

На правах рукописи

Смагулова Айнура Муратовна

**Фенотипические и молекулярно-генетические свойства возбудителей
дерматомикозов мелких домашних и диких плотоядных животных**

4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных
1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Сибирском федеральном научном центре агробιοтехнологий Российской академии наук (СФНЦА РАН) и НАО «Казахский агротехнический исследовательский университет им. С. Сейфуллина»

Научные руководители: доктор биологических наук, профессор
Глотова Татьяна Ивановна;
доктор биологических наук, доцент
Кухар Елена Владимировна

Официальные оппоненты: **Логинов Сергей Игоревич**, доктор биологических наук, доцент, ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный аграрный университет», заведующий кафедрой микробиологии и гигиены животных;

Проценко Мария Анатольевна, кандидат биологических наук, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, старший научный сотрудник отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций

Ведущая организация: **ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук»**

Защита состоится «14» июня 2024 г. в «10⁰⁰» часов на заседании диссертационного совета 24.1.211.02, созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского федерального научного центра агробιοтехнологий Российской академии наук (СФНЦА РАН) по адресу: 630501, Новосибирская область, Новосибирский район, р.п. Краснообск, СФНЦА РАН, а/я 463, тел/факс (383) 348-44-62, E-mail: dis.ievsidv@bk.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Сибирской научной сельскохозяйственной библиотеке и на сайте СФНЦА РАН: <https://sfscs.ru>; автореферат размещен на сайте ВАК: <https://vak.minobrnauki.gov.ru>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
канд. ветеринар. наук

Нефедова
Екатерина Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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, встречаются в почве в качестве свободноживущих обитателей. Род *Epidermophyton* включает в себя лишь один вид – *E. floccosum*, который поражает только человека.

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, выделенных от инфицированных собак, кошек и других плотоядных.

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 изолирование культур дерматофитов на питательных средах являются золотым стандартом диагностики дерматофитозов. Однако в некоторых случаях для видовой идентификации может потребоваться дополнительное изучение биохимических свойств выделенных культур дерматофитов. Поэтому видовой 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).

Изучению особенностей распространения и проявления дерматомикозов 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).

Молекулярные методы являются перспективными для прямого обнаружения ДНК грибов в клинических образцах и их видовой идентификации (N. Kondori et al., 2013). Особенно актуально это сейчас 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 иденти-

фикации дерматофитов в некоторых странах (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).

Применение молекулярно-генетических методов для изучения спектра грибов, вызывающих поражения кожи и шерстного покрова, позволит значительно расширить видовой состав дерматофитов, патогенных для мелких домашних и диких плотоядных животных.

Степень разработанности темы исследования

Дерматофитозы относятся к инфекционным заболеваниям, не подлежащим строгой отчетности, из-за их низкой опасности для здоровья человека, что затрудняет изучение их распространенности. За рубежом обязательному микологическому исследованию подвергаются все животные с дерматологическими проблемами, а также пациенты ветеринарных клиник с другими патологиями, что позволяет установить объективную картину распространенности дерматофитозов среди животных. Кроме того, в плановом порядке обследуют животных в приютах, зоомагазинах и у частных владельцев, которые могут быть потенциальными источниками скрытого миконосительства. В Российской Федерации и в Республике Казахстан исследования на дерматомикозы проводятся только в случаях выявления клинически больных животных, поступающих в ветеринарные клиники. Диагноз чаще всего основывается на результатах использования УФ-лампы с фильтром Вуда и прямой микроскопии проб биоматериала.

Проведение комплексного клинического и микологического исследования проб биологического материала, полученных от мелких домашних и диких плотоядных животных с поражениями кожи и шерстного покрова, изучение спектра возбудителей дерматофитозов и их биологических свойств, а также обобщение и систематизация фенотипических и молекулярно-генетических свойств возбудителей позволят внести существенный вклад в диагностику дерматофитии плотоядных.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы является изучение фенотипических и молекулярно-генетических свойств возбудителей дерматомикозов мелких домашних и диких плотоядных животных, а также усовершенствование методов диагностики.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

1. Изучить распространенность и этиологическую роль различных видов дерматофитов в заболевании мелких домашних и диких плотоядных животных.
2. Определить культурально-морфологические свойства выделенных культур дерматофитов.
3. Изучить биохимические, иммунологические свойства дерматофитов, выделенных от мелких домашних и диких плотоядных животных.
4. Усовершенствовать методы лабораторной диагностики дерматофитозов

мелких домашних животных.

5. Провести молекулярно-генетические исследования основных возбудителей дерматофитозов и биоинформационный анализ полученных данных.

Научная новизна работы.

Выделены и охарактеризованы 19 штаммов *Microsporum canis* – возбудителей микроспории плотоядных, продуцентов специфических антител.

Впервые выделены, идентифицированы и охарактеризованы два штамма дерматомицета *Trichophyton benhamiae* как возбудители микоза кожи домашних кошек, нуклеотидные последовательности которых депонированы в GenBank.

Разработан способ получения цветного антигена, который используют в модифицированной реакции роз бенгал пробы для диагностики микроспории у кошек и собак.

Отработан не прямой вариант ИФА с антигеном *M. canis* №13 для диагностики микроспории плотоядных.

Разработан протокол постановки полимеразной цепной реакции для генетической идентификации грибов *Microsporum canis* и *Trichophyton benhamiae*.

Научная новизна исследований подтверждена получением двух патентов на изобретение Республики Казахстан: № 30026 Способ серологической диагностики микроспории плотоядных и № 30172 Штамм гриба *Microsporum canis F-МС-13*, используемый для получения специфических антигенов и антител при разработке методов диагностики микроспории плотоядных, а также Евразийского патента № 029205 Способ серологической диагностики микроспории плотоядных.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты исследований представляют теоретическую и практическую ценность, так как дают возможность совершенствования диагностики дерматомикозов домашних и диких животных.

Цветной антиген и иммунная сыворотка используются в качестве компонентов при постановке реакции роз бенгал пробы для экспресса диагностики микроспории кошек и собак в диагностических ветеринарных лабораториях, молекулярно-генетический метод идентификации дерматомицетов применяется в научном процессе Научно-исследовательской платформы сельскохозяйственной биотехнологии КАТИУ им. С. Сейфуллина и Национального центра биотехнологии МЗ РК.

Нуклеотидные последовательности штаммов грибов *Microsporum canis* и *Trichophyton benhamiae* депонированы в международной базе данных NCBI и могут быть использованы для сравнительного анализа генома возбудителей и биоинформационного анализа мировым научным сообществом.

