

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
ОКПО 00496165, ОГРН 1037700258870, ИНН/КПП 7721017821/772101001

№ 917/22 от «02» мая 2024 г.
на № _____ от _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН,
чл.-корр. РАН, д-р ветеринарных наук,


Гулюкин А. М.
_____ 2024 г.



ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу Смагуловой Айнуры Муратовны на тему «Фенотипические и молекулярно-генетические свойства возбудителей дерматомикозов мелких домашних и диких плотоядных животных», представленной к защите в диссертационный совет 24.1.211.02 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Сибирский федеральный научный центр агробιοтехнологий Российской академии наук» (СФНЦА РАН) на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 4.2.3. – инфекционные болезни и иммунология животных и 1.5.6 – биотехнология.

Актуальность темы. Дерматофиты – кератинофильные грибы, принадлежащие к семейству Arthrodermataceae (Onygenales, Ascomycota), включающему десятки родственных видов, различающихся в основном по их анаморфам или бесполом формам, которые объединены в три классических рода: Trichophyton, Microsporum и Epidermophyton (Y. Graser et al., 2008; С.Н. Ковалев и соавт., 2014; А.С. Потоскуева, 2021). Роды Trichophyton и Microsporum включают антропофильные, зоофильные и геофильные виды дерматофитов, которые способны вызывать инфекцию преимущественно у людей или животных, а также встречаются в почве в качестве свободноживущих организмов. Заболевания, вызываемые этими грибами, – дерматофитозы – распространены по всему миру, число случаев заражения ежегодно увеличивается не только у животных, но и у людей. Особое значение имеет распространение дерматофитозов среди мелких домашних животных – кошек и собак, являющихся компаньонами человека. Microsporum canis и Trichophyton mentagrophytes являются наиболее значимыми видами дерматофитов, поражающих собак, кошек и других плотоядных.

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

Дерматофитозы наносят значительный экономический ущерб, связанный с длительным лечением дорогостоящими противогрибковыми препаратами и санитарно-дезинфекционными мероприятиями. Учитывая легкость передачи возбудителя от животных к человеку, борьба с дерматофитозами имеет не только ветеринарное, но и медицинское значение.

До недавнего времени диагностика дерматофитозов основывалась на анализе клинических признаков заболевания, которые ненадежны из-за изменчивого характера дерматологических поражений и сходства с другими кожными заболеваниями, имитирующими симптомы, характерные для дерматофитозов (М.М. Ibrahim et al., 2023). Прямое микроскопическое исследование проб биологического материала, отобранных из очагов поражений, и выделение культур дерматофитов на питательных средах являются золотым стандартом диагностики дерматофитозов. Идентификация обычно проводится на основании макро- и микроморфологических признаков.

Однако в некоторых случаях для видовой идентификации может потребоваться дополнительное изучение биохимических свойств выделенных культур дерматофитов. Видовая идентификация дерматофитов на основе изучения фенотипических свойств является трудоемким процессом, требующим больших затрат времени и высокой квалификации исследователей (S.E. Kidd, G.F. Weldhagen, 2022).

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

Актуальной задачей является мониторинг этиологической структуры дерматофитозов, выявление новых видов возбудителей, характеристика их фенотипических и генотипических признаков. Для лабораторной диагностики актуально внедрение новых методов ускоренной диагностики дерматофитозов, в

частности, на основе ПЦР (полимеразной цепной реакции). Это позволит значительно улучшить диагностику, повысить эффективность борьбы с дерматофитозами. Исходя из этого, выбранная тематика диссертационной работы представляется актуальной и требующей всестороннего изучения.

Новизна исследований и полученных результатов состоит в том, что получены актуальные данные по этиологической структуре и клинико-эпизоотологическим особенностям дерматофитозов плотоядных. Впервые на территории Западной Сибири выделены, идентифицированы и охарактеризованы штаммы дерматофита *Trichophyton benhamiae* как возбудителя дерматофитоза кошек. Получено 19 штаммов *Microsporum canis* – возбудителей микроспории плотоядных, продуцентов специфических антител. Разработан способ получения цветного антигена для использования в модифицированной реакции роз бенгал пробы для диагностики микроспории у кошек и собак. Разработан непрямой вариант ИФА для диагностики микроскопии плотоядных.

