:** не определялись
13. **Продукция антигенов, ферментов, токсинов:** не определялась
14. **Вирулентность для лабораторных животных, результаты биопробы, LD<sub>50</sub>:** не определялось
15. **Условия культивирования:** культура штамма растет на агаре Сабуро или сусло-агаре (рН 6,2-6,8) при температуре 26-28 °С. Срок инкубирования 72 часа.
16. **Условия хранения:** в лиофилизированном виде в ампулах. Объем лиофилизата составляет 1 см<sup>3</sup>.
17. **Организация-депонитор:** Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И.Скрябина и Я.Р. Коваленко российской академии наук (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН), Российская Федерация, 109428, г.Москва, Рязанский проспект д.24, корпус 1. Тел./факс (495)970-03-69. E-mail: [admin@viev.ru](mailto:admin@viev.ru)
18. **Авторы:** Капустин Андрей Владимирович, д.б.н.; Овчинников Роман Сергеевич, к.б.н.; Савинов Василий Александрович, к.б.н., Самылина Ирина Викторовна.
19. **Форма депонирования:** национальное патентное депонирование

Заместитель директора по научной работе  
ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, д.б.н.

 / А.В. Капустин

Заведующий лабораторией диагностики и  
контроля антибиотикорезистентности  
возбудителей наиболее клинически значимых  
инфекционных болезней животных, к.б.н.

 / А.И. Лашцев

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)**

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)**

Рязанский проспект, д. 24, корпус 1, Москва, 109428  
Тел./факс (495) 970-03-69. E-mail: admin@viev.ru

## СВИДЕТЕЛЬСТВО О ДЕПОНИРОВАНИИ

№ 52

«31» мая 2024 года

Всероссийская государственная коллекция патогенных и вакцинных штаммов  
микроорганизмов-возбудителей инфекционных болезней животных  
депонировала для целей национальной патентной процедуры  
31 мая 2024 года  
авторский штамм микроорганизма *Rhodotorula mucilaginosa* «ЗУ/3-23»

**Область применения штамма:** диагностический штамм

**Депозитор:** Российская Федерация, 109428, г. Москва, Рязанский проспект д. 24, корпус 1., 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)

Тел./факс (495) 970-03-69. E-mail: admin@viev.ru

**Автор (ы):** Капустин А.В., Овчинников Р.С., Самылина И.В., Савинов В.А.

**Штамму присвоен регистрационный номер:** F-88

Свидетельство выдано для подачи заявки на изобретение.

Заместитель директора по научной работе  
ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, д.б.н.

 / А.В. Капустин

Заведующий лабораторией диагностики и  
контроля антибиотикорезистентности  
возбудителей наиболее клинически  
значимых инфекционных болезней  
животных, к.б.н.

 / А.И. Лаишевцев

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

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)

Рязанский проспект, д. 24, корпус 1, Москва, 109428  
Тел./факс (495) 970-03-69. E-mail: admin@viev.ru

ПАСПОРТ ШТАММА МИКРООРГАНИЗМА

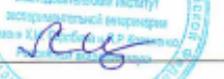
1. **Номер штамма в «Всероссийской государственной коллекции патогенных и вакцинных штаммов микроорганизмов-возбудителей инфекционных болезней животных»:** F-88
2. **Вид микроорганизма:** *Rhodotorula mucilaginosa*
3. **Основание для депонирования:** референтный штамм
4. **Патогенность:** в соответствии с классификацией микроорганизмов – возбудителей инфекционных заболеваний человека, простейших, гельминтов и ядов биологического происхождения по группам патогенности санитарных правил СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» грибы рода *Rhodotorula* не относятся ни к одной из групп патогенности.
5. **Заключение о группе патогенности:** не проверялось
6. **Дата, источник и место выделения:** январь 2023 г., выделено из фекалий уток, Ярославская область.
7. **Где идентифицирована культура:** лаборатория микологи и антибиотиков им. А.Х. Саркисова ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН
8. **Метод идентификации:** посредством изучения ферментативных свойств и масспектральным анализом
9. **Морфологические признаки:** сферические, почкующиеся клетки, гифы мицелия не формируются
10. **Культуральные особенности:** на агаре Сабуро образует кораллово-красные, блестящие, выпуклые колонии с ровным краем
11. **Биохимические свойства:** глюкоза -, мелибиоза -, лактоза -, мальтоза +, сахароза -, галактоза -, целлобиоза -, инозит -, ксилоза-, дульцит -, раффиноза -, трегалоза -, уреазная активность +
12. **Серологические свойства:** не определялись
13. **Продукция антигенов, ферментов, токсинов:** не определялась
14. **Вирulence для лабораторных животных, результаты биопробы, LD<sub>50</sub>:** не определялось
15. **Условия культивирования:** культура штамма растет на агаре Сабуро или сусло-агаре (рН 6,2-6,8) при температуре 26-28°C. Срок инкубирования 72 часа.
16. **Условия хранения:** в лиофилизированном виде в ампулах. Объем лиофилизата составляет 1 см<sup>3</sup>.
17. **Организация-депозитор:** Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И.Скрябина и Я.Р. Коваленко российской академии наук (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН). Российская Федерация, 109428, г.Москва, Рязанский проспект д.24, корпус 1. Тел./факс (495)970-03-69. E-mail: [admin@viev.ru](mailto:admin@viev.ru)
18. **Авторы:** Капустин Андрей Владимирович, д.б.н.; Овчинников Роман Сергеевич, к.б.н.; Савинов Василий Александрович, к.б.н., Самылина Ирина Викторовна.
19. **Форма депонирования:** национальное патентное депонирование