Разработанные методические рекомендации по выделению и идентификации *Trichophyton benhamiae* – возбудителя дерматомикозов кошек предназначены для использования в работе научно-исследовательских и практических учреждений ветеринарного профиля при диагностике дерматомикозов животных.

Методология и методы исследования

В работе были использованы клинические, микологические, биохимиче-

ские, биотехнологические, молекулярно-генетические, статистические методы исследования. Методология диссертационной работы спланирована в соответствии с ее структурой и задачами исследования. Объектами научного исследования являлись изоляты и штаммы грибов-дерматофитов. Научная литература, касающаяся тематики исследования, была проанализирована формально-логическими методами.

Положения, выносимые на защиту:

1. Результаты изучения распространения дерматофитозов среди животных-компаньонов в г. Астана за 2012-2023 гг.;
2. Видовой состав и этиологическая значимость грибов, являющихся возбудителями дерматофитозов у мелких домашних и диких плотоядных животных;
3. Культурально-морфологические свойства возбудителей дерматофитозов;
4. Биохимические, иммунологические свойства, анализ чувствительности возбудителей дерматофитозов к противогрибковым препаратам;
5. Результаты усовершенствования методов лабораторной диагностики дерматофитозов мелких домашних животных;
6. Молекулярно-генетический и биоинформационный анализ основных возбудителей, выделенных от мелких домашних и диких плотоядных животных.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность результатов, полученных в ходе выполнения диссертационной работы, подтверждена статистической обработкой данных, актами комиссионных испытаний, утвержденных в установленном порядке.

Основные результаты исследований были доложены на: Международной научно-теоретической конференции «Роль ветеринарной науки и практики в эффективном развитии животноводства» (Алматы, 2012), научно-теоретической 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.г.т. Гвардейский, 2015), Международной конференции «Молекулярная диагностика» (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).

Публикации результатов исследований. По материалам диссертации опубликованы 23 научные работы, в том числе 4 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ («Сибирский вестник сельскохозяйственной науки», «Ветеринария сегодня» и «Проблемы медицинской микологии»); 4 статьи – в базах, индексируемых Scopus (Journal of pure and applied microbiology, Advances in Animal and Veterinary Sciences, International Journal of Veterinary Science, Medical Mycology Case

Reports).

Структура и объем работы. 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.

Автор выражает искреннюю благодарность научным руководителям: главному научному сотруднику лаборатории биотехнологии – диагностический центр Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СФНЦА РАН, д-ру биол. н., проф. Гловой Т.И.; директору научно-исследовательской платформы сельскохозяйственной биотехнологии НАО «Казахский агротехнический исследовательский университет им. С. Сейфуллина», д-ру биол. н., доц. Кухар Е.В.; заведующему лабораторией Биоразнообразия и генетических ресурсов Национального центра биотехнологии МЗ РК, PhD, доц. Кияну В.С., а также канд. мед. н., доценту кафедры микробиологии, вирусологии имени Ш.И. Сарбасовой «Медицинский университет – Астана» Байдуйсеновой А.У. за оказание практической и консультационно-методической помощи.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследований

Работа выполнена в 2012-2023 гг. в ветеринарных клиниках г. Новосибирска Российской Федерации и г. Астана Республики Казахстан, где были отобраны пробы биоматериала от животных с подозрением на микроспорию плотоядных.

Первичное выделение и идентификация культур грибов проводились в лаборатории биотехнологии-диагностический центр ИЭВСиДВ СФНЦА РАН. Детальное изучение культурально-морфологических и молекулярно-генетических свойств дерматомицетов проводилось в лаборатории коллективного пользования Научно-исследовательской платформы сельскохозяйственной биотехнологии.

Результаты получены в рамках выполнения одной инициативной темы, бюджетного гранта МСХ РК и грантового финансирования МОН РК по проекту ИРН AP19678812.

В работе были использованы клинические, микологические, биохимические, биотехнологические, молекулярно-генетические, статистические методы исследования. Научная литература, касающаяся тематики исследования, была проанализирована формально-логическими методами.

Объектами исследования являлись 198 проб биоматериала, 41 штамм грибов-дерматофитов.

Результаты исследований

Особенности распространения дерматофитозов среди животных-компаньонов в г. Астана за 2012-2023 гг.

В период с 2012 по 2023 гг. было исследовано 198 проб биоматериала, отобранных от домашних и диких плотоядных животных на выявление возбудителей микозов кожи. В 51% случаев от животных были выделены грибы микромицеты. Среди них встречались классические возбудители дерматофитозов *Microsporum* spp. (17,7%) и *Trichophyton* spp. (3,0%), а также возбудители оппортунистических микозов: плесневые и дрожжеподобные грибы различных видов. Превалирующими возбудителями микозов у домашних животных все чаще становятся оппортунистические плесневые грибы (28,8%). Дрожжи выявлены всего в 1,5% случаев. В 48,9% – рост микромицетов отсутствовал (31,2%), либо наблюдался рост бактериальной флоры (16,3%).

Болезнь регистрировали в любое время года, но чаще всего весной и осенью, реже – летом и зимой. Рост заболевания отмечали в марте-апреле и в сентябре-октябре, заметное снижение частоты случаев микроспории было в июле и декабре. В 2019-2020 гг. у собак и кошек чаще выявляли трихофитию, а с 2021 г. – микроспорию.

Особенности клинического проявления атипичной формы дерматомикозов у домашних и диких животных

В ходе выполнения работы выявлены случаи постановки неверного диагноза у домашних питомцев и диких животных в ветеринарных клиниках г. Астаны. При клиническом осмотре у животных регистрировали очаги поражения в виде алопеций, пролиферации и гиперемии в области живота и внутренней поверхности задних конечностей с расчесами. По совокупности клинических признаков и симптомов поражений, выявленных у животных, поставлены предварительные диагнозы «микроспория», себорея, «пищевая аллергия», «демодекоз», «острый генерализованный малассезиоз», трихофития.

Микроскопия проб биоматериала выявила наличие грибного мицелия и спор, имеющих сходство между собой. Это потребовало проведения молекулярно-генетической идентификации, что позволило достоверно идентифицировать выделенные культуры в каждом конкретном случае.

Рассмотренные нами клинические случаи дерматомикозов у домашних и диких плотоядных, подтверждают сложности и длительность установки диагноза при атипичных и стертых клинических формах проявления инфекции.