Автором изучены филогенетические связи различных штаммов видов *M. canis* и *T. benhamiae*, подобраны пары праймеров для их видовой идентификации, разработан протокол постановки полимеразной цепной реакции для генетической идентификации грибов *Microsporum canis* и *Trichophyton benhamiae*.

Значимость результатов диссертационного исследования для науки и практики. Теоретическая и практическая значимость работы обусловлены вкладом в совершенствование диагностики и терапии дерматофитозов домашних животных. Цветной антиген и иммунная сыворотка используются в качестве компонентов при постановке реакции роз бенгал пробы для экспресс-диагностики микроспории кошек и собак в диагностических ветеринарных лабораториях. Непрямой вариант ИФА с использованием в качестве специфического компонента растворимого белкового антигена *M. canis* рекомендуется использовать для серологической диагностики микроспории плотоядных.

Автором предложен метод ПЦР для молекулярно-генетической идентификации дерматофитов *T. benhamiae* и *M. canis*. Нуклеотидные последовательности штаммов грибов *M. canis* и *T. benhamiae* депонированы в международной базе данных GenBank NCBI и могут быть использованы для сравнительного анализа генома возбудителей и биоинформационного анализа мировым научным сообществом.

Получены данные о чувствительности *M. canis* и *T. benhamiae* к противогрибковым препаратам, что позволяет оптимизировать терапию дерматофитозов животных.

Также автором разработаны и утверждены в установленном порядке «Методические рекомендации по выделению и идентификации *Trichophyton benhamiae* – возбудителя дерматомикозов кошек».

Достоверность и обоснованность диссертационного исследования. Основные положения работы, практические предложения и заключение, сформулированные в диссертационной работе, соответствуют поставленным целям и задачам. Научные

данные получены автором с помощью общепринятых микологических, серологических и молекулярно-генетических методик, с использованием надлежащего оборудования на Научно-исследовательской платформе сельскохозяйственной биотехнологии.

Данные подвергнуты статистической обработке, а также анализу с использованием международных баз данных (GenBank NCBI). О достоверности исследования говорит обширный иллюстративный материал и полученные в ходе исследования нуклеотидные последовательности, часть из которых депонирована в базе данных GenBank. Достоверность результатов также подтверждается пакетом документов, куда входят справки о депонировании штаммов в коллекции культур, справки о депонировании штаммов в GenBank, справки о внедрении результатов НИР. По теме исследования автором получено 3 патента.

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

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

В разделе «Введение» обосновывается актуальность выбранной темы, описывается степень разработанности темы исследования, ставятся цели и задачи работы. Также обосновывается научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Представлена методология исследования и положения, выносимые на защиту. Описаны степень достоверности и апробация результатов исследования, сведения о публикациях, личный вклад автора, структура и объем диссертации, а также выражены благодарности.

«Обзор литературы» содержит современные научные данные о дерматофитозах животных и их возбудителях – грибах-дерматофитах. Представлена характеристика основных видов дерматофитов, данные по этиологии и клинико-эпизоотологическим особенностям дерматофитозов. Подробно описаны культурально-морфологические и биохимические свойства дерматофитов родов *Microsporium* и *Trichophyton*. Проанализированы существующие методы лабораторной диагностики дерматофитозов, с акцентом на серологические и молекулярно-генетические методы. Анализ источников литературы раскрывает предпосылки проводимого исследования, определяет методические подходы.

«Материалы и методы» содержат подробное описание использованных микологических, серологических, биохимических, иммунологических и молекулярно-генетических методов. Приводятся методы статистической обработки данных. Этот раздел демонстрирует проработанность дизайна исследования и методологических подходов.

