

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

кандидата биологических наук, доцента Сачивкиной Надежды Павловны на диссертационную работу Самылиной Ирины Викторовны на тему «Видовой состав, распространенность и характеристика биологических свойств оппортунистических грибковых патогенов животных», представленную в диссертационный совет 24.1.249.01 на базе ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской Академии Наук» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.2.3 – инфекционные болезни и иммунология животных.

Актуальность темы. Микозы у животных приобретают всё большее эпизоотическое и клиническое значение. Возрастает число заболеваний, вызванных оппортунистическими грибами, ранее считавшимися непатогенными. Эти инфекции чаще развиваются при снижении иммунной защиты и нередко протекают в тяжёлой системной форме. Их диагностика и лечение остаются сложными задачами, что подчёркивает актуальность углублённых исследований в данной области. Оппортунистические микозы представляют растущую угрозу в ветеринарии. Диагностика затруднена из-за неспецифичности симптомов и необходимости применения специализированных методов. С развитием молекулярных технологий появляются новые подходы к идентификации патогенов, включая MALDI-TOF MS. Однако для эффективного применения требуется адаптация методик и расширение баз данных с учётом региональных штаммов. Ограниченность антимикотических средств, рост резистентности грибов и дефицит знаний у специалистов усугубляют ситуацию. В связи с этим актуальны исследования, направленные на изучение этиологии, совершенствование диагностики и повышение эффективности терапии микозов у животных.

Новизна исследования и полученных результатов. Автором получены актуальные данные о распространённости и видовом составе оппортунистических дрожжевых грибов у животных, включая возбудителей кандидозов, малассезиозов, родоторулёзов, трихоспоронозов и феогифомикозов. Впервые на территории Российской Федерации от животных были выделены и охарактеризованы редкие возбудители кандидозов: *Candida zeylanoides*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. peltata*, *C. douebushaemulonii*, *C. saitoana*, а также представители рода *Cryptococcus* — *C. albidus*, *C. uniguttulatus*, *C. liquefaciens*, *C. ferigula*, *C. oeiensis*, *C. magnum*. Кроме того, выделены и описаны редкие виды дрожжевых грибов: *Cutaneotrichosporon moniliiforme*, *Debaryomyces nepalensis*, *Pseudozyma pruni*, *Kazachstania aerobia*, *K. pintolopesii*, *Cystobasidium pallidum*, *Kwoniella pini* и *Naganishia globosa*. Проведено определение чувствительности широкого спектра дрожжевых оппортунистов к антимикотическим препаратам с использованием количественной оценки минимальной ингибирующей концентрации (МИК). Получен репрезентативный набор масс-спектров для 18 штаммов дрожжевых грибов и внесён в базу данных российского масс-спектрометра, что расширяет

Вх. № 08
13 мая 2025 г.

возможности их идентификации методом MALDI-TOF MS. Также изучена способность к биоплёнкообразованию у штаммов *C. famata*, *C. krusei*, *C. lipolytica*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Aureobasidium pullulans* и *Trichosporon asahii*, выделенных от животных, что имеет важное значение для оценки их патогенного потенциала и устойчивости к терапии.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и заключений обусловлены методически правильно подобранными этапами проведения изысканий, классическими и современными методами анализа экспериментальных данных.

Оценка содержания диссертации. Диссертационная работа изложена на 169 страницах компьютерной верстки. Включает введение, обзор литературы, собственные исследования, в которых представлены материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов, заключение, практические предложения, список литературы и приложения. Диссертация иллюстрирована 22 таблицами, 38 рисунками. Библиография включает 196 источников, в том числе 153 иностранных авторов.

Во «ВВЕДЕНИИ» обоснована актуальность темы исследования, дана информация о современном состоянии проблемы, поставлена цель, определены задачи исследований, отражены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология и методы исследований, основные положения, выносимые на защиту, степень достоверности, апробация результатов исследования.

В ПЕРВОЙ ГЛАВЕ представлен анализ монографической и периодической литературы, касающийся вопросов значимости микозов для ветеринарии в современном мире. Описана клиническая значимость оппортунистических грибов рода *Candida*, *Malassezia* и других редких родов грибов-оппортунистов. Также представлены литературные данные о механизме действия противогрибковых препаратов и о формировании устойчивости к ним.