Изучение культурально-морфологических свойств *M. canis*

В результате микологического исследования проб биоматериала выделили 35 штаммов *M. canis*: 26 – от кошек, 8 – от собак, 1 – от тигра. Характеристика штаммов *M. canis* при первичном выделении показала наличие культурально-морфологических признаков, характерных для данного вида дерматофитов (рисунки 1).

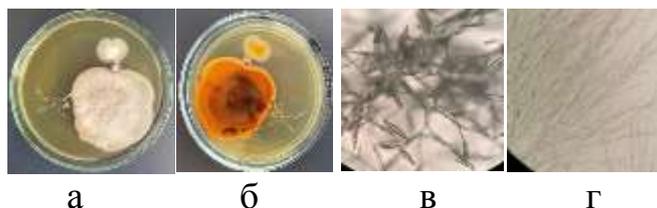


Рисунок 1 – Рост *M. canis* на питательных средах и микроморфология (а – лицевая, б – обратная сторона колонии, в – макроконидии, г – мицелий)

Были выявлены характерные светло-бежевые колонии, окраска реверзума, наличие или отсутствие пигмента в субстрате, разрывы питательной среды, а при микроскопии – макроконидии (в) и тонкий ровный септированный мицелий (г).

При микроскопии чистых культур в поле зрения просматривали однородный тонкий ровный септированный, бамбукообразный мицелий, с ракетовидными утолщениями на концах, редкие грушевидные микроконидии, макроконидии веретенообразной формы с четко выраженным сегментированием от 5 до 7 сегментов, очень редко до 8, что позволило идентифицировать данные культуры как возбудителя микроспории вида *Microsporum canis*.

Культурально-морфологическая идентификация *T. benhamiae*

Было выделено 6 штаммов *Trichophyton* spp. В результате полного микологического исследования проб биоматериала два штамма дерматомицетов были охарактеризованы как *Trichophyton* spp., морфологически сходных с *M. canis*. В дальнейшем при генотипировании они были идентифицированы как *T. benhamiae*.

Культурально-морфологическими исследованиями установлено, что штаммы отличались разнообразием фенотипических признаков (рисунок 2).

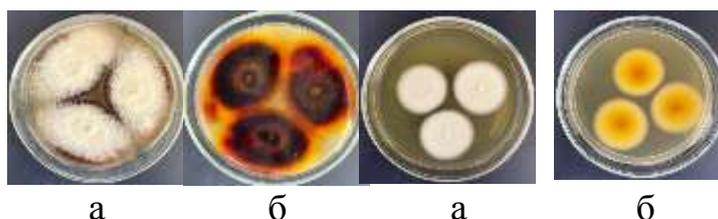


Рисунок 2 – Штаммы *T. benhamiae*, агар Сабуро, 28 °С, 20 суток (а – лицевая сторона, б – реверзум)

Штаммы *T. benhamiae* формировали на агаре Сабуро мучнистые круглые с кратеровидным центром колонии со стелющимся бежево-кремового цвета слегка порошистым или мучнистым мицелием. Субстратный мицелий и обратная сторона колоний были окрашены в оранжево-коричневый цвет. Растущий край колонии был ровным.

Микроскопия позволила выявить у обоих штаммов *T. benhamiae* наличие септированного бамбукообразного мицелия с характерным ветвлением и макроконидиями с двухконтурной клеточной стенкой с заметной перетяжкой, а

также наличие микро- и макроконидий, сидящих на гифах, и формирующихся артростпор (рисунок 3).

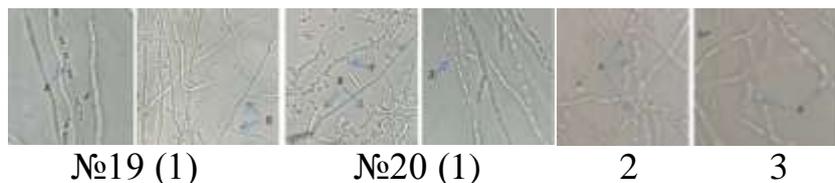


Рисунок 3 – Строение мицелия (1), макроконидий (2) и микроконидий (3) у штаммов *T. benhamiae*: на агаровых блоках; 28°C; ×400, 3 сут., стрелкой указаны перетяжки (7 сут.)

Таким образом, при изучении культурально-морфологических свойств *T. benhamiae*, выделенных от домашних кошек, выявили принципиальные морфологические отличия мицелия и споровых форм дерматомицетов *T. benhamiae* от *M. canis*.

Сахаролитическая и уреазная активность дерматомицетов

Сахаролитическую активность выделенных штаммов дерматомицетов *T. benhamiae* и *M. canis* изучали с применением сред Гисса, уреазную активность – среды Кристенсена.

Отдельные штаммы *M. canis* отличались отсутствием способности расщеплять маннит, либо лактозу. Выявлена высокая активность ферментов мальтазы и сахаразы у всех штаммов *M. canis*. При этом, часть штаммов имели низкую уреазную активность (67%), либо она отсутствовала (33%).

Штаммы *T. benhamiae* обладали низкой активностью в отношении маннита, активно сбразивали сахарозу, слабее – мальтозу, глюкозу и лактозу, активно расщепляли мочевины. Установили, что штаммы *T. benhamiae* отличались более высокой сахаролитической и уреазной активностью, чем штаммы *M. canis*.

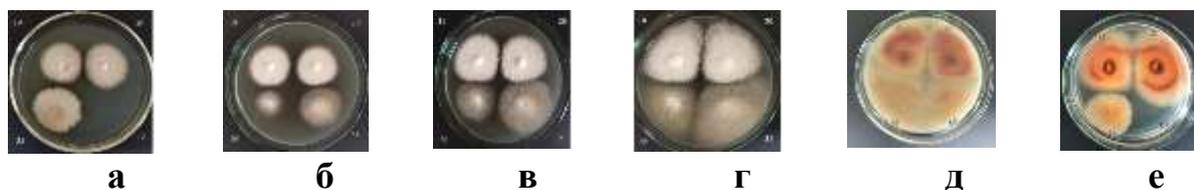
Кератинолитическая активность штаммов дерматомицетов, выделенных от мелких домашних и диких плотоядных животных

Оба штамма *T. benhamiae* проявили выраженные кератинолитические свойства в тесте на перфорацию волос, на модифицированных средах Сабуро с добавлением гидролизата кератина из кошачьей шерсти либо мелко измельченной кошачьей шерсти.