Заместитель директора по научной работе  
ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, д.б.н.

 / А.В. Капустин

Заведующий лабораторией диагностики и  
контроля антибиотикорезистентности  
возбудителей наиболее клинически значимых  
инфекционных болезней животных, к.б.н.



 / А.И. Лаишевцев

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ  
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)**

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)**

Рязанский проспект, д. 24, корпус 1, Москва, 109428  
Тел./факс (495) 970-03-69. E-mail: admin@viev.ru

**СВИДЕТЕЛЬСТВО О ДЕПОНИРОВАНИИ**

№ 54

«31» мая 2024 года

Всероссийская государственная коллекция патогенных и вакцинных штаммов микроорганизмов-возбудителей инфекционных болезней животных депонировала для целей национальной патентной процедуры  
31 мая 2024 года  
авторский штамм микроорганизма *Trichosporon asahii* «M4-23Sn»

**Область применения штамма:** диагностический штамм

**Депозитор:** Российская Федерация, 109428, г. Москва, Рязанский проспект д. 24, корпус 1., 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)

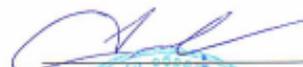
Тел./факс (495) 970-03-69. E-mail: admin@viev.ru

**Автор (ы):** Капустин А.В., Овчинников Р.С., Самылина И.В., Савинов В.А.

**Штамму присвоен регистрационный номер:** F-90

Свидетельство выдано для подачи заявки на изобретение.

Заместитель директора по научной работе  
ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, д.б.н.

 / А.В. Капустин

Заведующий лабораторией диагностики и  
контроля антибиотикорезистентности  
возбудителей наиболее клинически  
значимых инфекционных болезней  
животных, к.б.н.

 / А.И. Лаишевцев

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ

(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

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)

Рязанский проспект, д. 24, корпус 1, Москва, 109428  
Тел./факс (495) 970-03-69. E-mail: admin@viev.ru

ПАСПОРТ ШТАММА МИКРООРГАНИЗМА

1. Номер штамма в «Всероссийской государственной коллекции патогенных и вакцинных штаммов микроорганизмов-возбудителей инфекционных болезней животных»: F-90
2. Вид микроорганизма: *Trichosporon asahii*
3. Основание для депонирования: референтный штамм
4. Патогенность: в соответствии с классификацией микроорганизмов - возбудителей инфекционных заболеваний человека, простейших, гельминтов и ядов биологического происхождения по группам патогенности санитарных правил СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» грибные агенты рода *Trichosporon* относятся к четвертой группе опасности, является зоопатогенным
5. Заключение о группе патогенности: не проверялась
6. Дата, источник и место выделения: ноябрь 2023 г., выделено от змеи с подкожными поражениями, Москва.
7. Где идентифицирована культура: лаборатория микологии и антибиотиков им. А.Х. Саркисова ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.
8. Методы идентификации: посредством изучения ферментативных свойств и масспектральным анализом.
9. Морфологические признаки: на агаре Сабуро после 72 часов инкубации при 28°C образуются настоящие гифы, которые распадаются на прямоугольные артроконидии с закругленными концами размером примерно 3-4 x 4-7 мкм.
10. Культуральные особенности: колонии от белого до кремового цвета, слегка мучнистые в центре, с широким краем, содержащим глубокие поперечные трещины. Размер колонии после 7 дней инкубации составляет 16-24 мм.
11. Биохимические свойства: глюкоза +, мелибиоза -, лактоза -, мальтоза +, сахароза -, галактоза +, целлобиоза +, инозит -, ксилоза+, дульцит -, раффиноза -, трегалоза +, уреазная активность +.
12. Серологические свойства: не определялись.
13. Продукция антигенов, ферментов, токсинов: не определялась
14. Вирулентность для лабораторных животных: результаты биопробы, LD<sub>50</sub>: не определялась
15. Условия культивирования: культура штамма растет на агаре Сабуро или сусло – агаре (рН 6,2-6,8) при температуре от 26-28 °С. Срок инкубирования 24 часа.
16. Условия хранения: в лиофилизированном виде в ампулах. Объем лиофилизата составляет 1 см<sup>3</sup>.
17. Организация-депозитор: Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И.Скрябина и Я.Р. Коваленко российской академии наук (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН). Российская Федерация, 109428, г.Москва, Рязанский проспект д.24, корпус 1. Тел./факс (495)970-03-69. E-mail: [admin@viev.ru](mailto:admin@viev.ru)
18. Авторы: Капустин Андрей Владимирович, д.б.н.; Овчинников Роман Сергеевич, к.б.н.; Савинов Василий Александрович, к.б.н., Самылина Ирина Викторовна.
19. Форм депонирования: национальное патентное депонирование