Диссертант отмечает, что оппортунистические микозы животных, вызываемые дрожжевыми и плесневыми грибами, становятся всё более распространёнными и наносят существенный экономический ущерб, особенно в животноводстве. Появляются новые возбудители, ранее не ассоциировавшиеся с патологией, однако данные о распространённости и видовом составе микозов у животных в России крайне ограничены. Также диссертант указывает, что традиционные методы микологической диагностики сохраняют значимость, но требуют дополнения современными технологиями, такими как MALDI-TOF MS, эффективность которых зависит от полноты базы данных и стандартизации протоколов. Помимо этого, нерешёнными остаются вопросы, связанные с идентификацией редких видов грибов, их лекарственной чувствительностью и отсутствием нормативных документов по диагностике. Расширение спектра микозов, их зоонозный потенциал и влияние на биоразнообразие подчёркивают необходимость углублённых исследований, направленных на совершенствование методов диагностики, мониторинга и разработки эффективных стратегий контроля.

В главе «МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ» приведены подробные характеристики используемых штаммов, методики выделения и культивирования грибов, алгоритмы проведения MALDI-TOF MS-идентификации, оценки минимальных ингибирующих концентраций противогрибковых препаратов и другие методы исследований

Результаты исследований и их обсуждение представлены в ГЛАВЕ 4. В подглаве 4.1 Самылина И.В. представила результаты по изучению видового состава, распространенности и локализации инфекционно-значимых грибов у животных. Установлено, что 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). При этом встречаемость грибов-оппортунистов варьирует у животных разных видов. Среди плесневых грибов всего идентифицировано 14 разных родов: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Mucor*, *Scopulariopsis*, *Geomyces*, *Geotrichum*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Chaetomium*, *Sporothrix*, *Chrysosporium*. При идентификации дрожжевых грибов классическими методами возникли определенные трудности. Имеющиеся тесты позволили соискателю 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.

В подглаве 4.2. описаны результаты работ по внедрению метода MALDI-TOF MS для идентификации дрожжевых грибов. Диссертантом был проведен опыт по сравнению трех 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. В ходе проведенного исследования было установлено, что оптимальным методом является расширенный метод – 93,3% изолятов определены до рода, 96,7% определены до вида.

В дальнейшем диссертантом был использован расширенный метод пробоподготовки для видовой идентификации дрожжевых грибов с помощью масс-спектрометрического анализа. Из 215 исследуемых 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. Учитывая, что среди неидентифицированных видов могли быть нетривиальные инфекционно-значимые грибы, диссертантом было решено выполнить работу по их точной видовой идентификации, характеристике биологических свойств, получению масс-спектров и внесению их в базу данных масс-спектрометра «АЛМАСС-Био 200». Для установления вида неидентифицированных методом MALDI-TOF 18 изолятов грибов секвенировали и определили точную видовую принадлежность, в

дальнейшем все они были охарактеризованы морфологически, описаны биохимические свойства, также была изучена чувствительность к противогрибковым препаратам, определена минимальная ингибирующая концентрация для каждого вида и определена фосфолипазная активность. После внесения нуклеотидных последовательностей в базу Genbank NCBI, были получены масс-спектры данных штаммов и внесены в базу данных масс-спектрометра MALDI-TOF Microbe Analysis (версия 1.0.0.0). 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.

Далее диссертантом было продолжено исследование видового состава дрожжевых оппортунистических грибов у животных с помощью метода MALDI-TOF. Результаты исследования представлены в **подглаве 4.3**. Было идентифицировано 13 различных родов (*Candida*, *Malassezia*, *Aureobasidium*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Cryptococcus*, *Cutaneotrichosporon*, *Pseudozyma*, *Debaryomyces*, *Kazachstania*, *Cystobasidium*, *Kwoniella*, *Naganishia*), среди которых доминируют *Malassezia* и *Candida*. Далее диссертантом описано видовое разнообразие каждого рода, также локусы выделения и морфология дрожжевых грибов. 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).

В подглаве 4.4. соискатель представил данные о чувствительности к противогрибковым препаратам. Чувствительность изолятов дрожжевых грибов к противогрибковым препаратам (кетоконазолу, клотримазолу, итраконазолу, флуконазолу, вориконазолу, нистатину и амфотерицину В) определяли диско-диффузионным методом.

Установлено, что чувствительность видов рода *Candida* к противогрибковым препаратам существенно различается. Наибольшую активность в большинстве случаев проявили нистатин и вориконазол. Так, более 90% изолятов *C. albicans*, *C. famata* и *C. guilliermondii* чувствительны к нистатину, тогда как чувствительность к итраконазолу и амфотерицину В оставалась на низком уровне (10–25%). У *C. parapsilosis*, *C. zeylanoides* и *C. catenulata* также выявлена высокая эффективность нистатина и вориконазола при устойчивости к итраконазолу. *C. krusei* характеризовалась высокой резистентностью к антимикотикам, за исключением нистатина (93,5%).