Выявили обильный рост на поверхности волоса, появление заметных «колышков» либо изъеденности поверхности волоса. Аналогичные результаты получены на волосах при заражении их *M. canis*. Штаммы *M. canis* на волосах проявили более выраженные кератинолитические свойства, чем *T. benhamiae* (рисунок 4).

Видовые отличия в проявлении культурально-морфологических характеристик более отчетливо были выражены у штаммов грибов при росте на средах с кератином. Поверхность колоний на контрольной среде была более нежно структурированная, бархатистая, на среде с кератином – более зернистая и плотная. На средах с добавлением гидролизата кошачьего кератина (б, в, г) от-

мечали увеличение скорости роста у грибов, активности формирования мицелия и спор, изменения окраски и структуры колоний, по сравнению с контрольной средой (а), особенно у *T. benhamiae*.



а – контроль, 8 сутки, б – колонии, 8 сутки, в – колонии, 10 сутки, г – колонии, 14 сутки

Рисунок 4 – Рост колоний дерматомицетов на среде Сабуро с добавлением гидролизата кератина (а-г) либо мелко изрезанных волос (д-е)

При росте на среде Сабуро с добавлением мелко измельченной кошачьей шерсти штаммы *T. benhamiae* формировали колонии с ярко выраженной пигментацией реверзума и зональностью накопления пигмента (д-е).

Наличие выраженных кератинолитических свойств у штаммов является доказательством их этиологической роли в развитии патологии кожи и ее производных у домашних кошек.

Чувствительность дерматомицетов к противогрибковым препаратам

Штаммы дерматомицетов были исследованы на наличие или отсутствие чувствительности к противогрибковым препаратам: клотримазолу, кетоконазолу, флуконазолу, амфотерицину, нистатину.

Анализ чувствительности штаммов *T. benhamiae* к противогрибковым препаратам показал, что оба штамма высокочувствительны к клотримазолу, особенно, к кетоконазолу. Штаммы *M. canis* высокочувствительны к кетоканазолу и клотримазолу. При этом у всех штаммов *M. canis* чувствительность ко всем противогрибковым препаратам по истечении трех суток снижалась. Однако, на штаммы *T. benhamiae* клотримазол оказывал более длительный фунгицидный эффект, полностью подавляя их рост и увеличивая зону лизиса.

Особенности получения и характеристика антигенов дерматомицетов

Антигены *T. benhamiae* и *M. canis* получали методом глубинного их культивирования при 28°C в течение 15 дней с периодическим перемешиванием при 140 об/мин. Максимальный выход биомассы отмечали у *T. benhamiae* №19 – 11,92 г.

Полученную биомассу использовали для получения корпускулярных и растворимых белковых антигенов дерматомицетов. Концентрация белка в растворимых антигенах составила 0,07-0,10 мг/мл, полисахаридов 0,05-0,07 мг/мл.

Агглютинирующие свойства всех растворимых антигенов дерматомицетов выявлены в КРА и РМА. При этом более выраженные агглютинирующие свой-

ства установили у антигенов *T. benhamiae* №20 и *M. canis* №26. У антигенов *T. benhamiae* №19 и *M. canis* №68 выявлены слабовыраженные агглютинирующие свойства. В РКА с нативным корпускулярным антигеном процесс сопровождался выпадением хлопьев и зерен агглютинации в течение 0,5-1 минуты, хорошо заметных на темном фоне. При постановке модифицированной реакции по типу роз бенгал пробы с сыворотками крови больных кошек и цветным антигеном *T. benhamiae* и *M. canis* выявлено образование хлопьев агглютинации в течение 10-15 секунд. Полученные нами антигены обладают высокими агглютинирующими свойствами, которые сохраняются при постановке различных вариантов реакции агглютинации. Цветные корпускулярные антигены перспективны в разработке диагностических агглютинирующих тестов.

При постановке реакции преципитации отметили, что штаммы *T. benhamiae* обладают слабовыраженными преципитирующими свойствами, а у штаммов *M. canis* они отсутствуют.

Для изучения иммуногенной активности антигенов провели иммунизацию белых лабораторных мышей по Фридлянской И.И. (1988) белковыми антигенами *T. benhamiae* и *M. canis* с концентрацией белка 0,06-0,1 мкг/мл. Анализ иммунных сывороток крови мышей в непрямом варианте ИФА показал наличие титров антител до 1:6400.

Результаты тестирования растворимых антигенов в различных серологических реакциях представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты тестирования растворимых антигенов в различных серологических реакциях

Белковые антигены дерматомицетов	Результаты в			
	РА	РБП	РИД	ИФА
<i>T. benhamiae</i> №19	+	++	+	1:6400
<i>T. benhamiae</i> №20	+	+	-	1:800
<i>M. canis</i> №26	+	+	-	1:6400
<i>M. canis</i> №68	+	+/-	-	1:6400

Примечание: «-» - реакция отрицательная; «+» - реакция положительная; «+/-» - реакция сомнительная.

Установили, что антигены *T. benhamiae* и *M. canis* обладают агглютинирующими свойствами; белковые растворимые антигены различных дерматомицетов обладают антигенностью, иммуногенностью и активностью в ИФА; штамм *T. benhamiae* №19 и штаммы *M. canis* проявили выраженные иммуногенные свойства.

Отработка параметров постановки непрямого варианта ИФА для диагностики микроспории плотоядных

При отработке параметров постановки непрямого варианта ИФА для диагностики микроспории подбирали оптимальную концентрацию антигена, время и условия сенсibilизации носителя, определяли диагностический титр.

Определили, что оптимальным является использование в ИФА белкового

растворимого антигена с концентрацией 0,10 мг/мл, конъюгата – в разведении 1:5000, продолжительность сенсibilизации антигена – от 2 до 18 часов. Это позволяет выявлять титры антител у белых мышей до 1:12800.

Испытание диагностической эффективности ИФА проводили с использованием проб сывороток крови от здоровых и больных микроспорией кошек, больных микроспорией собак: 23 пробы сыворотки крови от кошек, в том числе, 11 – от здоровых животных, 12 – от заболевших животных; 6 сывороток крови – от собак, больных микроспорией.

Результаты исследования свидетельствуют о том, что в сыворотках крови здоровых кошек в двух случаях титр антител составил 1:100, в семи – 1:200, в двух – 1:400. В сыворотках крови от больных кошек титры антител составляли от 1:400 до 1:12800. При этом показатель оптической плотности (ОП) у всех больных животных превышал значение ОП отрицательного контроля в 9 и более раз.