«Результаты собственных исследований» детально отражают суть и объем проведенных автором исследований. Представлены результаты изучения распространенности и этиологической структуры дерматофитозов среди животных-компаньонов в г. Астана за более чем 10-летний период (2012-2023 г). Подробно описаны клинико-эпизоотологические особенности заболевания, такие как сезонность, клинические формы, включая атипичные. Дана подробная культурально-морфологическая характеристика изолятов дерматофитов, выделенных от больных животных. Большой научный интерес и практическую значимость представляют данные по чувствительности грибов-дерматофитов к противогрибковым препаратам. Значительная часть исследований посвящена получению дерматофитных антигенов, изучению их иммуногенных свойств и разработке метода непрямого ИФА для диагностики микроспории. Также представлены результаты изучения молекулярно-генетической характеристики дерматофитов, включая филогенетический анализ штаммов различного происхождения.

В разделе «Обсуждение» проводится анализ собственных результатов в сравнении с литературными данными. Полученные результаты, в частности, позволяют рекомендовать разработанный непрямой вариант иммуноферментного анализа с растворимым антигеном *M. canis* в качестве диагностического теста для выявления микроспории плотоядных. Подобраны оптимальные праймеры и режимы постановки ПЦР для идентификации дерматофитов родов *Trichophyton* и *Microsporium*.

В «Заключении» автор делает выводы по проделанной работе, которые соответствуют поставленным целям и задачам. Также автор вносит практические предложения, которые могут использоваться в ветеринарии для диагностики дерматофитозов животных.

Рекомендации ведущей организации по использованию результатов научных исследований. Полученные диссертантом результаты могут быть использованы:

- для улучшения терапии дерматофитозов с учетом данных о чувствительности грибов к противогрибковым препаратам;
- для диагностики дерматофитозов кошек, вызванных видом *T. benhamiae*;
- для серологической диагностики микроспории плотоядных методом непрямого ИФА;
- для филогенетического анализа возбудителей дерматофитозов с использованием нуклеотидных последовательностей, депонированных в базе данных GenBank NCBI;
- фотоматериалы по макро- и микроморфологии грибов-дерматофитов могут использоваться для обучения студентов и ветеринарных специалистов.

Соответствие диссертации и автореферата критериям «Положения о присуждении ученых степеней». Автореферат содержит основные разделы диссертации и в полном объеме раскрывает ее научные положения. Выводы и практические предложения, представленные в автореферате и диссертации, не отличаются. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 4.2.3. – инфекционные болезни и иммунология животных по п. 4 – «Генетика, селекция, культивирование микроорганизмов, разработка, стандартизация, технология и контроль производства иммунобиопрепаратов (вакцин, сывороток, диагностических тест-систем)»; по п. 7 – «Диагностика инфекционных болезней животных (эпизоотологическая, клиническая, патоморфологическая, серологическая, молекулярная), индикация патогенных микроорганизмов»; по п. 8 – «Популяционный уровень явлений патологии животных, заболеваемость и эпизоотический процесс, общие и частные вопросы эпизоотологии инфекционных болезней животных»; по п. 16 – «Инфекционные болезни, общие животным и человеку», а также паспорту специальности 1.5.6 – биотехнология, по п. 11 – «Биотехнологии для ветеринарии и животноводства, включая аквакультуру» и п. 24 – «Иммунобиотехнология».

Оценка содержания диссертации, её завершенности в целом. В целом диссертационная работа и автореферат демонстрируют хорошую структуру, научный подход к изложению материала и использование актуальной терминологии. Исследование выполнено на хорошем современном уровне, содержание диссертации соответствует поставленным целям и задачам. Особенно стоит отметить качественные иллюстрации работы, что улучшает восприятие представленных данных.

В ходе выполнения работы автором были получены новые данные, представляющие научную ценность. Диссертация представляет логически цельную завершенную научно-квалификационную работу, в которой предложены решения задач, актуальных для ветеринарии, в частности, для повышения эффективности борьбы с инфекционными болезнями животных.

Подтверждение основных результатов диссертации в печати. По теме диссертации опубликовано 23 работы, в том числе 4 публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, 4 публикации в изданиях,

индексированных в базе данных рецензируемой научной литературы Scopus, 3 патента, и 12 публикаций в других изданиях.