Заместитель директора по научной работе  
ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, д.б.н.

Заведующий лабораторией диагностики и  
контроля антибиотикорезистентности  
возбудителей наиболее клинически значимых  
инфекционных болезней животных, к.б.н.



/ А.В. Капустин

/ А.И. Лаишевцев

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
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)

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель академика-секретаря  
Отделения сельскохозяйственных  
наук РАН, руководитель секции  
«Зоотехния и ветеринария»,  
академик РАН

 Н.А. Зиновьева  
« 07.05.2024 » г.

**Методические рекомендации  
по лабораторной диагностике кандидозов животных**

Москва 2024

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
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)

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель академика-секретаря  
Отделения сельскохозяйственных  
наук РАН, руководитель секции  
«Зоотехния и ветеринария»,  
академик РАН

  
«15» август 2024 г.

**Методические рекомендации  
по лабораторной диагностике малассезиозов животных**

Москва 2024



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ  
СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

**C12N 1/16** (2006.01)**C12Q 1/04** (2006.01)**C12R 1/72** (2006.01)

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: действует (последнее изменение статуса: 10.01.2025)  
Пошлина: учтена за 5 год с 20.07.2028 по 19.07.2029. Установленный срок для уплаты пошлины за 6 год: с 20.07.2028 по 19.07.2029. При уплате пошлины за 6 год в дополнительный 6-месячный срок с 20.07.2029 по 19.01.2030 размер пошлины увеличивается на 50%.

(52) СПК

**C12N 1/165** (2024.08); **C12Q 1/04** (2024.08); **C12R2001/72** (2024.08)(21)(22) Заявка: **2024120449**, 19.07.2024(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
**19.07.2024**Дата регистрации:  
**09.01.2025**

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: **19.07.2024**(45) Опубликовано: **09.01.2025** Бюл. № **1**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **WO 2018213641 A1**, 22.11.2018, **ВОАТТО HUMBERTO FABIO ET AL.**, **Candida duobushaemulonii: an emerging rare pathogenic yeast isolated from recurrent vulvovaginal candidiasis in Brazil**, Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2016, v. 111, n.6, p. 407-410, **KUMAR ANIL ET AL.**, Simple low cost differentiation of *Candida auris* from *Candida haemulonii*

complex using **CHROMagar Candida medium supplemented with Pal's medium**, Rev Iberoam Micol, 2017, v.34, n.2, p.109-111, **RU 2809386 C1**, 11.12.2023, **ОГАНЕСЯН Э.Г. И ДР. К ВОПРОСУ О ПРОБЛЕМАХ ИДЕНТИФИКАЦИИ CANDIDA AURIS, ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ**, 2022, т.24, н.3, с.54-61.