Анализ данных показал, что у всех больных животных с ярко выраженными клиническими признаками микроспории выявляются высокие титры антител к возбудителю *M. canis* (1:400 и выше). У клинически здоровых кошек с выявленными титрами 1:400, на 21-25 дни отмечали проявление признаков дерматомикозов. Это свидетельствует о возможности выявления инфицированных животных до формирования у них клинических признаков заболевания. Исходя из этого, считаем, что титр антител 1:400 может быть установлен как диагностический (таблица 2, 3).

Таблица 2 – Результаты исследования проб сыворотки крови от здоровых и больных кошек методом непрямого ИФА

n = 3, при P < 0,05

Сыворотки крови здоровых кошек	Титр	Показатель ОП сывороток при 1:100	Сыворотки крови заболевших животных	Титр	Среднее значение оптической плотности
1	1:100	0,132±0,14	1	1:400	0,329±0,23
2	1:200	0,262±0,17	2	1:800	0,340±0,21
3	1:100	0,201±0,15	3	1:6400	0,578±0,32
4	1:200	0,264±0,18	4	1:400	0,298±0,16
5	1:200	0,298±0,21	5	1:12800	1,166±0,27
6	1:200	0,291±0,22	6	1:6400	0,626±0,24
7	1:200	0,218±0,19	7	1:6400	0,678±0,26
8	1:200	0,235±0,23	8	1:800	0,315±0,19
9	1:400	0,342±0,27	9	1:12800	1,298±0,33
10	1:200	0,214±0,16	10	1:6400	0,602±0,19
11	1:400	0,285±0,21	11	1:1600	0,492±0,18
			12	1:800	0,421±0,17
K ⁺ ср.= 0,393					
K ⁻ ср.= 0,032					

Таблица 3 – Результаты исследования проб сыворотки крови от собак методом непрямого ИФА

№	Сыворотки крови собак	Титр	Показатель ОП сывороток при 1:100
1	1 – собака Анталия, 6 лет	1:6400	0,467±0,25
2	3 – собака Рося, 4 года	1:800	0,358±0,27
3	9 – собака Бастер, возраст не указан	1:400	0,228±0,16
4	18 – собака Бленди, возраст не указан	1:25600	1,171±0,31
5	1.2 – собака Ника, 10 лет	1:100	0,185±0,14
6	3.1 – собака, возраст не указан	1:25600	1,142±0,31
K ⁺ ср.= 0,385			
K ⁻ ср.=0,069			

Возможность выявления титров антител к *M. canis* в разведении сывороток до 1:25600 с помощью растворимого белкового антигена, указывает на высокую его активность, поэтому он может быть использован при постановке непрямого ИФА.

Таким образом, разработанный непрямой вариант ИФА с растворимым антигеном обладает высокой активностью и чувствительностью и может быть использован для диагностики микроспории плотоядных животных.

Молекулярно-генетическая характеристика возбудителей дерматомикозов

Для подтверждения результатов видовой идентификации выделенных нами культур дерматомицетов провели их исследование молекулярно-генетическими методами. Выделение ДНК проводили по трем методам (методы А, В, С), отличающимся различным составом экстрагирующего буфера, рН и концентрацией реагентов. При сравнении результатов установлено, что оптимальный выход ДНК получен при использовании метода А (средняя концентрация ДНК – 586 нг/мкл). В дальнейшем подбирали праймеры для идентификации дерматомицетов (таблица 4).

Таблица 4 – Последовательности олигонуклеотидных праймеров для ПЦР

№	Маркерный участок	Последовательность праймера	Источник
1	ITS4/ITS5	F TCCTCCGCTTATTGATATGC R GGAAGTAAAAGTCTAACAAGG	Schoch C. L. et al., 2012
2	ITS1/ITS4	F: TCCGTAGGTGAACCTGCGG R: TCCTCCGCTTATTGATATGC	White T.J. et al., 1990
3	SSU (NS1/NS4)	F: GTAGTCATATGCTTGTCTC R: CTTCGTC AATTCCTTTAAG	White T.J. et al., 1990
4	26S (D1/D2)	F: CTTGGTCATTTAGAGGAAGTA R: GGTCCGTGTTTCAAGACGG	Мокроносова М.А. и соавт., 2012

После постановки ПЦР с использованием всех пар праймеров ITS4-ITS5, ITS1/ITS4, 26S (D1/D2), SSU (NS1/NS4) пробы ДНК очищали для секвенирования.

По результатам типирования с использованием праймеров маркерного ге-

нома SSU и D1/D2, дерматомицеты идентифицированы до генетически близких родов, семейств или не были идентифицированы. Универсальные праймеры ITS1/ITS4 и ITS4/ITS5 позволили идентифицировать возбудителей при проведении молекулярно-генетических исследований до определения вида возбудителей.

Для предотвращения образования шлейфа и димеризации праймеров нами были отработаны температурные режимы отжига праймеров для каждого рода *Microsporium ssp.* (59°C) и *Trichophyton ssp.* (57,5°C).

На следующем этапе исследований провели постановку ПЦР с подобранными праймерами и отработанными параметрами температурного режима их отжига. Анализ результатов, показал, что отработанные параметры постановки ПЦР, позволяют получить ампликоны с молекулярной массой на уровне 759 пар нуклеотидов для ДНК, выделенной от *M. canis*, и на уровне 512 пар нуклеотидов – от *T. benhamiae*.

Генетическую идентификацию возбудителей провели по методу Сэнгера. Далее сравнивали полученные нуклеотидные последовательности с референтными последовательностями из международной базы данных NCBI. Расшифрованные нуклеотидные последовательности депонировали в базе данных GenBank.

С целью изучения эволюционной связи между разными видами выявленных дерматомицетов, имеющих общего предка, дальнейшие исследования провели с помощью биоинформационного анализа.

Биоинформационный анализ геномов дерматомицетов

Эволюционный анализ геномов дерматомицетов проводили для выявления родства отдельных возбудителей дерматомикозов, выделенных и идентифицированных нами. Филогенетический анализ проводили в программе математического моделирования MEGAX. Эволюционное родство штаммов, основанное на анализе структур фрагментов последовательности *ITS4F/ITS5R*, отражающие родственные связи дерматомицетов рода *Microsporium* и *Trichophyton*, было выведено с использованием метода Neighbor-Joining (объединения соседей).

Представленный на рисунке 6 оптимальный вариант дерева построен в масштабе, показывающим эволюционное расстояние, соответствующее 200 заменам на каждые 100 нуклеотидных последовательностей. Анализ включал 29 нуклеотидных последовательностей (*M. canis* – красный цвет, *T. benhamiae* – белый) с включенными позициями 1-м+2-м+3-м+некодирующими.