В целом, среди исследованных изолятов прослеживается устойчивая тенденция - высокая чувствительность к нистатину и вориконазолу при одновременной резистентности к итраконазолу и амфотерицину В, как у распространённых, так и у редких видов *Candida*. Изоляты *A. pullulans* оказались наиболее чувствительными к нистатину (100%), флуконазолу (93,5%), клотримазолу (86,8%) и кетоконазолу (85,3%). Амфотерицин В продемонстрировал высокую активность

исключительно в отношении грибов этого рода (80,6%). Наименьшая чувствительность отмечена к итраконазолу и вориконазолу — по 48,4%.

Для грибов родов *Trichosporon* наибольшая чувствительность выявлена к нистатину (83,2%) и вориконазолу (88,7%). Остальные препараты показали низкую активность (менее 15%), амфотерицин В оказался полностью неэффективным (0%). Для грибов рода *Rhodotorula* наиболее широким спектром обладали нистатин (77,9%) и вориконазол (63,8%). Эффективность остальных препаратов составила менее 25%. Для грибов рода *Cryptococcus* наибольшую эффективность проявил нистатин (94,3%), а также клотримазол (51,4%). Эффективность остальных препаратов была менее 25%.

Соискателем отмечена высокая встречаемость полирезистентных штаммов, устойчивых к двум и более классам антимикотиков, с вариабельностью от 24% до 93% в зависимости от рода. Среди *Candida* spp. их доля составила 43,1%, *M. pachydermatis* — 24,1%, *R. mucilaginosa* — 70,1%, *Trichosporon* spp. — 92,8%, *Cryptococcus* spp. — 69,5%. У *A. pullulans* полирезистентные штаммы не выявлены. Зафиксированы также мультирезистентные изоляты, чувствительные лишь к одному из семи препаратов, преимущественно среди родов *Trichosporon* и *Rhodotorula*.

Далее диссертантом была проведена оценка минимальной ингибирующей концентрации антимикотиков для выделенных штаммов дрожжевых грибов, результаты которой представлены в подглаве 4.5. Полученные данные по рекомендации соискателя могут применяться для эмпирической терапии дрожжевых микозов.

В подглаве 4.6. изучалось образование биопленок дрожжевыми грибами. Интенсивность биопленкообразования варьировала у грибов от 0,223 OD у *C. albicans* до 0,334 OD у *C. parapsilosis*. Также высокий уровень образования биопленок обнаружили у *C. lipolytica* (0,305 OD). Виды *C. famata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* проявили биопленкообразование на уровне 0,22 – 0,26 OD, что сопоставимо с *C. albicans* (0,22 OD). Виды *A. pullulans*, *T. asahii* и *R. mucilaginosa* продемонстрировали выраженную способность к биопленкообразованию, в ряде случаев превосходя *C. albicans* по интенсивности.

В целом диссертант выполнил значительный объем исследований, в результате которых получены новые данные для науки и практики, имеющие фундаментальное и прикладное значение.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации. Автореферат соответствует тексту диссертации и оформлен в соответствии с требованиями ВАК Российской Федерации и ГОСТ Р 7.0.11-2011 «Диссертация и автореферат диссертации. Структура и правила оформления», утвержденного приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии №811-ст от 13.12.2011 г.

Подчеркивая актуальность, новизну и значимость исследований, считаю необходимым высказать ряд вопросов и замечаний:

1. Проводили ли вы исследования по распространенности грибво-оппортунистов у здоровых животных?
2. Как отличить оппортунистический патоген от представителя нормальной микробиоты?
3. Какие могут быть рекомендованы меры по лечению и профилактики дрожжевых микозов? Возможность создания вакцин?
4. Встречаются отдельные технические опечатки и стилистические погрешности в предложениях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Самылиной Ирины Викторовны на тему «Видовой состав, распространенность и характеристика биологических свойств оппортунистических грибковых патогенов животных», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является самостоятельной, законченной научно-квалификационной работой и соответствует паспорту специальности 4.2.3 – инфекционные болезни и иммунология животных. Диссертация по актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов, по объему и уровню проведенных исследований соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (пп. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от №842 от 24 сентября 2013 г. (ред. от 25.01.2024) «О порядке присуждения учёных степеней» (вместе с «Положением о присуждении ученых степеней»), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.2.3 – инфекционные болезни и иммунология животных.

Официальный оппонент: Сачивкина Надежда Павловна
кандидат биологических наук, доцент
(03.02.03-микробиология, 2018 г.)

кафедры микробиологии им В.С. Киктенко

Медицинский институт, Федеральное государственное автономное образова-
тельное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы
народов» (ФГАОУ ВО РУДН)

117198, г. Москва,

ул. Миклухо-Маклая, 6

Тел.: 8 919-962-63-09; e-mail: sachivkina@yandex.ru.

Подпись Сачивкиной Н.П. заверяю:

Ученый секретарь Ученого совета

Медицинского института

ФГАОУ ВО «РУДН»

к. фарм. н., доцент