Замечания и недостатки. Оценивая положительно диссертационную работу в целом, хотелось бы высказать некоторые замечания и получить ответы на следующие вопросы:

- в табл. №1 не указаны видовые названия выявленных возбудителей дерматомикозов, указана лишь принадлежность к родам - *Trichophyton* spp. и *Microsporum* spp.;
- на рисунках (диаграммах) № 24, 25, 26 приведена степень активности ферментов. Прокомментируйте, в каких единицах она измерялась?
- на стр. 87, 88 по результатам непрямого ИФА приводятся как показатели титров, так и показатели оптической плотности (ОП). Какой из этих показателей имеет большую диагностическую значимость и почему?
- какие проявления дерматомикозов были у больных кошек и собак (таблицы 7 и 8)? Это имеет значение для диагностической интерпретации результатов ИФА.

Замечания по диссертационной работе:

- автор параллельно использует термины «дерматофитозы», «дерматофитии», «дерматомикозы», но в рамках одной работы лучше придерживаться единой терминологии;
- автор в работе не указывает номера штаммов, с которыми проводили исследования, например, при серологических исследованиях (стр. 80, 81, 82) не указаны номера штаммов, из которых получены антигены. В разделе 2.2.10 не указаны номера штаммов, которые автор подвергал секвенированию, что не позволяет интерпретировать табличные данные;
- стр. 79 – не указано, с какими сыворотками ставили реакции РКА и РБП, нет данных о животных каких видов и как именно получены эти сыворотки (экспериментальная иммунизация или естественная инфекция);
- стр. 80. «При появлении кольца на дне лунки результат учитывали как свидетельство того, что животное переболело или находится в инкубационном периоде». Не представлены данные по животным, которые позволяли бы так интерпретировать результаты.
- стр. 82. «Считаем, что наличие преципитирующих свойств у антигенов штамма *T. benhamiae* №19 объясняется его иммуногенностью. На это также указывают более высокая скорость роста, образование более интенсивной пигментации...». Данное утверждение не аргументировано, приведенные свойства штамма не имеют прямой корреляции с иммуногенностью.
- в практическом предложении 4 вместо термина «протокол постановки ПЦР предлагается для молекулярно-генетической диагностики *T. benhamiae* и *M. canis*» корректнее использовать термин «предлагается для молекулярно-генетической идентификации...», т.к. ПЦР использовали для секвенирования и определения вида, а не для детекции патогенов в клиническом материале.

Заданные вопросы имеют уточняющий характер и не снижают ценность рецензируемой работы.

Заключение. Диссертационная работа Смагуловой Айнуры Муратовны на тему «Фенотипические и молекулярно-генетические свойства возбудителей дерматомикозов мелких домашних и диких плотоядных животных», является законченной самостоятельной научно-исследовательской работой, предлагающей новые знания по этиологии дерматофитозов животных, и практические решения по усовершенствованию диагностики этих распространённых инфекций. По актуальности темы, объёму проведенных исследований и новизне полученных результатов диссертация Смагуловой А.М. соответствует требованиям пункта п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней ВАК», а ее автор заслуживает присвоения ему искомой степени кандидата биологических наук по специальностям: 4.2.3. – инфекционные болезни и иммунология животных; 1.5.6 – биотехнология.

Отзыв на диссертацию и автореферат рассмотрен на расширенном совещании сотрудников лаборатории микологии и антибиотиков им. А.Х. Саркисова ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (протокол № 1 от 02 мая 2024 г).

Заведующий лабораторией
микологии и антибиотиков им. А.Х. Саркисова
ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН,
кандидат биологических наук

Овчинников Роман Сергеевич

Главный научный сотрудник
лаборатории микологии
и антибиотиков им. А.Х. Саркисова
ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН,
доктор биологических наук, доцент

Капустин Андрей Владимирович

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

Подписи Овчинникова Р.С., Капустина А.В. заверяю:

Специалист по кадрам
ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН



И.А. Захарова

02.05.2024 г.