Из рисунка 5 видно, что эволюционное происхождение всех проанализированных штаммов *M. canis* имеет азиатские корни. Штаммы *T. benhamiae* эволюционно происходят от европейских предков.

Эволюционное дерево, основанное на анализе структур фрагментов последовательности *ITS1F/ITS4R*, было получено путем применения метода соединения соседей к матрице попарных расстояний, эволюционным расстоянием, соответствующим 250 заменам на каждые 100 нуклеотидных последовательностей. Проведен анализ 23-х нуклеотидных последовательностей (*M. canis* – красный, *T. benhamiae* – зеленый). Включенные позиции кодонов были 1-й+

2-й+3-й+некодирующий. Всего в окончательном наборе данных было 1337 позиций.

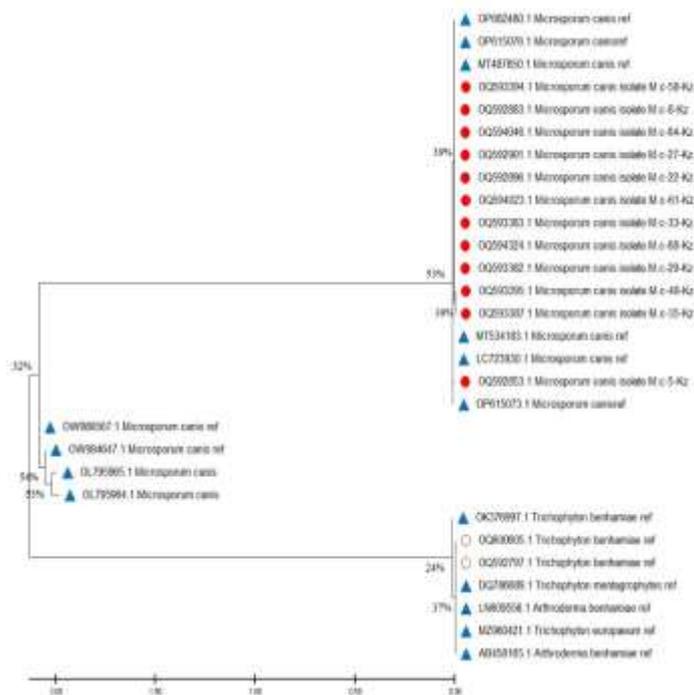


Рисунок 5 – Филогенетическое дерево, основанное на анализе структур фрагментов последовательности *ITS4F/ITS5R*

Построение филогенетического дерева, основанное на отражении родственных связей дерматомицетов, показало, что независимо от использования разных пар праймеров возбудители рода *Microsporum* и *Trichophyton* во всех случаях достоверно распределены по разным кладам (рисунок б).

Для сравнения релевантной последовательности рДНК межгенной области видов *M. canis* и *T. benhamiae* были подобраны последовательности из внешней группы исследуемых видов. Выявлен высокий уровень гомологии последовательностей 5.8, 18, 28S рРНК межгенной области видов *M. canis*. Ряд последовательностей имеют всего по одной нуклеотидной замене, что указывает на точечную мутацию. Казахстанский штамм OQ594324.1 имеет одну мононуклеотидную вставку. Штамм *T. benhamiae* №20 не содержит замен нуклеотидов и полностью гомологичен референтным штаммам. У штамма *T. benhamiae* №19 имеются дополнительные нуклеотидные вставки и точечные мутации. Все нуклеотидные последовательности штаммов *T. benhamiae* практически гомологичны. Три последовательности (MT261760.1, KU496914.1 и OK376997.1) имеют по одной мутации в каждой. Две нуклеотидные вставки выявлены у штаммов *T. mentagrophytes* MT261760.1 и KU496914.1. Данные штаммы находятся в одной кладе, не являются представителями вида *T. benhamiae*, что достоверно повышает специфичность диагностического теста и позволяют дифференцировать представителей одного рода.

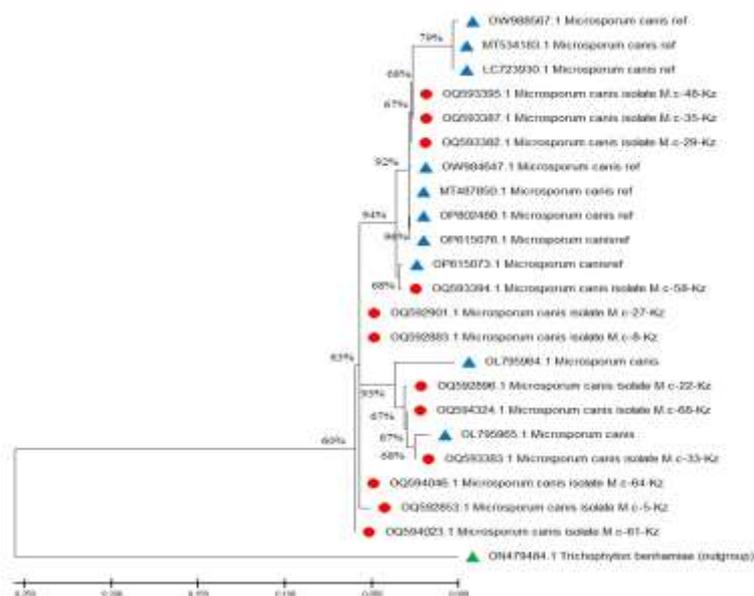


Рисунок 6 – Филогенетическое дерево, основанное на анализе структур фрагментов последовательности *ITS1F/ITS4R*, отражающие родственные связи дерматомицетов рода *Microsporium* и *Trichophyton*

Таким образом, нами проведен эволюционный анализ геномов дерматомицетов для выявления родства отдельных возбудителей дерматомикозов. Подобраны пары праймеров и температурный режим отжига для дерматомицетов рода *Microsporium* и *Trichophyton*, позволяющий с высокой точностью проводить видовую идентификацию. На основе полученных индивидуальных номеров нуклеотидных последовательностей построены филогенетические деревья, определено эволюционное родство штаммов. Расшифрованные нуклеотидные последовательности в количестве 21 депонированы в международной базе данных GenBank.