Адрес для переписки:

**109428, Москва, Рязанский пр-кт, 24, корп. 1, ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН**

(72) Автор(ы):

**Овчинников Роман Сергеевич (RU), Самылина Ирина Викторовна (RU), Савинов Василий Александрович (RU), Капустин Андрей Владимирович (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)**

(54) **Штамм дрожжевого гриба вида *Candida duobushaemulonii*, предназначенный для использования в качестве референтного для фенотипической идентификации при лабораторной диагностике кандидозов**

Исх. № 07-01/11 от 07.11.2024

**ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН**  
ИНН 7721017821 ОГРН 1037700258870  
109428, г. Москва, пр-кт Рязанский, 24,  
корп. 1

## **Информационное письмо о проведенных работах в рамках соглашения о научном сотрудничестве № 18-01/07 от 25.07.2024**

Настоящим письмом сообщаем Вам, что в рамках заключенного между ООО «Альгимед Техно» и Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Федеральный научный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко Российской академии наук» (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН) Соглашения о научном сотрудничестве № 18-01/07 от 25.07.2024 (далее – Соглашение) в период с 25.07.2024 по 27.08.2024 были проведены работы по описанию и внесению в базу данных масс-спектрометра «АЛМАСС Био» неидентифицированных образцов грибов с последующим подтверждением их идентификации сотрудниками ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, а именно и.о. заведующим лабораторией микологии и антибиотиков Овчинниковым Романом Сергеевичем и аспирантом лаборатории микологии и антибиотиков Самылиной Ириной Викторовной.

В качестве объектов исследования использовали 18 штаммов дрожжевых грибов, выделенных от животных в лаборатории микологии и антибиотиков ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН. При первичной идентификации на масс-спектрометре «АЛМАСС Био» достоверность идентификации (score) для данных штаммов был менее 1,7, т.е. штаммы не удалось идентифицировать. Затем штаммы были подвергнуты секвенированию по региону ITS, что позволило определить их видовую принадлежность.

Для внесения данных в базу получали 30 масс-спектров каждого штамма дрожжевого гриба для создания усредненного характеристического масс-спектра (из них три биологических повторности и по десять технических повторностей для каждой биологической). Все масс-спектры были получены с помощью метода пробоподготовки экстракции микроорганизмов муравьиной кислотой. При получении масс-спектров обращали внимание на качество белковых пиков и отсутствие шумов.

Далее в программу Microbe Analysis загружали полученные результаты, выбирали соответствующие настройки и вводили родовое и видовое наименование дрожжевого гриба, согласно полученным результатам секвенирования. Затем создавали новый раздел в библиотеке с новым полученным штаммом. После нажатия кнопки "Добавить" усредненный масс-спектр был добавлен в библиотеку согласно до этого заданным параметрам.

Таким образом, в базу масс-спектрометра «АЛМАСС Био» были внесены масс-спектры 17 новых видов грибов (18 штаммов), ранее отсутствовавших в базе данных. Каждый штамм был внесен в базу MALDI-TOF Microbe Analysis под своим уникальным номером (ALG0001-ALG0018). Перечень внесенных штаммов представлен в таблице ниже:

№	№ в базе данных	Название вида	Лабораторный № штамма
1	ALG0001	<i>Cystobasidium pallidum</i>	4-24Bov
2	ALG0002	<i>Kazachstania pintolopesii</i>	6-24Owl
3	ALG0003	<i>Kazachstania aerobia</i>	8477-23Bov
4	ALG0004	<i>Candida saitoana</i>	M116-24Eq
5	ALG0005	<i>Debaromyces hansenii</i>	M117-24Eq
6	ALG0006	<i>Naganishia globosa</i>	M182-24Cf
7	ALG0007	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	M271-24Ef
8	ALG0008	<i>Pseudozyma pruni</i>	M339-23Fc
9	ALG0009	<i>Cystofilobasidium ferigula</i>	M428-24Ps
10	ALG0010	<i>Cutaneotrichosporon moniliiforme</i>	M434-24Cf
11	ALG0011	<i>Naganishia albida</i>	M444-24Ps
12	ALG0012	<i>Filobasidium oeirense</i>	M445-24Ps
13	ALG0013	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>	M449-24Ps
14	ALG0014	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	M494-23Md
15	ALG0015	<i>Trichosporon aquatile</i>	M511-24Cf
16	ALG0016	<i>Rhodotorula glutinis</i>	П73-24Ps
17	ALG0017	<i>Filobasidium magnum</i>	M422-24Ps
18	ALG0018	<i>Kwoniella pini</i>	Pch20/1-23

После внесения в базу данные штаммы были повторно идентифицированы на МАЛДИ-ВМС «АЛМАСС Био». Значение уровня достоверности идентификации (score) для всех штаммов составил более 2,0, что свидетельствует о высокой точности идентификации до уровня вида.

Таким образом, проведенные работы расширили возможности масс-спектрометра «АЛМАСС Био» и позволили проводить видовую идентификацию 17 новых видов грибов в дополнение к уже имеющимся в базе данных прибора.

Благодарим за плодотворное сотрудничество и надеемся на продолжение партнерских отношений!

С уважением,  
Исполнительный директор



Ластовская В.Н.