Исходя из полученных данных, следует отметить важность идентификации и дифференциации видов возбудителей дерматофитозов. Особенно актуальным это является для *T. benhamiae* – нового возбудителя дерматомикоза кошек, впервые выделенного на территории России.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дерматофиты занимают важное место в структуре возбудителей заболеваний кожи и ее производных у собак и кошек, а также других видов плотоядных животных. В последние годы заболеваемость людей и животных дерматофитами, вызванными грибами родов *Microsporium* и *Trichophyton*, не снижается. Для повышения эффективности терапии этих заболеваний необходимо проводить изучение фенотипических, биологических и молекулярно-генетических свойств возбудителей, в том числе – усовершенствование методов их диагностики.

В данной работе были проведены исследования по изучению распространения дерматофитозов среди собак и кошек, а также диких плотоядных животных.

Выделены культуры возбудителей и охарактеризованы их фенотипические, биологические и молекулярно-генетические свойства. Кроме того, большое внимание уделено разработке и усовершенствованию методов их идентификации и лабораторной диагностики.

По результатам исследований сделаны следующие **выводы**:

1. В результате проведенных микологических исследований 198 проб биоматериала от домашних и диких животных из 3,0% проб выделены грибы рода *Trichophyton* spp., а из 17,7% – *Microsporum* spp. Из 28,8% проб биоматериала выделены оппортунистические плесневые грибы (*Mucor* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp.); из 1,5% – дрожжеподобные грибы (*Candida* spp., *Rhodotorula* spp., *Exophiala* spp.). Из 31,2% проб биоматериала микромицеты не выделены, а из 16,3% – изолированы бактерии.

2. Изучение культурально-морфологических свойств возбудителей дерматомицетов выявило у них характерные видовые особенности и разнообразие фенотипических признаков. Основным отличием *T. benhamiae* и *M. canis* является характер роста колоний на питательных средах, окраска реверзума, характер накопления и цвет пигмента, особенность морфологических микроструктур. Установлено, что дерматофитии, вызванные *T. benhamiae* и *M. canis* у плотоядных могут иметь схожие клинические признаки, что затрудняет диагностику заболевания.

3. Впервые на территории Западной Сибири выделен, идентифицирован и описан новый вид дерматофитов – *T. benhamiae*, как возбудитель дерматофитии кошек. Изучены его культурально-морфологические, биохимические, антигенные и молекулярно-генетические свойства.

4. Выявлена резистентность штаммов *T. benhamiae* и *M. canis* к противогрибковым препаратам. 90% штаммов грибов были устойчивыми к амфотерицину и флуконазолу, большинство – слабо чувствительны к нистатину. Для лечения дерматофитии кошек и собак, вызванной *T. Benhamiae*, следует использовать препараты, относящиеся к азоловой группе: клотримазол и кетоконазол.

5. Получены растворимые преимущественно белковые антигены с концентрацией белка 0,125 мг/мл, корпускулярные нативные и цветные антигены с концентрацией белка в среднем 0,09 мг/мл. Они обладают выраженной иммуногенностью, проявляют активность в непрямом варианте ИФА, позволяют выявлять титры специфических антител в пробах сыворотки крови переболевших и иммунизированных животных в разведениях от 1:200 до 1:6400.

6. Корпускулярные и растворимые антигены дерматомицетов обладают выраженными агглютинирующими и слабыми преципитирующими свойствами. Наличие агглютинирующих свойств подтверждено капельной реакцией агглютинации и при постановке модифицированной роз бенгал пробы. Преципитирующие свойства выявлены только у антигенов *T. benhamiae* №19 при постановке РИД.

7. Генетическая идентификация возбудителей по методу Сэнгера со сравнительным анализом полученных нуклеотидных последовательностей с референтными последовательностями дерматомицетов из базы данных NCBI позволила идентифицировать их до вида. Нуклеотидные последовательности выде-

ленных нами штаммов *M.canis* и *T. benhamiae* депонированы в базу данных GenBank.

8. Сравнительный анализ геномов грибов рода *Microsporium* и *Trichophyton* с референтными штаммами установил невысокий уровень внутривидового полиморфизма и точечных мутаций нуклеотидных последовательностей генов 5.8, 18, 28S рРНК ITS-области, которые можно использовать для выявления дерматомицетов родов *Trichophyton* и *Microsporium* в пробах биоматериала.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Депонированные штаммы дерматомицетов *M. canis* и депонированные в GenBank их нуклеотидные последовательности рекомендуются в качестве референтных при идентификации возбудителей дерматомикозов.

2. Цветные корпускулярные антигены *M. canis* могут быть использованы в качестве компонента в модифицированной реакции по типу роз бенгал пробы для экспресса диагностики микроспории плотоядных;

3. Непрямой вариант ИФА с использованием в качестве специфического компонента растворимого белкового антигена *M. canis* рекомендуется использовать для серологической диагностики микроспории плотоядных.

4. Отработанный протокол постановки ПЦР предлагается для молекулярно-генетической диагностики *T. benhamiae* и *M. canis*.

5. Разработаны «Методические рекомендации по выделению и идентификации *Trichophyton benhamiae* – возбудителя дерматомикозов кошек», утвержденные ученым советом СФНЦА РАН протокол №1 от 16.02.2023.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ

1. Кухар, Е.В. Подбор метода выделения ДНК из дерматомицетов и других микромицетов / Е.В. Кухар, А.М. Шарипова, А.Б. Шевцов // Проблемы медицинской микологии. – 2013. – Т.15, № 2. – С. 95.

2. Смагулова, А.М. Выявление плеоморфных вариантов *Microsporium canis* среди казахстанских изолятов / А.М. Смагулова // Проблемы медицинской микологии. – 2023. – Т. 25, № 2. – 2023. – С. 177-178.

3. Смагулова, А.М. Биологические и молекулярно-генетические свойства *Trichophyton benhamiae* – нового возбудителя дерматомикозов кошек / А.М. Смагулова, Е.В. Кухар, Т.И. Глотова, А.Г. Глотов // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2023. – Т. 53, № 1. – С. 53-61.

4. Смагулова, А.М. Филогенетический анализ дерматофитов, выделенных от мелких домашних животных /А.М. Смагулова, Е.В. Кухар, Т.И. Глотова, А.Г. Глотов // Ветеринария сегодня. – 2023. – Т. 12, № 3. – С. 259-264.

Публикации в изданиях, входящих в базу цитирования Scopus

5. Kukhar, E.V. Identification of Dermatofungi Pathogens by Multilocus Sequence Typing Method / E.V. Kukhar, **A.M. Sharipova**, A.B. Shevtsov // Journal of pure and applied microbiology. – 2015. – Vol. 9(3). – P. 1-7.

6. Kukhar, E.V. Identification of Dermatofungi Isolated from People and Animals with Dermatophytoses on the Territory of Kazakhstan / E.V. Kukhar, V.S. Kiyani, **A.M. Smagulova**, A. Nikulina // Advances in Animal and Veterinary Sciences: Q4, SJR – 0,15 IF 19. Adv. Anim. Vet. Sci. – 2019. – Vol.7(s1). – P. 21-27.

7. Generalized dermatophytosis of combined etiology in a circus tiger (*Panthera Tigris Altaica*) / Y.V. Kukhar, **A.M. Smagulova**, V.S. Kiyani // International Journal of Veterinary Science. 2022. – Vol.11(4). – P. 552-556.

8. First record of *Trichophyton benhamiae* isolated from domestic cats in Russia / **A.M. Smagulova**, Ye.V. Kukhar, T.I. Glotova, A.G. Glotov, A.S. Kim // Med Mycol Case Rep. 2023. – Vol.40. – P.16-21.

Патенты

9. Патент 30026 Республика Казахстан, (19)KZ(13)B(11)30026. Способ серологической диагностики микроспории плотоядных / Е.В. Кухар, В.С. Киян, Т.И. Глотова, Т.Б. Тугунова, **A.M. Шарипова**, А.И. Никулина, А.В. Паламарчук; заявит. и патентообл. АО «КАТУ им. С. Сейфуллина». – № 2013/1797.1; заявл. 29.11.2013; опубл. 15.06.15, Бюлл. № 6. – 6 с.

10. Патент 30172 Республика Казахстан, (19)KZ(13)B(11)30172. Штамм гриба *Microsporium canis F-MS-13*, используемый для получения специфических антигенов и антител при разработке методов диагностики микроспории плотоядных / Е.В. Кухар, Н.А. Панченко, **A.M. Шарипова**, А.И. Никулина; заявит. и патентообл. АО «КАТУ им. С.Сейфуллина». – № 2014/0017.1; заявл. 10.01.2014; опубл. 15.07.15, Бюлл. № 7. – 6 с.

11. Евразийский патент 029205, G01N 33/547(20006.01) C12N 1/14(20006.01) C12Q1/28(20006.01) Способ серологической диагностики микроспории плотоядных / Е.В. Кухар, В.С. Киян, **A.M. Шарипова**, Т.И. Глотова, Т.Б. Тугунова, А.В. Паламарчук; заявит. и патентообл. «КАТУ им. С. Сейфуллина» 28.02.2018 г. – №201400374; заявл. 27.12.2013; опубл. 28.02.2018. Бюлл. ЕАПО, № 3. – 6 с.

Публикации в других изданиях

12. **Шарипова, А.М.** Влияние компонентов питательной среды на морфологические и культуральные свойства грибов / А.М. Шарипова // Сейфуллинские чтения – 8: материалы. Респ. науч.-теорет. конф. – Астана, 2012. – С. 128-129.

13. **Шарипова, А.М.** Фенотипическая и биохимическая характеристика штамма *Trichophyton mentagrophytes* / А.М. Шарипова // Химия и жизнь: материалы XII Межд. науч.-практ. студ. конф. – Новосибирск, 2013. – С. 196-199.

14. **Шарипова, А.М.** Сравнение праймеров ITS и SSU при идентификации грибов-дерматомицетов / **A.M. Шарипова** // Сейфуллинские чтения – 9: материалы Респ. науч.-теорет. конф. – Астана, 2013. – С. 123.

15. Киян, В.С. Создание коллекции грибов – возбудителей дерматомикозов животных и человека / В.С. Киян, **А.М. Шарипова**, Е.В. Кухар // Ломоносов – 2014: XXI Межд. науч. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых. – М., 2014. – С. 211-212.
16. Кухар, Е.В. Получение и очистка антигенов *Microsporium canis*, *Trichophyton interdigitale* и *Trichophyton rubrum* / Е.В. Кухар, Б.А. Курманов, В.С. Киян, Е.В. Егорчева, **А.М. Шарипова** // Проблемы теории и практики современной ветеринарной науки: сб. научн. тр. КазНИВИ. – Алматы, 2014. – С. 104-111.
17. Кухар, Е.В. Культурально-морфологические, биохимические свойства и молекулярно-генетическая характеристика *Microsporium canis* / Е.В. Кухар, Н.А. Панченко, **А.М. Шарипова**, Т.И. Глотова, А.Г. Глотов // Российский ветеринарный журнал. – 2014. – № 5. – С. 23-26.
18. Kukhar, E.V. The analysis spectrum of the causative agent of dermatomycosis animals in Kazakhstan / E.V. Kukhar, V.S. Kiyani, **A.M. Sharipova** // Материалы Межд. науч.-практ. конф., посвящ. 80-лет. заслуженного ученого, проф. В.Л. Зайцева. – п.г.т. Гвардейский, 2015. – С. 190-194.
19. Глотова, Т.И. Заболеваемость микроспорией плотоядных среди популяции кошек г. Нур-Султан / Т.И. Глотова, Е.В. Кухар, **А.М. Смагулова** // Abstracts of Conference. London (September 27-29, 2021). – P. 207-209.
20. Смагулова, А.М. Молекулярно-генетические свойства *Microsporium canis* / А.М. Смагулова, Т.И. Глотова, Е.В. Кухар, В.С. Киян, А.Г. Глотов // Молекулярная диагностика: сб. Межд. конф. – М., 2021. – С. 177-178.
21. Несипбаева, А.Е. Получение цветного антигена *Microsporium canis* и его активность в агглютинирующем тесте / А.Е. Несипбаева, **А.М. Смагулова** // Сейфуллинские чтения – 18: материалы Межд. науч.-теорет. конф. – Астана, 2022. – Т.1., Ч. 3. – С. 10-12.
22. Смагулова, А.М. Анализ чувствительности нового возбудителя дерматофитии кошек *Trichophyton benhamiae* к фунгицидным препаратам / А.М. Смагулова // Сб. мат. межд. науч.-практ. конф., посвящ. 80-лет. акад. НАН РК, д-ра ветеринар. наук, проф. Т. Сайдулдина. – Алматы, 2023. – С. 445-453.
23. Смагулова, А.М. Спектр возбудителей микозов кожи у домашних и диких животных в Казахстане и Западно-Сибирском регионе России / А.М. Смагулова, Т.И. Глотова, Е.В. Кухар // Успехи медицинской микологии. – 2023. – Т. 25. – С. 37-41.